



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

**Estudio de mecanismos moleculares asociados a la acción de
probióticos en células de cáncer colorrectal.**

Tesinista: Exequiel Gonzalo Alonso

Directora: Dra. Graciela Gigola

Co-Directora: Dra. Claudia Gentili

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Estudio de mecanismos moleculares asociados a la acción de probióticos en células de cáncer colorrectal.



Tesis de Grado: Lic. En Ciencias Biológicas

Lugar de trabajo: Laboratorio de Química Biológica

Tesinista: Exequiel Gonzalo Alonso Directora: Dra. Graciela Gigola

Co-directora: Dra. Claudia Gentili

2018

ÍNDICE

Índice.....	3
Resumen.....	1
1. antecedentes	2
1.1. Probioticos	2
1.2. Mecanismos probables de la acción anticarcinogénica de los probióticos	2
1.3. Cáncer de Cólon	8
1.4. Vías de señalización implicadas en el desarrollo del Cáncer Colorrectal	9
1.4.1. La vía de señalización de las MAP quinasas	9
1.4.2. La vía de señalización PI3K/AKT.....	11
1.4.3. La tirosina quinasa Src.....	14
1.4.4. La familia de proteínas quinasas C (PKC)	15
1.4.5. La vía de señalización de β -Catenina	16
1.5. Tratamiento de cáncer de cólon	18
2. Objetivos.....	20
3. Materiales y métodos.....	21
3.1. Modelos experimentales	21
3.1.1. Modelo Animal	21
3.1.2. Modelo Celular	25
3.1.3. Cuantificación de proteínas.....	27
3.1.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	27
3.1.5. Electrotransferencia e Inmunoblotting.....	27
4. Resultados	29
4.1. Western – Blot.....	29
4.2. Índice de expresión.....	30
5. Discusión.....	35
6. Conclusión	37
7. Bibliografía.....	38

RESUMEN

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo anfitrión. Se ha observado que el suministro de ciertas formulaciones puede llegar a modular la microbiota intestinal, mejorando las condiciones físico-químicas y a la vez reduciendo el estrés oxidativo. El cáncer colorrectal está ubicado entre las primeras causas de mortalidad por enfermedad maligna en el mundo donde se calcula que el 90% de los pacientes mueren debido a la metástasis. Es por esto que la profilaxis se ha convertido en la mejor estrategia terapéutica para este tipo de patología. En el laboratorio donde se llevó a cabo este trabajo se observó que en una línea celular HCT-116 proveniente de adenocarcinoma de colon, el tratamiento con probióticos indujo la fosforilación y por lo tanto la activación de las ERK 1/2. En el modelo In Vivo de cáncer de colon inducidos en ratas Wistar mediante la inyección intraperitoneal de 1,2 Dimetilhidrazina (DMH) y suplementadas con probióticos se observó un aumento en la expresión proteica de ERK 1/2 total en relación con los tratados que fueron sometidos únicamente DMH y una dieta libre de probióticos. En cuanto al efecto angiogénico no se observaron diferencias entre control y tratado.

1. ANTECEDENTES

1.1. PROBIOTICOS

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) los probióticos se definen como “Microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren algún beneficio al huésped”.

Los probióticos se han convertido en un ingrediente típico en muchos alimentos tradicionales y formulaciones. Se han usado varios atributos de bacterias probióticas con éxito en el tratamiento de la diarrea aguda, la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y otros trastornos intestinales dentro de los cuales se encuentra el que hacemos hincapié en este trabajo, el Cáncer Colorrectal (CCR).

1.2. Mecanismos probables de la acción anticarcinogénica de los probióticos

Los siguientes mecanismos se describen en la literatura científica por ser responsables de la actividad anticarcinogénica de los probióticos: (I) modificación de la composición de la microbiota intestinal; (II) cambios en la actividad metabólica de la microbiota intestinal; (III) unión y degradación de compuestos cancerígenos presentes en la luz intestinal; (IV) producción de compuestos con actividad anticancerígena, como ácidos grasos de cadena corta y ácido linoleico conjugado; (V) inmunomodulación; (VI) mejora de la barrera intestinal; (VII) cambios en la fisiología del huésped; (VIII) inhibición de la proliferación e inducción celular apoptosis en células cancerosas.

Modificación de la composición microbiana intestinal

La composición exacta de la microbiota intestinal y su relación con el desarrollo de CRC sigue siendo desconocido. Sin embargo, una microbiota intestinal saludable debe estar compuesta de tal manera que el número de bacterias beneficiosas exceda las bacterias patógenas (eubiosis). De otra manera, puede desencadenar una inflamación crónica y aumentar la producción de compuestos carcinogénicos (disbiosis). Los microorganismos probióticos son capaces de reducir la población de bacterias patógenas de diferentes maneras, a través de: la competencia por nutrientes, factores de crecimiento y receptores de adhesión. Algunos probióticos pueden producir sustancias antibacterianas como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácido láctico, que inhiben el crecimiento o eliminan las bacterias patógenas de la luz intestinal.

Cambios en la actividad metabólica de la microbiota intestinal

Algunas bacterias presentes en los intestinos humanos son capaces de producir compuestos carcinogénicos. Esta capacidad es debido a la presencia y actividad de algunas enzimas, como β -glucosidasa, β -glucuronidasa, nitrato reductasa, azoreductasa, 7- α -deshidroxilasa, todas las cuales son capaces de convertir hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas heterocíclicas y ácidos biliares primarios en carcinógenos activos. Estos metabolitos tienen actividades citotóxicas y genotóxicas, que pueden conducir a crecimiento celular anormal y la activación de vías antiapoptóticas en los colonocitos.

Cambiando el metabolismo microbiano por la modulación de la actividad de estas enzimas es una de las estrategias propuestas por la cual el consumo de probióticos puede reducir el riesgo de desarrollar CRC. Estudios *in vitro* (Nowak *et al* 2014) e *in vivo* (Zhu *et al*, 2014) han demostrado que el consumo de ciertas cepas de bacterias probióticas pueden reducir la actividad de estas enzimas.

Unión y Degradación de Compuestos Carcinogénicos Presentes en el Lumen Intestinal.

Esta habilidad parece estar asociada con la aparición de intercambio catiónico entre los compuestos cancerígenos y los peptidoglicanos presentes en las paredes celulares de algunos microorganismos probióticos. Así, los compuestos cancerígenos serían eliminados junto con la bacteria a través de las heces. La capacidad de unión y la degradación parecen ser altamente dependientes de la cepa utilizada, la viabilidad del microorganismo, el compuesto cancerígeno, la dosis probiótica y condiciones ambientales, como el pH, la presencia de sales biliares y enzimas gastrointestinales.

Producción de compuestos con Actividad Anticarcinogénica

Los microorganismos probióticos pueden producir compuestos con propiedades anticarcinogénicas, como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y el ácido linoleico conjugado (ALC). Como son de naturaleza diferente, cada uno de estos compuestos exhibe una actividad anticarcinogénica diferente.

- **Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC)**

Los AGCC son los productos finales de la fermentación bacteriana de carbohidratos no digeribles de la dieta y de orígenes endógenos, como el moco. El butirato es el AGCC más estudiado en lo que respecta al CRC, ya que ayuda a regular el equilibrio entre la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de los colonocitos (Serban, 2014). El butirato se encuentra en mayores cantidades en las heces de individuos sanos, en comparación con las personas con CRC. Se estima que se producen 200 mmol de butirato en el colon humano todos los días. Las bacterias productoras de butirato pertenecen a los grupos de Clostridium IV y XIVa, y las principales especies productoras incluyen *Faecalibacterium prausnitzii*,

Eubacterium rectale y Roseburia (Vipera & O'Keefe, 2012). El ácido láctico bacterias (BAL) no producen butirato, pero algunas especies de bacterias como Eubacterium hallii y Anaerostipes caccae, son capaces de convertir acetato y lactato en butirato (Weir et al., 2013). En consecuencia, la producción de butirato depende de la composición de la microbiota intestinal, la dieta, la composición química de los carbohidratos ingeridos y la presencia de otros metabolitos. Además, el butirato puede contribuir a la prevención de la CRC, ya que es capaz de mejorar la barrera intestinal a través del aumento en la producción de mucina y la proliferación de células sanas, ya que este AGCC es el principal sustrato energético para los colonocitos. El butirato también estimula la producción de factores de crecimiento y citocinas antiinflamatorias, como la interleukina (IL)-10. Además, este AGCC tiene la capacidad de disminuir la producción de citocinas inflamatorias al inhibir la activación de la transcripción nuclear mediada por el factor kappa B (NF- κ B); aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales; regulando la actividad de proteínas implicadas en la apoptosis, como Bcl-2, Bak y caspasas 3 y 7; aumentar la actividad de la enzima antioxidante glutatión-S-transferasa; suprimir la actividad de la ciclooxigenasa (COX)-2; estimular la producción de péptidos antimicrobianos; e inhibir la desacetilación de histonas. Este efecto puede provocar el silenciamiento o la regulación positiva de los genes involucrados en el control de la proliferación, diferenciación y apoptosis del ciclo celular. Sin embargo, el trabajo en animales muestra que los efectos beneficiosos del butirato varían de acuerdo al modelo experimental utilizado, el grado de inflamación, la dosis, la etapa del proceso carcinogénico, e incluso la genética del individuo (Irrazábal *et al*, 2014). Además del butirato, los ácidos acético y propiónico también exhiben actividad antiinflamatoria, ya que son capaces de suprimir la activación de NF- κ B y regular la expresión génica de citoquinas proinflamatorias (Teddlind *et al*, 2007). El ácido propiónico es capaz de estimular la apoptosis de las células tumorales, y exhibe una actividad antiproliferativa. Los AGCC son producidos naturalmente por las bacterias que componen la microbiota intestinal. Por lo tanto, el consumo de probióticos puede contribuir al aumento de la producción diaria de dichos ácidos grasos.

- **Ácido Linoleico Conjugado (ALC)**

Algunas especies de bacterias probióticas, como Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, Propionibacterium freudenreichii, entre otras, son capaces de producir ALC a partir del ácido linoleico. Este ácido graso se produce en el íleon distal por bacterias, y puede ser absorbido o interactuar con los colonocitos, ejerciendo así sus efectos beneficiosos localmente. Las actividades antiproliferativas y proapoptóticas de ALC resultan de su capacidad para aumentar la expresión del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR γ),

que está involucrado en la modulación del metabolismo lipídico, apoptosis y función de sistema inmune. Los ALC pueden suprimir la producción de eicosanoides en colonocitos por dos vías. La primera, consiste en la sustitución del ácido araquidónico en las membranas celulares por ALC; y la segunda, es el resultado de la interferencia de ALC en la actividad de las enzimas ciclooxigenasa y lipoxigenasa, que son responsables de la síntesis de eicosanoides. La actividad anticarcinogénica del ALC es dosis-dependiente. Por lo tanto, el consumo de los probióticos que puede aumentar la producción de este ácido graso lo suficiente como para promover un efecto anticancerígeno.

Inmunomodulación.

La aparición de inflamación crónica en el intestino aumenta el riesgo de padecer CRC. Por lo tanto, las personas con enfermedad inflamatoria intestinal son cinco veces más propensas a desarrollar CCR en comparación con individuos sanos (Tjalsma *et al*, 2012). La inflamación crónica puede afectar la composición de la microbiota intestinal y aumentar su potencial genotóxico, lo cual indica la existencia de una fuerte relación entre la microbiota intestinal, el sistema inmune y la probabilidad de padecer CRC. La microbiota intestinal es esencial para la maduración del sistema inmune, y el desarrollo de tolerancia inmunológica, un mecanismo por el cual el sistema inmune es modulado para proteger el organismo huésped contra los patógenos.

Proporcionar la cantidad apropiada de los probióticos y una microbiota favorable para el sistema inmune es un enfoque para la inmunomodulación en beneficio del organismo huésped (Koboziev *et al*, 2014). El uso de probióticos para la inmunomodulación es una práctica común y creciente. Eso ocurre a través de la interacción entre las células inmunes presentes en el tracto gastrointestinal y los microorganismos probióticos o sus metabolitos. Los metabolitos son reconocidos por los receptores de las células inmunitarias y epiteliales, tales como receptores Toll-like y NOD-like. Después de ser reconocidos, las células inmunes y epiteliales comienzan a secretar citoquinas que pueden ayudar a regular la respuesta inmune innata y adaptativa (Delcenserie *et al*, 2008).

En el caso del CRC, las citoquinas proinflamatorias, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, IL-12, y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) pueden asociarse con el desarrollo de cáncer. En contraste, las citoquinas antiinflamatorias, IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) pueden exhibir efectos inhibitorios (Yu & Fang, 2015). Dado que los probióticos pueden aumentar la producción de citoquinas antiinflamatorias y disminuir la producción de citoquinas proinflamatorias el desarrollo de las células de cáncer de colon puede retrasarse. Además, los probióticos pueden disminuir la expresión de COX-2, una enzima que cataliza la producción de prostaglandinas derivadas del ácido araquidónico, y que se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollar CRC, ya que estimula la proliferación celular y el proceso proinflamatorio (Zhang *et al*, 2016).

Otra ruta inmunomoduladora importante consiste en el aumento de la producción de inmunoglobulina A (IgA). Debido a su resistencia a la proteólisis, esta inmunoglobulina actúa en la barrera intestinal, lo que limita el contacto de compuestos potencialmente cancerígenos presentes en la luz intestinal con colonocitos (Corthésy *et al*, 2007). Además, IgA crea un ambiente antiinflamatorio, ya que no puede activarse el sistema del complemento y la respuesta proinflamatoria (Yan & Polk, 2011).

Es importante destacar que la actividad inmunomoduladora de los probióticos depende de su supervivencia y persistencia en el tracto gastrointestinal; así como la variedad, dosis y frecuencia utilizada. Además, la interacción con el sistema inmune del huésped puede afectar su actividad inmunomoduladora. Por lo tanto, no todos los probióticos son capaces de modular el sistema inmune y prevenir la aparición de CCR.

Refuerzo de la barrera intestinal.

La función principal de la barrera intestinal es proteger nuestro cuerpo de los daños físicos y químicos, así como de la invasión de microorganismos presentes en la luz intestinal. Esta barrera consiste en una capa de células epiteliales (colonocitos), algunas células inmunes, caliciformes y células de Paneth, proteínas de unión celular, capas de moco, IgA, pH, péptidos antimicrobianos y microorganismos que componen la microbiota intestinal.

La relación simbiótica entre la microbiota intestinal y nuestro cuerpo depende de la existencia de esta separación anatómica. Cualquier alteración en esta barrera aumenta la interacción del huésped con la microbiota intestinal, lo que puede llevar a una inflamación y, eventualmente, al desarrollo de CCR. Los microorganismos de la microbiota intestinal pueden cambiar la barrera intestinal y hacerla más o menos permeable. Algunas especies de probióticos son capaces de reducir la permeabilidad intestinal, ya que pueden modificar tres componentes importantes de la barrera intestinal, como son: el pH intracolónico, las proteínas de unión celular y la producción de mucinas (Rajagopala *et al*, 2017).

- **pH intracolónico**

Las personas con CRC suelen exhibir valores de pH intracolónicos más altos en comparación con individuos sanos. Por lo tanto, la disminución del pH intracolónico se ha asociado con menor incidencia de este tipo de cáncer. Los valores más altos de pH se pueden atribuir a las bajas cantidades de ácidos orgánicos y AGCC presentes en las heces de estos individuos. Estos ácidos pueden ser producidos a partir de la actividad metabólica de los microorganismos probióticos como se describió previamente.

Los valores de pH intracolónico más bajos inhiben la proliferación y la patogenicidad de las bacterias, así como la actividad de las enzimas bacterianas responsables de la producción de compuestos

cancerígenos. Además de disminuir el pH intracolónico, los ácidos láctico y acético aumentan el peristaltismo, dificultando la adhesión de bacterias patógenas a los colonocitos y, en consecuencia, reduciendo el tiempo que los compuestos cancerígenos podrían estar en contacto con la mucosa intestinal (Ohigashi *et al*, 2013).

- **Proteínas de adhesión celular**

Los procesos inflamatorios y carcinogénicos aumentan la permeabilidad intestinal, principalmente porque cambian la estructura y expresión de las proteínas de unión celular, que hace que los colonocitos se adhieran entre sí. Estas proteínas se encuentran principalmente en la región apical de los colonocitos, y están formados por un complejo de proteínas transmembrana (occludinas y claudinas) que se unen al citoesqueleto de los colonocitos a través de la unión transmembrana proteínas, formando las uniones estrechas (Ohland & Macnaughton, 2010). El consumo regular de probióticos puede reducir la permeabilidad intestinal, ya que modifican la distribución de las proteínas de unión celular (L. Madsen, 2012). Disminuye la cantidad de compuestos con capacidad carcinogénica e inflamatorios absorbidos, y evita la ocurrencia de daño a los colonocitos y, en consecuencia, el desarrollo de CRC.

- **Producción de Mucinas**

La barrera formada por el moco es dinámica, y la composición y cantidad de la mucina producida está influenciada por la composición de la microbiota intestinal (Carasi *et al*, 2015). Así, algunos probióticos pueden aumentar la producción de mucinas mediante células caliciformes, a través de la regulación positiva de los genes MUC, principalmente MUC 2. La capacidad de los probióticos para aumentar la producción de mucinas puede verse afectada por factores, como el sistema inmune y la dieta.

- **Cambios en la Fisiología del Huésped**

Los probióticos pueden cambiar la fisiología del huésped y así contribuir a la prevención de la CCR (Irrazábal *et al*, 2014). Por ejemplo, algunos microorganismos probióticos pueden cambiar la actividad de algunas enzimas involucradas en el proceso de desintoxicación celular, como catalasa, superóxido dismutasa y glutatión-S-transferasa, lo que impide la actividad de las libres radicales (RL) y sustancias cancerígenas. Los RL son producidos naturalmente por la microbiota intestinal durante la respiración celular y los procesos inflamatorios.

Otro método por el cual los probióticos pueden modificar la fisiología del huésped está relacionado con las poliaminas, que son moléculas cargadas positivamente capaces de unirse a las proteínas, fosfolípidos, ADN y ARN presentes en las células. En consecuencia, las poliaminas pueden regular la expresión génica, proliferación celular y la diferenciación.

Debido a sus funciones fisiológicas, la biosíntesis, catabolismo, absorción y reflujo celular de poliaminas están estrictamente controladas. Sin embargo, con el desarrollo de CRC, este control se pierde, lo que aumenta las concentraciones intracelulares de estas moléculas.

inhibición de la proliferación e inducción de la apoptosis en células cancerosas

Los eventos de proliferación y apoptosis de células tumorales es lo que define la velocidad del desarrollo del cáncer. Debido a los cambios que ocurren durante el proceso de desarrollo de dicha patología, en estas células predomina más la proliferación que los eventos de apoptosis (Fearon, 2011). Por lo tanto, los probióticos que son capaces de modular la proliferación celular y la apoptosis son de gran interés, ya que las células cancerosas serían eliminadas de forma menos agresiva y, debido a que la apoptosis no causa ningún daño a células vecinas y no produce inflamación, a diferencia de los tratamientos como quimioterapia y la radioterapia (Zhu *et al*, 2014).

En un estudio *in vitro*, *Enterococcus faecium* RM11 y *Lactobacillus fermentum* RM28, cepas bacterianas que se pueden encontrar en la leche fermentada, pudieron inhibir la proliferación celular en células Caco-2 en un 21% y 23%, respectivamente (Thirabunyanon *et al*, 2009). Del mismo modo, Sadeghi-Aliabadi *et al.* (Zhu *et al*, 2014) observaron una actividad antiproliferativa de *Lactobacillus plantarum* A7 y *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivado por el calor y el sobrenadante libre de células producido por ellos. Esto sugiere que los efectos de los probióticos en las células cancerosas pueden no depender de la viabilidad de los microorganismos. Chen *et al* observaron una disminución significativa en la proliferación celular relacionada con la producción de bacitracina por parte de la cepa probiótica *Bacillus subtilis* (Z. Chen *et al.*, 2015).

La mayor incidencia de apoptosis de células cancerosas inducida por el consumo de los probióticos se ha atribuido al AGCC, particularmente el butirato. Este AGCC puede inducir cambios epigenéticos, paralizando el ciclo celular y estimulando la expresión de genes pro-apoptóticos (Kumar *et al*, 2013).

La inmunomodulación es otra vía posible que contribuye a la actividad pro-apoptótica inducida por el consumo de probióticos, especialmente el aumento de la producción de TNF- α . Además, Wan *et al.* (Wan *et al*, 2014) concluyó que la capacidad de inducir apoptosis del tumor en células SW620 por el probiótico *Lactobacillus delbrueckii* fue una consecuencia del aumento de la expresión de caspasa-3 y reducción de la expresión de Bcl-2.

1.3. CÁNCER DE CÓLON

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 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 (CCR) es el segundo tipo de cáncer más común en las mujeres en los hombres en todo el mundo según datos proporcionados en el 2018 por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (Siegel, Miller, & Jemal, 2018). Además de la edad y la raza, muchos de los factores de riesgo conocidos para el CCR derivan de los comportamientos tradicionalmente asociados con países de altos ingresos, como un estilo de vida sedentario, dieta occidental y el tabaquismo. Según datos proporcionados por la Sociedad Americana de Cáncer en el año 2018, la prevalencia de dichos factores se refleja en la variación de la incidencia del CCR en el mundo, que es más alta en Europa y América del Norte y la más baja en África

Durante el desarrollo de los adenocarcinomas colorrectales, las células epiteliales del tracto gastrointestinal adquieren mutaciones secuenciales genéticas y epigenéticas en oncogenes específicos y/o genes supresores de tumores confiriéndoles una ventaja selectiva sobre la proliferación y la auto renovación, es decir, el epitelio normal se transforma en mucosa hiperproliferativa, causando la aparición, progresión y metástasis del CCR (De Rosa et al., 2015).

La carcinogénesis del CCR es un proceso de múltiples etapas, caracterizado por una gran inestabilidad genómica que se produce por diferentes vías; entre las más importantes se encuentran: la de inestabilidad cromosómica (CIN), la de inestabilidad microsatelital (MSI) y la de metilación (Tariq & Ghias, 2016).

1.4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER COLORRECTAL

1.4.1. La vía de señalización de las MAP quinasas

Hasta el presente, cuatro cascadas MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) han sido al menos identificadas, estas incluyen ERK1/2 (las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2), JNK (quinasa c-Jun N-terminal), p38 y ERK5/ BMK1. Estas quinasas con actividad sobre residuos serina y treonina se activan por fosforilación en respuesta a una amplia variedad de estímulos extracelulares que interactúan con receptores que poseen actividad tirosina quinasa intrínseca, o con receptores que pueden ser fosforilados en tirosina o simplemente por activación de tirosina quinasas citosólicas como Src. Todas las MAPKs se activan mediante un mecanismo de fosforilación dual único,

sobre un motivo Thr-X-Tyr, situado en el bucle de fosforilación (Cheruku *et al*, 2015). Las señales (o estímulos) son transmitidos a través de una serie de proteínas quinasas citosólicas que están organizadas en tres niveles: MAP3K, MAPKK y MAPK (**Figura 1**). Cada familia participa en la regulación del metabolismo intracelular y expresión de genes involucrados en diversas respuestas celulares incluyendo crecimiento y desarrollo, enfermedad, apoptosis y respuesta celular a estrés (Keshet & Seger, 2010). Usualmente, las ERK1/2 juegan un rol en la proliferación y diferenciación, las JNK y p38 son activadas por el estrés celular por lo que se denominan proteínas quinasas activadas por estrés, y la ERK5 parece responder igualmente a ciertos tipos de estrés, así como a señales mitogénicas. Sin embargo, dependiendo de las líneas celulares y la estimulación, las distintas cascadas pueden regular funciones no canónicas, es decir, fuera de lo normal, e incluso opuestas; así, en raras condiciones, ERK1/2 puede participar en la respuesta al estrés y la apoptosis, mientras que JNK puede mediar la proliferación. La mala regulación de las cascadas, a menudo, conduce a enfermedades tales como el cáncer, la diabetes y la respuesta inmune inflamatoria (Keshet & Seger, 2010). Más aun, la activación de la señalización ERK 1/2 es muy común en el CCR (Cheruku *et al*, 2015). Se ha informado de que pequeñas moléculas inhibitoras dirigidas contra la vía ERK han demostrado tener efectos antitumorales sobre el CCR (Peng *et al*, 2013).

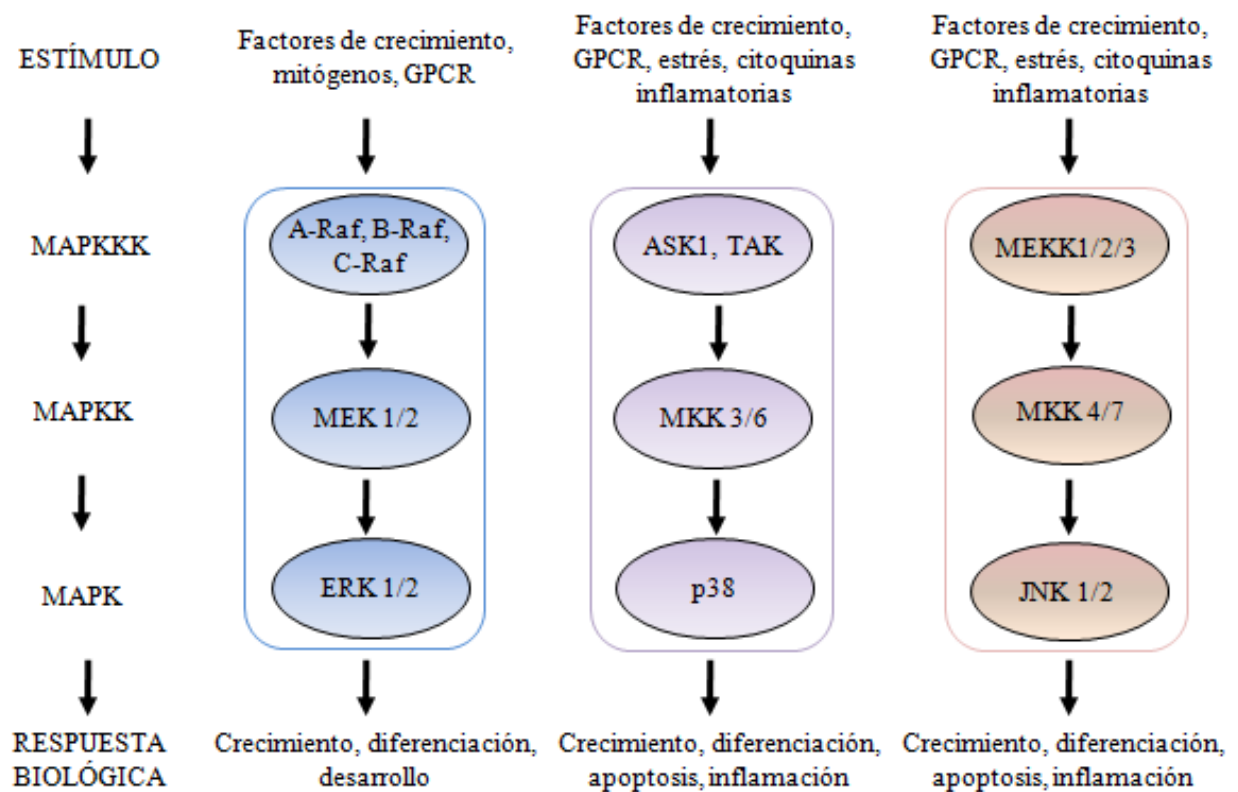


Figura 1: Componentes de las vías de señalización de MAPK

1.4.2. La vía de señalización PI3K/AKT

Fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) pertenece a una familia de quinasas de lípidos que se activa por numerosos estímulos celulares tales como factores de crecimiento y receptores de hormonas, regulando así el crecimiento celular, la supervivencia, la movilidad y las respuestas a los cambios en las condiciones nutricionales. Como muestra la **Figura 2**, esta quinasa puede ser dividida en tres clases (I, II y III) en base a su selectividad por los sustratos, su estructura y su modo de regulación (Thorpe *et al*, 2015; Hawkins & Stephens, 2015). La clase I se divide en: a) clase IA, que comprende heterodímeros formados por una subunidad regulatoria (p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ o p50 α) y una subunidad catalítica de 110KDa (p110 α , β o δ); y b) clase IB, está compuesta por heterodímeros con una subunidad regulatoria (p101 o p87) y una subunidad catalítica (p110 γ) (Backer, 2010). Numerosos estudios indican que la clase IA PI3K está implicada en el cáncer humano (Yuan & Cantley, 2008); se sabe que esta vía es una de las más desreguladas en esta enfermedad que no sólo juega un rol clave en el crecimiento tumoral, sino que también es un potencial objetivo de los tratamientos de cáncer (Osaki *et al*, 2004). Como se muestra en la **Figura 5**, la clase IA PI3K es activada por receptores con actividad tirosina quinasa (RTK) o tirosinas quinasas no receptoras tales como c-Src mientras que la clase IB es activada por receptores acoplados a proteína G (GPCR) (Fruman & Rommel, 2014). Las interacciones de la subunidad regulatoria con varias proteínas afectan la localización y activación de la subunidad catalítica. Además, la interacción directa de la subunidad catalítica con Ras puede estimular la actividad de la clase I de PI3K (Castellano & Downward, 2011). Una vez activada, esta quinasa cataliza la adición de un grupo fosfato a la posición 3'-OH del anillo de inositol de fosfatidilinositoles (Fruman & Rommel, 2014). El resultante fosfatidilinositol 3'-fosforilado sirve como segundo mensajero el cual media el reclutamiento a la membrana plasmática y la activación de moléculas efectoras que poseen un dominio de homología de plekstrina (PH), entre las que se encuentra la quinasa Akt (Vanhaesebroeck *et al*, 2012).

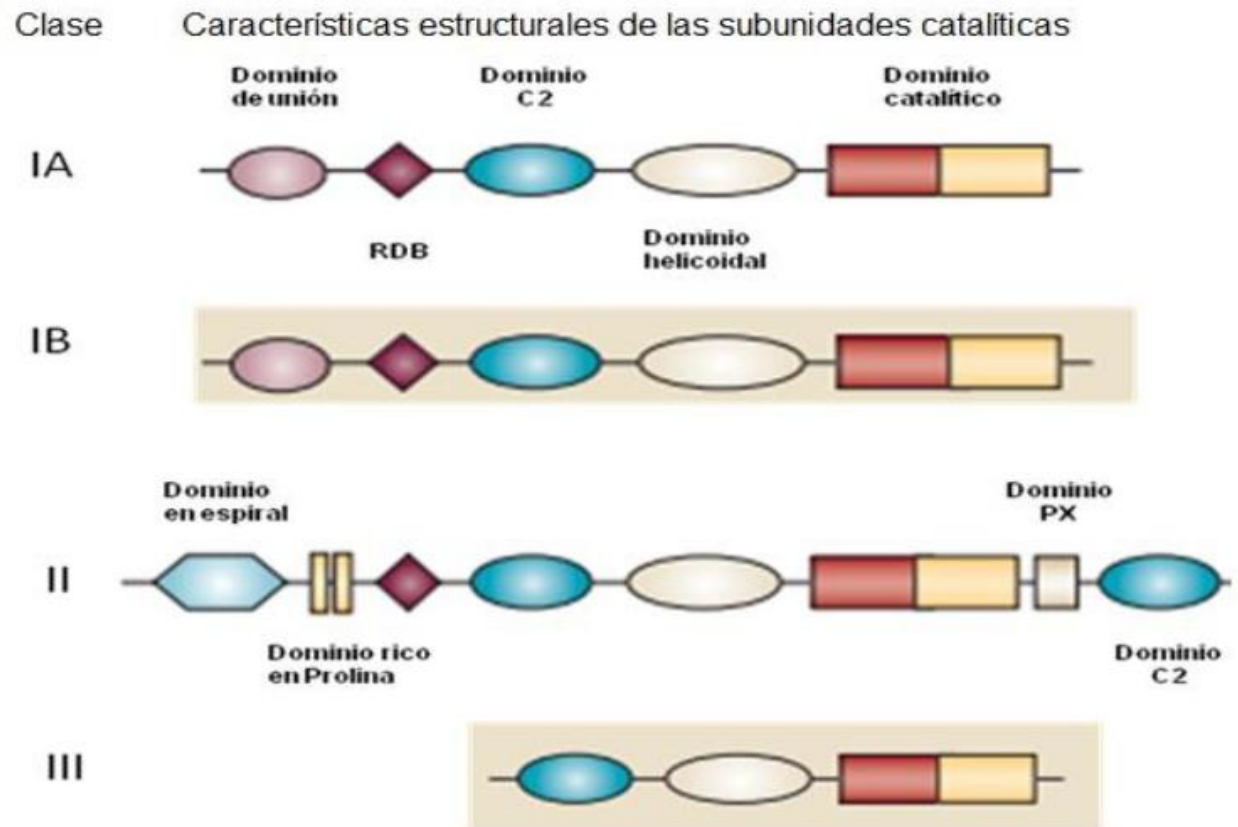


Figura 2: PI3Ks constituye una familia de enzimas que está dividida en tres clases.

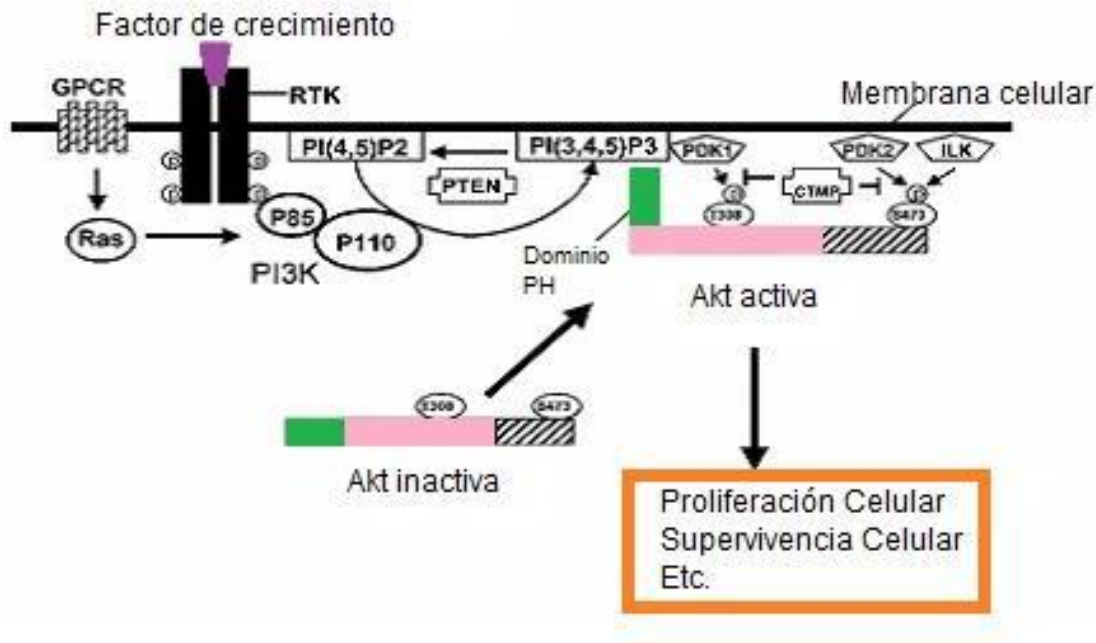


Figura 3: Modelo para la regulación de la vía de señalización PI3K/Akt.

Las PI3K clase II (PI3K-C2 α , β y γ) son monómeros caracterizados por un dominio C-terminal C2 que parece no unir Ca^{2+} . Estas enzimas fosforilan preferentemente fosfatidilinositol y fosfatidilinositol-4-fosfato; y dado que no poseen adaptadores, no se conocen la manera en que se controlan las PI3K clase II. La clase III PI3K fosforila fosfatidilinositol (PI) para formar fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) en ubicaciones intracelulares específicas, como endosomas y estructuras autofagocíticas tempranas, y regula el destino y la función de estas estructuras mediante la unión a distintos dominios efectores. Solo hay una subunidad catalítica de PI3K de clase III, que se une a una proteína quinasa putativa (p150 o Vps15), la cual participa en su regulación. Los detalles moleculares de cómo está regulada la actividad de PI3K de Clase III todavía son poco conocidos (Hawkins & Stephens, 2015). Akt, también llamada proteína quinasa B (PKB) o proteína relacionada con la quinasa A o C (RAC), es una quinasa de 57 KDa que fosforila residuos de serina y de treonina. Los genomas de mamíferos contienen tres genes de Akt, que codifican las isoformas Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) y Akt3 (PKB γ). Akt2 y Akt3 tienen un 81% y un 83% de homología en la secuencia de aminoácidos con Akt1, respectivamente. Como muestra la **Figura 4**, cada gen codifica una proteína que contiene un dominio PH en el extremo N-terminal, un dominio quinasa central que incluye el residuo de treonina 308 (Thr309 en Akt3), y un dominio regulador C-terminal que incluye el residuo de serina 473 (Ser474 en Akt2 y Ser472 en Akt3). La unión de los lípidos fosforilados (resultantes de la activación de PI3K) al dominio PH de Akt provoca su translocación del citoplasma a la membrana plasmática y altera su conformación para permitir la fosforilación del residuo de treonina 308 por PDK-1 (quinasa dependiente de fosfoinosítido-1). La fosforilación del residuo de serina 473 es

controversial, ya que puede ser mediada por PDK-1, PDK-2 (quinasa dependiente de fosfoinosítido-2), ILK (quinasa ligada a integrina) o por autofosforilación. Se requiere de la fosforilación de ambos residuos para la activación completa de Akt(Gao *et al*, 2014).

La vía de señalización de PI3K/Akt está asociada con el CCR humano participando en la transformación de la mucosa gástrica o del colon a un fenotipo menos diferenciado y más maligno. Se cree que los efectos de PI3K sobre el crecimiento y progresión del tumor están mediados principalmente por Akt (Pandurangan, 2013). Akt se encuentra sobre-expresada en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de colon, de páncreas, de ovario, y de mama. Además, la sobre-estimulación de la fosforilación de Akt y la consecuente sobre-activación de esta enzima en los carcinomas de colon humano se correlaciona con el aumento de la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis, así como diferentes parámetros clínico-patológicos tales como grado invasivo, infiltración de vasos, metástasis de ganglios linfáticos y estadio tumoral (H. Chen *et al*, 2018).

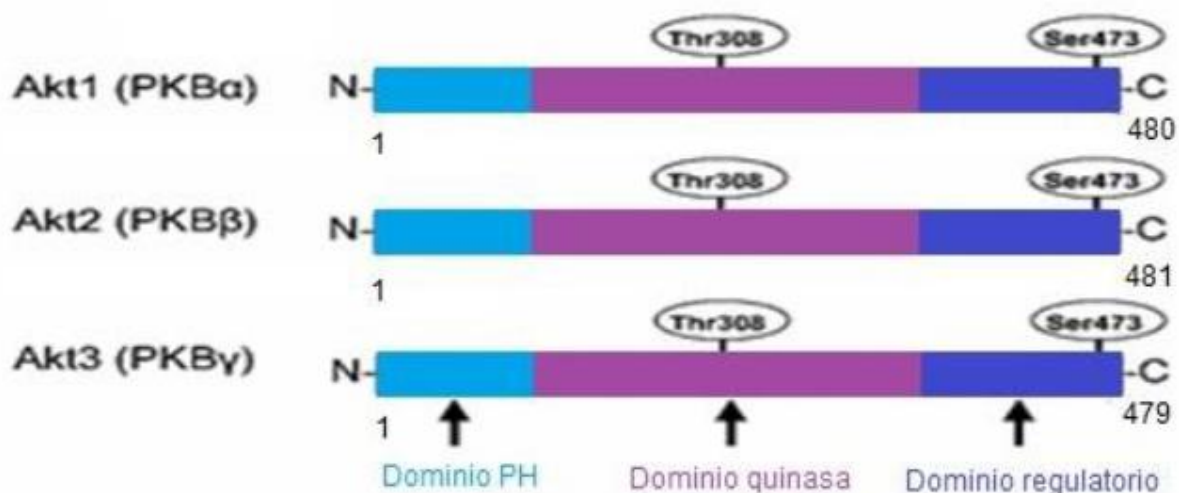


Figura 4: Estructura de los dominios de las tres isoformas humanas de Akt/PKB

1.4.3. La tirosina quinasa Src

Se han identificado al menos once tirosinas quinasas no receptoras pertenecientes a la familia Src en mamíferos: Src, Fyn, Yes, Blk, Yrk, Frk (Rak), Lck, Hck, Lyn, Frg y Srm. Los miembros de esta familia son estructuralmente similares, pero difieren en sus patrones de localización y expresión. Src, Fyn y Yes están ubicuamente expresadas mientras que varios de los otros miembros de esta familia se encuentran predominantemente en ciertos tipos de células(Sen & Johnson, 2011). La relación de las proteínas Src con los distintos sistemas de señalización ha generado un enorme interés en el entendimiento de mecanismos por los cuales estas enzimas son reguladas y cómo participan en las cascadas de

señalización intracelular(Boggon & Eck, 2004). La tirosina quinasas de la familia Src poseen una masa molecular entre 52-66 KDa y están compuestas por varios dominios presentes en otras moléculas de señalización. Se ha propuesto un modelo que describe el funcionamiento y los diferentes dominios de la proteína Src basado en la estructura cristalina de Src humana(Boggon & Eck, 2004). Como se observa en la **Figura 5**, estas quinasas contienen un dominio SH4 de localización a membrana en la región N-terminal, un grupo de aminoácidos comúnmente llamado dominio único, un dominio SH3, un dominio SH2, una unión que conecta el dominio SH2 con el dominio quinasa y una extremidad o cola conservada en la región C-terminal(Sen & Johnson, 2011). Este dominio carboxilo-terminal contiene el residuo tirosina Y527 (siendo para humanos el residuo Y530) el cual es clave en la regulación de la actividad quinasa. En la conformación inactiva de Src, el dominio quinasa se encuentra inhibido, bloqueado por un rulo que se forma al unirse el residuo Y527 fosforilado con el dominio SH2. Cuando un estímulo provoca la activación de Src, la defosforilación del residuo Y527 permite separar la cola de la región C terminal del dominio SH2 y este evento provoca un cambio conformacional en el dominio catalítico, exponiendo su sitio activo. Estos cambios conformacionales permiten la exposición del residuo de tirosina Y416 (ubicada en el bucle catalítico) y su autofosforilación conduciendo a la total activación de Src, ya que la fosforilación de Y416 estabilizaría la conformación extendida característica de Src activa. La actividad de Src no sólo está controlada por un delicado balance de fosforilación y defosforilación, sino que otros mecanismos participarían en la activación de esta enzima (Young *et al*, 2001,Okada, 2012). De esta manera, Src juega un rol integral en múltiples procesos celulares a través de la interacción estructural de SH2 y SH3 con la señalización proteica, incluyendo la invasión, migración, proliferación, angiogénesis y apoptosis (Yeatman, 2004, Sen & Johnson, 2011). La activación aberrante de Src se describe en múltiples tipos de cáncer y, en particular, en el cáncer gastrointestinal se observa un incremento en su activación (probablemente, como consecuencia de alteraciones genéticas y epigenéticas) que favorece el progreso y la quimiorresistencia de la enfermedad(Lieu & Kopetz, 2010). El 80% de los pacientes con CCR sobre-expresan Src en el tejido tumoral. La evidencia ha demostrado que la sobre-expresión de Src en el CCR acelera la metástasis y provoca resistencia a los fármacos quimioterapéuticos a través de múltiples vías de señalización. Por lo tanto, la inhibición de Src puede ser útil como blanco terapéutico para el tratamiento del CCR

1.4.4.La familia de proteínas quinasas C (PKC)

La proteína quinasa C (PKC) es una familia de quinasas que fosforilan residuos de serina y treonina, dependientes de fosfolípidos y que funcionan en numerosos tipos de células. Como se puede apreciar en la **Figura 6**, basándose en sus características estructurales y de activación, esta familia de proteínas puede clasificarse además en tres subfamilias: isoenzimas de PKC convencionales o clásicas (cPKC, α , β I, β II, γ), isoenzimas de PKC nuevas o no clásicas (nPKCs, δ , ϵ , η , θ), e isoenzimas atípicas de

PKC (α PKCs, ζ , ι , λ)(Steinberg, 2012). Las isoenzimas de PKC están implicadas en múltiples vías de transducción de señales que responden a una variedad de estímulos externos, incluyendo hormonas, factores de crecimiento y otros ligandos de receptores de membrana. Por esta razón, las isoenzimas de PKC pueden actuar como dianas terapéuticas para varias enfermedades. En cáncer, las isoenzimas de PKC juegan un rol crítico en la proliferación celular, supervivencia, migración, invasión, apoptosis, angiogénesis y resistencia a drogas utilizadas en el tratamiento de esta enfermedad(Kang, 2014). En particular, la importancia de las PKC en el CCR ha sido demostrada y varios reportes indican que la carcinogénesis del CCR va acompañada de cambios en la expresión de las diferentes isoenzimas de PKC, incluyendo un aumento dramático en el nivel de expresión de PKC β II y PKC ϵ , como también la pérdida de la funcionalidad de PKC δ (Luna *et al*, 2011). Con respecto a PKC α , se ha demostrado que esta isoenzima participa en el arresto del crecimiento y la supresión del cáncer en el epitelio intestinal(Kang, 2014).

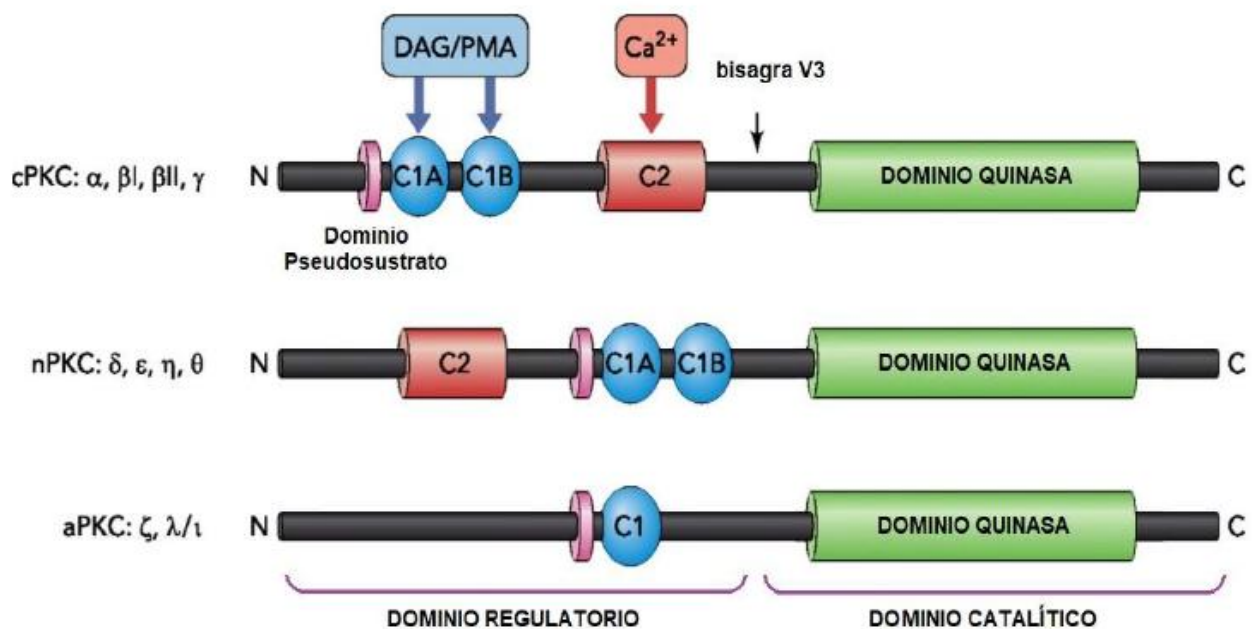


Figura 6: Estructura de los dominios de las enzimas de la familia PKC

1.4.5. La vía de señalización de β -Catenina

La señalización de Wnt representa una de las pocas cascadas moleculares clave que regulan el destino celular de los animales a lo largo de su vida. Durante el desarrollo embrionario, los niveles proteicos de β -catenina, regulados por Wnt, contribuyen críticamente al establecimiento del eje del cuerpo

y la orquestación del desarrollo de los tejidos y órganos. En los órganos adultos, la señalización Wnt continúa desempeñando papeles indispensables en la homeostasis tisular, la renovación celular y la regeneración (Yang, 2012).

La proteína β -catenina (Armadillo en *Drosophila*), codificada por el gen CTNNB1, es el principal componente de la vía Wnt/ β -catenina. El desequilibrio en las propiedades estructurales y de señalización de la β -catenina a menudo da como resultado una enfermedad y un crecimiento desregulado relacionado con el cáncer y la metástasis (Mantilla *et al*, 2015).

En hasta el 90% de los CCR la vía de señalización regulada por Wnt/ β -catenina es defectuosa (Walther *et al*, 2009). La estabilidad de β -catenina en citosol es regulada por un complejo de degradación. La proteína supresora de tumores Axina funciona como el andamio de este complejo interactuando directamente con β -catenina, con el producto del gen adenomatous polyposis coli (APC), con la quinasa de caseína 1 (CK1) y con la quinasa de glucógeno-sintasa 3 (GSK3). Cuando el ligando Wnt no ocupa su receptor Frizzled y co-receptor LRP, β -catenina es fosforilada secuencialmente en Ser45 por CK1 y en Thr41/Ser37/Ser33 por GSK3. De esta manera, β -catenina, una vez fosforilada en esos sitios, y después del agregado de ubiquitina, es rápidamente degradada por el proteosoma. La ocupación del receptor por su ligando Wnt inhibe la fosforilación de β -catenina por CK1 y GSK3 lo que acarrea el desarmado del complejo de destrucción. β -catenina, ahora libre en el citosol, es importada hacia el núcleo donde estimula la transcripción de genes que regulan la proliferación, diferenciación y migración celular (**Figura7**). Los defectos encontrados en la vía de señalización Wnt/ β -catenina en la mayoría de los casos de CCR están caracterizados por mutaciones en APC, axina y/o β -catenina. Estas mutaciones evitan la degradación de β -catenina y simultáneamente estimulan su acumulación nuclear y la transcripción de los genes que esta proteína controla. Se identificaron otros sitios de fosforilación en β -catenina (tales como Ser552 y Ser675) que cuando están fosforilados estimulan la entrada de β -catenina al núcleo y su actividad transcripcional independientemente de la vía de señalización activada por Wnt (Verheyen & Gottardi, 2010). Varias quinasas tales como c-Src, Akt, PKA y las MAPKs fosforilan a β -catenina regulando su función como mediador en la transducción de señales extracelulares (Valenta *et al*, 2012).

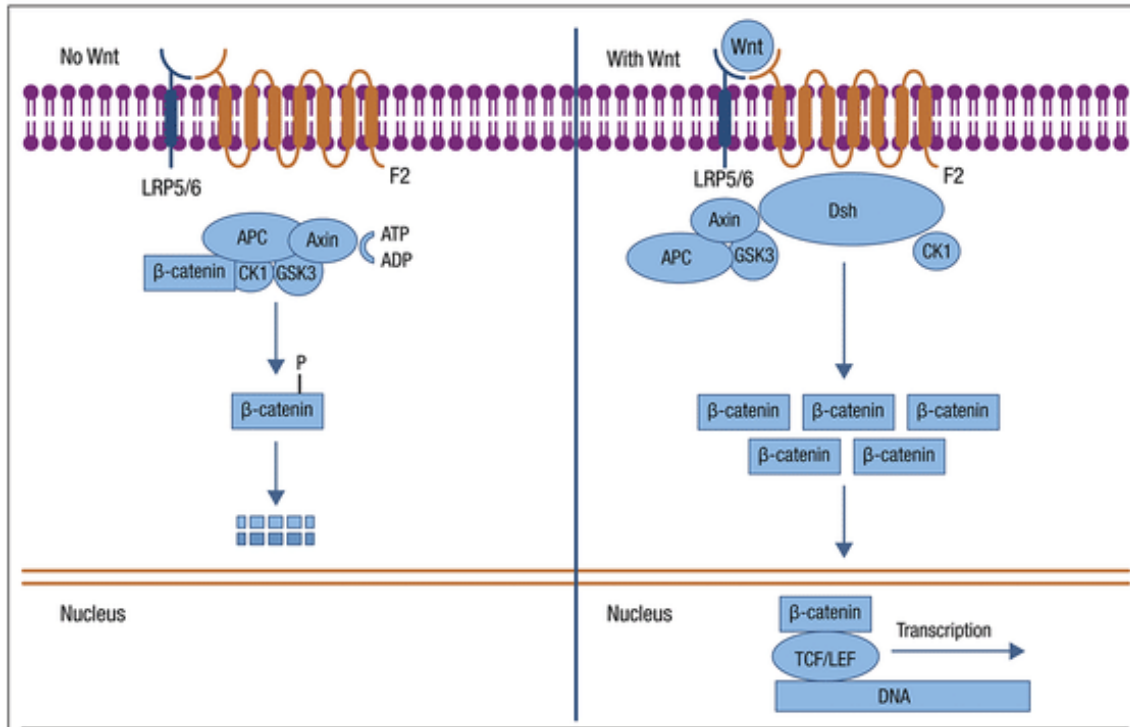


Figura 7: Representación esquemática de la vía de señalización Wnt/ β -catenina

1.5. TRATAMIENTO DE CÁNCER DE CÓLON

Las opciones para el tratamiento del cáncer de colon incluyen actualmente la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia utilizando Irinotecán (CPT-11) el cual está aprobado en todo el mundo para el tratamiento del CCR metastásico, como quimioterapia de primera y segunda línea para el CCR avanzado o recurrente. La combinación de CPT-11 con otras drogas (por ejemplo, FOLFIRI, que es una combinación de CPT-11 junto con leucovorin y 5-fluorouracilo o 5-FU), demostró incrementar significativamente la supervivencia de los pacientes que no han respondido a la terapia inicial basada únicamente en 5-FU (Li *et al*, 2014, Mocellin *et al*, 2017); los cuales reducen significativamente la calidad de vida de los mismos. Existen además estrategias terapéuticas emergentes, como las drogas antiinflamatorias no esteroideas (Sulindac), nuevos agentes quimioterápicos (Capecitabina) y anticuerpos monoclonales (Cetuximab, anticuerpo para el factor de crecimiento epidérmico).

Sin embargo, los probióticos representan otra opción terapéutica emergente. Han demostrado su eficacia en varias enfermedades como la colitis ulcerativa, diarrea, eczema atópico. Las posibilidades 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 mencionados previamente.

2. OBJETIVOS

A lo largo de este trabajo se ha logrado el entrenamiento en manejo de cultivo celular y en técnicas de biología celular y molecular para el estudio de la transducción de señales.

En este trabajo de tesina se propone explorar los mecanismos de señalización desencadenados a partir de la interacción de células tumorales intestinales con probióticos utilizando como modelos experimentales una línea celular intestinal HCT-116 derivada de adenocarcinoma de colon humano y un modelo experimental de animal con desarrollo de cáncer colorrectal por inducción con 1,2 – DMH. De esta forma se procedió a:

1- En las células HCT-116 tratadas con una suspensión de probióticos:

1.1- Evaluar marcadores tales como stem-cell y p-ERK.

2- En el modelo animal con desarrollo de CCR por inducción con 1,2-DMH divididos en dos grupos, con y sin una dieta suplementada con probióticos:

2.1-Evaluar la expresión de marcadores moleculares que han sido estudiados como factores pronósticos de CCR en humanos y en modelos animales, pero nunca en animales cuya dieta ha sido suplementada con probióticos, tales como ERK 1/2 y CD 31 (marcador de angiogénesis).

2.2-Evaluar la expresión de algún marcador asociado a la progresión del CCR, tal como el ERK 1/2.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MODELOS EXPERIMENTALES

3.1.1. Modelo Animal

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 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 libitum 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 realizódía 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 estas tienen un impacto directo en el desarrollo y resultados de una experiencia (Hutchinson, Avery, & Vandewoude, 2005)(Benefiel, Dong, & Greenough, 2005)(Smith & Corrow, 2005). 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 estricto seguimiento de los animales durante el desarrollo de todo el proceso experimental. El tamaño de muestra se determinó a 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 los Animales de Laboratorio de la Universidad Nacional del Sur.

Eutanasia.

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

Criterios adicionales de eutanasia:

- Pérdida de peso: pérdida del 20 al 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 de que no pudiera realizarse de inmediato, el cadáver pudo ser conservado en refrigerador durante 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 anormalidades 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 colonica y si infiltra, hasta que 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 a 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 diámetros mayores de cada tumor presente en un animal.

Estudios histológicos.

Procesamiento de muestras para microscopia óptica.

Se obtienen tacos de parafina 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 mismo 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)

Inmunohistoquímica

Los tumores de los ratones “nude” fueron embebidos en parafina y las secciones de los mismos fueron desparafinadas, rehidratadas y pretratadas para recuperación de antígenos mediada por calor (usando una olla a presión) con tampón de citrato de sodio (10 mM, pH 6) durante 15 minutos. Después de la etapa de recuperación de antígeno, las secciones de tejido se lavaron y se bloquearon en H₂O₂ al 30%, y se añadieron los anticuerpos primarios para su incubación en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. La tinción inmunohistoquímica se llevó a cabo manualmente usando el kit comercial “ABCAM Detection IHC Kit” (ABCAM, Cambridge, MA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de las secciones fueron controladas bajo microscopio y finalmente detenidas con agua destilada. Luego las muestras se contrastaron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron. La tinción se visualizó usando un microscopio óptico de campo claro.

Evaluación de las tinciones inmunohistoquímica por índice de expresión

Los niveles de expresión de diversos marcadores moleculares se clasificaron semi-cuantitativamente basándose en las puntuaciones combinadas del porcentaje de células tumorales positivamente teñidas junto con la intensidad de tinción. Un tumor se puntuó como '0' si menos del 5% de las células tumorales se tiñeron positivas, '1' si 5-50% se tiñeron positivas, '2' si más de 50 a 90% de las células se tiñeron positivas y '3' si el 90-100% de las células se tiñeron positivas. La intensidad de tinción se puntuó como "0" si no se producía tinción de las células o si sólo había una tinción débil, "1" si había tinción moderada y "2" en casos de tinción fuerte. La puntuación final de todas las proteínas de expresión se definió como "expresión baja de la proteína" si la suma de la puntuación de la positividad y la intensidad de tinción fue de 0-1, "expresión media de la proteína" si la suma fue de 2-3 y "expresión alta de la proteína" si la suma era de 4-5 (Allen, 2006). En cada caso, se evaluaron al menos tres áreas tumorales diferentes y se tomó la media de los resultados como la puntuación final de expresión.

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

- Índice 0: reacción ausente.
- Índice entre 1 a 6: reacción débil.
- Índice entre 7 a 12: reacción fuerte.

3.1.2. Modelo Celular

Línea celular intestinal HCT-116

Para los estudios in vitro se empleó como modelo experimental la línea celular HCT-116 derivadas de carcinoma de colon humano, adquiridas de la ATCC (American Type Culture Collection)

Las células se cultivaron a 37°C, bajo atmósfera de 5% de CO₂ en aire, en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor e irradiado, 1% de aminoácidos no esenciales, penicilina (100 µl/ml), estreptomicina (100 mg/ml) y gentamicina (50 mg/ml). Una vez alcanzado el nivel de confluencia apropiado (70%), las células HCT-116 fueron deprivadas de SFB por 2 horas, luego el medio de cultivo fue retirado y se procedió a agregarle a cada caja (8 en total contando los controles) 1ml de PBS e incubadas con 1ml de una solución de *B.subtilis* 10⁸ UFC/ml, durante tiempos cortos (5, 10, 15 y 20 minutos). Los controles fueron tratados con el vehículo correspondiente. Además de un preparado conteniendo solo bacterias en medio PBS para luego procesarlas y descartar la presencia de p-ERK 1/2 y el marcador de angiogénesis DC31.

Obtención de la cepa de *Bacillus subtilis*

La cepa fue aislada del suplemento probiótico comercial "Totalflora" del Laboratorio Roux Ocefa. Los aislamientos se conservaron a -70°C, en caldo nutritivo con un 10% de Glicerol (Criopreservante). Para la realización de la experiencia, ese vial fue repicado en un caldo nutritivo, durante 24 Horas A 37°C y se realizó el aislamiento en agar nutritivo incubado en las mismas condiciones del cultivo puro, luego fue centrifugado 10 minutos a 5000RPM, se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con Buffer PBS, centrifugando y siempre descartando el sobrenadante para eliminar el medio de cultivo que pudiera interferir en la medición de proteínas. Por último, se preparó una suspensión en Buffer PBS y se leyó la absorbancia a 500 nm, sabiendo que el resultado de la misma debía ser entre 0.200nm y 0.250nm, densidad óptica que corresponde a aproximadamente un recuento de 10⁸ UFC (La densidad óptica fue de 0.205nm), según la escala de Mc Farland.

Obtención de lisado celular

Luego de que las células HCT-116 fueron expuestas a las bacterias, el medio de cultivo fue removido, las cajas de cultivo se colocaron en hielo y se lavaron 4 veces con PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 2 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; pH: 7,2-7,4) frío siendo el último lavado el que contenía inhibidores de fosfatasa (NaF 50µl/ml y Na₃VO₄ 5µl/ml). Seguidamente las células fueron lisadas con 60µl de buffer compuesto por aprotinina 4 µl/ml, leupeptina 4 µl/ml, fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) 5µl/ml, NaF 50 µl/ml y Na₃VO₄ 5µl/ml y los lisados fueron colectados en tubos eppendorfs. Se colectaron los sobrenadantes y se tomaron alícuotas para cuantificar las proteínas por el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976).

3.1.3.Cuantificación de proteínas

Las proteínas de los lisados celulares fueron cuantificadas por el método de Bradford. Para ello, se tomaron alícuotas de las muestras; se agregó 2,5 ml de reactivo de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250 100 mg/L; etanol 4,75% y ácido fosfórico 8,5%), se incubó durante 5 minutos y las absorbancias se midieron a 595 nm empleando un espectrofotómetro Beckman DU530. Como estándar de concentración conocida se empleó 1 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA).

3.1.4.Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Las proteínas de los lisados celulares se desnaturalizaron en buffer muestra de electroforesis 6X (Tris-HCl 0,375 M pH: 6,8; dodecilsulfato de sodio (SDS) 12%; glicerol 60%; 2-mercaptoetanol 30% y azul de bromofenol como indicador del frente de corrida) y se calentaron en baño de agua a 100°C durante 5 minutos. Posteriormente las muestras fueron sembradas (30 µg proteína /calle) y separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) discontinuos (gel de "stacking": 4% acrilamida, gel de separación: 10% acrilamida) según la técnica de Laemmli (Laemmli, 1970). En paralelo se sembraron marcadores coloreados de peso molecular conocido. La electroforesis se realizó a voltaje constante (100 voltios) utilizando como buffer de corrida Tris 25 mM pH: 8,8; glicina 195 mM; SDS 0,1%.

3.1.5.Electrotransferencia e Immunoblotting

A continuación, las proteínas separadas por SDS-PAGE según su peso molecular fueron electrotransferidas a membranas de polivinilideno bifluoruro (PVDF) (immobilon-P, 0,45 µm). Las membranas se hidrataron en metanol puro durante 50 segundos y se equilibraron en buffer de transferencia Towbin (Tris 0,25 M pH: 8,3; glicina 0,192 M; 20% metanol) durante 5 minutos al igual que los geles. La transferencia se realizó en una cámara semi seca aplicando 125 mA por gel durante 1 ó 2 horas y embebiendo la membrana y el gel en buffer de transferencia (Towbin et al., 1979). Posteriormente el gel se tiñó con el colorante Coomassie Brilliant Blue R-250 para constatar la eficiencia de la transferencia, según se detalla más adelante.

Los sitios de ligado inespecíficos de la membrana fueron bloqueados usando el buffer TBS-T 0,1% (Tris 50 mM pH: 7,4; NaCl 200 mM; 0,1% Tween-20) conteniendo 5% de leche descremada y deshidratada durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, la membrana se incubó con la dilución apropiada de anticuerpo primario (específico para la detección de la proteína de interés y preparado en TBS-T 0,1% conteniendo 1-5% de leche ó BSA) durante toda la noche a 4°C. Luego la membrana fue lavada con TBS-T 0,1% para eliminar el exceso de anticuerpo primario, y luego fueron incubadas con la dilución apropiada de anticuerpo secundario (anti globulina de la especie animal

correspondiente al anticuerpo primario usado) conjugado a peroxidasa (preparado en TBST 0,1% conteniendo 1-5% de leche descremada) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana fue lavada con TBS-T 0,1% para eliminar el exceso de anticuerpo secundario y finalmente se incubó con un kit comercial de electroquimioluminiscencia (ECL) y expuestas a placas radiográficas Kodak BioMax Light film para visualizar las proteínas de interés. Las bandas obtenidas fueron digitalizadas y se cuantificaron usando el programa ImageJ v1.52a. Los datos fueron volcados a planillas de Excel para la construcción de los gráficos correspondientes.

4. RESULTADOS

4.1. WESTERN – BLOT

Efectos de *Bacillus subtilis* sobre la expresión proteica de un marcador de membrana correspondiente al fenotipo stem-cell.

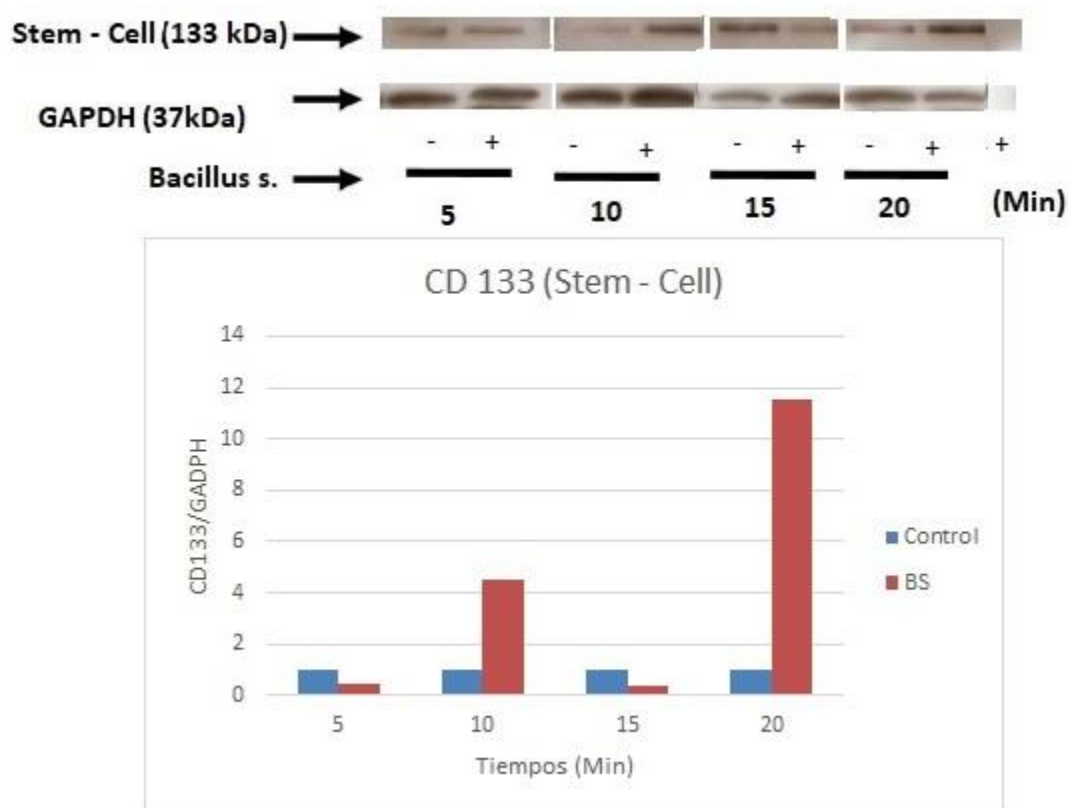


Figura 1. *Bacillus subtilis* induce el comportamiento celular en HCT-116 correspondiente al programa fenotípico tipo stem-cell.

Efecto de *Bacillus subtilis* sobre la fosforilación de las quinasas ERK 1/2.

El tratamiento de las células tumorales con *Bacillus subtilis* a tiempos cortos demostró que en las mismas parece dispararse un mecanismo de supervivencia evidenciado por un aumento en la fosforilación de ERK 1/2.

Se puede observar además que la última calle, correspondiente al lisado bacteriano no dio ningún resultado puesto que la vía ERK 1/2 es exclusiva de células eucariotas y levaduras (Buscà *et al*, 2016).

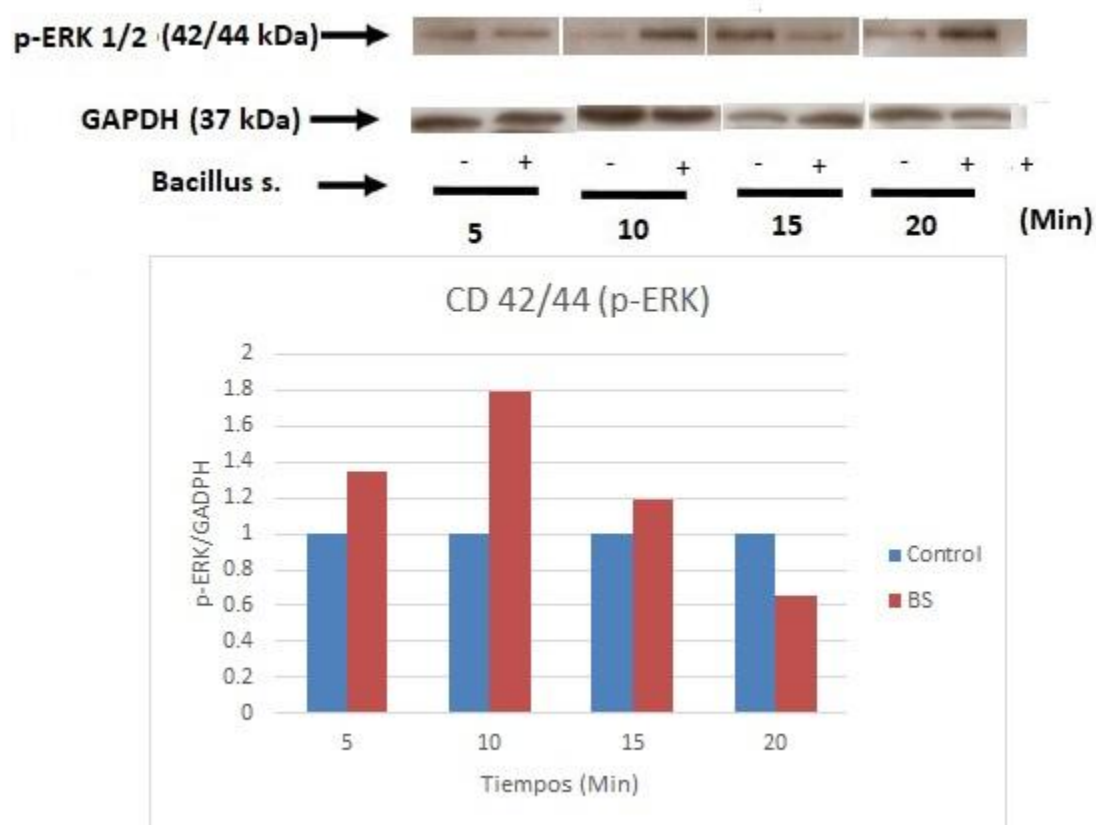


Figura 2. *Bacillus subtilis* induce la fosforilación de ERK 1/2 en las células tumorales HCT-116.

4.2. ÍNDICE DE EXPRESIÓN

Efecto de probióticos sobre la expresión de ERK 1/2 en tumores inducidos en ratas mediante el tratamiento con DMH.

Grupo		Índice de Expresión
DMH	Citoplasma	8
	Núcleo	8
DMH + Probióticos	Citoplasma	4
	Núcleo	3

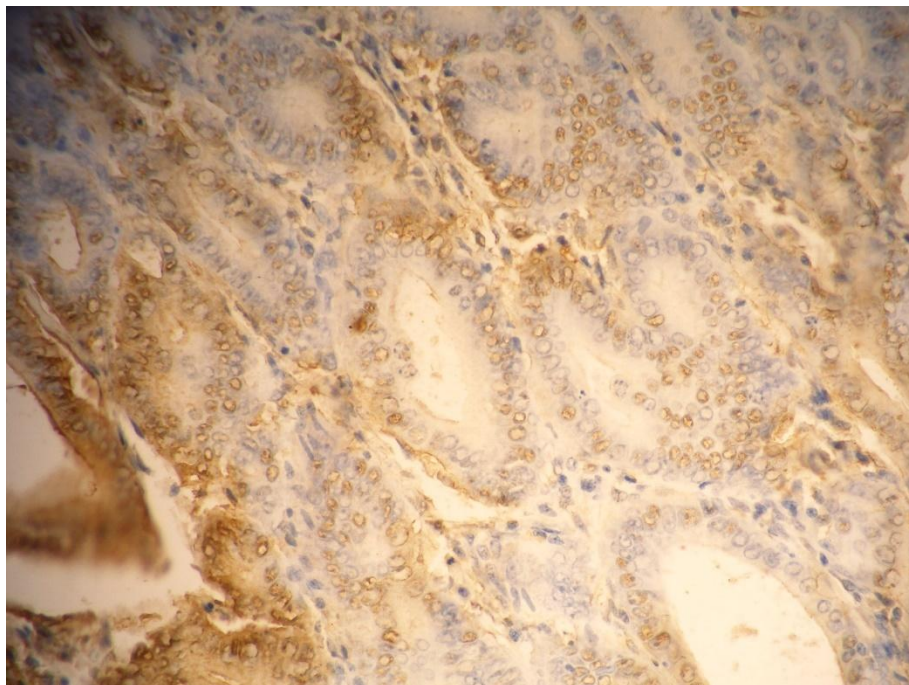


Figura 3. Control al que se le suministró únicamente DMH.

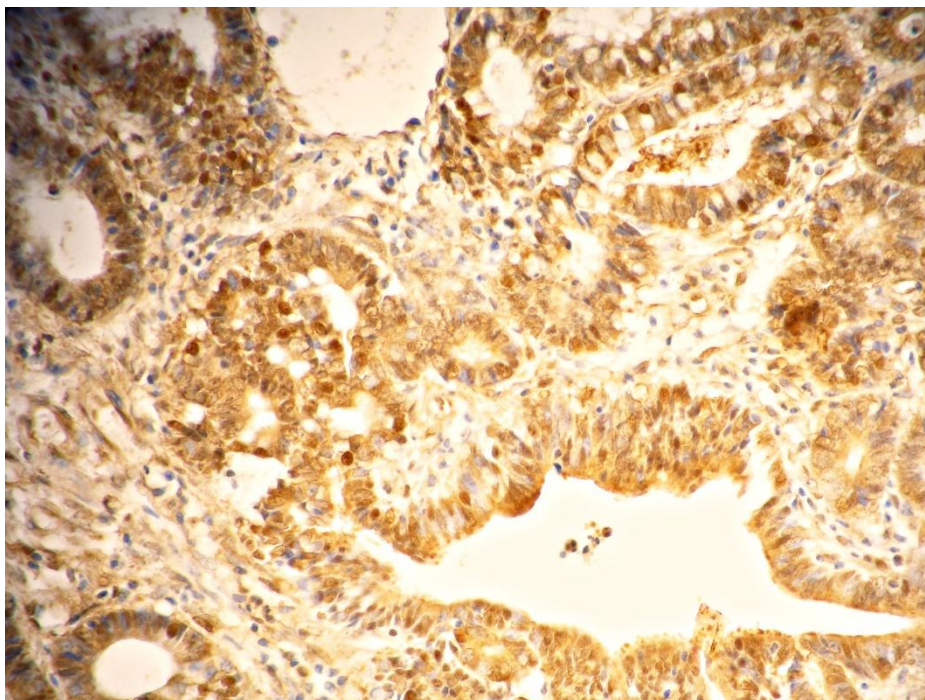


Figura 4. Tratamiento al que se le suministró DMH + Probióticos.

Efecto de probióticos sobre la expresión del marcador de angiogénesis CD31 en tumores inducidos en ratas mediante el tratamiento con DMH.

Grupo		Índice de Expresión
DMH	Citoplasma	0
	Núcleo	0
DMH + Probióticos	Citoplasma	0
	Núcleo	0

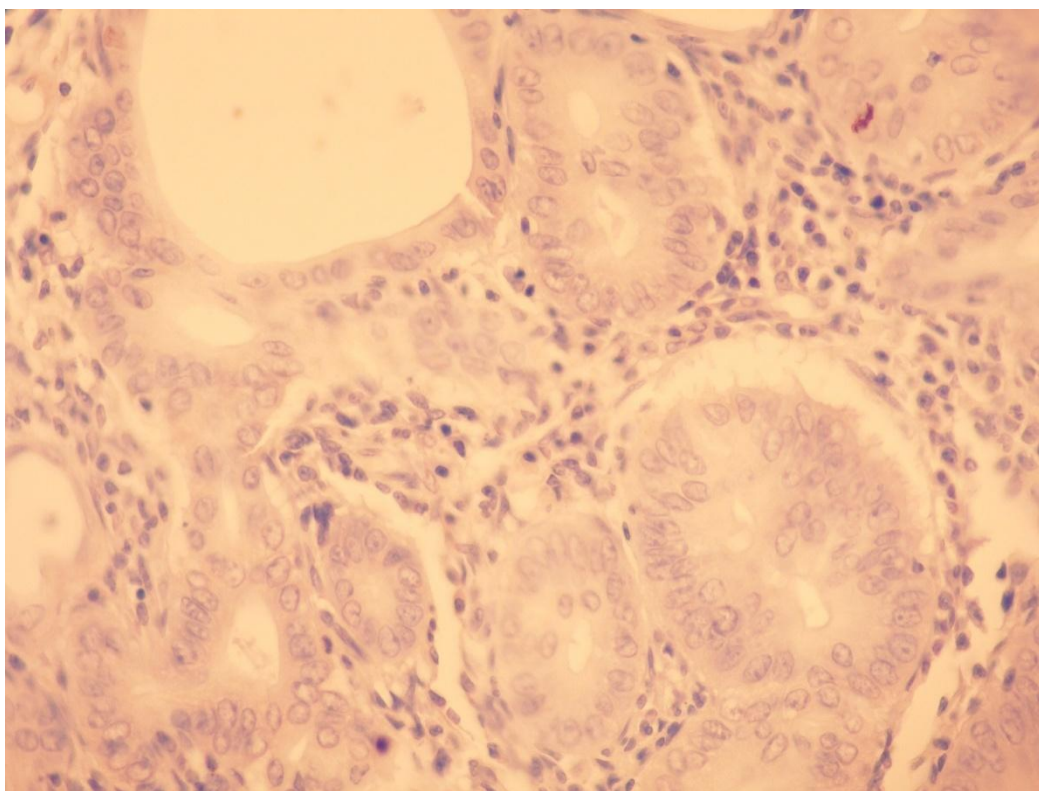


Figura 5.Control al que se le suministró únicamente DMH.

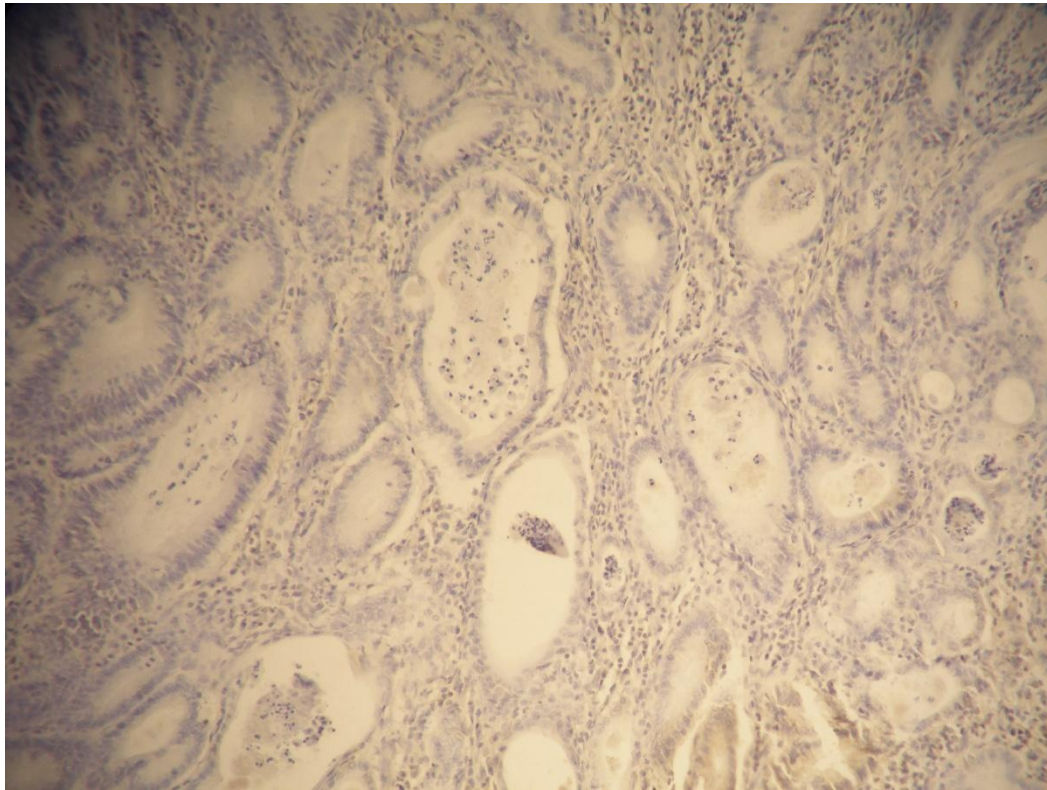


Figura 6. Tratado al que se le suministró DMH + Probióticos.

Se muestra una imagen de un tumor de cáncer colorrectal proveniente de una rata tratada con 1,2 Dimetilhidrazina (DMH) (agente cancerígeno) + Probióticos. Se observa una gran marcación de ERK 1/2 MAPK en el núcleo y en el citoplasma de las células tumorales reflejado por el valor del índice de expresión obtenido. Se sabe que las ERK una vez activadas pueden translocar al núcleo para fosforilar sustratos nucleares.

En la imagen tomada de un tumor proveniente de una rata que fue tratada únicamente con DMH la marcación de ERK 1/2 no es tan intensa con respecto al tratamiento.

Ambas muestras derivan de un estudio de Tesis Doctoral de la Dra. Gigola que demostró la acción de los probióticos en el retardo del crecimiento tumoral inducido por DMH y los resultados mostrados en las fotos indican que los probióticos aumentan la expresión y además activan las ERK 1/2; probablemente estas MAPKS estén mediando eventos tales como apoptosis y/o inhibición de la progresión del ciclo celular. Tradicionalmente la vía ERK 1/2 se ha asociado a eventos de proliferación y diferenciación, así como de supervivencia celular; sin embargo, algunos estudios han demostrado que la vía ERK 1/2 podría estar también asociada a procesos apoptóticos inducido por ciertos probióticos (Sakatani *et al*, 2016).

En tratamiento y control los resultados del índice de expresión para el marcador de angiogénesis CD31 son nulos.

5. DISCUSIÓN

A tiempos cortos las células parecen disparar un mecanismo de supervivencia que puede observarse por un aumento en la fosforilación de ERK 1/2, teniendo en cuenta que esta vía está implicada en mecanismos de proliferación y supervivencia celular. Por otro lado, SaimaShakilMaliket *al* encontraron en sus estudios que la cepa de *Bacillus subtilis* induce efectivamente un mecanismo de apoptosis celular debido a la producción de un compuesto denominado surfactina (Malik et al., 2018). En la **figura 1** se pueden observar

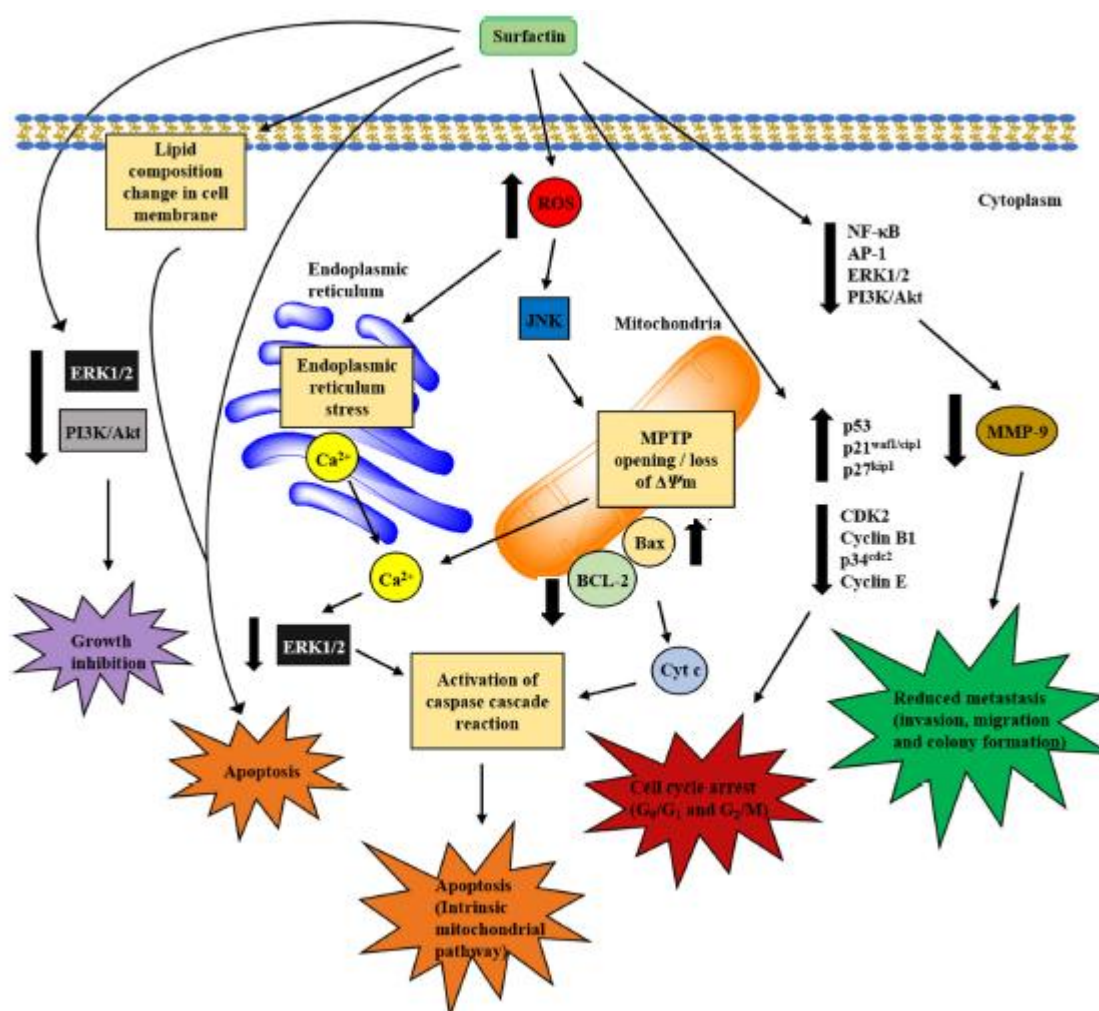


Figura1. Mecanismos propuestos de la actividad in vitro de la surfactina.

varios de los mecanismos propuestos mediante los cuales actuaría dicho compuesto entre los cuales no solo se observa la inducción de la apoptosis sino además la interrupción del ciclo celular y efectos antiproliferativos (Wu et al., 2017).

Teniendo él cuenta el resultado obtenido in vivo en los modelos de rata Wistar en donde se observó que el tratamiento con probióticos resultaron en un aumento de la expresión proteica de ERK 1/2 quedaría por demostrar si el aumento de la expresión proteica de esta quinasa también aumenta en el modelo In Vitro a tiempos cortos en las HCT-116.

En el Western Blot se observa que la última calle que se correspondía con el lisado obtenido a partir de *Bacillus subtilis* no se detectó p-ERK lo cual se condice con la bibliografía de que dicha vía es exclusiva de eucariotas.

En cuanto al fenotipo stem-cell, teniendo en cuenta que para el estudio de la expresión proteica de un marcador de membrana suelen utilizarse rangos más amplios de tiempo, en los tiempos evaluados aquí se puede observar una oscilación en la expresión de este marcador que podría corresponderse con el comportamiento errático que caracteriza este tipo celular cuando ingresan en un programa fenotípico como es el de stem-cell(Kai *et al*, 2009).

En el Western Blot se observa que la última calle que correspondía con el lisado obtenido a partir de *Bacillus subtilis* no se detectó el marcador stem-cell lo cual se condice con la bibliografía de que dicha vía es exclusiva de eucariotas.

Otro modelo interesante para analizar es el medio en el cual las bacterias están resuspendidas, en particular para el estudio de los factores liberados al medio.

En cuanto al marcador de angiogénesis utilizado en los preparados del modelo in vivo en aquellos preparados provenientes de ratas previamente tratadas únicamente con DMH se observó la expresión de dicho marcador. Por lo tanto, la DMH promovería la vascularización del tumor, pero no su progresión.

En los preparados provenientes de ratas tratadas con DMH + Probióticos no se observó diferencia en la expresión del marcador de angiogénesis en comparación con el control por lo que se podría asumir que el fenotipo celular no tenía un perfil angiogénico.

En ambos modelos la mutación que origina el cáncer se da en el gen RAS, en el codón 12 o 13.

6. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesina sugieren que el tratamiento del cáncer colorrectal con probióticos en el modelo in vivo como in vitro inducen la activación de la vía ERK 1/2 y la fosforilación de ERK 1/2 MAPK respectivamente activando posiblemente alguna vía apoptótica no clásica.

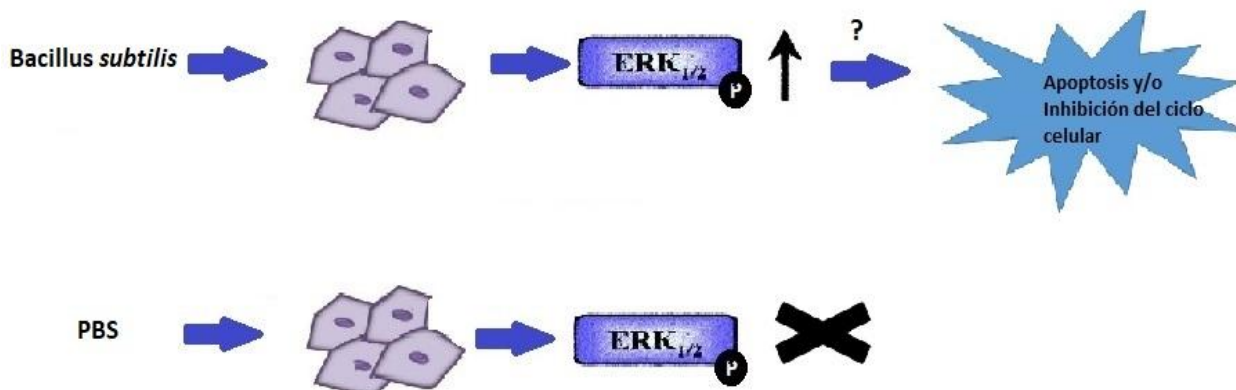


Figura 1. El tratamiento con probióticos en el modelo In Vitro induce un aumento en la fosforilación de ERK 1/2 pudiendo inducir la apoptosis o la inhibición del ciclo celular.

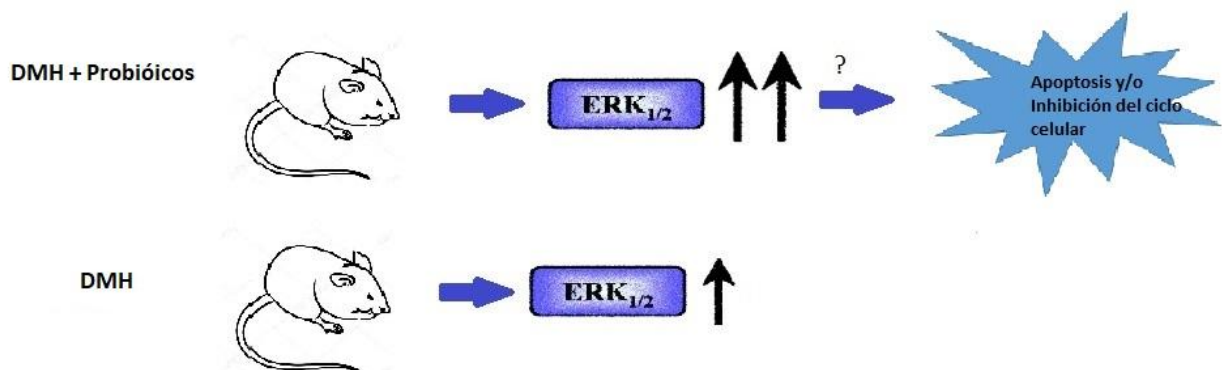


Figura 2. El tratamiento con probióticos en el modelo In Vivo induce un aumento en la expresión de ERK 1/2 pudiendo inducir la apoptosis o inhibición del ciclo celular.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Backer, J. M. (2010). The regulation of class IA PI 3-kinases by inter-subunit interactions. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 346, 87–114. https://doi.org/10.1007/82_2010_52
- Benefiel, A. C., Dong, W. K., & Greenough, W. T. (2005). Mandatory “enriched” housing of laboratory animals: the need for evidence-based evaluation. *ILAR Journal*, 46(2), 95–105. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15775019>
- Boggon, T. J., & Eck, M. J. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*, 23(48), 7918–7927. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208081>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>
- Buscà, R., Pouysségur, J., & Lenormand, P. (2016). ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4(June), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00053>
- Carasi, P., Racedo, S. M., Jacquot, C., Romanin, D. E., Serradell, M. A., & Urdaci, M. C. (2015). Impact of kefir derived *Lactobacillus kefir* on the mucosal immune response and gut microbiota. *Journal of Immunology Research*, 2015, 361604. <https://doi.org/10.1155/2015/361604>
- Castellano, E., & Downward, J. (2011). RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & Cancer*, 2(3), 261–274. <https://doi.org/10.1177/1947601911408079>
- Chen, H., Gao, J., Du, Z., Zhang, X., Yang, F., & Gao, W. (2018). Expression of factors and key components associated with the PI3K signaling pathway in colon cancer. *Oncology Letters*, 15(4), 5465–5472. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8044>
- Chen, Z., Ai, L., Wang, J., Ren, L., Yu, Y., Xu, J., ... Chen, Y. (2015). *Bacillus subtilis* ameliorate intestinal tumorigenesis.
- Cheruku, H. R., Mohamedali, A., Cantor, D. I., Tan, S. H., Nice, E. C., & Baker, M. S. (2015). Transforming growth factor- β , MAPK and Wnt signaling interactions in colorectal cancer. *EuPA Open Proteomics*, 8, 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.euprot.2015.06.004>
- Corthésy, B., Gaskins, H. R., & Mercenier, A. (2007). Cross-Talk between Probiotic Bacteria and the Host Immune System. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 781S–790S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.781S>
- De Rosa, M., Pace, U., Rega, D., Costabile, V., Duraturo, F., Izzo, P., & Delrio, P. (2015). Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncology Reports*, 34(3), 1087–1096. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4108>
- Delcenserie, V., Martel, D., Lamoureux, M., Amiot, J., Boutin, Y., & Roy, D. (2008). Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Current Issues in Molecular Biology*, 10(1–2), 37–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18525105>
- Fearon, E. R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual Review of Pathology*, 6, 479–507. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130235>
- Fruman, D. A., & Rommel, C. (2014). PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature*

- Reviews. Drug Discovery*, 13(2), 140–156. <https://doi.org/10.1038/nrd4204>
- Gao, Y., Moten, A., & Lin, H.-K. (2014). Akt: a new activation mechanism. *Cell Research*, 24(7), 785–786. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.57>
- Hawkins, P. T., & Stephens, L. R. (2015). PI3K signalling in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1851(6), 882–897. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2014.12.006>
- Hutchinson, E., Avery, A., & Vandewoude, S. (2005). Environmental enrichment for laboratory rodents. *ILAR Journal*, 46(2), 148–161. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15775024>
- Irrazábal, T., Belcheva, A., Girardin, S. E., Martin, A., & Philpott, D. J. (2014). The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer. *Molecular Cell*, 54(2), 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.039>
- Kai, K., Nagano, O., Sugihara, E., Arima, Y., Sampetean, O., Ishimoto, T., ... Saya, H. (2009). Maintenance of HCT116 colon cancer cell line conforms to a stochastic model but not a cancer stem cell model. *Cancer Science*, 100(12), 2275–2282. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01318.x>
- Kang, J. (2014). Protein Kinase C (PKC) Isozymes and Cancer. *New Journal of Science*, 2014, 1–36. <https://doi.org/10.1155/2014/231418>
- Keshet, Y., & Seger, R. (2010). The MAP Kinase Signaling Cascades: A System of Hundreds of Components Regulates a Diverse Array of Physiological Functions (pp. 3–38). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-795-2_1
- Koboziev, I., Reinoso Webb, C., Furr, K. L., & Grisham, M. B. (2014). Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. *Free Radical Biology & Medicine*, 68, 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.008>
- Kumar, M., Nagpal, R., Verma, V., Kumar, A., Kaur, N., Hemalatha, R., ... Singh, B. (2013). Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. *Nutrition Reviews*, 71(1), 23–34. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00542.x>
- L. Madsen, K. (2012). Enhancement of Epithelial Barrier Function by Probiotics. *Journal of Epithelial Biology and Pharmacology*, 5(1), 55–59. <https://doi.org/10.2174/1875044301205010055>
- Li, Y., Wei, J., Xu, C., Zhao, Z., & You, T. (2014). Prognostic significance of cyclin D1 expression in colorectal cancer: a meta-analysis of observational studies. *PloS One*, 9(4), e94508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094508>
- Lieu, C., & Kopetz, S. (2010). The SRC family of protein tyrosine kinases: a new and promising target for colorectal cancer therapy. *Clinical Colorectal Cancer*, 9(2), 89–94. <https://doi.org/10.3816/CCC.2010.n.012>
- Luna-Ulloa, L. B., Hernández-Maqueda, J. G., Castañeda-Patlán, M. C., & Robles-Flores, M. (2011). Protein kinase C in Wnt signaling: implications in cancer initiation and progression. *IUBMB Life*, 63(10), 915–921. <https://doi.org/10.1002/iub.559>
- Malik, S. S., Saeed, A., Baig, M., Asif, N., Masood, N., & Yasmin, A. (2018). Anticarcinogenicity of microbiota and probiotics in breast cancer. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 655–666. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1448994>
- Mantilla, C., Mellado, I. S., Jaramillo, A. D., & Navas, M.-C. N. (2015). Mecanismos de señalización por β -catenina y su papel en la carcinogénesis. *CES Medicina*, 29(1), 128. Retrieved from

<http://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/view/109%5Cnhttp://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/download/109/2394>

- Mocellin, S., Baretta, Z., Roqué I Figuls, M., Solà, I., Martin-Richard, M., Hallum, S., & Bonfill Cosp, X. (2017). Second-line systemic therapy for metastatic colorectal cancer. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1, CD006875. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006875.pub3>
- Nowak, A., Śliżewska, K., Błasiak, J., & Libudzisz, Z. (2014). The influence of *Lactobacillus casei* DN 114 001 on the activity of faecal enzymes and genotoxicity of faecal water in the presence of heterocyclic aromatic amines. *Anaerobe*, 30, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.09.014>
- Ohigashi, S., Sudo, K., Kobayashi, D., Takahashi, O., Takahashi, T., Asahara, T., ... Onodera, H. (2013). Changes of the intestinal microbiota, short chain fatty acids, and fecal pH in patients with colorectal cancer. *Digestive Diseases and Sciences*, 58(6), 1717–1726. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2526-4>
- Ohland, C. L., & Macnaughton, W. K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(6), G807-19. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00243.2009>
- Okada, M. (2012). Regulation of the Src Family Kinases by Csk. *International Journal of Biological Sciences*, 8(10), 1385–1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.5141>
- Osaki, M., Oshimura, M., & Ito, H. (2004). PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, 9(6), 667–676. <https://doi.org/10.1023/B:APPT.0000045801.15585.dd>
- Pandurangan, A. K. (2013). Potential targets for prevention of colorectal cancer: a focus on PI3K/Akt/mTOR and Wnt pathways. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 14(4), 2201–2205. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23725112>
- Peng, H., Dara, L., Li, T. W. H., Zheng, Y., Yang, H., Tomasi, M. L., ... Lu, S. C. (2013). MAT2B-GIT1 interplay activates MEK1/ERK 1 and 2 to induce growth in human liver and colon cancer. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 57(6), 2299–2313. <https://doi.org/10.1002/hep.26258>
- Rajagopala, S. V., Vashee, S., Oldfield, L. M., Suzuki, Y., Venter, J. C., Telenti, A., & Nelson, K. E. (2017). The human microbiome and cancer. *Cancer Prevention Research*, 10(4), 226–234. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-16-0249>
- Sakatani, A., Fujiya, M., Ueno, N., Kashima, S., Sasajima, J., Moriichi, K., ... Kohgo, Y. (2016). Polyphosphate derived from *Lactobacillus brevis* inhibits colon cancer progression through induction of cell apoptosis. *Anticancer Research*, 36(2), 591–598.
- Sen, B., & Johnson, F. M. (2011). Regulation of SRC family kinases in human cancers. *Journal of Signal Transduction*, 2011, 865819. <https://doi.org/10.1155/2011/865819>
- Serban, D. E. (2014). Gastrointestinal cancers: influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer Letters*, 345(2), 258–270. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.08.013>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>
- Smith, A. L., & Corrow, D. J. (2005). Modifications to husbandry and housing conditions of laboratory rodents for improved well-being. *ILAR Journal*, 46(2), 140–147. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15775023>

- Steinberg, S. F. (2012). Cardiac actions of protein kinase C isoforms. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 27(3), 130–139. <https://doi.org/10.1152/physiol.00009.2012>
- Tariq, K., & Ghias, K. (2016). Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biology & Medicine*, 13(1), 120–135. <https://doi.org/10.28092/j.issn.2095-3941.2015.0103>
- Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M., & Vidal, A. (2007). Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 13(20), 2826–2832. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17569118>
- Thirabunyanon, M., Boonprasom, P., & Niamsup, P. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnology Letters*, 31(4), 571–576. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9902-3>
- Thorpe, L. M., Yuzugullu, H., & Zhao, J. J. (2015). PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature Reviews. Cancer*, 15(1), 7–24. <https://doi.org/10.1038/nrc3860>
- Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J. R., & Dutilh, B. E. (2012). A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(8), 575–582. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2819>
- Valenta, T., Hausmann, G., & Basler, K. (2012). The many faces and functions of β -catenin. *The EMBO Journal*, 31(12), 2714–2736. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.150>
- Vanhaesebroeck, B., Stephens, L., & Hawkins, P. (2012). PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(3), 195–203. <https://doi.org/10.1038/nrm3290>
- Verheyen, E. M., & Gottardi, C. J. (2010). Regulation of Wnt/beta-catenin signaling by protein kinases. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 239(1), 34–44. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22019>
- Vipperla, K., & O'Keefe, S. J. (2012). The microbiota and its metabolites in colonic mucosal health and cancer risk. *Nutrition in Clinical Practice : Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 27(5), 624–635. <https://doi.org/10.1177/0884533612452012>
- Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., & Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 9(7), 489–499. <https://doi.org/10.1038/nrc2645>
- Wan, Y., Xin, Y., Zhang, C., Wu, D., Ding, D., Tang, L., ... Li, W. (2014). Fermentation supernatants of *Lactobacillus delbrueckii* inhibit growth of human colon cancer cells and induce apoptosis through a caspase 3-dependent pathway. *Oncology Letters*, 7(5), 1738–1742. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.1959>
- Weir, T. L., Manter, D. K., Sheflin, A. M., Barnett, B. A., Heuberger, A. L., & Ryan, E. P. (2013). Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults. *PLoS One*, 8(8), e70803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070803>
- Wu, Y. S., Ngai, S. C., Goh, B. H., Chan, K. G., Lee, L. H., & Chuah, L. H. (2017). Anticancer activities of surfactin potential application of nanotechnology assisted surfactin delivery. *Frontiers in*

- Pharmacology*, 8(OCT), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00761>
- Yan, F., & Polk, D. B. (2011). Probiotics and immune health. *Current Opinion in Gastroenterology*, 27(6), 496–501. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32834baa4d>
- Yeaman, T. J. (2004). A renaissance for SRC. *Nature Reviews. Cancer*, 4(6), 470–480. <https://doi.org/10.1038/nrc1366>
- Young, M. A., Gonfloni, S., Superti-Furga, G., Roux, B., & Kuriyan, J. (2001). Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. *Cell*, 105(1), 115–126. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11301007>
- Yu, Y.-N., & Fang, J.-Y. (2015). Gut Microbiota and Colorectal Cancer. *Gastrointestinal Tumors*, 2(1), 26–32. <https://doi.org/10.1159/000380892>
- Yuan, T. L., & Cantley, L. C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27(41), 5497–5510. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.245>
- Zhang, X., Kang, Y., Xie, Z., Su, J., & Kong, X. (2016). Oral administration of *Lactobacillus acidophilus* strain SW1 suppresses tumor necrosis factor (TNF) -alpha and increases transforming growth factor (TGF) -beta in mice, 9(12), 23461–23466.
- Zhu, J., Zhu, C., Ge, S., Zhang, M., Jiang, L., Cui, J., & Ren, F. (2014). *Lactobacillus salivarius* Ren prevent the early colorectal carcinogenesis in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model. *Journal of Applied Microbiology*, 117(1), 208–216. <https://doi.org/10.1111/jam.12499>