

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO* DE FACTORES EXTRACELULARES DE *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum* SOBRE LÍNEA CELULAR HT-29 DE CÁNCER DE COLON HUMANO

Mendoza Flores P.^{*a}, Barrón González M.P.^a, Monreal Cuevas E.^b, Morales Vallarta M.R.^a, Taméz Guerra P.^b, Morales Rubio M.F.^a, Gómez Flores R.^b.

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, ^aDepartamento de Biología Celular y Genética. ^bUnidad de Formulación de Biológicos y Acarreadores de Drogas. Ciudad Universitaria, C.P. 66451, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

*priss_lca@hotmail.com

RESUMEN

Los probióticos son organismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas ejercen un efecto benéfico para la salud del huésped. Se ha demostrado que varias cepas probióticas ejercen efectos benéficos tanto en la microbiota endógena como en el epitelio y el sistema inmune intestinal. Como microorganismos probióticos se utilizan los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Hay datos que indican que los probióticos pueden impedir o retrasar la aparición de ciertos tipos de cáncer. Varios trabajos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que probióticos detoxifican y tienen propiedad antimutagénica. Se ha demostrado en algunos trabajos *in vitro* que los factores extracelulares han presentado actividad biológica sobre protozoarios y bacterias de importancia médica, es por esto que en este trabajo se obtuvieron factores extracelulares de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum* para determinar la actividad biológica sobre la línea tumoral HT-29. Con los factores extracelulares, a diferentes dosis, se observó una marcada inhibición del crecimiento de HT-29, siendo las mejores concentraciones las de 13mg/mL y 26mg/mL. Se concluye que los factores extracelulares si inhiben el crecimiento de HT-29 y esto puede generar más experimentos *in vitro* e *in vivo* para demostrar la actividad antagonista de probióticos en células de cáncer.

ABSTRACT

Probiotics are living organisms which when administered in adequate amounts to exert a beneficial effect on the health of the host. Has been shown to exert several beneficial probiotic strains both endogenous microbiota as epithelium and intestinal immune system. As used probiotic microorganisms *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. There is evidence that probiotics can prevent or delay the onset of certain cancers. Various works *in vivo* and *in vitro* have shown that probiotics are detoxified and antimutagenic property. It has been shown in some studies *in vitro* that extracellular factors have displayed activities of protozoa and bacteria of medical importance, which is why in this work were obtained from *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* extracellular factors to determine the biological activity on tumor cell line HT-29. With extracellular factors, at different doses, there was a marked inhibition of the growth of HT-29 being the best concentration of 13mg/mL and 26mg/m. We conclude that if extracellular factors inhibit the growth of HT-29 and this can generate more experiments *in vitro* and *in vivo* to demonstrate the antagonist activity of probiotics in cancer cells.

Palabras clave: Probióticos, factores extracelulares, HT-29.

Área: Microbiología y biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Los probióticos son “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio de salud al huésped” (FAO/OMS, 2002). Como microorganismos probióticos se utilizan principalmente las bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque no exclusivamente.

Varios trabajos han demostrado que los probióticos estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo, son también conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos y se utilizan para prevenir infecciones entéricas y gastrointestinales, así como también se ha reportado propiedades antimutagénicas y efecto benéfico en tratamiento de cáncer colorrectal en modelo murino (Wollowski *et al.*, 2001; Fotiadis *et al.*, 2008; Gupta y Garg, 2009; Patel y Patel, 2010).

Por otra parte, el cáncer de colon y recto puede aparecer en cualquier persona (sobre todo a partir de los 40 años), pero es más frecuente a partir de los 60 años. En el mundo el cáncer colorrectal ocupa el cuarto lugar con 608,000 defunciones (OMS, 2008).

Brady *et al.* (2000); recogen un total de 24 observaciones sobre probióticos y tumores de colon, que describen la reducción por derivados lácteos fermentados por bacterias del ácido láctico, de la tumorigénesis experimentalmente inducida en ratas.

Baricault *et al.* (1995), estudiaron el efecto de diferentes leches fermentadas usando la línea celular Caco-9. Encontraron que 10-50% de las células demostraron una disminución en el crecimiento.

Kulkarni y Reddy (1994), han reportado una inhibición en formación de FCA en 50% en ratas con una alimentación con *Bifidobacterium longum*. Challa *et al.* (1997), observó una reducción del 23% en total colonización de FCA y 28% en total AC en ratas con una dieta que contenía 0.5% de *Bifidobacterium longum* (1×10^8 células viables/g de alimento).

Se ha reportado la actividad inhibitoria de los factores extracelulares de varios probióticos sobre cultivos axénicos *in vitro* de parásitos, así como en bacterias enteropatógenas. Estos resultados brindan la posibilidad de realizar experimentos empleando únicamente los metabolitos producto de los probióticos. El objetivo de este trabajo fue emplear los factores extracelulares de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum*, y evaluar la actividad *in vitro* que ejercen éstos en la línea celular HT-29.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico:

Bifidobacterium longum

Lactobacillus acidophilus.

Línea celular HT-29.

Obtención y liofilización de factores extracelulares.

Las cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum* se reactivaron con medio MPT-caldo, el cual se preparó de acuerdo a las indicaciones mencionadas por Barrón *et al.*, 2008. Se realizó una cinética de crecimiento con el método turbidimétrico.

Para la obtención y liofilización de los factores extracelulares, se inoculó 1% de cultivo de los probióticos en un litro de medio caldo a 37°C por 48h. Se centrifugó a 2500 rpm por 10 min, se separó el sobrenadante y se esterilizó con filtros Millipore de 0.22 µm. Posteriormente los factores extracelulares se llevaron a un liofilizador Labconco.

Valoraciones de actividad citotóxica.

Las células HT-29 de cáncer de colon humano que se encuentren en crecimiento exponencial, con un 90% de confluencia, se trataron con una solución de tripsina 0.025%-EDTA 0.03% durante 5 minutos a 37°C, para obtener una suspensión celular que se contará en cámara de Neubauer, empleando el método de exclusión del colorante azul de trypan. Se inocularon 5×10^4 células de cáncer de colon humano en placas de 96 pozos con fondo plano. Las placas se preincubaron por 24 h a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ y 95% de aire, por 24 h, para permitir adherencia de las células en los pozos. Se realizaron diluciones seriadas 1:2 de la solución madre del liofilizado de factores extracelulares sobre las placas de 96 pozo de fondo plano, ajustando un volumen de 100 µL, incubando por un periodo de 48 h a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ y 95% de aire. Además, se dejaron pozos con células más medio de cultivo, como control positivo de crecimiento, como control negativo de crecimiento se colocó Doxorubicina HCl y pozos sin células, pero con tratamiento como blancos.

Para evaluar el efecto citotóxico del compuesto, se empleó el método fluorométrico indirecto de reducción del MTT.

Análisis estadístico.

Se realizó un análisis estadístico ANOVA $P < 0.05$ y un análisis de concentración inhibitoria media (CI₅₀).

RESULTADOS

La figura 1 muestra los resultados de la valoración citotóxica de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum*:

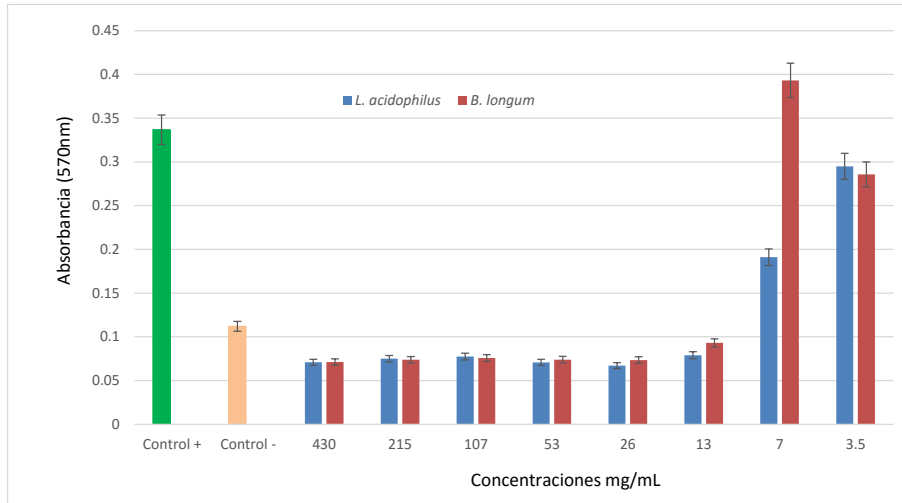


Figura 1. Actividad biológica de los factores extracelulares de *L. acidophilus* y *B. longum* a diferentes concentraciones.

En la figura 1, las concentraciones de *L. acidophilus*, las diluciones de 430 mg/mL a 7mg/mL tuvieron una marcada inhibición del crecimiento y no tuvieron diferencia significativa. La concentración de 3.5 mg/mL obtuvo diferencia estadística. En el caso de *B. longum*, las concentraciones de 430mg/mL a 13 mg/mL son semejantes y las de 7mg/mL y 3.5mg/mL tienen diferencia significativa entre ellas mismas y con las demás diluciones.

Entre ambas cepas si hubo diferencia significativa, y también se puede observar la diferencia con el grupo control positivo de proliferación de HT-29; asimismo, las concentraciones de 430 a 13mg/mL tuvieron una inhibición mayor en comparación al control negativo de proliferación, con ambos controles hubo diferencia significativa.

Las siguientes figuras muestran a la línea celular HT-29 antes y después del bioensayo donde se muestra su marcada inhibición de crecimiento.

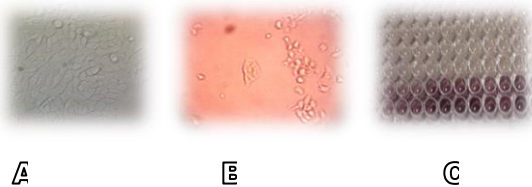


Figura 2. Fotografías de HT-29. **A.** HT-29 antes de bioensayo. **B.** HT-29 después de bioensayo. **C.** Placa de 96 pozos después de bioensayo.

Los factores extracelulares de *L. acidophilus* tienen una inhibición de crecimiento de HT-29 del 68.5%, y para *B. longum* es del 61.2%. Este resultado concuerda con Baricault *et al.* (1995), ya que encontraron que 10-50% de las células Caco-9 demostraron una disminución en el crecimiento al experimentar con *L. acidophilus*.

Kulkarni y Reddy (1994), reportaron una inhibición en formación de cripta aberrante en 50% en ratas con una alimentación con *B. longum*. Una investigación similar por Challa *et al.* (1997), observó una reducción del 23% en total colonización de FCA y 28% en total AC(cripta aberrante) en ratas con una dieta que contenía 0.5% de *Bifidobacterium longum* (1×10^8 células viables/g de alimento). Éstos reportes concuerdan con el resultado obtenido con los factores extracelulares de *B. longum*.

CONCLUSIONES:

* Los factores extracelulares de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum* inhiben el crecimiento de la línea celular de cáncer de colon humano HT-29.

* De acuerdo a este resultado se puede realizar a futuro una experimentación *in vivo* para determinar el efecto antagonista de los factores extracelulares de *L. acidophilus* y *B. longum*.

BIBLIOGRAFÍA

- Baricault L, Denariáz G, Hourí JJ, Bouley C, Sapin C, Trugnan G, 1995. Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation. *Carcinogenesis*, 16: 245-252. E-ISSN: 19487886.
- Barrón-González, M.P., Serrano Vázquez G.C., Villareal-Treviño L., Verduzco Martínez J.A., Morales Vallarta M.R., Mata Cárdenas B.D. 2008. Inhibición del crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* por acción de probióticos. *Ciencias UANL* 11:235-290.
- Brady, L.J., D.D.Gallagher y F.F. Busta. 2000. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *Journal of Nutrition* 130:410-414.
- Challa A, Rao DR, Chawan CB, Shackelford L, 1997. *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, 18: 517-521.
- Fotiadis CI, Stoidis CN, Spyropoulos BG, Zografos ED, 2008. Role of probiotics, prebiotics and symbiotic in chemoprevention for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 14(42): 6453-6457.
- Gupta V, Garg R, 2009. Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27: 202-209.
- Kulkarni N, Reddy BS, 1994. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane induced aberrant crypt foci formation and faecal bacterial β -glucuronidase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 207: 278283.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/ Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS). Consulta de Expertos sobre Evaluación de las Propiedades Saludables Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico, 1-4 de octubre de 2001.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2008. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Patel KP, Patel VJ, 2010. Probiotics, prebiotics and synbiotics. Disponible en: [<http://www.nhlmmcgym.com/indian-journal15.htm>]
- Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL, 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *American Journal*.