

María Alfaro Larraya

Efecto de los probióticos *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus gasseri*
sobre las acciones de la quercetina en cultivos celulares de cáncer de colon



Universidad Pública de Navarra
Departamento de Ciencias del Medio Natural

Memoria presentada por Dña. María Alfaro Larraya para optar al grado de Doctor por la
Universidad Pública de Navarra.

Pamplona, Octubre de 2013

Fdo. Doña María Alfaro Larraya

Don Florencio Marzo Pérez, Catedrático de Universidad en el área de Zoología (Biología, Fisiología y Nutrición Animal) de la Universidad Pública de Navarra y Don Ignacio José Encío Martínez, Profesor Titular de Universidad en el área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Pública de Navarra,

Hacen constar:

que Dña. María Alfaro Larraya, Licenciada en Biología por la Universidad de Navarra, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva como título “Efecto de los probióticos *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus gasseri* sobre las acciones de la quercetina en cultivos celulares de cáncer de colon” en los Departamentos de Ciencias del Medio Natural y Ciencias de la Salud de la Universidad Pública de Navarra. Revisada la presente memoria, expresan su autorización para la presentación de la misma y que sea sometida a defensa ante el Tribunal correspondiente para optar al grado de doctor.

En Pamplona, a 25 de Octubre de 2013

Dr. D. Florencio Marzo Pérez

Dr. D. Ignacio José Encío Martínez

Financiación:

La realización de esta Tesis se ha llevado a cabo en el Laboratorio de biología, fisiología y nutrición animal de la Universidad Pública de Navarra en el marco del proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia, “MODULACION NUTRICIONAL DEL CANCER DE COLON MEDIANTE UNA BEBIDA LACTEA ENRIQUECIDA CON UN SIMBIOTICO” (AGL2006-10296-C02-01). Durante la realización de este trabajo Dña. María Alfaro Larraya ha disfrutado de una Beca para la Formación de Tecnólogos del Departamento de Innovación, Empresa y Empleo del Gobierno de Navarra y un Contrato de Ayudante en la Universidad Pública de Navarra.

Bueno, ha llegado el momento después de todos estos años de dar las *GRACIAS*. Aunque a muchos de vosotros ya os he dicho lo mucho que me habéis ayudado a lo largo de este tiempo.

En primer lugar, dar las gracias a la Universidad Pública de Navarra y al Departamento de Ciencias del Medio Natural, por permitirme realizar esta Tesis y en especial al Dr. Florencio Marzo porque realmente me dio la oportunidad de comenzar un camino en el mundo de la investigación en algo que el llamaba “probióticos” y “flavonoides” y que yo muy atentamente escuchaba. Esto fue hace ya 7 años, parece mentira, ¿verdad?. Siempre estaré agradecida al Dr. Florencio Marzo por confiar en mi, gracias.

A todos mis compañeros que compartieron el inicio en el camino de la investigación: Patri, Jaio e Iván. Bueno que voy a decir de vosotr@s; “mami jaio” realmente fuiste la primera persona en enseñarme a como moverme en un laboratorio, así que muchas gracias. Patri, hay patri, patri, cuantas horas de laboratorio y cervecitas hemos compartido juntas y realmente comprobé que en los momentos difíciles también estabas ahí, que no eras una simple compañera de trabajo, gracias. Uffff Iván, llega tu momento, bueno, aunque en muchas situaciones somos como el perro y el gato, realmente has sido mi apoyo, mi ayuda en muchísimos momentos y a lo largo de estos años he conseguido sacarte de tu “mundo paralelo”, aunque fuese por unos día y pudimos disfrutar de dos congresos maravillosos, que siempre se quedarán en mi recuerdo, gracias.

Al departamento de Ciencias de la Salud y en especial al Dr. Ignacio Encio, por su apoyo, su comprensión y porque cuando llamaba a tu puerta siempre estaba dispuesto a ayudarme, gracias.

Chic@s de Ciencias de la Salud; bueno, voy a empezar por partes, porque realmente sois una parte muy importante de mi vida tanto dentro como fuera del labo. Todo comenzó un día que el Dr. Florencio Marzo me comentó que llamase a un número de teléfono y que me pusiese en contacto con un tal Jon Celay, ahí estaba yo con un post-it con el número de teléfono y poco más. La verdad no apostaba mucho por él, pero todo cambió desde el momento que descolgué ese teléfono. Gracias Jon, porque creo que no eres consciente de todo lo que me has ayudado. Yo venía de un mundo de ratoncillos y eso de cultivos celulares, Citometría.... no tenía ni idea y la verdad, me sorprendiste mucho, ya que siempre estabas dispuesto ayudarme con una sonrisa, gracias. Como he comentado todo cambió a partir de esa llamada, empecé a conocer a un montón de gente. Mis rubias, Idoia y Mirja mis chicas de risas, lloros, juergas...gracias por estar ahí. Irantzu S, M^a José, Ronces, Ainara, Irantzu L, Esther y Dani gracias por vuestro apoyo y como

no, por alegrar esas veladas tan divertidas que hemos pasado y espero que el día que esto termine lo celebremos por todo lo alto. Bueno, espero no tener que apuntaros en la “lista negra”.

Nerea, aunque has sido una de las últimas en llegar a mi vida, no por eso eres menos importante, “mi diseñadora gráfica”, gracias por tu ayuda y apoyo.

Teacher Manu, gracias por aguantarme, porque realmente sé que en algunos momentos me hubieras matado, pero aun así, ahí estabas cada semana para ayudarme con el inglés, gracias.

A mis amigas y primos: Josune, María, Gabri, mis amigas de Arguedas, Rosa, Sandra, gracias por estar ahí por darme vuestro apoyo durante todos estos años y espero que sigáis. Rizos, Primo, gracias por compartir conmigo momentos tan especiales.

A mi abuela, por sus rezos y apoyo.

Hermana, que te voy a decir, que desde los 6 años estás formando parte de mi vida, y aunque en muchos momentos no te lo exprese, eres mis preocupaciones, mis alegrías, mi compañera de cañitas. Que eres todo para mí y espero que sigas siéndolo SIEMPRE, gracias.

Por último a mis padres, que por supuesto SIN ELLOS nada de esto hubiera sido posible, gracias por apoyarme en TODO, tanto en los momentos buenos como malos, tanto cuando tenía razón como cuando no la tenía, porque siempre habéis respetado mis decisiones sin imponerme las vuestras, por todos esos viajes maravillosos que me habéis brindado, en definitiva gracias por compartir conmigo el camino de la vida.

A mis padres
A mi hermana

ABREVIATURAS

AICAR	Activador de la proteína activada por monofosfato de adenina (de <i>5' adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>)
AKT	Proteína quinasa B (<i>Protein Kinase B</i>)
AMPK	Quinasa activa por monofosfato de adenina (de <i>AMP-activated protein kinase</i>)
Apaf1	Factor activador de proteasas apoptóticas 1 (de <i>apoptotic Peptidase Activating Factor 1</i>)
APC	Gen supresor de tumores APC (de <i>Adenomatous polyposis coli</i>)
APN	Aminopeptidasa N (de <i>Aminopeptidase N</i>)
AXIN	Axina
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2 (de <i>Bcl-2-associated X protein</i>)
Bcl-2	Linfoma de células B/leucemia – 2 (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
Bid	Interacción del dominio BH3 agonista de la muerte (de <i>BH3- Interacting Domain Death Agonist</i>)
BSA	Suero bovino fetal
CDKI	Inhibidor de Quinasas dependientes de ciclinas (de <i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>)
CDK	Quinasa dependiente de ciclinas (de <i>Cyclin-Dependant Protein Kinase</i>)
CIP/KIP	(de <i>CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein</i>)
Jun	Oncogen Jun (de <i>Jun oncogene</i>)
COX-2	Ciclooxigenasa 2 (de <i>Cyclooxygenase 2</i>)
CTNNB1	Gen de la beta catenina (de <i>catenin (cadherin-associated protein beta 1)</i>)
DMEM/F12	(de <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>)
DMSO	Dimetil Sulfoxido (de <i>Dimethyl Sulfoxide</i>)
DPPIV	Dipeptidilpeptidasa IV (de <i>Dipeptidilpeptidase IV</i>)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (de <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
Fas-L	Superfamilia TNF miembro 6
FRA 1	Proteína quinasa (de <i>Kinesin-like proteína FRA1</i>)
GLUT	Transportador de glucosa (de <i>glucose transporter</i>)

GSK-3 β	Proteína glucógeno sintasa quinasa 3 (de <i>Glycogen Synthase kinase β</i>)
K-RAS	Proteína Ras (de <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>)
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógenos (de <i>Mitogen-activated protein kinases</i>)
MLH1	Proteína del sistema reparador del DNA (de <i>mutL homolog 1</i>)
MSH2	Proteína del sistema reparador del DNA (de <i>mutS homolog 2</i>)
MSH6	Proteína del sistema reparador del DNA (de <i>mutS homolog 6</i>)
mTOR	Proteína quinasa serina/treonina (de <i>Serine/threonine protein kinase</i>)
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-YI)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
MUC1	Mucina 1 (de <i>mucin 1</i>)
MYC	Protooncogenes (de <i>myelocytomatosis encogen</i>)
NF-KB	Factor nuclear k-B (de <i>Nuclear Factor k-B</i>)
PEPT-1	Transportador de peptidos 1 (de <i>Peptide transporter 1, solute carrier family 15 member 1</i>)
SGLT-1	Cotransportador de sodio y glucose (de <i>Sodium-glucose cotransporter 1</i>)
TNF	Factor de necrosis tumoral (de <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TP53	Gen de la proteína tumoral p53 (de <i>Tumor protein p53</i>)
TRAIL	Ligando de apoptosis inducida por el receptor de TNF (de <i>TNF-related Apoptosis Inducing Ligand</i>)
TSC2	Proteína tuberína (de <i>tuberous sclerosis proteína 2</i>)

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
	3
1. TRACTO GASTROINTESTINAL	3
1.1 Características generales del intestino grueso	4
1.2 Digestión y absorción de hidratos de carbono y proteínas	10
1.3 Patologías asociadas al intestino grueso	11
	12
2. CÁNCER COLORRECTAL	12
2.1 Características generales del cáncer colorrectal	12
2.2 Genética molecular del cáncer colorrectal	14
2.3 Estadificación	16
2.4 Factores de riesgo	16
	17
3. FLAVONOIDES	17
3.1 Estructura química	17
3.2 Tipos de flavonoides	20
3.3 Efectos biológicos	21
3.4 Quercetina	23
	24
4. PROBIÓTICOS	24
4.1 Mecanismos de acción	25
4.1.1 Acciones en procesos infecciosos	26
4.1.2 Acciones en procesos metabólicos	26
4.1.3 Efectos sobre enfermedades inflamatorias intestinales	27
4.1.4 Papel sobre el cáncer colorrectal	27
4.1.5 Acción combinada de los probióticos	28
	29
5. APOPTOSIS	29
5.1 Las caspasas y su función en la apoptosis	31
5.2 Vías de inducción de apoptosis	31
	33
6. CICLO CELULAR	33
6.1 Fases del ciclo	34
6.2 Regulación del ciclo celular	35
6.3 Vía AMPK de proliferación y supervivencia celular	37
	43
OBJETIVOS	43
	49
MATERIAL Y MÉTODOS	49
	49
1. DISEÑO EXPERIMENTAL	49
	50
2. CULTIVO CELULAR DE LÍNEAS HT-29 Y CACO.2	50
2.1 Descripción de líneas celulares de adenocarcinoma de colon	50
2.2 Mantenimiento de los cultivos celulares	51
2.2 Protocolo de subcultivo	52
	52
3. PREPARACIÓN DE LA QUERCETINA Y LOS PROBIÓTICOS EN ESTUDIO	52
3.1 Preparación de la quercetina	52
3.2 Preparación de los probióticos	53

4. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE COLON	53
4.1 Determinación de la actividad sacarasa	55
4.2 Determinación de la actividad aminopeptidasa N y dipeptidilpeptidasa IV	57
5. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR	57
5.1 Determinación de la actividad citotóxica de la quercetina y las cepas probióticas en las líneas celulares HT-29 y Caco.2	59
5.2 Determinación de apoptosis en cultivos celulares	61
5.3 Análisis del efecto del inhibidor de caspasas <i>Z-VAD-FMK</i> sobre la muerte celular inducida por los tratamientos	61
5.4 Análisis de la actividad Caspasa 3	63
6. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR	64
7. CUANTIFICACIÓN Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	65
7.1 Cuantificación de proteínas por el método Bradford	65
7.2 Expresión de proteínas mediante la técnica de Western - blot	66
7.2.1 Determinación de transportadores de membrana PEPT-1 y SGLT-1	66
7.2.2 Determinación de las proteínas p-AMPK α , Bcl-2, Bax, p53 y p21	69
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	73
RESULTADOS	73
1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y TRANSPORTADORES DE MEMBRANA	81
2. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA	86
3. APOPTÓISIS	86
3.1 Determinación de apoptosis	89
3.2 Ensayos de inhibición de apoptosis	91
3.3 Actividad caspasa 3	92
4. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR	97
5. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA APOPTOSIS Y CICLO CELULAR	97
5.1 La quercetina y las cepas probióticas modifican la expresión de Bcl-2 y Bax	102
5.2 La quercetina y las cepas probióticas aumentan la fosforilación de la AMPK	104
5.3 La quercetina y las cepas probióticas aumentan la expresión de p53 y p21	111
DISCUSIÓN	111
1. SINÉRGIA DE LA ACCIÓN DE LA QUERCETINA Y B.BIFIDUM O L.GASSERI SOBRE EL TRANSPORTE DE NUTRIENTES AL INTERIOR DE LA CÉLULA	116
2. MODULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	117
3. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS Y CICLO CELULAR	120
4. ACTIVACIÓN DE AMPK	125
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFIA	

INTRODUCCIÓN

1. TRACTO GASTROINTESTINAL

1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL INTESTINO GRUESO

El intestino grueso es la parte final del tubo digestivo. Se extiende desde el íleon hasta el ano, y tiene una longitud aproximada de 1,5 m. En él se distinguen tres partes: ciego, colon y recto. El ciego normalmente se sitúa en la fosa ilíaca derecha. En el colon, que continua al ciego, se pueden diferenciar cuatro partes: el colon ascendente, que alcanza hasta la cara visceral del hígado, el colon transversal, que se dirige casi transversalmente de derecha a izquierda hasta el extremo inferior del bazo, el colon descendente, que desciende verticalmente hasta la fosa ilíaca izquierda y el colon sigmoide, que discurre describiendo sinuosidades de forma y extensión variable. A continuación del colon sigmoide se dispone el recto, que es el segmento final del tubo digestivo.¹

La función principal de la región inferior del tracto gastrointestinal, es decir la parte perteneciente al colon y recto, es la reabsorción de iones y agua. Las células del epitelio colónico juegan un papel fundamental en este proceso. La pared del colon, está formada por diferentes capas: mucosa, submucosa, muscular, subserosa y serosa. Una de las características que diferencia el epitelio colónico del intestino delgado es la poca representación en este tejido de células enteroendocrinas, su abundancia en células mucosecretoras y la ausencia de células de Paneth que únicamente se pueden localizar en el colon ascendente.²

El epitelio de la mucosa del colon es un epitelio simple formado por un gran número de invaginaciones hacia el interior de la lámina propia, denominadas criptas de *Lieberkühn*. Este epitelio se remueve cada 3-4 días aproximadamente, lo que supone un proceso constante de regeneración de las células que constituyen las criptas. Las células absortivas o enterocíticas son, junto con las células caliciformes, las más abundantes en el epitelio colónico. Están polarizadas y se caracterizan por la presencia en la membrana apical de microvellosidades que forman un borde en cepillo en el que se localizan diferentes hidrolasas (Tabla 1) como la sacarasa-isomaltasa, la lactasa, la aminopeptidasa N, la dipeptidilpeptidasa IV y la fosfatasa alcalina. Estas enzimas son utilizadas con frecuencia como marcadores moleculares propios de este tipo de células.³

Tabla 1. Enzimas intestinales del borde en cepillo. Cuadro adaptado del libro Fisiología Humana, Stuart ira fox, Mc Graw Hill, 2003.

Enzimas intestinales del borde en cepillo unidas a la membrana celular

Disacaridasa	Sacarasa	Digiere la sacarosa a glucosa y fructosa
	Maltasa	Digiere la maltosa a glucosa
	Lactasa	Digiere la lactosa a glucosa y galactosa
Peptidasa	Aminopeptidasa Enteroquinasas	Produce aminoácidos libres Activa la tripsina
Fosfatasa	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , ATPasa Fosfatasa alcalina	Interfieren en la absorción del calcio alimenticio Elimina grupos fosfato de las moléculas orgánicas

1.2 DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO Y PROTEÍNAS

Las enzimas intestinales juegan un papel muy importante en la digestión y absorción de hidratos de carbono y proteínas. El almidón y el glucógeno son los hidratos de carbono complejos que podemos digerir. La amilasa es la enzima encargada de degradar sus largas cadenas de glucosa convirtiéndolas en otras más cortas y en el disacárido maltosa. Los disacáridos de la dieta, incluida la maltosa, son hidrolizados por las disacaridasas del borde en cepillo intestinal (maltasa, sacarasa, y lactasa) (Tabla 1). La glucosa, galactosa y fructosa así producidas son los compuestos finalmente absorbidos en el duodeno y en la parte superior del yeyuno en el intestino delgado.⁴

En el proceso de transporte de glucosa a través de las membranas celulares participan dos familias de proteínas transportadoras: la familia de transportadores de glucosa asociados a sodio (SGLT) y la de proteínas facilitadoras de transporte de glucosa (GLUT). Los transportadores de la familia GLUT, que se expresan en todos los tejidos, forman el primer mecanismo de entrada de glucosa en las células. Hasta la fecha se han identificado 14. Todos ellos son glicoproteínas de entre 45 y 55 kDa de tamaño, que de acuerdo con su secuencia, lugar de expresión y características funcionales (especificidad por el sustrato, Km y respuesta a bloqueantes específicos como la forskolina) se han dividido en tres subfamilias: transportadores GLUT de clase I (GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4 y GLUT14), de clase II (GLUT5, GLUT7, GLUT9 y GLUT11) y de clase III (GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 y HMIT). A su vez, la familia SGLT incluye a los transportadores intestinales y renales de glucosa (SGLT1, SGLT2 y SGLT3) junto con los transportadores de inositol (SGLT4), de yodo (SGLT5) y de multivitaminas (SGLT6).⁵

En la absorción intestinal de glucosa, galactosa y fructosa (Fig. 1) se utilizan transportadores idénticos a los localizados en el túbulo proximal renal. Así, mientras la fructosa se moviliza a través de la membrana apical por difusión facilitada a través del transportador GLUT5 y a través de la membrana basolateral por difusión facilitada a través del transportador GLUT2⁵, la glucosa y la galactosa se transportan en contra de gradiente de concentración, en un proceso de simporte con Na⁺. El gradiente electroquímico de Na⁺, mantenido por la Na⁺/K⁺-ATPasa que bombea el Na⁺ a través de la membrana basolateral⁵, impulsa el proceso.

Membrana Basolateral

Membrana Apical

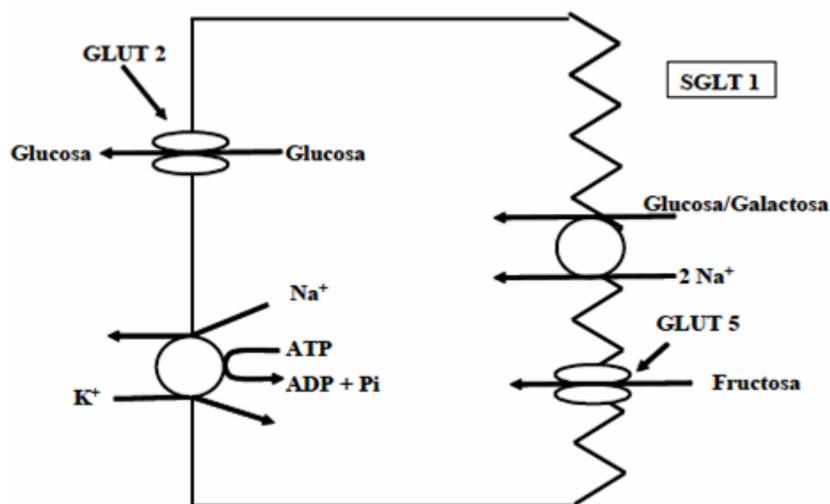


Figura 1. Transporte de glucosa a través del epitelio intestinal. Adaptada de Castrejón, 2007.

Los transportadores de la familia SGLT constan de 14 dominios transmembrana, tienen un sitio de glicosilación entre los dominios 6 y 7 y sus extremos amino y carboxilo terminales son extracelulares. Introducen en las células 2 iones de Na^+ por molécula de hexosa. El transporte de Na^+ se lleva a cabo en una región próxima al extremo amino. La interacción con el Na^+ promueve un cambio conformacional en la proteína que aumenta su afinidad por la hexosa, que entra en la célula por una región cercana al extremo carboxilo. SGLT1 es el miembro principal de esta familia. Codificado por un gen localizado en el cromosoma 22, se expresa principalmente en el intestino delgado, corazón y riñón. Su deficiencia congénita provoca el síndrome de mala absorción de glucosa y galactosa. Esta enfermedad, autosómica recesiva, que se manifiesta ya en las primeras semanas de vida, provoca cuadros diarreicos severos.⁵

Las enzimas que participan en la digestión de proteínas se pueden clasificar en dos grupos característicos, el de endopeptidasas, también llamadas proteasas, y el de exopeptidasas. Las endopeptidasas rompen los enlaces peptídicos en el interior de la cadena de aminoácidos y dan lugar a fragmentos peptídicos más pequeños. Pertenecen a este grupo enzimas como la pepsina, la tripsina y la quimiotripsina.⁴ Las exopeptidasas liberan aminoácidos a partir de los péptidos. Las más importantes son las aminopeptidasas y las dos isozimas de la carboxipeptidasa secretadas por el páncreas. La digestión (Tabla 1) se inicia en el estómago por acción de las pepsinas, en particular la A y la C. Junto con la proteólisis llevada a cabo por las pepsinas, la alta acidez del estómago también favorece la hidrólisis de las proteínas antes de que estas alcancen el intestino para su posterior absorción. En el lumen intestinal las endopeptidasas, principalmente la tripsina, elastasa y quimiotripsina junto con exopeptidasas como las carboxipeptidasas A y B, dan lugar a péptidos de dos a seis residuos aminoácídicos así como aminoácidos libres.⁴

La absorción de aminoácidos tiene lugar por medio de sistemas transportadores específicos para determinados grupos de aminoácidos (Fig. 2). Se emplea el término “sistema” para hacer referencia al hecho de que se hayan identificado actividades transportadoras con funciones similares en distintos tipos celulares⁶. En la membrana apical del epitelio intestinal se han descrito un sistema transportador para aminoácidos neutros cuya deficiencia produce enfermedad de Hartnup (sistema B^0 , también denominado $\text{B}^0\text{AT1}$, producto del gen SLC6A19), un sistema transportador para aminoácidos ácidos cuya deficiencia produce aminoaciduria dicarboxílica (sistema X^-_{AG} , también denominado EAAT3 , producto del gen SLC1A1), un sistema transportador para aminoácidos neutros acoplado a Na^+ (sistema ASC , también denominado ASCT2 , producto del gen SLC1A5), un sistema transportador para aminoácidos básicos y cisteína cuya deficiencia produce cistinuria (sistema $\text{b}^{0,+}$, formado por el heterodímero $\text{rBAT/b}^{0,+}\text{AT}$,

productos de los genes SLC3A1 y SLC7A9 respectivamente) y un sistema transportador para iminoaminoácidos, aminoácidos pequeños y β -aminoácidos acoplado a H^+ cuya deficiencia produce iminoglicinuria (sistema PAT, también denominado PAT1, producto del gen SLC36A1). A su vez, en la membrana basolateral se han descrito un sistema transportador para aminoácidos neutros excepto prolina (sistema L, formado por el heterodímero 4F2hc/LAT2, productos de los genes SLC3A2 y SLC7A8 respectivamente), un sistema transportador para aminoácidos neutros acoplado a H^+ (sistema A, también denominado SNAT2, producto del gen SLC38A2), un sistema transportador para aminoácidos básicos cuya deficiencia produce lisinuria (sistema y^+L , formado por el heterodímero de 4F2hc, producto del gen SCL3A2, con y^+LAT1 o y^+LAT2 , productos de los genes SLC7A7 y SLC7A6 respectivamente) y un sistema transportador para aminoácidos aromáticos cuya deficiencia produce el síndrome del pañal azul (sistema T, también llamado TAT1, producto del gen SLC16A10).

La absorción de los péptidos, que está condicionada por su baja permeabilidad a través de las membranas biológicas debido a su estructura hidrofílica y tamaño molecular, tiene lugar a través de diferentes sistemas de transporte en los que repercuten las diferencias metabólicas y variaciones anatómicas, fisiológicas y bioquímicas que se presentan en las diferentes partes del tracto gastrointestinal. El paso de dipéptidos y tripéptidos a través de la membrana apical de las células del epitelio intestinal por medio PEPT-1 constituye la principal forma de captación de aminoácidos. PEPT-1 tiene capacidad para absorber, de forma activa, los alrededor de 400 dipéptidos y 8000 tripéptidos distintos de la dieta. La absorción de los dipéptidos y tripéptidos se realiza junto con la de H^+ , de modo que PEPT-1 emplea un gradiente electroquímico de H^+ como fuerza de transporte. El intercambiador Na^+/H^+ mantiene el gradiente electroquímico de H^+ y la Na^+/K^+ -ATPasa proporciona la energía (Fig. 3). Diferentes sistemas transportadores de aminoácidos y péptidos facilitan a continuación la salida de estos compuestos desde el enterocito hasta el torrente circundante.^{7,8}

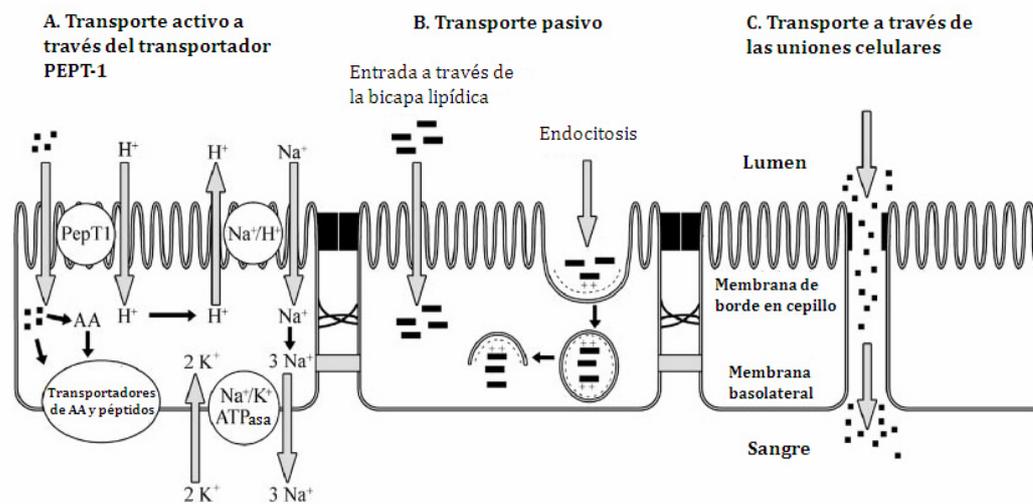


Figura 2. Transporte de péptidos a través de la membrana. A) Transporte de péptidos mediante el transportador PEPT-1, **B)** Transporte pasivo sin consumo de energía, **C)** Transporte a través de los espacios intercelulares. Adaptada de Gilbert, 2008.

El gen que codifica PEPT-1, ubicado en el cromosoma 13q 33-q34, se denomina SLC15A1 y pertenece a la familia SLC15 de transportadores de membrana. La proteína PEPT-1 está formada por 708 aminoácidos y reconoce a los péptidos en función de su carga eléctrica. Aunque tiene una baja afinidad por los péptidos, su capacidad de transporte es elevada⁹. PEPT-1 se expresa en las células epiteliales intestinales y renales. El nivel de expresión de PEPT-1 en el epitelio intestinal aumenta con la cantidad de proteína en la dieta y se ha descrito que diversas hormonas, como la insulina y la leptina, inducen su expresión. La expresión de PEPT-1 también se ha detectado a niveles reducidos en el colon y el epitelio ductal biliar. Diferentes estudios, tanto en roedores como en humanos, han mostrado que en el caso del colon la expresión de PEPT-1 se reduce al colon distal¹⁰. Además se ha descrito que en condiciones patológicas de inflamación de la mucosa colónica, como sucede en la enfermedad de Crohn y el cáncer colorrectal, la expresión de PEPT-1 está incrementada.¹¹

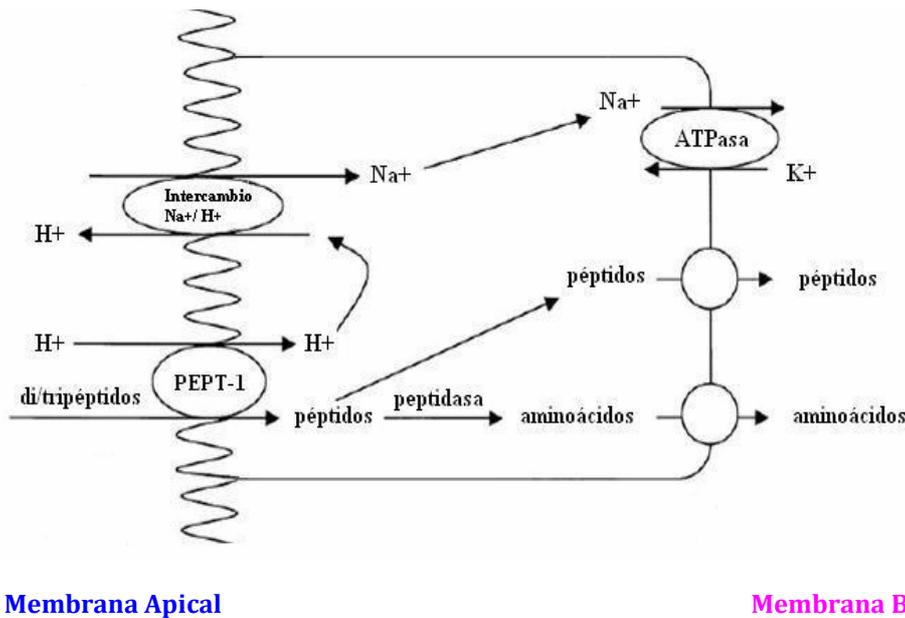


Figura 3. Transporte de aminoácidos a través del epitelio intestinal. Adaptada de Adibi, 2003.

Junto con el sistema de transporte activo mediado por PEPT-1, los péptidos también pueden absorberse mediante difusión pasiva, bien a través de las uniones intercelulares (vía paracelular), bien por endocitosis mediada por péptidos penetradores capaces de transportar otras sustancias. Esto implica el movimiento de péptidos de bajo peso molecular a favor de un gradiente de concentración sin consumo de energía ni sistema de transporte o portador específico (Fig. 2).¹²

Por último, cabe resaltar que se ha observado que los procesos de digestión y de transporte de azúcares y péptidos pueden ser modulados mediante la dieta incluso en aquellas condiciones patológicas de inflamación en las que estos procesos están modificados¹². La ingesta de galactooligosacáridos, por ejemplo, está relacionada con un incremento en la actividad sacarasa en ratones BALB/c y en cultivos de células de adenocarcinoma de colon Caco.2¹³, mientras que el tratamiento de cultivos de células Caco.2 con quercetina 50 μ M durante 72 horas incrementa la actividad fosfatasa alcalina y la actividad dipeptidilpeptidasa en estas células.¹⁴

1.3 PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL INTESTINO GRUESO

Entre las enfermedades asociadas al intestino grueso que afectan a la región de colon y recto destacan:¹⁵

- La colitis isquémica, que es una enfermedad producida por una disminución de la circulación sanguínea en el colon. Puede producirse por dificultades en la circulación sanguínea en todo el cuerpo o por disminución sólo en los vasos del colon. Aparece generalmente en personas de edad avanzada, es más frecuente en mujeres y suele ir asociada con otros factores de riesgo cardiovascular.
- La colitis ulcerosa una enfermedad inflamatoria crónica del intestino de causa desconocida que afecta generalmente al recto y al colon. Es frecuente en personas jóvenes aunque puede aparecer también en cualquier otra edad.¹⁶
- La enfermedad de Crohn, que se desarrolla en la zona del ano y del recto a partir de lesiones tales como repliegues cutáneos, fisuras, fístulas y abscesos. La frecuencia con la que aparecen estas lesiones, que varía entre el 15-45%, es mayor cuando afecta al colon en vez de al intestino delgado. Estas lesiones suelen ir acompañadas de síntomas intestinales.¹⁶
- Los divertículos, que son herniaciones de la mucosa de la pared del colon que salen a través de su capa muscular dando lugar a pequeñas dilataciones en la pared del intestino grueso. El 95% de los divertículos se detectan en el sigma, porción del colon anterior al recto.
- Los pólipos de colon, que son prominencias de tejido que sobresalen hacia la luz del colon. Se consideran el tamaño y el número de pólipos; cuando éste es superior a 100 se habla de poliposis.¹⁶
- El cáncer colorrectal, que es el tumor maligno formado por células de la mucosa del intestino grueso y de sus glándulas. La mayoría de los cánceres colorrectales aparecen sobre un pólipo existente en la mucosa del colon que por circunstancias diversas evoluciona a tumor maligno.

2. CÁNCER COLORRECTAL

Las células del cuerpo se dividen de forma regular con el objetivo de reemplazar a las ya envejecidas o muertas y mantener así la integridad y el correcto funcionamiento del organismo. El proceso de división está estrictamente regulado. Cuando los mecanismos de control de la división están alterados en una célula, ésta y sus descendientes inician una división incontrolada, que con el tiempo dará lugar a un tumor o nódulo. Cuando las células que forman el tumor no poseen la capacidad de invadir y destruir otros órganos el tumor se considera benigno. Pero cuando las células además de crecer sin control sufren nuevas alteraciones y adquieren la capacidad de invadir tejidos y órganos adyacentes, y por tanto de trasladarse y proliferar en otras partes del organismo, el tumor es un tumor maligno o cáncer.¹⁷

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad y su número de casos está aumentando en todo el mundo. Se prevé que a nivel mundial, la mortalidad por cáncer aumentará un 45% entre 2007 y 2030 debido en parte al crecimiento demográfico y en parte al envejecimiento de la población. En la mayor parte de los países desarrollados el cáncer es la segunda causa principal de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares, y según datos epidemiológicos se empieza a ver esta tendencia en el mundo menos desarrollado como América del Sur y Asia.¹⁸ Algunos tipos de cáncer, como los de próstata, mama y colon, son más frecuentes en los países desarrollados. Otros tipos de cáncer, como los de hígado, estómago y cuello uterino, son más frecuentes en los países en desarrollo.¹⁸

La aparición de cáncer se ha asociado a varios factores de riesgo relacionados con el estilo de vida,¹⁹ como el consumo de tabaco, las dietas ricas en grasas, el consumo excesivo de alcohol, el exceso de peso, la inactividad física, la exposición a carcinógenos o la exposición a radiaciones ultravioletas o ionizantes. Una alimentación saludable, acompañada de ejercicio físico puede prevenir hasta un tercio de los casos de cáncer:²⁰ la actividad física, un peso adecuado y una ingesta diaria de frutas y verduras frescas reducen, por ejemplo, el riesgo de desarrollar cáncer de mama, de colon, de cavidad bucal, de pulmón y de cuello uterino, mientras que en las sociedades en las que se consumen más alimentos salados o conservados en vinagre la incidencia de cáncer gástrico es más elevada. El envejecimiento y algunas infecciones, como la del virus de la hepatitis B o la del virus del papiloma humano, son otros factores importantes en la aparición del cáncer. La incidencia de esta enfermedad aumenta muchísimo con la edad, muy

probablemente porque se van acumulando factores de riesgo de determinados tipos de cáncer al tiempo que los mecanismos de reparación celular pierden eficacia con la edad.

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CÁNCER COLORECTAL

Se denomina cáncer colorrectal al que se origina en el colon o el recto. La pared del colon y del recto está compuesta por varias capas (mucosa, submucosa, muscular, subserosa y serosa). El cáncer colorrectal se origina en la más interna y puede crecer a través de algunas o de todas las demás capas. En la mayoría de los casos su desarrollo se produce lentamente, durante varios años. Habitualmente, antes de que se origine se forma un crecimiento de tejido (tumor o pólipo no canceroso) en el revestimiento del colon o del recto. Estos pólipos inicialmente son benignos y tan sólo un 5-10% se malignizan.²¹ La probabilidad de transformarse en cáncer depende de la clase de pólipo. Así, mientras que los pólipos inflamatorios y los pólipos hiperplásicos por lo general no son precancerosos, los pólipos adenomatosos son afecciones precancerosas. Como resultado, más del 95% de los cánceres colorrectales son adenocarcinomas que se desarrollan en las glándulas de la mucosa. El resto comprende otros tipos de tumores menos comunes que también pueden comenzar en el colon o el recto e incluye tumores carcinoides, tumores del estroma gastrointestinal, linfomas y sarcomas.

El cáncer colorrectal supone, aproximadamente, el 10-15% de todos los cánceres existentes. En los países occidentales ocupa, con un millón de casos nuevos cada año, el segundo lugar en incidencia tras el cáncer de pulmón en el hombre y el de mama en la mujer. Su edad media de aparición es de unos 69 años y, aunque también puede aparecer en personas más jóvenes, la mayoría de los pacientes tienen más de 50 años en el momento del diagnóstico. Afecta a hombres y mujeres casi por igual,²¹ del 5% al 10 % de los casos son hereditarios y el resto son esporádicos.

2.2 GENÉTICA MOLECULAR DEL CÁNCER COLORECTAL

Los dos síndromes hereditarios más comunes asociados con los cánceres colorrectales son la poliposis familiar adenomatosa (familiar adenomatous polyposis, FAP) y el cáncer colorrectal hereditario no asociado con poliposis (hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC). Aproximadamente un 1% de los cánceres colorrectales se deben a la FAP. Las personas con FAP presentan desde la adolescencia cientos o miles de pólipos en el colon y el recto y, por lo general,

el cáncer surge en uno o más de estos pólipos entre los 20 y los 40 años. Los estudios moleculares han relacionado la FAP con alteraciones con pérdida de función en el gen APC.^{22,23} La presencia de tumores de tejidos blandos, tumores óseos y ampulomas asociados a los pólipos del colon caracterizan a una subclase de la FAP conocida como síndrome de Gardner, mientras que la aparición de tumores malignos del sistema nervioso central acompañando a los pólipos define el síndrome de Turcot.

El HNPCC, también conocido como síndrome de Lynch, representa alrededor del 3% al 5% de todos los cánceres colorrectales. El HNPCC es causado por mutaciones en diversos genes implicados en la reparación del DNA como MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 o PMS2. Como la FAP, este síndrome también se presenta cuando las personas son relativamente jóvenes y aunque las personas con HNPCC tienen pocos pólipos el riesgo de que contraigan cáncer colorrectal en el transcurso de su vida es elevado. Además, las mujeres con esta afección también tienen un riesgo muy alto de padecer cáncer de endometrio. Otros cánceres asociados con el HNPCC son los de ovario, estómago, intestino delgado, páncreas, riñón, encéfalo, uréter y vías biliares.

El cáncer colorrectal esporádico representa la mayor proporción de casos y en su desarrollo no existe implicación genética hereditaria. Según el modelo propuesto por Fearon y Vogelstein en 1990,²⁴ el cáncer colorrectal esporádico se produce como consecuencia de una mutación somática en células de la cripta intestinal. En la mayoría de las lesiones que podemos encontrar en el colon se observan mutaciones de genes supresores de tumores, siendo el gen APC el que aparece mutado con mayor frecuencia.²² La mutación somática se localiza en el extremo 5' del exón 15 del gen, una región implicada en la interacción con la β -catenina, una proteína de adhesión crítica para el establecimiento y mantenimiento de capas epiteliales.

La interacción con la β -catenina y la glucógeno sintetasa quinasa GSK-3 β es una de las interacciones más estudiadas del gen APC. Estas proteínas son componentes de la vía de señalización Wnt. La vía de señalización Wnt juega un papel importante en la renovación y desarrollo del epitelio colónico y su desregulación es uno de los principales factores implicados en la carcinogénesis del colon:^{25,26} en el 90% de los tumores colorrectales se observan alteraciones en la regulación de la vía Wnt²⁷ y en el 85% de los casos de cáncer colorrectal esporádico, así como en los casos de FAP, se observan alteraciones en el gen APC.²² Normalmente APC forma un complejo junto con la GSK-3 β y la β -catenina en el citoplasma de las células. En estas condiciones se produce una fosforilación de la β -catenina que da lugar a su degradación por ubiquitinación. Las mutaciones del gen APC impiden su unión con la β -catenina

y permiten que ésta quede libre en el citoplasma y se transloque al núcleo. En el núcleo la β -catenina enlaza con factores de transcripción de las familias Tcf y Lef. El factor de células T 4 (Tcf-4), uno de los miembros de la familia Tcf, se expresa en el epitelio colónico y activa la transcripción de genes relacionados con la proliferación celular, como los de c-Myc, c-Jun, Fra-1 o la ciclina D1, sólo cuando está unido a la β -catenina. Por eso se acepta que las mutaciones en APC promueven la carcinogénesis colorrectal al impedir la degradación de la β -catenina.²⁸ En los casos en los que no está afectado el gen APC, los genes que se ven afectados en mayor medida son él de la β -catenina (CTNNB1) y él de la axina (AXIN).²⁹ Las principales mutaciones encontradas en CTNNB1 se localizan en los residuos susceptibles de fosforilación por GSK-3 β .

Otros genes implicados en la carcinogénesis del cáncer colorrectal y que están relacionados con el paso de pólipo a adenoma, son K-RAS y TP53. El paso de pólipo a adenoma se produce como consecuencia del incremento en la proliferación celular derivado de la activación de oncogenes, como K-RAS, unido a la inhibición de genes supresores de tumores, como TP53. De hecho, en el proceso de carcinogénesis la mutación de APC suele ir seguida de inactivación de p53 mientras que en condiciones normales el aumento de β -catenina se correlaciona con un incremento en la expresión de p53, al parecer por inhibición de su degradación proteolítica, que actúa como mecanismo compensador y preventivo de la formación de tumores.³⁰

2.3 ESTADIFICACIÓN

La estadificación del cáncer colorrectal emplea el sistema TNM, en él que la letra T describe cuanto ha crecido el tumor primario hacia la pared del intestino y áreas adyacentes, la letra N describe la extensión de la propagación a los ganglios adyacentes y la letra M indica si se ha producido metástasis. Estas letras se acompañan además de un número comprendido entre el 0 y el 4, que indica la gravedad en orden ascendente, o de la letra x, que indica que el estado del tumor no puede ser evaluado por falta de información. Una vez que se han determinado las categorías T, N y M esta información se combina en un proceso de agrupamiento por etapas que distingue los siguientes estadios(Fig. 5):³¹

- Estadio 0 (Tis, N0, M0): El tumor se encuentra en su etapa más temprana y se localiza sólo en la capa interna (mucosa) del colon o del recto. En esta etapa el cáncer colorrectal también se conoce como carcinoma in situ.

- Estadio I (T1-T2, N0, M0): El tumor ha crecido a través de la pared interior del colon o recto hasta las capas submucosa (T1) o muscular (T2), pero no se ha propagado a ganglios linfáticos adyacentes ni a áreas distantes.
- Estadio II (T3-T4a-T4b, N0, M0): El tumor ha crecido a través de la pared del colon o recto. Es posible que haya invadido tejido cercano, pero no se ha diseminado a los ganglios linfáticos. En función del grado de penetración se distinguen los subtipos IIA (T3), IIB (T4a) y IIC (T4b).
- Estadio III (T1-T2- T3-T4a, N1-N2a-N2b, M0): El tumor ha crecido a través de la pared interior del colon o recto hasta las capas submucosa (T1), muscular (T2) o externas del colon o del recto (T3), o a través del peritoneo visceral (T4a). Además se ha propagado a ganglios linfáticos cercanos (N1 entre 1 y 3 ganglios, N2a entre 4 y 6 ganglios y N2b a 7 o más ganglios) pero no a partes distantes. En función del grado de penetración se distinguen los subtipos IIIA, IIIB y IIIC.
- Estadio IV: si se ha diseminado a uno (subtipo IVA) o más (subtipo IVB) órganos distantes.
- Cáncer recurrente: si tras el tratamiento el tumor se reproduce en el colon, en el recto o en otras partes del cuerpo.

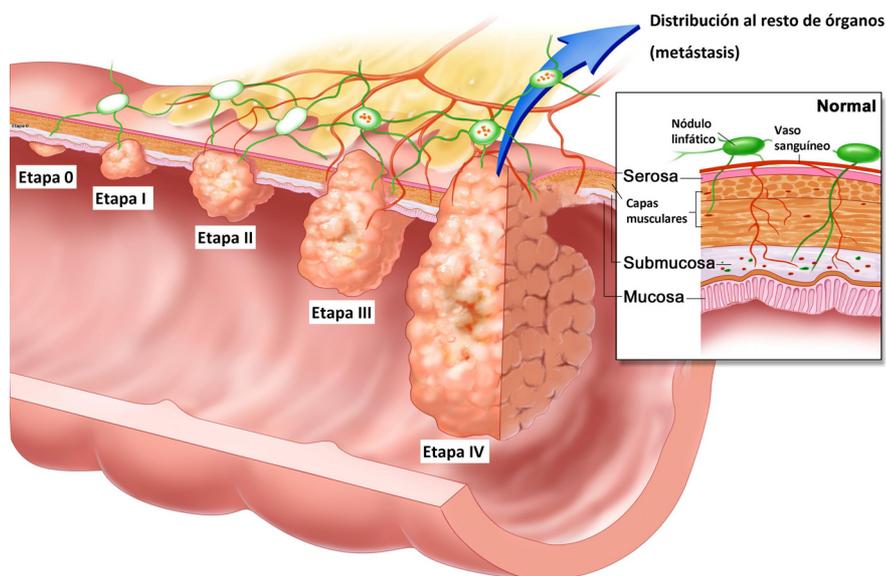


Figura 5. Diferentes grados de desarrollo de pólipos en la mucosa del colon. Adaptada de National Cancer Institute at the National Institute of Health. Winslow, 2005

2.4 FACTORES DE RIESGO

Entre los factores de riesgo que inciden en el desarrollo del cáncer colorrectal se pueden considerar:³²

- La edad, ya que más del 90% de los cánceres colorrectales se diagnostican después de los 50 años.
- Los antecedentes familiares y personales de poliposis o de cáncer de colon.
- Los antecedentes de enfermedad inflamatoria intestinal, como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.
- La actividad física, ya que llevar una vida sedentaria aumenta el riesgo de padecer cáncer de colon.
- El consumo de tabaco o alcohol, que facilitan el desarrollo de pólipos en la mucosa del colon.
- La alimentación, ya que el cáncer de colon suele ir asociado a dietas ricas en grasas animales y pobres en fibra y existen evidencias que indican que una dieta equilibrada, rica en vegetales y fibra disminuye el riesgo de padecer cáncer colorrectal.^{33,34} Estudios recientes muestran que algunos de los compuestos que adquirimos a través de la dieta, como los flavonoides, los oligosacáridos o la fibra intervienen en procesos como la proliferación celular, la apoptosis y la síntesis de proteínas relacionadas con la carcinogénesis por lo que contribuyen a la prevención del cáncer y a un mejor pronóstico.³⁵

3. FLAVONOIDES

Los flavonoides forman parte del grupo de los polifenoles. Son pigmentos naturales presentes en los vegetales que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes como la contaminación ambiental, los rayos ultravioleta o las sustancias químicas presentes en los alimentos.

Los flavonoides fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, que en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P, por su característica de permeabilidad, y también vitamina C₂, porque se observó que algunos flavonoides poseían propiedades similares a la vitamina C. Dichas clasificaciones de los flavonoides no pudieron ser confirmadas y ambas denominaciones se abandonaron en 1950.³⁶

3.1 ESTRUCTURA QUÍMICA

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que poseen una estructura común de difenil-pirano (C6-C3-C6), formada por dos anillos de fenilo (anillos A y B) unidos a través de un anillo de pirano (anillo C) (figura 8). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'.³⁷

Los flavonoides reúnen tres características estructurales importantes para su función:³⁸

- La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi.
- La presencia de un doble enlace en posición 2,3
- La presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5

De entre los principales flavonoides, la catequina presenta sólo la característica de poseer un doble enlace en posición 2,3 y la diosmetina posee solamente la estructura catecol u O-dihidroxi en el anillo B. La quercetina sin embargo posee las tres.

3.2 TIPOS DE FLAVONOIDES

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, flores y semillas. También se pueden obtener a partir del vino, cerveza, té verde y té negro y aparecen en algunas plantas como arándanos, ginkgo biloba o cardo mariano.³⁹ En estos casos, se suelen situar principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas apareciendo en pequeñas cantidades solamente en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo. Una excepción a esta norma son los tubérculos de cebolla que contienen gran cantidad de quercetina 4'-D-glucósido.⁴⁰ Debido a su abundancia los flavonoides son fácilmente adquiribles a través de la dieta, bien de forma habitual bien por medio de suplementos nutricionales.

El grupo de los flavonoides es muy amplio y diverso y en él se pueden identificar más de 5.000 compuestos diferentes. Los más destacados o estudiados son(Fig. 6):⁴¹

- Citroflavonoides como la quercetina, hesperidina, rutina, naranjina y limoneno. La **quercetina** es de color amarillo-verdoso y está presente en cebollas, manzanas, brócoles, cerveza y uvas. La hesperidina se encuentra en los hollejos de las naranjas y limones. La naranjina es la responsable del sabor amargo de frutas como la naranja, el limón y la toronja. El limoneno está presente en los limones.
- Isoflavonoides como la genistéina y la daidzeina, Se encuentran en alimentos que contienen soja.
- Proantocianidinas, que se encuentran presentes en las semillas de uva y en extractos de corteza del pino marino.
- Antocianidinas, que son responsables de los colores rojo y rojo-azulado de las cerezas.
- Ácido elágico, que se encuentra en frutas como la uva y en verduras.
- Catequinas, como la epigallocatequina, que se encuentran en el té verde y té negro.
- Kaemferol, presente en puerros, rábanos, remolacha roja y endibias.

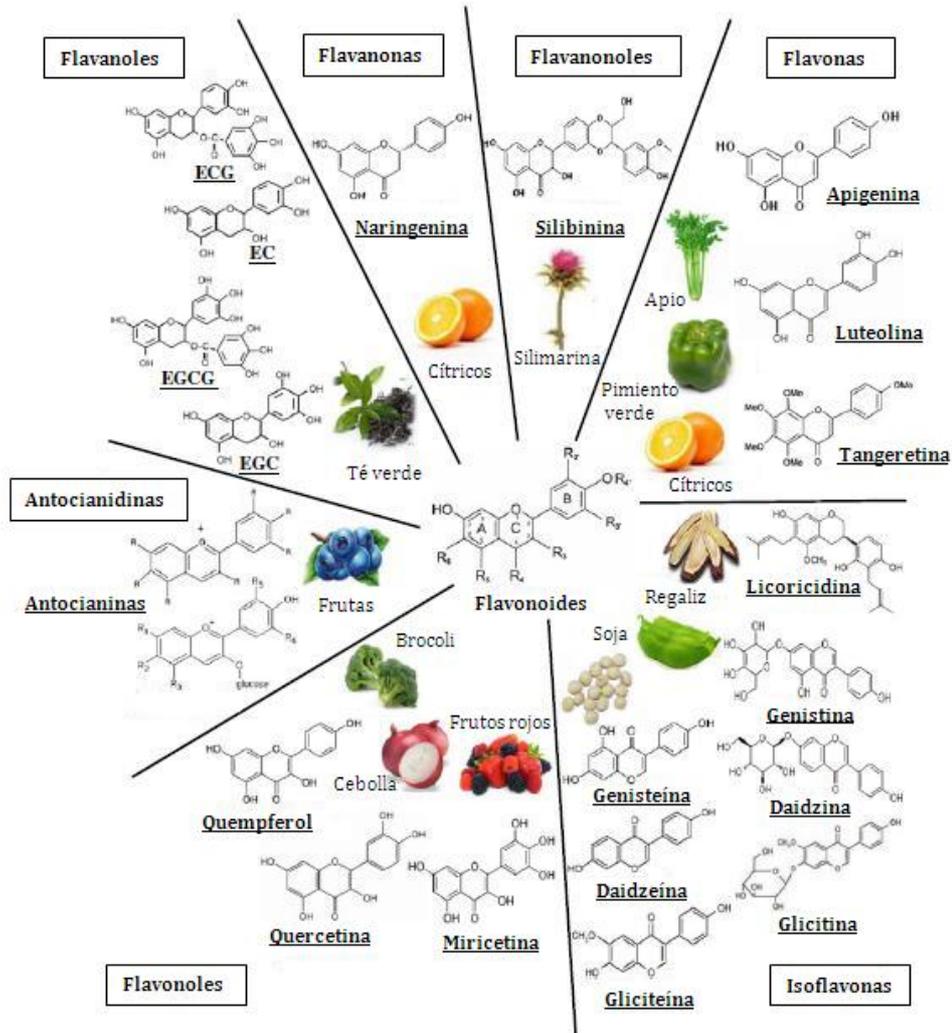


Figura 6. Tipos y obtención de flavonoides. Adaptada de Weng, 2012.

3.3 EFECTOS BIOLÓGICOS

Los efectos biológicos de los flavonoides se evalúan a partir de su biodisponibilidad, dependiente de su estructura química y sus mecanismos de absorción, distribución y eliminación. La quercetina y la catequina constituyen un buen ejemplo de la diferencia de biodisponibilidad que podemos encontrar entre dos flavonoides: la quercetina experimenta una mayor metilación en plasma que la catequina, y además los metabolitos de la catequina son glucuronidados mientras que los metabolitos de la quercetina son también sulfatados. Estos aspectos afectan a la solubilidad de los metabolitos en los fluidos orgánicos y son en parte responsables de la vía de eliminación de ambos flavonoides.⁴²

El interés de los flavonoides ha ido creciendo con el paso de los años debido a sus múltiples y variadas propiedades. En un principio, se describió su poder como agentes antioxidantes, capaces de eliminar radicales libres e incluso capaces de evitar su formación mediante la quelación de metales de transición. Posteriormente, se descubrieron sus efectos como agentes pro-oxidantes, capaces de provocar daño oxidativo, y en la actualidad se acepta que la actividad pro-oxidante podría ser de gran ayuda en casos como los de las células cancerosas, en las que podrían inducir apoptosis. También se sabe que los flavonoides no sólo actúan como pro-oxidantes, antioxidantes o quelantes de metales de transición, sino que también son capaces de actuar como moduladores de diversas rutas de señalización celular, activándolas o inhibiéndolas⁴³. Ciertos tipos de flavonoles como la quercetina, la miricetina, y el kaempferol, tienen efectos antimutagénicos. Este efecto parece estar asociado con la presencia de un doble enlace en posición 2-3 y de un grupo 3-OH en la molécula del flavonoide. Por el contrario, la actividad cancerígena de estos compuestos reside en los intermediarios quinónicos, generados durante la oxidación de los flavonoides, que interaccionan con las moléculas de DNA. Estas quinonas, por su carácter electrófilo, son muy reactivas y pueden participar en la producción de radicales superóxidos y peróxidos, lo que explicaría sus propiedades mutagénicas y cancerígenas.⁴³

3.4 QUERCETINA

La quercetina (Fig. 7) es uno de los flavonoides más frecuentes en nuestra dieta. Presente en alimentos como la cebolla, el té, la manzana, el brócoli o el vino tinto es uno de los flavonoides más estudiado.⁴⁴ La quercetina posee acciones biológicas como antioxidante, antiinflamatorio, antiarterioesclerótico y antimutagénico. También se ha descrito que modula la actividad de enzimas intestinales y transportadores de azúcares y aminoácidos en líneas celulares de adenocarcinoma de colon, en las que incrementa la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina y la dipeptidilpeptidasa IV.¹⁴ Durante los últimos años se han comenzado a analizar sus acciones frente a diferentes tipos de cáncer con resultados prometedores que demuestran su poder antiinvasivo.⁴⁵

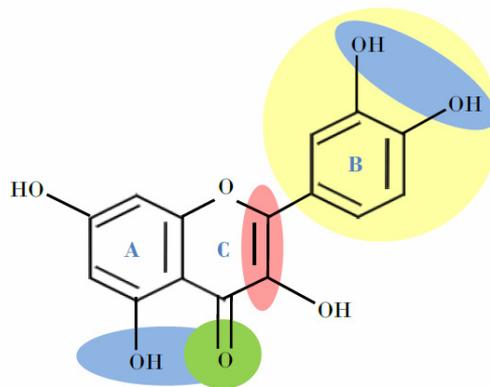


Figura 7. Estructura de la quercetina

En ratones se ha observado que la quercetina es capaz de disminuir la aparición de tumores hepáticos en estadios iniciales de desarrollo. Este efecto está asociado a aumentos tanto en los niveles de glutatión (GSH) como en la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa, la superóxido dismutasa o la glutatión peroxidada.⁴⁶ En células HepG2 (células humanas de hepatocarcinoma) la quercetina también induce la expresión de la glutatión peroxidasa y eleva los niveles intracelulares de glutatión.^{47,48} Ya que estos cambios, también inducidos por otros polifenoles como la rutina, previenen el estrés oxidativo de las células, la actividad anticancerígena de la quercetina a menudo se relaciona con su efecto antioxidante.⁴⁹

La quercetina, como otros polifenoles de la dieta, puede actuar también, en función del tipo celular, de la dosis o del tiempo de exposición, como pro-oxidante, ya que estimula la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Como consecuencia tiene capacidad para inducir

apoptosis y dar lugar a la prevención o disminución del desarrollo tumoral en diferentes tipos de cáncer. En células MDA-MB-468 de cáncer de mama⁵⁰ y H661 de adenocarcinoma pulmonar, por ejemplo, la quercetina induce apoptosis mediante un incremento de los niveles intracelulares de ROS que conduce a la formación de H₂O₂.⁵¹ También se ha descrito que la quercetina tiene capacidad para inducir apoptosis, de forma dependiente de la dosis, en diversas líneas celulares cancerígenas en las que se detectan alteraciones en la fragmentación del DNA,^{52,53} activación de proteínas proapoptóticas como Bax,^{54,53} disminución de proteínas antiapoptóticas como Bcl-xL y Bcl-2⁵³, activación de las caspasas-3, 7, y 9 y liberación del citocromo c.^{55,56}

En relación al efecto de la quercetina sobre los procesos de proliferación, supervivencia y muerte celular, se ha descrito que este efecto está estrechamente relacionado con la concentración utilizada en el tratamiento: concentraciones bajas de quercetina dan lugar a mecanismos de supervivencia mediante la activación de MAPKs (Proteínas quinasas activadas por mitógenos)⁵⁷ y el incremento en los niveles de fosforilación de p-AKT.⁵⁸ Sin embargo, concentraciones altas de quercetina, ejercen un efecto pro-apoptótico mediante la activación de caspasas y la disminución en los niveles de fosforilación de AKT y ERKs (Quinasas reguladas por señales extracelulares).^{55,59} Estas modificaciones en la proliferación celular suelen aparecer asociadas a cambios en el ciclo celular. Así, la quercetina inhibe la proliferación e induce una parada del ciclo celular en fase G₀/G₁, S y G₂/M en células de adenocarcinoma de colon HT-29⁶⁰ y en células de leucemia (MOLT-4)⁶¹ y reduce la inflamación de la mucosa del colon a través de la inhibición de COX.2 en ratones inducidos con azoximetano.⁶² También se ha descrito que la quercetina reduce la proliferación celular a la mitad en células LoVo de cáncer de colon y MCF-7 de cáncer de mama, en las que induce una parada del ciclo celular en G₂/M tras 24 horas de tratamiento.⁶³ En la actualidad son diversos los grupos que están analizando si la administración conjunta de varios polifenoles puede tener un efecto mayor sobre la proliferación celular que su administración por separado. En este sentido se ha observado que la quercetina actúa de modo sinérgico con el resveratrol en la inducción de apoptosis en células sanguíneas de pacientes con leucemia⁶¹ y sobre la proliferación celular y activación de caspasa 3 en células de cáncer de colon.⁶⁴ Como consecuencia de todas estas acciones, se ha sugerido que existe una relación directa entre una dieta rica en quercetina y el riesgo de padecer cáncer de colon, cáncer de estómago,^{65,66} enfermedades neurodegenerativas⁶⁷ y enfermedades cardiovasculares.⁶⁸

4. PROBIÓTICOS

El aparato digestivo del hombre está colonizado por diversas especies bacterianas, donde existen más de 400 especies diferentes.⁶⁹ Más de la mitad del peso de la materia que está en el colon corresponde a células bacterianas. El estómago contiene una pequeña cantidad de bacterias, aproximadamente 10^3 ufc/mL de jugo gástrico, mientras que la concentración bacteriana aumenta a lo largo del intestino hasta llegar a una concentración final de 10^{12} bacterias/g en el colon. Las bacterias que forman la denominada microflora intestinal no suelen tener efectos nocivos y se ha demostrado que algunas de estas cepas existentes en la microbiota son necesarias para mantener el buen funcionamiento de su huésped.⁷⁰

Los probióticos se definen como “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas tienen un efecto beneficioso en la salud del hospedador”. Estos microorganismos deben estar correctamente identificados, carecer de factores de virulencia y de la capacidad de producir metabolitos indeseables, deben ser tolerantes a las condiciones del entorno donde ejercen el beneficio y su funcionalidad probiótica debe haberse verificado en ensayos con humanos. Entre las características más importantes que deben cumplir se encuentra su viabilidad en el tracto digestivo, ya que cuando son ingeridos deben sobrevivir al paso por el mismo y mantener su capacidad para interactuar con el epitelio o la microbiota intestinal.⁷¹ Para poder evaluar su eficacia en la salud humana se requiere su identificación a nivel de cepa, ya que los efectos saludables demostrados para una cepa microbiana específica no son extrapolables a otras cepas de la misma especie.⁷² En la mayoría de los casos los probióticos son bacterias grampositivas que se clasifican fundamentalmente en dos géneros: *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.^{73,74} La tabla 2 recoge algunas de las especies identificadas.

Tabla 2. Diferentes cepas probióticas. Adaptada de Holzapfel, 2001

<i>Lactobacillus</i> sps.	<i>Bifidobacterium</i> Sps.	<i>Streptococcus</i> Sps.	<i>Saccharomyces</i> Sps.	Others
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. boulardii</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. casei (rhamnosus)</i>	<i>B. breve</i>	<i>S. salivarius subsp. thermophilus</i>		<i>Escherichia coli</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>			<i>Enterococcus</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>			<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. infantis</i>			
<i>L. lactis</i>	<i>B. adolescentis</i>			
<i>L. paracasei</i>				
<i>L. plantarum</i>				
<i>L. reuteri</i>				
<i>L. salivarius</i>				
<i>L. bulgaricus</i>				

4.1 MECANISMOS DE ACCIÓN

La integridad del epitelio intestinal juega un papel muy importante en los mecanismos de defensa ya que protege al organismo de las agresiones. Una lesión o pérdida de la barrera intestinal puede desencadenar el desarrollo de diferentes tipos de enfermedades inflamatorias intestinales y de algunas enfermedades autoinmunes. Algunas cepas de probióticos son capaces de contribuir al mantenimiento correcto de la barrera intestinal, así como de prevenir y reparar los daños ocasionados en la mucosa intestinal. Como resultado los probióticos ejercen acciones sobre la inmunidad innata y adquirida y protegen al hospedador frente a infecciones, procesos de inflamación intestinal crónica⁷⁵ y otro tipo de enfermedades como el cáncer.⁷³

Los probióticos ejercen sus acciones a distintos niveles: interactúan con la microbiota intestinal ya existente, mejoran la función de integridad de la barrera intestinal y modulan la respuesta inmune (Fig. 8).⁷⁶ Las cepas probióticas modulan la microbiota intestinal inhibiendo la colonización del tracto gastrointestinal por patógenos y favoreciendo la presencia de grupos microbianos, como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*, considerados como beneficiosos dentro de la microbiota intestinal.⁷⁷ En la modulación interviene la producción por parte de los probióticos de sustancias antimicrobianas, bacteriocinas y ácidos grasos de cadena corta. Al mismo tiempo, las células epiteliales y las del sistema inmune innato poseen receptores

celulares capaces de diferenciar entre la microbiota comensal y la patógena y de inducir la síntesis de diferentes mediadores como citoquinas y moléculas de adhesión.⁷⁸

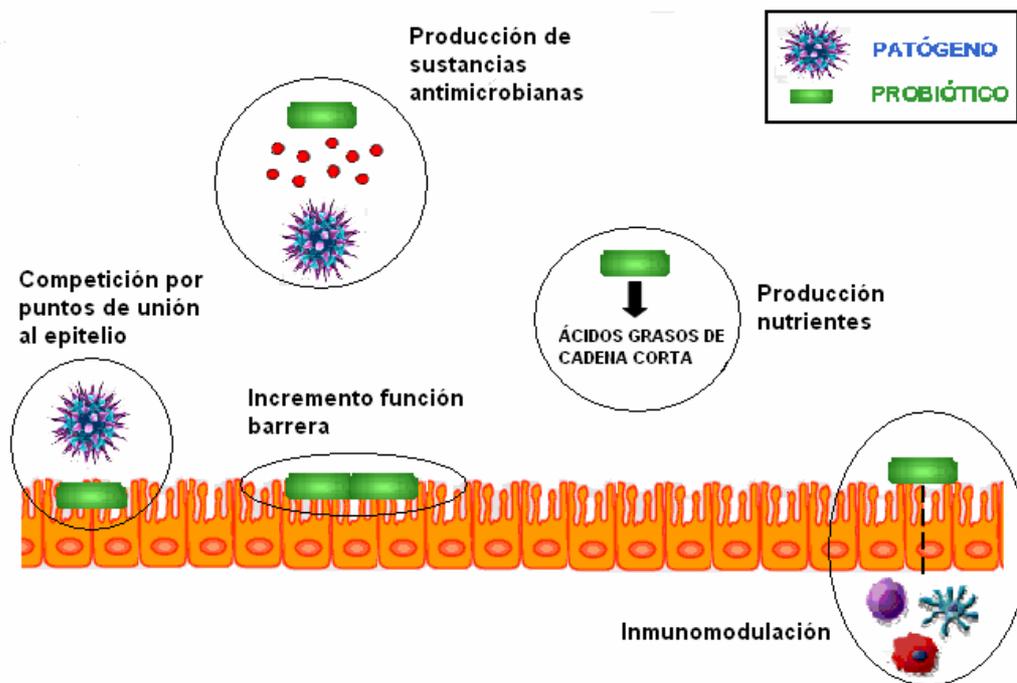


Figura 8. Mecanismos de acción de los probióticos. Producción de sustancias antimicrobianas, función de barrera intestinal, activación del sistema inmune, competición por sitios de unión y producción de nuevos nutrientes o moléculas bioactivas.

4.1.1 Acción de los probióticos en procesos infecciosos

Algunas cepas probióticas como *S. boulardii*, *L. casei* y *L. rhamnosus* han demostrado poseer un papel importante en el tratamiento de la diarrea infecciosa infantil, sobre todo en gastroenteritis virales y en diarreas asociadas al tratamiento con antibióticos^{79,80}. También se ha observado que la combinación de cepas de *B. infantis*, *L. acidophilus* y *B. bifidum* reduce el riesgo de incidencia de enterocolitis necrotizante en neonatos prematuros y reduce su mortalidad.⁸¹

4.1.2 Acciones de los probióticos en procesos metabólicos

Los probióticos pueden intervenir en diferentes procesos metabólicos que tienen lugar en el organismo, bien mediante su acción a nivel enzimático, bien actuando sobre la propia actividad metabólica del individuo. En el metabolismo de carbohidratos, por ejemplo, tienen un papel destacado ya que los ácidos grasos de cadena corta producto de su degradación, como el propiónico o el butírico, poseen capacidad antiinflamatoria, estimulan la proliferación y diferenciación celular del epitelio y median en la resistencia a la insulina y la diabetes.⁸² Además se ha demostrado que los síntomas de intolerancia a la lactosa se manifiestan en menor medida cuando se consume yogur que cuando se consume leche. Este efecto se ha atribuido a las cepas probióticas *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* que suelen estar presentes en el cultivo del yogur y favorecen la digestión de la lactosa al liberar la actividad β -galactosidasa en el intestino delgado.⁸³ Por otro lado, la fermentación de las proteínas por parte de la microbiota del intestino puede dar lugar a metabolitos tóxicos, entre los que se incluyen amoniaco, aminas, fenoles, tioles e índoles, y se ha demostrado que algunas cepas probióticas como *L. casei* y *B. breve* disminuyen significativamente el nivel de p-cresol excretado, un biomarcador empleado en la insuficiencia renal crónica.⁸⁴ Por último, en relación al metabolismo de los lípidos, algunos estudios con animales han mostrado que el consumo de probióticos disminuye el nivel de colesterol sérico y la concentración de la fracción LDL colesterol en plasma.⁸⁵

4.1.3 Efecto de los probióticos sobre las enfermedades inflamatorias intestinales

Los daños producidos en la función de barrera de la mucosa intestinal dan lugar a enfermedades como la colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. Estas enfermedades se caracterizan por presentar periodos de recurrencia y de remisión de los síntomas y por su evolución a cronificarse. Se ha descrito que la cepa *E. coli Nissle 1917* contribuye a la remisión de los síntomas en la colitis ulcerosa, y también que la combinación de probióticos con fructooligosacáridos y el tratamiento combinado con varios probióticos resultan eficaces frente a este tipo de enfermedades.⁸⁶ Sin embargo, aunque en pacientes con enfermedad de Crohn se han realizado estudios con combinaciones de *B. breve*, *B. longum* y *L. casei* con inmunomoduladores y corticosteroides, en la actualidad aún no hay evidencias suficientes de que los probióticos actúen sobre la enfermedad de Crohn ya que ninguna de las cepas

probióticas clínicamente evaluadas ha demostrado eficiencia en el mantenimiento en el tiempo de los síntomas.^{87,88}

4.1.4 Papel de los probióticos sobre el cáncer colorrectal

Se ha observado que los probióticos pueden jugar un papel preventivo en el desarrollo de cáncer colorrectal. Entre los diferentes mecanismos propuestos mediante los cuales los probióticos ejercerían su efecto beneficioso se encuentran la modificación de las poblaciones de bacterias presentes en la microbiota intestinal con disminución de la población de bacterias patógenas y aumento de la de bacterias beneficiosas, la modulación de la respuesta inmune a nivel gastrointestinal y la producción de moléculas bioactivas por fermentación de nutrientes adquiridos a través de la dieta, como fibra, prebióticos y polifenoles.⁸⁹ Es destacable la producción de ácidos grasos de cadena corta, tales como acetato, propionato y butirato, ya que se ha sugerido que estos compuestos modifican la expresión de genes relacionados con la inducción de apoptosis y regulación del ciclo celular.⁸⁹ Por este motivo, puesto que en un alto porcentaje de tumores se observa una desregulación del ciclo celular como consecuencia de alteraciones epigenéticas que podrían ser reversibles, la modificación o modulación de la microbiota intestinal mediante el uso de probióticos se ha propuesto como un posible mecanismo de prevención del cáncer colorrectal.⁸⁹

Se ha descrito que algunos probióticos como *B. adolescentis*, *B. lactis*, *B. bifidum* o *B. breve* intervienen en el proceso de adhesión en líneas celulares de adenocarcinoma de colon, como Caco.2 y HT-29, y en procesos inflamatorios como la colitis ulcerosa.⁹⁰ También se ha descrito que *L. reuteri* secreta factores capaces de inducir apoptosis en células de leucemia mieloide. Estas cepas inducirían la apoptosis de las células mediante la activación del factor de transcripción NF-kB y la regulación de la expresión de proteínas antiproliferativas y antiapoptóticas.⁹¹ Por último, otros probióticos como *B. longum* o *L. gasseri* afectan al desarrollo del cáncer colorrectal inducido con dimetilhidracina en ratones, en los que estimulan el sistema inmune dando lugar a un aumento en la proliferación de macrófagos que se correlaciona con una disminución en la proliferación de las células de la mucosa por bloqueo del ciclo celular en fase S.⁹²

4.1.5 Acción combinada de probióticos

En la actualidad se sabe que el efecto de los probióticos es mayor cuando se administran de forma conjunta con otras cepas probióticas, con prebióticos, como algunos carbohidratos, o con polifenoles.⁹³ Por ejemplo, la combinación de un fructooligosacárido como la inulina con cepas de *L. rhamnosus* y *B. lactis* aumenta el número de cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* existentes en la microbiota intestinal y disminuye la población de *C. perfringens*, dando lugar a una menor incidencia de patologías del tracto gastrointestinal.⁹⁴ A su vez, la combinación de un extracto de arándanos con *B. infantis*, o con una mezcla de *L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. plantarum*, produce un aumento en el peso de ratas Wistar y en él de su contenido fecal, que además contiene una menor cantidad de enterobacterias. Como consecuencia de esta observación los cambios en la microbiota intestinal se han asociados con una mejora en los procesos de fermentación y absorción intestinal en modelos de ratas Wistar.⁹⁵

También se ha observado que las modificaciones en la microbiota intestinal (colonización por bacterias beneficiosas, disminución de la inflamación de la mucosa del colon y producción de compuestos anticancerígenos) van acompañadas en muchas ocasiones de alteraciones en la actividad de diferentes disacaridasas intestinales, tales como la sacarasa, la lactasa o la isomaltasa.^{96,94} Como ejemplo podemos citar que se ha descrito que la alimentación de ratas con dietas suplementadas con un combinado de inulina y cepas probióticas como *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. bifidum*, *B. longum* y *S. thermophilus*, incrementa la actividad de dichas enzimas tras el tratamiento.⁹⁷

Por último, se ha demostrado que la alimentación con la combinación de *B. lactis* y un extracto de carbohidratos no digeribles reduce el número de lesiones preneoplásicas en ratas. Sin embargo, esta reducción no se observa cuando se alimentan los animales solamente con el probiótico, lo que indica una acción sinérgica entre el extracto de carbohidratos no digerible y la cepa *B. lactis*.⁹⁸

5. APOPTOSIS

En todos los organismos multicelulares adultos debe existir un equilibrio entre la proliferación y muerte de las células, con el objetivo de mantener un tamaño constante. Cuando este equilibrio se altera se desencadenan situaciones patológicas como el cáncer, en él que la proliferación de las células se encuentra aumentada, o las enfermedades degenerativas, en las que los procesos de muerte celular están incrementados. Por lo tanto, la muerte celular programada es parte de los procesos fisiológicos que son necesarios para el correcto funcionamiento del organismo.⁹⁹ Atendiendo a sus características morfológicas se distinguen al menos 4 tipos de muerte celular: necrosis, apoptosis, autofagia y catástrofe mitótica.¹⁰⁰

Kerr, Wyllie y Currie¹⁰¹ describieron en 1972 una forma de muerte celular sin inflamación asociada a la que denominaron apoptosis, que era diferente del proceso de muerte celular con inflamación asociada conocido hasta entonces y que se denominaba necrosis⁹⁹. Los cambios estructurales más destacados en la muerte por apoptosis son (Fig. 9):¹⁰²

- Las células se vuelven redondeadas y disminuyen de tamaño (picnosis).
- Se produce una retracción de los pseudópodos.
- La cromatina se condensa y se degradan los núcleos (cariorrresis)
- En la superficie de la célula aparecen unas invaginaciones a modo de burbujas (*blebbing*) aunque la membrana se mantiene íntegra hasta el final del proceso y los orgánulos no cambian de tamaño.
- Las células se rompen en fragmentos, dando lugar a los cuerpos apoptóticos.
- *In vivo* los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos que segregan citoquinas que inhiben la inflamación.

Con frecuencia los términos apoptosis y muerte celular programada se han empleado indistintamente. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que apoptosis y muerte celular programada no son estrictamente sinónimos, ya que la muerte celular programada puede ocurrir en ausencia de los cambios estructurales típicos de la apoptosis.¹⁰⁰

Los cambios más destacados en la muerte por necrosis son (Fig 9):¹⁰³

- La capacidad de la membrana para controlar el paso de los iones y agua esta alterada, por lo tanto las células ganan tamaño (oncosis) y sus orgánulos se hinchan.
- Las membranas de las células se rompen y su contenido se vierte al espacio intercelular.
- Se produce la inflamación de los tejidos adyacentes a las células.

La muerte celular por autofagia se caracteriza morfológicamente porque ocurre sin condensación de la cromatina pero con secuestro del material citoplasmático en vacuolas (autofagosomas) que se fusionan con los lisosomas para formar autolisosomas cuyo contenido se degrada.¹⁰⁰ La vacuolización del citoplasma es por tanto la característica principal de este tipo de muerte celular programada.

La catástrofe mitótica es un tipo de muerte celular que se produce como consecuencia de la segregación anormal de cromosomas o fragmentos de cromosomas durante la metafase, lo que provoca alteraciones morfológicas como la micronucleación y multinucleación de las células.¹⁰⁰

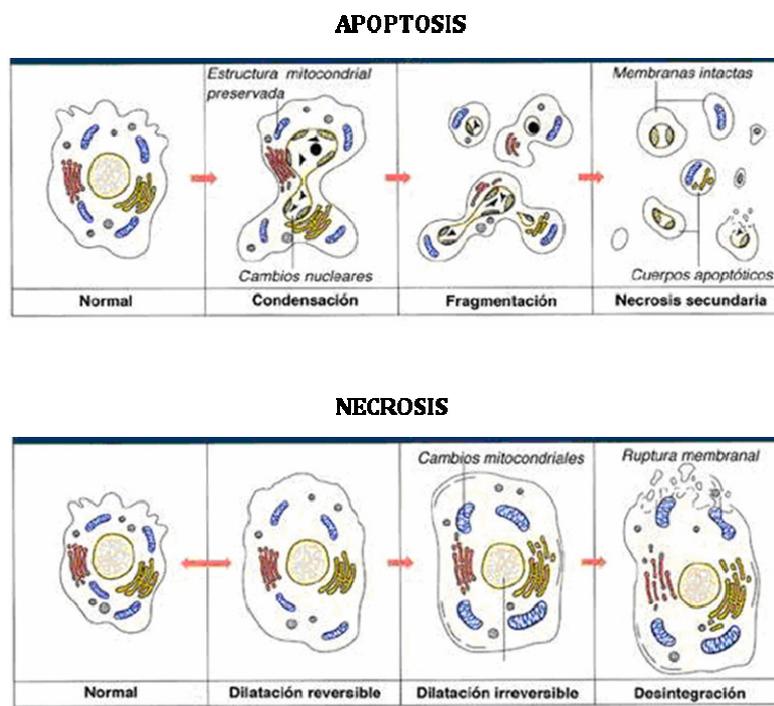


Figura 9. Características morfológicas de la muerte celular por necrosis y apoptosis. Adaptada de www.retina.umh.es

5.1 LAS CASPASAS Y SU FUNCIÓN EN LA APOPTOSIS

Las caspasas son enzimas proteolíticas pertenecientes a la familia de las cisteín-proteasas involucradas en la apoptosis y activación de citoquinas proinflamatorias. Estas enzimas, que atacan a sus proteínas diana cortándolas en secuencias específicas que contienen un residuo de aspartato, son claves en la traducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por una diversidad de estímulos.¹⁰⁴ En situaciones normales son sintetizadas como precursores inactivos, procaspasas, que necesitan ser cortadas para su activación. Las procaspasas contienen tres dominios estructurales que se separan por digestión proteolítica: uno N-terminal y otros dos que dan origen a las subunidades grande (p20) y pequeña (p10) de la caspasa activa.¹⁰⁵ De acuerdo con la estructura del prodominio N-terminal se distinguen dos clases de procaspasas:¹⁰⁶ las procaspasas de clase I o iniciadoras, que contienen un prodominio grande, y las de clase II o efectoras, con el prodominio pequeño o ausente. Las procaspasas 1, 2, 8, 9 y 10 pertenecen a la clase I y las procaspasas 3, 6 y 7 a la clase II. Los prodominios N-terminales de las caspasas de clase I contienen motivos de reclutamiento de caspasas (CARD) o efectores de muerte (DED) a través de los que interaccionan con receptores de muerte, como en el caso de la caspasa 8, o con proteínas reguladoras, como APAF-1 en el caso de la caspasa 9.¹⁰⁷ Como resultado de estas interacciones se produce la activación de las caspasas iniciadoras, que a su vez activan por digestión proteolítica las caspasas efectoras.¹⁰⁸ Las caspasas efectoras tienen como sustrato a numerosas proteínas entre las que se encuentran ICAD, un inhibidor de la nucleasa responsable de la fragmentación del DNA en la apoptosis, lamininas de la envoltura nuclear, proteínas del citoesqueleto e inhibidores de apoptosis de la familia Bcl-2, por lo que su activación conduce a la condensación de la cromatina, a la fragmentación del DNA cromosómico, a la fragmentación nuclear y de orgánulos citoplasmáticos y a la formación de cuerpos apoptóticos.¹⁰⁹

5.2 VÍAS DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

Existen dos vías principales por las cuales se activa la apoptosis:

Vía intrínseca o mitocondrial: Esta vía es activada por señales procedentes del interior de la célula, como el estrés oxidativo o el daño en el DNA inducido por radiaciones o agentes químicos. Estas señales del interior de la célula inician un proceso de muerte celular programada que comienza con la salida del citocromo c de la mitocondria.¹¹⁰ En el citoplasma el

citocromo c enlaza con Apaf1 y la caspasa 9 formando el apoptosoma. La formación de este complejo activa a la caspasa 9, que a su vez activa a las caspasas 3, 6 y 7 dando lugar a la apoptosis¹¹⁰ (Fig 12). La familia de proteínas Bcl-2 regula la permeabilidad de la membrana mitocondrial y, por tanto, la salida del citocromo c. Esta familia está formada por varios miembros, algunos antiapoptóticos como Bcl-2 y Bcl-XL y otros proapoptóticos como Bax, Bcl-Xs o Bid. Estas proteínas, que promueven o inhiben la liberación del citocromo c, pueden realizar sus funciones de forma conjunta o independiente.

Vía extrínseca o receptores de muerte: La activación de la vía apoptótica extrínseca se lleva a cabo por la unión de un ligando de la familia de los factores de necrosis tumoral (TNF) a uno de los receptores de muerte en la superficie celular. En la familia TNF podemos encontrar hasta 19 ligandos diferentes, entre los que podemos destacar el propio TNF- α , Fas-L y TRAIL. Los receptores de estas moléculas son proteínas transmembrana que tras la unión con su ligando trimerizan. La trimerización del receptor permite el reclutamiento, a través de su porción intracelular, de un complejo proteico que contiene proteínas adaptadoras que contienen dominios de muerte. Estas proteínas adaptadoras permiten la unión sobre el complejo de las caspasas -8 y -10. Como resultado estas caspasas se activan y pueden a su vez activar a otras caspasas efectoras.¹¹¹ Junto con su capacidad para activar a otras caspasas efectoras, la caspasa-8 puede también inducir la ruptura de Bid dando lugar a la forma truncada de Bid (t Bid). Esta forma truncada interactúa con otros miembros de la familia Bcl-2 e induce la liberación del citocromo c desde la mitocondria, conectando así la vía extrínseca con la intrínseca durante el proceso de inducción de apoptosis (Fig 10).¹¹¹

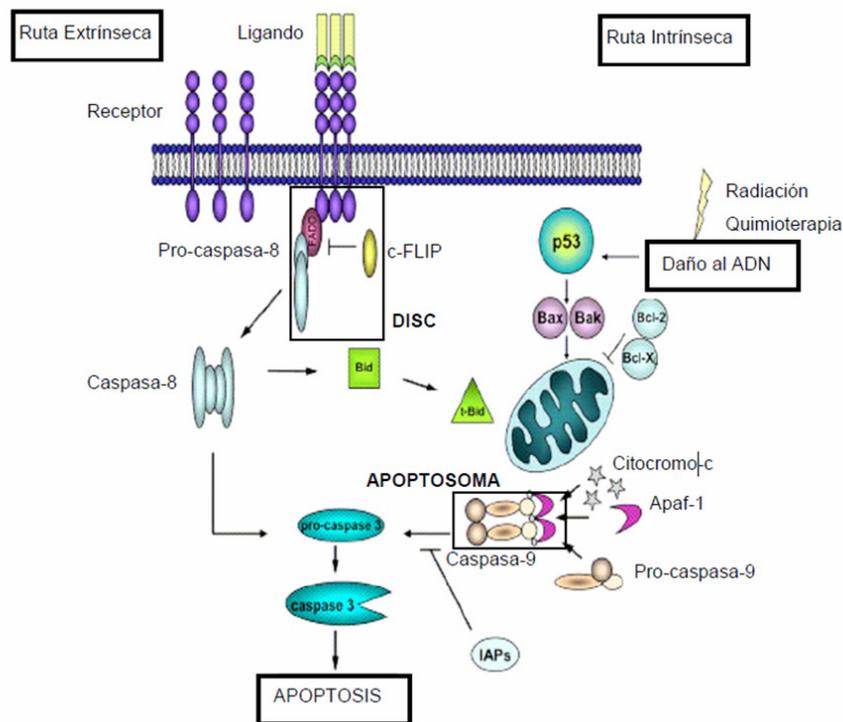


Figura 10. Vía intrínseca y vía extrínseca de la apoptosis. Adaptada de Mom, 2006¹¹²

6. CICLO CELULAR

El ciclo celular es la secuencia cíclica de procesos que ocurren en la vida de una célula eucariota que conserva la capacidad de dividirse. Es por tanto el mecanismo a través del cual los seres vivos se reproducen. En los organismos unicelulares la división celular implica una verdadera reproducción, ya que a partir de una célula madre se obtienen dos células hijas que maduran y se convierten en dos individuos distintos. En los organismos multicelulares se requieren muchos más ciclos de división celular para el desarrollo de un individuo. Además, en los organismos pluricelulares la división celular también es necesaria para reemplazar las células perdidas por desgaste, mal funcionamiento o por muerte celular programada. Es importante señalar que en las células somáticas, las células generadas son genética, estructural y funcionalmente idénticas tanto a la célula materna como entre sí, a menos que hayan sufrido mutaciones. Las células nuevas heredan un duplicado exacto de la información genética de la célula materna. Para que esto suceda es necesario que la célula lleve a cabo una serie de procesos citoplasmáticos y nucleares.¹¹³

6.1 FASES DEL CICLO

Durante el transcurso del ciclo celular, cuya duración varía entre los diferentes tipos de células eucariotas, pueden distinguirse dos grandes periodos: uno de división, también llamado fase M, y otro de interfase, que es el periodo de tiempo que transcurre entre dos divisiones. Durante la interfase la célula crece en tamaño y duplica su contenido en DNA y proteínas, preparándose para la siguiente división. Se subdivide en tres períodos: G1, que es el intervalo de tiempo que transcurre entre el final de la fase M y el inicio de la síntesis de DNA, S, de síntesis de DNA, y G2, que es el periodo que transcurre entre el final de la replicación y el inicio de la división. Durante la división tienen lugar la división nuclear, o mitosis, en la que se produce la separación de los cromosomas homólogos previamente replicados, y la división del citoplasma, o citocinesis, en dos células hijas. Tras la citocinesis de la división anterior, una vez en G1, la nueva célula es pequeña y posee poco ATP como consecuencia del gasto experimentado en la división anterior, por lo que en este periodo las células crecen, sintetizan proteínas y acumulan ATP. Al final de esta etapa existe un punto de control, conocido como punto de restricción (punto R o Start), en él que las células pueden detener su crecimiento hasta que se encuentran en condiciones de pasar a la siguiente fase. En este estadio las células pueden salir del ciclo celular y entrar un estado de quiescencia, denominado G0, en él que pueden pasar toda su vida y del que sólo ocasionalmente salen para proseguir el ciclo celular. Superado el punto de restricción comienza la fase S, en la que se duplica el material genético. Dado que el proceso de síntesis de DNA consume una gran cantidad de energía, una vez finalizada la replicación la célula entra nuevamente en un proceso de crecimiento y adquisición de ATP, la fase G2, observándose cambios en la estructura celular que indican el comienzo de la división celular. Esta fase, que finaliza cuando los cromosomas comienzan a condensarse al inicio de la mitosis, contiene otro punto de control conocido como punto de control G2-M. Puede decirse por tanto que la formación de los dos genomas durante el ciclo celular se produce a nivel molecular durante la fase S de síntesis del DNA y a nivel celular durante la mitosis. Para asegurar el correcto funcionamiento del ciclo celular, es decir, que cada nueva célula hija reciba un genoma completo, tanto el inicio y progresión de la fase S como la mitosis deben ser controladas de forma muy precisa.¹¹⁴

6.2 REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

El sistema de control del ciclo celular está formado por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La familia de las CDKs incluye 26 genes (CDK1-CDK10, CDK11A, CDK11B, CDK12-CDK20 y CDKL1-CDKL5). Todas las CDKs son serin-treonin quinasas cuya activación se ha relacionado en algunos casos con el control del ciclo celular, y en otros con él de la transcripción, de la diferenciación o de la apoptosis. Excepto en el caso de las CDKLs que son independientes de ciclina, su actividad se regula mediante su unión a ciclinas: mientras que la unión con las ciclinas activa a las CDKs¹¹⁵ e inicia una cascada de fosforilaciones que impulsa el ciclo celular,^{116,117} en ausencia de ciclina las CDKs son inactivas.

Las ciclinas son proteínas sintetizadas durante la interfase y eliminadas al final de la mitosis de cada ciclo celular. Actúan como reguladores de la actividad enzimática de las CDKs y su concentración va variando a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular.^{118,119} Hay descritos 4 grandes tipos de ciclinas que se unen a las CDKs y actúan en las diferentes fases del ciclo celular: ciclinas de tipo D (D₁, D₂, D₃), que actúan en la fase G1 del ciclo celular, ciclinas de tipo E (E₁, E₂), que actúan al final de la fase G1 y en el progreso G1/S, ciclinas de tipo A (A₁, A₂), que actúan en la fase S y principio de la fase G2, y ciclinas de tipo B (B₁, B₂), que actúan en la fase G2¹²⁰. Las ciclinas se unen preferentemente a una o dos CDKs concretas (Fig 14). Las ciclinas de tipo D se unen a CDK4 y CDK6, las ciclinas de tipo E se unen a CDK2, las ciclinas de tipo A se unen a CDK2 y CDK1 y las ciclinas de tipo B a se unen CDK1. El aumento o disminución de de los niveles de ciclinas es por tanto el determinante principal de la actividad de las CDKs durante el progreso del ciclo celular.

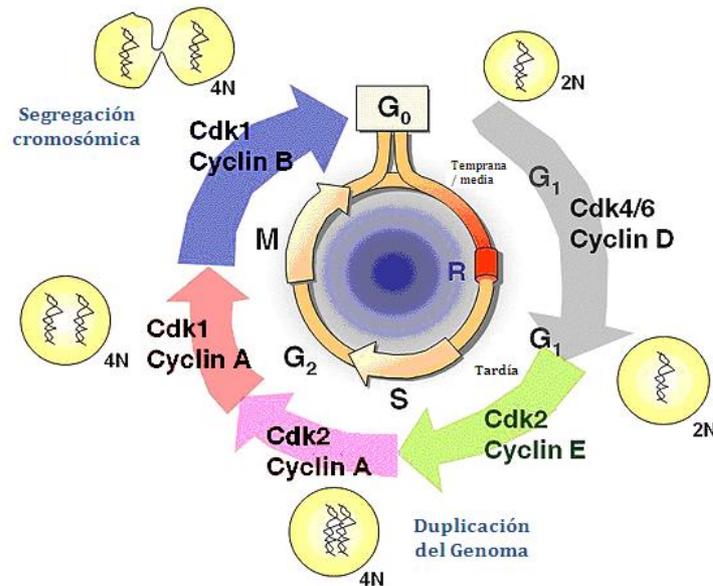


Figura 14. Regulación del ciclo celular mediado por quinasas dependientes de ciclinas. Adaptada de sciencewatch.com. Malumbres 2010.

Además de ser regulada mediante su unión con ciclinas, la actividad de las CDKs también es regulada mediante su unión con otras proteínas: los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs). Los CKIs son proteínas inhibidoras de las CDKs implicadas en la parada del ciclo celular en respuesta a señales antiproliferativas, como la ausencia de factores de crecimiento, las citoquinas o el daño en el DNA. Hay dos familias de CKIs: la familia CIP/KIP y la familia INK4.¹²¹

La familia CIP/KIP incluye tres proteínas estructuralmente relacionadas entre sí: p21, p27 y p57. Sus miembros inhiben la actividad quinasas de los complejos CDK2/ciclina E, CDK4/ciclina D, CDK6/ciclina D, CDK2/ciclina A y CDK1/ciclina B.¹²² La proteína p21 bloquea el ciclo celular en G1/S, uniéndose a los complejos CDK4/ciclina D y CDK2/ciclina E. Esta parada del ciclo celular permite a la célula reparar el DNA dañado antes de replicarse. La proteína p21 tiene un papel esencial en respuesta a diferentes situaciones de estrés celular y se incrementa en estas situaciones, especialmente tras el daño en el DNA, ya que su síntesis está regulada por la proteína supresora de tumores p53,¹²³ cuya actividad aumenta cuando el DNA está dañado.¹²⁴ Por otro lado la proteína p27 regula señales inhibidoras del crecimiento y la proteína p57 tiene una ruta de expresión tejido-específica, lo que indica su papel especializado en el control del ciclo celular.¹²³

La familia INK4 está formada por cinco proteínas: p14, p15, p16, p18 y p19. A diferencia de las proteínas de la familia CIP/KIP, que se unen a complejos CDK/ciclina, la familia INK4 se une sólo a CDK en el sitio de unión de las ciclinas e inhiben a CDK4 y CDK6, implicadas en el control del ciclo celular en la fase G1.¹²⁵

6.3 VÍA AMPK DE PROLIFERACIÓN Y SUPERVIVENCIA CELULAR

La proteína AMPK forma parte de la subfamilia de proteína-quinasa activadas por AMP/SNF1. Sus efectos más estudiados son la inhibición de rutas anabólicas, la activación de rutas catabólicas, la parada del ciclo celular y la inducción de apoptosis. Debido a estos efectos se ha propuesto a la AMPK como marcador metabólico.

La AMPK es un complejo heterotrimérico que consta de una subunidad catalítica α y dos subunidades reguladoras β y γ . Existen dos isoformas conocidas de las subunidades α y β , mientras que de la γ se han descrito tres. Debido a las distintas combinaciones de las isoformas se han descrito 12 complejos distintos que presentan diferencias en su actividad, regulación y localización celular.^{126,127} La AMPK se activa en situaciones que incrementan la relación AMP/ATP, como la hipoxia, los choques térmicos, el ejercicio y los niveles bajos de glucosa. Desde un punto de vista molecular la AMPK se activa alostéricamente por unión con AMP. Su fosforilación por diferentes quinasas también incrementa su actividad.¹²⁸ La activación de la AMPK regula distintos procesos metabólicos en la célula (Fig12), entre los que se incluyen la síntesis de proteínas y el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos. La activación de la AMPK en células tumorales suprime el crecimiento tumoral, mientras que su pérdida fomenta la progresión del tumor. Este fenómeno se debe, al menos en parte, a la regulación de las vías metabólicas celulares,¹²⁹ ya que la AMPK inhibe la glucólisis aeróbica y la síntesis de proteínas. Además, tras la incubación de las células tumorales con AICAR, un activador de la AMPK, se han detectado alteraciones en SGLT-1 que están relacionadas con la expresión de la AMPK.¹³⁰ Por otro lado, la proliferación y el ciclo celular están ampliamente relacionados con el metabolismo de proteínas. Se ha propuesto que la activación de la AMPK inhibe la síntesis de proteínas, necesaria para la proliferación y el progreso del ciclo celular, porque disminuye la actividad de mTOR¹³¹ a través de sus acciones sobre TSC2 y Raptor.^{132,133} Sus efectos sobre el ciclo también son debidos a su capacidad para fosforilar a p53 en la Ser15. En condiciones normales p53 es ubiquitinado y degradado rápidamente, pero cuando se fosforila incrementa su estabilidad. Ello

conlleva un aumento de los niveles de p21^{CIP1} con parada del ciclo celular^{134,135} y/o inducción de apoptosis mediante la regulación de distintos genes de la familia Bcl-2.¹³⁶

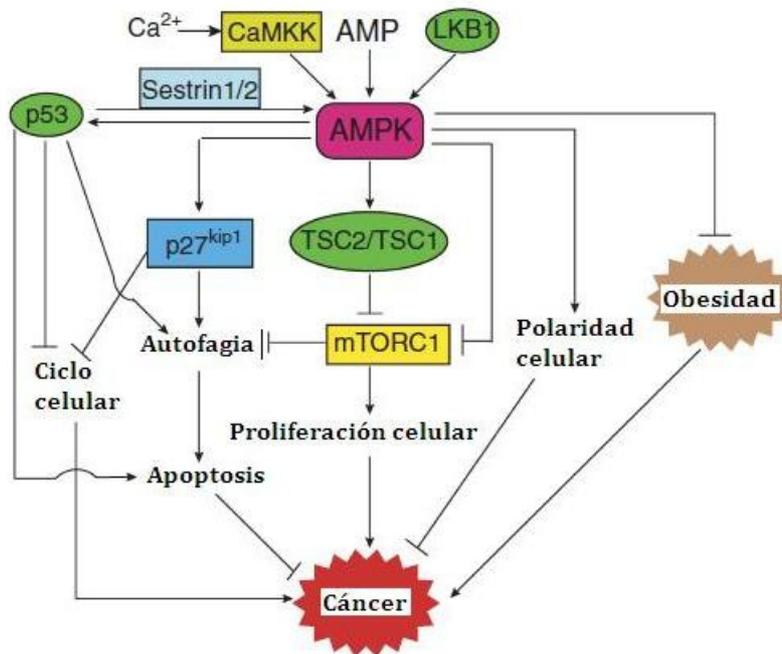


Figura 12. Activación de la AMPK proteína quinasa en cáncer. Adaptada de Wang, 2009

OBJETIVOS

La alimentación y la nutrición, junto con la actividad física, se encuentran entre los factores más determinantes para el desarrollo de enfermedades como el cáncer colorrectal,⁹² que en un 90% de los casos está asociado a una dieta alta en grasas y baja en fibra.¹⁷ Los alimentos además de aportar nutrientes, contienen una serie de sustancias no nutritivas, conocidas como fotoquímicos,¹³⁷ que no son consideradas esenciales para la salud humana, pero que pueden tener un efecto importante en el desarrollo de enfermedades.¹³⁸ Entre los fitoquímicos más estudiados se encuentra la quercetina, un flavonoide que disminuye la proliferación celular en cultivos de células de cáncer de colon HT-29 con bloqueo del ciclo celular e inducción de apoptosis dependiente de p53, efectos que se producen como consecuencia de la fosforilación de la AMPK en su subunidad α .^{139,140}

Los probióticos son bacterias grampositivas que se clasifican fundamentalmente en dos géneros: *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.⁷³ Entre los retos principales de la investigación con probióticos se encuentran la determinación de los mecanismos responsables de su eficacia, la definición de las diferentes cepas probióticas con efectos beneficiosos⁹⁶ y el análisis de su posible sinergia con compuestos fotoquímicos.¹⁴¹ Por ello en este trabajo nos proponemos analizar el efecto de los probióticos *B. bifidum*¹⁴² y *L. gasseri*,⁹² y su posible sinergia con él de la quercetina, sobre la viabilidad celular y la absorción y transporte de azúcares y péptidos en células humanas de adenocarcinoma de colon. Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar el efecto de la quercetina, de los probióticos *B. bifidum* y *L. gasseri* y de las combinaciones de quercetina y probióticos sobre la actividad de enzimas con actividad glucosidasa, como la sacarasa, o peptidasa, como la aminopeptidasa N y la dipeptidilpeptidasa IV, en cultivos de células humanas de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2.
2. Analizar el efecto de la quercetina, de los probióticos *B. bifidum* y *L. gasseri* y de las combinaciones de quercetina y probióticos sobre la expresión del transportador de azúcares SGLT-1 y del transportador de péptidos PEPT-1 en cultivos de células humanas de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2.
3. Analizar el posible efecto citotóxico de los probióticos *B. bifidum* y *L. gasseri* y de sus combinaciones con quercetina en cultivos de células humanas de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2.

4. Analizar el efecto de los probióticos *B. bifidum* y *L. gasseri* y de sus combinaciones con quercetina sobre la apoptosis, el ciclo celular y la expresión de proteínas relacionadas con la carcinogénesis en cultivos de células humanas de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Como se ha comentado con anterioridad, este estudio pretendía analizar el efecto que ejercen dos cepas de bacterias lácticas, *B. bifidum* y *L. gasseri*, complementadas y sin complementar con quercetina en células de adenocarcinoma de colon y comparar este efecto con el de la quercetina en las mismas células. Todos los parámetros cuya posible modificación se pretendía analizar están relacionados con la viabilidad celular y entre ellos se incluyen la capacidad de proliferar, la capacidad de transportar nutrientes al interior de la célula, el tipo de muerte celular inducida por los tratamientos, el efecto sobre el ciclo celular y, por último, el efecto sobre la expresión de algunas proteínas relacionadas con el control del ciclo y la muerte de las células.

Como modelo para llevar a cabo los experimentos se escogieron dos líneas celulares humanas de adenocarcinoma de colon, HT-29 y Caco.2. Las características principales de estas dos líneas celulares, que tienen diferente grado de diferenciación, se describen en el apartado 2.1 de la sección Material y Métodos. Durante el periodo de experimentación los cultivos celulares se mantuvieron en fase de crecimiento exponencial, en frascos de cultivo de 75 cm² de superficie, con medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con suero bovino fetal al 10% (Material y Métodos, apartado 2.2). Para garantizar el crecimiento exponencial las células se subcultivaron cada vez que los cultivos alcanzaban el 80% de confluencia (Material y Métodos, apartado 2.3).

Los ensayos de proliferación celular se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos y el resto de los experimentos se realizaron en frascos de cultivo de 25 cm² o en placas de 6 pocillos. Durante los tratamientos experimentales, de 24 horas de duración, el medio de cultivo, DMEM/F12 suplementado con suero bovino fetal, se sustituyó por DMEM/F12 suplementado con ITS (Material y Métodos, apartado 2.2). En todos los experimentos se sembraron seis grupos de células: uno de células sin tratar (células control), uno de células tratadas con quercetina, uno de células tratadas con *B. bifidum*, uno de células tratadas con *L. gasseri*, uno de células tratadas con *B. bifidum* complementado con quercetina y otro de células tratadas con *L. gasseri* complementado con quercetina. Trascorridas las 24 h de tratamiento se realizaron las determinaciones apropiadas en todos y cada uno de los grupos de cultivo.

Para valorar el efecto de los tratamientos en la proliferación celular se analizó la capacidad de las células para reducir MTT (Material y Métodos, apartado 5.1). Para valorar la capacidad de

transportar nutrientes al interior de la célula se determinaron en los cultivos las actividades sacarasa (Material y Métodos, apartado 4.1), dipeptidildipeptidasa IV y aminopeptidasa N (Material y Métodos, apartado 4.2) y el nivel de expresión de los transportadores de dipéptidos PEPT-1 y de glúcidos dependiente de sodio SGLT-1. La estimación de los niveles de expresión de los transportadores se realizó por *western blot* (Material y Métodos, apartado 7.2.1). Para analizar si los tratamientos inducían la muerte de las células en los cultivos se cuantificó, mediante TUNEL, el tanto por ciento de células apoptóticas presentes en los cultivos (Material y Métodos, apartado 5.2), mientras que para valorar la posible participación de caspasas en el proceso de muerte celular se repitió la cuantificación en presencia del inhibidor universal de caspasas Z-VAD-FMK (Material y Métodos, apartado 5.3). También se determinó en los cultivos, por fluorimetría, la actividad caspasa 3 (Material y Métodos, apartado 5.4). Para analizar el efecto de los tratamientos sobre el ciclo celular se determinó el tanto por ciento de células que se encontraban en cada una de las fases del ciclo celular. Esta determinación se realizó cuantificando, por citometría de flujo con Ioduro de Propidio, el contenido en ADN de las células (Material y Métodos, apartado 6). Finalmente, para profundizar en el efecto de los tratamientos sobre el ciclo celular y sobre el mecanismo de inducción de muerte celular se determinaron por *western blot* los niveles intracelulares de las proteínas p-AMPK α , p53, p21, Bcl-2 y Bax (Material y Métodos, apartado 7.2.2)

2. CULTIVO CELULAR DE LÍNEAS HT-29 Y CACO.2

2.1 Descripción de líneas celulares de adenocarcinoma de colon

En este trabajo se utilizaron las líneas celulares tumorales de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2. Estas líneas celulares se obtuvieron de la *American Type Culture Collection* (ATCC), y fueron suministradas por *LGC Standards S.L.U.* (Barcelona, España).

Fogh y Trempe en 1975 establecieron las líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano HT-29 y Caco.2.¹⁴³ Las células HT-29 forman cultivos heterogéneos que contienen subpoblaciones de células con diferente grado de diferenciación. En condiciones estándar de cultivo, la población de células HT-29 contiene más de un 95% de células morfológicamente indiferenciadas. Durante su crecimiento estas células se apilan formando multicapas sin polarización ni expresión de los marcadores de diferenciación, característicos de las células adultas del epitelio intestinal. Sin embargo, el resto de la población (5-10%) desarrolla

características de células diferenciadas que expresan enzimas tales como la aminopeptidasa N (APN), la dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV), la glicoproteína de membrana MUC1 y otras mucinas. Las células HT-29 presentan mutaciones en los genes *APC* (Adenomatous polyposis coli) y *TP53* (gen supresor de tumores), con la consiguiente alteración de sus funciones y amplificación del protooncogén *MYC*.¹⁴⁴

A nivel morfológico, las células Caco.2 presentan propiedades de diferenciación *in vitro* similares a las poblaciones derivadas de las células HT-29 diferenciadas. Cuando se encuentran en fase de crecimiento, próxima a la confluencia, dejan de proliferar y desarrollan una monocapa de células polarizadas con un fenotipo absortivo. En estas condiciones destaca la presencia de un borde en cepillo, mejor definido que el de las poblaciones diferenciadas de HT-29, en él que se detectan niveles reducidos de lactasa y elevados de sacarasa-isomaltasa, aminopeptidasa y dipeptidilpeptidasa IV o fosfatasa alcalina.¹⁴⁵ Las células Caco.2, como las células HT-29, también presentan mutaciones en los genes *APC* y *TP53*.

2.2 Mantenimiento de los cultivos celulares

El cultivo de las células se realizó en frascos de 75 cm² (Nunc, Thermo Scientific, IL, EE.UU.) y en estufa a 37°C de temperatura con una atmosfera con un 5% de CO₂ y un 96% de humedad relativa. Los cultivos se mantuvieron en Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Invitrogen), L-glutamina 2mM y penicilina/estreptomicina al 1% (Lonza Biologics Ins, EE.UU.). Previamente a su utilización el suero bovino fetal (SFB) se descomplementó por incubación a 56°C durante 30 minutos. Para mantener el crecimiento exponencial y el cultivo en monocapa los medios se sustituyeron cada 48 horas y las células se subcultivaron por tripsinización al alcanzar el 80% de confluencia.

Durante los tratamientos experimentales con quercetina, con los probióticos, *B. bifidum* o *L. gasseri*, o con la combinación de la quercetina y los probióticos, el medio de cultivo se sustituyó por DMEM/F12 sin suero bovino fetal, que se suplementó con 0,01mg/mL de transferrina, 0,01mg/mL de insulina, 0,01µg/mL de selenio (ITS), piruvato sódico al 2% y L-glutamina 2mM (Lonza Biologics Ins, EE.UU.).¹⁴⁶

2.3 Protocolo de subcultivo

El mantenimiento de los subcultivos se llevó a cabo por tripsinización. Con este fin:

- Una vez que las células HT-29 o Caco.2 alcanzaron el 80% de confluencia en el frasco de cultivo, se retiró el medio de cultivo por aspiración con una pipeta Pasteur y se lavaron las células con 10 mL de PBS.
- Se añadieron al frasco 3mL de una solución de tripsina (0,05 *Trypsin- EDTA* (1X), Gibco by life Technologies-Invitrogen) y se incubaron las células durante 5 minutos a 37°C, con un 5% de CO₂ y un 96% de humedad relativa.
- Tras la incubación con la tripsina se añadieron 7mL de medio DMEM/F12 suplementado con suero bovino fetal al 10%, con el fin de inactivar la acción de la tripsina.
- Se transfirió la suspensión celular a tubos tipo Falcon de 15mL y se recogieron las células por centrifugación a 300 g durante 5 minutos.
- Una vez obtenido el precipitado celular se resuspendió en 4mL de medio DMEM/F12 suplementado con suero bovino fetal al 10% y se contaron las células en una cámara de Neubauer.

3. PREPARACIÓN DE LA QUERCETINA Y LOS PROBIÓTICOS EN ESTUDIO

3.1 Preparación de la quercetina

El flavonoide quercetina (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxi-flavona dihidratada, > 99% pureza) se obtuvo del laboratorio Sigma-Aldrich Química, S.A. (Alcobendas, Madrid, España).

La quercetina se disolvió inicialmente en dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Química, S.A) a una concentración de 0,1 M. La solución obtenida se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22 micras (Milipore Ibérica S.A.U, España). A partir de ésta solución de stock, se prepararon diluciones seriadas (10⁻³, 10⁻⁴, 5x10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷M) en el medio de cultivo DMEM/F12 sin suplementar. Estas disoluciones se almacenaron a -20 °C hasta su posterior utilización.

3.2 Preparación de los probióticos

Los probióticos *B. bifidum* CECT 870 y *L. gasseri* CECT 4479 se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), (Valencia).

La cepa *L. gasseri* se creció en agar MRS líquido (Scharlau Chemie S. A) a 37° C durante 48 horas. Los cultivos de *B. bifidum* también se crecieron en agar MRS líquido a 37° C durante 48 horas pero manteniéndolos en una atmósfera con un 5% de CO₂ y un 96% de humedad relativa. Posteriormente las bacterias se recogieron por centrifugación a 1200 g durante 10 minutos, se lavaron con 5 mL de PBS y se resuspendieron en medio de cultivo DMEM/F12 sin suplementar. La suspensión bacteriana se cuantificó por espectrofotometría de luz visible (600nm, UV-1630 UV-Visible Spectrophotometer de Shimadzu Kyoto, Japón) de acuerdo a una curva estándar previamente preparada (Mc Farland).¹⁴⁷

4. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE COLON

4.1 Determinación de la actividad sacarasa

La determinación de la actividad sacarasa se realizó en extractos de células HT-29 y Caco.2. La determinación se llevó a cabo según el método GOD-PAP descrito por Dahlqvist en 1964.¹⁴⁸ Este método se basa en la medida de la cantidad de glucosa liberada a partir de la hidrólisis del disacárido sacarosa por la acción del complejo enzimático sacarasa-isomaltasa localizado en el borde en cepillo del enterocito. La cuantificación de la glucosa se realiza siguiendo espectrofotométricamente a una longitud de onda de 500 nm la oxidación de la glucosa por medio de la enzima glucosa oxidasa (Glucose GLUC-PAP, Randox Laboratories LTD) (Fig. 13).

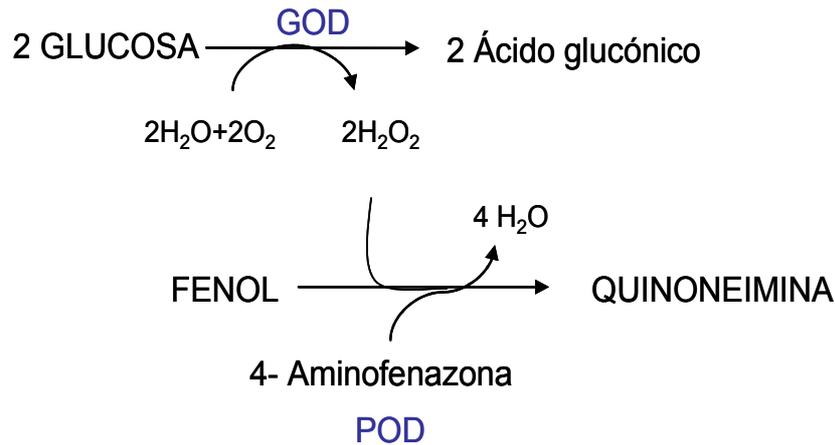


Figura 13. Descripción del método GOD-PAP. Este método consta de dos reacciones catalizadas por la glucosa oxidasa y una peroxidada.

El análisis de la actividad sacarasa se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- Se incubaron las células HT-29 o Caco.2 en DMEM/F12 suplementado con ITS, piruvato sódico al 2% y L-glutamina 2mM, en placas de 6 pocillos, a una concentración de 10^6 células por pocillo, durante 24 horas.
- Tras las 24 horas se añadieron al medio de cultivo la quercetina, a concentración $100 \mu\text{M}$, los probióticos, a una concentración de 10^7 ufc/mL o la combinación de quercetina y probióticos y se continuó la incubación durante 24 horas.
- Trascorridas las 24 horas de tratamiento, las células se lavaron con 1mL de PBS.
- Después de lavar las células con PBS se añadieron $500 \mu\text{L}$ de *Passive Lysis Buffer* (1x) (Promega Corporation, U.S.A) a cada pocillo y se continuó la incubación durante 15 minutos con agitación (20 rpm, Vibromix Tehtnica) a temperatura ambiente con el fin de soltar y lisar las células HT-29 y Caco.2 de la superficie de los pocillos.
- Tras la incubación con el tampón de lisis, se centrifugó la suspensión celular a 300 g, durante 5 minutos a 4°C .
- Tras la centrifugación, se recogieron los sobrenadantes de las células y se cuantificó la concentración de proteína. La cuantificación de proteína se realizó por el método Bradford (Apartado 7.1).
- Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el posterior análisis de la actividad enzimática de la sacarasa.
- Las muestras se descongelaron en hielo durante aproximadamente 15 minutos.

- Una vez descongeladas las muestras de las células HT-29 y Caco.2, se incubaron 100 μL de la muestra de las células HT-29 o Caco.2 con 100 μL del tampón disacárido (56mM sacarosa) durante 1 hora a 37° C.
- Tras la incubación con el tampón disacárido se añadió 1mL del reactivo *GOD-PAP* y se continuó la incubación durante 15 minutos a 37° C.
- Finalmente, y una vez transcurrida la incubación con el reactivo *GOD-PAP*, se pasó a la lectura de las muestras con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 500nm (UV-1630 UV-Visible Spectrophotometer de Shimazu Kyoto, Japón).

Los valores obtenidos se expresaron como actividad específica de la enzima sacarasa en las células HT-29 y Caco.2, tras el tratamiento con quercetina, o con los probióticos, o con la combinación de la quercetina y los probióticos.

4.2 Determinación de la actividad de la aminopeptidasa N y la dipeptidilpeptidasa IV

La determinación de la actividad enzimática de la aminopeptidasa N y de la dipeptidilpeptidasa IV, enzimas ancladas en la membrana de borde en cepillo de los enterocitos, se basa en la cuantificación por fluorimetría de la β -naftilamida, que se libera al hidrolizar las dipeptidasas sus sustratos específicos (Fig. 14).¹⁴⁹

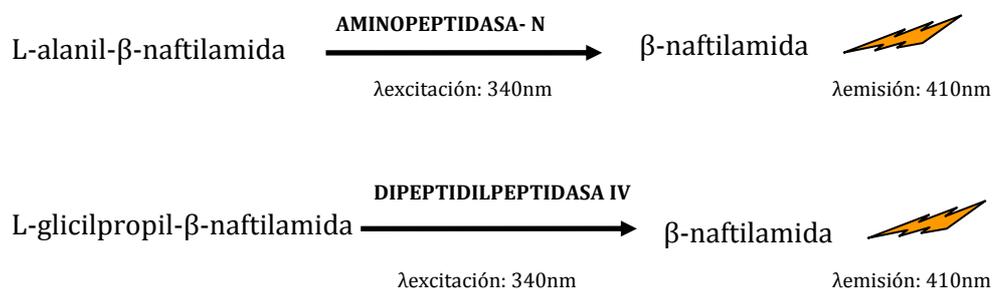


Figura 14. Determinación de las actividades aminopeptidasa N y dipeptidilpeptidasa IV.

La determinación de la actividad de las dipeptidasas se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento:

- Se incubaron las células HT-29 o Caco.2 a una concentración de 10^6 células por pocillo, en placas de 6 pocillos durante 24 horas.
- Tras la incubación durante 24 horas se paso a incubar las células con la quercetina a una concentración de $100 \mu\text{M}$, o con los probióticos a una concentración de 10^7 ufc/mL o con la combinación de la quercetina y los probióticos en placas de 6 pocillos durante 24 horas.
- Trascorridas 24 horas, de acción de los diferentes tratamientos, las células se lavaron con 1mL de PBS.
- Después de lavar las células con PBS se añadió $500 \mu\text{L}$ de *Passive Lysis Buffer* (1x) (Promega Corporation, USA) a cada pocillo y se continuó la incubación durante 15 minutos con agitación (20 rpm, Vibromix Tehtnica) a temperatura ambiente con el fin de soltar y lisar las células HT-29 y Caco.2 de la superficie de los pocillos.
- Tras la incubación con el tampón de lisis, se centrifugó la suspensión celular a 300 g , durante 5 minutos a 4°C .
- Tras la centrifugación, se recogieron los sobrenadantes de las células y se cuantificó la concentración de proteínas. La cuantificación de proteína se realizó por el método Bradford (Apartado 7.1).
- Se almacenaron a -80°C hasta el posterior análisis en los estudios de la actividad enzimática de la aminopeptidasa N y la dipeptidilpeptidasa IV.
- Las muestras se descongelaron en hielo durante aproximadamente 15 minutos.
- Los sustratos L-alanil- β -naftilamida y L-glicilprolil- β -naftilamida (Sigma-Aldrich Química, S.A.) se diluyeron, a una concentración de $3,6 \text{ mM}$, en dimetilformamida al 40% y se almacenaron a -20°C hasta el posterior análisis de la actividad de las enzimas aminopeptidasa N y dipeptidilpeptidasa IV.
- Una vez descongelados los extractos celulares, se incubaron $100 \mu\text{L}$ de cada uno de los sustratos descritos anteriormente con $100 \mu\text{L}$ de tampón fosfato ($0,5 \text{ M}$ de fosfato potásico diácido y $0,5 \text{ M}$ de fosfato potásico monoácido) durante 5 minutos a 37°C .
- Transcurrido este tiempo se añadieron $100 \mu\text{L}$ del extracto celular de las células HT-29 o Caco.2 que previamente había sido descongelado en hielo y se continuó la incubación durante 30 minutos a 37°C .
- Finalmente se añadieron $1,5 \text{ mL}$ de la solución de *Stop* glicina (50mM glicina), se dejaron enfriar las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente y se leyeron en un

fluorímetro a una longitud de onda de 340nm de excitación y 410nm de emisión (Spectrofluorophotometer rf 1501, shimadzu).

Los valores obtenidos se expresaron como actividad específica de las enzimas aminopeptidasa N y dipeptidilpeptidasa IV en células HT-29 y Caco.2.

5. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR

5.1 Determinación de la actividad citotóxica de la quercetina y las cepas probióticas en las líneas celulares HT-29 y Caco.2

La actividad citotóxica de la quercetina y de los probióticos se analizó a través de un ensayo colorimétrico *in vitro* basado en la reducción del MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazoloil) (Sigma-Aldrich Química, S.A.) por la enzima succinato deshidrogenasa. En este ensayo, las células metabólicamente activas reducen el MTT, de color amarillo en solución, a formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales de color azul oscuro. La cantidad de formazán formado en la reacción puede cuantificarse por espectrofotometría, lo que permite estimar el número de células vivas presentes en los cultivos de HT-29 y Caco.2.

La viabilidad de las células HT-29 y Caco.2 se estimó comparando el crecimiento de las células sin tratar (control) y tratadas con quercetina o con los probióticos o con la quercetina en combinación con los probióticos con respecto al número de células sembradas inicialmente. Los ensayos se realizaron en placa de 96 pocillos de fondo plano, a una concentración de 10.000 células por pocillo en el caso de la línea celular HT-29 y 20.000 células por pocillo en el caso de la línea celular Caco.2. Los ensayos se realizaron en un volumen final de 200 μ L (100 μ L suspensión celular, 20 μ L del compuesto en estudio y 80 μ L de medio de cultivo suplementado). Se incubaron ambas líneas celulares en presencia de concentraciones crecientes de quercetina (10^{-4} , 5×10^{-5} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} M), o de probióticos *B. bifidum* o *L. gasseri* (10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 y 10^8 ufc/mL, medidas por espectrofotometría) o de una mezcla de ambos (10^7 ufc/mL de *B. bifidum* o *L. gasseri* con concentraciones crecientes, 10^{-4} , 5×10^{-5} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} M de quercetina). A las células no tratadas (control) se les añadió el vehículo en el que se había disuelto la quercetina (DMSO 1mL/L). En todos los experimentos se sembró una placa con células sin tratar como control de tiempo cero (placa T_0). Las placas se incubaron en la estufa a 37°C, 5% CO_2 y un 96% de humedad relativa durante 24 horas. Trascurrido el tiempo de

incubación se añadieron 50 μL de MTT (2mg/mL en PBS) por pocillo y las placas se incubaron durante 4 horas adicionales. Transcurrido este tiempo se retiró el medio por aspiración, se añadieron 150 μL de DMSO por pocillo y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm en un lector de ELISA Bio-Kinetics Teader (BIO-TEK, Winooski, VT, EE.UU.), sustrayendo el valor obtenido a 630 nm para reducir el ruido de fondo (Fig. 15).

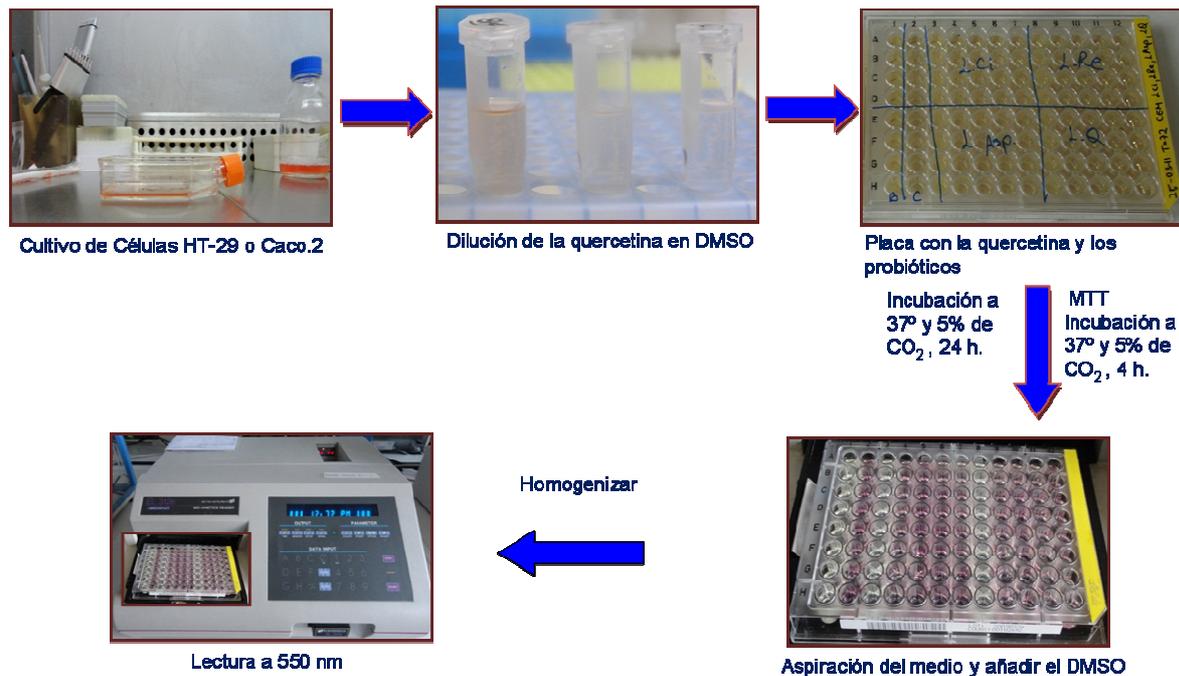


Figura 15. Esquema representativo de un ensayo de citotoxicidad. Las imágenes muestran los diferentes pasos que se llevaron a cabo para realizar el análisis de citotoxicidad de la quercetina, los probióticos o la mezcla de la quercetina y los probióticos.

Los datos, normalizados respecto a su control en cada experimento, se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. Los resultados se expresan como porcentaje de crecimiento ($\text{Media} \pm \text{SEM}$) y se calcularon a partir de los datos de absorbancia de acuerdo al siguiente cálculo:

- $[(A - A_0) / (A_C - A_0)] \times 100$, cuando $A \geq A_0$
- $[(A - A_0) / A_0] \times 100$, cuando $A < A_0$

donde:

- A = absorbancia de las células tratadas con los compuestos
- A₀ = absorbancia a tiempo cero
- A_C = absorbancia de las células sin tratar (Control)

Los parámetros de citotoxicidad se obtuvieron por extrapolación en curvas dosis/respuesta y se expresan como GI₅₀ (concentración que inhibe en un 50% el crecimiento de las células), TGI (concentración que inhibe totalmente el crecimiento de las células) y LD₅₀ (concentración que disminuye en un 50% el número de células iniciales).

5.2 Determinación de apoptosis en cultivos celulares

El nivel de apoptosis en los cultivos de las líneas celulares HT-29 y Caco.2 se determinó mediante el sistema *Apo-Direct*TM (BD Pharmingen). Este sistema se basa en la técnica de TUNEL. La técnica de TUNEL tiene como fundamento la incorporación de un oligonucleótido marcado con fluorescencia en los extremos de las cadenas de DNA en una reacción catalizada por la transferasa terminal (TdT). Esta técnica permite cuantificar el porcentaje de células apoptóticas en un cultivo ya que la activación de endonucleasas durante el programa apoptótico provoca la degradación de la cromatina y la fragmentación del DNA. Con el sistema *Apo-Direct*TM se emplea un método de un solo paso para marcar las roturas del DNA con dUTPs unidos al fluorocromo isocianato de fluoresceína (FITC). Posteriormente se detectan las células apoptóticas mediante citometría de flujo.

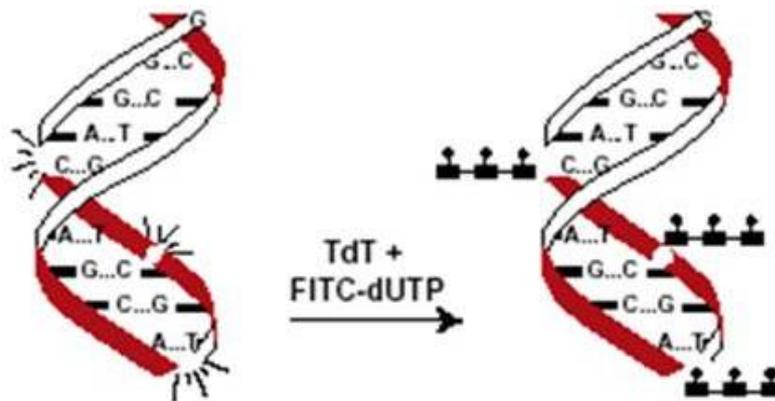


Figura 16. Fundamento del kit Apo-DirectTM. Este método se basa en el marcaje de fragmentos de DNA con FITC-dUTP.

La capacidad de la quercetina, o los probióticos o la combinación de quercetina y probióticos para inducir apoptosis en células de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2 se determinó tras 24 horas de tratamiento con quercetina, o con los probióticos o con la mezcla con concentraciones de 100 μ M de quercetina y 10⁷ ufc/mL de cada uno de los probióticos por separado.

Tras los tratamientos, las células se tripsinizaron (Apartado 2.3) y se recogieron por centrifugación. Posteriormente las células se incubaron con paraformaldehído (Sigma-Aldrich Química, S.A.) al 1% (p/v) en PBS de pH 7,4 (D-PBS, Gibco), a una concentración de 1x10⁶ células/mL durante 30 minutos a 0°C.

Tras la incubación de las células con el paraformaldehído, las células se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 300 g y se lavaron dos veces con 5 mL de PBS y se volvieron a recoger las células por centrifugación durante 5 minutos a 300 g.

Finalmente, las células recogidas por centrifugación se fijaron en etanol al 70% a una concentración de 1x10⁶ células/mL a 0°C durante 30 minutos y se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.

Para el marcado de las células éstas se mantuvieron en hielo y se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 300 g para eliminar el etanol residual. Tras realizar dos lavados con 1 mL de *Wash Buffer*, se recogieron las células por centrifugación a 300 g durante 5 minutos.

Las células se incubaron con la solución de marcado, que contiene la enzima *TdT*, *FITC-dUTP* y *tampón de reacción*, durante una hora en un incubador a 37°C. A continuación se les añadió 1 mL de la solución de aclarado *Rinse Buffer* y se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos. Este proceso se repitió tras retirar el sobrenadante por aspiración. Por último, el precipitado se resuspendió en 0,5 mL de solución de yoduro de propidio/RNasa y se incubó 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

Las células marcadas se analizaron en un citómetro de flujo *EPICS-XL-4CLR* (Beckman-Coulter, Miami, Florida, EE.UU.), equipado con un láser de argón (488 nm). La fluorescencia del FITC se detectó a una longitud de onda de 520 nm. El calibrado del citómetro se comprobó en cada experimento utilizando *Flow-Check™ Fluorospheres* (Beckman Coulter). Los datos en escala

logarítmica, obtenidos a partir de 10.000 células por muestra, se analizaron con el programa informático *EXPO32 ADC* (Beckman–Coulter, Miami, Florida, EE.UU.).

Los resultados se expresan como tanto por ciento de células apoptóticas en el cultivo tras el tratamiento con la quercetina, o con los probióticos o con la combinación de quercetina y probióticos. Para el cálculo de los resultados se realizaron como mínimo 3 experimentos independientes por duplicado.

5.3 Análisis del efecto del inhibidor de caspasas *Z-VAD-FMK* sobre las muerte celular inducida por los tratamientos

Con el fin de analizar si la capacidad de la quercetina, o de los probióticos *B. bifidum* y *L. gasseri* o de la combinación de quercetina y probióticos para inducir apoptosis era dependiente de la activación de caspasas, las células fueron preincubadas durante 1 hora con *Z-VAD-FMK* (BD Pharmingen), un inhibidor universal de caspasas de amplio espectro que inhibe la acción de las caspasas mediante unión irreversible al sitio catalítico de estas proteasas y por lo tanto inhibición de la apoptosis. La concentración utilizada del inhibidor fue de 20 μM . Tras la preincubación, las células se trataron con quercetina 100 μM , o con 10^7 ufc/mL de probiótico o con la mezcla de ambos (quercetina 100 μM y probiótico 10^7 ufc/mL) durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas las células se analizaron con el sistema *Apo-Direct™* tal y como se describe en el apartado anterior.

5.4 Análisis de la actividad Caspasa 3

La determinación de la actividad de la caspasa 3 se realizó con el *kit ApoAlert Caspase Assay Plates* (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA). Este kit contiene el tetrapéptido *DEVD*, sustrato específico de la caspasa 3 unido a un fluorocromo inmovilizado en los pocillos de una placa de 96 pocillos. Cuando el lisado celular que contiene la caspasa 3 activa se aplica a los diferentes pocillos, ésta degrada el tetrapéptido liberando el fluorocromo, que se puede detectar con un lector de placas de fluorescencia estándar a una longitud de onda de 460 nm.

Los análisis se realizaron tras el tratamiento de las células con la quercetina a concentración 100 μM , o con los probióticos a concentración 10^7 ufc/mL o con la mezcla de ambos (quercetina 100 μM y probiótico 10^7 ufc/mL) durante 24 horas.

A continuación se describe brevemente el procedimiento:

- Una vez transcurrido el tiempo de incubación con la quercetina, o los probióticos o la combinación de quercetina y probióticos, las células se tripsinizaron (Apartado 2.3) y se contaron.
- Se separaron 2×10^5 células/pocillo y la suspensión celular se centrifugó a 300 g a 4° C durante 5 minutos.
- Se retiró el sobrenadante, se resuspendió el precipitado celular en 50 μ L de solución de lisis 1x y se incubó durante 10 minutos a 0°C.
- Una vez transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó la suspensión celular a 300 g a 4° C durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a tubos tipo *ependorf* preenfriados y mantenidos en hielo hasta su posterior utilización.
- Se añadieron 50 μ L del *Reaction Buffer/DTT* a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se incubó la placa durante 5 minutos en un incubador a 37° C.
- Tras la incubación de la placa con el *Reaction Buffer/DTT*, se añadieron 50 μ L de las muestras celulares que estaban mantenidas en hielo, a cada uno de los pocillos y se continuó la incubación durante 2 horas a 37° C.
- Finalmente, se midió la fluorescencia emitida por los extractos celulares en un fluorímetro *FLUOROSKAN ASCENT FL* (Thermo Labsystems, Waltham, MA). Longitud de onda de excitación utilizada fue 380 nm y la de emisión fue de 460 nm).

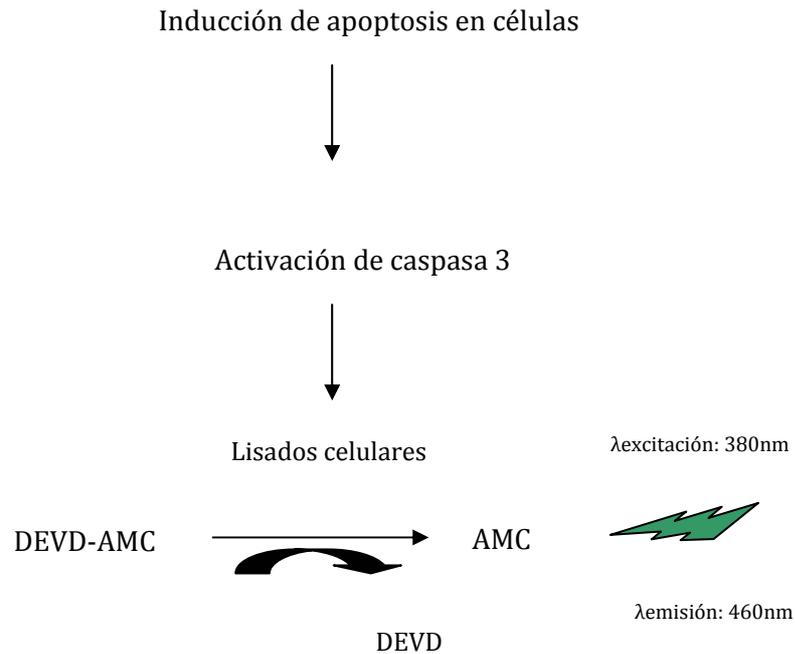


Figura 17. Esquema del análisis de detección de caspasa 3 activa. Se muestran los pasos a realizar para el análisis de la caspasa 3 y su posterior lectura en un fluorímetro.

6. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

El análisis del ciclo celular se llevó a cabo con el sistema *Apo-Direct*TM. Este sistema contiene el fluorocromo yoduro de propidio. Este fluorocromo, que emite fluorescencia a 623 nm, se une al DNA total y proporciona información sobre el contenido en DNA de las células, por lo tanto sobre el porcentaje de células del cultivo que se encuentran en cada una de las diferentes fases del ciclo celular.

En cada experimento se analizaron 20.000 células que habían sido previamente fijadas con paraformaldehído y marcadas con yoduro de propidio, tal como se describe en el apartado 4.1. La fluorescencia emitida por el yoduro de propidio se detectó con un citómetro de flujo *EPICS-XL-4CLR* (Beckman-Coulter, Miami, Florida, EE.UU.), equipado con un láser de argón (488 nm) y se registró en forma de histogramas. Los datos obtenidos se analizaron con el programa informático *EXPO32 ADC* (Beckman-Coulter, Miami, Florida, EE.UU.). Los resultados se expresan en tanto por ciento de células en cada una de las fases del ciclo. Para el cálculo de los resultados se realizaron como mínimo 3 experimentos independientes por duplicado.

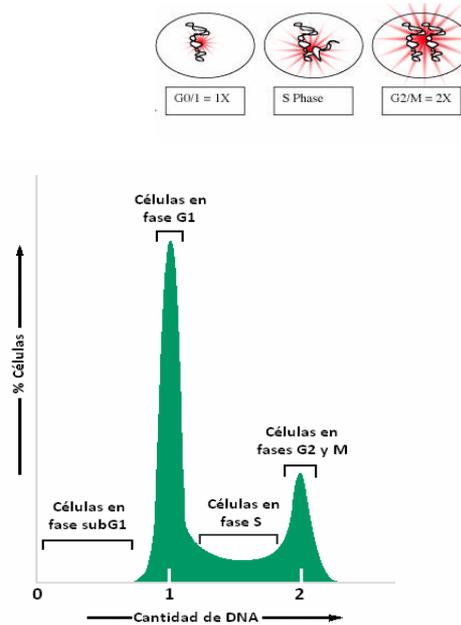


Figura 18. Fases del ciclo celular, en relación a la cantidad de DNA. Adaptado de Molecular Biology of the cell, 4th Edition.

7. CUANTIFICACIÓN Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

7.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para determinar la cantidad de proteína en los extractos celulares se utilizó el método de cuantificación de proteína *Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories Inc)* basado en el método colorimétrico de *Bradford*. En este método se emplea un colorante hidrofóbico que tiene un color pardo y que al unirse a la proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente. Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra se requiere la preparación de una curva de calibrado empleando una proteína patrón. Para obtener la recta patrón se emplearon soluciones de concentración conocida de seroalbúmina bovina (BSA), preparadas a partir de una solución patrón de concentración conocida (2mg/mL) (*Pierce, Thermo Scientific*). A continuación se mezclaron 20 μ L de los estándares de seroalbúmina, o 20 μ L de los extractos celulares en los que se quería determinar la proteína, con 200 μ L del colorante (diluido 1/5 en agua destilada). La reacción colorimétrica se determinó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

7.2 Expresión de proteínas mediante la técnica de Western - blot

En este trabajo se ha analizado por *western blot* la expresión del transportador de glúcidos dependiente de sodio SGLT-1, del transportador de dipéptidos PEPT-1 y de distintas proteínas implicadas en la inducción de apoptosis y el control del ciclo celular (p-AMPK α , Bcl-2, Bax, p53 y p21). El *western blot* permite identificar, cuantificar y localizar proteínas en función de su capacidad para enlazar con anticuerpos específicos. La técnica consta de una primera fase en la que las proteínas se separan en un gel de poliacrilamida y posteriormente se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. En una segunda etapa la membrana se incubó con un anticuerpo específico que reconoce la proteína de interés. Los anticuerpos utilizados se recogen en la Tabla 3.

7.2.1 Determinación de transportadores de membrana PEPT-1 y SGLT-1

- Se incubaron las células HT-29 y Caco.2 a una concentración de 10^6 células por pocillo con la quercetina, o los probiótico o la combinación de la quercetina y los probióticos en placas de 6 pocillos durante 24 horas.
- Tras la incubación las células se lavaron con 1mL de PBS.
- Tras el tratamiento y lavado de las células, se añadieron 500 μ L de *Passive Lysis Buffer* (1x) (Promega Corporation, U.S.A) a cada pocillo y se incubó la placa durante 15 minutos en agitación (20 rpm, Vibromix Tehtnica).
- Después de la incubación con el tampón de *Passive Lysis Buffer* se recogió la suspensión celular y se centrifugó a 300 g a 4° C durante 5 minutos.
- Se recogieron los sobrenadantes y se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Apartado 7.1).
- Se almacenaron a -80° C hasta su posterior análisis.
- Los extractos celulares, una vez descongelados, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, cargando 12 μ g del extracto celular. La electroforesis se llevó a cabo a 20mA y 100V durante los primeros 30 minutos y 60mA y 200V durante los siguientes 30 minutos, mediante el sistema *Mini-PROTEAN*® 3 *Electrophoresis Cell* (Bio-Rad).
- Una vez terminada la electroforesis las proteínas se transfirieron del gel de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa. La electrotransferencia se realizó durante 1 hora a 400mA y 100V, mediante el sistema *Mini Trans-Blot*® *Cell* (Bio-Rad).

- A continuación, con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, se bloqueó la membrana por incubación con una solución de leche desnatada al 1% en solución *TBS-Tween* (1x).
- Tras la incubación de bloqueo, las membranas se lavaron 2 veces durante 5 minutos con *TBS-Tween* (1x).
- Posteriormente se incubaron las membranas a 4° C con agitación (20 rpm, Vibromix Tehtnica) durante 16 horas con el anticuerpo primario PEPT-1(H-235) o SGLT-1 (H-235) diluido 1:200 en solución *TBS-Tween* (1x).
- Tras la incubación, las membranas se lavaron tres veces, una vez durante 10 minutos y 2 veces durante 5 minutos, con *TBS-Tween* (1x) con agitación (20 rpm, Vibromix Tehtnica).
- Una vez realizados los lavados, las membranas se incubaron con la solución de anticuerpo secundario peroxidado *goat anti-rabbit IgG.HRP* (dilución 1:2000) durante 1 hora con agitación (20 rpm, Vibromix Tehtnica) (Tabla 3).
- Tras la incubación con el anticuerpo secundario, se repitieron los lavados citados anteriormente y se detectaron las proteínas por un método quimioluminiscente (*Amersham ECL Primer Western Blotting Detection Reagent*, Amersham GE Healthcare, UK), dejando en contacto la membrana de nitrocelulosa con el reactivo durante 1 minutos. Posteriormente se exponen las membranas en películas de radiografía (Hyperfilm™ MP, Amersham GE Healthcare, UK). Tras la exposición de las membranas con las películas radiográficas se revelaron en una máquina de revelado Curix 60 (AGFA).

7.2.2 Determinación de las proteínas p-AMPK α , Bcl-2, Bax, p53 y p21

- Se incubaron las células HT-29 y Caco.2 a una concentración de 10⁶ células por pocillo con la quercetina, o los probiótico o la combinación de la quercetina y los probióticos en placas de 6 pocillos durante 24 horas
- Tras los tratamientos las células se tripsinizaron (Apartado 2.3) y se recogieron por centrifugación a 300 g durante 5 minutos.
- Los precipitados celulares se resuspendieron en 500 μ L de tampón de lisis *RIPA* (Sigma-Aldrich Química, S.A) suplementado con un cóctel de inhibidor de proteasas (Protease inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich Química, S.A), se añadió 1mL del inhibidor de proteasas por cada 10 mL del tampón de lisis *RIPA*, posteriormente se incubaron durante 30 minutos en hielo.

- Tras la lisis la suspensión celular se centrifugó a 300 g y 4° C durante 5 minutos.
- Se recogieron los sobrenadantes y posteriormente se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Apartado 7.1).
- Se almacenaron a -80° C hasta su posterior análisis.
- Los extractos celulares se descongelaron en hielo y una vez descongelados, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%. Se cargó 12 µg de cada uno de los extractos celulares en el gel de poliacrilamida. La electroforesis se llevó a cabo a 20mA y 100V durante los primeros 30 minutos y 60mA y 200V durante los siguientes 30 minutos, mediante el sistema *Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell* (Bio-Rad).
- Una vez finalizada la electroforesis las proteínas se transfirieron del gel de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Se realizó la electrotransferencia durante 1 hora a 400mA y 100V, mediante el sistema *Mini Trans-Blot® Cell* (Bio-Rad).
- A continuación, con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, se bloqueó la membrana por incubación con una solución de leche desnatada al 1% en solución *TBS-Tween* (1x) para los anticuerpos Bcl-2, Bax, p53 y p21 y con una solución de albúmina al 5 % (*Albumin, Bovine*, Sigma-Aldrich Química, S.) en solución *TBS-Tween* (1x) para el anticuerpo p-AMPK α , durante 1 hora con agitación (20 rpm, Vibromix Tehtnica).
- Tras la incubación de bloqueo, las membranas se lavaron 2 veces durante 5 minutos con *TBS-Tween* (1x).
- Posteriormente se incubaron las membranas con el anticuerpo primario (p-AMPK α 1/2 (Thr 172), Bax (Δ 21), Bcl-2 (N-19), p21 (C-19) o p53 (FL-393)) diluido 1:200 en solución *TBS-Tween* (1x), a 4° C con agitación (20 rpm, Vibromix Tehtnica) durante 16 horas. Tabla 3
- Tras la incubación, las membranas se lavaron tres veces con agitación (20 rpm, Vibromix Tehtnica). Una vez durante 10 minutos y 2 veces durante 5 minutos con *TBS-Tween* (1x) para los anticuerpos Bax (Δ 21), Bcl-2 (N-19), p21 (C-19), p53 (FL-393), y una vez durante 10 minutos y 2 veces durante 5 minutos con *TBS-Tween* (5x) para el anticuerpo p-AMPK α .
- Una vez realizados los lavados citados anteriormente, las membranas se incubaron con la solución de anticuerpo secundario *goat anti-rabbit IgG.HRP* peroxidado (dilución 1:2000; (Tabla 3) durante 1 hora con agitación (20 rpm, Vibromix Tehtnica).
- Tras la incubación con el anticuerpo secundario, se repitieron los lavados citados anteriormente y se detectaron las proteínas por un método quimioluminiscente (*Amersham ECL Primer Western Blotting Detection Reagent*, Amersham GE Healthcare, UK), dejando en contacto la membrana de nitrocelulosa con el reactivo durante 1

minutos. Posteriormente se exponen las membranas en películas de radiografía (Hyperfilm™ MP, Amersham GE Healthcare, UK). Tras la exposición de las membranas con las películas radiográficas se revelaron en una máquina de revelado Curix 60 (AGFA).

Se cuantificó la intensidad de la banda de las diferentes proteínas mediante el programa *Quantity One* (Bio-Rad). Los datos se obtuvieron a partir de la cuantificación por triplicado de al menos 3 membranas distintas procedentes de 3 experimentos independientes. Para corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína entre muestras se empleó la β -Actina (anticuerpo B-Actin (PA1-21167) diluido 1:500) como control de carga. Los valores obtenidos para cada proteína en estudio se expresan de forma relativa con respecto a la cantidad de β -Actina.

Tabla 3. Anticuerpos empleados para Western - blot

	Anticuerpos	Especie	Casa comercial
Primarios	<i>PEPT-1 (H-235)</i>	Conejo	Santa Cruz
	<i>SGLT-1 (H-85)</i>	Conejo	Santa Cruz
	<i>p-AMPKα1/2 (Thr 172)</i>	Conejo	Santa Cruz
	<i>Bax (Δ21)</i>	Conejo	Santa Cruz
	<i>Bcl-2 (N-19)</i>	Conejo	Santa Cruz
	<i>P21 (C-19)</i>	Conejo	Santa Cruz
	<i>P53 (FL-393)</i>	Conejo	Santa Cruz
	<i>β-actina (PA1-21167).</i>	Conejo	Thermo
Secundario	<i>Goat anti-rabbit IgG.HRP</i>	Conejo	Santa Cruz

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 19.00 para Windows (IBM SPSS Statistics for Windows, versión 19.00 Armonk, NY: IBM Corp.). El estudio de la distribución de las muestras se realizó mediante las pruebas de normalidad de *Shapiro-Wilks* y *Kolmogorov-Smirnov*. Las diferencias estadísticas entre las muestras en cada experimento se analizaron mediante el test para comparaciones múltiples de *Kruskal-Wallis*, seguido de las pruebas *a posteriori* U de Mann-Whitney. Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas a un nivel de $P < 0.05$.

RESULTADOS

1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y TRANSPORTADORES DE MEMBRANA

La actividad enzimática y el transporte de azúcares, aminoácidos y péptidos están modificados en el desarrollo del cáncer colorrectal debido al proceso de proliferación, diferenciación e inflamación que se produce en el intestino. La expresión del transportador de glucosa SGLT-1¹⁵⁰ y del transportador de dipéptidos o tripéptidos PEPT-1,¹⁵¹ por ejemplo, incrementa en el cáncer colorrectal. Estas alteraciones en el transporte de glucosa y de péptidos suelen estar asociadas con alteraciones en la actividad enzimática intestinal de disacaridasas, como la sacarasa, o peptidasas, como la aminopeptidasa N y la dipeptidilpeptidasa IV.^{152, 153}

Considerando estos antecedentes, decidimos analizar si el tratamiento con quercetina, con los probióticos *B. bifidum* o *L. gasseri* o con la combinación de la quercetina y los probióticos modificaba la actividad de estas enzimas, o la expresión de los transportadores de membrana PEPT-1 y SGLT-1, en líneas celulares de adenocarcinoma de colon. Con este fin se trataron cultivos de las líneas celulares HT-29 y Caco.2 con quercetina 100 μM , con 10^7 ufc/mL de *B. bifidum* o *L. gasseri* o con la combinación de quercetina 100 μM y 10^7 ufc/mL del probiótico durante 24 horas, y posteriormente se determinó la actividad sacarasa, dipeptidilpeptidasa IV y aminopeptidasa N y la expresión de los transportadores PEPT-1 y SGLT-1 en los cultivos. La determinación de la actividad enzimática de la sacarasa se llevó a cabo por el método GOD-PAP. La determinación de la actividad de la aminopeptidasa N y de la dipeptidilpeptidasa IV se llevó a cabo mediante la cuantificación por fluorimetría de la β -naftilamida liberada tras la hidrólisis por las dipeptidasas de la L-alanil- β -naftilamida y la L-glicilpropil- β -naftilamida respectivamente. La expresión de los transportadores de membrana PEPT-1 y SGLT-1 se determinó por western-blot con anticuerpos específicos. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 19 a 23.

Como se observa en la Figura 19, el tratamiento con quercetina 100 μM aumenta la actividad sacarasa en ambas líneas celulares, tanto en presencia como en ausencia de los probióticos. Sin embargo, los probióticos por si mismos no tienen efecto sobre la actividad sacarasa en ninguna de las dos líneas celulares. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la actividad sacarasa entre los cultivos tratados con quercetina 100 μM y los tratados con la combinación de quercetina y probióticos (Fig. 19). Estos resultados sugieren que *B. bifidum* y *L. gasseri* no modifican la actividad sacarasa en cultivos de líneas celulares de adenocarcinoma de colon.

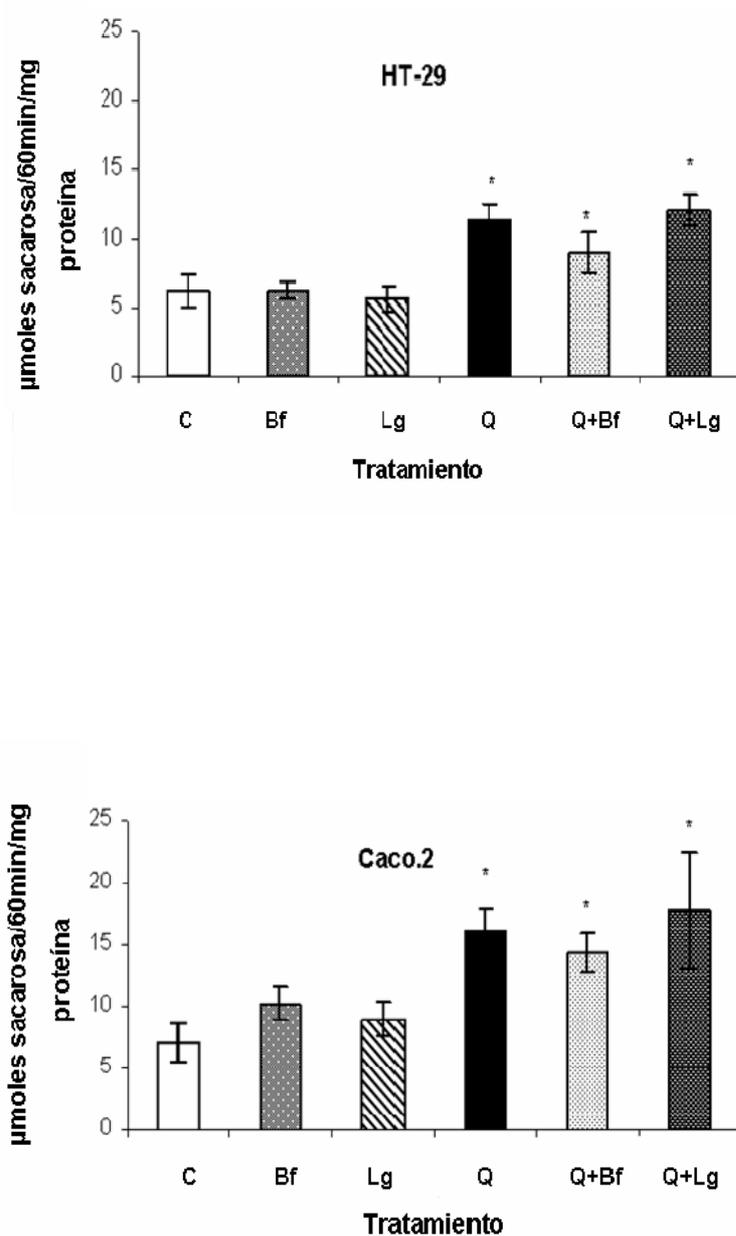


Figura 19. La quercetina aumenta la actividad sacarasa en células HT-29 y Caco.2. Las células se cultivaron durante 24 horas en ausencia (control) o presencia de quercetina $100 \mu\text{M}$, 10^7 ufc/mL de los probióticos *B. bifidum* o *L. gasseri*, o la mezcla de quercetina y probiótico. Tras 24 horas de incubación se lisaron las células y se determinó la actividad enzimática mediante el método GOD-PAP. Los resultados se expresan como media \pm SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. * indica diferencias significativas con respecto a los de las células control ($p \leq 0,05$).

La Figura 20 muestra los resultados de la actividad enzimática de la aminopeptidasa N tras los tratamientos. En la Figura 20 se manifiesta que el tratamiento con quercetina 100 μM durante 24 horas disminuye la actividad aminopeptidasa N en ambas líneas celulares. Sin embargo, el tratamiento con las cepas probióticas no tiene efecto sobre dicha actividad. El tratamiento combinado con la quercetina y las cepas *B. bifidum* o *L. gasseri* también muestra que los probióticos no modifican el efecto de la quercetina sobre la actividad enzimática aminopeptidasa N en los cultivos celulares (Fig20).

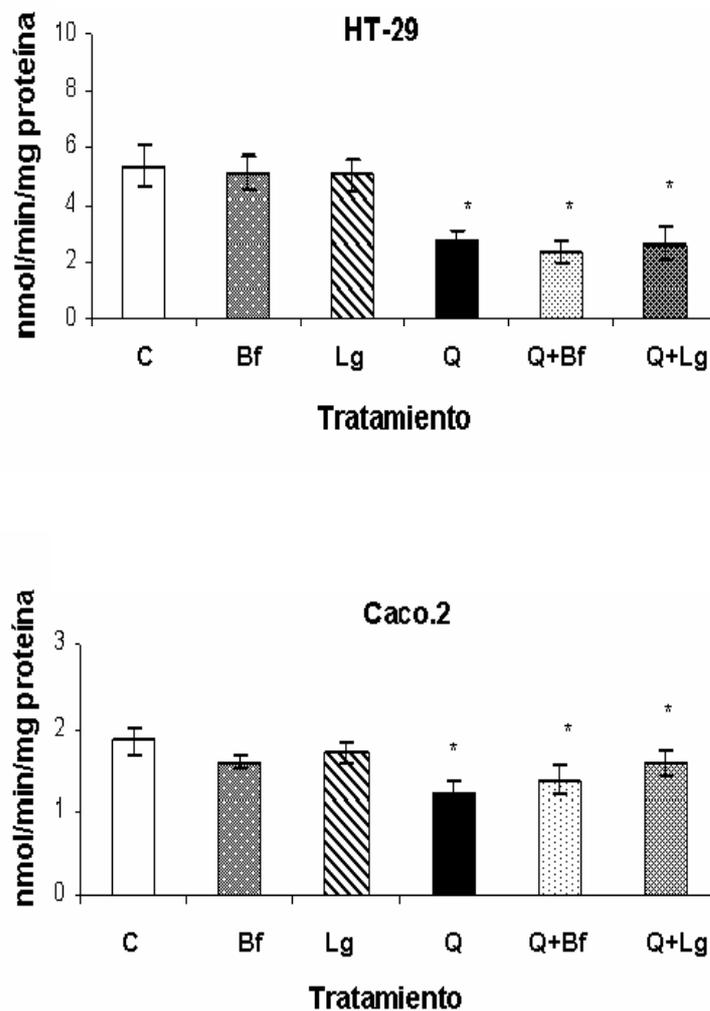


Figura 20. La quercetina disminuye la actividad aminopeptidasa N en células HT-29 y Caco.2. Las células se cultivaron en ausencia (control) o presencia de quercetina 100 μM , de 10^7 ufc/mL de los probióticos *B. bifidum* o *L. gasseri* o de la mezcla de quercetina y probiótico. Tras 24 horas de incubación se lisaron las células y se determinó la actividad enzimática en los extractos celulares. Los resultados se expresan como media \pm SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. * indica diferencias significativas con respecto a los de las células control ($p \leq 0,05$).

La Figura 21 muestra los resultados obtenidos cuando se determinó la actividad dipeptidilpeptidasa IV tras los tratamientos. Se comprobó que el tratamiento con quercetina 100 μM disminuye la actividad dipeptidilpeptidasa IV en ambas líneas celulares. Sin embargo, el tratamiento de los cultivos de células HT-29 y Caco.2 con las cepas probióticas *B. bifidum* o *L. gasseri* no modificó dicha actividad. Tampoco se observaron diferencias significativas en la actividad dipeptidilpeptidasa IV entre las células tratadas con quercetina y las células tratadas con la combinación de quercetina y probióticos, lo que indica que en las condiciones de nuestro trabajo los probióticos no afectan a la acción de la quercetina sobre dicha actividad.

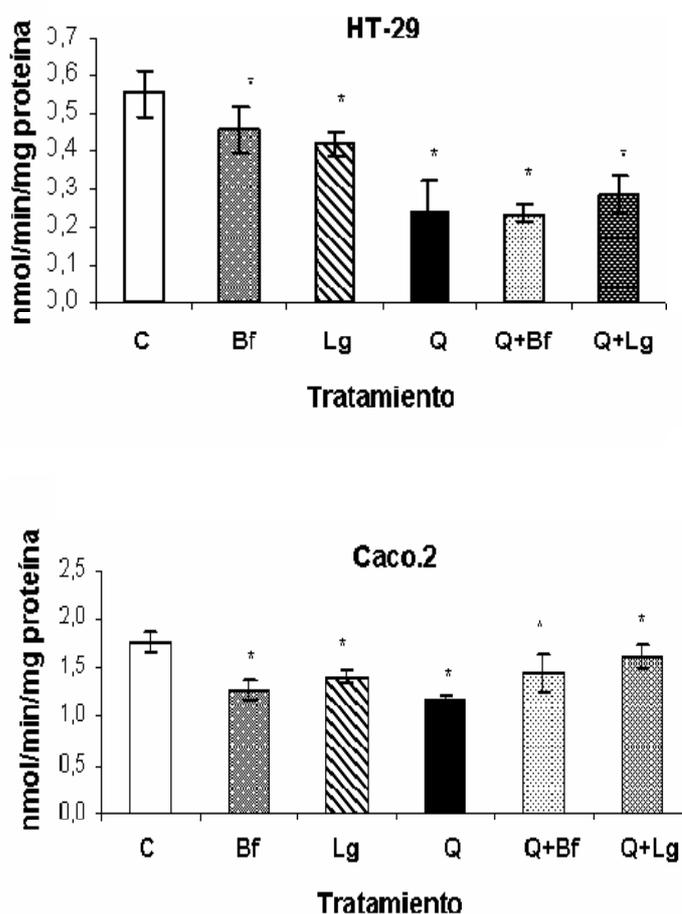
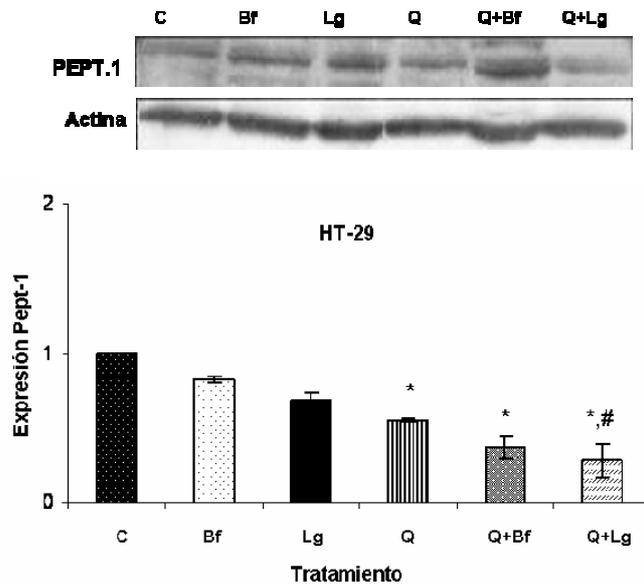


Figura 21. La quercetina disminuye la actividad dipeptidilpeptidasa IV en células HT-29 y Caco.2. Las células se cultivaron en ausencia (control) o presencia de quercetina 100 μM , de 10^7 ufc/mL de los probióticos *B. bifidum* o *L. gasseri* o de la mezcla de quercetina y probiótico. Tras 24 horas de incubación se lisaron las células y se determinó la actividad enzimática en los extractos celulares. Los resultados se expresan como media \pm SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. * indica diferencias significativas con respecto a los de las células control ($p \leq 0,05$).

Tras analizar el efecto de la quercetina y de los probióticos sobre la actividad sacarasa, aminopeptidasa N y dipeptidilpeptidasa IV, se continuó con el estudio de los posibles efectos del tratamiento en la expresión de los transportadores presentes en la membrana intestinal. Con este fin los cultivos de células HT-29 y Caco.2 se trataron con quercetina 100 μ M, con 10^7 ufc/ml de las cepas probióticas *B. bifidum* o *L. gasseri* o con la combinación de quercetina 100 μ M y los probióticos durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas de tratamiento, se lisaron las células y se determinó la expresión de los transportadores de membrana PEPT-1 y SGLT-1 en los extractos celulares. La determinación se llevó a cabo por western blot empleando los anticuerpos específicos *PEPT-1* (H-235) y *SGLT-1* (H-85). Con el fin de corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína entre muestras, los resultados obtenidos, que se muestran en las Figuras 22 y 23, se expresan de forma relativa con respecto a la cantidad de β - Actina (anticuerpo β -Actin (PA1-21167)), proteína constitutiva empleada como control de carga.

La Figura 22 muestra que el tratamiento con quercetina 100 μ M disminuye aproximadamente un 40% la expresión del transportador de membrana PEPT-1 en ambas líneas celulares. Por otro lado, también muestra que los probióticos, aunque no tienen efecto por si mismos sobre la expresión de PEPT-1 en ninguna de las dos líneas celulares, potencian el efecto de la quercetina, ya que existen diferencias significativas en la expresión de PEPT-1 entre los cultivos tratados sólo con quercetina 100 μ M y los tratados con la combinación de quercetina y la cepa probiótica *L. gasseri* en ambas líneas celulares.

A)



B)

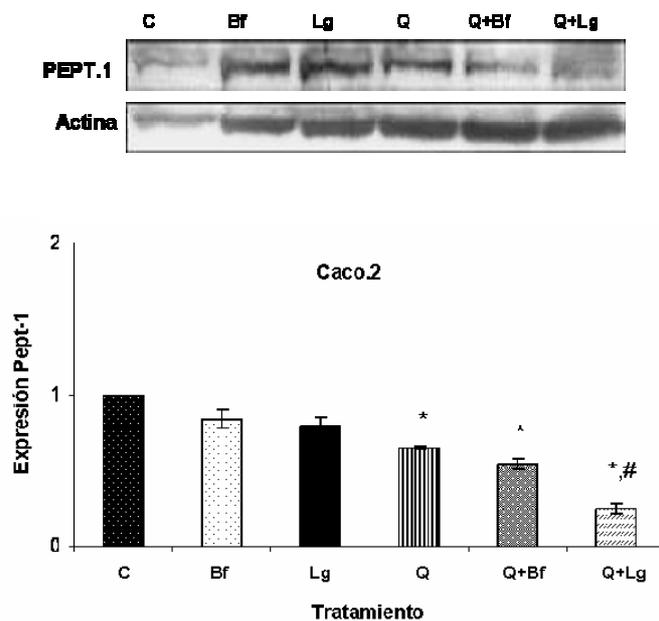


Figura 22. Los probióticos *B. bifidum* y *L. gasseri* aumentan el efecto de la quercetina sobre la expresión del transportador PEPT-1 en células HT-29 y Caco.2. La expresión de PEPT-1 en células tratadas durante 24 horas en ausencia (control) o presencia de quercetina 100 μ M, de 10^7 ufc/mL de los probióticos o de la mezcla de quercetina y probiótico se determinó mediante western-blot. Los resultados, normalizados con respecto a los de la β -actina, se expresan de forma relativa tomando como 1 los de las células control. Los resultados se representan como media \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. * indica diferencias significativas con respecto a los de las células control ($p \leq 0,05$). # indica diferencias significativas con respecto a los de las células tratadas con quercetina ($p \leq 0,05$).

La Figura 23 muestra los resultados respecto a la expresión del transportador de membrana SGLT-1 tras los tratamientos. La Figura muestra que el tratamiento con quercetina 100 μ M redujo aproximadamente un 40% la expresión de SGLT-1 en las dos líneas celulares. También pone de manifiesto que los probióticos, aunque no tienen efecto por sí mismos sobre la expresión de SGLT-1 en ninguna de las dos líneas celulares, potencian el efecto de la quercetina, ya que existen diferencias significativas en la expresión de SGLT-1 entre los cultivos tratados sólo con quercetina 100 μ M y los tratados con la combinación de quercetina y probióticos en ambas líneas celulares. Además, este efecto es más acusado en los cultivos de células Caco.2 y en los tratamientos combinados en los que se emplea *L. gasseri*, lo que sugiere que depende del tipo celular y la cepa probiótica empleados.

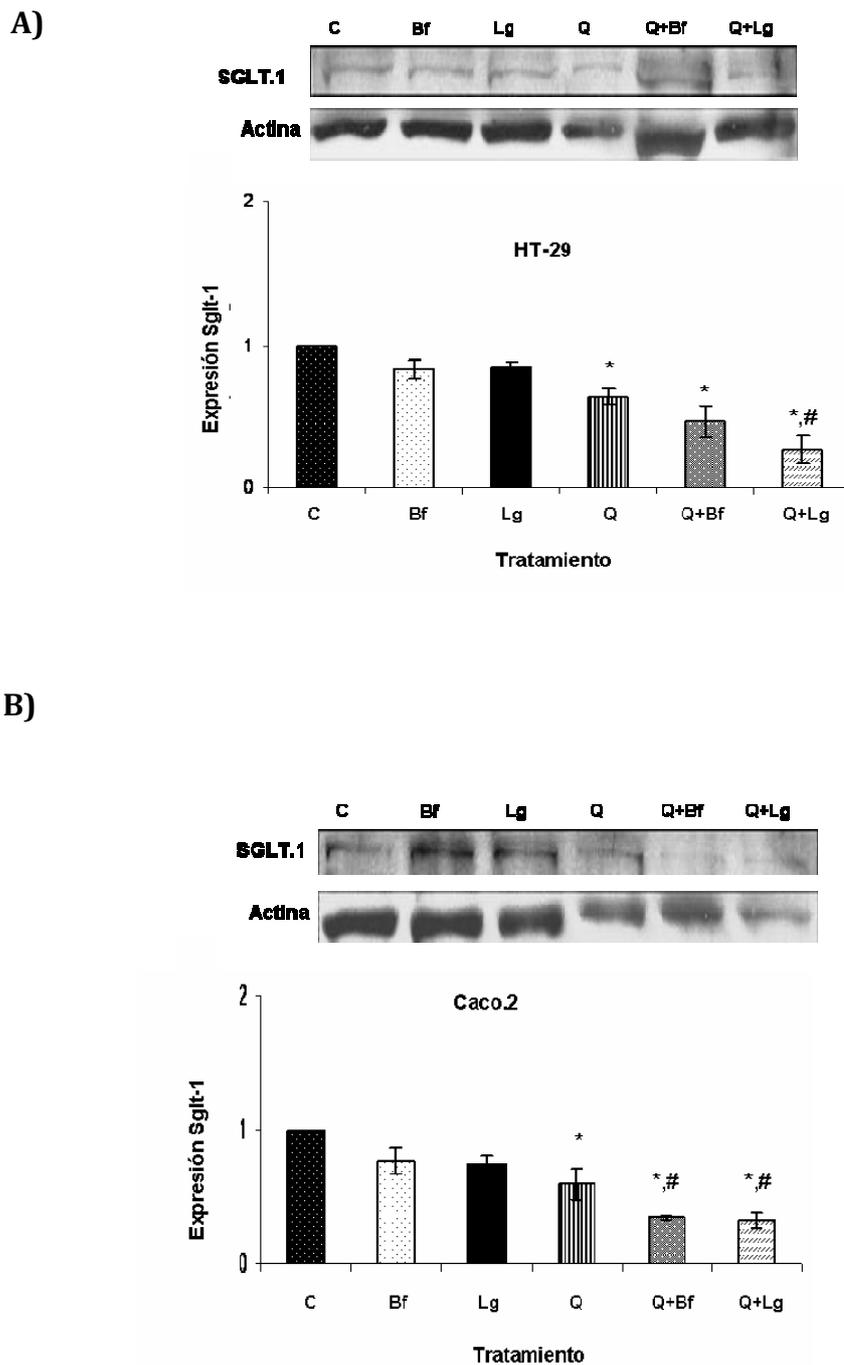


Figura 23. Los probióticos *B. bifidum* y *L. gasseri* aumentan el efecto de la quercetina sobre la expresión del transportador SGLT-1 en células HT-29 y Caco.2. La expresión de SGLT-1 en células tratadas durante 24 horas en ausencia (control) o presencia de quercetina 100 μ M, de 10^7 ufc/mL de los probióticos o de la mezcla de quercetina y probiótico se determinó mediante western-blot. Los resultados, normalizados con respecto a los de la β -actina, se expresan de forma relativa tomando como 1 los de las células control. Los resultados se representan como media \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. * indica diferencias significativas con respecto a los de las células control ($p \leq 0,05$). # indica diferencias significativas con respecto a los de las células tratadas con quercetina ($p \leq 0,05$).

2. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

En la actualidad se están llevando a cabo numerosos estudios científicos relacionados con la posible actividad anticancerígena de compuestos no nutricionales también llamados fitoquímicos. Este grupo de compuestos, que pueden llegar a prevenir el desarrollo del cáncer, es muy amplio e incluye flavonoides como la quercetina. La quercetina es un componente importante de la dieta humana ya que está presente en alimentos de origen vegetal, por lo que ha llegado incluso a despertar interés desde el punto de vista nutricional. En los últimos años, se han atribuido a la quercetina efectos beneficiosos frente al desarrollo de diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas.¹⁵⁴ Debido a sus posibles efectos sobre la proliferación celular, en este trabajo hemos querido analizar el efecto citotóxico de la quercetina, de los probióticos *B. bifidum* o *L. gasseri* y de sus combinaciones en las líneas celulares de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2. Los análisis se han llevado a cabo mediante el ensayo colorimétrico del MTT. La actividad citotóxica se determinó a 6 concentraciones diferentes de quercetina y a 5 concentraciones diferentes de los probióticos. En el caso de la combinación de quercetina y probióticos se emplearon mezclas formadas por 10^7 ufc/ml de probióticos y cada una de las diferentes concentraciones de quercetina. Los resultados se obtuvieron a partir de 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado para cada una de las concentraciones. Los resultados obtenidos se representan en curvas de dosis-respuesta (Fig. 24) a partir de las cuales se obtuvieron por extrapolación los parámetros citotóxicos (Tabla 4) GI_{50} (concentración del compuesto que provoca la inhibición del 50% de las células), TGI (concentración del compuesto que provoca la inhibición total del crecimiento) y LC_{50} (concentración del compuesto que reduce en un 50% el número de células iniciales).

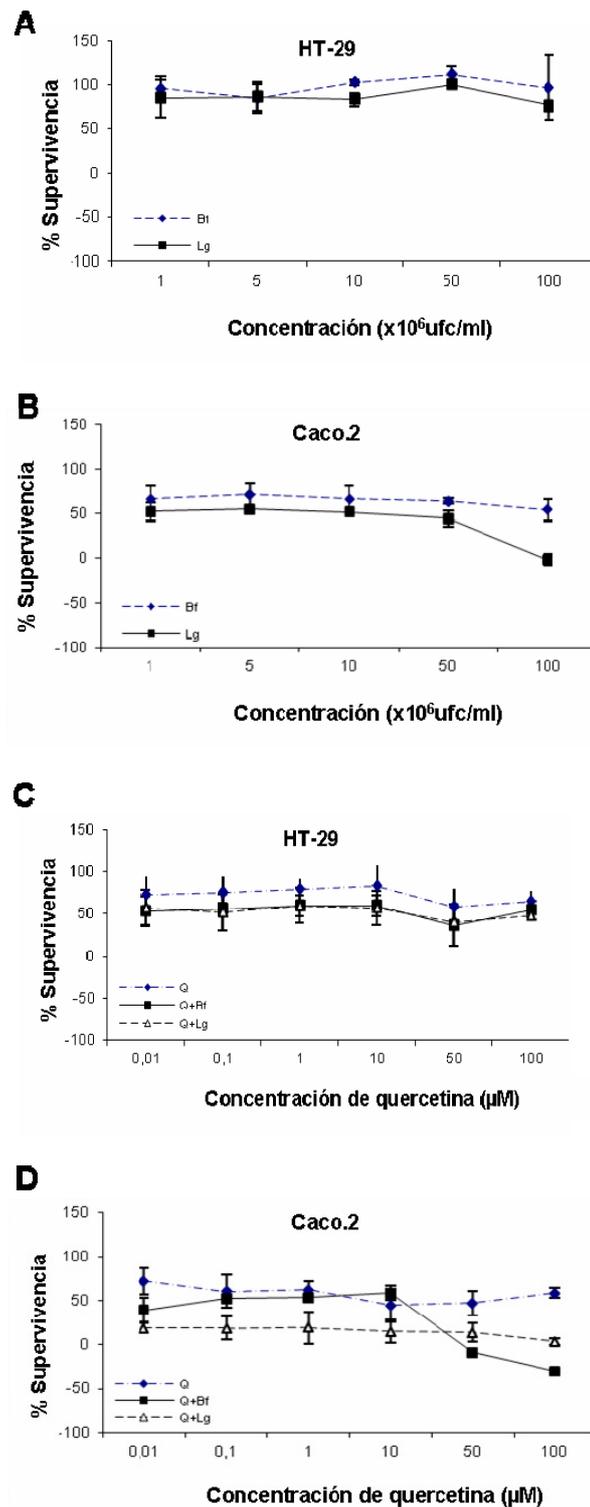


Figura 24. La quercetina, los probióticos *B. bifidum* o *L. gasseri* o la combinación de quercetina y los probióticos tienen actividad citotóxica en células HT-29 y Caco.2. A) Supervivencia de las células HT-29 tras el tratamiento durante 24 horas con las diferentes concentraciones de *B. bifidum* o *L. gasseri* **B)** Supervivencia de las células Caco.2 tras el tratamiento durante 24 horas con las diferentes concentraciones de *B. bifidum* o *L. gasseri*, **C)** Supervivencia de las células HT-29 tras el tratamiento durante 24 horas con las diferentes concentraciones de quercetina y 10^7 ufc/mL *B. bifidum* o *L. gasseri*, **D)** Supervivencia de las células Caco.2 tras el tratamiento durante 24 horas con las diferentes concentraciones quercetina y 10^7 ufc/mL *B. bifidum* o *L. gasseri*. La actividad citotóxica se analizó mediante un ensayo colorimétrico *in vitro* basado en la reducción del MTT. Los datos se presentan como la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes por cuadruplicado.

Las Figuras 24C y 24D muestran que el tratamiento con quercetina 100 μ M redujo la supervivencia celular aproximadamente un 40% con respecto a la de las células sin tratar (células control) en ambas líneas celulares. La Figura 24B muestra a su vez que el tratamiento con 10^7 ufc/mL de *B. bifidum* redujo aproximadamente un 33% la supervivencia celular en cultivos de células Caco.2, mientras que el tratamiento con 10^7 ufc/mL de *L. gasseri* la redujo un 49%. La Figura 24A muestra que el tratamiento con 10^7 ufc/mL de *B. bifidum* no modifica la supervivencia celular en cultivos de células HT-29, mientras que el tratamiento con 10^7 ufc/mL *L. gasseri* sólo la reduce ligeramente. Las Figuras 24C y 24D también muestran que cuando se tratan los cultivos celulares con combinaciones de distintas concentraciones de quercetina y 10^7 ufc/ml de probióticos el efecto de la quercetina sobre la supervivencia celular se potenció en ambas líneas celulares, con reducciones del crecimiento celular que en el caso de la combinación de quercetina y la cepa *L. gasseri* se sitúan en torno al 50% en células HT-29 y son prácticamente completas en células Caco.2. Especialmente interesante es el resultado que se obtuvo en células Caco.2 con la combinación de quercetina 100 μ M y 10^7 ufc/ml de *B. bifidum*, ya que en este caso se observó incluso una reducción en el número inicial de células. Para facilitar la interpretación de este resultado, se representan en la Figura 25 los porcentajes de crecimiento de células sin tratar (control) y tratadas con quercetina 100 μ M, con 10^7 ufc/ml de *B. bifidum* o *L. gasseri* o con la combinación de quercetina 100 μ M y 10^7 ufc/ml de *B. bifidum* o *L. gasseri*. En la figura se toma como referencia el crecimiento de las células control (100% de crecimiento).

Tabla 4. Parámetros citotóxicos de la quercetina y los probióticos en células de adenocarcinoma de colon. GI₅₀; concentración del compuesto que inhibe en un 50% el crecimiento de las células. TGI; concentración del compuesto que inhibe por completo el crecimiento de las células. LC₅₀; concentración del compuesto que reduce en un 50% el número de células iniciales. Las concentraciones se expresan en ufc/ml en el caso de *B. bifidum* y *L. gasseri* y como concentración μ M en el caso de la quercetina.

	HT-29			Caco.2		
	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀
Quercetin	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (Bf)	> 10 ⁸	> 10 ⁸	> 10 ⁸	> 10 ⁸	> 10 ⁸	> 10 ⁸
<i>Lactobacillus gasseri</i> (Lg)	> 10 ¹⁰	> 10 ¹⁰	> 10 ¹⁰	1,9 10 ⁷	9,3 10 ⁷	> 10 ¹⁰
Quercetin + Bf	> 100	> 100	> 100	0,08	44,86	> 100
Quercetina +Lg	26,6	> 100	> 100	0,03	> 100	> 100

Estos resultados, junto con los parámetros de citotoxicidad recogidos en la Tabla 4, ponen de manifiesto que la quercetina reduce la viabilidad celular en líneas celulares de adenocarcinoma de colon y que esta reducción es mayor cuando la quercetina se aplica junto con una cepa probiótica. Los resultados también indican que la sensibilidad al tratamiento depende del tipo celular y de la cepa probiótica empleada. En general, podemos afirmar que las células Caco.2 son más sensibles al tratamiento que las células HT-29 y que la inducción por la cepa probiótica del efecto de la quercetina sobre la viabilidad celular es más potente en el caso de *B. bifidum* en células Caco.2 y en el caso de *L. gasseri* en células HT-29.

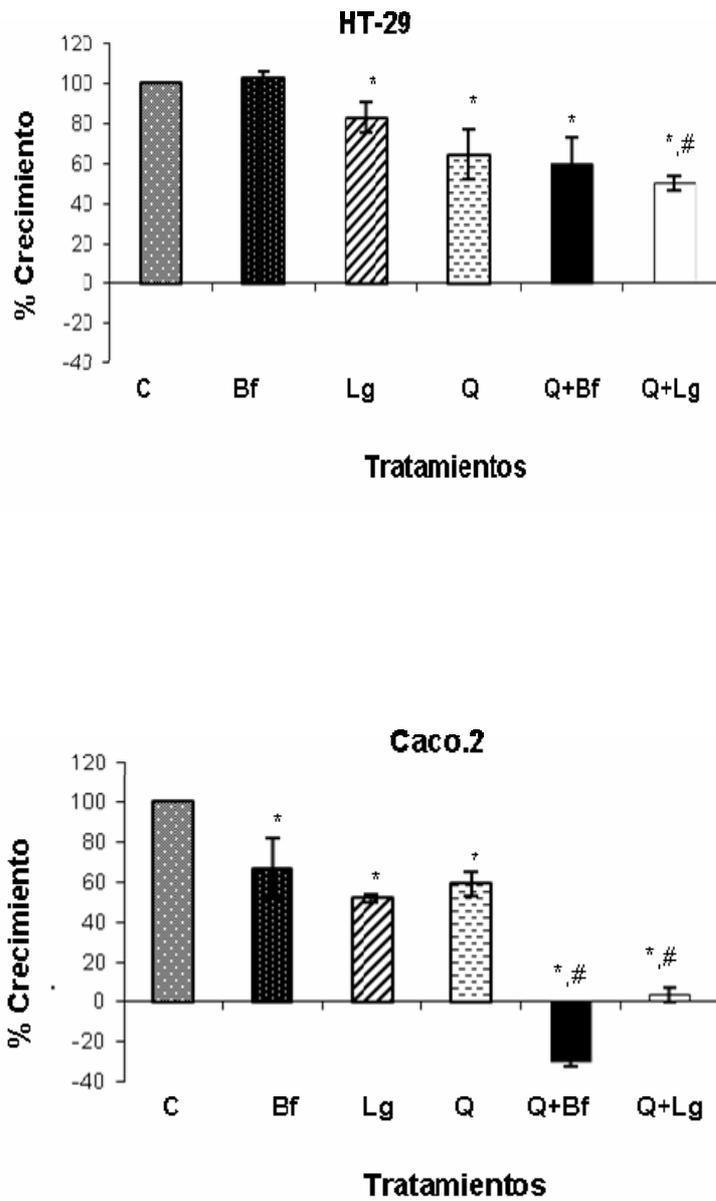


Figura 25. Los probióticos *B. bifidum* y *L. gasseri* (10^7 ufc/mL) potencian el efecto de la quercetina ($100 \mu\text{M}$) sobre el crecimiento celular en cultivos de células HT-29 y Caco.2. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. * indica diferencias significativas con respecto a los de las células control ($p \leq 0,05$). # indica diferencias significativas con respecto a los de las células tratadas con quercetina ($p \leq 0,05$).

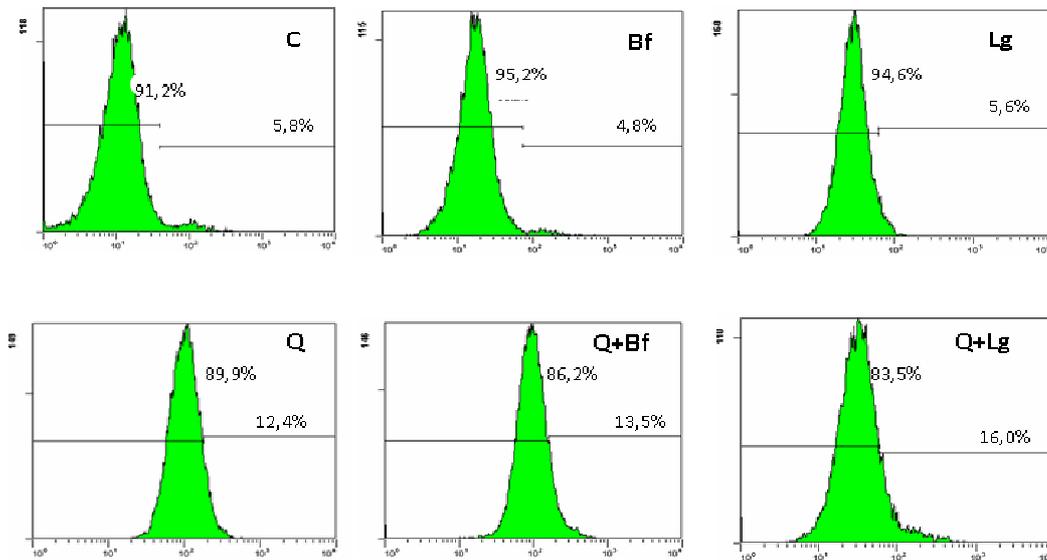
3. APOPTOSIS

3.1 Determinación de Apoptosis

En todos los organismos multicelulares adultos debe existir un equilibrio entre la proliferación y muerte de las células que lo forman con el fin de mantener un tamaño constante¹⁵⁵. Debido a la importancia de la muerte celular programada o apoptosis, en la actualidad hay un elevado número de estudios en la literatura científica en los que se analiza la relación entre la capacidad proliferativa de los tumores y el fenómeno apoptótico. En todos ellos se demuestra que existe una correlación entre apoptosis y proliferación, tanto en tejidos sanos como en tejidos tumorales. Así, una mayor tasa de proliferación se ha asociado con un peor pronóstico y una peor respuesta a los tratamientos. El porcentaje basal de células apoptóticas o la capacidad de inducir la muerte de las células tumorales por la acción de diversos tratamientos también han demostrado tener un papel muy importante en el pronóstico del tumor y en la posible respuesta al tratamiento.¹⁵⁶ Por ello se analizó si el efecto de la quercetina y los probióticos sobre la viabilidad celular detectado en los ensayos de citotoxicidad estaba relacionado con la capacidad para inducir apoptosis. Con este fin se trataron durante 24 horas cultivos de células HT-29 y Caco.2 con quercetina 100 μM , con 10^7 ufc/mL de *B. bifidum* o *L. gasseri* o con la combinación de quercetina y los probióticos y tras los tratamientos se determinó el porcentaje de células apoptóticas en los cultivos. Las determinaciones se llevaron a cabo mediante citometría de flujo por el método TUNEL, empleando el sistema *Apo-Direct kit* (Becton Dickinson). Las Figuras 26 y 27 recogen los resultados obtenidos.

Como se observa en las Figuras 26 y 27, la proporción de células apoptóticas en los cultivos tratados con quercetina 100 μM (12,35% en el caso de la línea celular HT-29 y 11,77% en el caso de la línea celular Caco.2) es mayor que en los cultivos de células no tratados (6,14% en el caso de la línea celular HT-29 y 5,15% en el caso de la línea celular Caco.2). Los resultados muestran también que los probióticos por si mismos no modificaron significativamente la proporción de células apoptóticas en los cultivos de la línea celular HT-29 y que sólo el tratamiento con 10^7 ufc/ml de *L. gasseri* incrementó ligeramente el porcentaje de células apoptóticas en la línea celular Caco.2. Por otro lado, se muestra que el efecto de la quercetina se potenció cuando las células se trataron junto a los probióticos (Fig. 26). Este efecto es mayor en la línea celular Caco.2, en la que llegan a alcanzarse porcentajes de células apoptóticas de hasta un 17,28% en las células tratadas con la combinación de quercetina y la cepa probiótica *L. gasseri* y un 30,28% en las células tratadas con la combinación de quercetina y la cepa probiótica *B. bifidum*.

A)



B)

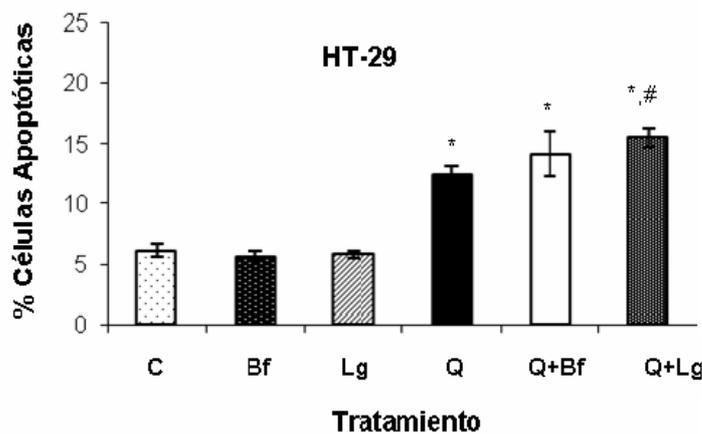
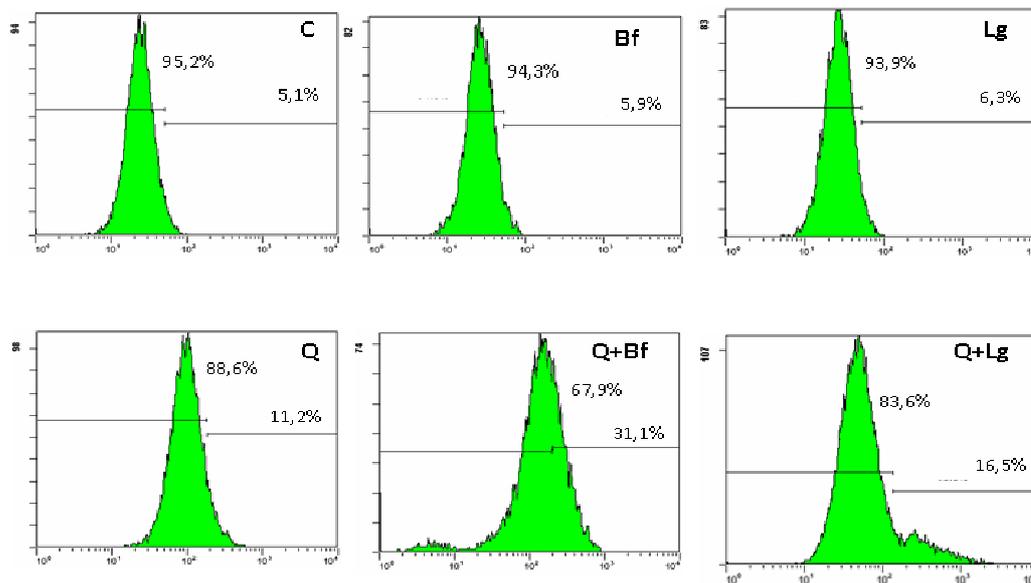


Figura 26. La quercetina induce apoptosis en la línea celular HT-29. Las células se incubaron durante 24 horas en ausencia (control) o presencia de quercetina 100 μ M, 10^7 ufc/mL de los probióticos o la mezcla de ambos. La determinación de la apoptosis se llevó a cabo por el método TUNEL. **A)** Resultado de un experimento representativo; **B)** Porcentaje de células apoptóticas tras el tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. * indica diferencias significativas con respecto a los de las células control ($p \leq 0,05$). # indica diferencias significativas con respecto a los de las células tratadas con quercetina ($p \leq 0,05$).

A)



B)

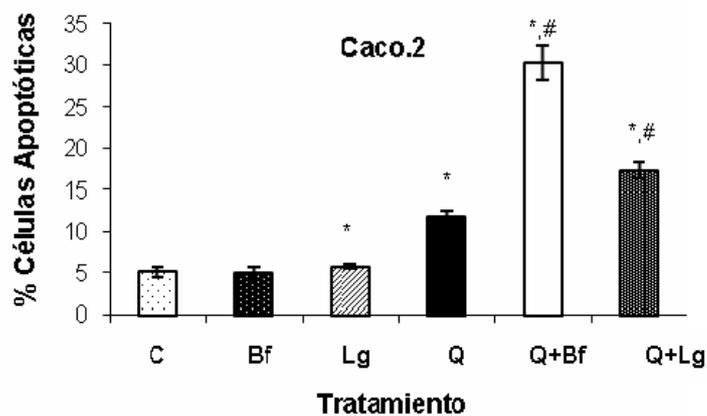


Figura 27. La quercetina induce apoptosis en la línea celular Caco.2. Las células se incubaron durante 24 horas en ausencia (control) o presencia de quercetina 100 μ M, 10^7 ufc/mL de los probióticos o la mezcla de ambos. La determinación de la apoptosis se llevó a cabo por el método TUNEL. **A)** Resultado de un experimento representativo; **B)** Porcentaje de células apoptóticas tras el tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. * indica diferencias significativas con respecto a los de las células control ($p \leq 0,05$). # indica diferencias significativas con respecto a los de las células tratadas con quercetina ($p \leq 0,05$).

Estos resultados indican que la quercetina induce muerte celular por apoptosis en cultivos de células de adenocarcinoma de colon y que los probióticos *B. bifidum* y *L. gasseri* potencian la capacidad de la quercetina para inducir apoptosis en los cultivos.

3.2. Ensayos de inhibición de apoptosis

La forma más común de generar apoptosis en la mayoría de las células es la vía mitocondrial. Este proceso se caracteriza por un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial. La pérdida de la integridad mitocondrial, uno de los eventos más característicos que ocurren durante la apoptosis, permite la salida del citocromo c de la mitocondria y su incorporación en el apoptosoma, lo que conduce a la activación de caspasas y la muerte de la célula.¹⁵⁷ Para analizar si el proceso de muerte celular por apoptosis inducido por la quercetina y los probióticos en células de adenocarcinoma de colon era dependiente de la activación de caspasas tratamos durante 24 horas con quercetina 100 μM , con 10^7 ufc/ml de probióticos o con la combinación de quercetina y probiótico células HT-29 y Caco.2 preincubadas durante 1 hora con el inhibidor general de caspasas *Z-VAD-FMK*. Transcurridas las 24 horas de tratamiento se determinó el porcentaje de células apoptóticas en los cultivos por citometría de flujo empleando el sistema *Apo-Direct kit*. Los valores que se obtuvieron se representan en la Figura 28.

Como se observa en la Figura 28, el inhibidor de caspasas *Z-VAD-FMK* suprime, al menos parcialmente, la apoptosis inducida por la quercetina, los probióticos o la combinación de la quercetina y los probióticos en ambas líneas celulares. Este resultado confirma la dependencia, al menos en parte, de la activación de caspasas en el proceso de muerte celular inducido por la quercetina y potenciado por los probióticos en líneas celulares de adenocarcinoma de colon.

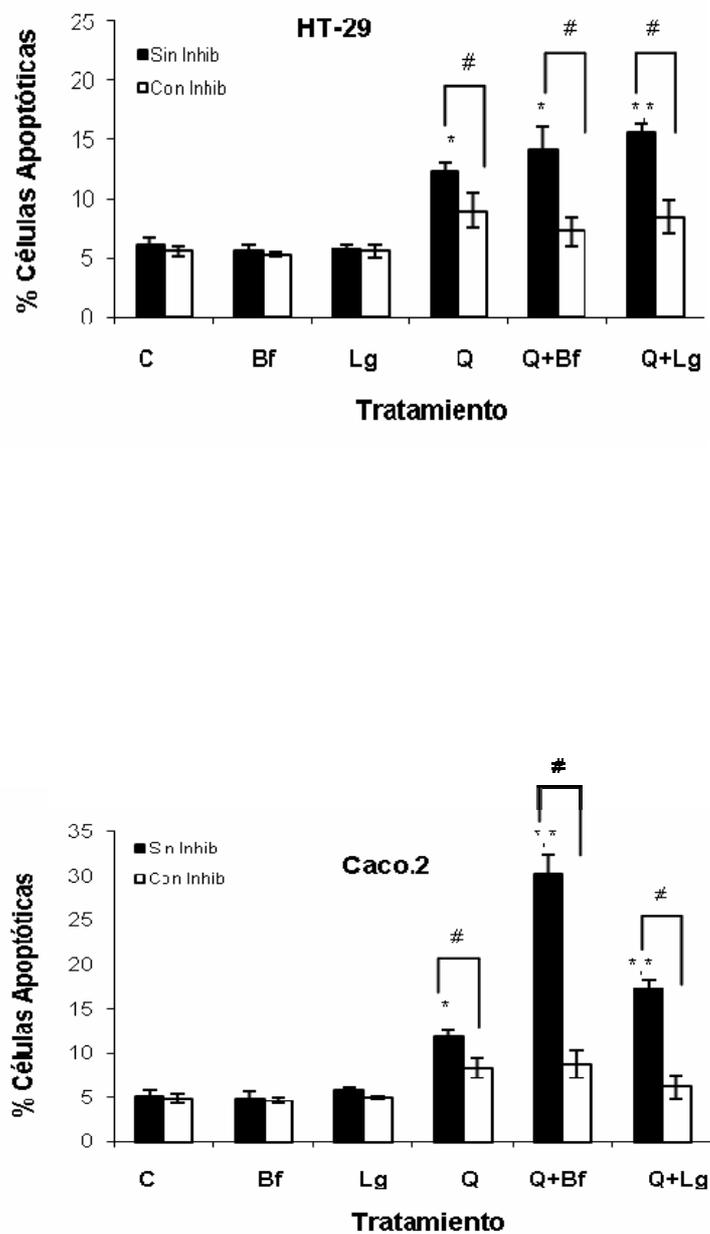


Figura 28. El inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK revierte el efecto de la quercetina en células HT.29 y Caco.2. Se determinó el porcentaje de células apoptóticas en cultivos de células HT-29 o Caco.2 preincubadas en presencia o ausencia Z-VAD-FMK 20 μ M durante 1 hora y tratadas durante 24 horas con quercetina 100 μ M, 10^7 ufc/mL de los probióticos o con la combinación de quercetina y probiótico. Los resultados corresponden a la media \pm SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. * indica diferencias significativas con respecto a los de las células control ($p \leq 0,05$). ** indica diferencias significativas con respecto a los de las células tratadas sólo con quercetina ($p \leq 0,05$). # indica diferencias significativas con respecto a las células tratadas con inhibidor.

3.3 Actividad Caspasa 3

Ya que el inhibidor de caspasas *Z-VAD-FMK* inhibió el proceso de muerte celular inducido por la quercetina y los probióticos en cultivos celulares de las líneas HT-29 y Caco.2, se procedió a estudiar si estas sustancias inducían la actividad caspasa 3 en estas células. Con este fin, se trataron durante 24 horas cultivos celulares de las líneas HT-29 y Caco.2 con quercetina 100 μM , con 10^7 ufc/ml de los probióticos o con la combinación de ambos. Tras las 24 horas de tratamiento se lisaron las células y se determinó la actividad caspasa 3 en los extractos celulares. Los análisis se realizaron por fluorimetría empleando el *kit ApoAlert Caspase Assay Plates*, que contiene el tetrapéptido *DEVD*, sustrato específico de la caspasa 3, unido a un fluorocromo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 29. Se observó que tanto la quercetina como los probióticos y las combinaciones de quercetina y probióticos aumentaron ligeramente la actividad caspasa 3 en los extractos celulares. Sin embargo este aumento no resultó estadísticamente significativo, lo que podría deberse, al menos en parte a la variabilidad entre experimentos y el reducido número de los mismos.

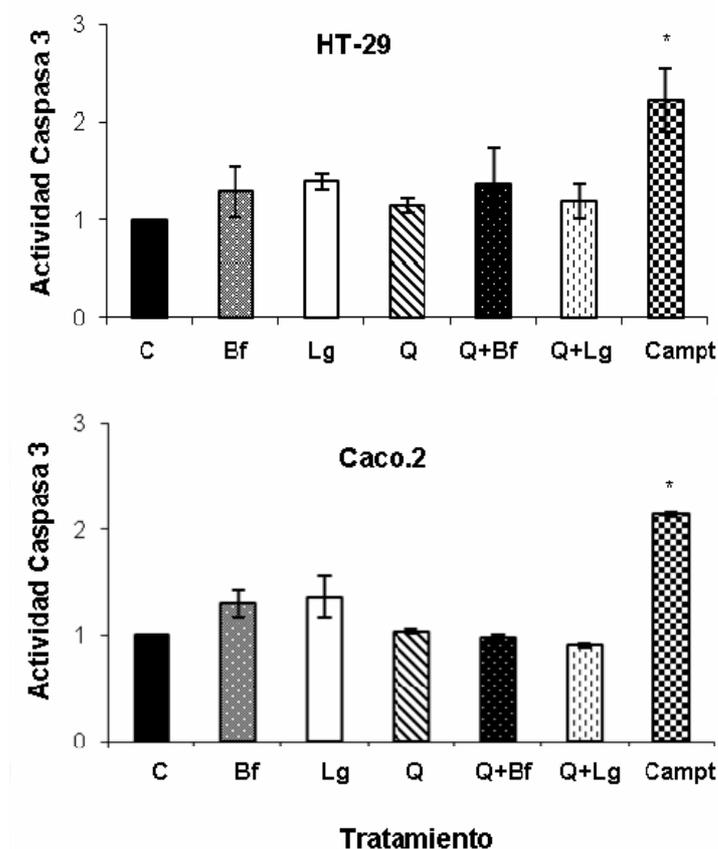


Figura 29. El tratamiento con la quercetina no modifica la actividad de la caspasa 3 en las líneas celulares HT-29 y Caco.2. Las células se incubaron durante 24 horas en ausencia (control) o presencia de quercetina 100 μ M, 10^7 ufc/mL de los probióticos o la mezcla de ambos. La determinación de la actividad de la caspasa 3 se realizó con el kit *ApoAlert Caspase Assay Plates*. Los resultados se expresan como la media \pm SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. * indica diferencias significativas con respecto a los de las células control ($p \leq 0,05$).

4. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

El ciclo celular es un fenómeno universal, presente en el crecimiento y desarrollo de todos los seres vivos y es el proceso por el cual las células se reproducen. Sus etapas más importantes son el proceso de replicación del material hereditario durante la fase de síntesis, llamada fase S, y el reparto de los cromosomas replicados durante la mitosis. Existen mecanismos de control para regular estos procesos y reparar los posibles errores durante su ejecución. Los mecanismos moleculares se encuentran muy conservados, existiendo procesos similares desde organismos unicelulares hasta los vertebrados superiores y el hombre. La exactitud con la que se lleva a cabo este proceso ha garantizado la supervivencia de los organismos, mientras que la pérdida de esta

exactitud aumenta la inestabilidad genómica, un factor importante en el desarrollo del cáncer.¹¹⁴ Estos hechos nos indujeron a estudiar si la quercetina, los probióticos o sus combinaciones tenían efectos sobre la distribución de las células entre las distintas fases del ciclo celular en cultivos de líneas de adenocarcinoma de colon. Con este fin se incubaron las células HT-29 y Caco.2 con quercetina 100 μ M, con 10^7 ufc/mL de *B. bifidum* o *L. gasseri* o con la combinación de ambos durante 24 horas y a continuación se determinó el contenido en DNA de las células. La determinación se llevó a cabo por citometría de flujo con yoduro de propidio mediante el empleo del *Kit Apo-Direct*. De este modo se puede determinar la cantidad de DNA en cada célula individual y calcular el porcentaje de células que se encuentran en cada una de las diferentes fases del ciclo celular (Sub-G1, G0/G1, S y G2/M). Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 30 y 31. Para el cálculo de los resultados se realizaron 3 experimentos independientes por duplicado.

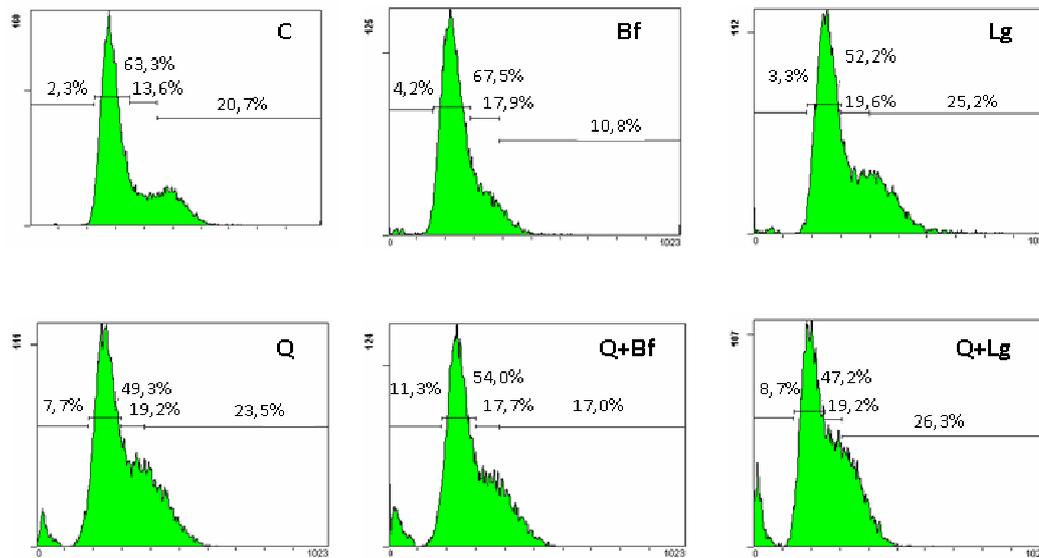
Como cabe esperar de compuestos con capacidad para inducir apoptosis, las Figuras 30 y 31 muestran que el tratamiento durante 24 horas con quercetina 100 μ M incrementa de modo significativo el porcentaje de células subdiploides en ambas líneas celulares. Así, la población de células Sub-G1 aumenta desde el 4,97 % en las células control hasta el 8,79% en las células tratadas en los cultivos de la línea HT-29 (Fig. 30), y desde el 5,18% en las células control hasta el 7,95% en las células tratadas en los cultivos de la línea Caco.2 (Fig. 31). A este aumento en el porcentaje de células Sub-G1 le acompaña, en ambas líneas celulares, una disminución del porcentaje de células en fase G0/G1 y un aumento del porcentaje de células en fase S y fase G2/M. Así, el porcentaje de células en fase G0/G1 en los cultivos de la línea HT-29 pasa desde el 67% en las células control hasta el 52,4% en las células tratadas, y en los cultivos de la línea Caco.2 desde el 64% en las células control hasta el 57% en las células tratadas. A su vez, el porcentaje de células en fase S pasa del 15,5% en las células control hasta el 22,4% en las células tratadas en los cultivos de la línea HT-29 y del 18,5% en las células control hasta el 23,1% en las células tratadas en los cultivos de la línea Caco.2 y el porcentaje de células en fase G2/M pasa del 13,2% en las células control hasta el 17,3% en las células tratadas en los cultivos de la línea HT-29. Este resultado indica que el tratamiento con quercetina provocó un bloqueo del ciclo celular en fase G2/M.

Por otra parte, las figuras también muestran que los tratamientos con los probióticos *B. bifidum* o *L. gasseri* no modificaron el porcentaje de células subdiploides en ninguna de las dos líneas celulares, y sólo provocaron un pequeño aumento en el porcentaje de células en fase G2/M que se correlaciona con un descenso en el porcentaje de células en fase G0/G1. Este resultado, confirma que el tratamiento de las células con los probióticos durante 24 horas no

provoca la muerte de las células, aunque sugiere la existencia de un bloqueo del ciclo celular coherente con su efecto inhibidor sobre la proliferación celular (Fig. 24).

Por último, las Figuras 30 y 31 también muestran que el tratamiento combinado con la quercetina y los probióticos provocó los mismos efectos, aunque de forma más manifiesta, que el tratamiento con quercetina. De hecho, existen diferencias estadísticamente significativas entre las células tratadas con la combinación de quercetina y probióticos y las células tratadas sólo con quercetina. Así, en los cultivos de la línea Caco.2 la población de células Sub-G1 aumenta desde el 7,95% en las células tratadas con quercetina hasta el 18,4% en las células tratadas con la combinación de quercetina y *B.bifidum*, aunque no se encontraron diferencias significativas entre estas poblaciones de células en los tratamientos con la combinación de quercetina y *L. gasseri* (Fig. 30). A este aumento en el porcentaje de células Sub-G1 le acompañó, una disminución del porcentaje de células en fase G0/G1 y en fase S y un aumento en fase G2/M. Así, el porcentaje de células en fase G0/G1 disminuyó desde el 57% en las células tratadas con quercetina hasta el 47,5% en las células tratadas con la combinación de quercetina y la cepa *B.bifidum* y hasta el 52% con la cepa *L. gasseri*, mientras que el porcentaje de células en fase S disminuyó del 23,1% en las células tratadas con quercetina hasta el 18,4% en las células tratadas con la combinación de quercetina y la cepa *B.bifidum* y no encontramos diferencias significativas con la combinación de quercetina y la cepa *L. gasseri*. Por último, el porcentaje de células en fase G2/M pasa del 12,4% en las células tratadas con quercetina hasta el 16% tanto en las células tratadas con la combinación de quercetina y *B.bifidum* como en las tratadas con la combinación de quercetina y *L. gasseri*. Respecto a la línea celular HT-29, en la Figura 31 se observa que, como en el caso de la línea Caco.2, los probióticos aumentaron el efecto de la quercetina, aunque por hacerlo de forma más moderada las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas.

A)



B)

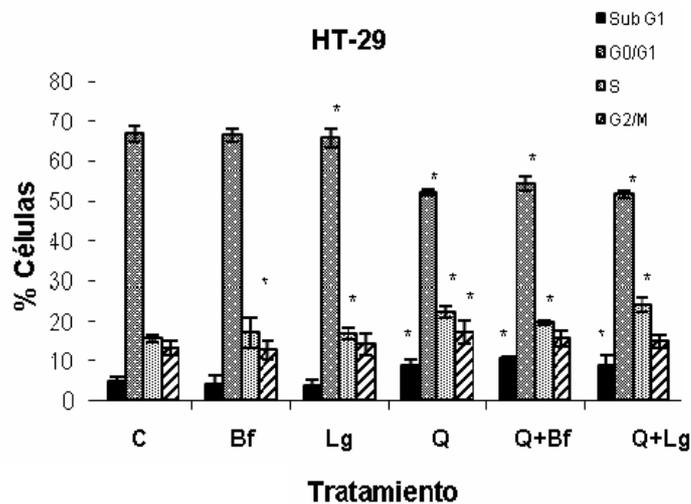
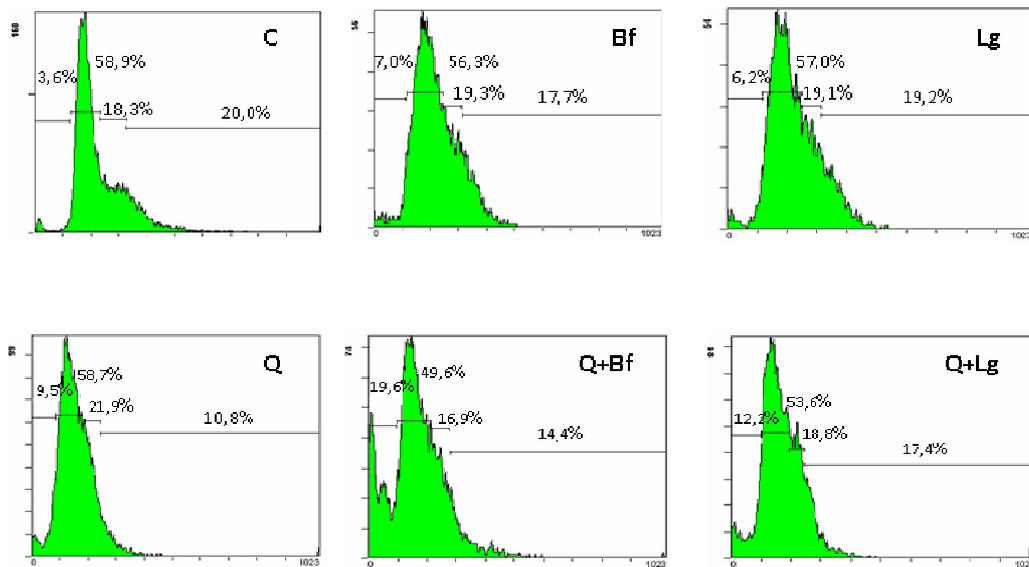


Figura 30. La quercetina modifica la distribución de las células HT-29 en las diferentes fases del ciclo celular. Las células se incubaron durante 24 horas en ausencia (control) o presencia de quercetina 100 μ M, 10^7 ufc/mL de los probióticos o la mezcla de ambos. **A)** Resultado de un experimento representativo, **B)** Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular tras el tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. * indica diferencias significativas con respecto a los de las células control ($p \leq 0,05$). # indica diferencias significativas con respecto a los de las células tratadas con quercetina ($p \leq 0,05$).

A)



B)

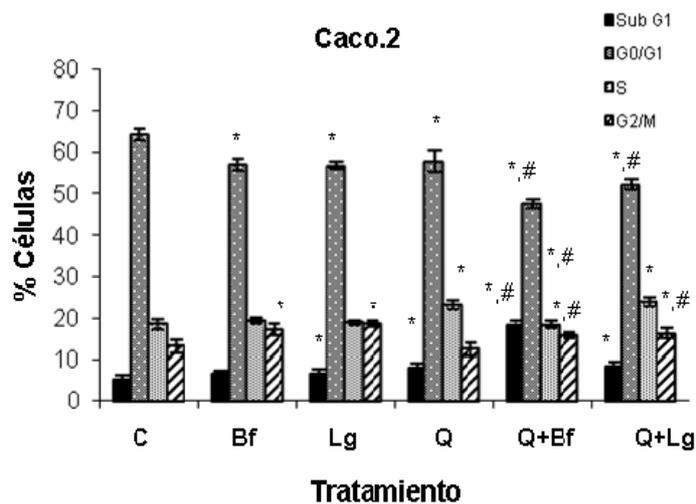


Figura 31. La quercetina modifica la distribución de las celular Caco.2 en las diferentes fases del ciclo celular. Las células se incubaron durante 24 horas en ausencia (control) o presencia de quercetina 100 μ M, 10^7 ufc/mL de los probióticos o la mezcla de ambos. **A)** Resultado de un experimento representativo, **B)** Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular tras el tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. * indica diferencias significativas con respecto a los de las células control ($p \leq 0,05$). # indica diferencias significativas con respecto a los de las células tratadas con quercetina ($p \leq 0,05$).

5. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS Y CICLO CELULAR

Para analizar con mayor detalle el mecanismo molecular por el que la quercetina y los probióticos bloquean el ciclo celular e inducen la muerte de las células se analizó el efecto de los tratamientos sobre la expresión de diversas proteínas habitualmente relacionadas con estos procesos, como AMPK α , p53, p21, Bcl-2 y Bax. Con este fin se compararon los patrones de expresión de estas proteínas en cultivos de células de adenocarcinoma de colon sin tratar o tratadas durante 24 horas con quercetina 100 μ M, con 10⁷ ufc/ml de *B. bifidum* o *L. gasseri* o con una mezcla de ambos. La expresión de las proteínas se determinó por western blot con anticuerpos específicos. Los resultados que se obtuvieron se detallan a continuación.

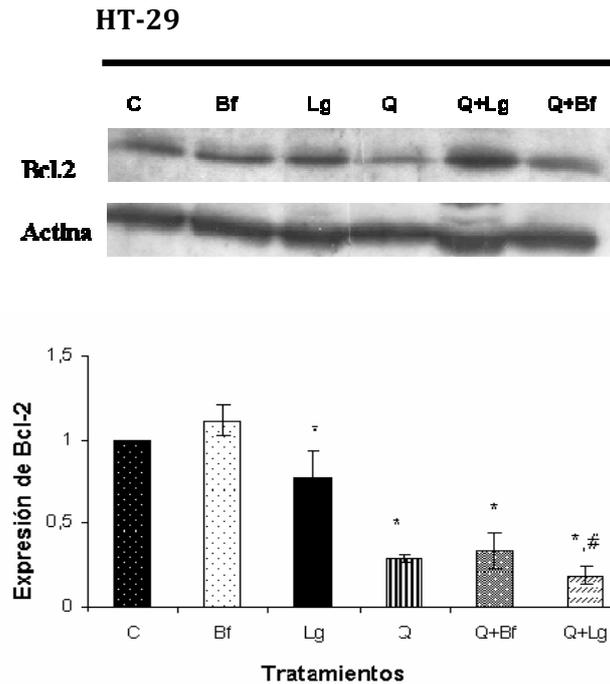
5.1 La quercetina y las cepas probióticas modifican la expresión de Bcl-2 y Bax

Las proteínas de la familia Bcl-2 juegan un papel muy importante en la regulación de la apoptosis. Entre ellas se encuentran proteínas inductoras de la apoptosis como Bax y proteínas inhibidoras de la apoptosis como Bcl-2.¹⁵⁸ Con el fin de analizar si los tratamientos modifican la expresión de Bcl-2 y Bax se incubaron las células HT-29 y Caco. 2 con quercetina 100 μ M, con 10⁷ ufc/mL de las cepas probióticas *B. bifidum* o *L. gasseri* o con la combinación de quercetina y probióticos durante 24 horas. Transcurridas 24 horas se lisaron las células y se analizó la expresión de Bcl-2 y Bax en los extractos celulares. La cuantificación se llevó a cabo por western blot de forma relativa por comparación con la de la proteína constitutiva β -actina. En las determinaciones se emplearon los anticuerpos *Bcl-2* (N-19), específico de Bcl-2, *Bax* (Δ 21), específico de Bax y β -actina (PA1-21167), específico de la β -actina. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 32 y 33.

En la Figura 32 se observa que el tratamiento con quercetina redujo en un 70% la expresión de Bcl-2 en células HT-29 y en un 50% en células Caco.2. Se observa también que los probióticos no afectaron a la expresión de Bcl-2 en ninguna de las dos líneas celulares, excepto en el caso de la cepa *L. gasseri* y HT-29 en él que se produjo una disminución del 30% en la expresión de Bcl-2. Por otra parte el tratamiento combinado con quercetina y los probióticos disminuyó la expresión de Bcl-2 en mayor proporción que el tratamiento con quercetina solo. Este efecto es más acusado en el caso de la combinación de quercetina y *L. gasseri*, que reduce la expresión de Bcl-2 en un 80% en células HT-29 y Caco.2. Sin embargo, el tratamiento con la combinación de

quercetina y *B. bifidum* en células HT-29 no produjo diferencias significativas en la expresión de Bcl-2 con respecto a la detectada en las células tratadas sólo con quercetina. Estos resultados ponen de manifiesto que los probióticos potencian el efecto de la quercetina sobre la expresión de Bcl-2 en líneas celulares de adenocarcinoma de colon, aunque este efecto es dependiente de la cepa probiótica y la línea celular.

A)



B)

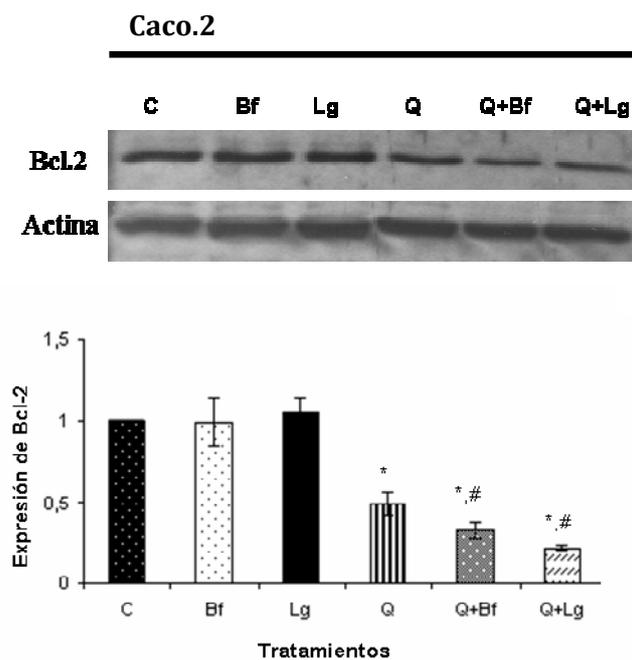
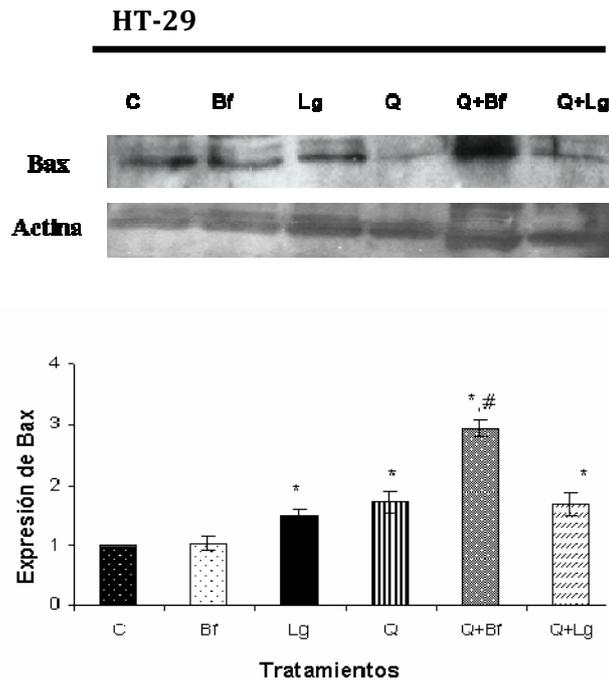


Figura 32. La quercetina disminuye la expresión de Bcl.2 en las líneas celulares HT-29 y Caco.2. Se determinó mediante western-blot la expresión de Bcl-2 en células HT-29 (A) o Caco.2 (B) incubadas durante 24 horas en ausencia (control) o presencia de quercetina 100 μ M, de 10^7 ufc/mL de los probióticos o de la mezcla de ambos. Los resultados, normalizados con respecto a los de la β -actina, se expresan de forma relativa tomando como 1 los de las células control. Los resultados se representan como media \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. * indica diferencias significativas con respecto a los de las células control ($p \leq 0,05$). # indica diferencias significativas con respecto a los de las células tratadas con quercetina ($p \leq 0,05$).

Los resultados del tratamiento con quercetina representados en la Figura 33 muestran que la expresión de Bax aumentó en un 70% en células HT-29 y en un 97% en células Caco.2. También muestra que el tratamiento con los probióticos aumentó la expresión de Bax en la línea celular Caco.2, en la que se produjo un aumento del 40% en el caso del tratamiento con la cepa *B. bifidum* y del 70% en el caso del tratamiento con *L. gasseri*. Sin embargo, en la línea celular HT-29 este aumento sólo se observó con la cepa *L. gasseri* (46% de aumento). La figura también muestra que el tratamiento combinado con quercetina y *B. bifidum* aumentó la expresión de Bax en mayor medida que el tratamiento con quercetina sola en ambas líneas celulares (incrementó en 3 veces la expresión de Bax en Caco.2 y HT-29). Estos resultados indican que los probióticos potencian el efecto de la quercetina sobre la expresión de Bax en líneas celulares de adenocarcinoma de colon, si bien este efecto es dependiente de la línea celular y la cepa probiótica, que es más efectiva si se trata de *B. bifidum* que si se trata de *L.gasseri*.

A)



B)

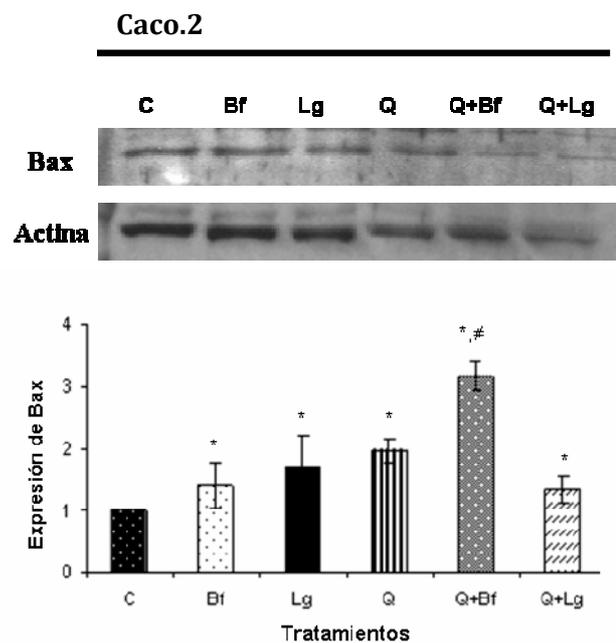


Figura 33. La quercetina aumenta la expresión de Bax en las líneas celulares HT-29 y Caco.2. Se determinó mediante western-blot la expresión de Bax en células HT-29 (A) o Caco.2 (B) incubadas durante 24 horas en ausencia (control) o presencia de quercetina 100 μ M, de 10^7 ufc/mL de los probióticos o de la mezcla de ambos. Los resultados, normalizados con respecto a los de la β -actina, se expresan de forma relativa tomando como 1 los de las células control. Los resultados se representan como media \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. * indica diferencias significativas con respecto a los de las células control ($p \leq 0,05$). # indica diferencias significativas con respecto a los de las células tratadas con quercetina ($p \leq 0,05$).

5.2 La quercetina y las cepas probióticas aumentan la fosforilación de la AMPK

La proteína-quinasa AMPK forma parte de la subfamilia de proteínas-quinasas activadas por AMP/SNF1. Esta proteína-quinasa, que se activa por fosforilación, interviene en procesos diversos entre los que se incluyen la activación de rutas catabólicas, la inhibición de rutas anabólicas, la parada del ciclo celular y la inducción de apoptosis. Por todo esto se ha propuesto que la AMPK actúa como marcador metabólico e inhibidor de la carcinogénesis.¹⁵⁹

Con el fin de analizar si los tratamientos de cultivos celulares de adenocarcinoma de colon con quercetina, probióticos o sus combinaciones modifican la cantidad de AMPK α fosforilada en los cultivos, se incubaron las células HT-29 y Caco. 2 con quercetina 100 μ M, con 10^7 ufc/mL de las cepas probióticas *B. bifidum* o *L. gasseri* o con la combinación de quercetina y probióticos durante 24 horas. Tras 24 horas, se lisaron las células y se cuantificó la cantidad de AMPK α fosforilada en los extractos celulares. La cuantificación se llevó a cabo por western blot de forma relativa por comparación con la de la proteína constitutiva β -actina. En las determinaciones se emplearon los anticuerpos *p-AMPK α 1/2 (Thr 172)*, específico de la forma fosforilada de la AMPK α en la treonina 172, y *β -actina (PA1-21167)*, específico de la β -actina. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 34.

Como puede observarse en la Figura 34, el tratamiento con quercetina aumenta 3 veces la cantidad de AMPK α fosforilada en células HT-29 y 2 veces en células Caco.2 (Fig. 34). Los resultados también ponen de manifiesto que los probióticos no modificaron la cantidad de AMPK α fosforilada en la línea celular Caco.2. Sin embargo, en la línea celular HT-29 indujeron un aumento en la fosforilación de AMPK α , del 40% en el caso de *B. bifidum* y del 70% en él de *L. gasseri*. Del mismo modo los tratamientos combinados con quercetina y los probióticos incrementaron los niveles de la p-AMPK α en comparación con el tratamiento con quercetina sólo. Así, en cultivos de la línea celular HT-29 la fosforilación de AMPK α aumentó hasta 4 veces en el caso del tratamiento con quercetina y la cepa *B. bifidum* y más de 4 veces con la cepa *L. gasseri*, mientras que en cultivos de la línea celular Caco.2 aumentó 3 veces con ambos tratamientos combinados de quercetina y probiótico. Estos resultados indican que los probióticos potencian el efecto de la quercetina sobre la fosforilación del AMPK α en líneas celulares de adenocarcinoma de colon.

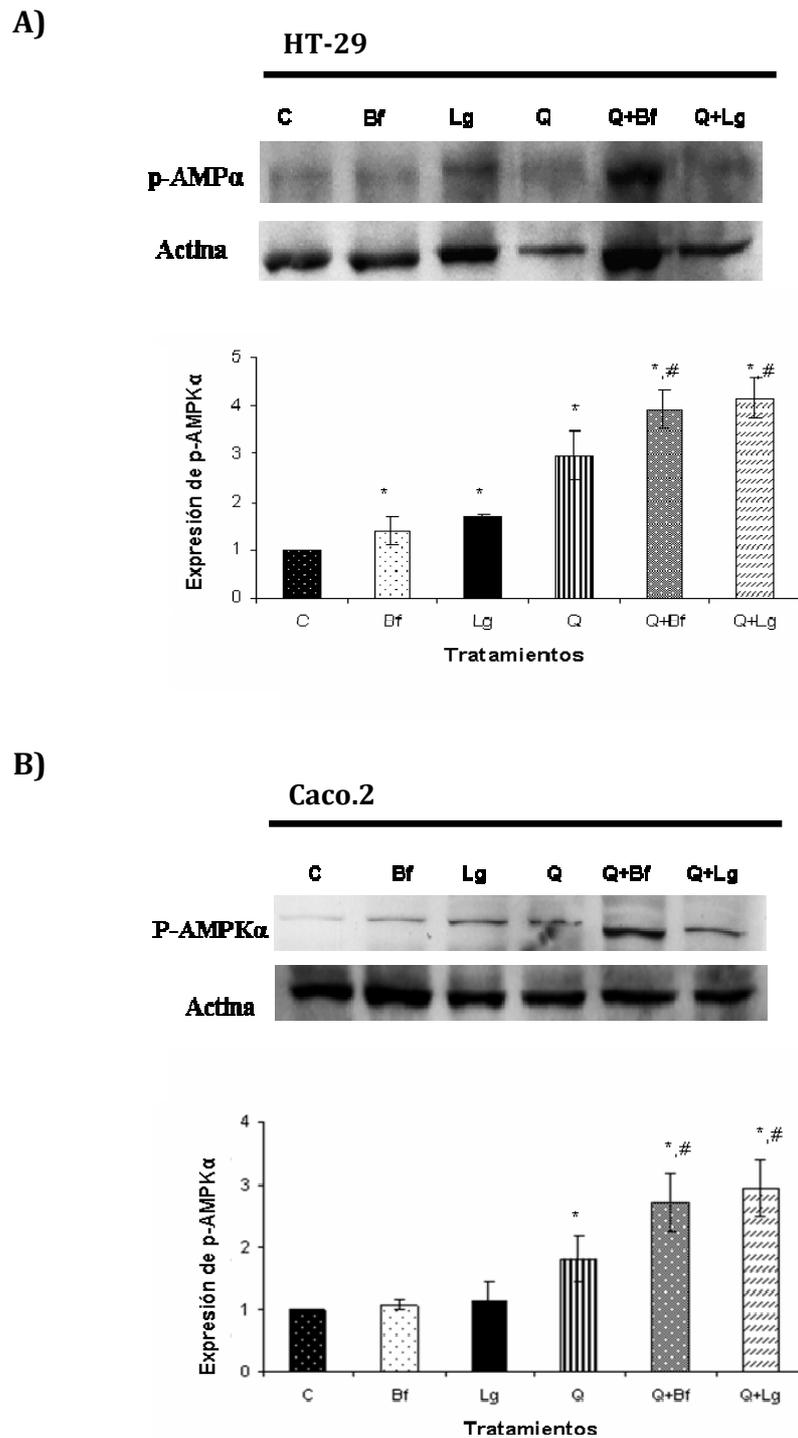


Figura 34. La quercetina aumenta la expresión de AMPKα en las líneas celulares HT-29 y Caco.2. Se determinó mediante western-blot la expresión de AMPKα en células HT-29 **A)** o Caco.2 **B)** incubadas durante 24 horas en ausencia (control) o presencia de quercetina 100 μM, de 10⁷ ufc/mL de los probióticos o de la mezcla de ambos. Los resultados, normalizados con respecto a los de la β-actina, se expresan de forma relativa tomando como 1 los de las células control. Los resultados se representan como media ± SEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. * indica diferencias significativas con respecto a los de las células control ($p \leq 0,05$). # indica diferencias significativas con respecto a los de las células tratadas con quercetina ($p \leq 0,05$).

5.3 La quercetina y las cepas probióticas aumentan la expresión de p53 y p21

La proteína p21 es un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas, y por lo tanto funciona como un regulador del ciclo celular, ejerciendo un papel primordial en el control de la transición G1/S. La expresión de esta proteína está estrechamente regulada por la proteína supresora de tumores p53, por lo que el control del ciclo celular en G1 es dependiente de p53 y las células detienen el ciclo celular como respuesta a un estímulo estresante.¹⁶⁰ Las líneas celulares HT-29 y Caco.2 de adenocarcinoma de colon poseen una forma mutada del gen p53, por lo que su actividad en estas células es reducida.¹⁴³

Con el fin de analizar si los tratamientos de cultivos de células HT-29 o Caco.2 con quercetina, probióticos o sus combinaciones modifican la expresión de p53 y p21 en estas células, se incubaron células HT-29 y Caco. 2 con quercetina 100 μ M, con 10⁷ ufc/mL de las cepas probióticas *B. bifidum* o *L. gasseri* o con la combinación de quercetina y probióticos durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas se lisaron las células y se analizó la expresión de p53 y p21 en los extractos celulares. La cuantificación se llevó a cabo por western blot de forma relativa por comparación con la de la proteína constitutiva β -actina. En las determinaciones se emplearon los anticuerpos *P53 (FL-393)*, específico de p53, *P21 (C-19)*, específico de p21 y *β -actina (PA1-21167)*, específico de la β -actina. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 35 y 36.

Los resultados representados en la Figura 35 muestran que el tratamiento con quercetina aumentó en 2 veces la expresión de p53 en células HT-29 y Caco.2. También muestran que los probióticos no afectaron a la expresión de p53 en ninguna de las dos líneas celulares, mientras que los tratamientos combinados con quercetina y los probióticos aumentaron la expresión de p53 más que el tratamiento con quercetina. Este efecto es más acusado en el caso de la combinación de quercetina y *L. gasseri*, que aumentó la expresión de p53 en 3 veces tanto en células HT-29 como Caco.2. Sin embargo, con la combinación de quercetina y *B. bifidum* este aumento sólo se detectó en células HT-29, mientras que en el caso de células Caco.2 no se observaron diferencias significativas en la expresión de p53 con respecto a los de las células tratadas sólo con quercetina. Estos resultados indican que los probióticos potencian el efecto de la quercetina sobre la expresión de p53 en líneas celulares de adenocarcinoma de colon de modo dependiente de la cepa probiótica y la línea celular utilizada.

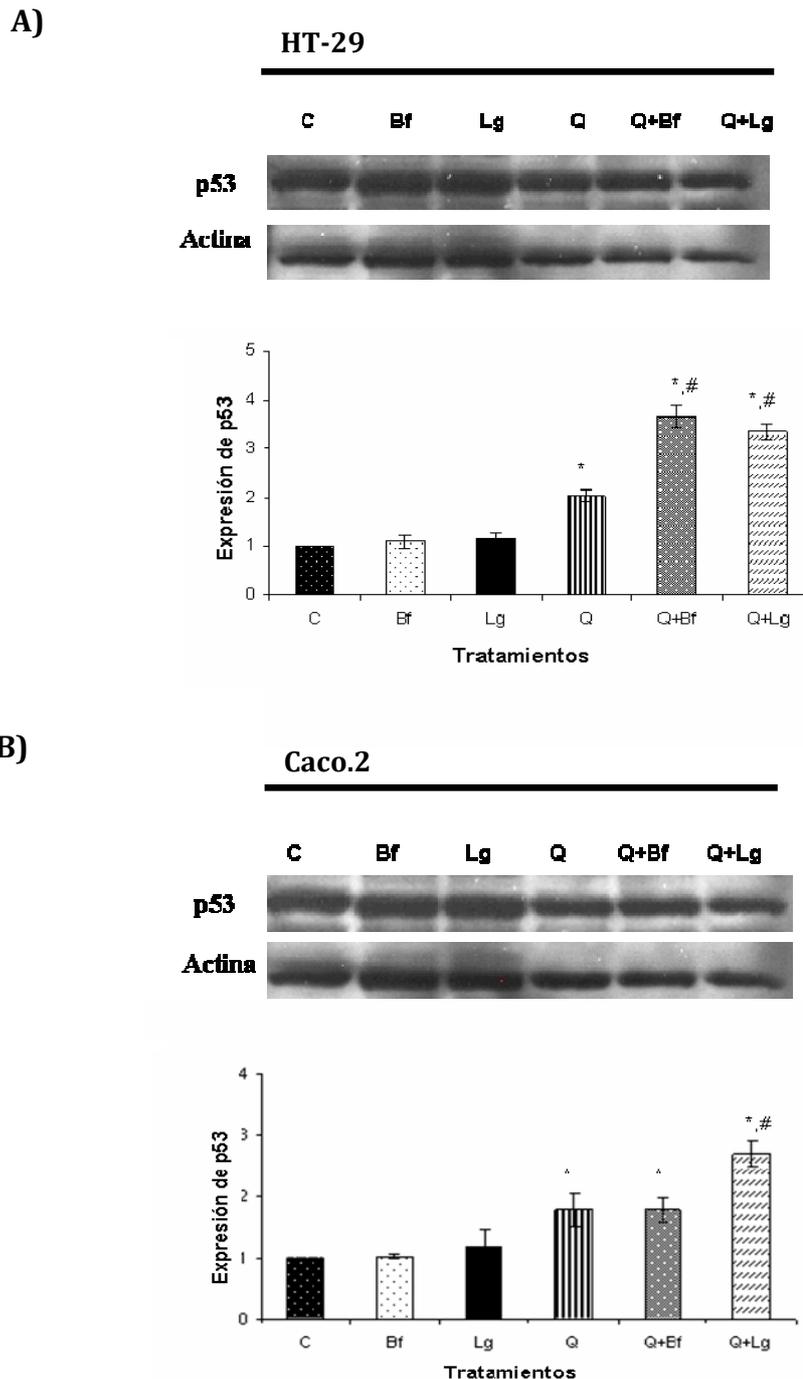
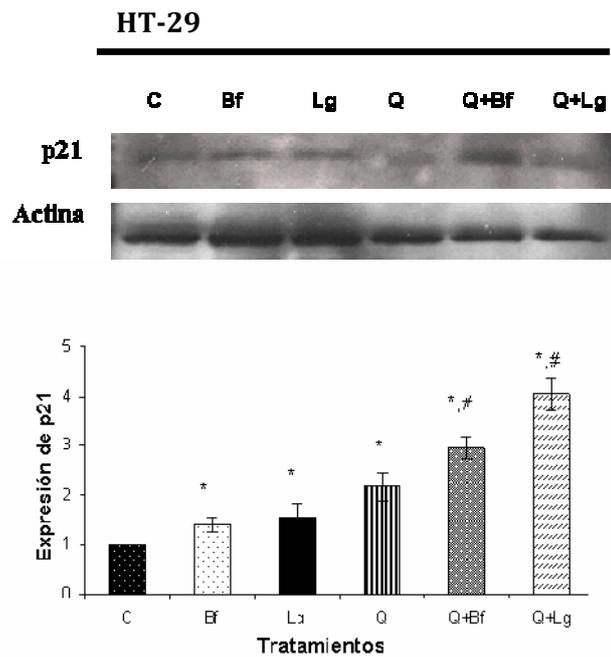


Figura 35. La quercetina aumenta la expresión de p53 en las líneas celulares HT-29 y Caco.2. Se determinó mediante western-blot la expresión de p53 en células HT-29 **A)** o Caco.2 **B)** incubadas durante 24 horas en ausencia (control) o presencia de quercetina 100 μ M, de 10^7 ufc/mL de los probióticos o de la mezcla de ambos. Los resultados, normalizados con respecto a los de la β -actina, se expresan de forma relativa tomando como 1 los de las células control. Los resultados se representan como media \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. * indica diferencias significativas con respecto a los de las células control ($p \leq 0,05$). # indica diferencias significativas con respecto a los de las células tratadas con quercetina ($p \leq 0,05$).

Los resultados expresados en la Figura 36 muestran que el tratamiento con quercetina aumentó 2 veces la expresión de p21 en células HT-29 y Caco.2 (Fig. 36). También muestra que los probióticos afectaron a la expresión de p21 en la línea HT-29, en la que se produjo un aumento de un 40% en el caso de la cepa *B. bifidum* y de un 60% en el caso de la cepa *L. gasseri*, aunque no lo hicieron en la línea celular Caco.2. Los resultados también muestran que el tratamiento combinado con quercetina y los probióticos aumentó la expresión de p21 más que el tratamiento con quercetina sola. Este efecto es más acusado en el caso del tratamiento con la combinación de quercetina y *L. gasseri* que aumentó la expresión de p21 4 veces. Sin embargo con la combinación de quercetina y *B. bifidum* este efecto si se detecta en las células HT-29, mientras que en el caso de las células Caco.2 no se observaron diferencias significativas en la expresión de p21 con respecto a las células tratadas sólo con quercetina. Estos resultados revelan que los probióticos potencian el efecto de la quercetina sobre la expresión de p21 en líneas celulares de adenocarcinoma de colon aunque sea dependiente de la cepa probiótica y la línea celular utilizada.

A)



B)

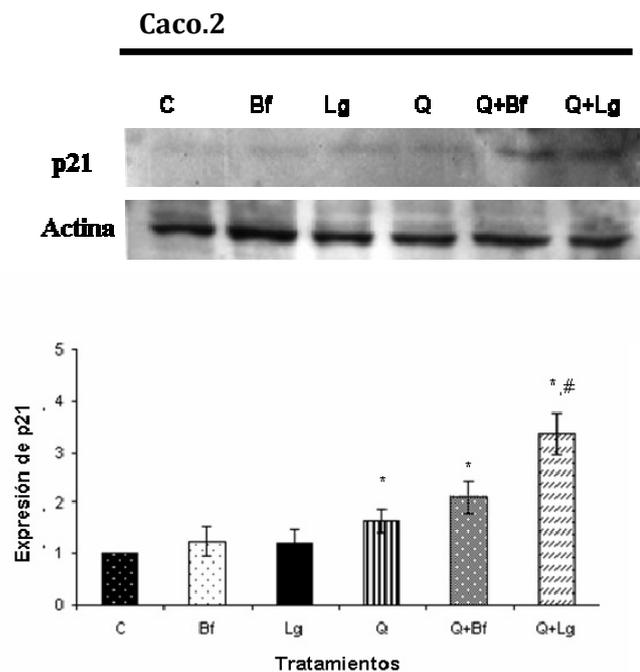


Figura 36. La quercetina aumenta la expresión de p21 en las líneas celulares HT-29 y Caco.2. Se determinó mediante western-blot la expresión de p21 en células HT-29 A) o Caco.2 B) incubadas durante 24 horas en ausencia (control) o presencia de quercetina 100 μ M, de 10^7 ufc/mL de los probióticos o de la mezcla de ambos. Los resultados, normalizados con respecto a los de la β -actina, se expresan de forma relativa tomando como 1 los de las células control. Los resultados se representan como media \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. * indica diferencias significativas con respecto a los de las células control ($p \leq 0,05$). # indica diferencias significativas con respecto a los de las células tratadas con quercetina ($p \leq 0,05$).

DISCUSIÓN

Desde hace varias décadas se han realizado numerosos estudios científicos relacionados con la posible actividad de los compuestos no nutricionales que forman parte de nuestra dieta, ya que se ha sugerido que estos compuestos pueden llegar a prevenir el desarrollo de enfermedades como el cáncer. Este grupo de moléculas, conocidas como fitoquímicos, es muy heterogéneo e incluye vitaminas, polifenoles, ácidos fenólicos, compuestos sulfurados y fitoalexinas.^{161,162} Se encuentran fundamentalmente en frutas y verduras. Debido a su abundancia en la dieta, la quercetina es uno de los fitoquímicos que más interés han despertado. Mediante una dieta rica en quercetina se puede llegar a alcanzar una concentración en plasma de quercetina y de sus metabolitos secundarios de hasta 8 $\mu\text{mol/L}$, y se ha descrito que una dieta rica en quercetina está asociada con un menor riesgo de desarrollar cáncer.¹⁶³

Entre los temas de investigación de mayor actualidad se encuentra el análisis de la posible sinergia entre probióticos y fitoquímicos como la fibra, los oligosacáridos o los flavonoides. La fermentación de estos compuestos por cepas probióticas, principalmente de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, origina nuevas moléculas bioactivas con características antitumorales. Entre estos metabolitos secundarios obtenidos por fermentación destacan los ácidos butírico, propiónico y acético, compuestos que actúan en la reducción de la inflamación gastrointestinal,¹⁶⁴ la modulación de la actividad enzimática intestinal,¹⁶⁵ la reducción de adenomas en la mucosa colónica,¹⁶⁶ la modulación de la proliferación y diferenciación celular⁹⁸ y la mejora del tránsito intestinal.⁹⁵ Todas estas evidencias sugieren que la quercetina es capaz de actuar a diferentes niveles en el desarrollo del cáncer y que los probióticos podrían modificar sus acciones al llevar a cabo procesos de fermentación que originarían nuevas moléculas bioactivas con posible actividad anticancerígena.

1. SINÉRGIA EN LA ACCIÓN DE LA QUERCETINA Y *B. BIFIDUM* O *L. GASSERI* SOBRE EL TRANSPORTE DE NUTRIENTES AL INTERIOR DE LA CÉLULA

La glucosa es el principal monosacárido que proporciona energía a las células del organismo. Esto hace que el transporte de glucosa al interior de la célula constituya un proceso esencial para el metabolismo energético y, en consecuencia, para los procesos que mantienen la vida. En el ser humano los monosacáridos de la dieta se absorben principalmente en el intestino delgado. En su absorción intervienen transportadores de glucosa dependientes de sodio de la familia SGLT y también proteínas de la familia de facilitadores de glucosa GLUT. Ya que las células

tumorales requieren un mayor aporte de los nutrientes, principalmente glucosa y aminoácidos, necesarios para el desarrollo y la vascularización del tejido tumoral, y por tanto para su proliferación y diferenciación, el metabolismo de la glucosa resulta de gran importancia en el desarrollo del cáncer colorrectal. Por ello no puede extrañar que se haya sugerido que, junto con el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), el transportador de glucosa SGLT-1, que se sobreexpresa durante la carcinogénesis, podría ser un buen marcador para el diagnóstico del cáncer colorrectal.^{150,167} Esta alteración en la expresión de SGLT-1 podría ser debida a la mayor demanda de glucosa por parte de las células tumorales para producir energía (Fig 38), resulta interesante que en este trabajo hayamos detectado que el tratamiento de cultivos de las líneas celulares de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2 con quercetina 100 μ M durante 24 horas (Fig 23) disminuye su expresión, indicando que la quercetina reduce las necesidades energéticas de las células y sugiriendo, por tanto, que disminuye su capacidad proliferativa. También resulta interesante que, a diferencia de la quercetina, la exposición de las células a las cepas probióticas *B. bifidum* o *L. gasseri* no modificara los niveles de expresión de SGLT-1 en los cultivos, pero que el tratamiento de las células HT-29 y Caco.2 con la combinación de quercetina 100 μ M y 10^7 ufc/mL de *B. bifidum* o *L. gasseri* disminuyera el nivel de expresión de SGLT-1 en los cultivos más que el tratamiento con la quercetina sola. Estos resultados indican que las cepas probióticas no afectan por si mismas a la expresión de SGLT-1 pero potencian el efecto de la quercetina sobre la misma. En cualquier caso hay que resaltar que este efecto fue más acusado en los cultivos de células Caco.2 y en los tratamientos combinados en que se empleó *L. gasseri*, lo que sugiere que la sinergia entre el flavonoide y el probiótico depende de la línea celular y la cepa probiótica.

Se ha descrito que los receptores del factor de crecimiento epitelial (EGFR) se sobreexpresan en el cáncer de colon y que su sobreexpresión se correlaciona con estados avanzados de la enfermedad e indiferenciación de las células tumorales.¹⁶⁸ Algunos estudios han mostrado que en células de adenocarcinoma de colon HT-29 estos receptores son modulados por flavonoides como la quercetina, por lo que se ha llegado a sugerir que las acciones de la quercetina en el cáncer colorrectal podrían estar relacionadas con su capacidad para suprimir la activación por fosforilación de EGFR.¹⁶⁹ Además, la inhibición de la fosforilación de EGFR en células HT-29 se asocia con regulación de la actividad de MAPKs como ERK1 y ERK2.¹⁶⁹ Por ello es posible que la regulación del transporte de glucosa se produzca mediante interacciones proteína-proteína entre el transportador SGLT-1 y el receptor EGFR. Esta interacción, que es independiente de la actividad tirosina quinasa de EGFR, conduciría a la estabilización de SGLT-1 e incrementaría la actividad de transporte de glucosa a través de la membrana. Por tanto, puesto que la interacción del dominio extracelular del EGFR con el transportador de glucosa SGLT-1 conduce a la sobreexpresión de SGLT-1 en procesos como el cáncer de colon en los que la demanda de

glucosa por parte de las células es mayor, la supresión por quercetina de la activación de EGFR es una posible explicación para la disminución de la expresión de SGLT-1 inducida por la quercetina.

También se ha sugerido que las acciones de la quercetina en células de adenocarcinoma de colon podrían deberse a sus efectos sobre la AMPK, cuya fosforilación, y por tanto activación, induce.¹⁷⁰ En este sentido, es importante tener en cuenta que se ha descrito que en células Caco.2 la expresión de esta proteína se correlaciona de modo inverso con la actividad transportadora de glucosa^{170,171} y, también, que en este trabajo hemos confirmado que la quercetina induce la fosforilación de la subunidad α de la AMPK (Fig 34) y que los probióticos *B. bifidum* y *L. gasseri* actúan de modo sinérgico con la quercetina en lo que a esta fosforilación se refiere. Nuestros resultados sugieren por tanto que la activación de la vía de señalización mediada por la AMPK es la causa de la represión de la expresión de SGLT-1 por quercetina.

Las modificaciones en el transporte de monosacáridos como la glucosa suelen estar asociadas frecuentemente con alteraciones en la actividad de enzimas intestinales con actividad disacaridasa, como la sacarasa, la maltasa o la lactasa. La actividad de estas enzimas, encargadas de llevar a cabo la hidrólisis de los disacáridos, está modificada durante el desarrollo del cáncer, por lo que pueden ser utilizadas como marcadores de diferenciación celular. De hecho, se ha sugerido que existe una relación entre el grado de diferenciación de las células y el incremento en la actividad de ciertas disacaridasas presentes en la membrana del borde en cepillo, que en el cáncer, debido al grado de indiferenciación de las células, es muy baja.¹⁵² Por este motivo conviene resaltar que en el presente trabajo hemos detectado que el tratamiento de cultivos de las líneas celulares de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2 con quercetina 100 μ M durante 24 horas incrementa la actividad sacarasa en los cultivos. Esto sugiere que el tratamiento afecta al grado de diferenciación de las células. En el mismo sentido, otros autores han encontrado que una dieta suplementada en un 5% con un galacto-oligosacárido incrementa la actividad sacarasa en cultivos de la línea celular Caco.2 de adenocarcinoma de colon¹³ y también se ha demostrado que esta misma dieta incrementa la actividad sacarasa en ratones BALB/c con respecto a ratones que no han sido alimentados con el galacto-oligosacárido.¹³

Por otro lado, otros trabajos también han descrito que dosis altas de inulina en combinación con varias cepas probióticas como *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. bifidum*, *B. longum* o *S. thermophilus* producen cambios en la microbiota intestinal de ratas, dando lugar a un aumento de la población de bacterias beneficiosas en el intestino que se correlaciona con un aumento en la actividad enzimática sacarasa, isomaltasa, lipasa y lactasa tras el tratamiento.⁹⁷ Sin embargo

los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el tratamiento de los cultivos de células HT-29 y Caco.2 con *B. bifidum* o *L. gasseri* no modifica la actividad sacarasa en los cultivos. Más aún, el tratamiento de los cultivos con la combinación de quercetina 100 μM y 10^7 ufc/mL de *B. bifidum* o *L. gasseri* tampoco afecta a la acción de la quercetina sobre esta actividad enzimática. Estos resultados indican por tanto que estas dos cepas probióticas ni tienen efecto sobre la actividad sacarasa en líneas celulares de adenocarcinoma de colon, ni afectan a la acción de la quercetina sobre esta actividad. En definitiva, nuestros resultados sugieren que el aumento en la actividad sacarasa y la disminución en la expresión de SGLT-1 inducidos por la quercetina en los cultivos de células HT-29 y Caco.2, y potenciados por los probióticos en el caso del transportador, podrían ser debidos a que tras el tratamiento las células presentan un mayor grado de diferenciación y una menor capacidad de proliferación.¹⁵²

Junto con el transporte de monosacáridos, otro factor importante en el desarrollo del cáncer colorrectal es el transporte de péptidos a través del epitelio intestinal. Aunque existen diferentes rutas a través de las cuales los péptidos pueden ser absorbidos, el tamaño de los péptidos y su hidrofobicidad son factores fundamentales que influyen en el tipo de transporte seleccionado: pasivo, a través de las uniones celulares o activo.¹⁷² Los oligopéptidos producidos por acción de las enzimas gástricas y pancreáticas durante el proceso de digestión de proteínas son hidrolizados adicionalmente por endopeptidasas de la membrana intestinal, lo que da lugar a dipéptidos y tripéptidos que pueden ser captados de forma activa mediante el transportador PEPT-1.¹⁷³ Este proceso de absorción activa mediado por PEPT-1 se produce con consumo de un gradiente electroquímico transmembrana y constituye la forma principal de captación de péptidos.^{174,7} Durante los últimos años se ha descrito que la expresión de PEPT-1, y por tanto el transporte de oligopéptidos a través del epitelio intestinal, está incrementada en patologías como el cáncer o las enfermedades inflamatorias intestinales. Se ha sugerido que este aumento podría ser debido bien a la inflamación del intestino provocada por la enfermedad, bien al incremento en la demanda de péptidos por parte de las células, derivado de su alta tasa de proliferación.¹⁰ Por eso resulta interesante que en este trabajo hayamos detectado que el tratamiento de cultivos de las líneas celulares de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2 con quercetina 100 μM durante 24 horas (Fig 22) disminuye la expresión de PEPT-1 en los cultivos, lo que nuevamente sugiere que la quercetina disminuye la capacidad proliferativa de las células.

Nuestros resultados también muestran que, a diferencia del tratamiento con quercetina, el tratamiento de las células HT-29 y Caco.2 con las cepas probióticas *B. bifidum* o *L. gasseri* no modifica los niveles de expresión de PEPT-1 en los cultivos. Sin embargo, el tratamiento con la combinación de quercetina 100 μM y 10^7 ufc/mL de *L. gasseri*, pero no con la combinación de

quercetina 100 μM y 10^7 ufc/mL de *B. bifidum*, los disminuye más que el tratamiento con la quercetina sola. Estos resultados indican que las cepas probióticas no afectan por si mismas a la expresión de PEPT-1, pero potencian el efecto de la quercetina sobre la misma. En cualquier caso hay que resaltar que este efecto es más acusado en los cultivos de células Caco.2 y con la combinación de quercetina y *L. gasseri*, lo que confirma que la sinergia entre el flavonoide y el probiótico depende de la línea celular y de la cepa probiótica empleadas. Tampoco podemos olvidar que las acciones de la quercetina y los probióticos en células de adenocarcinoma de colon podrían deberse a sus efectos sobre la AMPK α , cuya fosforilación y activación inducen (Fig 34), ya que la activación de la AMPK inhibe la síntesis de proteínas porque disminuye la actividad de mTOR.¹³¹ En el mismo sentido, diversos trabajos con teoflavinas han mostrado que la activación de la AMPK por fosforilación de su subunidad α inhibe la expresión de PEPT-1, y por tanto la captación de péptidos, en cultivos de células Caco.2.¹⁷⁵ Este mismo resultado también se ha observado tras el tratamiento de células Caco.2 con AICAR, un inductor de la activación de AMPK.¹⁷⁶

Los cambios en el transporte de péptidos podrían estar asociadas con modificaciones en la actividad de enzimas intestinales con actividad peptidasa, como la aminopeptidasa N y la dipeptidilpeptidasa IV.¹⁷⁷ Por eso resulta interesante que de modo reciente se haya observado que el tratamiento con un extracto de uva es capaz de disminuir la actividad de la dipeptidilpeptidasa IV en animales sanos, en animales alimentados con una dieta rica en grasas y en células Caco.2, y que diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* hayan puesto de manifiesto el efecto de la curcumina sobre la actividad de la aminopeptidasa N. A pesar de ello en la actualidad no existen evidencias claras de los mecanismos de acción de los flavonoides sobre la actividad enzimática de la aminopeptidasa N y dipeptidilpeptidasa IV.¹⁵³ Por eso resulta prometedor que en este trabajo hayamos observado que el tratamiento de cultivos de células HT-29 y Caco.2 durante 24 horas con quercetina 100 μM disminuye estas actividades en los cultivos ya que, como hemos comentado anteriormente con respecto a la actividad sacarasa, este resultado indica que tras el tratamiento las células presentan una menor capacidad de proliferación. Nuestros resultados también muestran que el tratamiento de los cultivos de células HT-29 y Caco.2 con *B. bifidum* o *L. gasseri* no modifica las actividades aminopeptidasa N y dipeptidilpeptidasa IV en los cultivos y que el tratamiento de los cultivos con la combinación de quercetina 100 μM y 10^7 ufc/mL de *B. bifidum* o *L. gasseri* tampoco afecta a la acción de la quercetina sobre estas actividades enzimáticas. Estos resultados indican por tanto que estas dos cepas probióticas ni tienen efecto sobre las actividades aminopeptidasa N y dipeptidilpeptidasa IV en líneas celulares de adenocarcinoma de colon, ni afectan a la acción de la quercetina sobre estas actividades.

2. MODULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación descontrolada de las células tumorales es uno de los aspectos a tener en cuenta en el cáncer de colon, ya que activa la síntesis de ácidos nucleicos y aumenta la demanda energética de las células. Debido a ello durante los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se ha analizado, y comprobado, la actividad antiproliferativa de la quercetina frente a líneas celulares tumorales, entre las que se incluyen diversas líneas de glioma,¹⁷⁸ de cáncer de pulmón,⁵⁵ de páncreas,⁵⁶ de melanoma,⁵⁴ de hematoma¹⁷⁹ y de colon.¹⁴⁰ Por eso no debe extrañar que en este trabajo hayamos observado que a concentraciones comprendidas entre 0,01 y 100 μM la quercetina se haya comportado como un agente citostático que, aunque no disminuye el número inicial de células, reduce la proliferación celular en cultivos de células de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2. La inducción de apoptosis (Fig. 26 y 27) y el bloqueo del ciclo celular (Fig. 30 y 31) que se producen como consecuencia de la activación de p53 mediada por la quercetina (Fig. 35) son una posible explicación para esta observación.

El papel de los probióticos en la proliferación celular, con resultados que varían en función de la cepa probiótica y el tipo celular, también ha comenzado a analizarse durante los últimos años.¹⁸⁰ En este trabajo mostramos que, como en el caso de la quercetina, el tratamiento de cultivos de células HT-29 o Caco.2 con 10^7 ufc/mL de *B. bifidum* o *L. gasseri* reduce ligeramente, aunque con pequeñas diferencias entre ambas líneas celulares y cepas probióticas, el crecimiento celular en los cultivos (Fig. 24). Más interesante que este dato, que indica que ambas cepas probióticas poseen una pequeña capacidad citostática, resulta el hecho de que la administración combinada de quercetina y probiótico llegue a suprimir por completo el crecimiento celular, e incluso a reducir el número inicial de células en los cultivos. Esta sinergia entre las actividades citostáticas de quercetina y probióticos, que es más acusada en los cultivos de células Caco.2 y en los tratamientos con *B. Bifidum*, se acompaña con un mayor aumento en los niveles de apoptosis (Fig. 27) y en los niveles de expresión de p53 en los cultivos (Fig. 35) que el observado en los tratamientos con el flavonoide solo. La actividad citotóxica de las combinaciones de quercetina y *B. Bifidum* o *L. gasseri*, y la inducción de muerte celular con activación de p53 que provocan estas combinaciones, sugiere que podrían utilizarse no sólo con fines preventivos, sino quizá también con fines terapéuticos, lo que obligará a hacer estudios adicionales sobre su efectividad y mecanismos de acción tanto *in vitro* como *in vivo*.

3. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS Y CICLO CELULAR

El efecto de la quercetina sobre los procesos de proliferación, supervivencia y muerte celular depende de la concentración utilizada: concentraciones elevadas de quercetina tienen un efecto proapoptótico,^{55,59} mientras que a concentraciones reducidas la quercetina activa mecanismos de supervivencia.^{57,58} Con frecuencia las modificaciones en la proliferación celular se producen con cambios en el ciclo celular, lo que en el caso de la quercetina está bien documentado. Así se ha descrito que la quercetina bloquea, en función del tipo celular, el ciclo en fase G₀/G₁, S o G₂/M.^{60, 61, 63} De acuerdo con resultados descritos previamente por otros autores¹⁴⁰ en este trabajo hemos observado que el tratamiento de células de adenocarcinoma de colon HT-29 con quercetina 100 µM durante 24 horas induce la expresión de los genes *TP53* y *CDKN1A* (Fig. 35 y 36). Cabe añadir que en este trabajo también hemos observado el mismo resultado en cultivos de células Caco.2 (Fig. 35 y 36), por lo que posiblemente éste sea un efecto generalizable a otras líneas celulares de adenocarcinoma de colon. El gen supresor de tumores *TP53* está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 y codifica una fosfoproteína nuclear de 53 Kd que le da su nombre. La proteína p53 es un factor clave en el balance entre la supervivencia y muerte de las células en respuesta al daño en el DNA,¹²⁴ ya que regula las transiciones G₀/S y G₂/M.¹⁸¹ El bloqueo del ciclo celular en estos puntos de control depende de la capacidad de p53 para inducir, entre otras, la expresión del gen *CDKN1A*,¹⁸² cuyo producto, la proteína p21^{CIP1}, reprime a su vez la transcripción de otras proteínas necesarias para la progresión del ciclo del ciclo celular, como CDK1 o la ciclina B1.¹⁸¹ Junto con estos datos, tampoco podemos olvidar que se ha descrito que la pérdida de la función de p53 se acompaña de la pérdida, al menos parcial, de la capacidad para bloquear la transición G₁/S, mientras que su capacidad para bloquear la transición G₂/M depende de su capacidad para inducir la transcripción de p21^{CIP1}.¹⁸³ Por eso no debe extrañar que, junto con los aumentos en la expresión de p53 y p21^{CIP1}, en este trabajo se haya observado que el tratamiento de cultivos de células HT-29 y Caco.2 con quercetina 100 µM bloquea el ciclo en fase G₂/M (Fig. 30 y 31), ya que estos dos tipos celulares expresan formas mutadas de p53 con capacidad funcional reducida.^{143,144} Este resultado difiere, al menos en parte, del descrito por Kim y colaboradores en células HT-29,¹⁴⁰ ya que tras 48 horas de tratamiento de las células con quercetina 100 µM estos autores observaron, junto con los aumentos en la expresión de p53 y p21^{CIP1}, un bloqueo del ciclo en fase G₁/S. El diferente tiempo de tratamiento y las distintas formas de analizar la viabilidad de las células y la distribución del ciclo celular en los cultivos, método TUNEL en nuestro caso y marcaje con Anexina V y yoduro de propidio en el suyo, son dos posibles explicaciones para esta diferencia.

De forma coherente con lo observado en el caso de la quercetina, nuestros resultados también muestran que el tratamiento de los cultivos de células HT-29 y Caco.2 con 10^7 ufc/mL de *B. bifidum* o *L. gasseri* induce la expresión de p21^{CIP1} (Fig. 36), bloquea el ciclo celular en fase G2/M (Fig. 30 y 31) y reduce la proliferación celular (Fig. 25). Además, puesto que en este trabajo no hemos detectado modificaciones en los niveles de expresión de p53 en los cultivos tras los tratamientos con *B. bifidum* o *L. gasseri* (Fig. 35), nuestros datos sugieren que la actividad citostática de los probióticos podría derivar de su capacidad para inducir la expresión de p21^{CIP1} de forma directa. Todavía más interesante que este dato resulta que el tratamiento de los cultivos con las combinaciones de quercetina y probióticos aumente la expresión de p53 y p21^{CIP1} más que el tratamiento con la quercetina sola (Fig. 35 y 36), ya que esta sinergia en la acción de quercetina y probióticos sobre la expresión de p53 y p21^{CIP1} conduce a un bloqueo del ciclo celular en fase G2/M aún más manifiesto (Fig. 30 y 31). Este bloqueo en fase G2/M se acompaña, especialmente en células Caco.2 y en el tratamiento con la combinación de quercetina y *B. Bifidum*, con una elevación en el porcentaje de células subdiploides, que se correlaciona con su actividad citotóxica y confirma la capacidad de esta combinación para inducir la muerte de las células.

Debido a su importancia, la apoptosis es uno de los procesos celulares más estudiados.¹⁵⁵ El programa apoptótico puede iniciarse bien por la vía extrínseca, o de receptores de muerte,¹⁵⁶ bien por la vía intrínseca.¹⁸⁴ La vía extrínseca activa directamente a la caspasa 8.¹¹¹ La pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial y la subsiguiente liberación del citocromo c y formación del apoptosoma con activación de la caspasa 9 son eventos clave en el inicio de la vía intrínseca.¹¹⁰ La caspasas iniciadoras 8 y 9 activan a su vez a caspasas efectoras, como las caspasas 3, 6 y 7, dando lugar a la apoptosis.¹¹⁰ La familia de proteínas Bcl-2 regula la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Esta familia está formada por proteínas proapoptóticas, como Bax, Bak, Bad y Bid, y antiapoptóticas, como Bcl-XL, Mcl-1 o el propio Bcl-2.¹⁵⁸ Por eso resulta interesante que en este trabajo hayamos observado que el tratamiento de cultivos de células de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2 con quercetina 100 μ M durante 24 horas aumenta la expresión de Bax (Fig. 33), reduce la de Bcl-2 (Fig. 32) e induce apoptosis en los cultivos (Fig. 26 y 27). Ya que en la relación Bax/Bcl-2 facilita la apertura del poro mitocondrial, y por tanto la liberación de proteínas mitocondriales con activación de la caspasa 9 y muerte celular, este resultado sugiere que la inducción de apoptosis mediada por la quercetina en los cultivos se produce por la vía mitocondrial. Que se haya descrito que la quercetina induce apoptosis con activación de la vía mitocondrial en células BGC-823 de cáncer gástrico¹⁶³ y en células HeLa de cáncer cervical,⁵³ que otros flavonoides, como la curcumina, induzcan apoptosis

con activación de proteínas apoptóticas como Bax e inhibición de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-XL,¹⁸⁵ o que la administración combinada de varios polifenoles como la quercetina y el ácido elálgico induzca apoptosis y modifique la distribución del ciclo celular en células sanguíneas de pacientes con leucemia⁶¹ apoya esta idea. La inducción por quercetina de la expresión de p53 (Fig. 35) es otro dato adicional que corrobora esta idea, ya que p53 contribuye a la permeabilización de la de la membrana externa de la mitocondria tanto de modo directo, al formar complejos con Bcl-2 y Bcl-XL que inhiben su actividad protectora,¹⁸⁶ como indirecto, al inducir la transcripción de Bax.¹⁸⁷ Por último, a pesar de que en las condiciones de este trabajo no hayamos podido detectar un incremento estadísticamente significativo en la actividad de la caspasa 3, el hecho de que el pretratamiento de los cultivos con z-VAD-fmk, un inhibidor universal de caspasas, suprima el proceso de muerte celular inducido por la quercetina en los cultivos (Fig. 28) también corrobora esta hipótesis, ya que las caspasas juegan un papel crucial en la ejecución del programa de muerte celular iniciado con la pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial.

Los resultados obtenidos en este trabajo también muestran que el tratamiento de cultivos de células HT-29 o Caco.2 con las combinaciones de quercetina 100 μ M y 10^7 ufc/mL de *B. bifidum* o *L. gasseri* durante 24 horas disminuye la expresión de Bcl-2 (Fig. 32), aumenta la de Bax (Fig. 33) y p53 (Fig. 35) e incrementa la proporción de células apoptóticas en los cultivos más que el tratamiento con la quercetina sola (Fig. 26 y 27). Además este resultado se produce sin que los probióticos afecten por si mismos a la expresión de p53 (Fig. 35) o Bcl-2 (Fig. 32), ni modifiquen la proporción de células apoptóticas en los cultivos (Fig. 26 y 27) a pesar de que incrementan la expresión de Bax (Fig. 33). En resumen, podemos decir que la quercetina en combinación con *B. bifidum* o *L. gasseri* induce apoptosis en las líneas celulares de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2 y que este efecto implica la activación de moléculas clave de la ruta apoptótica mitocondrial, así como la modulación a lo largo del tiempo de diferentes señales relacionadas con las vías de proliferación y viabilidad celular.

4. ACTIVACIÓN DE AMPK

El crecimiento y el ciclo celular, están estrechamente relacionados con el metabolismo de proteínas. La función de la AMPK en el control del metabolismo de proteínas y ciclo celular está relacionada, por un lado con la regulación de la síntesis y degradación de proteínas mediante regulación de la vía TSC2/TOR y por otro, con la regulación del supresor tumoral p53 y los inhibidores de ciclinas dependientes de quinasas p21 y p27.^{159,134} Cuando la AMPK se activa, actúa sobre p53 y la fosforila en la Ser15 incrementando su estabilidad. Ello conlleva un aumento de los niveles celulares de p21^{CIP1} e induce una parada en el ciclo y/o la muerte celular.^{188,189} La proteína p53 juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad del genoma debido a que la pérdida por mutación de la función de p53 permite la supervivencia de elementos celulares genéticamente dañados que conducen a una transformación celular tumoral. Asimismo la inhibición del ciclo celular también se ha relacionado con la inhibición de mTOR mediada por AMPK.¹⁹⁰ Por eso es interesante que en este trabajo hayamos detectado que el tratamiento de cultivos de células HT-29 o Caco.2 con quercetina 100 μ M induce la activación de la AMPK por fosforilación de su subunidad α (Fig. 34), y también que esta activación se acompañe con una disminución en el grado de proliferación de los cultivos, una disminución en la expresión de los transportadores de azúcares SGLT-1 y péptidos PEPT-1 y un aumento en la expresión de p53 (Fig. 35) y de sus genes diana p21^{CIP1} (Fig 36) y Bax (Fig. 33), ya que este resultado sugiere que todas las acciones de la quercetina sobre la proliferación, el ciclo celular y la apoptosis se producen como consecuencia de su efecto sobre la AMPK y apunta, por tanto, la posibilidad de que la AMPK sea una nueva diana terapéutica en el tratamiento del cáncer de colon. Este resultado es todavía más interesante si consideramos que *B. bifidum* y *L. gasseri* inducen también la fosforilación de la AMPK α , al menos en la línea celular HT-29, y que esta fosforilación se produce de forma mucho más acentuada cuando se tratan los cultivos con las combinaciones de quercetina y probiótico, ya que este resultado sugiere que las combinaciones de quercetina y probióticos podrían utilizarse con fines preventivos y/o terapéuticos frente al desarrollo de cáncer colorrectal.

En definitiva, nuestros resultados muestran que los probióticos *B. bifidum* y *L. gasseri* potencian las acciones de la quercetina mediante la activación de la vía de señalización de la AMPK por fosforilación de su subunidad α . Esta activación provoca cambios tanto metabólicos como celulares que se resumen gráficamente en la figura 37. Los cambios metabólicos relacionados con la disminución de la proliferación celular, y por tanto de las necesidades energéticas y de aminoácidos, se manifiestan con un descenso en la expresión de los transportadores de azúcares SGLT-1 y péptidos PEPT-1. Los cambios celulares incluyen el

bloqueo en el ciclo celular y la inducción de apoptosis y se manifiestan con aumentos en la expresión de p53, p21^{CIP1} y cambios en la relación Bax /Bcl-2. Por todo ello, y aunque hay que prestar especial atención a la concentración de quercetina y al tipo de cepa probiótica empleada, y a pesar de que se requieren numerosas investigaciones que contribuyan a aclarar el mecanismo de acción de los probióticos, podemos afirmar que la quercetina en sinergia con una cepa prebiótica como *B. bifidum* o *L. gasseri* podría considerarse un potencial agente preventivo y terapéutico en el desarrollo del cáncer colorrectal.

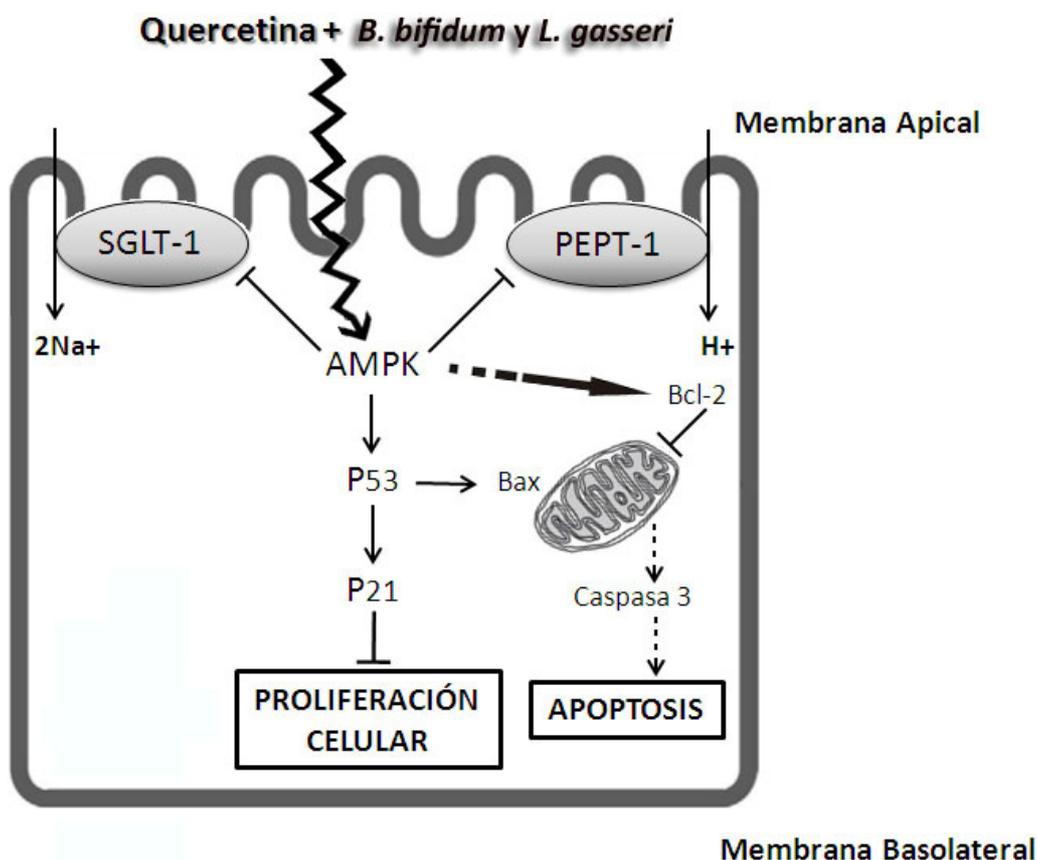


Figura 37. Efecto de los probióticos *B.bifidum* y *L.gasseri* sobre las acciones de la quercetina en cultivos de líneas celulares HT-29 y Caco. 2 de adenocarcinoma de colon.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo “Efecto de los probióticos *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus gasseri* sobre las acciones de la quercetina en cultivos de líneas celulares HT-29 y Caco.2 de cáncer de colon” se obtienen las siguientes conclusiones:

Actividad enzimática y transporte a través de la membrana intestinal

1. La quercetina aumenta la actividad sacarasa y disminuye la actividad aminopeptidasa N y dipeptidilpeptidasa IV en cultivos de células humanas de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2. *B. bifidum* y *L. gasseri* no modifican dichas actividades y tampoco afectan a la acción de la quercetina sobre las mismas.
2. La quercetina disminuye la expresión del transportador de azúcares SGLT-1 y del transportador de péptidos PEPT-1 en cultivos de células humanas de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2. *B. bifidum* y *L. gasseri*, aunque no modifican por si mismos dichas expresiones, potencian el efecto represor de la quercetina sobre las mismas.

Proliferación celular

3. La quercetina, *B. bifidum* o *L. gasseri* disminuyen la proliferación en cultivos de células humanas de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2. Esta disminución es mayor cuando la quercetina y las cepas probióticas se administran de forma conjunta, aunque la sensibilidad de los cultivos al tratamiento varía con el tipo celular y la cepa probiótica empleada.

Apoptosis

4. *B. bifidum* y *L. gasseri* potencian la capacidad de la quercetina para inducir apoptosis de modo dependiente de la activación de caspasas en cultivos de células humanas de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2. La inducción de apoptosis mediada por la quercetina se produce por la vía mitocondrial ya que el tratamiento de los cultivos con este compuesto disminuye la expresión de Bcl-2 y aumenta la de Bax. Además, *B. bifidum* y *L. gasseri* potencian el efecto de la quercetina sobre la expresión de Bcl-2 y Bax.

Ciclo celular

5. El tratamiento de cultivos de células humanas de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2 con quercetina, *B. bifidum* o *L. gasseri* bloquea el ciclo celular en fase G2/M. El tratamiento de los cultivos con la combinación de quercetina y probiótico provoca el mismo efecto, aunque de forma más manifiesta que los tratamientos por separado.

6. El bloqueo del ciclo celular inducido por la quercetina en cultivos de células humanas de adenocarcinoma de colon se produce con aumentos en la expresión de p53 y p21. *B. bifidum* y *L. gasseri* no afectan a la expresión de p53 en estos cultivos, aunque inducen la expresión de p21 y potencian el efecto de la quercetina sobre la expresión de p53 y p21.

AMPK α

7. La quercetina, *B. bifidum* o *L. gasseri* inducen la fosforilación de la AMPK α en cultivos de células humanas de adenocarcinoma de colon HT-29 y Caco.2, aunque en el caso de los probióticos este efecto depende del tipo celular. A pesar de ello, *B. bifidum* y *L. gasseri* incrementan el efecto de la quercetina sobre la fosforilación de la AMPK α en ambos tipos celulares.

CONCLUSIÓN FINAL

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las cepas probióticas *B. bifidum* y *L. gasseri* aumentan la capacidad de la quercetina para inducir la fosforilación de la subunidad α de la AMPK en células de adenocarcinoma de colon. Puesto que la AMPK es un sensor metabólico cuya activación por fosforilación reduce la capacidad proliferativa de las células ya que bloquea el ciclo celular, induce apoptosis e inhibe la síntesis de proteínas y la glucólisis aeróbica, estos resultados sugieren que las combinaciones de quercetina y *B. bifidum* o *L. gasseri* podrían utilizarse con fines preventivos y/o terapéuticos frente al desarrollo de cáncer colorrectal. A pesar de ello es preciso recalcar que nuestros resultados también indican que los efectos observados son más o menos acusados en función del tipo celular y de la cepa probiótica empleados, lo que pone de manifiesto la necesidad de seguir analizando las acciones de la quercetina en combinación con éstas u otras cepas probióticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Carballido FC, Coruña U da. Fisiología y fisiopatología de la nutrición: I Curso de Especialización en Nutrición. Universidad de Coruña; 2005.
2. Wright NA. Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *Int J Exp Pathol.* 2000;81(2):117-43.
3. Fox SI. Fisiología humana. 12ª ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España,S.A.U.; 2011.
4. Silverthorn DU, Silverthorn AC. Fisiología humana. Ed. Médica Panamericana; 2008.
5. Castrejón V, Carbó R, Martínez M. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *Rev Educ Bioquímica.* 2007;26(2):49-57.
6. Bröer S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev.* 2008;88(1):249-86.
7. Brodin B, Nielsen CU, Steffansen B, Frøkjær S. Transport of peptidomimetic drugs by the intestinal Di/tri-peptide transporter, PepT1. *Pharmacol Toxicol.* 2002;90(6):285-96.
8. Segura-Campos M, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. *Rev Chil Nutr.* 2010;37(3).
9. Thwaites DT, Anderson CMH. H⁺-coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine. *Exp Physiol.* 2007;92(4):603-19.
10. Adibi SA. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;285(5):G779-788.
11. Wuensch T, Schulz S, Ullrich S, Lill N, Stelzl T, Rubio-Aliaga I, et al. The peptide transporter PEPT1 is expressed in distal colon in rodents and humans and contributes to water absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013;305(1):G66-73.
12. Gilbert ER, Wong EA, Webb KE Jr. Board-invited review: Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. *J Anim Sci.* 2008;86(9):2135-55.
13. Leforestier G, Blais A, Blachier F, Marsset-Baglieri A, Davila-Gay A-M, Perrin E, et al. Effects of galacto-oligosaccharide ingestion on the mucosa-associated mucins and sucrase activity in the small intestine of mice. *Eur J Nutr.* 2009;48(8):457-64.
14. Lea MA, Ibeh C, Han L, Desbordes C. Inhibition of growth and induction of differentiation markers by polyphenolic molecules and histone deacetylase inhibitors in colon cancer cells. *Anticancer Res.* 2010;30(2):311-8.
15. Fundación Española del Aparato Digestivo. saludigestivo.es.

16. Sociedad Española de Patología Digestiva. www.sepd.es.
17. Asociación española contra el cáncer. www.aecc.es.
18. World Health Organization: Who. www.who.int.
19. Ruddon RW. Cancer Biology. Oxford University Press; 2007.
20. Who: Global Database on Body Mass Index. www.who.int/bmi. 2005.
21. Sociedad Española de Oncología Médica. www.seom.org.
22. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996;87(2):159-70.
23. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525-32.
24. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
25. Holcombe RF, Marsh JL, Waterman ML, Lin F, Milovanovic T, Truong T. Expression of Wnt ligands and Frizzled receptors in colonic mucosa and in colon carcinoma. *Mol Pathol*. 2002;55(4):220-6.
26. Liu W, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, et al. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet*. 2000;26(2):146-7.
27. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1653(1):1-24.
28. Stamos JL, Weis WI. The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(1):a007898.
29. Fodde R, Smits R, Hofland N, Kielman M, Meera Khan P. Mechanisms of APC-driven tumorigenesis: lessons from mouse models. *Cytogenet Cell Genet*. 1999;86(2):105-11.
30. Laurent-Puig P, Agostini J, Maley K. Colorectal oncogenesis. *Bull Cancer (Paris)*. 2010;97(11):1311-21.
31. Ayuso Colella JR, Pagés Llinás M, Ayuso Colella C. Staging rectal cancer. *Radiologia*. 2010;52(1):18-29.
32. Alianza Prevención Cáncer de Colon. www.alianzaprevencioncolon.es.
33. Büchner FL, Bueno-de-Mesquita HB, Ros MM, Kampman E, Egevad L, Overvad K, et al. Consumption of vegetables and fruit and the risk of bladder cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer*. 2009;125(11):2643-51.

34. Ross SA. Evidence for the relationship between diet and cancer. *Exp Oncol.* 2010;32(3):137-42.
35. Tan AC, Konczak I, Sze DM-Y, Ramzan I. Molecular pathways for cancer chemoprevention by dietary phytochemicals. *Nutr Cancer.* 2011;63(4):495-505.
36. Ververidis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretzschmar G, Panopoulos N. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnol J.* 2007;2(10):1214-34.
37. Kühnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet.* 1976;24:117-91.
38. Letan A. The Relation of Structure to Antioxidant Activity of Quercetin and Some of Its Derivatives I. Primary Activity. *J Food Sci.* 1966;31(4):518-23.
39. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 1995;33(12):1061-80.
40. Hertog MGL, Hollman PCH, van de Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J Agric Food Chem.* 1993;41(8):1242-6.
41. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:19-34.
42. Manach C, Texier O, Morand C, Crespy V, Régéat F, Demigné C, et al. Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(11-12):1259-66.
43. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002;96(2-3):67-202.
44. Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52(5):507-26.
45. Weng C-J, Yen G-C. Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities. *Cancer Metastasis Rev.* 2012;31(1-2):323-51.
46. Tanaka T, Nishikawa A, Shima H, Sugie S, Shinoda T, Yoshimi N, et al. Inhibitory effects of chlorogenic acid, reserpine, polyphenolic acid (E-5166), or coffee on hepatocarcinogenesis in rats and hamsters. *Basic Life Sci.* 1990;52:429-40.
47. Alía M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur J Nutr.* 2006;45(1):19-28.

48. Alía M, Ramos S, Mateos R, Granado-Serrano AB, Bravo L, Goya L. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;212(2):110-8.
49. Vázquez-Garzón VR, Arellanes-Robledo J, García-Román R, Aparicio-Rautista DI, Villa-Treviño S. Inhibition of reactive oxygen species and pre-neoplastic lesions by quercetin through an antioxidant defense mechanism. *Free Radic Res.* 2009;43(2):128-37.
50. Koshy L, Dwarakanath BS, Raj HG, Chandra R, Mathew TL. Suicidal oxidative stress induced by certain antioxidants. *Indian J Exp Biol.* 2003;41(11):1273-8.
51. Yang GY, Liao J, Li C, Chung J, Yurkow EJ, Ho CT, et al. Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis.* 2000;21(11):2035-9.
52. Sasaki M, Nakamura H, Tsuchiya S, Horie S, Kashiwayanagi M, Saito T, et al. Quercetin-induced PC12 cell death accompanied by caspase-mediated DNA fragmentation. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(4):682-6.
53. Vidya Priyadarsini R, Senthil Murugan R, Maitreyi S, Ramalingam K, Karunagaran D, Nagini S. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- κ B inhibition. *Eur J Pharmacol.* 2010;649(1-3):84-91.
54. Zhang X-M, Chen J, Xia Y-G, Xu Q. Apoptosis of murine melanoma B16-BL6 cells induced by quercetin targeting mitochondria, inhibiting expression of PKC-alpha and translocating PKC-delta. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;55(3):251-62.
55. Nguyen TTT, Tran E, Nguyen TH, Do PT, Huynh TH, Huynh H. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis.* 2004;25(5):647-59.
56. Mouria M, Gukovskaya AS, Jung Y, Buechler P, Hines OJ, Reber HA, et al. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2002;98(5):761-9.
57. Yu R, Jiao JJ, Duh JL, Gudehithlu K, Tan TH, Kong AN. Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant-responsive element-mediated phase II enzyme gene expression. *Carcinogenesis.* 1997;18(2):451-6.
58. Lee YK, Park SY, Kim YM, Lee WS, Park OJ. AMP kinase/cyclooxygenase-2 pathway regulates proliferation and apoptosis of cancer cells treated with quercetin. *Exp Mol Med.* 2009;41(3):201-7.
59. Spencer JPE, Rice-Evans C, Williams RJ. Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. *J Biol Chem.* 2003;278(37):34783-93.

60. Kim WK, Bang MH, Kim ES, Kang NE, Jung KC, Cho HJ, et al. Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr Biochem*. 2005;16(3):155-62.
61. Mertens-Talcott SU, Percival SS. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Lett*. 2005;218(2):141-51.
62. Yang K, Lamprecht SA, Liu Y, Shinozaki H, Fan K, Leung D, et al. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis*. 2000;21(9):1655-60.
63. Zhang H, Zhang M, Yu L, Zhao Y, He N, Yang X. Antitumor activities of quercetin and quercetin-5',8-disulfonate in human colon and breast cancer cell lines. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. 2012;50(5):1589-99.
64. Del Follo-Martinez A, Banerjee N, Li X, Safe S, Mertens-Talcott S. Resveratrol and quercetin in combination have anticancer activity in colon cancer cells and repress oncogenic microRNA-27a. *Nutr Cancer*. 2013;65(3):494-504.
65. Wilson RT, Wang J, Chinchilli V, Richie JP, Virtamo J, Moore LE, et al. Fish, vitamin D, and flavonoids in relation to renal cell cancer among smokers. *Am J Epidemiol*. 2009;170(6):717-29.
66. Kyle JAM, Sharp L, Little J, Duthie GG, McNeill G. Dietary flavonoid intake and colorectal cancer: a case-control study. *Br J Nutr*. 2010;103(3):429-36.
67. Hwang IK, Lee CH, Yoo K-Y, Choi JH, Park OK, Lim SS, et al. Neuroprotective effects of onion extract and quercetin against ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus. *J Med Food*. 2009;12(5):990-5.
68. Han J-J, Hao J, Kim C-H, Hong J-S, Ahn H-Y, Lee Y-S. Quercetin prevents cardiac hypertrophy induced by pressure overload in rats. *J Vet Med Sci Jpn Soc Vet Sci*. 2009;71(6):737-43.
69. Tannock GW. Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1999;76(1-4):265-78.
70. Mitsuoka T. Intestinal flora and aging. *Nutr Rev*. 1992;50(12):438-46.
71. Guarner F, Requena T, Marcos A. Consensus statements from the Workshop «Probiotics and Health: Scientific evidence». *Nutr Hosp*. 2010;25(5):700-4.
72. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(2 Suppl):361S-364S.
73. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(2 Suppl):365S-373S.

74. Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 1998;41(2):103-25.
75. Ohland CL, Macnaughton WK. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298(6):G807-819.
76. Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(2):300-10.
77. Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(1):1-6.
78. Werner T, Haller D. Intestinal epithelial cell signalling and chronic inflammation: From the proteome to specific molecular mechanisms. *Mutat Res.* 2007;622(1-2):42-57.
79. Dinleyici EC, Eren M, Ozen M, Yargic ZA, Vandenplas Y. Effectiveness and safety of *Saccharomyces boulardii* for acute infectious diarrhea. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12(4):395-410.
80. Szajewska H, Wanke M, Patro B. Meta-analysis: the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for the prevention of healthcare-associated diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34(9):1079-87.
81. Deshpande GC, Rao SC, Keil AD, Patole SK. Evidence-based guidelines for use of probiotics in preterm neonates. *BMC Med.* 2011;9:92.
82. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer R-J. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;27(2):104-19.
83. De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. Probiotics--compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(2 Suppl):421S-429S.
84. De Preter V, Vanhoutte T, Huys G, Swings J, De Vuyst L, Rutgeerts P, et al. Effects of *Lactobacillus casei* Shirota, *Bifidobacterium breve*, and oligofructose-enriched inulin on colonic nitrogen-protein metabolism in healthy humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292(1):G358-368.
85. Guo Z, Liu XM, Zhang QX, Shen Z, Tian FW, Zhang H, et al. Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD.* 2011;21(11):844-50.
86. Seksik P, Dray X, Sokol H, Marteau P. Is there any place for alimentary probiotics, prebiotics or synbiotics, for patients with inflammatory bowel disease? *Mol Nutr Food Res.* 2008;52(8):906-12.
87. Mack DR. Probiotics in inflammatory bowel diseases and associated conditions. *Nutrients.* 2011;3(2):245-64.

88. Haller D, Antoine J-M, Bengmark S, Enck P, Rijkers GT, Lenoir-Wijnkoop I. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: probiotics in chronic inflammatory bowel disease and the functional disorder irritable bowel syndrome. *J Nutr.* 2010;140(3):690S-7S.
89. Kumar M, Nagpal R, Verma V, Kumar A, Kaur N, Hemalatha R, et al. Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. *Nutr Rev.* 2013;71(1):23-34.
90. Preising J, Philippe D, Gleinser M, Wei H, Blum S, Eikmanns BJ, et al. Selection of bifidobacteria based on adhesion and anti-inflammatory capacity in vitro for amelioration of murine colitis. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(9):3048-51.
91. Iyer C, Kusters A, Sethi G, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB, Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF-kappaB and MAPK signalling. *Cell Microbiol.* 2008;10(7):1442-52.
92. Foo N-P, Ou Yang H, Chiu H-H, Chan H-Y, Liao C-C, Yu C-K, et al. Probiotics prevent the development of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colonic tumorigenesis through suppressed colonic mucosa cellular proliferation and increased stimulation of macrophages. *J Agric Food Chem.* 2011;59(24):13337-45.
93. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464(7285):59-65.
94. Davis CD, Milner JA. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *J Nutr Biochem.* 2009;20(10):743-52.
95. Bränning C, Håkansson A, Ahrné S, Jeppsson B, Molin G, Nyman M. Blueberry husks and multi-strain probiotics affect colonic fermentation in rats. *Br J Nutr.* 2009;101(6):859-70.
96. De Preter V, Hamer HM, Windey K, Verbeke K. The impact of pre- and/or probiotics on human colonic metabolism: does it affect human health? *Mol Nutr Food Res.* 2011;55(1):46-57.
97. Yang S-C, Chen J-Y, Shang H-F, Cheng T-Y, Tsou SC, Chen J-R. Effect of synbiotics on intestinal microflora and digestive enzyme activities in rats. *World J Gastroenterol WJG.* 2005;11(47):7413-7.
98. Le Leu RK, Hu Y, Brown IL, Woodman RJ, Young GP. Synbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. *Carcinogenesis.* 2010;31(2):246-51.
99. Reed JC. Apoptosis-Based Therapies. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(2):111-21.
100. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3-11.

101. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.
102. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980;68:251-306.
103. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*. 1999;96(2):245-54.
104. Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. *Exp Oncol*. 2012;34(3):255-62.
105. Kidd VJ. Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:533-73.
106. Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev*. 1998;12(11):1551-70.
107. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 28 de agosto de 1998;281(5381):1312-6.
108. Tsao DH, McDonagh T, Telliez JB, Hsu S, Malakian K, Xu GY, et al. Solution structure of N-TRADD and characterization of the interaction of N-TRADD and C-TRAF2, a key step in the TNFR1 signaling pathway. *Mol Cell*. junio de 2000;5(6):1051-7.
109. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*. 1997;278(5336):294-8.
110. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74(4):609-19.
111. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol Quant Biosci Nano Macro*. 2011;3(4):279-96.
112. Duiker EW, Mom CH, de Jong S, Willemse PHB, Gietema JA, van der Zee AGJ, et al. The clinical trial of TRAIL. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. 2006;42(14):2233-40.
113. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. *Conceptos de genética*. 8º ed. Pearson Educación; 2006.
114. Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*. 2000;100(1):71-8.
115. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(3):153-66.
116. Malumbres M. Revisiting the «Cdk-centric» view of the mammalian cell cycle. *Cell Cycle Georget Tex*. 2005;4(2):206-10.
117. Sánchez I, Dynlacht BD. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16(3):311-21.

118. Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(1):21-32.
119. Haesslein J-L, Jullian N. Recent advances in cyclin-dependent kinase inhibition. Purine-based derivatives as anti-cancer agents. Roles and perspectives for the future. *Curr Top Med Chem.* 2002;2(9):1037-50.
120. Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(11):630-41.
121. Sharma PS, Sharma R, Tyagi R. Inhibitors of cyclin dependent kinases: useful targets for cancer treatment. *Curr Cancer Drug Targets.* 2008;8(1):53-75.
122. Nixon C, Chambers G, Ellsmore V, Campo MS, Burr P, Argyle DJ, et al. Expression of cell cycle associated proteins cyclin A, CDK-2, p27kip1 and p53 in equine sarcoids. *Cancer Lett.* 2005;221(2):237-45.
123. Martín A, Odajima J, Hunt SL, Dubus P, Ortega S, Malumbres M, et al. Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27(Kip1) and p21(Cip1). *Cancer Cell.* 2005;7(6):591-8.
124. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001;1(3):222-31.
125. Lutful Kabir FM, Agarwal P, Deinnocentes P, Zaman J, Bird AC, Bird RC. Novel frameshift mutation in the p16/INK4A tumor suppressor gene in canine breast cancer alters expression from the p16/INK4A/p14ARF locus. *J Cell Biochem.* 2013;114(1):56-66.
126. Salt I, Celler JW, Hawley SA, Prescott A, Woods A, Carling D, et al. AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *Biochem J.* 1998;334 (Pt 1):177-87.
127. Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J.* 2000;346 Pt 3:659-69.
128. Hardie DG. Roles of the AMP-activated/SNF1 protein kinase family in the response to cellular stress. *Biochem Soc Symp.* 1999;64:13-27.
129. Faubert B, Boily G, Izreig S, Griss T, Samborska B, Dong Z, et al. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metab.* 2013;17(1):113-24.
130. Walker J, Jijon HB, Diaz H, Salehi P, Churchill T, Madsen KL. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) enhances GLUT2-dependent jejunal glucose transport: a possible role for AMPK. *Biochem J.* 2005;385(Pt 2):485-91.
131. Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, et al. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell.* 2004;6(1):91-9.

132. Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res*. 2007;100(3):328-41.
133. Witczak CA, Sharoff CG, Goodyear LJ. AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: from structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2008;65(23):3737-55.
134. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2005;18(3):283-93.
135. Imamura K, Ogura T, Kishimoto A, Kaminishi M, Esumi H. Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;287(2):562-7.
136. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408(6810):307-10.
137. Araújo JR, Gonçalves P, Martel F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr Res New York N*. 2011;31(2):77-87.
138. Lamson DW, Brignall MS. Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Altern Med Rev J Clin Ther*. 2000;5(3):196-208.
139. Ranelletti FO, Maggiano N, Serra FG, Ricci R, Larocca LM, Lanza P, et al. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2000;85(3):438-45.
140. Kim H-J, Kim S-K, Kim B-S, Lee S-H, Park Y-S, Park B-K, et al. Apoptotic effect of quercetin on HT-29 colon cancer cells via the AMPK signaling pathway. *J Agric Food Chem*. 2010;58(15):8643-50.
141. Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem Pharmacol*. 2012;83(1):6-15.
142. Verma A, Shukla G. Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* suppresses DMH-induced procarcinogenic fecal enzymes and preneoplastic aberrant crypt foci in early colon carcinogenesis in Sprague Dawley rats. *Nutr Cancer*. 2013;65(1):84-91.
143. Von Kleist S, Chany E, Burtin P, King M, Fogh J. Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *J Natl Cancer Inst*. 1975;55(3):555-60.
144. Corzo C, Petzold M, Mayol X, Espinet B, Salido M, Serrano S, et al. RxFISH karyotype and MYC amplification in the HT-29 colon adenocarcinoma cell line. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;36(4):425-6.

145. Zweibaum A, Triadou N, Kedinger M, Augeron C, Robine-Léon S, Pinto M, et al. Sucrase-isomaltase: a marker of foetal and malignant epithelial cells of the human colon. *Int J Cancer J Int Cancer*. 1983;32(4):407-12.
146. Kim EJ, Kang I-J, Cho HJ, Kim WK, Ha Y-L, Park JHY. Conjugated linoleic acid downregulates insulin-like growth factor-I receptor levels in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr*. 2003;133(8):2675-81.
147. McFarland. *J Amer Med Assoc*. 1907;14:1176.
148. DAHLQVIST A. METHOD FOR ASSAY OF INTESTINAL DISACCHARIDASES. *Anal Biochem*. 1964;7:18-25.
149. Andria G, Cucchiara S, De Vizia B, De Ritis G, Mazzacca G, Auricchio S. Brush border and cytosol peptidase activities of human small intestine in normal subjects and celiac patients. *Pediatr Res*. 1980;14(6):812-8.
150. Guo GF, Cai YC, Zhang B, Xu RH, Qiu HJ, Xia LP, et al. Overexpression of SGLT1 and EGFR in colorectal cancer showing a correlation with the prognosis. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. 2011;28 Suppl 1:S197-203.
151. Satake M, Enjoh M, Nakamura Y, Takano T, Kawamura Y, Arai S, et al. Transepithelial transport of the bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002;66(2):378-84.
152. Pandrea IV, Carrière V, Barbat A, Cambier D, Dussaulx E, Lesuffleur T, et al. Postmitotic differentiation of colon carcinoma caco-2 cells does not prevent reentry in the cell cycle and tumorigenicity. *Exp Mol Pathol*. 2000;69(1):37-45.
153. González-Abuín N, Martínez-Micaelo N, Blay M, Pujadas G, Garcia-Vallvé S, Pinent M, et al. Grape seed-derived procyanidins decrease dipeptidyl-peptidase 4 activity and expression. *J Agric Food Chem*. 2012;60(36):9055-61.
154. Ferguson LR, Schlothauer RC. The potential role of nutritional genomics tools in validating high health foods for cancer control: broccoli as example. *Mol Nutr Food Res*. 2012;56(1):126-46.
155. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6.
156. Russo M, Mupo A, Spagnuolo C, Russo GL. Exploring death receptor pathways as selective targets in cancer therapy. *Biochem Pharmacol*. 2010;80(5):674-82.
157. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*. 2003;22(53):8543-67.
158. Van Gorp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304(3):487-97.
159. Wang W, Guan K-L. AMP-activated protein kinase and cancer. *Acta Physiol Oxf Engl*. 2009;196(1):55-63.

160. Rodriguez R, Meuth M. Chk1 and p21 cooperate to prevent apoptosis during DNA replication fork stress. *Mol Biol Cell*. 2006;17(1):402-12.
161. Russo GL. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Biochem Pharmacol*. 2007;74(4):533-44.
162. Surh Y-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):768-80.
163. Wang P, Zhang K, Zhang Q, Mei J, Chen C, Feng Z, et al. Effects of quercetin on the apoptosis of the human gastric carcinoma cells. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 2012;26(2):221-8.
164. Veiga P, Gallini CA, Beal C, Michaud M, Delaney ML, DuBois A, et al. Bifidobacterium animalis subsp. lactis fermented milk product reduces inflammation by altering a niche for colitogenic microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(42):18132-7.
165. Hatakka K, Holma R, El-Nezami H, Suomalainen T, Kuisma M, Saxelin M, et al. The influence of Lactobacillus rhamnosus LC705 together with Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii JS on potentially carcinogenic bacterial activity in human colon. *Int J Food Microbiol*. 2008;128(2):406-10.
166. Mai V, Colbert LH, Perkins SN, Schatzkin A, Hursting SD. Intestinal microbiota: a potential diet-responsive prevention target in ApcMin mice. *Mol Carcinog*. 2007;46(1):42-8.
167. Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol Ther*. 2009;121(1):29-40.
168. Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE, Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008;26(6):983-94.
169. Fridrich D, Teller N, Esselen M, Pahlke G, Marko D. Comparison of delphinidin, quercetin and (-)-epigallocatechin-3-gallate as inhibitors of the EGFR and the ErbB2 receptor phosphorylation. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52(7):815-22.
170. Peng L, Li Z-R, Green RS, Holzman IR, Lin J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr*. 2009;139(9):1619-25.
171. Sopjani M, Bhavsar SK, Fraser S, Kemp BE, Föller M, Lang F. Regulation of Na⁺-coupled glucose carrier SGLT1 by AMP-activated protein kinase. *Mol Membr Biol*. 2010;27(2-3):137-44.
172. Shimakura J, Terada T, Katsura T, Inui K-I. Characterization of the human peptide transporter PEPT1 promoter: Sp1 functions as a basal transcriptional regulator of human PEPT1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;289(3):G471-477.

173. Shiraga T, Miyamoto K, Tanaka H, Yamamoto H, Taketani Y, Morita K, et al. Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H⁺/Peptide transporter PepT1. *Gastroenterology*. 1999;116(2):354-62.
174. Shen H, Smith DE, Brosius FC 3rd. Developmental expression of PEPT1 and PEPT2 in rat small intestine, colon, and kidney. *Pediatr Res*. 2001;49(6):789-95.
175. Takeda J, Park H-Y, Kunitake Y, Yoshiura K, Matsui T. Theaflavins, dimeric catechins, inhibit peptide transport across Caco-2 cell monolayers via down-regulation of AMP-activated protein kinase-mediated peptide transporter PEPT1. *Food Chem*. 2013;138(4):2140-5.
176. Pieri M, Christian HC, Wilkins RJ, Boyd CAR, Meredith D. The apical (hPepT1) and basolateral peptide transport systems of Caco-2 cells are regulated by AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299(1):G136-143.
177. Bušek P, Malík R, Šedo A. Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues (DASH) and their substrates in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(3):408-21.
178. Braganhol E, Zamin LL, Canedo AD, Horn F, Tamajusuku ASK, Wink MR, et al. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer Drugs*. 2006;17(6):663-71.
179. Ramos S, Alía M, Bravo L, Goya L. Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). *J Agric Food Chem*. 2005;53(4):1271-80.
180. Zhu Y, Michelle Luo T, Jobin C, Young HA. Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Lett*. 2011;309(2):119-27.
181. Flatt PM, Pietenpol JA. Mechanisms of cell-cycle checkpoints: at the crossroads of carcinogenesis and drug discovery. *Drug Metab Rev*. 2000;32(3-4):283-305.
182. Levesque AA, Kohn EA, Bresnick E, Eastman A. Distinct roles for p53 transactivation and repression in preventing UCN-01-mediated abrogation of DNA damage-induced arrest at S and G2 cell cycle checkpoints. *Oncogene*. 2005;24(23):3786-96.
183. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, et al. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*. 1998;282(5393):1497-501.
184. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett*. 2006;11(4):506-25.
185. Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB, Diederich M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2008;76(11):1340-51.

186. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*. 2003;11(3):577-90.
187. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 1995;80(2):293-9.
188. Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J Agric Food Chem*. 2003;51(25):7292-5.
189. Martín MA, Ramos S, Mateos R, Granado Serrano AB, Izquierdo-Pulido M, Bravo L, et al. Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *J Agric Food Chem*. 2008;56(17):7765-72.
190. Martín MA, Serrano ABG, Ramos S, Pulido MI, Bravo L, Goya L. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *J Nutr Biochem*. 2010;21(3):196-205.

Nombre de archivo: Tesis Definitiva 2013.doc
Directorio: \\Clavo\temporal\SAIOA
Plantilla: C:\Documents and Settings\Usuario\Datos de programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dot
Título: 1
Asunto:
Autor: Argente
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 07/10/2013 9:34
Cambio número: 294
Guardado el: 31/10/2013 11:53
Guardado por: Maria
Tiempo de edición: 2.004 minutos
Impreso el: 31/10/2013 1:36
Última impresión completa
Número de páginas: 170
Número de palabras: 120.962 (aprox.)
Número de caracteres: 665.297 (aprox.)