

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA
Y FARMACIA**

**"Suplementación dietaria con probióticos en ratas con
cáncer de colon inducido por dimetilhidrazina y en
tratamiento con quimioterapia."**

Tesis presentada por:
Bioquímica Graciela Gigola
para optar al grado académico de **Dr. en Bioquímica**

Directora de Tesis

Prof. Dra. Gabriela del Valle Perdigón:

Profesora Titular con dedicación exclusiva. Cátedra de Inmunología. Facultad de Bioquímica,
Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán.
Investigadora Superior de CONICET.

Agradecimientos

- A la Dra. Prof. Gabriela del Valle Perdigón por ser mi guía en el desarrollo del presente trabajo de tesis, por su constante apoyo y perseverancia.
- A los Prof. Juan Eduardo Pérez y Horacio Vicente Maturi por su tarea como supervisores locales y su aliento permanente.
- Al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur por permitirme desarrollar los trabajos de investigación en esta Unidad Académica.
- Al Laboratorio Biosidus, Argentina y a la Dra. Marta Cassini, por proveer con total desinterés el probiótico empleado en el trabajo.
- A mis compañeros de la Cátedra de Anátomo-Histología, Lic. Fernanda Elías, Bioq. Hebe Lofrano, Ayudantes Alumnos Natalia Ullua, Gabriel Melatini y Gonzalo Martín Arrieta por su invaluable colaboración.
- Al Personal del Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Méd. Vet. Guillermo Lemus y técnicos Rolando Olave, Walter Correa y Miguel Domínguez, por su presencia incondicional.
- A la Técnica Histológica Liliana Albornoz, por sus consejos y ayudas.
- A la Méd. Patóloga Patricia Gómez, por la realización en los diagnósticos histopatológicos.
- Al Dr. Ariel Zwenger, por sus necesarios y generosos aportes.
- A los Méd. Jorge Picorel y Alejandro Adducci.
- A la Lic. Virginia Corbella por el análisis estadístico.
- A la Lic. María Soledad Melatini por el procesamiento de la droga oncológica.

Dedico esta tesis a los animales de laboratorio, sin los
cuales éste y tantos otros trabajos científicos
no serían posibles,

a mi familia,
por estar siempre.

Índice

Introducción	1
Beneficios potenciales del yogur sobre la función intestinal y la salud	4
Efecto probiótico y de las leches fermentadas: yogur y enfermedades del aparato digestivo	8
Intolerancia y mala digestión de lactosa	8
Las enfermedades diarreicas	11
Enfermedad inflamatoria intestinal	13
Helicobacter pylori	15
Las reacciones alérgicas	16
El cáncer de colon	18
Carcinogénesis colónica	21
Modelos experimentales en cáncer de colon	26
1,2 -Dimetilhidrazina dihidroclorato (1,2 - DMH)	28
Teorías carcinogénicas del cáncer de colon inducido por 1,2-Dimetilhidrazina.	32
Factores constitucionales y regulación.	34
Mucosa colónica normal y tumoral de rata	39
Morfología de la mucosa colónica de rata.	39
Descripción de las lesiones inducidas con DMH	45
Tratamiento del cáncer de colon	46
Objetivos	48
Materiales y métodos	51
Animales del estudio	52
Historias clínicas	52
Parte diario	53
Eutanasia	53
Estudios macroscópicos. Necropsia y disección.	53
Carga tumoral.	55
Estudios histológicos. Procesamiento de muestras para microscopía.	55
Protocolo general.	55
Inmunofluorescencia para recuento de células IgA positivas.	55
Técnica de inmunohistoquímica.	56
Índice de expresión inmunohistoquímica	57
Estudios bacteriológicos. Recuento de lactobacilos y anaerobios totales en materia fecal.	58
Materiales. 1,2-Dimetilhidrazina.	58
Bioflora®	59
Capecitabina	60
Diseños experimentales	61
Desarrollo de un modelo de carcinogénesis colorrectal por inducción con dimetilhidrazina.	61
Modelo de inducción de cáncer colorrectal con suplemento de Bioflora®.	62
Modelo de inducción de cáncer colorrectal con suplemento de Bioflora® y tratamiento con capecitabina.	63
Historia clínica	65
Planilla de autopsia	66
Parte diario	67
Resultados	68

Desarrollo de un modelo de carcinogénesis colorrectal por inducción con dimetilhidrazina.	69
Relación entre la dosis de Bioflora® y la respuesta inmune asociada.	74
Efecto de un probiótico sobre tumores colorrectales inducidos con 1,2 dimetilhidrazina en ratas.	82
Efecto de la administración de probióticos en la sobrevida de ratas Wistar-Lewis en tratamiento con capecitabina para cáncer de colon inducido por 1,2-dimetilhidrazina.	94
Apéndice	102
Conclusiones	106
Bibliografía	114

INTRODUCCIÓN

El yogur es uno de los alimentos más antiguos producidos por el hombre. Nadie sabe con certeza cuánto tiempo ha estado el yogur entre nosotros, pero la mayoría de los historiadores sitúan su descubrimiento entre 9000 y 6000 años AC. La evidencia sugiere que en el año 9000 AC el hombre del Neolítico en Asia Central tenía ganado doméstico, caballos y camellos, y que consumían su leche. Se supone que el descubrimiento del yogur pudo haber sido accidental, un error del hombre primitivo tratando de conservar la leche en un clima cálido. Así fue descubierto el proceso de fermentación y el yogur no sólo sobrevivió hasta los tiempos modernos, sino que se extendió por todo el mundo.

Una teoría del descubrimiento del yogur es que el hombre primitivo almacenaba la leche en los intestinos de los animales. Las enzimas que estaban presentes en los intestinos podrían haber comenzado el proceso de fermentación inicial. Otra teoría indica que, cuando se sacrificaban animales, los hombres observaban que la leche que éstos habían consumido cambiaba su estado y se dispuso a crear una leche fermentada intencionalmente. Cualquiera sea la verdadera historia detrás de su descubrimiento, el yogur se extendió desde Asia Central hasta el Medio Oriente y Europa y luego a todo el mundo.

El yogur aparece en muchos textos antiguos, incluyendo las antiguas escrituras indias Ayurveda, los textos bíblicos e históricos de Plinio, Herodoto, Homero y Galeno. En Génesis 18:8, Abraham pudo haber servido yogur y leche a sus invitados: “Entonces él tomó cuajada, leche y el becerro que había preparado, y lo puso delante de ellos. Y estuvo con ellos debajo del árbol mientras comían.”

Se cree que el gran guerrero mongol Genghis Khan consumía leche de yegua fermentada, denominada *kumis*. Mongoles de todos los niveles sociales lo bebían, pero era de particular importancia para los guerreros, pues se creía que no solo los mantenía saludables, sino que los hacía más valientes ante sus enemigos.

Existe registro histórico que en el siglo XVI un médico turco salvó la vida del rey Francisco I, tratándolo con yogur elaborado con leche de cabra. El rey había estado sufriendo algún tipo de enfermedad intestinal que ningún medicamento parecía curar. Esta cura maravillosa trajo un nuevo repunte de la popularidad del yogur como un alimento saludable, aunque nadie sabía cómo actuaba sobre el organismo.

Mientras el yogur continuó con su popularidad, tanto por su sabor único y supuestos beneficios, no fue hasta principios del siglo XX que éstos últimos comenzaron a estudiarse. Un científico ruso llamado **Elie Metchnikoff** estudió los beneficios para la salud de la leche fermentada en el pueblo de Bulgaria; determinó que las bacterias en los productos lácteos cultivados como el yogur ayudan a reducir la cantidad de

microorganismos nocivos en el intestino, llegando a escribir un libro, *La prolongación de la vida: Estudios de una filosofía optimista*.

En los últimos años se han publicado numerosos estudios sobre los efectos beneficiosos del yogur y de las cepas bacterianas utilizadas en la producción del mismo. Estas bacterias productoras de ácido láctico incluyen cepas de *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Los efectos del yogur y las bacterias lácticas (BL) en la salud gastrointestinal han sido investigados en modelos animales y ocasionalmente en humanos. Algunos estudios emplean yogur, especies individuales de BL o ambos, mostrando beneficios promisorios en la salud para algunas patologías gastrointestinales como la intolerancia a la lactosa, la constipación, las diarreas, el cáncer de colon, la enfermedad inflamatoria intestinal, la infección por *Helicobacter pylori* y las alergias. Los pacientes con alguna de estas patologías se verían beneficiados por el consumo de yogur. Estos beneficios estarían relacionados con la microbiota y el tránsito intestinal, y el mejoramiento de la respuesta inmune innata y adaptativa (1).

Ciertas especies bacterianas usadas en la producción de yogur y seleccionadas de la microbiota intestinal tienen propiedades antipatogénicas y antiinflamatorias. Estos microorganismos están involucrados con una resistencia mejorada a la colonización del intestino por bacterias patógenas, lo que ha llevado a la introducción de nuevas terapias y profilaxis basadas en el consumo de monocultivos y cultivos mixtos de microorganismos vivos denominados probióticos. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, Food and Agriculture Organization) define a los probióticos como microorganismos vivos que cuando son administrados a un huésped en cantidades adecuadas le confieren beneficios para la salud más allá de los inherentes a la nutrición (2).

El yogur es el alimento más conocido que contiene probióticos. El Código Alimentario Argentino lo define en su artículo 576 - (Res. MSyAS N° 295, 14.04.99) como “el producto incluido en la definición 1.1. cuya fermentación se realiza con cultivos protosimbóticos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subsp. *termophilus* a los que en forma complementaria pueden acompañar otras bacterias ácido-lácticas que, por su actividad, contribuyen a la determinación de las características del producto terminado.”

En el apartado 1.1 define a las leches fermentadas como “productos, adicionados o no de otras sustancias alimenticias, obtenidos por coagulación y disminución del pH de la leche o leche reconstituida, adicionada o no de otros productos lácteos, por fermentación

láctica mediante la acción de cultivos de microorganismos específicos. Estos microorganismos específicos deben ser viables, activos y abundantes en el producto final durante su período de validez.”

Numerosos estudios sugieren efectos terapéuticos beneficiosos de las BL sobre la salud. Sin embargo, los resultados han sido inconsistentes, tal vez debido a diferencias en las cepas de BL, las vías de administración, y los procedimientos de investigación utilizados en estos estudios.

La composición de nutrientes del yogur se basa en la composición de nutrientes de la leche de la que se deriva. Otras variables que juegan un rol durante el procesamiento de la leche, incluyendo la temperatura, la duración de la exposición al calor, la exposición a la luz y las condiciones de almacenamiento, también afectan el valor nutritivo del producto final. Además, los cambios en los componentes de la leche que se producen durante la fermentación láctica influyen en el valor nutricional del producto acabado. La composición final nutricional del yogur también se ve afectada por las especies y cepas de bacterias utilizadas en la fermentación, el origen y tipo de sólidos de leche, que se pueden añadir antes de la fermentación, y la temperatura y la duración del proceso de fermentación (1).

Beneficios potenciales del yogur sobre la función intestinal y la salud.

Microbiota intestinal: los lactobacilos forman parte de la biota microbiana del intestino delgado y grueso. La capacidad de la microbiota intestinal no patógena, como las BL, para asociarse y unirse al borde en cepillo intestinal es un atributo importante de las bacterias probióticas que impide el acceso a la mucosa gastrointestinal de los agentes patógenos perjudiciales (3). Para tener un efecto, las BL deben adaptarse al ambiente intestinal del huésped y ser capaces de sobrevivir en el tracto intestinal (4-7). La supervivencia de las BL es influenciada por el pH gástrico así como por la exposición a las enzimas digestivas y sales biliares (6), y es diferente en las distintas especies (7).

Comparando cuatro cepas de bifidobacterias (*B. infantis*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, y *B. longum*) se observó que *B. longum* fue el más resistente a los efectos del ácido gástrico (8). *Bifidobacterium animalis* resultó tener una alta tasa de supervivencia durante el tránsito intestinal en humanos (9).

El efecto del consumo de yogur fermentado con *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. casei* sobre la microbiota fecal de niños sanos de entre 10-18 meses fue estudiado por Guerin-Danan y col. (10). Observaron un mayor número de niños con *Lactobacillus* en la

materia fecal después de la ingesta de yogur, mientras que no se vieron afectados el número total de anaerobios, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y enterobacterias. En un grupo de pacientes ancianos con gastritis atrófica e hipoclorhidria, *Lactobacillus gasserii* sobrevivió al paso por el tracto gastrointestinal, pero no se recuperaron *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* (7). También se ha demostrado que *Bifidobacterium* sp. sobrevive al paso por el tracto gastrointestinal, detectándose concentraciones fecales hasta 8 días luego de la ingesta (11).

Otro factor importante que limita la supervivencia de los lactobacilos en el tracto gastrointestinal superior es la capacidad inherente de adherirse a las células epiteliales (6). Con el uso de microscopía electrónica de barrido, Planta y Conway (12) estudiaron 16 cepas de *Lactobacillus* por su capacidad para asociarse con las placas de Peyer y los tejidos linfoides intestinales en ratones. Dos de las 16 cepas investigadas, *L. acidophilus* y *L. bulgaricus*, son de interés porque están relacionadas con el yogur. Se encontró, tanto *in vitro* como en modelos *in vivo* utilizando ratones BLB/c, que *L. bulgaricus* no se asocia con las placas de Peyer o el tejido linfoide asociado a mucosa. *L. acidophilus* tenía un bajo grado de asociación con las placas de Peyer y ninguna asociación con el tejido linfoide de las vellosidades intestinales. Sin embargo, los autores afirman que las cepas de *Lactobacillus* probados mostraron altas tasas de supervivencia cuando se administraron por vía oral.

También se ha descrito la capacidad de LB para disminuir la invasión gastrointestinal por bacterias patógenas (3,13). Bernet y col. (3) reportaron una relación dosis-dependiente de *L. acidophilus* mediada por la inhibición de la adhesión de *Escherichia coli* enteropatógenas y *Salmonella typhimurium* a las células Caco-2. Además, *L. acidophilus* inhibe la entrada de *E. coli*, *S. typhimurium* y *Yersinia pseudotuberculosis* en esta línea celular. En otro informe, los mismos autores describieron efectos inhibitorios similares en dos cepas de *Bifidobacterium*, *B. breve* y *B. infantis* (13). Además, es posible que la capacidad de las BL para competir con patógenos por la adhesión a la pared intestinal esté influenciada por la fluidez de la membrana. Esta posibilidad fue sugerida por estudios que indican que el tipo y cantidades de ácidos grasos poliinsaturados en el medio extracelular influirían en las propiedades adhesivas de las BL al epitelio (14, 15).

Respuesta inmune asociada a mucosa: el tejido linfoide de la mucosa del tracto gastrointestinal desempeña un papel importante como primera línea de defensa contra los patógenos ingeridos. Las interacciones de las BL con el revestimiento de la mucosa epitelial del tracto gastrointestinal, así como con las células linfoides que residen en el intestino, se han sugerido como los mecanismos más importantes por los cuales las BL mejoran la función inmune en el intestino. Se han identificado varios factores que contribuyen a las

actividades inmunomoduladoras y antimicrobianas de las BL, incluyendo la producción de pH bajo, ácidos orgánicos, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, etanol y diacetilo, el agotamiento de los nutrientes y la competencia por el espacio disponible (2, 16, 17).

El tracto gastrointestinal posee un complejo sistema inmunológico. El sitio principal del sistema inmune en el intestino se conoce como tejido linfoide asociado a mucosa, que se puede dividir en sitios inductivos y efectoros. En el intestino delgado, los sitios inductivos están en las placas de Peyer, que consisten en grandes folículos linfoides. El componente efector más definido del sistema inmune adaptativo es la inmunoglobulina A secretora (IgA-S.) La IgA-S es la inmunoglobulina principal de la respuesta inmune humoral, que junto con la respuesta innata proporciona protección contra los antígenos microbianos en la superficie de la mucosa intestinal (18). En los individuos sanos, la IgA-S inhibe la colonización del intestino por bacterias patógenas, así como la penetración de la mucosa por antígenos. Al menos el 80% de todas las células plasmáticas del cuerpo, fuente de IgA-S, se encuentran en la lámina propia intestinal a lo largo del intestino delgado. La IgA es la inmunoglobulina más abundantemente producida en el cuerpo humano. La producción de IgA-S intestinal requiere la presencia de la microbiota comensal (19), lo que indica que la producción de IgA-S intestinal es inducida en respuesta a la estimulación antigénica. Aún no está claro, sin embargo, cómo los linfocitos B de la lámina propia se activan para convertirse en células plasmáticas secretoras de IgA o como la microbiota intestinal influye en este proceso. La mayoría de los estudios sobre el efecto de la leche fermentada o de BL específicas sobre la función inmune intestinal se han centrado en sus efectos adyuvantes en el intestino.

También se ha estudiado la capacidad de las BL para modular la concentración de IgA en el intestino. La administración oral de *L. acidophilus*, *L. casei* y la alimentación con yogur incrementa tanto la producción de IgA como el número de células IgA secretoras en el intestino delgado de ratones de manera dosis-dependiente (16). De forma similar, un informe de Puri y col. (20) indicó que las concentraciones séricas de IgA inducidas por *S. typhimurium* fueron significativamente mayores en los ratones alimentados con yogur durante un período de 4 semanas que en los ratones de control alimentados con leche. Este informe sugiere que la IgA secretada por las células B intestinales entra en la circulación y aumenta la concentración de IgA en el suero. Así, el efecto sobre la producción de IgA debido a la ingesta de yogur puede darse a nivel intestinal y sistémico. El mismo estudio demostró también que en los ratones alimentados con yogur, los linfocitos tuvieron una

mayor respuesta proliferativa inducida por mitógenos en el intestino frente a *S. typhimurium* que los del grupo control.

En un estudio realizado en humanos, Link-Amster y col. (21) demostraron que el título de IgA específica anti-*S. typhimurium* fue 4 veces mayor en los sujetos alimentados con leche fermentada con *L. acidophilus* que en los sujetos del control alimentados con dieta sin leche fermentada. Las concentraciones totales de IgA-S también aumentaron en los sujetos que consumieron leche fermentada.

Los macrófagos juegan un rol importante en la respuesta inmune innata en el intestino y representan una de las primeras líneas de defensa inespecífica contra la invasión bacteriana. Perdígón y col. estudiaron los efectos sobre los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos de la alimentación con leche fermentada con *L. casei* o *L. acidophilus* o ambos en ratones suizos (22). Demostraron que la alimentación con estas BL durante 8 días aumentó la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales *in vitro* e *in vivo* y la producción de anticuerpos. La activación del sistema inmune se inició el día 3, alcanzó un máximo en el día 5, y disminuyó ligeramente en el día 8 de alimentación. La actividad fagocítica fue impulsada aún más en los ratones que recibieron una sola dosis de leche fermentada en el día 11 de la alimentación.

La modulación de la producción de citoquinas por el yogur y las BL ha sido objeto de varios estudios. Además de la interleuquina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α), que son producidos principalmente por los macrófagos, los linfocitos T son la fuente de la mayoría de las citoquinas investigadas en dichos informes. Las células T son clasificadas en dos categorías, linfocitos T colaboradores tipo 1 (Th1) y tipo 2 (Th2). Cuando son activadas, estas células producen dos patrones de citoquinas (23). Las células Th1 son las principales productoras de interferón- γ (IFN- γ) e IL-2, y las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Las citoquinas Th1 impulsan la inmunidad mediada por células, y las citoquinas Th2 aumentan la inmunidad humoral. El IFN- γ juega un papel crítico en la inducción de otras citoquinas, en la mediación de los macrófagos y la activación de células natural killer (NK).

Varios informes indican que el consumo de yogur o la ingesta de BL modulan la producción de varias citoquinas, como IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , y TNF- α (24-27). Además, la producción de IFN- γ en un cultivo *in vitro* utilizando linfocitos humanos fue mayor en presencia de BL (*L. bulgaricus* y *S. thermophilus*) que en aquellos sin BL (28). El yogur con *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* vivos, también aumentó el IFN- γ producido por células T purificadas de adultos jóvenes después de 4 meses de alimentación (26).

No han sido investigados los efectos del consumo de yogur en la modulación de la producción de citoquinas en el tracto gastrointestinal humano. Estos estudios, aunque factibles con el uso de muestras de biopsias de intestino de sujetos sanos (29), son difíciles de llevar a cabo.

A pesar de que las citoquinas juegan un papel en la regulación de diversas funciones inmunológicas, algunas de ellas, por ejemplo, la IL-1 β , IL-6 y TNF- α , han recibido más atención que otras, ya que tradicionalmente han sido clasificadas como proinflamatorias y, como tales se sabe que están asociadas con enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (30). Otra variada familia de moduladores inmunes que juegan un papel importante en la salud del tracto gastrointestinal son las quimioquinas y sus receptores (31). En la actualidad, se han publicado pocos datos sobre el efecto del yogur o de sus componentes en la modulación de quimioquinas en el tracto gastrointestinal. Wallace y col. (32) investigaron los efectos de diferentes cepas de *Lactobacillus* sobre la producción de quimioquinas por la línea celular HT-29 de epitelio intestinal. Las tres especies de BL investigadas, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, y *L. delbrueckii*, tuvieron efectos supresores sobre la producción de dos quimioquinas, RANTES (un miembro de la superfamilia de la IL-8) e IL-8, por células HT-29 activadas. Como en el caso de las citoquinas proinflamatorias, estas quimioquinas son necesarias para la función inmune normal. Sin embargo, una alta producción de estas quimioquinas durante una condición inflamatoria se cree que exacerba la respuesta inflamatoria.

Efecto probiótico y de las leches fermentadas: yogur y enfermedades del aparato digestivo

Intolerancia y mala digestión de lactosa

La deficiencia de lactasa en los adultos es la más común de las deficiencias de enzimas conocidas. Más de la mitad de la población adulta mundial es intolerante a la lactosa. En términos de desarrollo, esto no necesariamente es considerado anormal, porque los seres humanos son los únicos mamíferos en los que se sostiene la actividad de la lactasa en el intestino delgado después del destete. En el caso de la mala digestión, la lactosa no digerida permanece en el lumen intestinal, y a medida que alcanza el colon, es fermentada por las bacterias. Los subproductos de este proceso incluyen ácidos grasos de cadena corta tales como lactato, butirato, acetato y propionato. Estos ácidos grasos se asocian con

electrolitos y conducen a una carga osmótica que puede inducir diarrea. Además, la fermentación de la lactosa por las bacterias del colon produce metano, hidrógeno y dióxido de carbono. Estos pueden permanecer en la luz pero finalmente serán excretados en forma de gases o por difusión a la circulación serán exhalados por los pulmones. El hidrógeno exhalado después de una carga de lactosa ha sido utilizado como un indicador indirecto, pero medible, de la mala digestión de lactosa. Otras fuentes de fibra dietética e hidratos de carbono no absorbidos pueden servir como sustratos para la fermentación en el colon lo que se traduce en un aumento de la producción de hidrógeno.

La incapacidad para digerir la lactosa varía ampliamente entre las distintas poblaciones (33, 34). En los Estados Unidos, la prevalencia de intolerancia a la lactosa primaria en adultos es del 53% entre los estadounidenses de origen mexicano, 75% entre los afroamericanos, y el 15% entre los blancos. La prevalencia entre los adultos de América del Sur y África es mayor del 50% y en algunos países asiáticos se acerca al 100%. La intolerancia a la lactosa varía mucho en los países europeos, con una prevalencia de alrededor del 2% en adultos escandinavos a aproximadamente el 70% entre los adultos del sur de Italia (34).

La mala digestión de lactosa puede desarrollarse secundaria a la inflamación o como resultado de la pérdida funcional de la mucosa intestinal (35), lo que puede ser resultado de condiciones tales como la enfermedad de Crohn, la enfermedad celíaca o las infecciones bacterianas y parasitarias. Además, la mala digestión de lactosa puede desarrollarse como consecuencia de la desnutrición severa. El trastorno se expresa clínicamente con calambres abdominales, diarrea y flatulencia después de la ingestión de leche. Sin embargo, la mayoría de las personas con intolerancia a la lactosa pueden soportar pequeñas cantidades (2-10 g) de lactosa en una comida sin presentar síntomas (35).

Es bien sabido que, para muchas personas intolerantes a la lactosa, los productos lácteos fermentados son mejor aceptados que aquellos sin fermentar. Puede haber más de una razón para esto. Durante la fermentación de la leche, la lactosa es parcialmente hidrolizada, lo que se traduce en un menor contenido de lactosa en el yogur que en la leche (36). Sin embargo, esta reducción de lactosa puede no ser significativa, debido a que los sólidos de la leche se añaden normalmente durante el procesamiento. La mayor tolerancia a la lactosa del yogur respecto de la leche entre sujetos intolerantes puede ser debido a la actividad de la lactasa endógena de los microorganismos del yogur (37, 38, 39). Kolars y col. (38) utilizaron una serie de pruebas de hidrógeno en el aliento, así como una evaluación subjetiva para determinar si los sujetos que fueron identificados como intolerantes a la

lactosa digerían y absorbían la lactosa mejor en el yogur que en la leche. El área bajo la curva de hidrógeno fue menor después del consumo de yogur que después del consumo de leche o lactosa en agua, lo que indica una mejor digestión y absorción de la lactosa del yogur. La valoración subjetiva por los sujetos en el estudio de Kolars también indicó que la lactosa en el yogur fue mejor tolerada que la misma cantidad de lactosa en leche o en agua. Utilizando mediciones de hidrógeno en el aliento, Savaiano y col. (39) investigaron los efectos de tres variedades de productos lácteos cultivados en la digestión de lactosa por individuos con deficiencia de lactasa 9. Cuando se compararon el yogur, la leche cultivada y la leche acidificada dulce, se vio que el yogur tuvo el efecto más beneficioso sobre la digestión de la lactosa. La actividad de la lactasa y el número de BL sobrevivientes se reducen significativamente cuando el yogur es pasteurizado.

La actividad enzimática de la lactasa es generalmente estable en respuesta a factores ambientales. Por ejemplo, se demostró que la actividad de la lactasa del yogur se conservó e incluso aumentó cuando el yogur se sometió a un entorno que simulaba la temperatura y los valores de pH bajos del intestino (38). Según lo sugerido por los autores, este estudio apoya la idea de que la lactosa del yogur es hidrolizada una vez que está en el yeyuno. Otros estudios informaron que la actividad de la lactasa es menos estable en respuesta al medio ambiente ácido. Pochart y col. (40) reportaron que la actividad de la lactasa en el yogur se redujo en más de un 80% a un pH de 5,0 en un modelo *in vitro*.

Sin embargo, el calentamiento del yogur disminuye significativamente la actividad de la lactasa, lo que indica que el yogur que ha sido tratado con calor no es tan beneficioso para las personas con intolerancia a la lactosa, sino el yogur que contiene cultivos vivos y activos. Este yogur es mejor para los individuos con malabsorción de lactosa que las leches fermentadas tratadas con calor (41). Durante el proceso de fermentación, la cantidad de lactosa presente en el yogur se reduce. El contenido de lactosa también varía con la duración de almacenamiento después de la fermentación. Además, la actividad de la lactasa bacteriana se corresponde con el tiempo de supervivencia de los lactobacilos después de la ingestión. La digestión mejorada de lactosa se explica en parte por la mejor actividad de la lactasa después de la ingestión de yogur y en parte por otras funciones enzimáticas, tales como la actividad del sistema de transporte de lactosa (permeasa) que permite su entrada a la bacteria probiótica (42, 43). Por otra parte, estudios en animales han sugerido que las BL pueden inducir la actividad de lactasa de las células epiteliales intestinales (44).

Un estudio realizado por Martini y col. (45) sustenta la mediación microbiana de la actividad de la lactasa en el tracto gastrointestinal. Estos autores demostraron que la

actividad de la lactasa en el yogur se mantuvo estable a un pH de 4.0, pero que la disrupción de la célula microbiana resulta en la pérdida del 80% de la actividad enzimática y un aumento del doble en la malabsorción de lactosa en un grupo de pacientes con mala digestión de lactosa.

Aunque se les reconoce a los organismos vivos del yogur la actividad de la lactasa funcional y la contribución a la digestión de la lactosa, su supervivencia en el tracto gastrointestinal es corta. En promedio, un número significativo sobrevive menos de una hora después de la ingestión (38, 41). A pesar de este tiempo de supervivencia un poco limitado, el efecto beneficioso de las BL en la digestión de la lactosa en los individuos que sufren de intolerancia a la lactosa es ahora ampliamente aceptada.

Las enfermedades diarreicas

La diarrea es un problema común entre los niños de todo el mundo que contribuye sustancialmente a las visitas médicas y hospitalizaciones pediátricas (46). Desde principios del siglo XX, se ha planteado la hipótesis de que cultivos de bacterias vivas, tales como los utilizados para la fermentación de productos lácteos, pueden ofrecer beneficios en la prevención y tratamiento de la diarrea (47).

La diarrea aguda es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en los países en desarrollo. Por esta causa mueren más de 2 millones de personas en el mundo por año, la mayoría niños, debido a una alta susceptibilidad y mayor exposición a los agentes causales. La infección entérica puede ser atribuida a distintos agentes infecciosos y la epidemiología depende del huésped, estación del año, exposición, etc. El agua contaminada es un reservorio y fuente importante de agentes causales de diarrea en los países en desarrollo (48). En el mundo más de 1.100 millones de personas no tiene acceso a fuentes de agua segura y 2.400 millones no tienen servicios sanitarios básicos (49). En Argentina más de 8 millones (23%) de habitantes no tienen red de agua potable, mientras que más de 21 millones (57,5%) no cuentan con desagües cloacales (50). Existen también otras fuentes de infección y vías de transmisión asociadas a la diseminación de los enteropatógenos, incluyendo el consumo de otros alimentos contaminados además del agua y la transmisión persona a persona. El tratamiento de rehidratación en la diarrea grave se debe instaurar rápidamente, pero en ciertas ocasiones se necesita además terapia antimicrobiana por la gravedad de la enfermedad o el riesgo de complicaciones (51).

Un metaanálisis de Van Neil y col. (52) encontró que el tratamiento con cepas de *Lactobacillus* ofrece un medio seguro y eficaz para el tratamiento de la diarrea infecciosa aguda en niños. Tanto la duración como la frecuencia de episodios de diarrea se redujeron en comparación con los de los sujetos del grupo control. El beneficio de la terapia con *Lactobacillus* se observa en enfermedades diarreicas causadas por varios patógenos. En un estudio doble ciego, controlado con placebo, se examinó el efecto de *B. bifidum* y *S. thermophilus* en la prevención de la aparición de la diarrea viral aguda en neonatos (53). Los niños que recibieron terapia bacteriana desarrollaron menos diarreas por rotavirus que el de los lactantes alimentados con la fórmula control. La evidencia del efecto beneficioso de las BL sobre la aparición de diarrea de origen bacteriano es más contradictorio, ya que existen reportes beneficios (54, 55) y sin efectos (56, 57) al respecto.

Varios estudios han investigado los efectos de bacterias probióticas en la diarrea asociada con el uso de antibióticos. La causa más probable de este tipo de diarrea es la influencia negativa de los antibióticos sobre la biota indígena de los intestinos (58). La mayoría de los casos de diarrea asociada a antibióticos son leves, y terminan poco después de que la terapia se interrumpe. Un tipo menos común pero más grave de la diarrea asociada a antibióticos se debe al crecimiento excesivo de especies bacterianas patógenas, tales como *Clostridium difficile* que está asociada con la colitis pseudomembranosa (59).

Un metaanálisis evaluó la capacidad de las diferentes especies de BL probióticas para prevenir la diarrea asociada a antibióticos (60). De los 9 estudios que se incluyeron en el análisis, cuatro utilizaron cepas de *Lactobacilos* o una combinación de *Lactobacilos* y *Bifidobacterias* (61-64). De estos 4 estudios, dos mostraron un beneficio significativo del uso de probióticos en comparación con el placebo (63, 64). Los autores concluyeron que las bacterias probióticas suministradas en cápsulas o como yogur pueden ser útiles en la prevención de diarrea asociada al uso de antibióticos.

Los mecanismos por los que las BL pueden proporcionar un efecto beneficioso contra algunos tipos de diarreas son desconocidos. Se ha sugerido que el efecto beneficioso puede provenir de la capacidad de las BL para restablecer la microbiota intestinal, para aumentar la barrera intestinal compitiendo con las bacterias patógenas por la adhesión a los enterocitos o para aumentar la respuesta de la IgA a los patógenos.

Enfermedad inflamatoria intestinal

Enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un término usado para algunas enfermedades crónicas autoinmunes del tracto intestinal. Estas enfermedades crónicas son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, que tienen síntomas similares, pero que afectan el tracto digestivo de maneras muy diferentes (30). La colitis ulcerosa consiste en la inflamación del colon y el recto pero no del tracto gastrointestinal superior, mientras que la enfermedad de Crohn puede afectar a la parte superior del tracto digestivo y por lo tanto puede llevar a una mala absorción de macronutrientes y micronutrientes. Las etiologías de estas enfermedades son desconocidas, pero los estudios sugieren que la microbiota intestinal juega un rol patogénico fundamental (65). Esta idea es apoyada por los modelos animales de la enfermedad de Crohn, en los que la presencia de la microbiota intestinal es absolutamente necesaria para el desarrollo de la enfermedad.

Las citoquinas proinflamatorias, particularmente el TNF- α , también han sido reconocidas en la patogénesis de la enfermedad de Crohn. Sin embargo, pese a las esperanzas, los resultados de los estudios que utilizan antagonistas del TNF- α fueron decepcionantes, y hubo algunos casos de complicaciones graves (66). No obstante, la reducción de la producción, el efecto del TNF- α o ambos en los pacientes con enfermedad de Crohn se consideran beneficiosos. Bourrel y col (27) informaron que la expresión y liberación de TNF- α por los linfocitos intraepiteliales se reduce cuando se co-cultiva la mucosa intestinal inflamada de pacientes con enfermedad de Crohn, en presencia de *L. casei* y *L. bulgaricus*. Normalmente, una mucosa sana proporciona una primera línea de defensa tanto contra la microbiota intestinal como contra los patógenos invasores. Se ha sugerido que las proporciones de la diferente microbiota intestinal se alteran en los pacientes con EII. Por ejemplo, se han demostrado concentraciones más bajas de *Lactobacillus* en las muestras de biopsias de colon y menores concentraciones fecales de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en los pacientes con enfermedad de Crohn que en sujetos sanos (67). Esta alteración en la biota intestinal puede aumentar la oportunidad para la colonización por patógenos y provocar una respuesta proinflamatoria posterior.

En el caso de la EII, una inmunidad de mucosa defectuosa permite una mayor captación de antígenos y mediadores proinflamatorios procedentes de bacterias del lumen. Se ha reportado que los pacientes con EII ven disminuida la protección de la mucosa como resultado de cambios en la composición y el grosor de la mucosa y alteraciones en el estado de glicosilación de las glicoproteínas del epitelio (68). Estos cambios en la mucosa intestinal

también se asocian con disminución de la actividad de IgA y aumento de IgG intestinal, que coincide con un estado reducido de protección y una condición proinflamatoria. Con la barrera debilitada y el aumento de la adherencia de bacterias patógenas a la mucosa, resulta una inflamación sostenida, que conduce a un mayor daño a la mucosa intestinal. En los últimos años, las terapias inmunosupresoras e inmunomoduladores se han vuelto cada vez más frecuente en el tratamiento de estas condiciones, tales como los esteroides que se utilizan desde la década del '60. Aunque eficaz, estos tipos de fármacos puede aumentar la prevalencia de infecciones oportunistas, así como la gravedad de cualquier infección subyacente que pueda estar presente (69). Otros efectos secundarios de estos tratamientos pueden incluir la hepatotoxicidad, fibrosis, linfoma y la supresión patológica de la médula ósea.

El papel beneficioso de la microbiota intestinal en la prevención de la inflamación intestinal se investigó mediante el uso de ratones knockout (IL-10^{-/-}) (70, 71). Estos ratones IL-10 deficientes desarrollan espontáneamente ileocolitis con muchas similitudes con la enfermedad de Crohn en humanos. Además, los ratones afectados responden favorablemente a los fármacos inmunosupresores o inmunomoduladores que son similares a los utilizados para tratar humanos con EII. La actividad inmunomoduladora de la IL-10 se ha estudiado ampliamente. Es ya bien establecido que la IL-10 desempeña un rol inhibitorio en la regulación de la síntesis de citoquinas inflamatorias y en la presentación de antígenos. Así, se ha sugerido a la IL-10 como un inmunomodulador para el tratamiento de la enfermedad de Crohn.

Madsen y col. (70) encontraron que los ratones IL-10^{-/-} tenían aumentada la adherencia de las bacterias a la mucosa del colon lo que precedió al desarrollo de la colitis. Esto ocurrió en paralelo a la disminución del número de *Lactobacillus* en el lumen intestinal. Cuando las concentraciones de *Lactobacillus* en el lumen intestinal se restablecen la colitis se atenúa.

Otro beneficio de las BL en la enfermedad de Crohn puede ser debido a la estimulación de la respuesta de IgA. Un informe de Malin y col. (72) sugiere que la bacterioterapia oral con *L. casei* puede restaurar la respuesta inmune antígeno-específica de IgA en las personas con enfermedad de Crohn. En un estudio anterior (73), la administración oral de *L. casei* a los pacientes con gastroenteritis viral promovió la respuesta mediada por IgA a antígenos específicos y acortó el período de diarrea del paciente.

A pesar de la evidencia experimental que indica que existen efectos beneficiosos de las BL en la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, el mecanismo exacto por el cual las

especies de BL antagonizan la progresión de estas enfermedades es poco conocida. La etiología exacta de la EII también es desconocida, pero es probable que, en personas susceptibles, la EII resulta de una respuesta inflamatoria continua, que puede deberse a un defecto tanto en la regulación de la respuesta proinflamatoria de la mucosa como en la función del epitelio intestinal. En la actualidad, la evidencia sugiere que el yogur y las BL tienen modestos beneficios clínicos y son seguros para su uso en pacientes con estas patologías. Se requieren estudios adicionales para determinar si el yogur es beneficioso como profiláctico o un régimen terapéutico para la EII, o ambos, y para establecer con exactitud qué mecanismos están implicados.

Helicobacter pylori

Han pasado sólo 30 años desde que fue descubierto *Helicobacter pylori*, una bacteria Gram negativa, en forma de espiral que se encuentra en la mucosa gástrica, adherida al epitelio de revestimiento del estómago (74). La ureasa permite que *H. pylori* sobreviva al neutralizar el medio ácido gástrico (75). *H. pylori* produce catalasa, que actuaría en la protección contra los radicales libres liberados por los leucocitos activados. La infección por *H. pylori* se asocia con una infiltración masiva de neutrófilos en la pared gástrica, la producción local de IFN- γ , con citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6 y con la quimioquina IL-8.

Se sabe actualmente que la infección por *H. pylori* juega un rol en la úlcera péptica, la gastritis crónica, el adenocarcinoma gástrico y el linfoma relacionado al tejido linfoide asociado a mucosa. La asociación entre la úlcera duodenal y *H. pylori* también está bien documentada; la infección por *H. pylori* se presenta en más del 90% de los pacientes con úlcera duodenal (76). El tratamiento de esta infección implica el uso de inhibidores de la bomba de protones, en combinación con antibióticos. Sin embargo, el uso de antibióticos para el tratamiento de la infección por *H. pylori* ha sido asociada con efectos adversos y con frecuencia conduce a la aparición de resistencia.

Varios estudios *in vitro* y en animales han demostrado reducción de la viabilidad de *H. pylori* y de la adherencia a las células epiteliales intestinales humanas después del tratamiento con diversas cepas de *Lactobacillus* (77). En una serie de ensayos *in vitro*, Mídolo y col. (78) mostraron que el crecimiento de *H. pylori* fue inhibido por el ácido láctico, independientemente del pH. También encontraron que 6 cepas de *L. acidophilus* y *L. casei* inhibieron el crecimiento de *H. pylori*, mientras que *B. bifidus* y *L. bulgaricus* no lo hicieron.

El efecto inhibitor se correlaciona con las concentraciones de ácido láctico producido por las BL examinadas. En otro estudio, Coconnier y col. (79) informaron que los medios adicionados con *L. acidophilus* redujeron la viabilidad *in vitro* de *H. pylori*, independientemente de las concentraciones de ácido láctico. Además disminuye la adhesión de *H. pylori* a células mucossecretantes HT-29. Varios estudios *in vitro* se llevaron a cabo para determinar si los efectos de las BL en la supervivencia de *H. pylori* son debidos al ácido láctico o a otros productos antibacterianos, tales como las bacteriocinas. De todas las bacteriocinas testeadas, la lacticina producida por *Lactococcus lactis* ha mostrado la mayor actividad cuando se usa contra varias cepas de *H. pylori* (80).

Estudios prometedores sobre los efectos inhibitorios de las BL en la supervivencia de *H. pylori in vitro* se extendieron a estudios *in vivo* utilizando pacientes humanos. Armuzzi y col (81) informaron que, cuando 120 sujetos asintomáticos que fueron positivos para *H. pylori* recibieron un suplemento de *L. casei* GG durante un período de 14 días, además de un régimen estándar de una semana de tratamiento con antibióticos, la erradicación de *H. pylori* fue más rápida que en los sujetos control.

Aunque han sido reportados resultados positivos, los efectos de las BL en la infección por *H. pylori* en humanos siguen siendo ambiguos. Por ejemplo, *L. acidophilus* y *L. gasseri* disminuyen la infección por *H. pylori*, como lo indica la reducción de los valores de [¹³C] urea en la prueba del aliento (82, 83), y la terapia con *L. acidophilus* ha demostrado reducir la inflamación de la mucosa gástrica (82). Sin embargo, las biopsias gástricas no mostraron la erradicación de *H. pylori*. Del mismo modo, Cats y col. (84) informaron que se necesita de *L. casei* viable para inhibir el crecimiento de *H. pylori in vitro*, pero sólo se observó una ligera tendencia significativa hacia un efecto supresor *in vivo* de la leche suplementada con *L. casei*.

Las reacciones alérgicas

Ha sido de interés el estudio de los efectos del yogur y las BL sobre las reacciones alérgicas en el tracto gastrointestinal (85, 86). El retraso en el desarrollo de *Bifidobacterias* y *Lactobacilos* en la microbiota intestinal es un hallazgo general en niños con estas reacciones (85). Isolauri (87) informó datos que sugieren que *Lactobacillus* GG puede utilizarse para prevenir alergias a alimentos.

El tratamiento térmico se ha sugerido como una forma de reducir la capacidad de las proteínas de la leche para causar reacciones alérgicas, lo que haría de la leche una fuente

más adecuada de proteína para las personas con una sensibilización inmunológica a la proteína de leche de vaca (88). Sin embargo, Kirjavainen y col. (86) utilizaron un ensayo clínico aleatorizado doble ciego para investigar los efectos de *L. rhamnosus* GG, inactivado por calor y viable, en lactantes con dermatitis atópica y alergia a la leche de vaca. La fórmula de leche suplementada con *L. rhamnosus* GG viable, pero no la inactivada por calor, mejoró significativamente la dermatitis atópica y los síntomas subjetivos de la alergia a la leche de vaca en los sujetos en comparación con el grupo control. Estos resultados sugieren que, en personas con alergia a la leche vacuna, la presencia de BL viables puede proporcionar beneficios que compensen los posibles efectos perjudiciales que las proteínas sin desnaturalizar de la leche pueden tener en la alergia. Además, la respuesta inmunológica a proteínas de la leche nativas puede diferir de la de proteínas de la leche desnaturalizadas por el calor. Un estudio reciente, utilizando un modelo en ratas, mostró que la β -lactoglobulina desnaturalizada por calor indujo una respuesta inflamatoria local de mucosa, mientras que la β -lactoglobulina nativa indujo una respuesta sistémica mediada por IgE (89). Es probable que la desnaturalización por calor resulte en cambios conformacionales que exponen y/u ocultan epítopes y conducen a la activación de diferentes subpoblaciones de células del sistema inmune y por lo tanto a los distintos resultados finales.

Aún no se conocen los mecanismos de los efectos protectores de las BL en las reacciones alérgicas. Una respuesta proinflamatoria en la mucosa intestinal que es inducida por alérgenos alimentarios puede alterar la función de barrera del intestino. Es posible que las BL puedan prevenir las reacciones alérgicas por tener un efecto protector sobre la función de la barrera intestinal, aunque el mecanismo de dicho efecto no ha sido determinado. También es posible un vínculo más directo entre la función del GALT y las respuestas alérgicas. Uno de los mecanismos primarios de activación de la supresión celular de los eventos pro-inflamatorios en el intestino, después de la activación antígeno-específica, es la secreción de citoquinas supresoras, como TGF- β e IL-10. El TGF- β es producido por los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ derivados de las células T del GALT y es un importante mediador en la supresión activa de la tolerancia oral. Además, el cambio de isotipo de inmunoglobulina de IgM a IgE mediado por IL-4 y la degranulación de mastocitos dependiente de IgE, están involucrados en la patogénesis de la alergia a los alimentos relacionados con enteropatía (90).

Las BL del yogur mejoran la producción de IFN- γ (26, 91), que actúa para inhibir el cambio de isotipo a IgE. La reacción de hipersensibilidad mediada por IgE, también conocida como alergia tipo I, es disparada por el entrecruzamiento de antígenos con

anticuerpos IgE que están unidos a los receptores Fc en las células cebadas. Se informó que *L. casei* inhibe la producción de IgE inducida por antígenos en esplenocitos de ratón (92). Además, las BL inducen la producción de la citoquina inmunosupresora IL-10 (24).

Una combinación de los efectos de mejoría y represivos es el mecanismo más probable por el que las BL pueden tener su acción. Sin embargo, las formas en que las BL u otros componentes del yogur influyen la producción de estas citoquinas inmunorreguladoras en el intestino aún no se han dilucidado, así como tampoco los posibles mecanismos de protección mediados por las BL.

El cáncer de colon.

Según el Instituto Nacional del Cáncer, en los Estados Unidos el cáncer de colon es el segundo más diagnosticado entre las mujeres y los hombres (93). El cáncer de colon es la segunda causa más común de muerte por cáncer. Para 2012 el número estimado de casos nuevos sería de 103.170 para colon y 40.290 para recto y las defunciones para ambos se estiman en 51.690 (www.cancer.gov).

En Argentina es el tercer cáncer más frecuente tanto en hombres como en mujeres (Figuras 1 y 2).

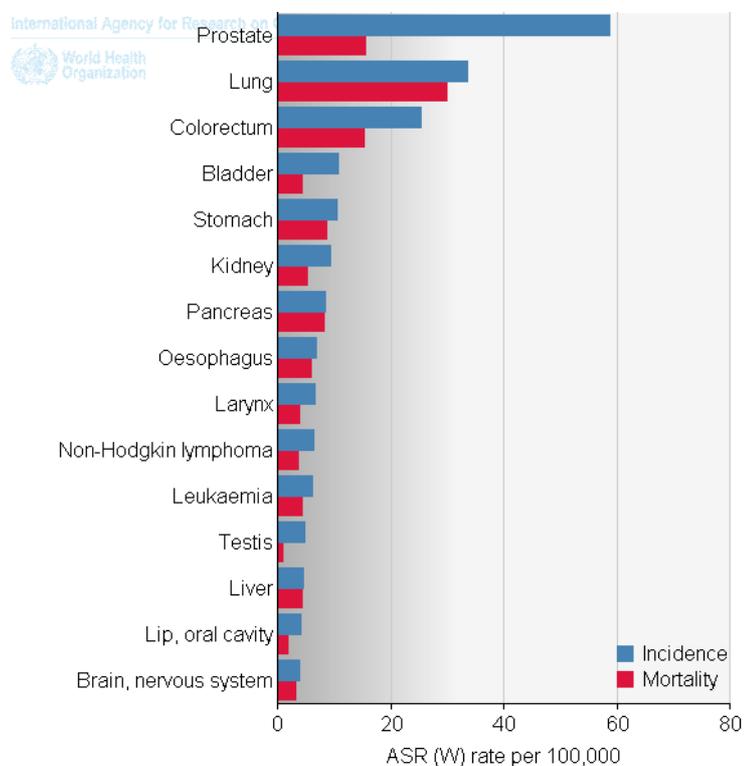


Figura 1: tasa de incidencia y mortalidad por cáncer estandarizadas por edad para hombres.
Fuente: GLOBOCAN 2012, Agencia Internacional para la Investigación sobre el cáncer.

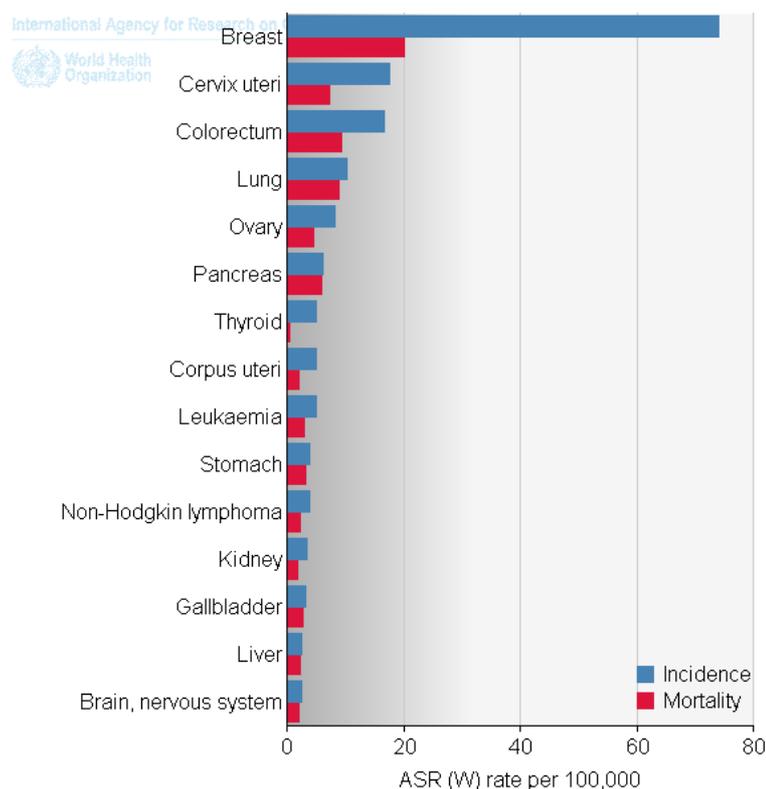


Figura 2: tasa de incidencia y mortalidad por cáncer estandarizadas por edad para mujeres.

Fuente: GLOBOCAN 2012, Agencia Internacional para la Investigación sobre el cáncer.

Los factores de riesgo para el cáncer colorrectal incluyen tanto factores genéticos como ambientales, y varios informes han sugerido que las interacciones entre los factores dietéticos, el epitelio del colon y la biota intestinal son fundamentales para su desarrollo.

En los últimos años se le ha dado más atención al papel de la dieta en la etiología del cáncer. Aunque la relación entre el cáncer de colon y los componentes de ciertos alimentos, tales como la fibra y la grasa, generó el mayor interés, también se estudió la posibilidad de que productos lácteos fermentados pueden proteger contra la formación de tumores en el colon. La evidencia epidemiológica sugiere una correlación negativa entre la incidencia de ciertos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de colon, y la ingesta de productos lácteos fermentados (24). Además, los productos lácteos fermentados o las bacterias utilizadas para la fermentación de la leche han mostrado tener efecto sobre el cáncer de colon y ciertos otros tumores en modelos murinos de carcinogénesis (95-98). Sin embargo, algunos estudios en animales que investigaron el efecto de diversas cepas de BL sobre la carcinogénesis colónica, mostraron resultados inconsistentes.

Wolowski y col. (98) investigaron el efecto protector de varias cepas de BL, tradicionalmente utilizadas para la fermentación de leche, en la carcinogénesis colónica en ratas inducida por 1,2-dimetilhidrazina (DMH). El tratamiento oral con *L. bulgaricus* durante

4 días protegió contra los daños al ADN inducidos por la DMH en el colon. En contraste, no hubo un efecto protector cuando se suministró *S. thermophilus*. Los autores no describen los mecanismos de protección de *L. bulgaricus*, pero especulan que podrían deberse al efecto de los tioles en los productos de degradación de proteínas que resultan de la actividad proteolítica de *L. bulgaricus*.

En un estudio previo con un modelo similar de cáncer de colon inducido con DMH en ratas, Shackelford y col. (97) en contraste con los resultados de Wollowski et al (98), encontraron que la leche fermentada con *L. bulgaricus* no redujo el número de ratas que desarrollaron tumores de colon, mientras que *S. thermophilus* sí lo hizo (27). En un estudio con azoximetano para inducir focos de criptas aberrantes en el colon de ratas, no se observaron efectos significativos, ya sea con *B. longum* o *L. casei* (99). Estos autores, sin embargo, observaron un efecto protector de *L. acidophilus* e inulina, pero sólo cuando se incrementó el contenido total de grasa de la dieta.

Utilizando un cultivo celular de carcinoma de colon, Ganjam y col. (100) aislaron una fracción del yogur que disminuía la proliferación celular, pero ésta no se vio afectada en respuesta a una fracción de la leche aislada de manera similar o frente al ácido láctico.

La elevada actividad de varias enzimas bacterianas fecales, algunas de las cuales están involucradas en el metabolismo de los nitratos genotóxicos, se asoció con un mayor riesgo de cáncer de colon (101, 102). La actividad de estas enzimas puede ser alterada por la dieta o la ingesta de antibióticos (103). *L. acidophilus* (104) y *L. Gasseri* (7) mostraron una reducción de la actividad enzimática de nitroreductasa, azorreductasa, y β -glucuronidasa en las heces en seres humanos, con una reducción de un 50% a 75% durante un período de ingesta de lactobacilos. Del mismo modo, Guerin-Danan y col. (10) informó que los bebés, de 10 a 18 meses, de edad alimentados con yogures fermentados con *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, y *L. casei* tuvieron menor actividad de β -glucuronidasa fecal que un grupo similar de niños alimentados con leche.

El mecanismo por el cual las BL pueden tener un efecto sobre la carcinogénesis de colon es actualmente desconocido. Algunos de los mecanismos que pueden estar implicados incluyen la mejora de la respuesta inmune local del huésped, la supresión de las bacterias nocivas, el secuestro de potenciales mutágenos, la producción de compuestos antimutagénicos, la reducción del pH en el colon, y la alteración de otras condiciones fisiológicas (105). Además, Pedrosa y col (7) demostraron que la alimentación con yogur o *Lactobacillus* reduce las enzimas que convierten procarcinógenos en carcinógenos, tales como la azorreductasa y la nitroreductasa.

La investigación respecto del rol de la dieta en el proceso del cáncer es muy extensa. A medida que avanzan los estudios va quedando claro que la nutrición juega un rol muy importante en el desarrollo del cáncer. Se estima que un 30 a 40% de los tumores podrían prevenirse con dietas apropiadas, actividad física y el mantenimiento de un peso corporal adecuado.

Carcinogénesis colónica.

En las últimas décadas hemos sido testigos de la evolución del modelo genético de desarrollo y progresión del cáncer, al punto que actualmente se acepta que es en gran parte una enfermedad genética. Esto incluye los factores genéticos hereditarios que influyen en la predisposición al cáncer y los blancos genéticos de la progresión que confieren la capacidad de crecimiento anómalo a las células neoplásicas.

El cáncer colorrectal ha sido el paradigma en el cual se basaron muchas de las teorías basadas en la genética del cáncer. Esto se debió a diferentes razones. Primero, el cáncer colorrectal es el tercero más prevalente en Norteamérica. Segundo, la mayoría de estos tumores son precedidos por una lesión claramente identificable, el adenoma. Tercero, las neoplasias colorrectales están casi siempre disponibles para ser estudiadas porque la cirugía es el primer tratamiento. Y cuarto, el desarrollo del cáncer colorrectal comprende una variedad de síndromes genéticos, la mayoría de los cuales han sido bien caracterizados (106).

El primer paso en el desarrollo genético de la mayoría de los tumores colorrectales es la mutación del gen APC (adenomatous polyposis coli), mientras que la mutación del gen TP53 sería un evento tardío (107).

El gen supresor de tumores APC fue identificado como el causante de la adenomatosis poliposa colónica familiar (FAP). APC tiene varias funciones, pero la que se relaciona con el desarrollo de tumores es la que controla la vía de señalización Wnt a través de la regulación de los niveles de β -catenina (108, 109).

La vía de Wnt fue implicada en la carcinogénesis hace ya 30 años en experimentos llevados a cabo en ratones. Se identificó un sitio común de integración viral en tumores mamarios de ratón inducidos por virus (MMTV) (110). El sitio de integración estaba en el promotor de un gen que se llamó *Int-1* y resultaba en el aumento de la producción de la proteína *Int-1* (111, 112). La expresión forzada de esta proteína en ratones transgénicos causaba el desarrollo de tumores mamarios, confirmando su rol en la tumorigénesis (113).

Int-1 resultó ser ortólogo del gen *Wingless (Wg)* de *Drosophila* y se combinaron los términos para producir el nombre Wnt para el gen de mamíferos y sus parálogos (114, 115).

La familia de genes WNT comprende al menos 19 miembros que muestran cierto grado de variación en su secuencia, pero todos tienen unos 23-24 residuos de cisteína con un espaciado altamente conservado (116, 117). Las proteínas Wnt son pequeñas glicoproteínas de secreción modificadas por lípidos (39-46 kD) que juegan un rol clave tanto en la embriogénesis como en tejidos maduros. Durante el desarrollo embriológico, estas proteínas intervienen en el control de la proliferación celular y el destino de las células madre. En tejidos maduros, están involucradas en la renovación de las células madre y en el mantenimiento del tejido (118).

Las proteínas Wnt son ligandos para la familia de receptores de siete dominios transmembrana Frizzled (Fz). Se conocen diez miembros de esta familia caracterizados por la presencia de dominios ricos en cisteínas. Cuando Wnt se une al receptor Fz puede activar una de tres vías diferentes (119):

- a. La vía clásica, que resulta en estabilización y aumento de la actividad transcripcional de β -catenina.
- b. La vía Wnt/PCP (planar cell polarity)
- c. La vía Wnt/calcio

Cada una de estas vías, aunque distintas, parecen ser iniciadas en el citoplasma por la proteína Dishevelled (120) y la respuesta final dependería del contexto celular del momento.

La vía clásica es la más relevante en el desarrollo del cáncer y tiene un estado de actividad “On” y otro “Off”. Estos estados son mantenidos por moléculas que actúan como ligandos “On” u “Off” y el desarrollo tumoral sería causa de una inactivación inapropiada por los ligandos “Off” o una activación inapropiada por los ligandos “On”, que llevarían a un estado “On” constante.

Estado “Off”. Inhibición extracelular. Para asegurar que la vía solo es activada cuando se requiere, se han desarrollado mecanismos inhibitorios que actúan a diferentes niveles. En el medio extracelular proteínas de secreción pueden secuestrar a Wnt de su receptor, como ser sFRPs (proteínas de secreción relacionadas a Fz) (121), WIF-1 (factor inhibidor de Wnt-1), Cerberus y Coco (122).

Otra clase de inhibidor extracelular es la familia de proteínas de secreción Dickkopf (Dkk) (123). Tres miembros de esta familia pueden antagonizar con Wnt (Dkk-1, -2 y -4) inactivando los receptores de superficie LRP5 y LRP6, los que son esenciales para la

activación de la vía clásica. Las Dkk forman un complejo ternario con LRP5/6 y los receptores Kremen 1 o 2 (124), luego este complejo sufre endocitosis, removiendo los receptores LRP5/6 de la superficie celular.

Degradación intracelular de β -catenina dependiente de fosforilación. Dentro de la célula, los mecanismos inhibitorios aseguran que los niveles de β -catenina se mantengan por debajo de los cuales ocurriría una actividad transcripcional aberrante. β -catenina se produce constitutivamente y se encuentra en el citoplasma como un pool de proteína monomérica. Los niveles de β -catenina citoplasmática son controlados por destrucción de la misma, luego de su reclutamiento en un gran complejo multiproteico. La Axina 1 o 2 es la proteína scaffold central de este complejo (125) y provee sitios de unión para β -catenina, APC, GSK3 β (glucógeno sintetasa kinasa 3 β), CK I α (caseín kinasa I α) y PP2A (fosfata 2A). APC también tiene un sitio de unión para β -catenina y PP2A, pero GSK3 β tiene sitio de unión solo para Axina y no para APC ni β -catenina (126). Cuando el complejo se forma es estabilizado por la fosforilación de APC y Axina mediada por GSK3 β . Con el complejo estabilizado GSK3 β fosforila el extremo N-terminal de β -catenina. (residuos treonina-41, serina-37 y serina-33). Una vez fosforilada la β -catenina es reconocida como una proteína que debe ser destruida por el sistema proteosómico (127). La falla en la fosforilación de alguno de los residuos hace que la β -catenina no pueda ser degradada.

Degradación intracelular de β -catenina independiente de fosforilación. p53 induce a Siah 1 que forma un complejo con APC, β -catenina, ubiquitina E2 y E3 lo que conduce a la degradación de β -catenina independiente de fosforilación (128).

Secuestro de β -catenina en la membrana celular. Además de su rol como factor de transcripción, β -catenina está involucrada en el control de la adhesión celular. Se puede encontrar en las uniones adherentes del lado citoplasmático de la membrana celular, formando un complejo con E-cadherina y α -catenina. Así parte del pool citoplasmático se dirige a la membrana celular y no está disponible para traslocar al núcleo. Un aumento en la expresión de E-cadherina disminuiría los niveles citoplasmáticos de β -catenina libre, inhibiendo la vía de Wnt. Ratones transgénicos que expresan β -catenina mutante muestran una up-regulación en la expresión de E-cadherina presumiblemente como un mecanismo de control de los niveles citoplasmáticos de β -catenina. (129).

Eventos nucleares en el estado "Off". En este estado de la vía clásica, β -catenina no puede traslocar al núcleo y por lo tanto sus genes blanco no están activados. En ausencia de β -catenina nuclear, las proteínas LEF/TCF se encuentran en un complejo con el represor transcripcional Groucho.

Estado "On". Activación a través de proteínas Wnt. La vía se inicia con la interacción del ligando Wnt con el receptor Fz. Sin embargo solo se activa en presencia de LRP5 o LRP6. La formación del complejo trimolecular tiene dos consecuencias (Figura 3). Primero, Dishevelled es reclutada a la membrana celular y fosforilada por la CK Iε, así forma un complejo con Axina y GSK3β, que inhibe la actividad de esta última (130). Luego, facilita la degradación de la Axina mediada por LRP5 o LRP6. El efecto final es la desestabilización del complejo responsable de la fosforilación de β-catenina, la cual escapará así a la degradación proteosómica, resultando en el aumento de niveles citoplasmáticos y su traslocación al núcleo.

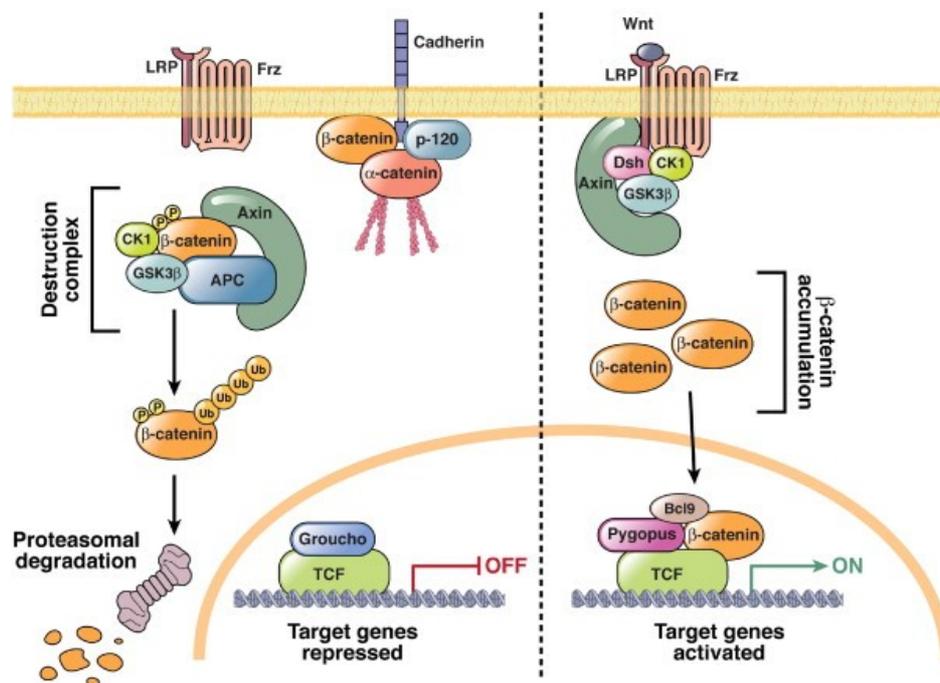


Figura 3: representación de la vía clásica de activación de Wnt y de los mecanismos por los cuales es regulada.

Eventos nucleares en el estado "On". Una vez en el núcleo, β-catenina compete con Groucho por la unión a las proteínas LEF/TCF, formando el complejo de activación transcripcional.

La expresión aberrante de los genes blancos de β-catenina media la transformación neoplásica de las células normales. La gran cantidad de genes que son desregulados causan alteraciones en una variedad de procesos celulares.

Wnt y cáncer. Alrededor del 80% de los tumores colorectales tienen mutaciones en el gen de APC y el 12% del gen para β-catenina (CTNNB1). La predominancia de las

mutaciones de APC sobre CTNNB1 es enigmática, ya que se requieren al menos dos eventos mutagénicos para la pérdida completa de la actividad de APC mientras que una única mutación en CTNNB1 lleva a la activación de la β -catenina (Figura 4). De todos modos en ratones se vio que la mutación del gen de β -catenina es suficiente para el desarrollo de adenomas (131).

Cualquiera sea el mecanismo de activación de la vía Wnt, el resultado es el mantenimiento de un nivel elevado de β -catenina en el citoplasma y de su actividad transcripcional. Los genes inducidos por ella no aparecen mutados y ejecutan sus funciones normalmente pero en una situación inapropiada. La expresión de los genes blanco es descontrolada y si los mecanismos compensatorios no pueden competir con los cambios, resulta en un desarreglo de los procesos normales que controlan el destino de la célula y escapa al control del crecimiento.

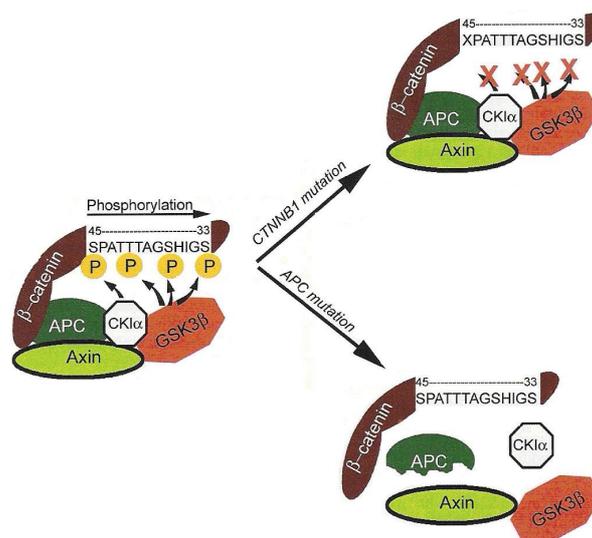


Figura 4: Activación de la vía Wnt por mutaciones de APC o β -catenina. La mayoría de las mutaciones resultan en una proteína truncada en la región proximal al dominio de unión a la axina, lo que causa la desestabilización del complejo multiproteico y la falla en la fosforilación de β -catenina.

Las mutaciones de APC se han identificado en más del 85% de los tumores colorrectales esporádicos confirmando la importancia de esta alteración en las neoplasias colorrectales en general (132).

El producto del gen APC es parte de un complejo multiproteínico que se une y regula la degradación citoplasmática de la proteína β -catenina. En presencia de mutaciones de APC, β -catenina escapa a la degradación y se une al factor Tcf4/LEF-1 activando la transcripción de genes nucleares. Los blancos para este complejo son c-myc, ciclina D1 y c-

jun. Los niveles anormales de estos genes contribuyen directamente a la transformación neoplásica y están involucrados en el control de la progresión del ciclo celular (133).

Modelos experimentales en cáncer de colon.

En 1941, Lorenz y Stewart (134) reportaron la aparición de tumores intestinales en ratones alimentados con dibenzantraceno o metilcolantreno, encontraron múltiples tumores en el intestino delgado, pero no en colon. En 1952, Walpole y col. (135) lograron desarrollar adenocarcinomas en intestino delgado y grueso en un pequeño número de ratas mediante la inyección subcutánea de dimetilaminobifenol. Luego se demostró que otros componentes relacionados con estos grupos de carcinógenos eran secretados activamente en la bilis y llevados a las células epiteliales intestinales con las heces (139). Druckrey y Lange (137) demostraron que la 1,2-dimetilhidrazina producía selectivamente tumores en el intestino delgado y grueso en ratas inbred.

Los carcinógenos químicos proveen un modelo *in vivo* potente, preciso y reproducible de cáncer de colon (138). En general, los procarcinógenos químicos se activan metabólicamente a carcinógenos activos, los cuales son agentes alquilantes (139). Esto ocurre en el hígado y no depende de la biota intestinal, ya que los animales libres de gérmenes también desarrollan tumores colónicos cuando se les suministra dimetilhidrazina (DMH) (140). El primer efecto del carcinógeno en las células del epitelio intestinal es la metilación del ADN (141). Los tumores en el intestino delgado se ven con menor frecuencia debido al efecto compensatorio de la proliferación celular, lo que atenúa el daño. El efecto mutagénico de la DMH, azoximetano y otros agentes alquilantes ocurre inicialmente a través de la metilación de la guanina en posición N-7 en el ADN, las guaninas modificadas se unen a la timidina en lugar de la citosina. Estos desarreglos en los apareamientos de las bases llevan a mutaciones durante las subsecuentes replications del ADN.

La inyección de DMH en dosis de 10 a 20 mg/kg de peso en ratones, ratas y hamsters produce adenomas y adenocarcinomas en el colon (142). En cierto porcentaje de ratas, no así en ratones, se desarrollan adenocarcinomas en el duodeno, yeyuno proximal y carcinomas escamosos del oído externo (143). La edad del animal al momento de la inyección puede influir en la distribución de los tumores (144).

Hay dos probables mecanismos para la iniciación de la carcinogénesis. El más importante involucra la conversión hepática de la DMH a azoximetano y azoximetanol, los

que luego se conjugan con el ácido glucurónico y se excretan con la bilis (145, 146). Los glucurónidos son hidrolizados por las bacterias y metabolizados a carcinógenos activos en la luz intestinal (147). Sin embargo, estudios realizados en aislamientos de segmentos colónicos, indican que la DMH y sus metabolitos pueden ser transportados a las células epiteliales intestinales por vía sanguínea sin la necesidad de la excreción biliar (148). Estudios en animales libres de gérmenes, en los cuales la activación de los carcinógenos conjugados no sucede, también sugieren a las vía sanguínea como un segundo mecanismo para la carcinogénesis (149).

A partir de estos modelos basados en la administración de agentes carcinógenos, se han realizado considerables progresos. Ratones genéticamente modificados, como el Min (multiple intestinal neoplasia) que lleva una mutación en la línea germinal de APC (adenomatous polyposis coli), han sido empleados en numerosos estudios sobre quimiopreención y dietas en cáncer de colon. También se desarrollaron modelos de cruza genéticas de ratones Min con otros ratones knockout. Tanto las estrategias de prevención como los efectos de dietas y drogas han sido evaluadas en ambos modelos, los de inducción por carcinógenos y los de animales genéticamente modificados. No es casual que los efectos de la mayoría de los agentes estudiados sean exagerados en estos modelos en comparación con los observados en humanos. Las razones son multifactoriales e incluyen la homogeneidad genética de los ratones comparada con la heterogeneidad de los humanos, las diferencias fisiológicas en la motilidad intestinal, hormonas, respuesta inmune y diferencias en los eventos genéticos somáticos durante la secuencia de focos de criptas aberrantes a adenoma a carcinoma.

En el desarrollo futuro de estos modelos será necesaria la combinación de la dieta y la manipulación genética de roedores, así como el uso de otros animales menos costosos para una semejanza más fiel de los variados factores que contribuyen a la neoplasia colorrectal en humanos. Los estudios epidemiológicos y moleculares han demostrado una gran heterogeneidad en el desarrollo del tumor en diferentes poblaciones, por lo que un solo modelo no sería suficiente para su estudio. (Use of animal models in colorectal cancer prevention. Steve Gallinger, Fifth AACR International Conference on Frontiers in Cancer Prevention Research, Nov 12-15, 2006)

1,2 -Dimetilhidrazina dihidroclorato (1,2 - DMH)

La 1,2 -DMH es el carcinógeno intestinal más usado. En 1967, Druckrey y col. (150) pusieron de manifiesto que la DMH era estructuralmente semejante al compuesto natural cicasina, describiendo que posee una específica y real capacidad de producir tumores de colon en diversas especies de roedores (151). La DMH es la mitad activa de la nuez de cycad (152).

Es un compuesto de síntesis. Hoy en día, no se sabe que este compuesto aparezca en la naturaleza. Es sintetizado para uso de laboratorio en cantidades limitadas. La potencia y órgano-especificidad de los procarcinógenos químicos vienen en gran medida determinados por la reactividad química y por la capacidad de que haya suficiente cantidad de sus formas carcinogénicas últimas en los tejidos diana. La cantidad del carcinógeno final está en función de la actividad de las vías metabólicas que conducen a su formación, de la actividad de las vías de detoxificación y también de las vidas medias de todas las especies biológicas implicadas (153). Druckrey postuló que la DMH sufre una serie de transformaciones químicas *in vitro*.

En un primer paso, la activación metabólica de la DMH implica la oxidación a azometano, un gas a temperatura corporal, que aparece en el aire espirado de las ratas tratadas con DMH. Una oxidación convierte al azometano en azoximetano que entonces, mediante un proceso de N-hidroxilación, se convierte en metilazoximetanol. El metilazoximetanol es químicamente inestable a temperatura corporal e *in vitro* se descompone espontáneamente en formaldehído, agua y nitrógeno. Durante esta descomposición se forma el agente alquilante metildiazonio, llamado carcinógeno final. Este último es una sustancia altamente reactiva que forma iones metil-carbono, que serían los responsables de las metilaciones de macromoléculas tanto *in vivo* como *in vitro*. La alteración de las propiedades de las macromoléculas críticas como ADN, ARN y otras proteínas, por alquilación y otras reacciones, es un paso esencial en la carcinogénesis química.

Fiala y col. (154) corroboraron que el supuesto anterior se producía *in vivo*, midiendo la excreción de metabolitos mediante cromatografía gaseosa y líquida de alta presión.

Los grupos metilo de la DMH son importantes para determinar su especificidad de acción. Reemplazando el grupo metilo por un grupo etilo da como resultado la producción de tumores de cerebro, bazo, timo, glándula mamaria e hígado en lugar de colon (152). El

marcado de la DMH por deuterio ocasiona un cambio en los órganos diana. Los resultados indican que la ruptura del enlace C-H es cinéticamente importante en la activación del DMH hasta su forma carcinogénica en órganos diana, y que la deuteración del sustrato permite que un efecto isótopo pequeño se haga relativamente más extenso (155).

La 1,2-DMH es un carcinógeno efectivo y selectivo de colon, debido a su actividad alquilante en los ácidos nucleicos del epitelio intestinal y sus propiedades mutagénicas (156). Actúa modificando el genoma de la célula, ocasionando eventualmente alteraciones del fenotipo celular, tales como pérdida de diferenciación, invasividad o conducta proliferativa anormal. La N-metilguanina y la O-6-metilguanina han sido aisladas del ADN de la mucosa colónica de ratas inyectadas con ^{14}C -DMH y en colon de rata cultivado tras incubación con DMH marcado. Los niveles iniciales de O-6-metilguanina son más altos en algunos órganos no diana que en el colon, pero ya que la tasa de reparación del colon es más lenta, el lapso de descodificación se prolonga por más tiempo.

La potencia y organoespecificidad de procarcinógenos químicos están en gran medida determinadas por la reactividad química y por la capacidad de que haya suficiente cantidad de sus formas carcinogénicas últimas en los tejidos diana. La cantidad del carcinógeno final está en función de la actividad de las vías metabólicas que conducen a su formación, de la actividad de las vías de detoxificación y también de las vidas medias biológicas de las especies implicadas (153).

Organotropismo, vías de administración y dosificación

La vía de administración afecta al organotropismo del carcinógeno, mostrando la importancia de los diferentes tejidos en la activación y detoxificación de la DMH. Las instilaciones intracolónicas simples o múltiples de DMH en ratones producen adenomas y adenocarcinomas pulmonares, angiomas y angiosarcomas de vasos sanguíneos (157) y fibrosarcomas subcutáneos.

También se ha observado, que dosis bajas diarias de DMH en el agua de bebida producen hemangioendoteliomas de hígado, pero no tumores colónicos. Sin embargo, la misma dosis total administrada una vez por semana produce cáncer de colon en la mayoría de las ratas.

Usualmente, la DMH se administra por vía subcutánea, y en dosis que van de 7 a 21 mg/kg de 12 a 20 semanas, ó 40 a 200 mg/kg en una única inyección.

También puede administrarse por vía oral, en el pienso, a razón de 21 mg/kg/semana durante 12 semanas o en el agua de bebida (158).

El órgano de manifestación y la distribución tumoral depende de la dosis del carcinógeno. Se considera que la dosificación óptima para la inducción selectiva de tumores de colon es de 10 mg/kg durante 25 semanas (dosis total de 250 mg). Este tiempo de inducción de 180-240 días proporciona una tasa tumoral del 90%, incluso algunos autores hablan de un 100% (159). El periodo de latencia, definido como el intervalo de tiempo entre la primera inyección de carcinógeno y la aparición de tumores, es aproximadamente de 6 meses a dosis de 10-20 mg/kg/semana. Con una dosificación más alta de DMH, la incidencia de tumores extracolónicos aumenta. Al disminuir la dosis, aumenta el periodo de latencia y los animales desarrollan menos tumores colónicos y extracolónicos así como metástasis (160).

Incluso una dosis simple de DMH producirá tumores, con un periodo de latencia estimado de 15-20 meses (161), aunque otros estudios describen una alta incidencia tumoral con un periodo de latencia de 9 meses (162).

Los componentes de la materia fecal no son capaces de activar la DMH administrada intrarrectalmente, ya que no aparecen tumores locales por esta vía.

Sin embargo, experimentos de transposición de colon a yeyuno y viceversa han demostrado susceptibilidad específica de colon, en comparación con mucosa de intestino delgado, en la que no aparecen tumores; a la carcinogenicidad de la DMH (163). Rubio y col. (164) describieron que se producen tumores en los segmentos desfuncionalizados de colon, aunque en menor proporción que en los segmentos funcionantes, sugiriendo que factores endógenos del contenido intestinal facilitan la carcinogénesis químicamente inducida (165).

Se ha demostrado que el trauma quirúrgico aumenta la carcinogénesis de colon en la rata. Las reacciones locales vasculares e inflamatorias probablemente desempeñan un papel en este fenómeno. También se ha descrito la importancia de la técnica de sutura y material usado (166) en la anastomosis como promotoras de carcinogénesis. Las suturas seromusculares, que no atraviesan la mucosa del colon, inducen menor proporción de neoplasias perianastomóticas que las transmurales (167). Se ha descrito que tras el daño quirúrgico se produce proliferación de las células de las criptas del colon y entran más células en ciclo mitótico, etapa en las que parecen ser más receptivas a las influencias carcinogénicas (168, 169). También la colitis inducida químicamente puede predisponer a las células colónicas epiteliales de la rata al efecto carcinogénico de la DMH (170).

Acciones de la DMH

La DMH induce proliferación celular en la cripta colónica, previo al desarrollo de atipias focales. La mayoría de tumores inducidos están localizados en el intestino grueso. Como ya hemos dicho la especificidad colónica está ligada a la dosis y al momento de observación.

Los tumores son generalmente múltiples, con semejanza próxima a los tumores humanos (171). Se acompañan de anorexia, pérdida de peso, heces sanguinolentas, obstrucción intestinal y, ocasionalmente, invaginación (172).

En la rata hay pocos pólipos adenomatosos benignos y una mayoría de adenocarcinomas aparecen de novo sobre mucosa plana (173, 174), aunque estudios tiempo dependientes demuestran que no de forma excluyente (175). Estos adenocarcinomas más o menos diferenciados se localizan en la mitad distal del colon izquierdo y generalmente, no son muco-secretorios (176). Los carcinomas mucinosos y de células en anillo de sello prevalecen en el colon proximal y ciego; siendo a menudo más metastásicos que los del colon izquierdo. Las metástasis son locales, peritoneales, en los ganglios linfáticos regionales o a distancia (158). Las metástasis hepáticas son excepcionales, en contraste con lo que ocurre en los tumores colónicos humanos, en los que supone una causa muy importante de muerte (177); sin embargo, líneas celulares obtenidas a partir de adenocarcinomas de colon de rata trasplantable que fue inducido por administración subcutánea de DMH, desarrollan metástasis de hígado y pulmón (178).

En los ratones se encuentran pocos adenocarcinomas y prevalece una mayoría de pólipos.

Se ha descrito que 4 semanas es el intervalo necesario para que la mucosa del colon vuelva a su estado normal tras los efectos tóxicos agudos de una inyección de DMH.

Su desventaja es la alta incidencia de tumores primarios en otros órganos. Por ruta subcutánea, inyecciones de DMH simples o repetidas inducen tumores de intestino, riñones, hígado, glándulas de Zymbal de la oreja en la rata (179); e intestino grueso, ano, pulmones (predominantemente de crecimiento alveolar) (180), hígado, riñones y vasos sanguíneos en ratones (181). También produce megalocitosis hepática y aparición de úlceras gástricas. Otra desventaja es la localización tumoral en todo el colon que dificulta el control del tamaño y crecimiento tumoral.

La DMH induce cambios en los lípidos plasmáticos, aumenta el colesterol libre y disminuye los niveles de fosfolípidos en los animales tratados (182).

La DMH es diurética a dosis de 21 mg/kg de peso (183).

Teorías carcinogénicas del cáncer de colon inducido por DMH.

Mecanismo de acción.

La carcinogénesis como un largo proceso multietapas fue descrito por primera vez por Blerenblum (184) en 1941 para explicar cómo hidrocarburos policíclicos inducían cáncer epidérmico en ratones. Este autor encontró que la aplicación de benzopreno en la piel de los animales no causó cáncer, excepto cuando se aplicó repetidamente aceite de crotona. El aceite de crotona solo o aplicado antes del carcinógeno no produjo neoplasias. De tales experimentos dedujo que el cáncer se produce lentamente en dos etapas separadas: una primera etapa de iniciación y una segunda de promoción. Esta teoría se extendió posteriormente al cáncer de todos los órganos, incluyendo las neoplasias de colon.

La aceptación de la carcinogénesis como un modelo multietapas era unánime, hasta que en 1981 A. Maskens (156), publicó un revolucionario trabajo en el que utilizando la lógica matemática, la estadística y el cálculo de probabilidades demostró fehacientemente que la carcinogénesis es un fenómeno en dos etapas, que además no se corresponderían con los experimentos clásicos de iniciación-promoción.

El tratamiento con DMH es capaz de inducir directamente un cambio estable y transmisible en un número de células epiteliales que por consiguiente estarían en riesgo respecto a un segundo suceso capaz de iniciar el crecimiento tumoral.

Este cambio es transmisible dentro de la mucosa, que se renueva por períodos prolongados. Las células afectadas no tienen expresión fenotípica en términos de ventaja proliferativa.

El segundo cambio no requiere exposición al carcinógeno (aunque la presencia continua del carcinógeno puede probablemente contribuir a ello) y afecta aleatoriamente a las células expuestas al carcinógeno a una tasa que es constante, al menos dentro del tejido considerado (185).

La suposición más razonable es que el primer paso representa una mutación somática. Las propiedades químicas y biológicas de la DMH, sus propiedades mutagénicas, así como la naturaleza trasmisible y estable de sus efectos en el epitelio intestinal apoyan este mecanismo. Cada inyección de DMH entra en interacciones inespecíficas diseminadas con el ADN y otros constituyentes macromoleculares celulares y es probablemente capaz de inducir, sobre una base aleatoria, una primera mutación específica en una proporción dada de células del colon.

Estas células estarían en riesgo para el segundo cambio, que permitiría la expresión del fenotipo tumoral.

La órgano especificidad de la DMH depende de reacciones de oxidación catalizadas por reacciones enzimáticas no identificables en los tejidos diana. Estudios autorradiográficos utilizando DMH marcada con ^{14}C muestran que este agente es captado por el hígado aproximadamente 1 hora después de la inyección y en las células epiteliales del colon 3 horas después de la misma. La DMH es excretada primariamente por el pulmón y riñones que eliminan del animal aproximadamente un 50% de la dosis inyectada. Los principales metabolitos en aire espirado son CO_2 y azometano (186); la orina contiene, DMH inalterada, azoximetano, azometano y metilazoximetanol. Se presume que el hígado es el lugar primario de oxidación de DMH a metilazoximetanol (MAM), que es entonces transportado vía sangre y /o corriente fecal al colon y otros órganos, aunque otros estudios indican que el colon en sí mismo contiene tipos celulares epiteliales o enzimas capaces de convertir la DMH en productos mutagénicos sin implicar necesariamente metabolismo intermediario por hepatocitos (187, 188), de hecho la mucosa colorrectal implantada en el estómago es sensible a la tumorigénesis causada por DMH (189). También se ha observado que el tránsito intestinal enlentecido induce un número aumentado de neoplasias colónicas en relación con el contacto prolongado con la mucosa del carcinógeno o debido a una mayor concentración en la luz colónica (190). Los estudios de Stralka y col. (191) usando anticuerpos policlonales anti P450, IIB1 y IIA1 postulan un sistema de metabolización de la droga P450-dependiente en el colon capaz de activar y metabolizar el modelo de carcinógeno colon-específico 1,2-DMH.

Algunos inhibidores metabólicos pueden interrumpir la activación de la DMH y prevenir la inducción tumoral. Algunos antioxidantes como el disulfiram y otros compuestos relacionados como el carbón disulfuro o el bis etilxantógeno son capaces de inhibir la carcinogénesis inducida por DMH y azometano (AOM) inhibiendo la N-oxidación en vivo de azometano a azoximetano y la C-oxidación del AOM *in vivo* (192).

Los estudios de Davies y col. (193) demuestran que aparecen alteraciones en la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en la mucosa premaligna de animales tratados con DMH meses antes de que se desarrollen tumores visibles y estos cambios pueden explicar parcialmente los niveles alterados de Na^+ y K^+ en el citoplasma y membrana basal de colonocitos premalignos y malignos (194, 195). La despolarización epitelial se produce tras la inyección del carcinógeno (196).

Factores constitucionales y regulación.**Especies, raza, sexo y edad influyen en la inducción de carcinoma intestinal.**

Las especies y las razas dentro de las especies muestran grandes diferencias en la susceptibilidad al carcinógeno. Los conejillos de indias son resistentes a la carcinogénesis inducida por DMH. Los hámsters son extremadamente susceptibles a DMH y son necesarias dosis muy bajas para evitar toxicidad hepática (158).

Las ratas y los ratones responden bien a carcinógenos pero con grandes variaciones entre las diferentes razas (197) mostrando incluso distinta susceptibilidad para los diferentes segmentos anatómicos del colon (198). Las razas más sensibles a la DMH son Fisher, Sprague-Dawley y BD-IX.

Las susceptibilidades genéticas encontradas en diferentes razas de ratón podrían explicar las diferencias en la capacidad de metabolizar el carcinógeno a su forma activa, pero no se encontró ningún sistema enzimático principal deficiente que sustente esta hipótesis.

Los roedores hembras son ligeramente menos susceptibles que los machos a la acción carcinogénica de la DMH (155). La administración de andrógenos a ratas macho BD-IX castradas incrementa la incidencia de cáncer de colon (199).

La edad es importante en la organoespecificidad del carcinógeno. El tratamiento prenatal de monos con DMH induce nefroma embriológico, similar al tumor de Wilms (200).

Experimentos con una inyección de DMH a ratas de 1, 10 ó 30 días mostraron que el carcinoma de colon apareció sólo en las ratas tratadas de 30 días. Los machos neonatalmente androgenizados y tratados con DMH desarrollan una mayor proporción de tumores colónicos que sus controles (201).

Se ha observado que la esplenectomía aumenta la incidencia de tumores malignos sin alterar la presencia de tumoraciones benignas. Se cree que la capacidad del bazo de proteger los animales de la inducción de tumores colónicos es probablemente debida a la preservación de la vigilancia inmunológica en el huésped (202).

Influencia de factores ambientales

Dieta, ácidos biliares y bacterias, tienen influencias por sí mismas y por su acción sobre el metabolismo de la DMH.

Estudios experimentales en animales sostienen la hipótesis de que la composición cualitativa de los ácidos grasos es uno de los factores determinantes en la carcinogénesis colónica. El tipo y cantidad de grasa dietética afecta al metabolismo microsomal de los carcinógenos, reforzando la iniciación tumoral (203), modificando la respuesta del tejido colónico al desafío genotóxico (204), incluso alterando el sistema inmune (205). Se ha observado que restricciones calóricas severas en la dieta pueden inhibir el crecimiento de los tumores de colon inducidos por DMH (206). Otros autores demuestran que ni una reducción moderada en la toma de grasas ni un aumento en los carbohidratos en la dieta ni una dieta vegetariana es probable que den como resultado una reducción sustancial en la incidencia de cáncer de colon (207).

El papel de las proteínas es controvertido, sin efecto en algunos experimentos o con un efecto de refuerzo en la aparición tumoral en animales alimentados con un alto contenido en proteínas comparado con animales que reciben un bajo contenido, independientemente del tipo de proteínas (151). Igualmente se ha descrito el papel de las proteínas de la leche en el desarrollo de tumores inducidos químicamente y en el tiempo de supervivencia de las ratas (208).

Ratas con pH ácido en las heces producido por consumo de lactulosa, sulfato sódico o ambos tienen significativamente menos tumores colónicos tras inyecciones con DMH que las ratas tratadas solo con DMH (209).

La fibra dietética es un buen candidato para el papel protector en cáncer de colon y está sostenida por datos epidemiológicos, pero los modelos experimentales animales aportan resultados aparentemente contradictorios de acuerdo con la naturaleza de las fibras estudiadas. El efecto protector de la fibra dietética consistiría en un aumento en la masa fecal y dilución de ácidos biliares y otros carcinógenos fecales. Los suplementos de celulosa en la dieta (5-15%) producen una supresión de la actividad mitótica reforzada por la DMH en las criptas del colon descendente durante el estadio de iniciación de la carcinogénesis (210). Este hallazgo se correlaciona con una reducción del número de animales que presentan tumores colónicos y una incidencia significativamente más baja de adenocarcinomas en ratas mantenidas con suplemento de celulosa a lo largo de las etapas de iniciación y de promoción (211). En ratas a las que se alimentó con dietas ricas en frutas y vegetales se observó una baja incidencia de adenomas; si además consumían una dieta con fritos y asados de tipo humano, las frutas y verduras no mostraron protección total, pero sí disminuyeron la incidencia de carcinomas (212). Una dieta alta en proteína animal y grasa, correlacionada con alto riesgo de cáncer de colon, se asocia con un aumento en

enzimas bacterianas capaces de generar carcinógenos en el intestino. Hay una correlación entre actividad enzimática bacteriana aumentada y conversión creciente de procarcinógenos a carcinógenos proximales en la corriente fecal. Se ha visto que la DMH induce alteración en la actividad de las enzimas bacterianas colónicas (213). Animales libres de gérmenes tratados con DMH tienen menor incidencia de tumores de colon en comparación con las ratas convencionales. La microbiota intestinal interfiere con el metabolismo de los ácidos biliares y con la grasa dietética, factores todos que ejercen gran importancia en la activación de la carcinogénesis por DMH (214). Los ácidos biliares secundarios, deoxicólico y litocólico son estructuralmente semejantes a compuestos que se sabe que son carcinógenos (215), como los colantrenos.

Morvay y col. (216) mostraron un aumento de la incidencia de tumores colónicos en ratas con niveles diarios totales de ácidos biliares y concentración de ácido biliar en el lado izquierdo del colon aumentados (217). Otros autores, consideran que los ácidos biliares no desempeñan un papel en los tumores colónicos inducidos por DMH (218).

La carcinogénesis química en animales de experimentación ha sido inhibida por gran número de compuestos con diversas estructuras químicas. Un posible efecto protector del selenio ha sido encontrado en carcinomas inducidos por DMH (219). La inhibición de la carcinogénesis colónica por antioxidantes como el selenio es multifacética. Los niveles de fosfolípidos poliinsaturados (componentes de las membranas biológicas) son muy sensibles a la peroxidación. Los radicales libres generados pueden romper la estructura y la integridad funcional de las membranas, alterar las propiedades de transporte, y causa daño potencial en el ADN, ARN y proteínas diana. La enzima superóxido dismutasa proporciona una defensa fisiológica normal al potencial daño de estos radicales (220).

Otro oligoelemento como el germanio previene el cáncer intestinal en este modelo (221). Los resultados más prometedores conciernen al efecto protector del calcio dietético en la carcinogénesis colónica (222). Los estudios de Sitrin y col. (223) mostraron que el calcio disminuye significativamente el número de ratas con tumores múltiples y el tamaño tumoral, y que estos efectos estaban abolidos por el déficit de vitamina D. El calcio suplementario se ha mostrado que inhibe el aumento de proliferación inducida por sales biliares y ácidos grasos en animales de experimentación (224), probablemente enlazándose a los mismos e inhibiendo su acción tóxica (225) y disminuyendo sus niveles totales en heces (226). Otros estudios han demostrado que los suplementos de calcio dietético son capaces de inhibir las mutaciones K-ras observadas en los tumores inducidos por DMH

(227). Diversos estudios han confirmado el papel de los β -carotenos en la prevención de cáncer de colon inducido por DMH en ratas y ratones entre un 60-100% (228).

También se ha descrito que la vitamina A podría tener efecto antiproliferativo y anticarcinogénico directo y que ratas deficientes en vitamina A y expuestas a DMH presentan una incidencia aumentada de carcinoma de colon (229), sobre todo en animales a los que se administró alto contenido de grasa en la dieta (230). Igualmente, algunos investigadores han descrito que suplementos de vitamina E reducen la incidencia tumoral en ratones, si bien otros experimentos refieren resultados contrarios, en los que la deficiencia de vitamina E no promovió la incidencia tumoral (231). La administración subcutánea de 1,25-dihidroxitamina D₃ previo a la agresión carcinogénica reduce significativamente la incidencia de tumores colónicos, presumiblemente actuando como antiproliferativo (232). Se ha descrito que la vitamina C presenta un efecto protector sobre la carcinogénesis inducida por DMH, probablemente por su capacidad de reaccionar directamente con el carcinógeno. A pesar de todo, otros autores sugieren que niveles no tóxicos de vitaminas es improbable que inhiban específicamente el proceso de carcinogénesis.

Los suplementos de potasio en el agua de bebida muestran de forma significativa prevención parcial de la inducción de tumores en intestino delgado de ratas Sprague-Dawley tratadas con DMH, y también se observó disminución en la incidencia de tumores colónicos y de glándulas de Zymbal, aunque no con significación estadística (233).

Wargovich y Newmark (234), evaluaron la capacidad de los flavonoides para proteger frente al daño en el ADN colónico inducido por DMH. No producen abolición de núcleos aberrantes lo que sugiere que son inactivos en las fases de iniciación de la carcinogénesis.

Los estudios de Caderni et al. (235) sugieren que el almidón tiene un efecto protector contra la carcinogénesis colónica en ratas tratadas con DMH y alimentadas con dietas ricas en grasa, baja en calcio y celulosa.

Estudios epidemiológicos describen que altos niveles de legumbres dietarios han sido asociados con bajas tasas de cáncer en general, y se correlacionan inversamente con las incidencias de cáncer de mama, colon y próstata. Las legumbres se sabe que contienen altas concentraciones de inhibidores de proteasa, al igual que otros agentes como lectinas que pueden modificar la carcinogénesis. Los inhibidores de la proteasa se ha visto tienen actividad anticarcinogénica tanto *in vivo* como *in vitro*. Billings y col. (236) publicaron que un derivado de la alubia de soja que contiene el inhibidor de Bowman-Birk, suprime la

carcinogénesis de hígado y colon en ratones inducida por DMH cuando está presente en la dieta.

Otros agentes, como los antiinflamatorios y en concreto el ácido acetilsalicílico reducen al 60% la cantidad de tumores inducidos por DMH (237). También se ha descrito que el Sulindac inhibe las tasas de desarrollo y de crecimiento de los tumores colónicos de la rata (238), en las etapas de displasia y microadenoma (239). La salazopirina, fármaco empleado en el tratamiento de la colitis ulcerosa, cuando se administra a ratas tratadas con el carcinógeno, no altera la incidencia tumoral, pero sí las características tumorales, son más pequeños, sesiles y microinvasivos (240).

Los estudios de Daniel y col. (241) sugieren que el cloroformo inhibe de forma dosis dependiente la inducción de daño nuclear por DMH en células epiteliales colónicas del ratón.

La ruta de administración de la dieta tiene una significativa influencia en la proliferación epitelial del epitelio colónico en ratas tratadas con DMH. Ratas alimentadas con nutrición parenteral no presentaron aumento en la proliferación celular epitelial (242), mostrando disminución importante de las figuras de metafase por cripta y altura de la cripta (243).

La actividad física aumentada en las ratas reduce la incidencia tumoral, posiblemente por una bajada del pH fecal, disminuyendo el flujo sanguíneo al colon y aumentando las enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, catalasa y la glutatión peroxidada (244). Los estudios de Andrianopoulos y col. (245) describen la acción del stress sobre la carcinogénesis colónica por DMH. Cuando ambos aparecen simultáneamente existe una reducción del número de tumores comparado con los controles y cuando el stress sigue al tratamiento, este efecto es similar pero en menor grado.

Así mismo, se ha descrito un sinergismo entre la radiación en el abdomen y el carcinógeno (246).

Expresión de oncogenes

Yander y col. han mostrado amplificación del oncogén myc al igual que expresión elevada del RNAm de myc en los tumores de colon de ratón. Tulchin y col., usaron azoximetano, un metabolito de la DMH, para inducir cáncer de colon en ratas en un

estudio llevado a cabo para investigar la distribución de la proteína c-myc respecto a los cambios histopatológicos.

Estos investigadores demostraron una expresión aumentada de c-myc en las células tumorales de rata en comparación con las normales (161).

Llor y col. describen mutaciones de K-ras en aproximadamente 1/3 de los carcinomas inducidos por DMH y, en líneas celulares de tumores de colon de rata derivados de tumores inducidos por la misma DMH, mientras que no observaron mutaciones H-ras. Estas mutaciones se produjeron en el segundo nucleótido de los codones 12 ó 13 o en el primer nucleótido del codón 59 del gen K-ras.

Las mutaciones K-ras fueron observadas en mucosa colónica premaligna a las 15 semanas de la inyección de DMH, en zonas sin displasia, adenoma o carcinomas, sugiriendo que la mutación de K-ras es un evento precoz en la carcinogénesis colónica (247).

En tumores colónicos de ratones tratados con DMH se observa una ausencia de pérdida alélica en el locus p53, lo que sugiere que las pérdidas alélicas del locus p53 no intervienen en la carcinogénesis inducida por DMH o que la alteración de los productos del gen podría tener un efecto de abolición de la función normal del p53 (248).

Mucosa colónica de rata normal y tumoral.

Morfología de la mucosa colónica de rata.

Descripción macroscópica

El intestino grueso de la rata se divide con propósitos descriptivos en las siguientes partes: ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente y recto (249).

Aunque diversos autores consideran solamente tres segmentos: ciego, colon ascendente o proximal y colon descendente-recto o distal.

Macroscópicamente, el ciego, el colon ascendente y el colon distal pueden distinguirse con facilidad. El ciego es un órgano ancho en forma de coma, de paredes delgadas y distendidas, móvil y sin apéndice (Figura 5). Los pliegues de la mucosa cecal están dispuestos aleatoriamente (250).

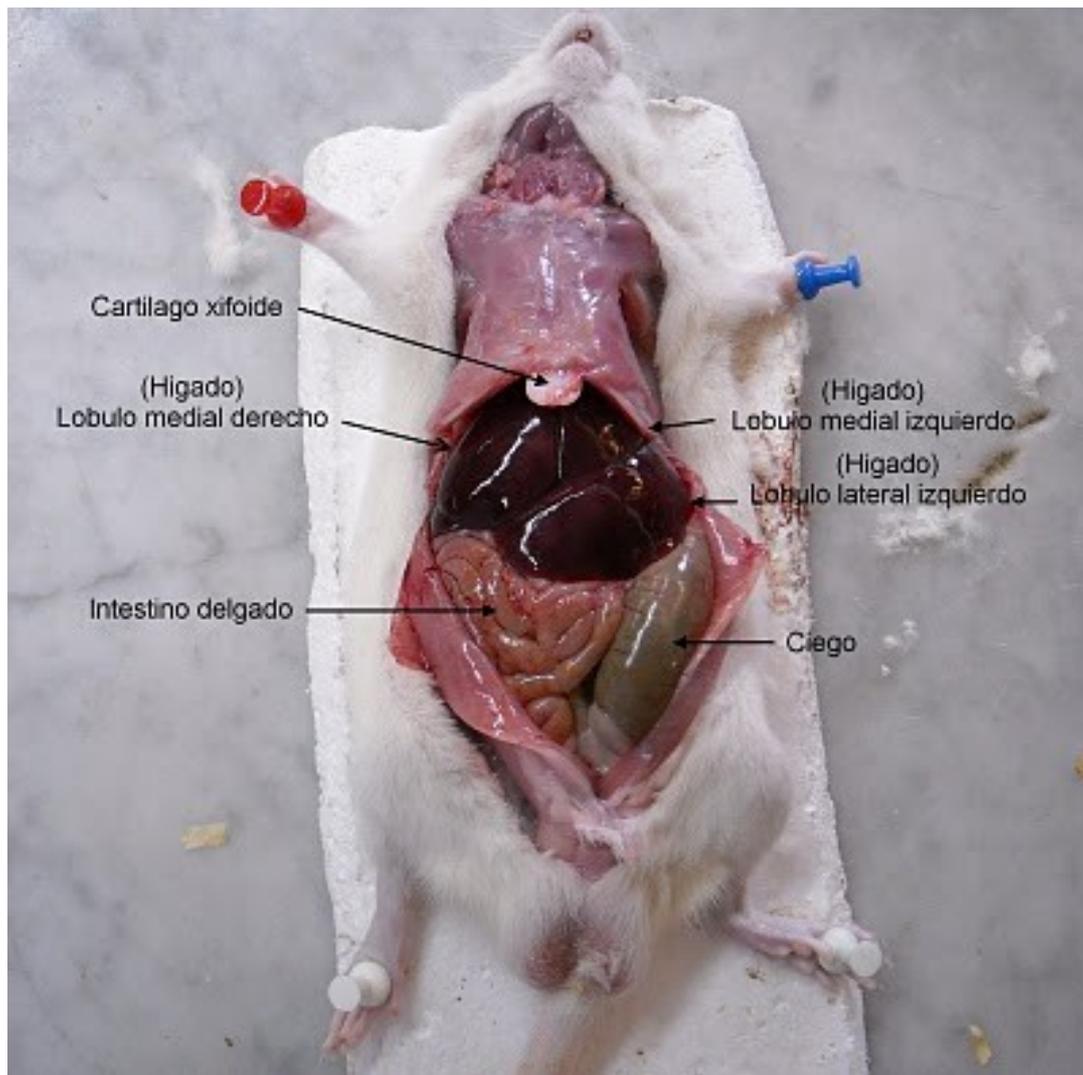


Figura 5: disposición de los órganos abdominales in situ, luego de disecar piel y plano muscular a lo largo de la línea media.

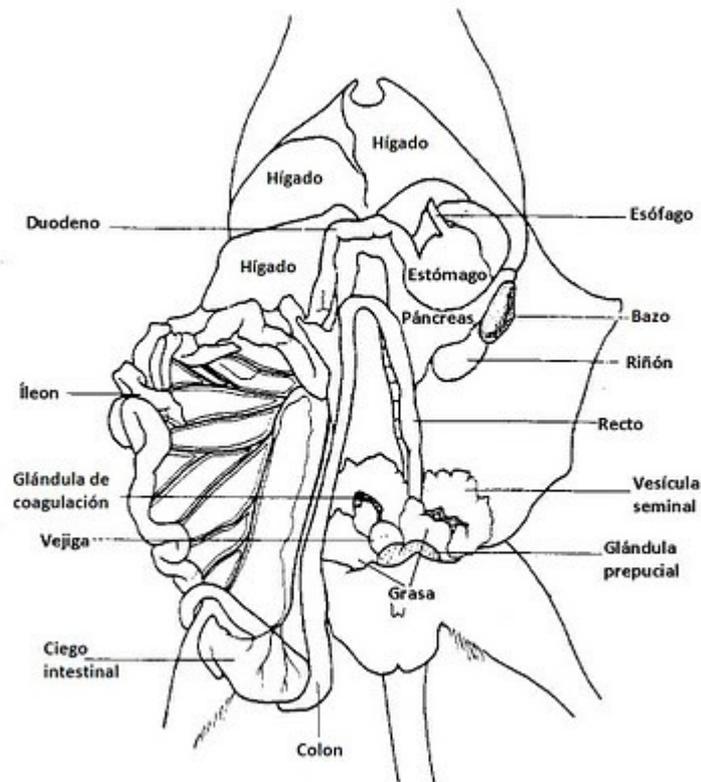


Figura 6: el esquema muestra la disposición de los órganos abdominales de la ratona en una disección habiéndose resecado lateralmente las asas intestinales delgadas para mostrar la localización del intestino grueso.

El colon proximal o ascendente, de aspecto más tubular, presenta unos pliegues ordenados oblicuamente, en forma de V. Uno o dos de estos pliegues muestra un área de engrosamiento nodular representando placas linfoides. Su porción más proximal es similar al ciego y distalmente incrementa su espesor por aumento de la submucosa y de la muscular externa. El colon ascendente describe una larga curva hasta la flexura esplénica (Figura 6).

El colon descendente de la ratona presenta una mucosa más lisa y está plegado en 4 a 6 elevaciones paralelas longitudinales; estos pliegues se interrumpen por áreas aplanadas en número y tamaño variables (251). Se extiende desde la flexura esplénica, pasa hacia abajo y medialmente para cruzar el eje pélvico donde se hace retroperitoneal para formar el recto, sin un colon sigmoide interpuesto y termina en el ano justo en la raíz de la cola. La pared del recto es similar a la de la porción terminal del colon.

Cuando el colon se distiende por las masas fecales la mucosa superficial se hace lisa. La ausencia de *taenia coli* y haustras es una peculiaridad anatómica del colon de la ratona.

El ciego mide de 6 a 9 cm. y el resto del colon mide de 16 a 20 cm. (249).

Descripción microscópica

En el epitelio del intestino grueso de la rata se han podido identificar varios tipos celulares:

Células caliciformes: Las células caliciformes son el tipo celular más frecuente del intestino grueso de la rata.

Las células caliciformes presentan generalmente, un núcleo redondeado, con un nucleolo pequeño y regular. El núcleo se dispone en la base celular, al quedar desplazado por las vacuolas de moco que ocupan el citoplasma (252).

La morfología de estas células varía en relación al segmento estudiado (253).

En el ciego y colon proximal, las células caliciformes localizadas en la base y en el tercio inferior de la cripta se muestran bien formadas, numerosas y llenas de moco; contrariamente, en la porción superior de las criptas, estas células se muestran más bien escasas, pero más grandes y de forma alargada u oval. En el colon distal, en el tercio inferior de la cripta son más pequeñas, mientras que las situadas en los dos tercios superiores de las criptas son más numerosas y voluminosas.

En la mucosa colónica normal, las células caliciformes secretan sialomucinas a lo largo del total o 2/3 inferiores de las criptas, mientras que en la parte superior de las criptas y la superficie epitelial se producen ambas sulfo y sialomucinas. El patrón normal mucoso puede variar, con ambos tipos de mucinas ácidas sulfo y sialomucinas secretadas en igual proporción a lo largo del epitelio criptal o sialomucinas predominando en la mitad superior de la cripta dando un patrón mixto (252).

Células columnares: Son el tipo celular más abundante en la superficie luminal y en el tercio superior de las criptas. La superficie luminal está formada por una capa simple de células epiteliales en continuidad con el epitelio de recubrimiento de las glándulas intestinales tubulares (251).

Al microscopio óptico se muestran como células altas con un citoplasma eosinófilo y núcleo ovoide. Carecen de vacuolas de moco (253).

Este tipo celular es más evidente en el colon ascendente y presenta microvellosidades.

Células endocrinas: Estas células se sitúan principalmente en las porciones inferiores de las criptas y, ocasionalmente en el epitelio superficial. Presentan gránulos de secreción oscuros (células de Kulchitsky) (254).

Células indiferenciadas: Las células indiferenciadas se localizan en la base de las criptas y se reconocen fácilmente por su núcleo voluminoso y escaso citoplasma.

Son células alargadas y delgadas en el colon proximal y, poligonales y redondeadas en los segmentos distales. Presentan un núcleo grande, redondeado u oval, con algunas invaginaciones y un nucleolo pequeño y redondeado (255).

Células vacuoladas: Este tipo celular, denominado así por su aspecto, se ha identificado en la porción más distal del intestino grueso de la rata. De predominio en los segmentos inferiores y medios de las criptas.

Contienen numerosas vacuolas de moco, más dispersas y más pequeñas que las de las células caliciformes.

Células secretoras del fondo de la cripta: Un tipo morfológicamente especial de células con capacidad secretora de moco fue descrito por Altmann (256) en 1983 en el colon de la rata. Reciben este nombre por su localización y por su aparente función principal. Estas células se localizan en el fondo de las criptas del colon proximal, no observándose en el resto de segmentos de intestino grueso.

Al microscopio óptico muestran una forma piramidal, con un citoplasma repleto de vacuolas. El núcleo es basal, ovoide o aplanado.

El microscopio óptico revela agregados de linfocitos bajo las áreas aplanadas de mucosa.

Células caveoladas: Se localizan a nivel del colon distal de la rata y representan un tipo celular relativamente infrecuente. Se identifican exclusivamente por microscopía electrónica (257).

Presentan grandes microvellosidades, con haces de filamentos que se extienden al interior del citoplasma; así como numerosas vesículas que se sitúan en el citoplasma apical.

Microscópicamente, las criptas experimentan un incremento progresivo de su longitud desde el ciego al colon distal. En el ciego, la mucosa es delgada y las criptas cortas, en alguna ocasión pueden ramificarse en su base. En el colon descendente, las criptas son más alargadas y delgadas, rectas y sin ramificaciones.

Microscopía electrónica de scanning (MES)

El aspecto del colon normal de rata varía para cada región también con MES. Aunque generalmente está cubierto por una densa y homogénea capa de moco, que cubre por completo el epitelio subyacente (258, 259).

La superficie del ciego es plana, y las criptas están rodeadas por surcos irregulares, similares a la corteza cerebral.

En el colon ascendente las criptas son poco abundantes y se encuentran ordenadas en lo alto de los marcados pliegues de la mucosa.

En el colon transverso el epitelio está cubierto de moco, y presenta criptas regularmente dispuestas y de forma circular.

La mucosa del colon distal está ordenada en pliegues longitudinales, los orificios de las criptas tienen forma estrellada (260). La superficie luminal del colon descendente está formada por repetición de grupos de unidades celulares rodeando el orificio de una glándula intestinal. Estas unidades glandulares muestran pequeñas variaciones en el tamaño, aunque los límites entre glándulas adyacentes no son obvios.

Se identifican tres tipos de células distintos en la superficie luminal:

1. Las células absortivas: presentan un contorno plano o suavemente convexo, cubierto por una densa y uniforme capa de *microvilli* alargados.

2. Las células mucosas: sobresalen entre las células absortivas y muestran una superficie convexa cubierta de *microvilli* cortos y escasos.

3. Se observa otro tipo de células en áreas cercanas a la periferia de las unidades glandulares. Estas células redondeadas parecen estar dispuestas sobre la superficie de la mucosa más que formando parte de ella, y su localización y aspecto sugieren que son el efecto de la exfoliación que sufren las células absortivas y mucosas (251).

Cinética celular

La proporción de producción celular varía de región en región en todo el colon, los valores más bajos se obtienen en el colon distal, mientras que los más altos se observan en el ciego (260).

En el colon normal la zona proliferativa se encuentra localizada en la porción inferior de las criptas, estas células son mitóticamente activas (261). Existe una región de lenta proliferación celular situada en la porción más basal de la cripta, y una región de más rápida proliferación en segundo quinto de la cripta (262). Estas células criptales son inmaduras y van migrando lentamente a la superficie sufriendo la maduración durante esta migración (263).

En un periodo que oscila entre 60 y 72 horas una célula emigra desde la zona proliferativa de la cripta a la superficie luminal (251).

Este proceso normal, está modificado en ciertos estados patológicos. En el cáncer, el adenoma, la mucosa de aspecto normal en pacientes con poliposis y roedores tratados con DMH, las células sintetizan ADN en toda la longitud de la cripta (260).

Descripción de las lesiones inducidas con DMH

Los tumores y lesiones benignas inducidos con DMH pueden ser asignados a alguna de estas categorías macroscópicas y microscópicas:

Categorías macroscópicas

Tumores sésiles: Son masas que protruyen sobre la superficie de la mucosa, con un diámetro máximo mayor que el de su unión a la mucosa y muy cercanos a la misma (264).

Tumores pedunculados: son pólipos con un tallo claramente visible (265).

Tumores exofíticos: son tumores usualmente polipoides protruyendo hacia la luz. Presentan un margen elevado con cavitación central y una masa subyacente lobulada que generalmente distiende la serosa subyacente (260).

Tumores endofíticos: son tumores en forma de meseta o ulcerativos con tendencia ligera o nula a abultar hacia la luz (266). Han sido denominados también tumores fungoides (264).

Placas: son lesiones con una superficie relativamente plana, ligeramente por encima del nivel de la mucosa.

Categorías microscópicas

Diversos autores han realizado clasificaciones microscópicas de los tumores inducidos por DMH en ratas. Lindström y col. (264) propusieron unas definiciones de los tumores adenomatosos benignos y malignos:

Adenoma: es un tumor benigno que aparece a partir del epitelio glandular y con desarrollo de formaciones tubulares o acinares o intercaladas con estructuras vellosas o papilares (267). El adenoma puede tener un grado variable de atipía epitelial, desde leve, moderada y severa, hasta atipía con posible pero no confirmada malignidad.

Adenocarcinoma *in situ*: este término se usa para atipía marcada intraepitelial o intraglandular, justificando un diagnóstico de malignidad. No muestran invasión de la muscular de la mucosa o más allá, por los elementos epiteliales. Se corresponde a la categoría de adenocarcinoma intramucosal de otros autores (264).

Adenocarcinoma infiltrante: este grupo se refiere a todos los casos con infiltración en la lámina propia o capas de tejido más profundas como la submucosa, muscular de la mucosa, etc.

Los adenocarcinomas se clasifican según su grado de diferenciación en:

1. Bien diferenciado: con estructuras bien diferenciadas de tipo acinoso o tubular y una atipía celular moderada y mitosis en el epitelio, con los núcleos basales y de tamaño regular.

2. Moderadamente diferenciado: son adenocarcinomas con estructuras no bien desarrolladas, presentan criptas epiteliales o túbulos con ramificación y dilatación compleja e irregular (264). Se asocian a atipía epitelial más marcada y alta frecuencia mitótica.

3. Pobrementemente diferenciado: se caracterizan por la presencia de células epiteliales que carecen de una disposición uniforme. Son adenocarcinomas con parte del tumor con estructura adenomatosa ligera o nula, pero con producción mucosa conservada.

Adenocarcinomas mucinosos: los tumores productores de moco o de células en anillo de sello, se clasifican según los autores como un grupo aparte o como adenocarcinomas poco diferenciados (266). Otros autores realizan una clasificación en dos tipos: no mucinosos y productores de mucina (253).

Carcinoma anaplásico: ha sido definido como un tumor maligno con atipía celular extrema y sin características celulares de diferenciación.

Otros tipos histológicos descritos por Pozharisski (249) son:

Carcinoma sólido: Este es un tumor pobrementemente diferenciado en el que las células tienden a una solidificación secundaria.

Carcinoma escirro: Es un tumor pobrementemente diferenciado en el que las células tienden a separarse, formándose tejido conectivo alrededor de los pequeños complejos separados y se parece al carcinoma escirro clásico.

Tratamiento del cáncer de colon

Las opciones para el tratamiento del cáncer de colon incluyen actualmente la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, los cuales reducen significativamente la calidad de vida de los pacientes. Existen además estrategias terapéuticas emergentes, como las drogas antiinflamatorias no esteroideas (Sulindac), nuevos agentes quimioterapéuticos (Capecitabina) y anticuerpos monoclonales (Cetuximab, anticuerpo para el factor epidérmico de crecimiento). Sin embargo, los probióticos representan otra opción terapéutica emergente. Los probióticos han demostrado su eficacia en varias enfermedades como la colitis ulcerativa, diarrea y eczema atópico. La posibilidad de administrar probióticos como terapia para el cáncer de colon surge de estudios sobre las bacterias

comensales que forman parte de la biota habitual intestinal en el desarrollo del cáncer de colon. Estas bacterias se han relacionado con el cáncer colorrectal debido a que la ubicación de los mismos coincide con una región en donde la concentración de bacterias es muy grande (10^{11} unidades formadoras de colonias por gramo de contenido intestinal). Existen numerosos mecanismos por los cuales las bacterias comensales pueden contribuir a la patogénesis del cáncer colorrectal. Uno de estos factores podría ser la alteración de la microbiota lo que facilitaría la inflamación intestinal, a través de un incremento de la respuesta inmune del huésped a las bacterias comensales. Otro factor contribuyente sería la activación de compuestos carcinógenos y mutágenos por las bacterias de la biota habitual.

En base a estos estudios previos, el uso de probióticos representaría una estrategia racional. Los mecanismos a través de los cuales los probióticos podrían inhibir el desarrollo del cáncer de colon no están completamente dilucidados, pero existe evidencia de una reducción de la respuesta inflamatoria a la biota habitual, alteración en las actividades metabólicas de las bacterias intestinales, reducción del número de bacterias involucradas en vías procarcinógenas y mutágenas y producción de sustancias antitumorales y antimutagénicas; reducción de enzimas bacterianas como la β -glucuronidasa y nitroreductasa, que juegan un rol importante en el desarrollo del cáncer hidrolizando compuestos carcinogénicos.

Numerosos estudios demuestran que el consumo de probióticos puede prevenir el cáncer colorrectal reduciendo los niveles de compuestos carcinógenos y el daño al ADN y demuestran un incremento en la inmunidad anti-tumoral mediada por probióticos a través de mecanismos que incluyen la producción de citoquinas y la modificación de la función de las células T (259).

OBJETIVOS

La carcinogénesis colorectal en humanos ha sido estudiada ampliamente. Se describe como un modelo de tumorigénesis en múltiples etapas secuenciales que involucra alteraciones genéticas progresivas, acumuladas y asociadas a daño tisular (106). Los primeros cambios incluyen mutaciones en oncogenes claves y genes supresores asociados a alteraciones epigenéticas.

El riesgo de cáncer colorectal humano se vincula fuertemente con la dieta (1). Sin embargo hasta el presente no se ha aclarado totalmente su efectividad en la incidencia del cáncer colorrectal.

Constituye una necesidad identificar algunos componentes de la dieta que puedan ejercer un efecto beneficioso sobre el riesgo de padecer cáncer colorrectal. La quimioprevención se usa con el fin de inhibir, demorar o revertir el proceso. Demostrar su efectividad en humanos mediante la disminución de la incidencia y/o mortalidad implica grandes, largos, costosos y en la actualidad, impracticables estudios. Es por esto que resultan de gran utilidad los modelos animales de carcinogénesis (138).

Uno de los objetivos de este trabajo fue desarrollar un modelo animal con alteraciones fisiopatológicas intestinales, análogas a las observadas en el cáncer colorrectal en humanos. De esta forma nuestros estudios podrán contribuir a clarificar aspectos aun no conocidos de la dieta sobre la incidencia del cáncer colorrectal.

Se pretende estudiar algunos pasos de la carcinogénesis colónica y observar cómo estas etapas son modificadas con el agregado de suplementos dietarios como los probióticos en ratas.

Nuestra hipótesis es que la ingesta de probióticos puede prevenir o retrasar la aparición de lesiones cancerosas modificando las alteraciones genéticas producidas por carcinógenos, prolongando la sobrevivencia de los animales en tratamiento quimioterápico y reduciendo los efectos secundarios asociados al mismo.

En la bibliografía a nuestro alcance no se han reportado trabajos que estudien la acción de los probióticos durante el tratamiento con quimioterapia del cáncer de colon en animales.

Con este propósito se plantean los siguientes objetivos generales:

- ✓ Evaluar el efecto de la administración de dietas suplementadas con probióticos en la prevención de la carcinogénesis inducida por dimetilhidrazina en ratas.
- ✓ Evaluar el efecto de la administración de probióticos en la sobrevivencia total de ratas en tratamiento quimioterápico con capecitabina para cáncer de colon inducido por dimetilhidrazina.

Se plantean además como objetivos particulares:

❖ Analizar la incidencia de tumores de colon inducidos por dimetilhidrazina en los animales alimentados con dietas suplementadas con probióticos y en tratamiento quimioterápico.

❖ Analizar los factores pronósticos anátomo-histológicos y otras variables pronósticas en los tumores de colon inducidos por dimetilhidrazina en los animales alimentados con dietas suplementadas y tratados con quimioterapia.

❖ Analizar la expresión de β -catenina, molécula blanco de la proteína APC, en la mucosa colónica para clarificar los mecanismos concernientes a la dieta y el proceso neoplásico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales del estudio.

Los animales provienen del Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur.

Se utilizaron ratas Wistar-Lewis macho de ocho semanas de edad, rango tolerable de seis a diez semanas, sanas al examen físico, expuestas a 12 horas de luz artificial de 6:00 a 18:00 y 12 horas de oscuridad de 18:00 a 6:00 (200 lux a 1 metro del piso de la jaula) a presión atmosférica, sometidas a un rango de temperatura de 20 a 22°C y a un 40 a 70% de humedad, con ventilación adecuada, alimentadas ad limitum con alimento balanceado comercial y agua corriente filtrada.

Los animales se alojaron en jaulas rectangulares de 35 por 35 por 65 cm realizadas con alambre 18 de acero inoxidable, piso alambrado y con una bandeja inferior para recolectar las excretas. Estas jaulas permiten un campo visual satisfactorio y un acceso fácil a los animales. El diseño de las mismas facilita su limpieza y desinfección. La ubicación de los sistemas de bebederos y distribución de alimento impiden su contaminación con excrementos. Se utilizó una cama de viruta de madera sobre la bandeja para absorber las excretas de los animales. La limpieza de la cama se realizó día por medio, removiendo totalmente la viruta y desinfectando las bandejas con hipoclorito de sodio al 10%.

Los animales se manipularon manualmente evitando al máximo el estrés.

El bienestar de los animales y su comportamiento durante el desarrollo de un trabajo científico, están relacionados con las condiciones de alojamiento y el uso de los mismos. Se sabe que distintas variables influyen en el bienestar de los animales y que éstas tienen un impacto directo en el desarrollo y resultado de una experiencia (268, 269, 270). A efectos de no perder datos relevantes y anticipar eventos adversos, debido a los extensos protocolos que requirieron los estudios se confeccionaron historias clínicas y partes diarios para realizar un seguimiento estricto de los animales durante todo el desarrollo del proceso experimental (271). El tamaño de muestra se determinó través del programa estadístico InfoStat, teniendo en cuenta un nivel de significación de $\alpha=0.01$.

Los protocolos fueron aprobados por el Comité Asesor de Cuidado Animal y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad Nacional del Sur.

Historias clínicas.

Se desarrolló un modelo de historia clínica para el seguimiento de la evolución de los animales y se contó con asesoramiento veterinario considerando la mayor cantidad de variables posibles y teniendo en cuenta los objetivos de la investigación.

Parte diario.

En el mismo se registran las variables ambientales del bioterio y las desviaciones negativas del bienestar animal, el cual se definió según el “Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación” del Consejo Canadiense de Protección de los Animales y las recomendaciones del Comité Asesor de Cuidado Animal y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad Nacional del Sur.

Eutanasia.

Para realizar el examen postmortem los animales fueron sacrificados bajo atmósfera de CO₂, según los lineamientos del IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee). En la determinación de sobrevida total se adoptaron los criterios adicionales de eutanasia del IACUC para evitar el dolor y el sufrimiento animal.

Criterios adicionales de eutanasia:

- ✓ Pérdida de peso: pérdida del 20 a 25% del peso al momento del ingreso al estudio, teniendo en cuenta la edad del animal, o la aparición de caquexia y pérdida de masa muscular.
- ✓ Inapetencia: anorexia completa por 24 horas o anorexia parcial (menos del 50% del requerimiento calórico) por 3 días.
- ✓ Debilidad/incapacidad para comer o beber: incapacidad que persiste por 24 horas.
- ✓ Estado moribundo: pérdida de la capacidad de responder a estímulos.
- ✓ Infección: que involucre cualquier órgano o sistema.
- ✓ Signos de severa disfunción de órganos o sistemas con pobre pronóstico.

Estudios macroscópicos.

Necropsia y disección.

Para evitar el proceso de degeneración postmortem, la necropsia se llevó a cabo lo antes posible. Sin embargo, en caso que no pudiera realizarse de inmediato, el cadáver pudo ser conservado en el refrigerador entre 2 y 4°C, inmediatamente después del deceso por unas 8 horas.

Durante la autopsia se completó la planilla correspondiente al animal indicando todas las observaciones macroscópicas sin agregar datos interpretativos ni clasificaciones histológicas de las lesiones, dictando la descripción a un asistente.

Se describieron forma, posición, color y consistencia de los órganos y en caso de corresponder, contenido normal o patológico.

Examen externo: se observó la condición general del animal, estado nutricional, presencia de alteraciones en la piel o el pelo y de lesiones superficiales. Se reportaron anomalías o lesiones en los orificios nasales, boca, ano y dientes. Se observó el color de la mucosa oral y las orejas.

Examen interno: se colocó al animal en posición ventral y se procedió a disecar la piel realizando un corte en la línea media desde la base del cuello hasta la pelvis. Se observó el aspecto del tejido subcutáneo y se colocó la piel a los lados.

A continuación se procedió a disecar el plano muscular a lo largo del plano medio. Se observó la posición de los órganos y la presencia de líquidos o adherencias en la cavidad. Luego se realizó la extracción de las vísceras abdominales para su examen detallado. Primero se retiró el intestino delgado desde el ciego hasta el estómago. Se observó la presencia de lesiones y se buscaron ganglios con cambios en su tamaño, forma o consistencia. En caso de ser necesario se tomaron muestras para su estudio histológico siempre rotulándolas adecuadamente.

Se observó *in situ* el intestino grueso para ubicar lesiones macroscópicas e identificar su localización (ciego, colon ascendente, transverso, descendente o recto) o cualquier alteración de la mucosa digna de mención (cambio de coloración, presencia de ulceración, etc.). Se retiró el colon completo, se procedió a realizar un corte a lo largo de su eje longitudinal y se separaron las lesiones macroscópicas. Ante la presencia de un posible tumor se informó si este compromete y en qué medida la luz colónica y si infiltra, hasta qué capa lo hace. El resto del órgano se fijó abierto a porciones de corcho y se colocó en formol 10% para su completo estudio microscópico.

Se retiraron y observaron también el estómago, hígado y bazo. En el hígado se realizaron cortes en busca de lesiones, si no se localizó ninguna, se tomó una muestra al azar.

Se resecaron ambos riñones, se anotó cualquier cambio en su aspecto, se cortaron a través del hilio en dos mitades y se colocaron en la solución fijadora.

Se procedió a abrir la cavidad torácica desde la última costilla cortando los cartílagos costales hasta la primera costilla a ambos lados del esternón. Luego se separó la apófisis inferior del esternón de su unión con el diafragma y se elevó quedando así la cavidad expuesta. Como en el caso del abdomen, se observaron los órganos en posición y luego se retiraron para su examen y toma de muestras para el estudio histológico.

Carga tumoral.

La carga tumoral se calculó como la suma del producto de los dos diámetros mayores de cada tumor presente en un animal.

Estudios histológicos.

Procesamiento de muestras para microscopía óptica.

Se obtienen tacos de todos los órganos mencionados y en el caso del colon se realiza un corte que abarque área patológica y mucosa sana en el mismo taco, rotulando los mismos de manera adecuada.

El material obtenido se procesó por técnicas histológicas de rutina (procesadora Shandon Citadel 2000).

Los preparados fueron evaluados por un mismo patólogo, sin conocimiento del grupo al que pertenecía o del tratamiento que se aplicó al animal.

Protocolo general.

- ✓ Fijación del material en formol 10% neutro tamponado entre 6-12 hs
- ✓ Alcohol etílico (OL) 70°, 1:30 hs.
- ✓ OL 96°, 1:30 hs.
- ✓ OL 100° (I) 1:30 hs.
- ✓ OL 100° (II) 1:30 hs.
- ✓ Toluol entre 1:30 hs y 3 hs.
- ✓ Parafina (I) 1:30 hs.
- ✓ Parafina (II) 1:30hs.
- ✓ Formación del taco.
- ✓ Corte con micrótopo (Leica RM2145)
- ✓ Coloración con Hematoxilina y Eosina
- ✓ Montaje con bálsamo sintético (Biopur)
- ✓ Observación microscópica (microscopio Olympus BX 51)

Inmunofluorescencia directa para recuento de células IgA positivas.

Se extirpó el intestino grueso a las ratas y se procesó por técnica de congelación. Se lavaron las muestras con buffer de Michelle, se incluyeron en Cryoplast (Biopack) y se realizaron cortes de 0,5 μm en crióstato (Minotome). Las secciones fueron empleadas en ensayos de inmunofluorescencia directa para determinar el número de células IgA+ en cada

lote. Se eliminó el medio de inclusión con acetona y se realizaron dos lavados en buffer PBS (DAKO). Se incubaron los cortes 30 minutos con anticuerpo a-IgA FITC (F0204, dilución 1:50) (DAKO), seguidamente se hicieron nuevos lavados y se cubrieron los preparados con medio de montaje (Fluorescent Mounten Medium-DAKO). Se contó el número de células IgA+ en 30 campos de 100 aumentos empleando un microscopio BX51 de epifluorescencia (OLYMPUS). El resultado se expresó en número de células IgA+/10 campos.

Se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo IgA FITC (F0204) (DAKO) anti IgA humana purificado y conjugado con isotiocianato de fluoresceína isómero 1. Dilución empleada 1:50.

Técnica de inmunohistoquímica (IHQ).

Cortes histológicos de 5 μm incluidos en parafina y montados sobre portaobjetos, fueron procesados para IHQ empleando el método del polímero de dextrán. Luego de remover la parafina en xileno durante 20 minutos, las secciones fueron hidratadas con alcohol etílico 100%, alcohol 95%, alcohol 75% y alcohol 50% durante 5 minutos cada uno, seguido de un pasaje por buffer PBS (buffer fosfato salino) 5 min. Seguidamente, se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena con 0,3% H_2O_2 0,3% durante 15 minutos en cámara húmeda.

Las muestras fueron colocadas en buffer TRIS-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) pH 9,0 en una olla a presión durante 10 minutos para permitir la recuperación antigénica. Una vez concluida la recuperación se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados con buffer PBS de 5 minutos cada uno.

Las muestras se incubaron con 50 μl del anticuerpo policlonal primario en cámara húmeda durante 1 hora. Luego se realizaron 3 lavados con buffer PBS de 5 minutos cada uno.

A continuación se procedió a la incubación con el sistema de detección, anti-Rabbit PolyDetector HRP Label (Bio SB, BSB 0223) durante 30 minutos, lavándose luego 3 veces con buffer PBS 5 minutos cada vez.

La reacción fue revelada aplicando 50 μl de 3,3'-diaminobencidina (PolyDetector DAB[®]) durante 10 min. Posteriormente, se lavó con agua destilada durante 5 minutos y se contrastó con hematoxilina. A continuación se procedió a la deshidratación en la siguiente secuencia de alcoholes: alcohol 50%, alcohol 75%, alcohol 95%, alcohol 100% y finalmente xilol, cada uno de los pasos de 5 minutos de duración cada uno. Por último los cortes se

montaron con bálsamo de Canadá sintético (Biopur) para su posterior observación microscópica.

Para controlar la especificidad de la reacción IHQ se emplearon controles positivos y negativos.

Se empleó el anticuerpo policlonal de conejo purificado por afinidad β -catenina (H-102): sc-7199 (Santa Cruz), un anticuerpo que reacciona con el extremo C-terminal (aminoácidos 680 a 781) de la proteína de origen humano. Este anticuerpo puede utilizarse para la detección por IHQ de β -catenina en ratón, rata y humanos. Dilución empleada 1:400.

Índice de expresión inmunohistoquímica.

En los cortes inmunomarcados se consideró: reacción en célula tumoral versus normal, intensidad medida en cruces + (1=leve), ++ (2=mediana), +++ (3=fuerte) y porcentaje de la reacción (0= sin reacción, 1=<5%, 2=5-30%, 3=30-60%, 4=>60%).

Cada muestra fue coloreada y comparada con una de referencia positiva y otra negativa, previamente clasificada como de leve o fuerte intensidad de coloración. La inmunoreactividad fue evaluada en la extensión completa del tumor por un mismo patólogo, sin conocimiento del grupo al que pertenecía o del tratamiento que se aplicó al animal.

Siguiendo los lineamientos de J. F. You y colaboradores, P. Grabowski y colaboradores (277) y la expresión semicuantitativa de K. Ajioka y colaboradores (278) en cáncer colorectal, se utilizó para el presente estudio un “índice de expresión antigénica”, el cual estuvo conformado de la siguiente manera:

Índice de expresión = intensidad de la reacción x porcentaje de la reacción

La expresión fue considerada de la siguiente manera:

- ✓ Índice 0: reacción Ausente,
- ✓ Índice entre 1 a 6: reacción Débil,
- ✓ Índice entre 7 a 12: reacción Fuerte.

Estudios bacteriológicos.**Recuento de lactobacilos y anaerobios totales en materia fecal.**

Se tomaron muestras de materia fecal de forma espontánea, las mismas fueron colocadas en recipientes estériles tarados, obteniéndose por diferencia el peso de la muestra. Se realizó una suspensión en un caldo extracto de levadura al 0,05% reducido. Esta dilución 1:10 (1g de materia fecal en 10 ml de caldo) proporciona una concentración aproximada de 10^{11} UFC/ml, en base al estimado de 10^{12} UFC/g de materia fecal. A partir de esta se realizan tres diluciones como sigue:

Tubo A	1:100	10^9 UFC/ml
Tubo B	1:100	10^7 UFC/ml
Tubo C	1:100	10^5 UFC/ml

Las diluciones A, B y C se sembraron en agar Rogosa (selectivo para lactobacilos) y agar BHI suplementado con sangre al 5% (para recuento de anaerobios totales). Las placas de agar Rogosa se incubaron a 37°C durante 48 horas en atmósfera reducida de CO₂ y las de agar sangre a la misma temperatura en jarra de anaerobiosis. Luego se contaron las colonias y los resultados fueron expresados en UFC/g de materia fecal.

Materiales.**1,2-Dimetilhidrazina (DMH).**

La DMH se empleó como carcinógeno en dosis de 20 mg/kg de peso intramuscular (IM) durante 8 semanas. La droga fue adecuadamente reconstituida en ácido etilendiaminotetraacético 1 mM (2,92 g de EDTA en 100 ml de solución fisiológica) y llevada a pH 7,0 con bicarbonato de sodio 1M (8,5 g de H₂CO₃Na en 100 ml de SF). Se disolvió la DMH en el 60% del volumen final con EDTA 1 mM, se llevó a pH con H₂CO₃Na 1 M gota a gota y luego se completó el volumen con EDTA 1 mM.

Los animales fueron inyectados por la misma persona a primera hora de la mañana. La administración de la DMH se realizó previa sedación con ACEDAN[®] (maleato de acepromacina, 10 mg/ml, Holliday Scott) intraperitoneal (IP) según el peso de cada animal (Figura 7).

Las drogas se almacenaron en lugar fresco y bien ventilado, lejos de sustancias incompatibles y claramente se indicó su peligrosidad en el envase. Para su manipulación se emplearon las normas de bioseguridad requeridas. Las dosis necesarias de droga se prepararon el día previo a su empleo.

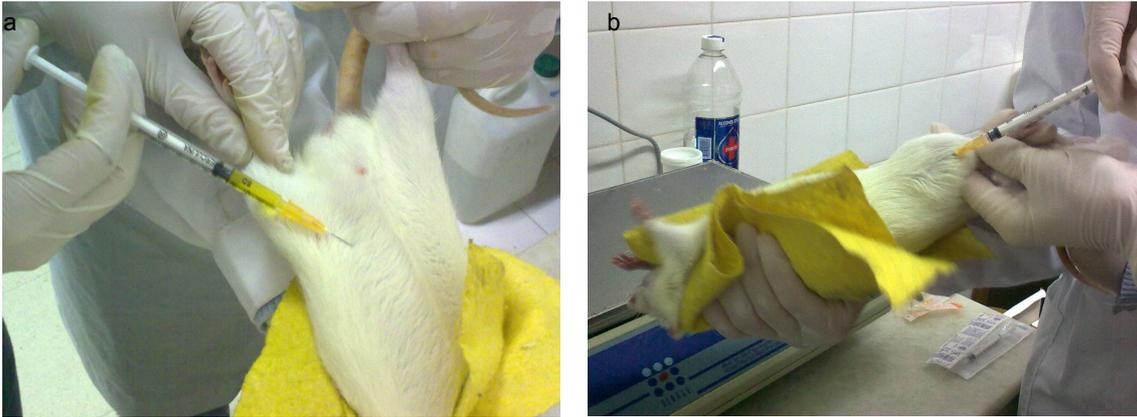


Figura 7: a, administración intraperitoneal de ACEDAN®. b, inyección de DMH intramuscular.

Bioflora® (Laboratorio SIDUS).

Es un probiótico formulado con bacterias intestinales aisladas de personas sanas, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecalis* y *Bifidobacterium brevis*. Las cepas que componen Bioflora® han sido especialmente seleccionadas basándose en experimentos en animales que demostraron su inocuidad. La cadena de frío es condición necesaria para garantizar la vida de los microorganismos.

Cada frasco de Bioflora® contiene:

Fórmula:

<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,3 x 10 ⁷ U.F.C.
<i>Lactobacillus casei</i>	3,3 x 10 ⁷ U.F.C.
<i>Streptococcus faecalis</i>	3,3 x 10 ⁷ U.F.C.
<i>Bifidobacterium brevis</i>	1,1 x 10 ⁷ U.F.C.

Excipientes:

Azúcar	3,5 g
Aerosil	0,1 g
Esencia de frutilla	0,15 g
Rojo Punzó	0,002 g
Esencia de crema	0,15 g
Leche descremada en polvo c.s.p.	7,6 g

La suspensión se reconstituyó en 25 ml de agua destilada y se suministró a los animales por vía oral 1ml por día en forma cíclica durante siete días, seguidos de cinco días de descanso (Figura 8).



Figura 8: administración de Bioflora® por vía oral a las ratas.

Capecitabina (Xeloda®, Laboratorio Roche).

La capecitabina es un carbamato de fluoropirimidina (Figura 9) no citostática que administrada por vía oral actúa como un precursor del citotóxico 5-fluoruracilo (5-FU). Tras ser administrado por vía oral, se absorbe con facilidad en el tubo digestivo. En el hígado, una carboxiesterasa hidroliza gran parte del componente, transformándolo en 5'deoxi-5 fluorocitidina. A continuación la histidina deaminasa, una enzima presente en la mayoría de los tejidos, incluso en los tumores, convierte la 5'deoxi-5 fluorocitidina en deso-5- fluorouridina. Luego la enzima timidina fosforilasa hidroliza esta última en la droga activa el 5-FU, que inhibe la síntesis de ADN y retarda el crecimiento del tejido.

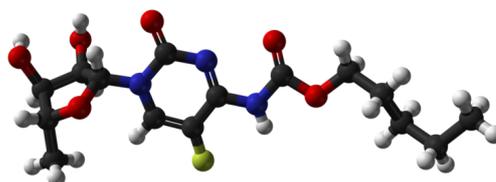
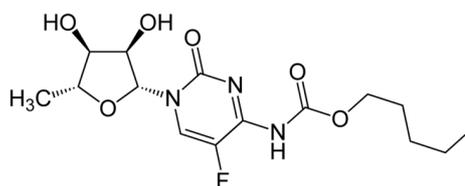


Figura 9: estructura molecular de la capecitabina.

La capecitabina se presenta en comprimidos de 150 y 500 mg. Se emplearon tabletas de 500 mg, las que fueron molidas en un molino chico Retsch Mühle luego se resuspendió en buffer citrato 40 mM (pH 6,0) con 5% de goma arábica como vehículo y se homogeneizó en un lavador ultrasónico Test Lab. Esta suspensión se preparó de modo que

contenga 359 mg/ml (276). La droga así preparada no puede ser administrada por vía oral por lo que se debió suministrar por sonda orogástrica (Figura 10).

La dosis empleada para tratar a los animales fue de 359 mg/kg de peso/14 días con una semana de descanso, continuándose el tratamiento hasta el fin del experimento. La misma fue suministrada por gavage mediante sondas de alimentación (Fine Science Tools, Reusable feeding needl 18061-50, 1.25 mm de diámetro, 50 mm de largo)

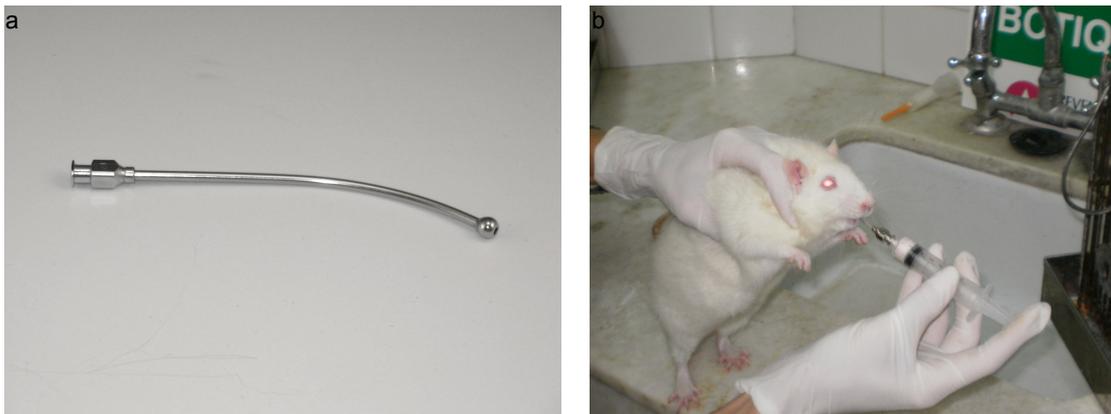


Figura 10: sonda de alimentación empleada para suministrar la droga quimioterapéutica (a) y administración orogástrica de Capecitabina uno de los animales (b).

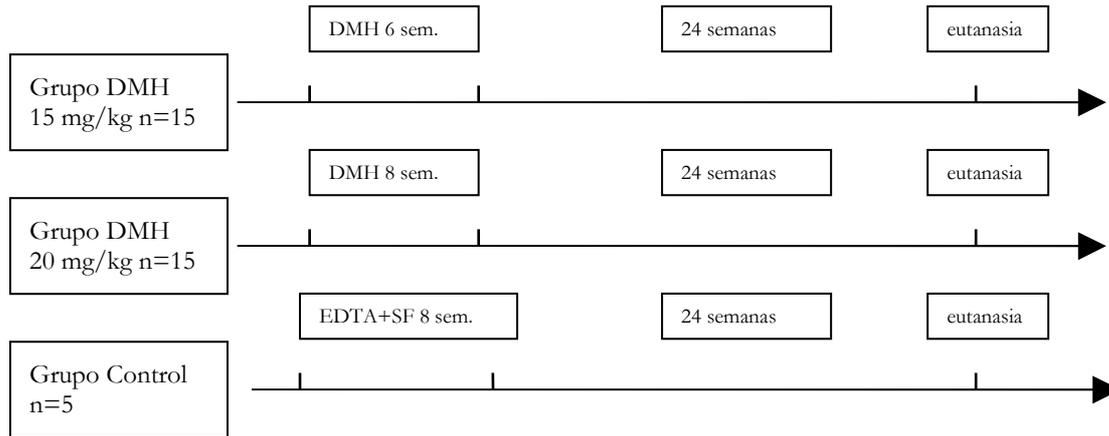
Diseños experimentales.

Desarrollo de un modelo de carcinogénesis colorrectal por inducción con dimetilhidrazina.

Se utilizaron 35 ratas Wistar Lewis macho divididas al azar en dos grupos de 15 y un grupo control de 5. El grupo DMH dosis baja se inyectó con 1,2 dimetilhidrazina en una dosis de 15 mg/kg de peso IM una vez a la semana durante seis semanas consecutivas. El grupo DMH dosis alta recibió una dosis de 20 mg/kg de peso IM una vez a la semana durante ocho semanas consecutivas. El grupo control se inyectó con el vehículo de suspensión de la DMH, ácido etilendiaminotetraacético 1 mM (2,92 g de EDTA en 100 ml de solución fisiológica).

Debido a las características de la droga, las hidrazinas son irritantes locales, se alternó la zona de inyección, una semana la pata derecha a la siguiente la izquierda y así siguiendo, para evitar lesiones por esta causa.

A las 24 semanas de finalizado el período de inducción se realizó la eutanasia y los correspondientes estudio anatomopatológicos.



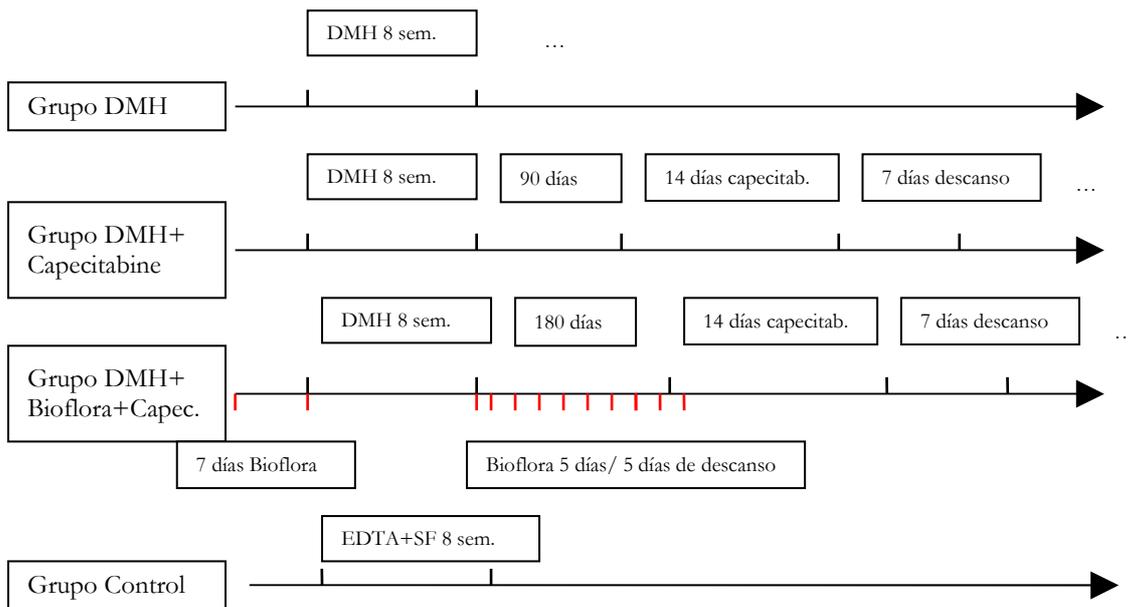
Modelo de inducción de cáncer colorrectal con suplemento de Bioflora®

Se utilizaron 35 ratas Wistar Lewis macho. Los animales se dividieron al azar en dos grupos de 15, divididos en 3 lotes de 5 y un grupo control de 5. El grupo DMH se inyectó con 1,2 dimetilhidrazina en una dosis de 20 mg/kg de peso IM una vez a la semana durante ocho semanas consecutivas. El grupo DMH+Bioflora® recibió la misma dosis de DMH y se le suministró 1 ml de Bioflora® por día durante una semana antes de comenzar la inducción con el carcinógeno y luego de la misma en forma alternada por 5 días con 5 días de suspensión hasta el final del experimento 6 meses luego de finalizada la inducción. El grupo control se inyectó con el vehículo de suspensión de la DMH, ácido etilendiaminotetraacético 1 mM (2,92 g de EDTA en 100 ml de solución fisiológica).

Fueron sacrificados bajo atmósfera de CO₂ 3 animales de cada grupo (elegidos al azar uno por jaula) y uno del grupo control; a los 2, 3, 4, 5 y 6 meses luego de finalizada la inducción.

Modelo de inducción de cáncer colorrectal con suplemento de Bioflora® y tratamiento con capecitabina.

Se utilizaron 35 ratas Wistar Lewis machos. Los animales fueron manipulados manualmente, evitando el estrés al máximo, por operadores entrenados. Los mismos fueron divididos en cuatro grupos: Grupo DMH, Grupo DMH+Capecitabina: inducción con DMH y tratamiento con quimioterapia, Grupo DMH+Capecitabina+Bioflora®: inducción con DMH más administración de Bioflora® y tratamiento con quimioterapia y Grupo Control.



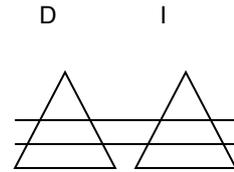
A los grupos DMH, DMH+Capecitabina y DMH+Capecitabina+Bioflora® se les inyectó DMH intramuscular 20 mg/Kg de peso una vez a la semana durante 8 semanas. Todos los animales fueron inyectados por la misma persona a primera hora de la mañana. Los animales del grupo DMH+Capecitabina recibieron además tratamiento quimioterápico mediante gavage con capecitabina Xeloda® (Roche) 359 mg/kg de peso por 14 días con 7 de descanso a partir de los 90 días de la última dosis de DMH, ya que en el experimento anterior se observaron pólipos adenomatosos en todos los animales luego de ese periodo de tiempo. Los animales del grupo DMH+Capecitabina+Bioflora® recibieron el mismo tratamiento que el grupo DMH+Capecitabina y un probiótico (Bioflora®, laboratorio SIDUS). Se le suministró 1 ml de Bioflora® por día durante una semana antes de comenzar la inducción con el carcinógeno y luego de la misma en forma alternada por 5 días con 5 días de suspensión hasta completar el experimento.

Este grupo comenzó a recibir el tratamiento quimioterápico a los 180 días de finalizada la inducción con el carcinógeno ya que la administración del probiótico retarda la

aparición de las lesiones. El grupo control se inyectó con el vehículo de suspensión de la DMH, ácido etilendiaminotetraacético 1 mM (2,92 g de EDTA en 100 ml de solución fisiológica).

Historia clínica

Identificación del animal:
Identificación de la jaula:



Raza: Wistar-Lewis Fecha de nacimiento (dd/mm/aa): / /

Investigador que llena la H.C.:.....

ANTECEDENTES HEREDITARIOS

Madre		Padre	
ID:	F.N:	ID:	F.N:
Falleció:	Causa:	Falleció:	Causa

Datos de interés sobre el animal antes de su entrega:

.....

.....

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Para ser incluidos en este estudio los animales deberán cumplir todos los criterios detallados abajo, redondear la opción correcta:

- Sexo Masculino: Cumple/No Cumple
- Tener ocho semanas de edad ± 2 semanas: Cumple/No Cumple
- No presentar ninguna enfermedad previa ni actual: Cumple/No Cumple
- No haber sido sometido a ningún tratamiento previo aún intrauterino: Cumple/No Cumple
- Examen físico normal: Cumple/No Cumple

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Cualquiera de las siguientes situaciones se considera criterio para excluir al animal de este estudio:

- Cualquier anomalía física
- Alteraciones del comportamiento
- Dificultad para alimentarse
- Disminución de más del 10% del peso corporal

Redondear la opción correcta:

ESTE ANIMAL **Cumple / No Cumple** LOS CRITERIOS PARA INGRESAR AL ESTUDIO.

DIETA

- Tipo:.....
- Agua:.....
- Fecha de inicio (dd/mm/aa): / /

EVOLUCIÓN

Fecha	Observaciones

--	--

Planilla de Autopsia

Fecha:.....

Peso del animal:.....

Descripción:

Examen externo:

.....

Examen interno:

.....

Órgano	Observaciones
Pulmón derecho	
Pulmón izquierdo	
Bazo	
Hígado	
Riñón derecho	
Riñón izquierdo	
Intestino delgado	
Intestino grueso	

Notas:

.....

Parte Diario

Fecha:/...../.....

Hora: :

Item			
1	Condiciones ambientales		
1.1	Controles		
		Ambiente Exterior	Box Bioterio
1.1.1	Temperatura (°C)		
1.1.2	Humedad (%)		
		Box Bioterio	
		Si	No
1.1.3	Ventilación		
1.1.4	Iluminación		
1.2	Factores ambientales		
1.2.1	Ruidos		
1.2.2	Productos químicos		
2	Cuidados de los animales		
2.1	Prácticas generales		
2.1.1	Recepción de animales de otro PGI		
2.1.2	Acondicionamiento y cuarentena		
2.2	Cuidado de los animales		
2.2.1	Alimento	Dieta Básica	
		Otro	
2.2.2	Agua		
2.2.3	Cama / Recolección de desechos		
3	Mantenimiento de las instalaciones		
3.1	Visualización de plagas		
		Bien	Regular
3.2	Limpieza y medidas sanitarias		Mal

Observaciones:.....

Elaborado por: Fiscalizado por:.....

Observaciones del fiscalizador:

Efecto de un probiótico sobre tumores colorrectales inducidos con 1,2 dimetilhidrazina en ratas.

Para determinar la incidencia, localizaciones, tipos y tamaños de lesiones colorrectales desarrolladas en dos grupos de ratas, uno alimentado con alimento balanceado habitual y otro al que se suplementó la dieta con probióticos (Bioflora®) se utilizaron 35 ratas Wistar Lewis macho. Los animales se dividieron al azar en dos grupos de 15, divididos en 3 lotes de 5 y un grupo control de 5. El grupo DMH se inyectó con 1,2 dimetilhidrazina en una dosis de 20 mg/kg de peso IM una vez a la semana durante ocho semanas consecutivas. El grupo DMH+Bioflora® recibió la misma dosis de DMH y se le suministró 1 ml de Bioflora® por día durante una semana antes de comenzar la inducción con el carcinógeno y luego de la misma en forma alternada por 5 días con 5 días de suspensión hasta el final del experimento 6 meses luego de finalizada la inducción.

La evolución de los animales fue seguida mediante partes diarios e historias clínicas. Fueron sacrificados bajo atmósfera de CO₂ 3 animales de cada grupo (elegidos al azar uno por jaula) y uno del grupo control; a los 2, 3, 4, 5 y 6 meses luego de finalizada la inducción. Se realizó el estudio anatomopatológico que incluyó intestino delgado, grueso, recto, pulmones, bazo, hígado, riñones y ganglios mesentéricos. Se inmunomarcaron cortes incluidos en parafina para identificar la localización de β -catenina en la mucosa colónica normal y en las distintas lesiones desarrolladas.

Se realizaron además cortes por congelación para la detección de células IgA secretoras (Rb IgA/FTTC, DAKO F0204) por inmunofluorescencia directa en el intestino grueso de los animales de los distintos grupos.

Se observaron diferencias significativas ($p < 0.001$) en la incidencia de lesiones colorrectales entre ambos grupos. Se hallaron lesiones en 12 de los 15 animales que consumieron alimento balanceado habitual y solo en 5 de los 15 a los que se les suplementó la dieta con Bioflora®. Los animales del grupo control no desarrollaron ningún tipo de lesión.

En el primer sacrificio, realizado 2 meses luego de finalizada la inducción con el carcinógeno químico, se observaron dos adenocarcinomas intramucosos en el grupo DMH y no se encontraron lesiones en el grupo DMH+Bioflora®. En el segundo sacrificio se observaron pólipos adenomatosos en los tres animales del grupo DMH y no fueron halladas lesiones en el grupo DMH+Bioflora®. En el tercer sacrificio se detectaron adenocarcinomas en dos animales del grupo DMH y un pólipo y un adenocarcinoma en un animal del grupo DMH+Bioflora®. Al realizar el cuarto sacrificio se encontraron lesiones

en todos los animales del grupo DMH y sólo en uno del grupo DMH+Bioflora®. En el último sacrificio, 6 meses luego de finalizada la inducción con DMH, se localizaron lesiones carcinomatosas en todos los animales de ambos grupos. El número y localización de las lesiones para ambos grupos se detalla en las tablas 4 y 5.

Grupo DMH	Pólipos		Tumores		Metástasis		
	rata N°	N°	Localización	N°	Localización	N°	Localización
1°sacrificio	1			1	CT		
	2			1	CD		
	3						
2°sacrificio	4	3	CD				
	5	2	CD				
	6	2	CT				
3°sacrificio	7						
	8			2	CD-R		
	9			2	CA-CT		
4°sacrificio	10			2	CA		
	11			3	CD-R		
	12	1	CA				
5°sacrificio	13	1	CD				
	14			3	CD		
	15			3	CD	3	G

Tabla 4: número, localizaciones y metástasis encontradas en el grupo DMH en los distintos sacrificios.

Grupo DMH +Bioflora®	Pólipos		Tumores		Metástasis		
	rata N°	N°	Localización	N°	Localización	N°	Localización
1°sacrificio	1						
	2						
	3						
2°sacrificio	4						
	5						
	6						
3°sacrificio	7	1	CT	1	CD		
	8						
	9						
4°sacrificio	10			1	CA		
	11						
	12						
5°sacrificio	13	1	CD	2	CA-CD		
	14	2	CD-R				
	15			1	CA	3	G

Tabla 5: número, localizaciones y metástasis encontradas en el grupo DMH+Bioflora® en los distintos sacrificios.

Referencias: CA: colon ascendente; CD: colon descendente; CT: colon transversal; R: recto; G: ganglios

Las localizaciones y tipos tumorales son semejantes a las que se observan en humanos (Figuras 23 y 24).

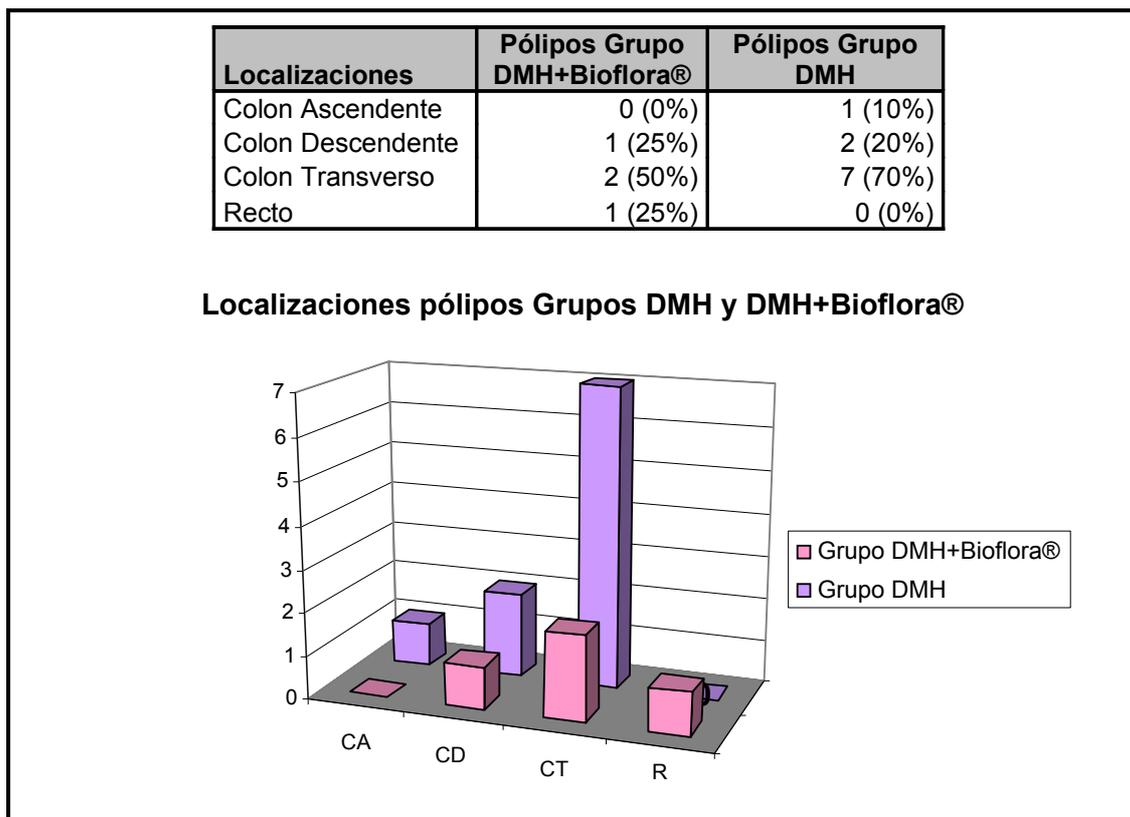


Figura 23: Localizaciones de los pólipos hallados en los grupos DMH y DMH+ Bioflora®. Referencias: CA: colon ascendente; CD: colon descendente; CT: colon transverso; R: recto

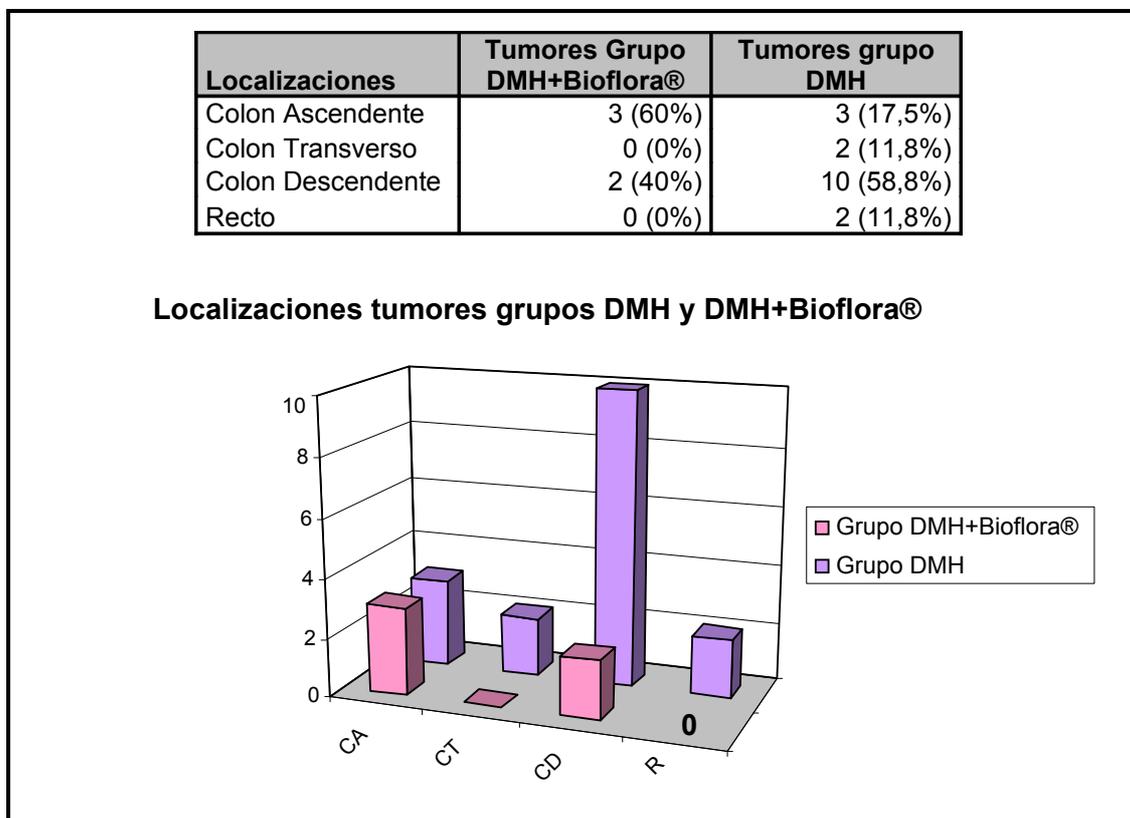


Figura 24: Localizaciones de los tumores hallados en los grupos DMH y DMH+ Bioflora®. Referencias: CA: colon ascendente; CD: colon descendente; CT: colon transverso; R: recto

El número de células IgA⁺ se incrementa significativamente ($p < 0.01$) en el intestino de los animales que recibieron suplemento de probióticos (Grupo DMH+ Bioflora®), con respecto a los animales a los que no lo consumieron (Grupo DMH). No observándose diferencias significativas entre el Grupo DMH+ Bioflora® y el control (Figura 25).

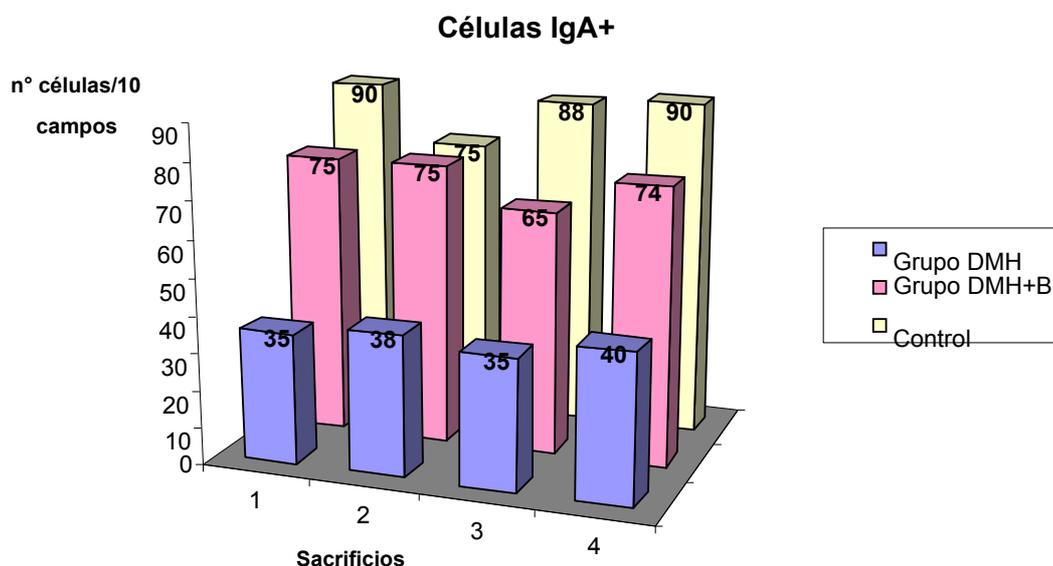


Figura 25: promedio del número de células IgA⁺ en los distintos sacrificios para los tres grupos estudiados.

En el Grupo DMH+ Bioflora® se observa un aumento de las placas de Peyer con dilatación de los linfáticos subyacentes y acumulación de linfocitos en dichos vasos (Figura 27). En el mismo nivel se observa mayor cantidad de linfocitos intramucosos y en sectores con moderada exocitosis intraglandular de más de 3 por glándula (Figura 28).



Figura 26: Grupo Control, corte transversal de mucosa colónica normal. Se observan las cuatro capas de la pared, mucosa (m), submucosa (sm), muscular externa (me) y serosa (s). Hematoxilina & eosina.

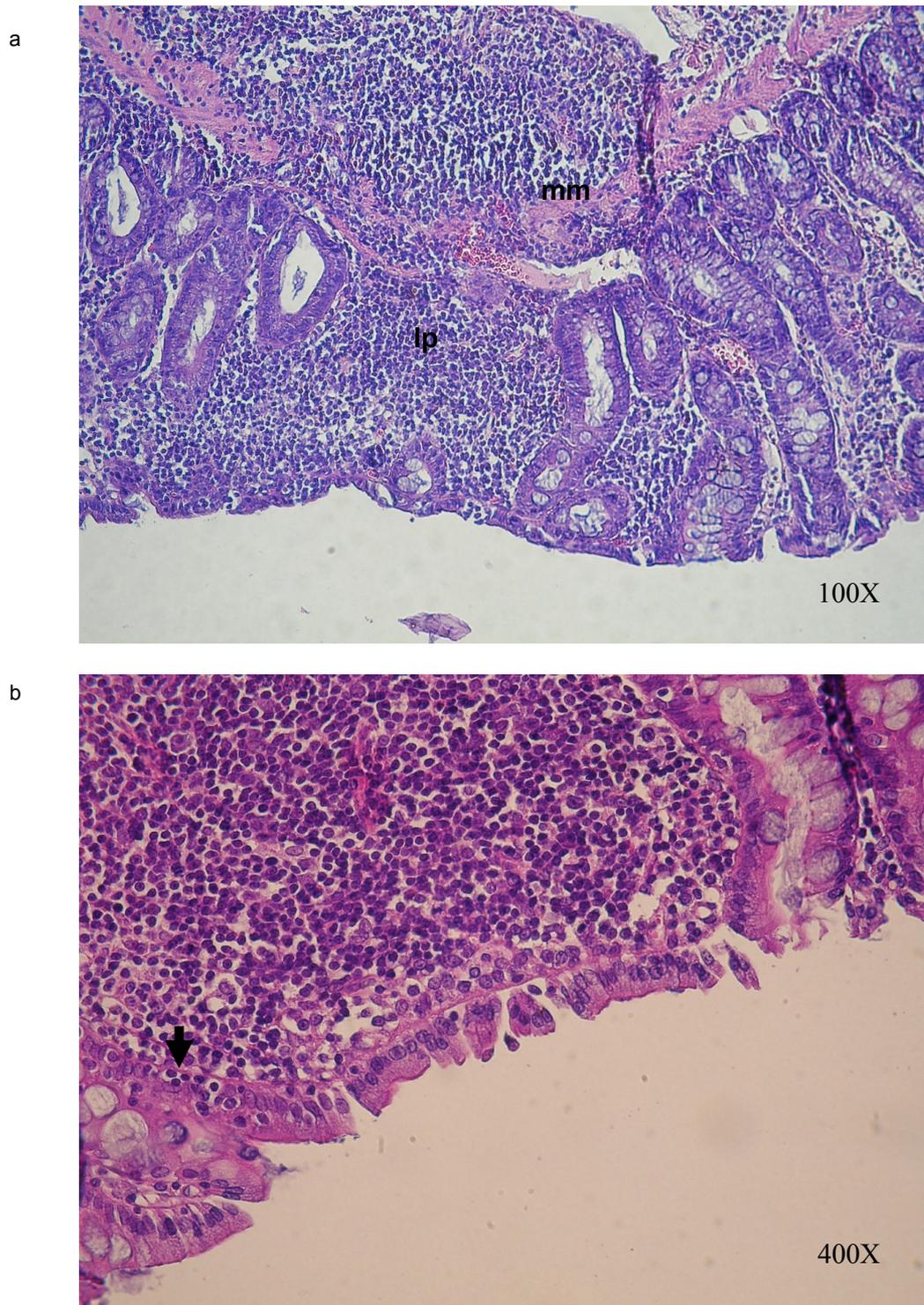


Figura 27: Grupo DMH+Bioflora®, mucosa normal (a), la lámina propia (lp) se observa muy infiltrada de linfocitos y la muscular de la mucosa (mm) en la base de las glándulas se hace difícil de reconocer. Linfocitos intramucosos (b) que pueden reconocerse por su núcleo redondeado, pequeño e hiper cromático (flecha). Hematoxilina & eosina.

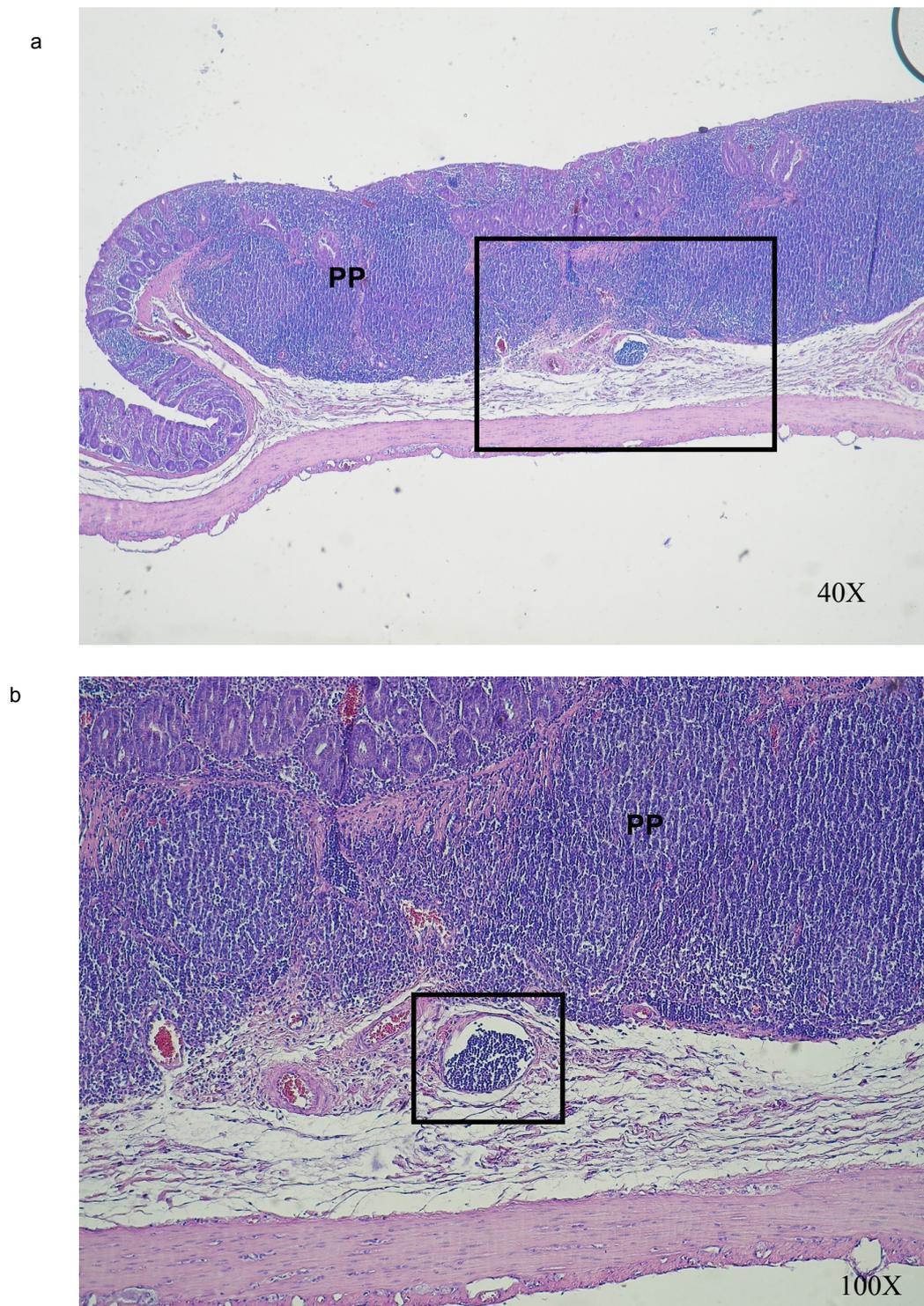


Figura 28: Grupo DMH+Bioflora®, mucosa normal de colon de rata, en la submucosa se observa un aumento de las placas de Peyer (PP) con dilatación de los linfáticos subyacentes (a) y un vaso linfático con acumulación de linfocitos (b, recuadro). Hematoxilina & eosina.

Cuando analizamos lo obtenido en relación a β -catenina, se observó una marcación fuerte (índice de reacción=12) en membrana plasmática y débil en citoplasma (índice de reacción=4,8) en los tejidos que no presentaron lesiones del grupo Control. En los Grupos DMH y DMH+ Bioflora® se encontró una reacción fuerte tanto en membrana (índice de reacción=12) como en citoplasma (índice de reacción Grupo DMH=7, índice de reacción Grupo DMH+ Bioflora®=8,6). No se observó reacción en los núcleos de los tejidos normales de ninguno de los grupos (Figuras 29 y 30, Tabla 6).

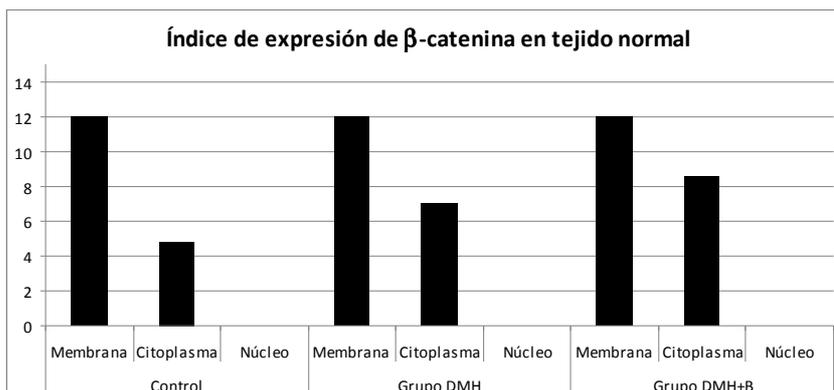


Figura 29: M: membrana, C: citoplasma, N: núcleo.

Grupo		Índice de expresión
Control	Membrana	12
	Citoplasma	4,8
	Núcleo	0
Grupo DMH	Membrana	12
	Citoplasma	7
	Núcleo	0
Grupo DMH+B	Membrana	12
	Citoplasma	8,6
	Núcleo	0

Tabla 6: índice de expresión de β -catenina en tejido normal.

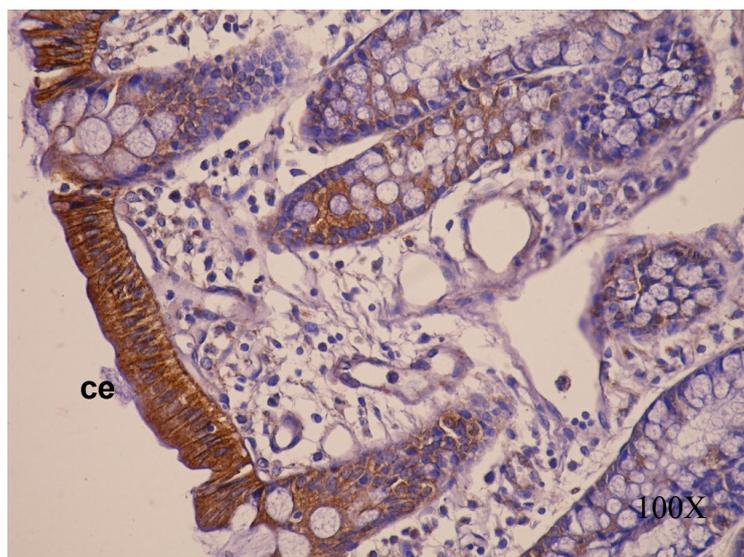


Figura 30: Marcación inmunohistoquímica para β -catenina en mucosa colónica normal, se observa la marcación en membrana plasmática y citoplasma de las células epiteliales (ce). Contraste Hematoxilina.

En los pólipos se observó una expresión similar en los grupos DMH y DMH+ Bioflora® con un índice de reacción fuerte tanto en citoplasma como en membrana plasmática y débil en núcleos (Figuras 32 y 33, Tabla 7).

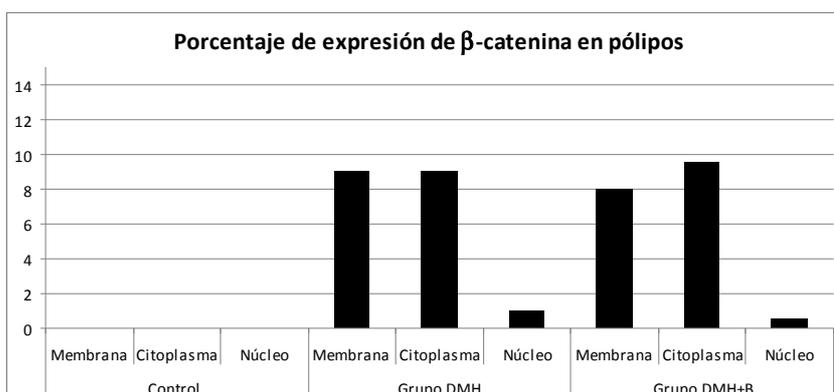


Figura 31: M: membrana, C: citoplasma, N: núcleo.

Grupo	Índice de expresión	
Control	Membrana	0
	Citoplasma	0
	Núcleo	0
Grupo DMH	Membrana	9
	Citoplasma	9
	Núcleo	1
Grupo DMH+B	Membrana	8
	Citoplasma	9,5
	Núcleo	0,5

Tabla 7: índice de expresión de β -catenina en pólipos.

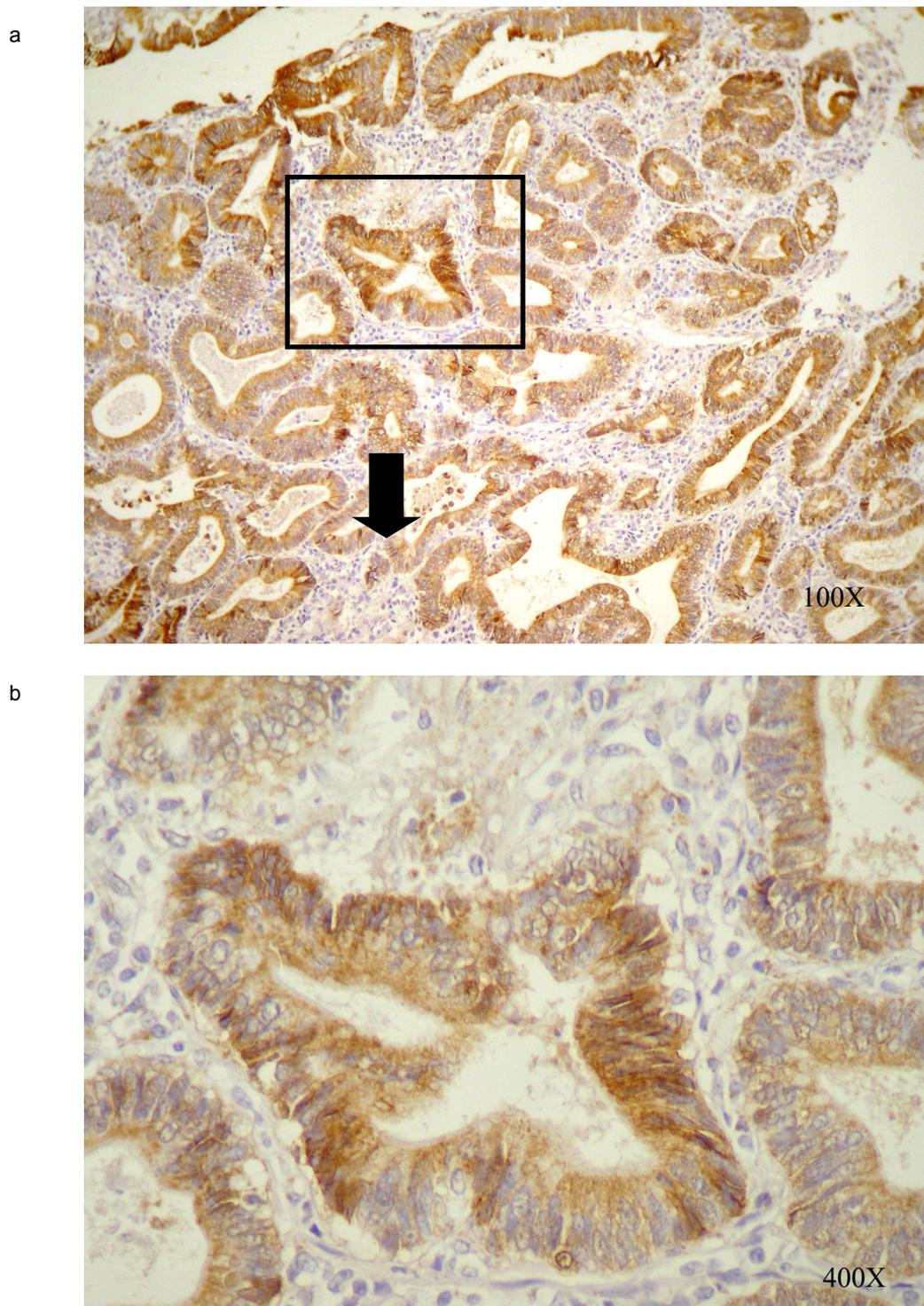


Figura 32: Marcación inmunohistoquímica para β -catenina en pólipo (a). Se observa una disminución en la intensidad de la marcación en la membrana de las células epiteliales, un aumento de la marcación citoplasmática y un escaso número de núcleos marcados (b). Contraste Hematoxilina.

En los adenocarcinomas se observa una disminución importante del índice de expresión de membrana citoplasmática que pasa a ser débil. El índice en citoplasma es muy semejante al que se observa en los pólipos y aparece una reacción nuclear fuerte que está presente en todos los adenocarcinomas estudiados (Figuras 33 y 34, Tabla 8).

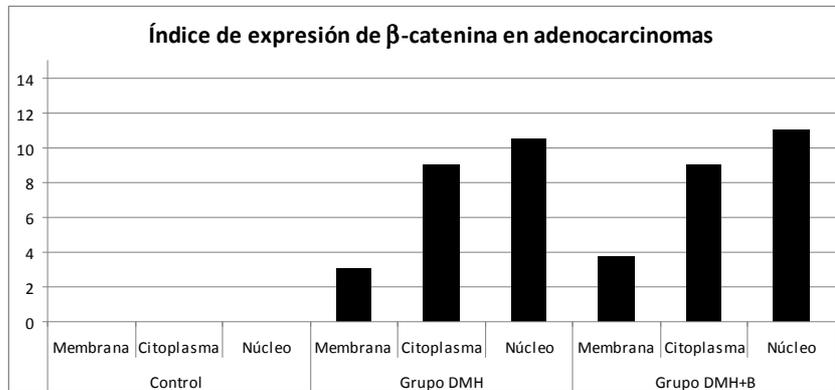


Figura 33: M: membrana, C: citoplasma, N: núcleo.

Grupo		Índice de expresión
Control	Membrana	0
	Citoplasma	0
	Núcleo	0
Grupo DMH	Membrana	3
	Citoplasma	9
	Núcleo	10,5
Grupo DMH+B	Membrana	3,8
	Citoplasma	9
	Núcleo	11

Tabla 8: Índice de expresión de β-catenina en adenocarcinomas.

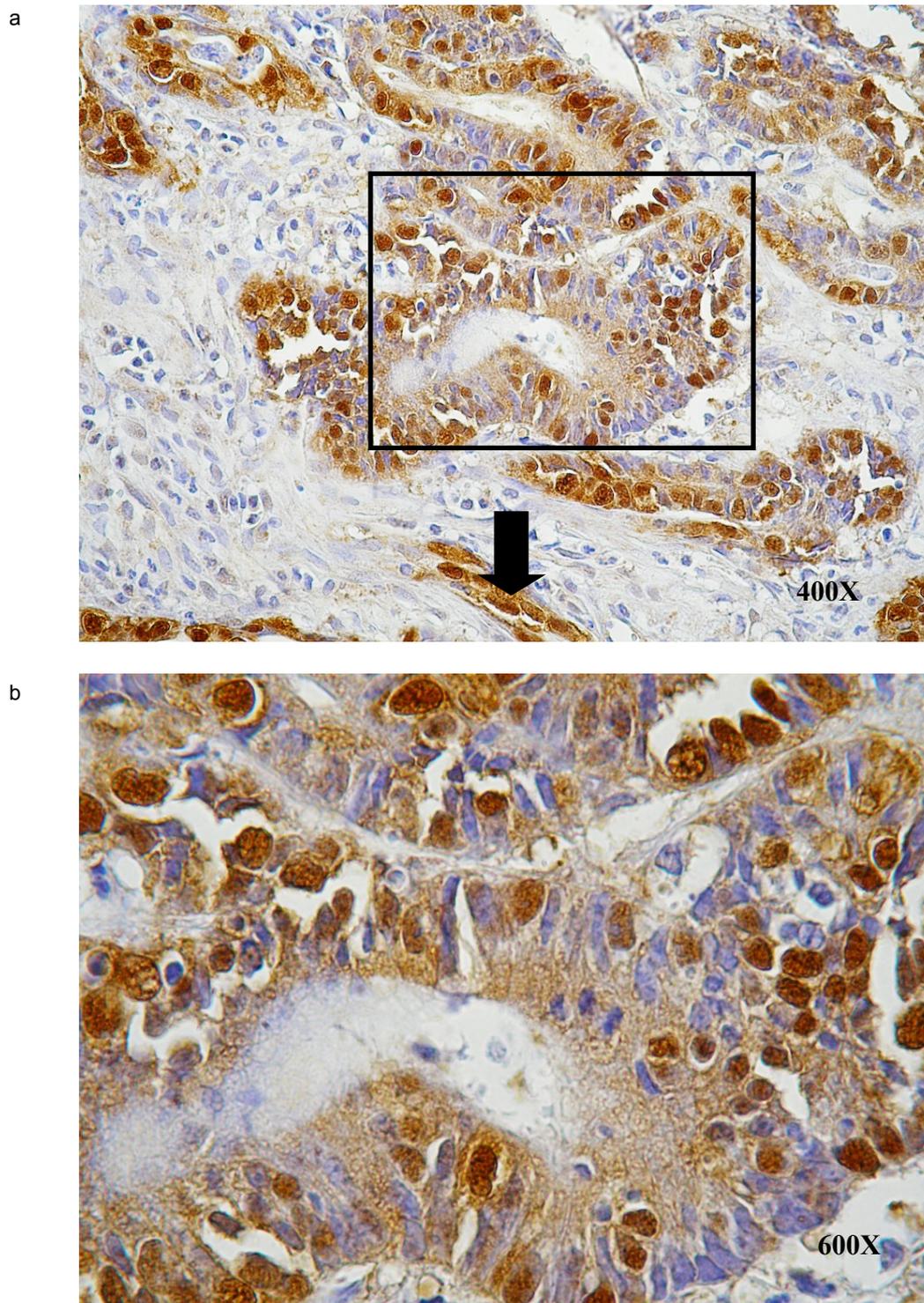


Figura 34: Marcación inmunohistoquímica para β -catenina en adenocarcinoma (a). Se observa una importante disminución en la marcación de membrana en las células del adenocarcinoma, una moderada marcación citoplasmática y la aparición de una intensa marcación nuclear (b). Contraste Hematoxilina.

Cuando se comparan los índices de expresión de β -catenina en las distintas localizaciones en tejido normal, pólipos y adenocarcinomas, no se observan diferencias entre los grupo DMH y DMH+Bioflora® (Figuras 35 y 36, Tabla 9).

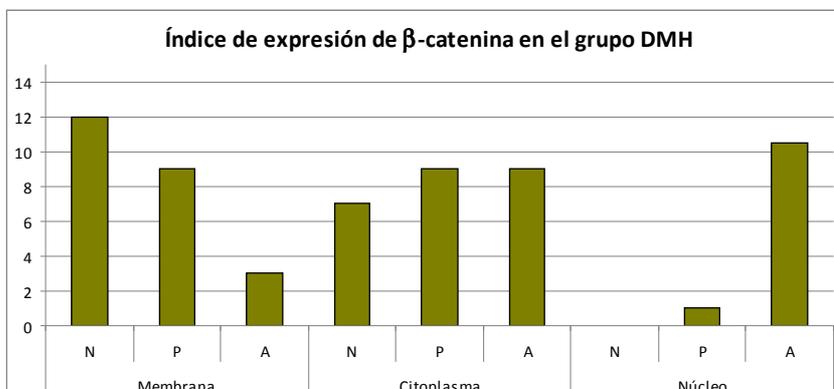


Figura 35: N: tejido normal, P: pólipos, A: adenocarcinomas.

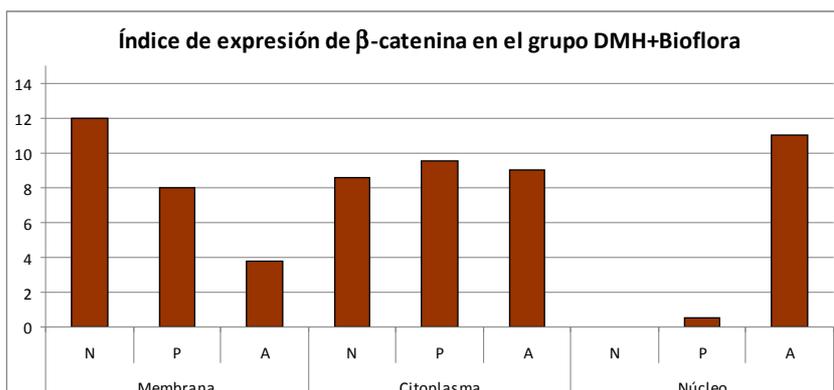


Figura 36: N: tejido normal, P: pólipos, A: adenocarcinomas.

Localización		IE grupo DMH	IE grupo DMH+B
Membrana	Normal	12	12
	Pólipos	9	8
	Adenocarcinomas	3	3,8
Citoplasma	Normal	7	8,6
	Pólipos	9	9,5
	Adenocarcinomas	9	9
Núcleo	Normal	0	0
	Pólipos	1	0,5
	Adenocarcinomas	10,5	11

Tabla 9: IE: índice de expresión en inmunohistoquímica para β -catenina en las distintas localizaciones.

CONCLUSIONES

Conclusiones generales

Las ratas y los ratones responden bien a carcinógenos químicos, pero con grandes variaciones entre las razas (197) mostrando incluso distinta susceptibilidad para cada uno de los segmentos anatómicos del colon (198). Las razas más sensibles a la DMH son Fisher, Sprague-Dawley y BD-IX. Diferentes autores, utilizando distintos modelos de inducción de cáncer de colon, con variaciones en cuanto a la cepa de animales empleada, la dosis, la vía y el tiempo de administración de la droga, obtienen variados porcentajes de inducción de tumores (246, 247, 248). Por estas discrepancias halladas en la bibliografía, fue necesario desarrollar un modelo de carcinogénesis colorrectal que nos permita cumplir con los objetivos de nuestro trabajo respetando el criterio de las 3R (reemplazo, refinamiento y reducción).

Nuestros estudios mostraron una relación directa entre la dosis de dimetihidrazina y el porcentaje de inducción de tumores desarrollados por los animales. Se pudo concluir que los tipos histológicos y ubicaciones de las lesiones en las condiciones experimentales fueron semejantes a las encontradas en humanos para ambos grupos y en ninguno se encontraron neoplasias distintas del tropismo del agente carcinógeno empleado.

La frecuencia aproximada de las distintas localizaciones de los carcinomas colorrectales en humanos son entre 85 y 90% para los adenocarcinomas, 8 a 10% para los carcinomas mucinosos, 2% para los carcinomas de células en anillo de sello y porcentajes menores al 1% para otros tipos histológicos (277). En nuestra experiencia, en el grupo al que se administró 20 mg/kg de peso de DMH se halló una frecuencia semejante, un 87% de adenocarcinomas y un 13% de carcinomas mucosecretantes. No se registraron muertes relacionadas con la aplicación de la 1,2-DMH.

Se sabe que la IgA cumple un importante rol en la protección de las mucosas frente a los patógenos. Se ha demostrado clínicamente que la administración de probióticos reduce la severidad y duración de la diarrea viral, el riesgo de contraer diarrea del viajero y el riesgo de la diarrea asociada al uso de antibióticos en niños. En nuestro modelo el incremento del número de células IgA+ resulta dependiente de la dosis del probiótico, se detecta un máximo a los 3 días que decae al nivel basal luego de 8 días de consumo, indicando que la administración cíclica sería más conveniente para obtener un efecto de estimulación sostenido sobre el sistema inmune. Estos resultados son semejantes a los encontrados en ratones, con la diferencia que el pico máximo de células IgA+ se obtiene más rápidamente en las ratas (16, 22). Probablemente el aumento de células IgA+ se deba al elevado número de BL presentes en el intestino hasta el día 15 postadministración de

Bioflora®. De acuerdo a estos resultados se eligió un esquema cíclico de suministro del probiótico de 5 días con 5 días de suspensión y una dosis de 1 ml/día.

Varios estudios indican que la microbiota intestinal es determinante en la salud. Su composición y actividad metabólica constituyen un área de abordaje interesante para mejorar la salud y reducir el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal, lo que puede llevarse a cabo a través de suplementos en la dieta, como puede ser el consumo de probióticos (279). El efecto de la dieta en la carcinogénesis puede darse por cambios en la actividad y composición de la microbiota intestinal (280). Los probióticos pueden modular las actividades metabólicas de la microbiota intestinal por tres posibles mecanismos: compitiendo y desplazando otros componentes de la microbiota, produciendo sustancias antibacterianas, incluyendo bacteriocinas, para controlar el crecimiento de otros miembros de la microbiota y produciendo ácido láctico y otros ácidos orgánicos que disminuyan el pH luminal y modulen así la actividad enzimática (281, 282, 283). En general, bacterias como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* poseen una muy baja actividad de enzimas que convierten procarcinógenos en carcinógenos en comparación con bacterias de los géneros *Bacteroides* y *Clostridium* (284).

Shahani y col. observaron que el consumo de leche fermentada con *L. acidophilus* puede reducir la población de bacterias dañinas e incrementar los niveles de lactobacilos en el intestino (285), sugiriendo que la suplementación con esta BL podría tener efectos beneficiosos inhibiendo el crecimiento de bacterias que estarían involucradas en la producción de promotores tumorales o procarcinógenos. No todos los estudios muestran correlación entre la administración de probióticos y la actividad de la microbiota intestinal. Bartram y col. sostienen que la microbiota fecal es relativamente estable y que no se ve afectada por la administración de *B. longum*. Tannock y col. sostienen que los efectos protectivos de las BL solo se observan cuando se encuentran en alta densidad en la microflora fecal y su consumo es regular.

Al suministrar 1 ml de Bioflora® por día a los animales y realizar el recuento de lactobacilos y anaerobios en materia fecal encontramos que el recuento de anaerobios totales decayó significativamente a los 5 días de su consumo y el de lactobacilos se duplicó luego de 3 días de administración y se mantuvo estable durante los 15 días subsiguientes, demostrando que en este modelo el probiótico es capaz de influenciar la composición de la microbiota intestinal.

El desarrollo del cáncer de colon es un proceso multifactorial influenciado por factores genéticos, fisiológicos y ambientales (286, 281). En cuanto a los factores

ambientales, el estilo de vida, en particular la dieta, puede afectar el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (279, 287). Se supone que la conexión entre la dieta y el cáncer colorrectal puede deberse a la influencia de la dieta en la microbiota intestinal y el metabolismo bacteriano, haciendo de ambos factores relevantes en la etiología de esta enfermedad (288, 289).

Aunque los mecanismos a través de los cuales los probióticos podrían inhibir el cáncer de colon no han sido totalmente elucidados, se han descrito algunos posibles mecanismos como la alteración de la composición y actividad metabólica de la microbiota intestinal, cambios en las condiciones fisicoquímicas del colon, unión a carcinógenos de la dieta, producción de ácidos grasos de cadena corta, protección de la mucosa colónica y mejoramiento del sistema inmune (279, 281).

Dado el rol de la microbiota en la carcinogénesis colónica, se cree que los factores que modulen de manera beneficiosa la composición y/o la actividad de la misma podrían inhibir el desarrollo del cáncer colorrectal. Numerosas observaciones experimentales han señalado el potencial efecto protector de las BL en el desarrollo del cáncer de colon (290). Como parte de la microbiota intestinal las BL serían capaces de promover estos efectos beneficiosos, retardando la carcinogénesis colónica influenciando las funciones metabólicas, protectivas e inmunológicas en el intestino (291).

Algunas explicaciones para los mecanismos por los cuales los probióticos podrían inhibir o retardar el desarrollo del cáncer colorrectal incluyen: la alteración de las actividades metabólicas de la microbiota intestinal, cambios cualitativos y cuantitativos en la composición de la misma, unión y/o degradación de potenciales carcinógenos y modulación de la respuesta inmune del huésped (282, 283).

La evidencia de la capacidad de los probióticos de unirse a los carcinógenos no es concluyente (292) y dependería del mutágeno y la cepa bacteriana empleadas (284).

Varios estudios reportan el efecto de las BL en la fase de promoción de la carcinogénesis. Rowland y col. (293) encontraron que la administración de *B. longum* (6×10^9 UFC/día), en ratas que recibieron azometano como inductor de la carcinogénesis, inhibe la formación de focos de criptas aberrantes. Ya que el tratamiento con el probiótico comienza una semana luego de la exposición al carcinógeno, estos resultados sugieren un efecto en la fase temprana de promoción de la carcinogénesis (284).

Goldin y col. (294) observaron una menor incidencia de tumores colónicos en ratas que consumieron *Lactobacillus* GG antes, durante y después de la inducción con DMH con

respecto a los que solo lo recibieron después de recibir el carcinógeno, concluyendo que el probiótico actuaría inhibiendo la fase de iniciación de la carcinogénesis.

Kumar y col. (295) testearon la eficacia de *L. plantarum* AS1 en la supresión del cáncer colorrectal inducido con DMH en ratas informando que esta BL es capaz de disminuir la incidencia de tumores a través de su actividad antioxidante. Sin embargo, se necesita una administración más prolongada de esta cepa para determinar el máximo efecto inhibitorio.

Gallanger y col. (296) obtienen resultados inconsistentes cuando emplean un protocolo de promoción de focos de criptas aberrantes en ratas junto con la administración de *B. longum* y *L. acidophilus*, los que ellos mismos atribuyen a las diferencias de edad en los animales al momento de administrar la DMH.

Los probióticos son capaces de modular el sistema inmune de manera dependiente de la cepa empleada (297), entre otras variables, por lo tanto las diferentes cepas podrían inducir diferentes respuestas inmunes que llevarían al retardo o a la inhibición de la carcinogénesis.

La administración del probiótico Bioflora® no impidió el desarrollo de tumores en los animales tratados con DMH, pero indujo un marcado retardo en el crecimiento de los mismos. Dicho efecto podría deberse al aumento en un parámetro importante como es el número de células IgA+ de probada actividad antiinflamatoria. La determinación de otros parámetros antiinflamatorios inducidos por Bioflora® permitirá la sugerencia de su empleo en la prevención de tumores intestinales.

Iwamoto y col. describen la expresión de β -catenina en colon normal y neoplásico (298). En la mucosa colónica normal se localiza predominantemente en la membrana plasmática de los colonocitos, no observándose marcación nuclear en todos los niveles de las criptas y encuentran un patrón similar en 9 pólipos hiperplásicos. En 58 pólipos adenomatosos se presenta inmunoreactividad tanto en el citoplasma como en el núcleo, la cual es intensa y se presenta en el 100% de las células. La marcación también es citoplásmica y nuclear en los 83 adenocarcinomas estudiados. La intensidad de la marcación citoplasmática es mayor en las células de los adenocarcinomas que en las de los pólipos adenomatosos. También estudiaron 12 adenocarcinomas en ratones obtenidos por inducción con azoximetano y en todos ellos hallaron marcación nuclear y citoplasmática para β -catenina. Este último hallazgo se condice con nuestras observaciones para los adenocarcinomas desarrollados en las ratas, sin embargo no encontramos diferencia en la marcación citoplasmática entre los pólipos y los adenocarcinomas y la marcación nuclear en

pólipos se encontró en un bajo porcentaje, pero nosotros no diferenciamos entre pólipos hiperplásicos y adenomatosos. Estas observaciones sugieren que la acumulación nuclear de β -catenina sería un paso común, potencialmente importante y posiblemente esencial en el proceso de la carcinogénesis colónica.

La elevada expresión de β -catenina en citoplasma sería consecuencia de la incapacidad de la degradación proteosómica, lo que llevaría a la traslocación nuclear de la proteína donde activaría la transcripción de genes que promueven el proceso de carcinogénesis colónica.

Si bien el grupo al que se suministró Bioflora® tuvo un índice de expresión inmunohistoquímico para β -catenina menor en pólipos en el núcleo (IE=1 para el grupo A, IE=0,5 para el grupo B), ello no es evidente cuando se desarrolla el adenocarcinoma, donde no se observaron diferencias entre los grupos A y B en la expresión de β -catenina y en el aumento de la traslocación al núcleo (IE=10,5 para el grupo A, IE=11 para el grupo B). A pesar que el probiótico mejora el estado inmune a nivel del intestino, no parece tener influencia en los mecanismos inhibitorios de señales que llevan al desarrollo tumoral.

Al efectuar la comparación global de las distribuciones de sobrevida para evaluar el efecto del probiótico en la sobrevida de los animales en tratamiento para cáncer de colon de todos los grupos estudiados (grupo DMH, grupo DMH+Capecitabina, grupo DMH + Bioflora®+Capecitabina y grupo control) se encontró un nivel de significación de $\alpha=0,0001$ menor a la requerida para la prueba ($\alpha=0,001$) por lo que la diferencia entre los grupos es altamente significativa.

Al analizar la comparación entre pares de grupos se encontró una diferencia significativa entre el grupo DMH y el resto de los grupos (nivel de significación requerido $\alpha=0,005$), no observándose diferencia significativa entre el grupo control y el grupo que recibió Bioflora®.

La mucositis (inflamación de las membranas mucosas) es una de las complicaciones gastrointestinales más problemáticas asociadas a la quimioterapia para el cáncer (299, 300). Los pacientes pueden exhibir síntomas como dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarrea. Además la quimioterapia altera la composición de la microbiota intestinal, lo que es crítico para el metabolismo de varias enzimas intestinales y la regulación de las funciones inmunes. Los regímenes basados en 5-fluoruracilo (5-FU), capecitabina e irinotecan, comúnmente usados en el tratamiento del cáncer colorrectal se asocian frecuentemente con diarrea. La diarrea severa puede ocasionar un desbalance metabólico o nutricional y la neutropenia asociada a diarrea es un riesgo para la vida del paciente. Se estima que un 20 a 45% de los

pacientes en quimioterapia experimentan diarrea durante el tratamiento, lo que implica una peor calidad de vida y resulta en interrupciones de la quimioterapia y prolongación de las internaciones hospitalarias (301, 302, 303). La excesiva motilidad intestinal puede ser reducida usando drogas como loperamida y análogos de la somatostatina, pero estos tratamientos también se asocian a efectos adversos, por lo que se necesitan maneras más simples y seguras de reducir la diarrea en estos casos. Österlund y col. estudiaron el rol de *Lactobacillus rhamnosus* GG en la prevención de la diarrea de grado 3 o 4 inducida por la quimioterapia adyuvante (5-FU) en pacientes con cáncer colorrectal estadio B o C de Dukes (n=126), que presentaron menos diarrea, menor dolor abdominal, debieron recibir menos reducciones en las dosis de quimioterapia debido a la toxicidad intestinal y requirieron menos cuidados intrahospitalarios (304). Además la administración de *Lactobacillus rhamnosus* GG no parece tener efectos adversos, es simple y de bajo costo. Los autores observan como limitación del estudio que no se incluyen pacientes tratados con regímenes que contengan irinotecan, capecitabina u oxaliplatino, que son usados comúnmente para el tratamiento del cáncer colorrectal. El estudio tampoco es ciego ni controlado con placebo, lo cual podría o no tener influencia sobre los efectos observados.

En un estudio de Von Bültzingslöwen y col. el uso de *Lactobacillus plantarum* durante la administración de 5-FU en ratas mejoró la alimentación y ayudó al mantenimiento del peso corporal, pero no resultó efectivo en la prevención de la diarrea (305).

Los resultados obtenidos muestran que Bioflora® favorece el tratamiento con el quimioterápico empleado al aumentar la supervivencia, peso de los animales, disminuir las manifestaciones clínicas del cáncer; llevando a un retardo en el crecimiento tumoral. Estos efectos serían debidos a varios mecanismos a través de los cuales los probióticos pueden actuar, entre ellos la modulación de la microbiota intestinal no patógena y su capacidad para ligar y degradar carcinógenos.

Conclusión final

Los probióticos juegan un rol protector en el proceso inicial de la carcinogénesis, sin embargo es importante determinar como la administración a largo plazo de estos microorganismos resultaría efectiva en la incidencia del cáncer colorrectal en humanos. Además existen desafíos para el desarrollo de probióticos, incluyendo la selección de los microorganismos más apropiados, el control de su consumo en la dieta, el tiempo y la frecuencia de las dosis recomendadas y el uso de biomarcadores para riesgo de cáncer que permitan monitorear su uso en ensayos clínicos. Se requieren modelos experimentales para

entender los mecanismos específicos involucrados en la influencia de los probióticos en el desarrollo del cáncer de colon.

La gran variedad de resultados reportados en la literatura dejan a la luz cierta controversia en cuanto a los efectos observados, especialmente la dificultad para comparar los estudios debido a las variaciones en el tiempo de desarrollo de los experimentos, las cepas bacterianas empleadas, las dosis y frecuencia de administración de los probióticos. Es de gran importancia que se desarrollen en el futuro estudios donde se definan y estandaricen las variables mencionadas, especialmente para dilucidar los mecanismos involucrados en cada uno de los efectos observados (306).

En el futuro será necesario el trabajo interdisciplinario de las ciencias y tecnologías en alimentación, nutrición, microbiología, ingeniería genética y biología molecular para ofrecer al mercado de consumidores productos accesibles y efectivos que ayuden a reducir el riesgo de ciertas enfermedades, particularmente algunos tipos de cáncer, y que actúen como adyuvantes en tratamiento específicos existentes para algunas enfermedades.

La significación más importante de esta tesis fue demostrar la inocuidad de la administración probiótica junto con un agente quimioterápico como la capecitabina durante la terapia antitumoral, ya que no se observaron efectos colaterales que hubieran podido bloquear el efecto del quimioterápico, ni se favorecieron mecanismos biológicos que afecten el ciclo celular, más allá de los que la droga carcinógena DMH indujo por sí misma.

La relación entre los efectos adversos de la quimioterapia y la administración de probióticos es extremadamente compleja. Se requieren más estudios que diluciden los mecanismos de respuesta a la administración de probióticos específicos durante el tratamiento quimioterápico para que éstos se transformen en nuevas, económicas y beneficiosas terapias asociadas a las ya establecidas para el cáncer colorrectal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adolfsson O, Meydani S, Russell R. Yogurt and gut function. *Am J of Clin Nutr*. 2004;80:245-256.
2. Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998;39:237–8.
3. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 1994;35:483–9.
4. Alm L, Pettersson L. Survival rate of lactobacilli during digestion: an in vitro study *Am J Clin Nutr* 1980;33(suppl):S2543 (abstr).
5. Robins-Browne RM, Path FF, Levine MM. The fate of ingested lactobacilli in the proximal small intestine. *Am J Clin Nutr* 1981;34:514–9.
6. Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci* 1987;70:1–12.
7. Pedrosa MC, Golner BB, Goldin BR, Barakat S, Dallal GE, Russell RM. Survival of yogurt-containing organisms and *Lactobacillus gasseri* (ADH) and their effect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and hypochlorhydric elderly subjects. *Am J Clin Nutr* 1995;61:353–9.
8. Clark PA, Martin JH. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuvants in cultured dairy foods: III. Tolerance to stimulated bile concentrations of human small intestines. *Cult Dairy Prod J* 1994;29:18–21.
9. Duez H, Pelletier H, Cools S, et al. A colony immunoblotting method for quantitative detection of a *Bifidobacterium animalis* probiotic strain in human faeces. *J Appl Microbiol* 2000;88:1019–27.
10. Guerin-Danan C, Chabanet C, Pedone C, et al. Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. *Am J Clin Nutr* 1998;67:111–7.
11. Bouhnik Y, Pochart P, Marteau P, Arlet G, Goderel I, Rambaud JC. Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* sp ingested in fermented milk. *Gastroenterology* 1992;102:875–8.
12. Plant L, Conway P. Association of *Lactobacillus* spp. with Peyer's patches in mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:320–4.
13. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl Env Microbiol* 1993;59:4121–8.
14. Kankaanpää P, Salminen SJ, Isolauri E, Lee YK. The influence of polyunsaturated fatty acids on probiotic growth and adhesion. *FEMS Microbiol Lett* 2001;194:149–53.

15. Kankaanpää P, Yang B, Kallio H, Isolauri E, Salminen S. Effects of polyunsaturated fatty acids in growth medium on lipid composition and on physicochemical surface properties of *Lactobacilli*. *Appl Env Microbiol* 2004;70:129–36.
16. Perdigón G, Álvarez S, Rachid M, Agüero G, Gobbato NJ. Immune system stimulation by probiotics. *J Dairy Sci* 1995;78:1597–606.
17. Aguirre M, Collins MD. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol* 1993;75:95–107.
18. Brandtzaeg P, Baekkevold ES, Farstad IN, et al. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol Today* 1999;20:141–51.
19. Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 2000;288:2222–6.
20. Puri P, Rattan A, Bijlani RL, Mahapatra SC, Nath I. Splenic and intestinal lymphocyte proliferation response in mice fed milk or yogurt and challenged with *Salmonella typhimurium*. *Int J Food Sci Nutr* 1996; 47:391–8.
21. Link-Amster H, Rochat F, Saudan KY, Mignot O, Aeschlimann JM. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intakes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994;10:55–64.
22. Perdigón G, de Macias ME, Álvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AA. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology* 1988;63:17–23.
23. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348–57.
24. Miettinen M, Vuopio-Varkila J, Varkila K. Production of human tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect Immun* 1996;64:5403–5.
25. Solis-Pereyra B, Aattouri N, Lemonnier D. Role of food in the stimulation of cytokine production. *Am J Clin Nutr* 1997;66(suppl): 521S–5S.
26. Halpern GM, Vruwink KG, van de Water J, Keen CL, Gershwin ME. Influence of long-term yogurt consumption in young adults. *Int J Immunother* 1991;7:205–10.
27. Borrueal N, Carol M, Casellas F, et al. Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut* 2002;51:659–64.
28. De Simone C, Bianchi Salvadori B, Negri M, Ferrazzi M, Baldinelli L, Vesely R. The adjuvant effect of yogurt on production of gamma interferon by Con A stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Nutr Rep Int* 1986;33:419–33.

29. Beharka AA, Paiva S, Leka LS, Ribaya-Mercado JD, Russell RM, Nibkin Meydani S. Effect of age on the gastrointestinal-associated mucosal immune response of humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001;56:B218–23.
30. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347: 417–29.
31. AjueborMN,SwainMG.Role of chemokines and chemokine receptors in the gastrointestinal tract. *Immunology* 2002;105:137–43.
32. Wallace TD, Bradley S, Buckley ND, Green-Johnson JM. Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: effects on cytokine production. *Food Prot* 2003;66:466–72.
33. Rorick MH, Scrimshaw NS. Comparative tolerance of elderly from differing ethnic backgrounds to lactose-containing and lactose-free dairy drinks: a double-blind study. *J Gerontol* 1979;34:191–6.
34. Sahi T. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand J Gastroenterol* 1994;202:7–20.
35. Vesa TH, Marteau P, Korpela R. Lactose intolerance. *J Am Coll Nutr* 2000;19:165–75
36. Bourlioux P, Pochart P. Nutritional and health properties of yogurt. *World Rev Nutr Diet* 1988;56:217–58.
37. Rosado JL, Solomons NW, Allen LH. Lactose digestion from unmodified, low-fat and lactose-hydrolyzed yogurt in adult lactose maldigesters. *Eur J Clin Nutr* 1992;46:61–7.
38. Kolars JC, Levitt MD, Aouji M, Savaiano DA. Yogurt—an autodigesting source of lactose. *N Engl J Med* 1984;310:1–3.
39. Savaiano DA, AbouElAnouar A, Smith DE, Levitt MD. Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. *Am J Clin Nutr* 1984;40:1219–23.
40. Pochart P, Dewit O, Desjeux JF, Bourlioux P. Viable starter culture, -galactosidase activity, and lactose in duodenum after yogurt ingestion in lactase-deficient humans. *Am J Clin Nutr* 1989;49:828–31.
41. Lerebours E, N'Djitoyp Ndam C, Lavoine A, Hellot MF, Antoine JM, Colin R. Yogurt and fermented-then-pasteurized milk: effects of shortterm and long-term ingestion on lactose absorption and mucosal lactase activity in lactase-deficient subjects. *Am J Clin Nutr* 1989;49:823–7.
42. HickeyMW,Hillier AJ, Jago GR. Transport and metabolism of lactose, glucose, and galactose in homofermentative lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 1986;51:825–31.
43. Foucaud C, Poolman B. Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. *J Biol Chem* 1992;267:22087–94.

44. Thoreux K, Balas D, Bouley C, Senegas-Balas F. Diet supplemented with yoghurt or milk fermented by *Lactobacillus casei* DN-114 001 stimulates growth and brush-border enzyme activities in mouse small intestine. *Digestion* 1998;59:349–59.
45. Martini MC, Bollweg GL, Levitt MD, Savaiano DA. Lactose digestion by yogurt β -galactosidase: influence of pH and microbial cell integrity. *Am J Clin Nutr* 1987;45:432–6.
46. Glass RI, Lew JF, Gangarosa RE, LeBaron CW, Ho MS. Estimates of morbidity and mortality rates for diarrheal diseases in American children. *J Pediatr* 1991;118:S27–33.
47. Metchnikoff E. Sur la flore du corps humain. *Manch Lit Philos Soc* 1901;45:1–38 (in French).
48. Giugno S, Oderiz S. Etiología bacteriana de la diarrea aguda en pacientes pediátricos. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 2010, vol.44, n.1, pp. 63-70.
49. Pickering L, Evans D, DuPont H, Vollet J, Evans D. Diarrhea caused by *Shigella*, rotavirus, and *Giardia* in daycare centers: prospective study. *J Pediatr* 1981; 99: 51-6.
50. Maceira D, Kremer P, Finucane H. El desigual acceso a los servicios de agua corriente y cloacas en Argentina. *CIPPEC Pol Pub An Julio* 2007; (39).
51. O’Ryan M, Prado V, Pickering LK. A millennium update on pediatric diarrheal infections in the developing world. *Semin Pediatr Infect Dis* 2005; 16: 125-36.
52. Van Neil CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 2002;109:678–84.
53. Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA, Yolken RH. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in a hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994;344:1046–9.
54. Gorbach SL, Chang TW, Goldin B. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *Lancet* 1987;2: 1519(letter).
55. Biller JA, Katz AJ, Flores AF, Buie TM, Gorbach SL. Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;21:224–6.
56. Shornikova AV, Isolauri E, Burkanova L, Lukovnikova S, Vesikari T. A trial in the Karelian Republic of oral rehydration and *Lactobacillus* GG for treatment of acute diarrhoea. *Acta Paediatr* 1997;86:460–5.
57. Clements ML, Levine MM, Ristaino PA, Daya VE, Huges TP. Exogenous lactobacilli fed to man—their fate and ability to prevent diarrheal disease. *Prog Food Nutr Sci* 1983;7:29–37.
58. Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 1992;15: 573–81.
59. Van der Waaij D. The ecology of the human intestine and its consequences for overgrowth by pathogens such as *Clostridium difficile*. *Annu Rev Microbiol* 1989;43:69–87.

60. D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ* 2002;324:1–6.
61. Gotz V, Romankiewicz JA, Moss J, Murray HW. Prophylaxis against ampicillin associated diarrhoea with *Lactobacillus* preparation. *Am J Hosp Pharm* 1979;36:754–7.
62. Tankanow RM, Ross MB, Ertel IJ, Dickinson DG, McCormick LS, Garfinkel JF. A double blind, placebo-controlled study of the efficacy of Lactinex in the prophylaxis of amoxicillin-induced diarrhea. *DICP* 1990;24:382–4.
63. Orrhage K, Brismar B, Nord CE. Effects of supplements of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on intestinal microbiota during administration of clindamycin. *Microb Ecol Health Dis* 1994; 7:17–25.
64. Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, Hanner TL, Lupo JV, Young RJ. *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children. *J Pediatr* 1999;135:356–68.
65. Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997;92:5S–11S.
66. Kwon HJ, Cote TR, Cuffe MS, Kramer JM, Braun MM. Case reports of heart failure after therapy with a tumor necrosis factor antagonist. *Ann Intern Med* 2003;138:807–11.
67. Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, et al. Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat. *Digestion* 1993;54:248–55.
68. McCormick DA, Horton LW, Mee AS. Mucin depletion in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* 1990;43:143–6.
69. van Wijngaarden P, Meijssen M. Tuberculous pleurisy: an unusual complication during treatment of Crohn disease with azathioprine. *Scand J Gastroenterol* 2001;37:1004–7.
70. Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 1999;116:1107–14.
71. Steidler L, Hans W, Schotte L, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000;289:1352–5.
72. Malin M, Suomalainen H, Saxelin M, Isolauri E. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus* GG. *Ann Nutr Metab* 1996;40:137–45.
73. Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virtanen E, Laine S, Arvilommi H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res* 1992;32: 141–4.
74. Marshall BJ. Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983;1:1273–5.

75. Labigne A, de Reuse H. Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicity. *Infect Agents Dis* 1996;5:191–202.
76. Duggan A. *Helicobacter pylori*: when is treatment now indicated? *Int Med J* 2002;32:465–9.
77. Aiba Y, Suzuki N, Kabir AMA, Takagi A, Koga Y. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am J Gastroenterol* 1998;93:2097–101.
78. Midolo P, Lambert J, Hull R, Luo F, Grayson M. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J Appl Bacteriol* 1995;79:475–9.
79. Coconnier M, Lievin V, Hemery E, Servin AL. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl Env Microbiol* 1998;64: 4573– 80.
80. Kim TS, Hur JW, Yu MA, et al. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J Food Prot* 2003;66:3–12.
81. Armuzzi A, Cremonini F, Ojetti V, et al. Effect of *Lactobacillus* GG supplementation on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy: a pilot study. *Digestion* 2001;63:1–7.
82. Michetti P, Dorta G, Wiesel PH, et al. Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (*johnsonii*) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion* 1999;60:203–9.
83. Sakamoto I, Igarashi M, Kimura K, Takagi A, Miwa T, Koga Y. Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. *J Antimicrob Chemother* 2001;47: 709–10.
84. Cats A, Kuipers EJ, Bosschaert MAR, Pot RGJ, Vandenbroucke- Grauls CMJE, Kusters JG. Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei*-containing milk drink in *Helicobacter pylori*-colonized subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:429–35.
85. Kalliomäki M, Isolauri E. Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3:15–20.
86. Kirjavainen PV, Salminen SJ, Isolauri E. Probiotic bacteria in the management of atopic disease: underscoring the importance of viability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36:223–7.
87. Isolauri E. Studies on *Lactobacillus* GG in food hypersensitivity disorders. *Nutr Today* 1996;31:28S–31S.
88. Gurr MI. The nutritional role of cultured dairy products. *Can Inst Food Sci Technol* 1984;17:57–64.
89. Rytönen J, Karttunen TJ, Karttunen R, et al. Effect of heat denaturation on beta-lactoglobulin-induced gastrointestinal sensitization in rats: denatured β -LG induces a more

intensive local immunologic response than native _LG. *Pediatr Allergy Immunol* 2002;13:269–77.

90. Bischoff SC, Mayer JH, Manns MP. Allergy and the gut. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;121:270–83.

91. Miettinen M, Matikainen S, Vuopio-Varkila J, et al. Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 1998;66:6058–62.

92. Shida K, Makino K, Morishita A, et al. *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 115:278–87.

93. National Cancer Institute. SEER Cancer Incidence Public-Use Database, 1973-1996, August 1998 Submission. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1999.

94. Peters RK, Pike MC, Garabrant D, Mack TM. Diet and colon cancer in Los Angeles County, California. *Cancer Causes Control* 1992;3: 457–73.

95. Reddy BS, Rivenson A. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3- methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer Res* 1993;53: 3914–8.

96. Ayebo AD, Shahani KM, Dam R. Antitumor component(s) of yogurt: fractionation. *J Dairy Sci* 1981;64:2318–23.

97. Shackelford LA, Rao DR, Chawan CB, Pulusani SR. Effect of feeding fermented milk on the incidence of chemically induced colon tumors in rats. *Nutr Cancer* 1983;5:159–64.

98. Wollowski I, Ji S, Bakalinsky AT, Neudecker C, Pool-Zobel BL. Bacteria used for the production of yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats. *J Nutr* 1999;129:77–82.

99. Bolognani F, Rumney CJ, Pool-Zobel BL, Rowland IR. Effect of lactobacilli, bifidobacteria and inulin on the formation of aberrant crypt foci in rats. *Eur J Nutr* 2001;40:293–300.

100. Ganjam LS, Thornton WH, Marshall RT, MacDonald RS. Antiproliferative effects of yogurt fractions obtained by membrane dialysis on cultured mammalian intestinal cells. *J Dairy Sci* 1997;80:2325–9.

101. Kim DH, Jin YH. Intestinal bacterial beta-glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch Pharm Res* 2001;24:564–7.

102. Reddy BS, Engle A, Simi B, Goldman M. Effect of dietary fiber on colonic bacterial enzymes and bile acids in relation to colon cancer. *Gastroenterology* 1992;102:1475–82.

103. Goldin BR, Gorbach SL. Alterations of the intestinal microflora by diet, oral antibiotics, and *Lactobacillus*: decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes, and glucuronides. *J Natl Cancer Inst* 1984;73:689–95.
104. Goldin BR, Gorbach SL. The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am J Clin Nutr* 1984;39: 756–61.
105. Rafter JJ. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:497–502.
106. Redston M. Carcinogenesis in the GI tract: from morphology to genetics and back again. *Mod Pathol* 2001;14(3):236-45.
107. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 2004; 17(6):671-4
108. Polakis P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* 1997;1332:F127–47.
109. Morin PJ. Beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* 1999; 21:1021–30.
110. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by mouse mammary-tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982;31:99-109.
111. Vanooyen A, Nusse R. Structure and nucleotide-sequence of the putative mammary oncogene Int-1 – proviral insertions leave the protein-encoding domain intact. *Cell* 1984;39:233-40.
112. Nusse R, Vanooyen A, Cox D, Fung YKT, Varmus H. Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (Int-1) on mouse chromosome-15. *Nature* 1984;307:131-36.
113. Tsukamoto AS, Grosschedl R, Guzman RC, Parslow T, Varmus HE. Expression of the Int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary-gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. *Cell* 1998;55:619-25.
114. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Wiegel D, Nusse R. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene Int-1 is identical to the segment polarity gene *Wingless*. *Cell* 1987;50:649-57.
115. Nusse R, Brown A, Papkoff J, et al. A new nomenclature for Int-1 and related genes – the Wnt gene family. *Cell* 1991;64:231.
116. McMahon AP. The Wnt family of developmental regulators. *Trends Genet* 1992;8:236-42.
117. Miller JR. The Wnts. *Genome Biol* 2002;3(1)3001.1-3001.15.
118. He XC, Zhang J, Tong WG et al. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt- β -catenin signaling. *Nature Genet* 2004;36:1117-21.

-
119. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon: functions and mechanisms of β -catenin independent Wnt signaling. *Dev Cell* 2003;5:367-77.
120. Boutros M, Mlodzik M. Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. *Mech Dev* 1999;83:27-37.
121. Jones SE, Jomary C. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioassays* 2002;24:811-820.
122. Bell E, Muñoz-Sanjuan I, Altmann CR, Vonica A, Brivanlou AH. Cell fate specification and competence by Coco, a maternal BMP, TGF beta and Wnt inhibitor. *Development* 2003;130:1381-1389.
123. Brott BK, Sokol SY. Regulation of Wnt/LPR signaling by distinct domains of Dickkopf proteins. *Mol Cell Biol* 2002;22:6100-6110.
124. Mao BY, Niehrs C. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene* 2003;302:179-183.
125. Kikuchi A. Roles of axin in the Wnt signaling pathway. *Cell Signalling* 1999;11:777-788.
126. Sakanaka C, Weiss JB, Williams LT. Bridging of beta-catenin and glycogen synthase kinase-3 beta by Axin and inhibition of beta-catenin mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3020-3023.
127. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 1998;17:7151-7160.
128. Sadot E, Geiger B, Oren M, Ben-Ze'ev A. Down-regulation of beta-catenin by activated p53. *Mol Cell Biol* 2001;21:6768-6781.
129. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin-pathways. *Science* 2004;303:1483-1487.
130. Lee E, Salic A, Kirschner MW. Physiological regulation of beta-catenin stability by Tcf3 and CK1 epsilon. *J Cell Biol* 2001;154:983-993.
131. Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, et al. Intestinal polyposis in mice with dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO J* 1999;18:5931-5942.
132. Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-170.
133. Venesio T, Balsamo A, Scordamaglia A, Bertolaso M, Arrigoni A, Sprujevnik T, Rossini FP, Risio M. Germline APC mutation on the beta-catenin binding site is associated with a decreased apoptotic level in colorectal adenomas. *Mod Pathol* 2003;16(1):57-65.

134. Lorenz E, Stewart HL. Intestinal carcinoma and other lesions in mice following oral administration of 1,2,5,6-dibenzanthracene and 2-methylcholanthrene. *J Natl Cancer Inst* 1941;1:17-40.
135. Walpole AL, Williams M, Roberts DC. The carcinogenic action of the carcinogenic action of 4-aminodiphenyl and 3,2-dimethyl-4-aminodiphenyl. *Br J Ind Med* 1952;9:255-63.
136. Cleveland JC, Litvak SF, Cole JW. Identification of the route of action of the carcinogen 3,2-dimethyl-4-amino-diphenyl in the induction of intestinal neoplasia. *Cancer Res* 1967;27:708-14.
137. Druckrey H, Lange A. Carcinogenicity of azoxymethane dependent on age in BD rats. *Fed Proc* 1972;31:1482-4.
138. Ryser HJ. Chemical carcinogenesis. *N Engl J Med* 1971; 285:721-34.
139. Wiebecke B, Krey U, Loehrs U, Eder M. Morphological and autoradiographical investigations on experimental carcinogenesis and polyp development in the intestinal tract of rats and mice. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1973;360:179-93.
140. Balish E, Shih CN, Croft WA, *et al.* Effect of age, sex and intestinal flora on the induction of colon tumours in rats. *J Natl Cancer Inst* 1977;58:1103-6.
141. Evans JT, Shows T, Sproul E, Paolini N, Mittelman A, Hauschka T. Genetics of colon carcinogenesis in mice treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res* 1977;37:134-6.
142. Thurnherr N, Deschner EE, Stonehill EH, Lipkin M. Induction of adenocarcinomas of the colon in mice by weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res* 1973;33:940-5.
143. Ward JM. Morphogenesis of chemically induced neoplasms of the colon and small intestine in rats. *Lab Invest* 1974;30:505-13.
144. Moon RC, Fricks CM, Schiff LJ. Effect of age and sex on colon carcinogenesis. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1976;17:23-8.
145. Pozharisski KM, Kapustin YM, Likhachev AJ, Shaposhnikov JD. The mechanism of carcinogenic action of 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Int J Cancer* 1975;15: 673-83.
146. Fiala ES, Bobotas G, Kulakis C, Wattenberg LW, Weisburger JH. Effect of disulfiram and related compounds of the metabolism *in vivo* of the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. *Biochem Pharmacol* 1977;26:1763-8.
147. Weisburger JH. Colon carcinogens: their metabolism and mode of action. *Cancer* 1971;28:60-70.
148. Zedek MS, Grab DJ, Sternberg SS. Differences in the acute response of the various segments of the rat intestine to treatment with the intestinal carcinogen methylazoxymethanol acetate. *Cancer Res* 1977;37:3245.
149. Banerjee A, Quirke P. Experimental models of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1998;41:490-505.

150. Druckrey H, Preussmann R, Matzkies F, Ivankovic S. Selective erzeugung von darmkrebs bei ratten durch 1,2-Dimethyl-hydrazin. *Naturwissenschaften* 1967; 54: 285-286.
151. Nigro N D, Bull A W. Experimental intestinal carcinogenesis. *Br J Surg* 1985; 72 (Suppl. Sep): S36-S37.
152. Pories S E, Ramchurren N, Summerhayes I, Steele G. Animal models for colon carcinogenesis. *Arch Surg* 1993; 128: 647-653.
153. Toth B. The large bowel carcinogenic effects of hydracines and related compounds occurring in nature and in the environment. *Cancer* 1977; 40: 2427-2431.
154. Fiala E S, Bobotas G, Kulakis C, Weisburger J H. Separation of 1,2-Dimethylhydrazine metabolites by high-pressure liquid chromatography. *J Chromatography* 1976; 117: 181-185.
155. Turusov V S, Lanko N S, Parfenov Y D, Gordon W P, Nelson S D, Hillery P S, Keefer L K. Carcinogenicity of deuterium-labeled 1,2-dimethylhydrazine in mice. *Cancer Res* 1988;48: 2162-2167.
156. Maskens A F. Confirmation of the two-step nature of chemical carcinogenesis in the rat colon adenocarcinoma model. *Cancer Res* 1981; 41: 1240-1245.
157. Dube M, Madarnas P, Rola-Pleszcynski M, Nigam V N. An animal model of Kaposi's sarcoma. Immune status of CD1 mice undergoing dimethyl hydrazine treatment to induce angiosarcomas and other malignancies. *Anticancer Res* 1992; 12: 105-112.
158. Martin M S. Experimental intestinal carcinogenesis. *Cancer J* 1992; 5: 5-10.
159. Kanazawa K, Yamamoto T, Sato S. Experimental induction of colonic carcinomas in rats. Analysis of factors influencing upon the incidence. *Jpn J Exp Med* 1975; 45: 439-456.
160. Blake J R S, Reeve R S, Hardcastle J D, Dawson I M P, Metcalf M J, Thompson M J. A study of the effect of colotomy and mucosal field changes in experimental colon cancer. *Clin Oncol* 1980; 6: 113-123.
161. Pratesi G, Deschner E E. The antitumoral activity of 4'-doxydoxorubicin compared to doxorubicin and 5-fluorouracil on methylazoxyethanol acetat-induced colon tumors in CF1 mice. *Cancer* 1984; 54: 18-24.
162. Glauert H P, Weeks J A. Dose-and time-response of colon carcinogenesis in Fischer-344 rats after a single dose of 1,2-dimethylhydrazine. *Toxicol Lett* 1989; 48: 283-287.
163. Celik C, Mittelman A, Paolini N S, Lewis D, Evans J T. Effects of 1,2-dimethylhydrazine on jejunocolic transposition in Sprague-Dawley rats. *Cancer Res* 1981; 41: 2908-2911.
164. Rubio C A, Nylander G. Further studies on the carcinogenesis of the colon of the rat with special reference to the absence of intestinal contents. *Cancer* 1981; 48: 951-953.

- 165.** Lewin M R, Ferulano G P, Cruse J P, Clark. Experimental colon carcinogenesis is facilitated by endogenous factors in the intestinal contents. *Carcinogenesis* 1981; 2: 1363-1366.
- 166.** Buhr H J, Hupp T, Beck N. Gastrointestinal tumours after stapler vs vicryl anastomoses in carcinogen-treated rats. *Eur J Surg Oncol* 1990; 16: 493-496.
- 167.** O'Donnell A F, O'Donnell P R, Royston D, Johnston D H, Barnard R, Bouchier Hayes D. La técnica de sutura utilizada afecta a la producción de células de las criptas en el segmento perianastomótico del colon y a la formación de tumores. *Br J Cancer (ed. esp.)* 1991; 6: 216-219.
- 168.** Pozharisski K M. The significance of nonspecific injury for colon carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 1975; 35: 3824-3830.
- 169.** Rokitansky A, Trubel W, Buxbaum P, Moeschl P. 1,2-Dimethylhydrazine-induced carcinogenesis influence by different colonic anastomoses in rats. *Eur Surg Res* 1989; 29: 184-189.
- 170.** Hagihara P F. Experimental colitis as a promoter in large-bowel tumorigenesis. *Arch Surg* 1982; 117: 1304-1307.
- 171.** Ross J S. Experimental large intestinal adenocarcinoma induced by hydrazines and human colorectal cancer: a comparative study. En: Malt R A, Williamson R C N (eds). *Colonic Carcinogenesis*. 1ª ed. Lancaster: MTP Press Limited;1982: 187-210.
- 172.** Gilbert J M. Experimental colorectal cancer as a model of human disease. *Ann R Coll Surg Engl* 1987; 69: 48-53.
- 173.** Pozharisski K M. Morphology and morphogenesis of experimental epithelial tumors of the intestine. *J Natl Cancer Inst* 1975; 54: 1115-1135.
- 174.** Ward J M. Morphogenesis of chemically induced neoplasms of the colon and small intestine in rats. *Lab Invest* 1974; 30: 505-513.
- 175.** Rowlatt C, Cruse J P, Barton T, Sadrudin A A, Lewin M R. Comparison of the significance of three histopathological thresholds of malignancy in experimental colorectal tumors. *Gut* 1989; 30: 845-853.
- 176.** Deschner E E. Experimentally induced cancer of the colon. *Cancer* 1974; 34: 824-828.
- 177.** Goldrosen M. Murine colon adenocarcinoma. Immunobiology of metastases. *Cancer* 1980; 45: 1223-1228.
- 178.** Onoue Y, Kashima Y, Aizawa K, Hatakeyama K. A new rat colon cancer cell line metastasizes spontaneously: biologic characteristics and chemotherapeutic response.
- 179.** Viñas J, Fortuny J C, Panades M J, Piñol C, Prim M, Fermiñán A, Corbella G, Calderó J, Egido R. Appearance of ear tumors in Sprague-Dawley rats treated with 1,2 dimethylhydrazine when used as a model for colonic carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1992; 13: 493-495.

- 180.** Gunning W T, Castonguay A, Godblatt P J, Stoner G D. Strain A/J mouse lung adenoma growth patterns vary when induced by different carcinogens. *Toxicol Pathol* 1991; 19:168-175.
- 181.** Toth B, Malick L, Shimizu H. Production of intestinal and other tumors by 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride in mice. I. A light and transmission electron microscopic study of colonic neoplasms. *Am J Pathol* 1976; 84: 69-86.
- 182.** Barton T P, Cruse J P, Lewin M R. Changes in serum lipids related to the presence of experimental colon cancer. *Br J Cancer* 1987; 56: 451-454.
- 183.** Toth B. Hydrazines and related compounds in colonic carcinogenesis. En: Malt R A, Williamson R C N (eds). *Colonic Carcinogenesis*. 1^a ed. Lancaster: MTP Press Limited; 1982: 165-176.
- 184.** Berenblum I, Bonser G M. Experimental investigation of "aniline cancer". *J Indust Hyg Toxicol* 1937; 19: 86-92.
- 185.** Maskens A P. Multistep models of colorectal carcinogenesis. En: Malt R A, Williamson R C N (eds). *Colonic Carcinogenesis*. 1^a ed. Lancaster: MTP Press Limited; 1982: 211-219.
- 186.** Fiala E S, Kulakis C, Bobotas G, Weisburger J H. Brief communication: detection and estimation of azomethane in expired air of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. *J Natl Cancer Inst* 1976; 56: 1271-1273.
- 187.** Oravec C T, Jones C A, Huberman E. Activation of the colon carcinogen 1,2-Dimethylhydrazine in a rat colon cell-mediated mutagenesis assay. *Cancer Res* 1986; 46: 5068-5071.
- 188.** Chan P C, Cohen L A, Narisawa T, Weisburger J H. Early effects of a single intrarectal dose of 1,2-Dimethylhydrazine in mice. *Cancer Res* 1976; 36: 13-17.
- 189.** Nakagawa Y, Watanabe H, Takahashi T, Ito A, Dohi K. Carcinogenicity of 1,2-dimethylhydrazine in colorectal tissue heterotopically transplanted into the glandular stomach of rats. *Jpn J cancer Res* 1992; 83: 24-30.
- 190.** Ucchedu A, Murgia C, Licheri S, Dessy E, Ghinami E, Scattone S, Cagetti M. Incidenza delle neoplasie coliche indotte da 1,2-dimetilidrazina nel ratto: influenza della stipsi. *G Chir* 1991; 12: 572-574.
- 191.** Stralka D, Strobel H W. Characterization of cytochrome P450-dependent dimethylhydrazine metabolism in human colonmicrosomes. *Cancer* 1991; 68: 2363-2369.
- 192.** Wattenberg L W. Brief communication: Inhibition of Dimethylhydrazine-induced neoplasia of the large intestine by Disulfiram. *J Natl Cancer Inst* 1975, 54: 1005-1006.
- 193.** Davies R J, Sandle G I, Thompson S M. Inhibition of the Na⁺, K⁽⁺⁾-ATP ase pump during induction of experimental colon cancer. *Cancer Biochem Biophys* 1991; 12: 81-94.

194. Davies R J, Weidema W F, Sandle G I, Palmer L, Deschner E E, DeCosse J J. Sodium transport in a mouse model of colonic carcinogenesis. *Cancer Res* 1987; 47: 4646-4650.
195. Davies R J, Juncosa R D, Kaplan D, Pempinello C, Asbun H, Pilch Y H. Colonic epithelial impedance analysis in a murine-model of large bowel cancer. *Arch Surg* 1986; 121:1253-1258.
196. Goller D A, Weidema W F, Davies R J. Transmural electrical potential difference as an early marker in colon cancer. *Arch Surg* 1986; 121: 345-350.
197. Evans J T. Differential susceptibility of mouse strains to induction of multiple large bowel neoplasms by 1,2-dimethylhydrazine. En: Malt R A, Williamson R C N (eds). *Colonic Carcinogenesis*. 1^a ed. Lancaster: MTP Press Limited;1982: 177-186.
198. James J T, Shamsuddin A M, Trump B F. Comparative study of themorfologic, histochemical and proliferative cahnges induced in the large intestine of ICR/Ha and C57 BL/Ha mice by 1,2-dimethylhydrazine. *J Natl Cancer Inst* 1983; 71: 955-964.
199. Moon R C, Fricks C M. Influence of gonadal hormones and age on 1,2 dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Cancer* 1977; 40: 2502-2508.
200. Beniashvili D. Induction of renal tumors in monkeys as a result of probable prenatal effects of 1,2-dimethylhydrazine. *Vopr Onkol* 1989 (Abst); 35: 1450-1454.
201. Smirnova I O, Turusov V S. 1,2-Dimethylhydrazine carcinogenesis in neonatally androgenized CBA mice. *Carcinogenesis* 1988; 9: 1927-1929.
202. Hull C C, Galloway P, Gordon N, Gerson S L, Hawkins N, Stellato T A. Splenectomy and the induction of murine colon cancer. *Arch Surg* 1988; 123: 462-464.
203. Pence B C, Tsai S Y, Richard B C. Effects of dietary fat on hepatic microsomal metabolism of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett* 1991; 59: 225-229.
204. Kuratko C, Pence B C. Rat colonic status: interaction of dietary fats with 1,2-dimethylhydrazine challenge. *J Nutr* 1992; 122: 278-282.
205. Newberne P M. Dietary fat, immunological response, and cancer in rats. *Cancer Res* 1981; 41: 3783-3785.
206. Weindruch R, Albanes D, Kritchevsky D. The role of calories and caloric restriction in carcinogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991; 5: 79-89.
207. Beth M, Berger M R, Schmahl D. Influence of some dietary constituents in chemical carcinogenesis in rats. En: Schmahl D, ed. *Combination effects in chemical carcinogenesis*. 1^a ed. Weinheim: VCM Publishers 1988: 231-265.
208. Papenburg R, Bounous G, Flieszer D, Gold P. Dietary milk proteins inhibit the development of dimethylhydrazine-induced malignancy. *Tumour Biol* 1990; 11: 129-136.
209. Samelson S L, Nelsson R L, Nyhus L M. Protective role of faecal pH in experimental colon carcinogenesis. *J Royal Society Med* 1985; 78: 230-233.

- 210.** Cameron I L, Ord V A, Hunter K E, Padilla G M, Heitman D W. Suppression of a carcinogen 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced increase in mitotic activity in the colonic crypts of rats by addition of dietary cellulose. *Cancer Res* 1989; 49: 991-995.
- 211.** Heitman D W, Ord V A, Hunter K E, Cameron I L. Effect of dietary cellulose on cell proliferation and progression of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 1989; 49: 5581-5585.
- 212.** Alink G M, Kuiper H A, Hollanders V M, Koeman J H. Effect of heat processing and of vegetables and fruit in human diets on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 1993; 14: 519-524.
- 213.** Goldin B, Gorbach S L. Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, lactobacillus supplements, and dimethylhydrazine. *Cancer* 1977; 40: 2421-2426.
- 214.** Klurfeld D M. Dietary fiber-mediated mechanisms in carcinogenesis. *Cancer Res* 1992;52 (Suppl 1): S2055-S2059.
- 215.** Guillem J G, O'Brian C A, Fitzner C J, Johnson M D, Forde K A, Gerfo P, Weinstein B. Studies on protein Kinase C and colon carcinogenesis. *Arch Surg* 1987; 122: 1475-1478.
- 216.** Morvay K, Szenteleki K, Torok G, Pinter A, Borzsonyi M, Nawroth R. Effect of change of fecal bile acid excretion achieved by operative procedures on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Dis Colon Rectum* 1989; 32: 860-863.
- 217.** Morvay K, Szenteleki K, Torok G, Pinter A. Effect of small bowel resection on fecal bile acid excretion and on experimental colon tumour in rats. *Acta Chir Hung* 1990; 31:25-31.
- 218.** Barton T, Cruse J P, Lewin M R. The relationship between faecal bile acids and the development of experimental colon cancer. *Br J Exp Pathol* 1988; 69: 149-154.
- 219.** Jacobs M M. Inhibitory effects of selenium on 1,2-dimethylhydrazine and methylazoxymethanol colon carcinogenesis. *Cancer* 1977; 40: 2557-2564.
- 220.** Jacobs M M. Inhibition of colon carcinogenesis. En: Autrup H, Willimas G M, eds. *Experimental colon carcinogenesis*. 1^a ed. Boca Raton: CRC Press, 1983: 281-292.
- 221.** Jao S W, Lee W, Ho Y S. Effect of germanium on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal cancer in rats. *Dis Colon Rectum* 1990; 33: 99-104.
- 222.** McIntosh G H. Colon cancer: dietary modifications required for a balanced protective diet. *Prev Med* 1993; 22: 767-774.
- 223.** Sitrin M D, Halline A G, Abrahams C, Brasitus T A. Dietary calcium and vitamin D modulate 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis in the rat. *Cancer Res* 1991; 51: 5608-5613.

224. Wargovich M J, Lynch P M, Levin B. Modulating effects of calcium in animal models of colon carcinogenesis and short-term studies in subjects at increased risk for colon cancer. *Am J Clin Nutr* 1991; 54 (Suppl 1): S202-S205.
225. Appleton G V N, Bristol J B, Williamson R C N. Increased dietary calcium and small bowel resection have opposite effects on colonic cell turnover. *Br J Cancer* 1986; 73: 1018-1021.
226. Behling A R, Kaup S M, Choquette L L, Greger J L. Lipid absorption and intestinal tumour incidence in rats fed on varying levels of calcium and butterfat. *Br J Nutr* 1990; 64: 505-513.
227. Llor X, Jacoby R F, Teng B B, Davidson N O, Sitrin M D, Brasitus T A. K-ras mutations in 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic tumors: effects of supplemental dietary calcium and vitamin D deficiency. *Cancer Res* 1991; 4305-4309.
228. Santamaria L A, Santamaria A B. Cancer chemoprevention by supplemental carotenoids and synergism with retinol in mastodynia treatment. *Med Oncol Tumor Pharmacoter* 1990;7: 153-167.
229. Newberne P M, Rogers A E. Rat colon carcinomas associated with aflatoxin and marginal vitamin A. *J Natl Cancer Inst* 1973; 50: 439-448.
230. Newberne P M, Bueche D, Riengropitak S, Schrager T F. The influence of dietary levels of vitamin A and fat on colon cancer. *Nutr Cancer* 1990; 13: 235-242.
231. McIntosh G H. The influence of dietary vitamin E and calcium status on intestinal tumors in rats. *Nutr Cancer* 1992; 17: 47-55.
232. Belleli A, Shany S, Levy J, Guberman R, Lamprecht S A. A protective role of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in chemically induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1992; 13: 2293-2298.
233. Jacobs M M. Potassium inhibition of DMH-induced small intestinal tumors in rats. *Nutr Cancer* 1990; 14: 95-101.
234. Deschner E E, Ruperto J, Wong G, Newmark H L. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* 1991; 12: 1193-1196.
235. Caderni G, Bianchini F, Mancina A, Spagnesi M T, Dolara P. Effect of dietary carbohydrates on the growth of dysplastic crypt foci in the colon of rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res* 1991; 51:3721-3725.
236. Billings P C, Newberne P, Kennedy A. Protease inhibitor suppression of colon and anal gland carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1083-1086.
237. Craven P A, DeRubertis F R. Effects of aspirin on 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1992; 13: 541-546.
238. Skinner S A, Penney A G, O'Brien P E. Sulindac inhibits the rate of growth and appearance of colon tumors in the rat. *Arch Surg* 1991; 126: 1094-1096.

- 239.** Moorghen M, Ince P, Finney K J, Sunter J P, Watson A J, Appleton D R. The effect of sulindac on colonic tumour formation in dimethylhydrazine-treated mice. *Acta Histochem Suppl* 1990; 39: 195-199.
- 240.** Andrianopoulos G D, Nelson R L, Barch D H, Nyhus L M. Sulfasalazine alters the character of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinoma in rats. *Anticancer Res* 1989; 9:1725-1728.
- 241.** Daniel F B, Reddy T V, Stober J A, Olson G R. Site-specific modulation of carcinogen-induced gastrointestinal tract nuclear anomalies in B6C3F1 mice by chloroform. *Anticancer Res* 1991; 11: 665-670.
- 242.** Heitman D W, Grubbs B G, Heitman T O, Cameron I L. Effects of 1,2-dimethylhydrazine treatment and feeding regimen on rat colonic epithelial cell proliferation. *Cancer Res* 1983; 43: 1153-1162.
- 243.** Cameron I L, Ord V A, Hunter K E, Van Nguyen M, Padilla G M, Heitman D W. Quantitative contribution of factors regulating rat colonic crypt epithelium: role of parenteral and enteral feeding, caloric intakes, dietary cellulose level and the colon carcinogen DMH. *Cell Tissue Kinet* 1990; 23: 227-235.
- 244.** Andrianopoulos G, Nelson R L, Bombeck C T, Souza G. The influence of physical activity in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis in the rat. *Anticancer Res* 1987; 7: 849-852.
- 245.** Andrianopoulos G D, Nelson R L, Misumi A, Bombeck C T, Nyhus L M. Effect of activity-stress on experimental rat colon carcinogenesis: early histopathologic changes and colon tumor induction. *Cancer Detect Prev* 1988; 13: 31-39.
- 246.** Sharp J G, Crouse D A. Apparent synergism between radiation and the carcinogen 1,2-dimethylhydrazine in the induction of colonic tumors in rats. *Radiat Res* 1989; 117: 304-317.
- 247.** Jacoby R F, Llor X, Teng B B, Davidson N O, Brasitus T A. Mutations in the K-ras oncogene by 1,2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. *J Clin Invest* 1991; 87: 624-630.
- 248.** Okamoto M, Ohtsu H, Miyaki M, Yonezawa H. No allelic loss at the p53 locus in 1,2-dimethylhydrazine-induced mouse colon tumors: PCR-SSCP analysis with sequencetagged microsatellite site primers. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1483-1486.
- 249.** Pozhariski K M. Tumours of the intestine. En: Turusov V S, ed. *Pathology of tumours in laboratory animals*. Vol. 1. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1973:119-140.
- 250.** Hebel R, Stromberg M W. *Anatomy and embryology of the laboratory rat*. Worthesee: Biomed, cop; 1986.
- 251.** Barkla D H, Tutton J M. Surface changes in the descending colon of rats treated with dimethylhydrazine. *Cancer Res* 1977; 37: 262-271.

252. Ehsanullah M, Filipe M I, Gazzard B. Mucin secretion in inflammatory bowel disease: correlation with disease activity and dysplasia. *Gut* 1982; 23: 485-489.
253. Lindström C G, Rosengren J E, Fork F T. Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation. *Acta Radiol Diagn* 1979; 20: 523-536.
254. Shamsuddin A K M, Trump B F. Colon epithelium. I. Light microscopic, histochemical and ultrastructural features of normal colon epithelium of male fisher 344 rats. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 375-388.
255. Hollmann K H. Uber den feinbau des rectumepithels. *Z Zellforsch* 1965; 68: 502-542.
256. Altmann G G. Morphological observations on mucussecreting nongoblet cells in the deep crypts of the rat ascending colon. *Am J Anat* 1983; 167: 95-117.
257. Thomopoulos G N, Schutte B A, Spicer S S. Light and electron microscopic cytochemistry of the glicoconjugates in the rectosigmoid colonic epithelium of the mouse and rat. *Am J Anat* 1983; 168: 239-256.
258. Traynor O J, Costa N L, Wood C B. A scanning electron microscopy study of changes in the colonic mucus layer during chemical carcinogenesis. *Cancer* 1983; 51: 1847-1853.
259. Cooke T, Kirkham N, Stainthorp D H, Inman C, Goeting N, Taylor I. Detection of early neoplastic changes in experimentally induced colorectal using scanning electron microscopy and cell kinetic studies. *Gut* 1984; 25: 748-755.
260. Toth B, Malick L. Production of intestinal and other tumours by 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride in mice. II. Scanning electron microscopic and cytochemical study of colonic neoplasms. *Br J Exp Pathol* 1976; 57: 696-705.
261. Tutton P J M, Barkla D H. Regulation of cell kinetics and colon cancer. En: Autrup H, Williams G M, eds. *Experimental colon carcinogenesis*. 1^a ed. Boca Raton: CRC Press; 1983:199-214.
262. Tutton P J M, Barkla D H. Cell proliferation in the descending colon of dimethylhydrazine treated rats and in dimethylhydrazine induced adenocarcinomata. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1976; 21: 147-160.
263. Cooper H S, Farano P, Coapman R A. Peanut lectin binding sites in colons of patients with ulcerative colitis. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111: 270-275.
264. Lindström C G, Rosengren J-E, Ekberg O. Experimental colonic tumours in the rat. III. Induction time, distribution and appearance of induced tumours. *Acta Radiol Diagn* 1978;19: 799-811.
265. Teague C A. Morphological changes during chemical induction of colon cancer. En: Autrup H, Willimas G M, eds. *Experimental colon carcinogenesis*. 1^a ed. Boca Raton: CRC Press, 1983: 107-124.

266. Blake J R S, Reeve R S, Hardcastle J D, Dawson I M P, Metcalf M J, Thompson M J. A study of the effect of colotomy and mucosal field changes in experimetal colon cancer. *Clin Oncol* 1980; 6: 113-123.
267. Wiebecke B, Krey U, Löhrs U, Eder M. Morphological and autoradiographical investigations on experimental carcinogenesis and polyp development in the intestinal tract of rat and mice. *Virchows Arc A* 1973; 360: 179-192.
268. Environmental enrichment for laboratory rodents. *ILAR J.* 2005;46(2):148-61. Review.
269. Mandatory "enriched" housing of laboratory animals: the need for evidence-based evaluation, *ILAR J.* 2005;46(2):95-105. Review.
270. Modifications to husbandry and housing conditions of laboratory rodents for improved well-being, *ILAR J.* 2005;46(2):140-7. Review.
271. Pérez, J.E.; Oresti, G.M.; Melatini G.; Berton, P.; Ullúa, N.; Gandini, N.A.; Gigola, G.; Zwenger, A.O.; Fermento, M.E. *Oncología Clínica.* 11(1):1278-1282, 2006. ISSN 1669-6336.
272. **Hayashi N., Tsutsumi M., Fukura M., Yano H., Tsuchishima M., Takase S.** Effect of chronic dietary ethanol consumption on colonic cancer in rats induced by 1,1-dimethylhydrazine. *Alcohol Clin Exp Res Jan 31(1 Suppl): S72-6*, 2007.
273. Bauer-Marinovic M., Florian S., Müller-Schmehl K., Glatt H., Jacobasch G. Dietary resistant starch type 3 prevents tumor induction by 1,2-dimethylhydrazine and alters proliferation, apoptosis and dedifferentiation in rat colon. *Carcinogenesis Sep;27(9):1849-59*, 2006.
274. **Imai T., Fukuta K., Hasumura M., Cho Y.M., Ota Y., Takami S., Nakagama H., Hirose M.** Significance of inflammation-associated regenerative mucosa characterized by Paneth cell metaplasia and beta-catenin accumulation for the onset of colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. ***Carcinogenesis*** Oct; 28(10):2199-206, 2007.
275. Surgical pathology of the gastrointestinal tract, liver, biliary tract and páncreas. Odze Robert. Chapter 19. Ed. Saunder, 2004.
276. Capecitabine provides low toxicity antitumor chemotherapy Turing perioperative periodof colectomy: experimental study in rats. Konstantinidis H., Pissanidou T., Sioga A. *The Internet Journal of Oncology* 2007;4(2).
277. Grabowski P, Mann B, Mansmann U et al. Expression of SIALYL-Le(x) antigen defined by MAb AM-3 is an independent prognostic marker in colorectal carcinoma patients. *Int J Cancer* 2000; 88:281–286.
278. Ajioka K, Allison L, Jass J. Significance of MUC1 and MUC2 mucin expression in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 1996; July 49(7):560-564.

279. Stein K, Borowiki A, Scharlau D, Scheltler A, Schau K, Obst U, Gleis M. Effects of symbiotic fermentation products on primary chemoprevention in human colon cells. *J Nutr Biochem* 2011. in press
280. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361:512-519.
281. Lyra A, Lathinen S, Ouwehand AC. Gastrointestinal benefits of probiotics – clinical evidence. 4th. ed. Boca Raton: CDC Press, 2012;509-523.
282. Rafter J. Probiotics and colon cancer. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol* 2003;17:849-859.
283. Fotiadis C, Stoidis CN, Spyropoulos BG, Zografos ED. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2008;14:6453-6457.
284. Burns AJ, Rowland I. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* 2000;1:13-24.
285. Shahani KM, Ayebo AD. Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microecology. *Am J Clin Nutr* 1980;33:2448-2457.
286. Turpin W, Humblot C, Thomas M, Guyot JP. Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *Int J Food Microbiology* 2010;143:87-102.
287. Pearson JR, Gill CIR, Rowland IR. Diet, fecal water, and colon cancer – development of biomarker. *Nutr Rev* 2009;67:509-526.
288. McGarr SE, Ridlon JM, Hylemon PB. Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:98-109.
289. Hatakka K, Holma R, El-Nezami H, Suomalainen T, Kuisma M, Saxelin M, Puossa T, Mykkänen H, Korpela R. The influence of *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* spp. *Shermanii* JS on potentially carcinogenic bacterial activity in human colon. *Int J Food Microbiology* 2008;128:406-410.
290. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR. Functional food science of gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 1998;80:147S-171S.
291. Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel B. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr* 2001;73:451S-455S.
292. Bolognani F, Rumney CJ, Rowland IR. Influence of carcinogen binding by lactic acid producing bacteria on tissue distribution and in vivo mutagenicity of dietary carcinogens. *Food Chem Toxicol* 1997;35:535-545.
293. Rowland I, Runney C, Counts J. Effects of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 1998;19:281-285.

294. Goldin B, Gualtieri L, Moore R. The effect of Lactobacillus GG on the initiation and promotion of DMH induced intestinal tumors in the rat. *Nutr Cancer* 1996;25:197-204.
295. Kumar RS, Kanmani P, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Thirunavukkarasu C, Arul V. Lactobacillus plantarum AS1 isolated from South Indian fermented food kallappam suppress DMH induced colorectal cancer in male Wistar rats. *Appl Biochem Biotechnol* 2012;166:620-631.
296. Gallaher DD, Stallings WH, Blessing LL, Busta FF, Brady LJ. Probiotics cecal microflora, and aberrant crypts in the rat colon. *J Nutr* 1996;126:1362-1371.
297. Oeschlaeger T. Mechanisms of probiotics actions. *Int J Med Microb* 2010;300:57-62.
298. Iwamoto M, Ahnen DJ, Franklin WA, Maltzman TH. Expression of β -catenin and full length APC protein in normal and neoplastic colonic tissues. *Carcinogenesis* 2000;21:1935-1940.
299. Keefe DM, Gibson RJ, Hauer-Jensen M. Gastrointestinal mucositis. *Semin Oncol Nurs* 2004;20:38-47.
300. Duncan M, Grant G. Oral and intestinal mucositis – causes and possible treatments. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:853-874.
301. Takasuna K, Hagiwara T, Watanabe K et al. Optimal antidiarrhea treatment for antitumor agent irinotecan hydrochloride (CPT-11) induced delayed diarrhea. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;58:494-503.
302. Arbuckle RB, Huber SL, Zacker C. The consequences of diarrhea occurring chemotherapy for colorectal cancer: a retrospective study. *Oncologist* 2000;5:250-259.
303. Dranitsaris G, Maroun J, Shah A. Estimating the cost of illness in colorectal cancer patients who were hospitalized for severe chemotherapy-induced diarrhea. *Can J Gastroenterol* 2005;19:83-87.
304. Österlund P, Ruotsalainen T, Korpela R. et al. Lactobacillus supplementation for diarrhea related to chemotherapy of colorectal cancer: a randomized study. *Br J Cancer* 2007;97:1028-1034.
305. Von Bültzingslöwen I, Adlerberth I, et al. Oral and intestinal microflora in 5-fluorouracil treated rats, translocation to cervical and mesenteric lymph nodes and effects of probiotics bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:278-284.
306. Sivieri K, Bedani R, Cardoso D, Rossi EA. Probiotics and intestinal microbiota: implications in colon cancer prevention. Chapter 9. In *Lactic acid bacteria – R&D for food, health and livestock purposes*. 2013.