



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL:

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BIFIDOBACTERIAS EN INTESTINO DE RATAS
TRATADAS CON DIETILNITROSAMINA**

ALUMNO:

CÉSAR POPOCA DELGADO

MATRICULA:

2112030923

ASESORES:

DRA. MARÍA ANGÉLICA GUTIÉRREZ NAVA

DR. JULIO ISRAEL PÉREZ CARREÓN

Mayo 2023

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 BIFIDOBACTERIAS.....	3
2.2 BIFIDOBACTERIAS FRENTE A ENFERMEDADES INTESTINALES	4
2.3 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON RNAR 16S	5
2.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	5
2.5 DIETILNITROSAMINA (DEN).....	7
2.6 HEPATOCARCINOMA (CHC) Y CÁNCER COLORECTAL (CCR).....	8
2.7 MÉTODOS HISTOQUÍMICOS.....	9
2.7.1 Tinción Tricromica de Masson.....	10
2.7.2 Tinción de Hematoxilina-Eosina.....	10
2.8 HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (FISH).....	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	12
4.0 OBJETIVOS	13
5.0 METODOLOGÍA.....	14
5.1 MICROORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO	14
5.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL CON RATAS.....	14
5.3 TOMA DE MUESTRAS	16
5.4 EXTRACCIÓN DE DNA DEL CONTENIDO DEL CIEGO.....	17
5.5 REACCIÓN DE LA CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	18
5.6 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA PCR EN TIEMPO REAL	19
5.7 TINCIÓN TRICROMICA DE MASSON	19
5.8 TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA.....	20
5.9 HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (FISH).....	21
6. RESULTADOS.....	24
6.1 REGISTRO DE PESO DE LOS DISTINTOS GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN.....	24
6.2 CUANTIFICACIÓN DEL DNA OBTENIDO DEL CONTENIDO DEL CIEGO	26
6.3 ANÁLISIS CUALITATIVO DE DNA	27
6.4 PCR CONVENCIONAL.....	28
6.5 PCR TIEMPO REAL	30
6.6 TINCIÓN DE MASSON DEL CIEGO DE LA RATA.....	31
6.7 TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA DEL CIEGO DE LA RATA.	32
6.8 TÉCNICA DE FISH.....	33
7. CONCLUSIONES	36
8. REFERENCIAS.....	37

1. Introducción

En 2010 en México fallecieron por algún tipo de cáncer 74,685 personas de las cuales el cáncer de hígado fue responsable de 5,393 muertes y el cáncer colon-rectal de 4,056 casos, encontrándose dentro de las diez causas de muertes por cáncer (Aldaco, *et al.*, 2012). El carcinoma hepatocelular es el tumor más frecuente en el hígado, la quinta causa de muerte en el mundo y la tercera por algún tipo de cáncer, encontrándose en un 20 % en hígado no cirrótico (Aguilar, *et al.*, 2015). El consumo de carnes asadas o fritas, tabaco, alcohol y algunos productos farmacéuticos (Arboatti, *et al.*, 2018) contienen compuestos capaces de metilar el DNA como ejemplo de ellos tenemos a la dietilnitrosamina que al entrar en contacto con las células hepáticas en su forma electrolítica es capaz de dañar el DNA causando la muerte celular, evitando así la regeneración del tejido hepático llevando a la formación de un carcinoma hepatocelular (Jack Wands, 2017).

Se ha documentado que algunas cepas de la microbiota del colon pueden generar varias sustancias mutagénicas, carcinógenas o promotores tumorales. Se sabe que las bifidobacterias tienen una actividad antígenotóxica absorbiendo o uniéndose a diversos carcinógenos de origen alimentario; (Burns & Rowland, 2003) manteniendo el equilibrio intestinal y desarrollando efectos antagónicos frente a bacterias perjudiciales para el huésped y ayudando a desarrollar la inmunidad por diversos mecanismos como es el mecanismo de inmunomodulación o síntesis de compuestos antimicrobianos (Sanz, *et al.*, 2006). La mayor parte de la información que se ha obtenido de la microbiota intestinal se ha podido obtener mediante métodos de secuenciación de nucleótidos de la subunidad ribosomal 16S (Bibiloni, *et al.*, 2009) siendo este gen el usado ampliamente para la detección de microorganismos mediante el uso de la técnica de PCR, generando miles de réplicas de un fragmento de DNA a partir de pequeñas cantidades usándose cebadores, nucleótidos y la DNA polimerasa (Garibyan & Avashia, 2013)

En el presente trabajo, se utilizó el modelo experimental de Schiffer, *et al.*, 2005, administrando por 16 semanas el carcinógeno dietilnitrosamina y por 18 semanas dos diferentes dosis de bifidobacterias, con el fin de detectar por técnicas moleculares la presencia de bifidobacterias utilizando como diana, el gen RNAr 16S con el uso de la técnica de PCR (Kaufmann, *et al.*, 1997) y analizando la morfología del ciego de los diferentes grupos experimentales por técnicas histológicas.

2. Marco Teórico

2.1 Bifidobacterias

Se tiene como evidencia que la microbiota intestinal se encuentra formada por bacterias anaerobias o anaerobias facultativas como son lactobacilos, enterococos, estreptococos y enterobacterias y por bacterias anaerobias estrictas (Sanz, *et al.*, 2006); como son bacteroides, eubacterias y bifidobacterias (Natalia, 2007).

Las bifidobacterias forman parte de la microbiota intestinal siendo bacterias anaerobias Gram positivas, con un pH óptimo de crecimiento de 6 a 7 y una temperatura de proliferación de 37 °C a 41 °C (Iñiguez & Acedo, 2006). Son encontradas al igual que muchas de las bacterias anaerobias en el colon o ciego adheridas a las mucinas, a las criptas y a los coloncitos (Domínguez, *et al.*, 2009). Constituyen un grupo importante en la microbiota intestinal del huésped debido a que no forman aminas alifáticas o compuestos sulfurosos o nitritos, teniendo una producción de vitaminas, enzimas digestivas, ácidos grasos de cadena corta, disminuyen el pH intestinal y aumentando la expresión de mucinas como MUC2 y MUC3 (Carnice, 2016). Tienen la capacidad de promover la maduración del intestino y ayudan a modular la inmunidad intestinal, disminuyen la intolerancia a la lactosa, ayudan al recubrimiento del intestino en conjunto con mucinas ileocolónicas (Carnice, 2016). Las bifidobacterias tienen una reducida producción de compuestos cancerígenos (Mirela & Andreu, 2013) contando con un efecto inmunomodulador en el huésped, modificando la relación epitelio-sistema inmunitario intestinal, aumentando la proliferación de Linfocitos T-reguladores, desarrollando mecanismos frente a patógenos gastrointestinales como son los mecanismos de adhesión, inmunomodulación y síntesis de compuestos antimicrobianos (Natalia, 2007).

Mecanismo de adhesión

Se considera como un fenómeno donde puede estar implicado en fuerzas electrostáticas pasivas o hidrófobas y con estructuras como son las lectinas y los polisacáridos de superficies, inhibiendo por competición a sitios de adhesión de patógenos en el tracto gastrointestinal, mediante componentes celulares y metabólicos de naturaleza proteica y glúcida. Algunos tipos de cepas de bifidobacterias son

capaces de producir citocinas antiinflamatorias y que al igual que los distintos probióticos pueden estimular la síntesis de IgA, la estimulación de la capacidad fagocítica de las células polimorfonucleares y la producción de distintas subpoblaciones linfocitarias (Sanz, *et al.*, 2006)

Compuestos antimicrobianos

Son compuestos de baja masa molecular (ácido láctico y acético), estos son los primeros responsables del efecto inhibitor que tienen las bifidobacterias y al igual que los ácidos grasos de cadena corta son los responsables de bajar los niveles de pH del colón contribuyendo al efecto barrera estimulando el flujo sanguíneo modulando la proliferación y diferenciación celular y en bacteriocinas (proteínas antimicrobianas) que son restringidas a bacterias Gram positivas (Sanz, *et al.*, 2006).

2.2 Bifidobacterias frente a enfermedades intestinales

Se cuenta con evidencia que la administración de lactobacilos y bifidobacterias disminuyen la incidencia de cáncer de colon inhibiendo de distintas maneras la aparición de esta enfermedad alterando la microbiota intestinal, las condiciones fisicoquímicas del colon, los sitios de unión de posibles carcinógenos, compuestos antimutagénicos y elevando el sistema inmune del huésped (Iosif, *et al.*, 2008). Enfermedades como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn son enfermedades que comparten muchas similitudes en su cuadro patológico ambas enfermedades se desarrollan en regiones donde se encuentran un número alto de bacterias como son el íleon y en el ciego donde se desarrolla la enfermedad de Crohn y en el caso de la colitis ulcerosa que se desarrolla en el recto; estos lugares es donde habitan las bifidobacterias (Schultz, *et al.*, 2003) En el síndrome de colon irritable se pudo observar una disminución en los síntomas de dolor abdominal y distensión al usarse *Bifidobacterium infantis* 35624 (Cisternas, 2011). Las bifidobacterias pueden actuar sobre el sistema inmunológico actuando como barrera del epitelio estimulando la producción de IgA fomentando el desarrollo del sistema inmune; de la misma manera influye en la producción de vitamina K, biotina y folatos, en la absorción de iones como Mg, Ca y Fe, en producción de energía por medio de la síntesis de ácidos grasos de cadena corta y en el metabolismo de carcinógenos (Vazquez, *et al.*, 2017). El uso de

Bifidobacterium bifidum impide el crecimiento *in vitro* de células HT-29 y HCT-116 (Barrenetxe, *et al.*, 2006) usando un extracto de la célula llamado quiroinositol en diferentes líneas celulares de adenocarcinoma de colon-rectal, inhibiendo el crecimiento en células HT-29 y HCT-116 (You, *et al.*, 2004).

2.3 Identificación de microorganismos con RNAr 16S

Hebert, *et al.*, 2003 estandarizaron una herramienta para identificar los organismos de los distintos ambientes, este método tenía que ser rápido, confiable y reproducible, basándose en la amplificación por PCR de una región del DNA; esta región del DNA mitocondrial compuesta de 600 pares de bases codifica a la subunidad I del Citocromo C Oxidasa (COI); pero esta región tenía limitaciones en los estudios con hongos y microorganismos; pero el RNAr 16S propuesto por Pace, *et al.*, 1986 fue la mejor opción para poder clasificar las bacterias y el uso de esta secuencia ha permitido establecer el proyecto árbol de la vida universal (Valenzuela-Gonzales, *et al.*, 2015).

La mayor parte de la información que se ha obtenido del ecosistema intestinal solo se ha podido obtener mediante los métodos que fijan secuencias de nucleótidos de la subunidad ribosomal ARNr 16S (Bibiloni, *et al.*, 2009). El ARNr 16S tiene un tamaño aproximado de 1500 nucleótidos codificado por el DNA ribosomal 16S (Rodicio & Mendoza, 2004) al encontrarla en todos los organismos ha sido reconocida como el marcador universal; pero por la variabilidad que la caracteriza es posible diferenciar entre especies, cepas o entre distintas variedades de organismos. El RNAr 16S tiene regiones conservadas que ayudan a la creación de iniciadores para permitir la amplificación de las regiones hipervariables que son las que más aportan información para estudios de genética y de taxonomía (Valenzuela-Gonzales, *et al.*, 2015).

2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de la cadena de la polimerasa desarrollada por Kary Mullis permitió la detección y la producción de grandes cantidades de DNA, esta técnica es ampliamente usada para la detección de patógenos y en medicina forense (Garibyan & Avashia, 2013). Es un ensayo enzimático que amplifica un fragmento del DNA, que puede ser obtenido de la piel, de la sangre, cabellos, saliva u otras fuentes, generando cantidades enormes de este fragmento a partir incluso de una sola molécula de DNA. Para poder

Llevarse cabo esta técnica necesita cebadores, nucleótidos y la DNA polimerasa (Garibyan & Avashia, 2013)

Para poder realizar la amplificación como se había mencionado se requieren de tres componentes fundamentales:

- La DNA Polimerasa, es la enzima encargada de unir de forma individual a los nucleótidos.
- Los nucleótidos que se encuentran formados por Adenina, Tiamina, Citosina y Guanina.
- Los cebadores son fragmentos cortos de DNA que se adhieren a la secuencia a amplificar siendo complementarios, funcionando como un punto de extensión para que se inicie el DNA Polimerasa (Garibyan & Avashia, 2013).

Estos componentes son mezclados y son llevados a un termociclador para llevar a cabo tres procesos para poder obtener el gen o fragmento de DNA a replicar, los procesos son:

- Desnaturalización del DNA: Se calienta por encima de los 90 °C para separar las cadenas de DNA complementario.
- Hibridación del DNA: Para llevar a cabo este paso la temperatura debe de descender para permitir la unión de los cebadores con los fragmentos a amplificar de DNA.
- Por último la temperatura se aumenta para que la DNA polimerasa pueda amplificar los cebadores agregando nucleótidos. Con cada repetición se duplican las cadenas de DNA replicadas (Garibyan & Avashia, 2013).

Existen dos tipos de PCR:

PCR cualitativa

Se utiliza para detectar la presencia de un gen en específico, por ejemplo la de un patógeno en una muestra biológica. El molde para que se logre la PCR son las

cadenas de DNA que son separadas para que la enzima sintetice las nuevas cadenas de la secuencia de interés, la enzima usada es la Taq Polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus* que es capaz de soportar altas temperaturas (Tamay de Dios L, 2013). Este método utiliza para poder visualizar el gen amplificado a la electroforesis en gel de agarosa, donde se van a separar los productos amplificados de acuerdo a su tamaño y su carga; para poder determinar la presencia y tamaño del gen amplificado se compara esta señal con la de marcadores moleculares que les funcionaran como referencia al gen amplificado (Garibyan & Avashia, 2013).

PCR cuantitativa (RT-PCR)

Se utiliza para cuantificar el DNA del gen de interés en la muestra detectando y cuantificando el producto de la PCR en tiempo real, donde se incluyen colorantes fluorescentes y sondas de DNA marcadas fluorescentemente, que ayudan a identificar inmediatamente después de la hibridación con el DNA objetivo (Garibyan & Avashia, 2013). Como ya se mencionó el objetivo de la RT-PCR es cuantificar las secuencias mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción, como dice el término tiempo real, la detección se realiza en cada ciclo de la reacción y a su vez cuantifica la cantidad de DNA presente. Esto fue porque Higuchi, *et al.*, 1992, video grabaron en tiempo real la incorporación del bromuro de etidio con el DNA en cada ciclo de la PCR, siendo este el objetivo de la PCR en tiempo real, detectar los ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes y así poder cuantificar las secuencias específicas por señales fluorescentes emitidas en la etapa de hibridación que son emitidas por cada copia de DNA producida en cada ciclo de la reacción (Tamay de Dios L, 2013).

2.5 Dietilnitrosamina (DEN)

La dietilnitrosamina es un agente hepatocarcinógeno encontrado en carnes asadas y fritas, así como en el tabaco, el alcohol y algunos productos farmacéuticos (Arboatti, *et al.*, 2018). La dietilnitrosamina causa aumentos en la concentración de interleucina 6 (IL-6) y es reactiva hacia el DNA después de la bioactivación, produciendo tumores en distintas especies a las que se les administre. Esta bioactivación se produce por la isoenzima P450 y el CYP2E1 que es inducido por el etanol (Verna & Williams, 1996).

Donde el CYP2E1 metaboliza el etanol a acetaldehído, bioactivando los procarcinógenos a carcinógenos finales (Upadhyya & Ravindranath, 2000). Esto mediante la hidrólisis del DEN por el CYP2E1 en iones diazonio, formando intermedios bioactivos que alquilan los ácidos nucleicos conduciendo a la necrosis hepatocelular y a la carcinogénesis de hígado (Conn, 2017).

La DEN al entrar en contacto con las enzimas hepáticas en su forma electrolítica daña el DNA causando la muerte de las células y evita la regeneración del tejido hepático, llevando a la formación del carcinoma hepatocelular (Jack Wands, 2017). El DEN al ser un compuesto alquilante es altamente reactivo al entrar en contacto con el DNA y al no requerir de una activación metabólica tiene la capacidad de producir aductos, de los cuáles el principal en producirse es el 7-etilguanina. No únicamente puede producir aductos, si no también puede unirse a la cadena principal de fosfato del DNA y reducir los niveles de 1, 3 o 7-alquiladenina (Muriel, 2017).

2.6 Hepatocarcinoma (CHC) y cáncer colorectal (CCR)

El hepatocarcinoma (CHC) a nivel mundial es el tumor con mayor incidencia, siendo la tercera causa de muerte; en Estados Unidos y Europa, donde se ha duplicado debido a infecciones de hepatitis C (VHC) (Tovar, *et al.*, 2007), teniendo una incidencia de 500 000 a 1 000 000 de nuevos casos al año; no únicamente ha incrementado el CHC por influencia del VHC sino también por lesiones crónicas ocasionadas por la cirrosis hepática (Ogawa, 2009). Dentro de los factores que propician la aparición del CHC se encuentran el abuso del alcohol, alimentos contaminados (ingesta de aflatoxina B1), aditivos en alimentos, productos químicos industriales y ambientales, obesidad, enfermedades metabólicas, diabetes y reacciones autoinmunes (Tovar, *et al.*, 2007).

El cáncer de hígado ocupa la tercera posición de causas de muerte en México, donde del 90 % de los tumores son un hepatocarcinoma (Pacheco-Perez, *et al.*, 2018) que pudieron ser causados por infecciones del virus de la hepatitis B o C, por consumo excesivo de alcohol, también desarrollarse por enfermedades metabólicas hereditarias y obesidad (Ortiz-Ortiz & Ortiz, 2012). En el hepatocarcinoma la microbiota es parte de una forma muy específica en su formación, activando los receptores tipo Toll (TLR) cuya función es detectar microorganismos invasores y la activación de señales vía

sistema inmune y desencadenando la respuesta inflamatoria, donde hay evidencia de que la inflamación persistente desencadena un hepatocarcinoma, el receptor tipo Toll no solo se limita a la activación de la respuesta inflamatoria sino también a patrones moleculares y lipopolisacáridos que desencadenan señales que activan la cascada del factor nuclear KB activando una mayor secreción de epiregulina, aumentando citoquinas proinflamatorias y moléculas inflamatorias iniciando el desarrollo de hepatocarcinoma por reacciones sobre hepatocitos, células Kupffer y células estelares siendo estas células el principal productor de colágeno (Romero, 2016).

Se encuentra una relación entre el riesgo de padecer CCR y la microbiota intestinal. Los glúcidos que se fermentan en el colón distal generan ácidos grasos de cadena corta y esta producción genera una disminución de la transformación de los ácidos biliares primarios a secundarios; siendo los ácidos biliares primarios agentes carcinógenos con una capacidad de dañar el DNA (Mirela & Andreu, 2013). Los lipopolisacáridos son sustancias antiinflamatorias de la pared celular bacteriana que al encontrarse al receptor tipo Toll (TLR4 del sistema inmunitario innato) los lipopolisacáridos generan una inflamación que es responsable de favorecer la aparición de la enfermedad, esto porque favorece una mayor proliferación celular (Schwabe, 2015).

Aún no se conoce precisamente el papel que ejercen los probióticos sobre su influencia antitumoral, pero de las funciones que se conocen pueden ser la modificación de pH intestinal y la producción de ácidos grasos de cadena corta, como son el acetato, butirato o el propionato; antagonizando a bacterias con bacteriocinas o citocinas y células inmunomoduladoras estimulantes (Leu, *et al.*, 2010).

2.7 Métodos Histoquímicos

Permiten la identificación de elementos constitucionales de la célula y de tejidos por procesos de tinción y su observación mediante un microscopio electrónico o de luz (Hani A, *et al.*, 2016). Las técnicas histoquímicas se encuentran fundamentadas en modificaciones moleculares y en los productos celulares obtenidos de las reacciones químicas de los tejidos con los colorantes usados en estas técnicas (Guerrero-Urbina, *et al.*, 2020). Algunos colorantes usados se pueden clasificar como ácidos, básicos o

neutros. Donde por ejemplo los colorantes ácidos son colorantes citoplasmáticos y en cambio los colorantes básicos son colorantes nucleares. (Simancas-Escorcia, *et al.*, 2021). Pero para poder visualizar esto se requieren de 5 pasos claves los cuales son la fijación de tejido, el procesamiento, la inclusión, el corte y por último la tinción. La histología ha tenido muchas mejoras tanto en las tinciones como en las mismas técnicas como ejemplo tenemos la hibridación in situ, la tinción de Hematoxilina-Eosina y la inmunohistoquímica (Hani A, *et al.*, 2016); siendo esta última la que ha permitido detectar, amplificar y poder evidenciar a antígenos específicos usando anticuerpos con niveles altos de especificidad (Guerrero-Urbina, *et al.*, 2020).

2.7.1 Tinción Tricromica de Masson

Esta tinción surge de la necesidad de tener tinciones que dieran resultados con múltiples colores en los tejidos que ayuden a diferenciarlos (Hani A, *et al.*, 2016) como lo son el colorante Ponceau de Xilidina y el azul de anilina. Que diferencian el tejido conjuntivo del tejido muscular dando resultados como se describen a continuación:

- a) Colágeno se tiñe de color azul o verde
- b) Las fibras musculares, citoplasmas y queratina de color rojo
- c) Núcleos color azul negrozco

2.7.2 Tinción de Hematoxilina-Eosina

Fue desarrollada por Wilhelm Von Waldeyer siendo esta una tinción débil combinándose con un fijador oxidante para potenciar la capacidad diferenciadora de los componentes que se encuentran en el tejido (Hani A, *et al.*, 2016). La tinción de Hematoxilina-Eosina como se describe en su nombre, se encuentra compuesta por dos colorantes:

- a) La hematoxilina (colorante básico) que tiñe de color azul a los ribosomas y a la cromatina.

b) La eosina (colorante ácido) que tiñe de rosa-anaranjado a rosado el citoplasma, al colágeno, al tejido conjuntivo y estructuras que sostienen y rodean la célula (Musumeci, 2014).

La eosina tiene la capacidad de diferenciar los glóbulos rojos con un color que va de naranja a rojizo oscuro, y dando un color rosa claro al colágeno y al musculo liso de un tono de rosa brillante (Simancas-Escorcía, *et al.*, 2021).

2.8 Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

La técnica de FISH implica la unión de una sonda marcada con fluorescencia de DNA con un fragmento de DNA objetivo, este gen puede provenir de preparaciones citogenéticas o de tejidos que han sido incluidos en parafina (Bayani & Squire, 2004). Teniendo una alta sensibilidad de poder ser usada en células ya sea se encuentren en metafase o en interfase, permite analizar una mayor cantidad de células en poco tiempo e identificar cambios estructurales que en la citogenética convencional no podrían detectarse (Sánchez, *et al.*, 2016). Las sondas son marcadas por un fluorocromo para su detección mediante un microscopio electrónico de barrido en microarreglos de tejidos (TMA), siendo el microarreglo de tejidos un bloque de parafina con una serie de núcleos cilíndricos de tejido previamente incluidos en parafina (Fedor & Marzo, 2005). Se tienen distintos tipos de sondas las centroméricas, las de pintado cromosómico y las de secuencia única (Sánchez, *et al.*, 2016) con una longitud que oscila de 15 a 30 bases dependiendo la especificidad, sensibilidad y la facilidad que puedan tener para penetrar los tejidos; unas de las sondas más usadas son la FITC (fluoresceína Isotiocianato) que se excita a 492 nm emitiendo un color verde a 528 nm (Martínez, 2011) y la sonda DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) emitiendo un color azul fosforescente con una excitación ultravioleta en una banda de 330-335 nm (Fernández, *et al.*, 2017).

3. Justificación

El hepatocarcinoma es uno de los tumores más frecuentes entre hombres y mujeres; siendo el quinto más frecuente en hombres y por su contraparte el séptimo en mujeres; siendo el tercero en provocar muertes en el mundo. Sabiéndose que el hepatocarcinoma puede ser desarrollado por enfermedades como son la cirrosis, hepatitis y virus de hepatitis C (González-Aguirre, *et al.*, 2013).

El incremento de la translocación bacteriana intestinal se encuentra ligado a la inflamación y fibrosis del hígado derivando a enfermedades como lo son: la enfermedad de hígado graso no alcohólico y el hepatocarcinoma que son relacionadas con la activación de receptores tipo Toll (TLR4). Se liga a la microbiota intestinal dañina y a los receptores tipo Toll como promotores del hepatocarcinoma siendo estos no iniciadores, sino promotores del hepatocarcinoma mediante la expresión de epiregulina (contribuye a la inflamación, cicatrización de heridas, reparación de tejidos y estimular la proliferación celular) y prevención de apoptosis (Romero, 2016). El consumo de bacterias benéficas como son las bifidobacterias es vital debido a que modulan la microbiota intestinal e inactivan el receptor TLR4 (Ponziani, *et al.*, 2018) debido a que la mayoría de las enfermedades hepáticas comparten la característica de tener una microbiota deficiente (Liu, *et al.*, 2019).

En enfermedades hepáticas las alteraciones en la microbiota como en los mecanismos de respuesta inflamatoria desempeñan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad; debido a que los probióticos poseen una actividad de modulación intestinal y respuesta inmunológica pueden ser eficaces para el tratamiento de enfermedades (Soriano, *et al.*, 2013) . Se sabe que las bifidobacterias habitan cerca del colon entre las mucinas, las criptas y los coloncitos (Domínguez, *et al.*, 2009); lo anterior refleja la importancia de estudiar el posible efecto hepatoprotector que pueden tener las bifidobacterias frente a procarcinógenos químicos como lo es la dietilnitrosamina.

4.0 Objetivos

General

Identificar bifidobacterias en el contenido del ciego de ratas tratadas con dietilnitrosamina, mediante técnicas moleculares.

Específicos

- Inducir hepatocarcinoma en los grupos experimentales que se les administró dietilnitrosamina.
- Obtener el contenido del ciego de las ratas para la extracción del DNA.
- Optimizar las condiciones de la reacción de PCR para la detección de bifidobacterias en el contenido intestinal.
- Amplificar el gen RNAr 16S para la identificación molecular usando los primers Lm3 y Lm26.
- Identificar la colonización de bifidobacterias en porciones del ciego de la rata mediante el uso de técnicas histológicas.
- Comparar y correlacionar los datos obtenidos en los diferentes grupos experimentales.

5.0 Metodología

5.1 Microorganismo y condiciones de cultivo

Bifidobacterium sp., se cultivó en medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) Difco con 0.05 % de cisteína (MRS-C). Este medio de cultivo se preparó en condiciones anaeróbicas burbujeando CO₂ y se selló con tapones de hule y arillos de metal. Posteriormente, el medio se esterilizó en autoclave durante 15 min a 15 lb/in². Posterior a la esterilización se incubó un inóculo de 20 mL del cultivo en 200 mL medio MRS-C a 37 °C por 48 horas, posterior a este tiempo se centrifugó a 8,000 rpm durante 20 min a 4 °C para ser lavado 2 veces con solución salina fisiológica y se almacenaron en congelación para conservar la integridad bacteriana hasta su administración.

5.2 Protocolo experimental con ratas

Se utilizaron ratas macho Wistar, con un peso promedio de 200 g se formaron 5 grupos con 7 individuos cada uno, y uno con 5 individuos siendo este el control negativo; la dosificación de los grupos formados se describe en tabla 1. De los grupos seleccionados la administración por vía oral de bifidobacterias se realizó tres veces por semana, dividiendo en dos dosificaciones de 1x10⁶ bacterias/mL y 1x10⁹ bacterias/mL y la administración de la dietilnitrosamina se realizó por vía intraperitoneal una vez por semana con una dosis de 50 mg/kg siguiendo el modelo descrito por Schiffer, *et al.*, 2005 (Figura 1) en un periodo de administración de 16 semanas siendo esta última semana donde se suspendió la administración de la dietilnitrosamina donde se espera la aparición de nódulos tumorales, mientras tanto se continuó la administración de las bifidobacterias por dos semanas más, llegando al término de estas 18 semanas se procedió a obtener las muestras para realizar la metodología (Schiffer, *et al.*, 2005).

Tabla 1.- Dosis y grupos formados, la administración de bifidobacterias vía oral y dietilnitrosamina administrada vía intraperitoneal.

<i>Identificación</i>	Grupo	N° de ratas	Bifidobacterias (Dosis)	Dietilnitrosamina (Dosis)
D1 BB	Dosis baja de bifidobacterias	7	1x10 ⁶ bacterias / mL	-----
D1 BB + DEN	Dosis baja de bifidobacterias más dietilnitrosamina	7	1x10 ⁶ bacterias / mL	50 mg DEN /kg
C-	Control Negativo	5	-----	-----
C+	Control Positivo	7	-----	50 mg DEN /kg
D2 BB	Dosis alta de bifidobacterias	7	1x10 ⁹ bacterias / mL	-----
D2 BB+ DEN	Dosis alta de bifidobacterias más dietilnitrosamina	7	1x10 ⁹ bacterias / mL	50 mg DEN /kg

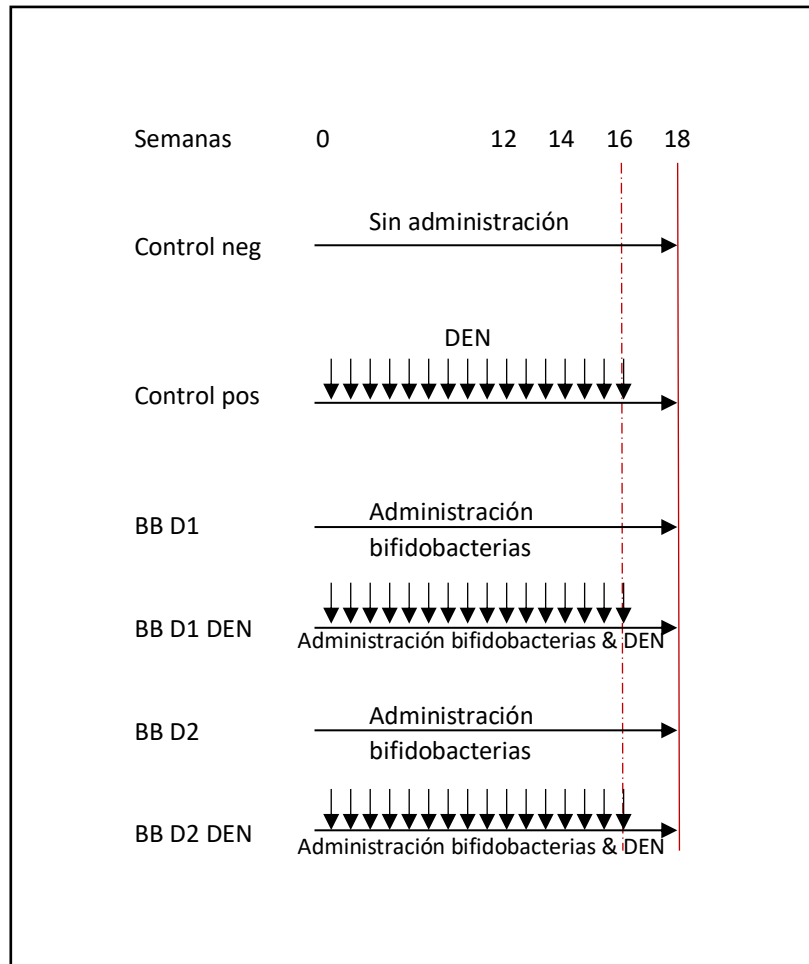


Figura 1.- Estrategia experimental de administración de bifidobacterias y dietilnitrosamina basada en el modelo de Schiffer, *et al.*, 2005 de una administración conjunta por un periodo de 16 semanas de bifidobacterias y dietilnitrosamina y la continuación de administración de ambas dosis de bifidobacterias hasta completar 18 semanas.

5.3 Toma de muestras

La obtención de las muestras se realizó sedando a las ratas con pentobarbital sódico usando una dosis de 50 mg/Kg vía intraperitoneal. Ya sedadas las ratas se verificó que no tuvieran sensibilidad, se realizó el sacrificio haciendo un corte en la vena cava abdominal y así poder obtener el ciego y su contenido donde se sabe colonizan las

bifidobacterias. El tejido obtenido del ciego se mantuvo en formalina para su posterior inclusión en parafina y las muestras del contenido del ciego se mantuvieron a -20 °C hasta su análisis para evitar alguna degradación o descomposición del contenido.

5.4 Extracción de DNA del contenido del ciego

La extracción de DNA se realizó mediante los pasos citados en el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit de la marca Qiagen como se indica a continuación:

- Se tomaron aproximadamente 220 mg de cada muestra de contenido del ciego en un tubo; a este tubo se le agregó 1.4 ml de Buffer ASL homogeneizando por 1 minuto, posteriormente se colocó la suspensión a 70°C durante 5 minutos en un baño seco, inmediatamente después de este paso se homogeneizó por 15 segundos y se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto.
- Seguido a la centrifugación, se tomaron 1.2 ml de muestra y se transfirieron a un segundo tubo, donde se le añadió una tableta InhibitEX (para poder disolver la tableta se agita en un vortex) se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifuga a 12,000 rpm durante 3 minutos.
- Se tomó 1.5 ml de sobrenadante y se transfieren en un tercer tubo para ser centrifugado por 3 minutos a 12,000 rpm.
- En un cuarto tubo se agregaron 2 µl de RNAsa y 200 µl de muestra del tubo anterior y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de este paso se agregó 15 µl de proteinasa K y 200 µl de Buffer AL, se homogeneizó, para ser incubado a 70°C durante 10 minutos en un baño seco. Después de este tiempo se agregó 200 µl de etanol absoluto frío y se homogeneizó.
- Se colocó una QIAamp spin column en un tubo de colección y se transfirió el contenido del paso anterior a un cuarto tubo a la QIAamp spin column; teniendo cuidado de no tocar los bordes de la columna y se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto, el contenido se descarta y la QIAamp spin column se transfirió a un nuevo tubo de colección para poder agregar 500 µl de Buffer AW1 y centrifugar a

12,000 rpm durante 1 minuto. Después de este paso se transfirió la QIAamp spin column en un nuevo tubo de colección y se añadió 500 µl de Buffer AW2 para centrifugar a 12,000 rpm durante 3 minutos.

- Después de los lavados con los buffer AW1 y AW2; la QIAamp spin column se transfirió a un microtubo y se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto; de nuevo la QIAamp spin column se transfirió a un nuevo microtubo y se agregó 200 µl de Buffer AE directamente en la membrana de la columna para ser incubado durante 1 minuto a temperatura ambiente y ser centrifugado a 12,000 rpm durante 1 min. Este tubo contiene el DNA bacteriano con unos rendimientos de 15-60 µg; se almacenó en congelación a -4 °C.
- Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para observar la integridad del DNA en un transiluminador UV.

5.5 Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica de PCR se realizó con: 1 µl de sonda DNA, 1 µl de cada primer Lm3 y Lm26 [1 µM] (Kaufmann, *et al.*, 1997); 12.5 µl de master Mix, agua libre de DNAsas cbp 50 µl. La técnica se realizó con las siguientes condiciones en un termociclador Biometra:

1. Desnaturalización inicial 95°C durante 5 min.

Posterior se realizaron 35 ciclos de:

a) Desnaturalización a 94°C durante 1 min.

b) Alineamiento a 57°C durante 3 min.

c) Extensión a 72°C durante 4 min,

Un ciclo final de extensión a 72°C durante 5 min.

Una vez concluida la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar la amplificación de DNA y verificar la presencia de bifidobacterias; esto mediante el uso de un transiluminador UV.

5.6 Optimización de las condiciones para PCR en Tiempo Real.

Para realizar la técnica de PCR en tiempo real se utilizaron primers y sondas TaqMan específicas para una región del 16RNAr del género *Bifidobacterium* (Furet et al., 2009), con las siguientes condiciones: un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 10 min posteriormente 40 ciclos a 95 °C 30 segundos y 60 °C 1 minuto. La placa se preparó con los siguientes componentes (Tabla 2).

- a) Muestra: DNA del contenido del ciego.
- b) IPC (Control Positivo Interno): Molde DNA de un cultivo puro de *Bifidobacterium* sp., se añade a la reacción de PCR. Para distinguir los resultados falsos negativos.
- c) IPC-Control Negativo (Pocillos de control negativo-IPC): Contiene un molde de IPC y buffer o agua en lugar de la muestra de reacción. El molde de IPC es el único que no se debe de amplificar, porque la reacción no contiene ninguna muestra.

Tabla 2.- Componentes de la técnica PCR Tiempo Real. Es representada por las muestras obtenidas del contenido del ciego de 3 grupos representativos identificadas como U, el DNA extraído de una muestra de bifidobacterias se identifica como I, el control negativo como IN contiene agua o buffer.

		Muestras
Muestra	U	DNA: Rata 6 D2 BB, Rata 6 D2 BB dilución 1:10, Rata 5 D1 BB+DEN, Rata 3 D2 BB dilución 1:10, R3 D2 BB y R6 C+
IPC	I	DNA cultivo <i>Bifidobacterium</i> sp
IPC- Control Negativo	IN	Agua

5.7 Tinción Tricromica de Masson

Se obtuvieron cortes de 8 µm utilizando un microtomo, éstos fueron adheridos a un portaobjetos, se dejaron reposar por 10 minutos en Xilol, transcurrido este tiempo se colocó en otro contenedor que contiene Xilol por 10 min más, posterior se colocó en alcohol al 100% por 5 minutos y se transfirió a un recipiente con alcohol al 95% por 5 minutos, después de esto se realizó un lavado con agua corriente y se colocó en un recipiente con solución Brown por una hora donde se dejó a una temperatura que oscila

de 56-60°C. Una vez transcurrido el tiempo se realizaron dos lavados, uno con agua corriente hasta desaparecer el color amarillo y uno con agua destilada posterior a los lavados se llevó la muestra al contenedor de Hematoxilina de Irum por 10 minutos, después se realizó dos lavados uno de agua corriente y de agua destilada, concluidos los lavados se colocó por 5 minutos en la solución de Briebrich-Scarlet (Fucsina ácida) y después se realizó un lavado con agua destilada, se dejó la muestra por 15 min en solución de Ácido fosfotúngstico acuoso al 10% y en solución Verde luz al 4% esto por 20 min para posterior realizarle un lavado con agua destilada. Se llevó un recipiente con agua acética al 1% dejándola reposar durante 4 minutos, transcurrido el tiempo se le hace un lavado con agua destilada. Por último se deja reposar por 5 min en alcohol 96%, esto se realizó en dos ocasiones y en dos distintos contenedores; posteriormente se transfirió la muestra a un contenedor con alcohol al 100% y se dejó reposar por 5 minutos, este paso se realizó en dos ocasiones y en distintos contenedores de alcohol al 100% una vez más se dejó en reposo en Xilol por 5 minutos repitiendo este paso en 2 ocasiones para posterior ser colocado en el medio de montaje. Visuaizar en microscopio.

5.8 Tinción de Hematoxilina-Eosina

Se obtuvieron cortes de 8 μm utilizando un microtomo, éstos fueron adheridos a un portaobjetos, la muestra se dejó reposar en Xilol por 5 minutos esto se realiza dos veces en distintos contenedores una vez concluido se colocó en alcohol absoluto por 3 min, se transfirió a alcohol al 96% y por último 3 minutos más en alcohol al 80%, posterior a esto se le realizó un lavado con agua destilada y se dejó reposar en Hematoxilina de Harris por 5 minutos al concluir se realizó un lavado con agua destilada y se deja de 5 a 10 segundos en agua acidulada para después realizarle un lavado con agua destilada y de la misma manera dejar de 5-10 segundos en agua amoniacal concluido el tiempo se realizó un lavado, se llevó a un recipiente con Eosina donde se dejó en reposo por 5 minutos para después dejar reposar por un tiempo de 2 a 5 segundos con alcohol al 85%, después en alcohol al 96% y por último en alcohol absoluto. Una vez concluido los pasos anteriores se volvió a colocar en Xilol por dos ocasiones por un tiempo de 5 minutos, para después colocarle en medio de montaje. Visuaizar en microscopio.

5.9 Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Se elaboró un microarreglo de tejidos (TMA, por sus siglas en inglés) utilizando cortes de tejido intestinal de todas las muestras obtenidas de los diferentes grupos experimentales, la tabla 3 muestra los número asignados a cada muestra.

Tabla 3. Número de posición de las muestras de ciego obtenidas de cada rata en el TMA, iniciando la numeración del grupo D1 BB, teniendo el número correspondiente de cada rata seguido del lugar donde se colocó en el TMA.

Identificación del grupo	Numeración de la Rata	Posición en el TMA	Identificación del grupo	Numeración de la Rata	Posición en el TMA
D1 BB	1	13	C+	1	20
	2	14		2	21
	3	15		3	22
	4	16		4	23
	5	17		5	24
	6	18		6	25
	7	19		7	26
D1 BB + DEN	1	27	D2 BB	1	6
	2	28		2	7
	3	29		3	8
	4	30		4	9
	5	31		5	10
	6	32		6	11
	7	33		7	12
C-	1	1	D2 BB+ DEN	1	34
	2	2		2	35
	3	3		3	36
	4	4		4	37
	5	5		5	38
				6	39
				7	40

Una vez asignados los números a cada muestra, se elaboró el TMA colocando las muestras en forma aleatoria como se muestra en la figura 2. Para hacer más fácil su identificación, por ejemplo A1 se encuentra la muestra 1 que en la tabla 3 de acuerdo a la columna de posición de TMA nos indica que pertenece a la muestra del grupo C- rata 1. Así mismo se encuentran acomodadas las demás muestras. Para los controles positivo independientes al modelo son las posiciones marcadas como + y en su

contraparte para los negativos son marcadas como - las posiciones marcadas con una X son posiciones las que no se les cuenta con muestra alguna.

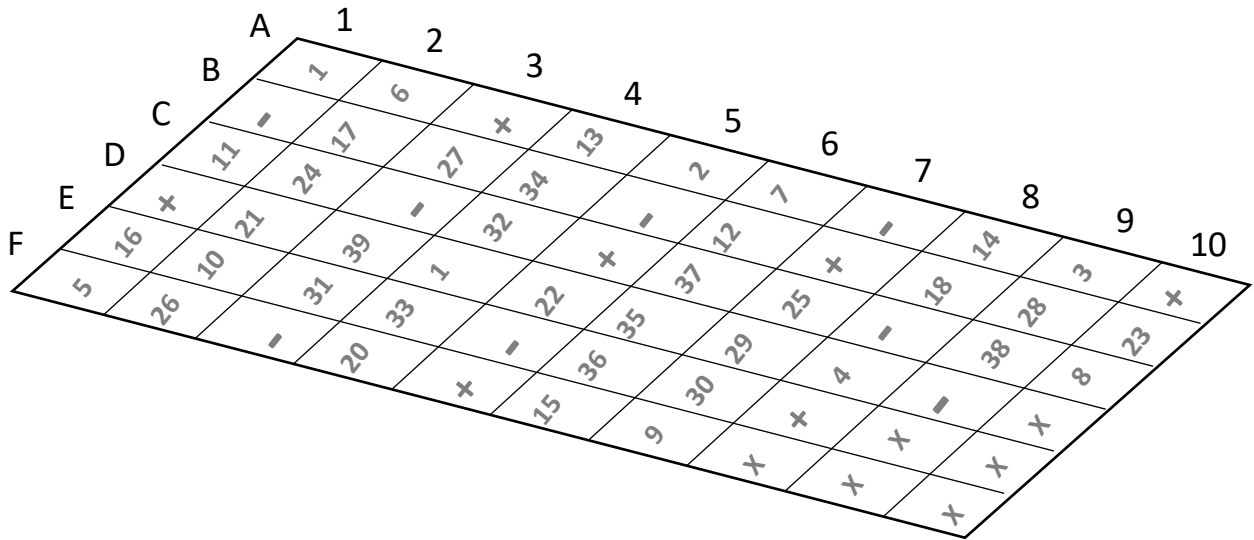


Figura 2.- Esquema de la organización de las muestras en el arreglo de tejidos (TMA), cada número representa el intestino de cada rata. Los signos - y + representan muestras de los grupos controles negativo (cultivo puro de *Lactobacillus*) y positivo (cultivo puro de *Bifidobacterium*) respectivamente.

EL TMA se elaboró tomando con un sacabocados una sección de intestino de cada muestra, una vez elaborado el TMA con las muestras embebidas en parafina, se realizó un corte de aprox 12 µm el cual fue colocado en un portaobjetos electrocargado. Posteriormente las muestras se desparafinaron y se trataron para después llevar a cabo la hibridación con las sondas específicas para el género *Bifidobacterium* **Bif 154** (/56-TAMN/AC CAC CCG TTT CCA GGA G (Takada *et al.*, 2004), siguiendo los pasos para esta técnica:

- a) Fijación y permeabilización: se realiza para estabilizar las estructuras y evitar la lisis celular, mediante el uso de agentes precipitantes como etanol y agentes que formen un entrecruzamiento como lo es el formaldehído (Martínez, 2011).

- b) Hibridación: se busca unir la sonda DAPI Y FITC con el DNA con un tampón formado de NaCl 5M, Tris/HCl 1M, Formamida, agua destilada y SDS al 10%; llevándose a oscuridad y calentando de 37 °C a 50 °C (Martínez, 2011).
- c) Lavado: la función es eliminar la sonda que no fue unida con el gen de interés mediante el uso de agua destilada (Martínez, 2011).
- d) Visualización: se requiere de un microscopio de epifluorescencia con distintos filtros para poder visualizar los espectros de color (Martínez, 2011).

6. Resultados

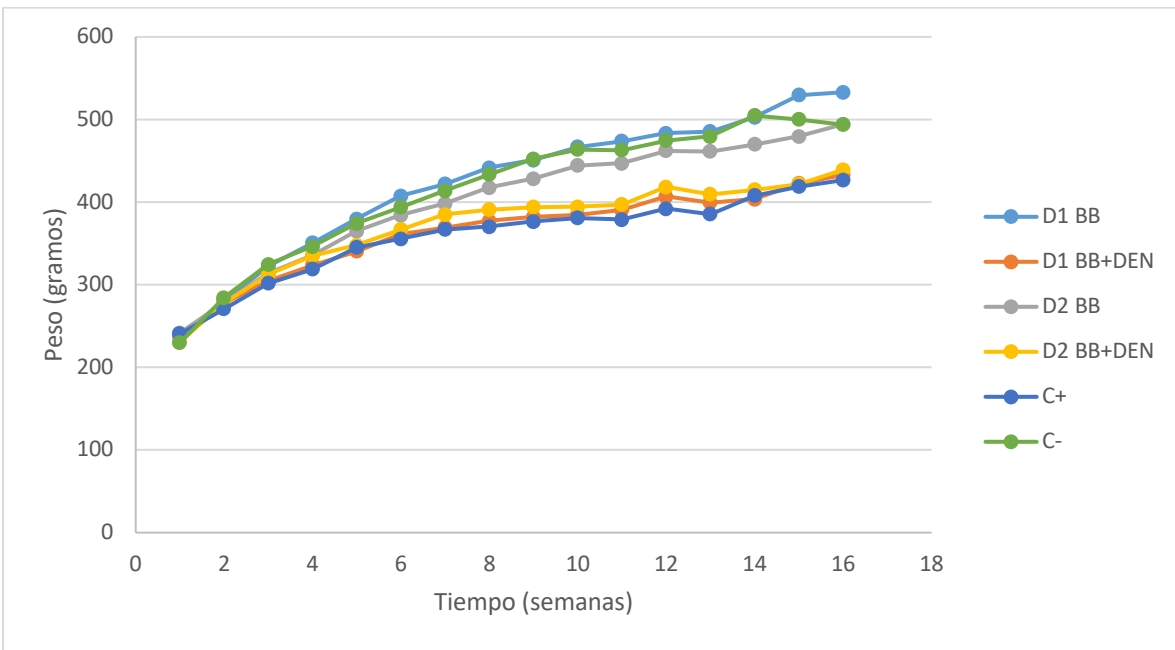
6.1 Registro de peso de los distintos grupos de experimentación

Los registros de pesos se muestran en la tabla 5 y gráfica 1, en las que al comparar se puede ver una notable diferencia de pesos desde la semana 6, siendo aún más notable en la semana 9 donde se puede observar que los grupos a los que se les fue únicamente administrado bifidobacterias D1 BB, D2 BB y el grupo control negativo tuvieron mayor crecimiento en comparación a los grupos que les fue administrado el carcinógeno dietilnitrosamina. Como se observa en la gráfica 1, el crecimiento de los grupos a los que se les administró bifidobacterias es muy notable en comparación de los grupos a los que se les administró dietilnitrosamina, siendo los grupos D1 BB y D2 BB que tuvieron un crecimiento “normal” debido a que se comportan igual que el grupo control negativo, viéndose un efecto negativo de la dietilnitrosamina sobre el crecimiento en los demás grupos.

Tabla 5.- Pesos promedio de los registros semanales obtenidos de los distintos grupos de experimentación. Iniciando de la semana 1 hasta la semana 16 donde se administró en conjunto las bifidobacterias con la dietilnitrosamina.

Semana	Grupos (pesos semanales)					
	D1 BB (g)	D1 BB+DEN (g)	D2 BB (g)	D2 BB+DEN (g)	C+ (g)	C- (g)
1	238.9	238.7	241.7	231.1	240.5	229.7
2	279.6	277.7	278.1	277.5	270.9	284.4
3	322.2	304.8	313.8	312.5	302.0	324.6
4	350.6	323.6	335.9	335.2	318.7	346.4
5	379.7	340.5	365.0	347.9	345.1	374.4
6	407.5	361.3	384.2	366.9	355.8	394.0
7	422.0	369.1	398.1	385.3	366.8	413.7
8	441.6	377.5	417.6	391.1	370.5	433.7
9	450.8	382.2	428.5	394.1	376.6	452.4

10	466.8	384.8	444.3	394.3	381.0	463.8
11	473.8	390.7	446.9	397.1	378.8	463.0
12	483.6	407.0	462.3	418.6	392.2	474.6
13	485.4	399.6	461.3	409.4	385.5	479.6
14	503.0	403.9	469.9	414.9	407.8	504.7
15	529.6	422.6	479.8	422.0	419.0	500.0
16	533.0	433.0	494.2	439.2	426.7	494.1



Gráfica 1.- Desarrollo semanal de los seis grupos de administración, se puede observar la tendencia de crecimiento de los grupos con administración de bifidobacterias en comparación con los grupos a los que se les administró dietilnitrosamina (DEN) que a partir de la semana 8 dejaron de tener un crecimiento en comparación con los otros grupos.

Los resultados obtenidos en esta metodología con respecto al seguimiento de los pesos durante las 16 semanas de la administración del DEN, nota una afectación en el peso obtenido comparando los grupos a los que se solo se les administró bifidobacterias con los que fueron administrados con DEN, pudiéndose ver esta comparativa en la gráfica de tendencia de pesos (Gráfica 1). De manera que estos resultados indica que la administración conjunta de DEN con bifidobacterias respecto al peso, el DEN llega a tener un impacto al observarse que a las 6 semanas se empieza a ver la diferencia de pesos en los distintos grupos siendo hasta la 10 muy notable, viendo así ya el daño que ha producido la administración del carcinógeno en el organismo de la rata.

6.2 Cuantificación del DNA obtenido del contenido del ciego

En la tabla 6 se presenta la concentración de DNA en [ng/ μ L] extraído del contenido del ciego de los distintos grupos experimentales.

Tabla 6.- Cuantificación del DNA extraído del contenido del ciego de los diferentes grupos experimentales.

Grupo	Rata	ng/ μ l	Grupo	Rata	ng/ μ l	Grupo	Rata	ng/ μ l
D1 BB	R1	2.3	D2 BB	R1	16.4	Control positivo	R1	22.9
	R2	12.6		R2	16.8		R2	31.3
	R3	18.4		R3	16.3		R3	33.1
	R4	0.6		R4	17.8		R4	12.7
	R5	2.3		R5	15.9		R6	28.8
	R6	4.4		R6	17.0		R7	10.8
	R7	1.9		R7	20.5			
D1 BB + DEN	R1	25.0	D2 BB + DEN	R1	20.8	Control negativo	R1	18.1
	R2	18.5		R2	24.0		R2	13.4
	R3	15.8		R3	21.9		R3	21.5
	R4	2.7		R4	24.5		R4	1.0
	R5	0.4		R5	20.7		R5	16.7
	R6	0.6		R6	12.6			
	R7	0.2		R7	16.9			

6.3 Análisis cualitativo de DNA

Mediante electroforesis al 1% se busca observar la integridad del DNA extraído del contenido del ciego y se compara con un marcador de 1000 pb encontrándose en el primer carril del gel; en la figura 1 se muestra solo dos grupos: D2 BB y D2 BB + DEN, que por su mayor concentración de DNA obtenido fueron elegidos como muestras representativas para este proceso. En la figura 3 se muestra el DNA purificado de los grupos experimentales donde se puede apreciar que varias muestras se degradaron y no pudieron ser utilizadas para la PCR, sin embargo, hubo algunas muestras que se obtuvieron íntegras como son la 5 y 7 del grupo D2 BB. Teniendo estos resultados se continúa con el desarrollo de la metodología, debido a que se cuenta con DNA que se puede usar para la técnica de PCR.

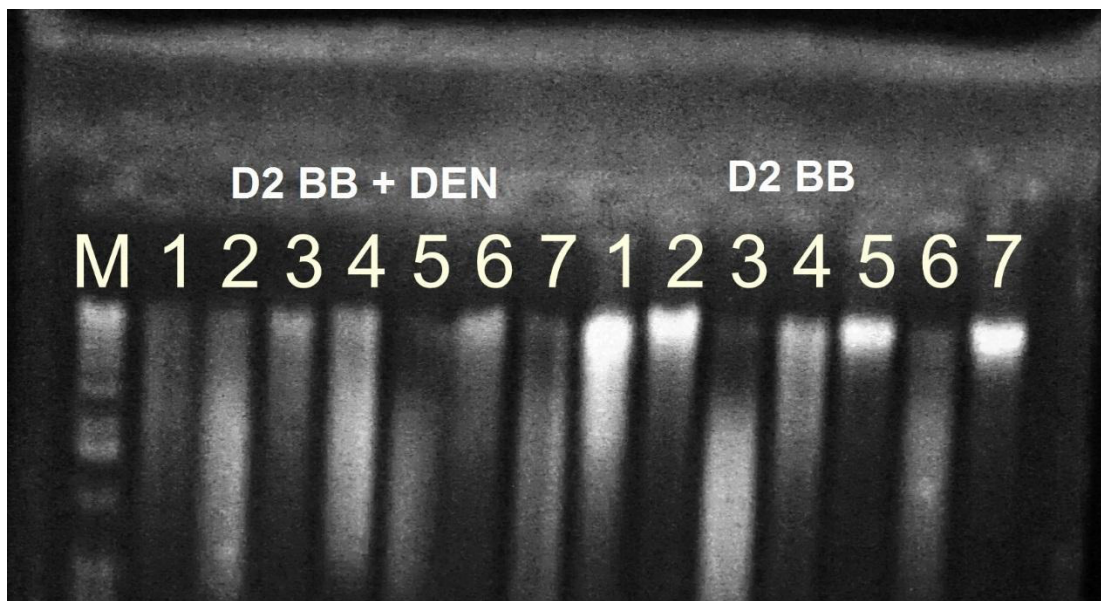


Figura 3.- Imagen representativa de los grupos de administración, como se muestra en la tabla 6 estos grupos D2 BB y D2 BB + DEN fueron los que se les cuantificó mayor cantidad de DNA por lo que se usan para determinar el análisis cualitativo del DNA y poder observar la integridad del mismo.

6.4 PCR convencional

De acuerdo al artículo escrito por Kaufmann, *et al.*, 1997, utilizando el juego de primers Im26 y Im3 se obtiene una banda de aproximadamente 1350 pb perteneciente al gen RNA 16S el cual sirve para identificar la presencia del género *Bifidobacterium*; también se menciona que en cepas negativas a esta reacción, se obtiene una banda en 300 pb (Kaufmann, *et al.*, 1997). En la figura 4 se puede ver en el carril 1 el marcador de DNA, seguido de los carriles marcados como R1 al R6 que es donde se encuentra DNA extraído del contenido del ciego del grupo D1 BB y en el último pozo el DNA extraído de un cultivo puro de *Bifidobacterium sp*; basándose en lo descrito anteriormente por Kaufman *et al* 1997 la señal observada en el pozo marcado como BB se encuentra por debajo de 1,636 pb que corresponde a la banda del tamaño esperado (1,350 pb) que indica positivo al género *Bifidobacterium* y en comparación con las muestras de DNA extraído del ciego de rata que no se presenta esa banda. La figura 5, nos puede sugerir la necesidad de optimizar la reacción, ya que las muestras R5, R6 y R7 del grupo D1 BB-DEN fueron las que presentaron el resultado positivo que indica la presencia de bifidobacterias, así como las muestras R3 y R5 del grupo D2 BB y las muestras R1, R2 y R3 del grupo D2 BB-DEN. Lo anterior nos confirma que se pudo identificar la presencia de bifidobacterias en las ratas que fueron administradas con ellas, en cambio, los grupos a los que no se les administró el probiótico, no se detectó en ninguna de las ratas.

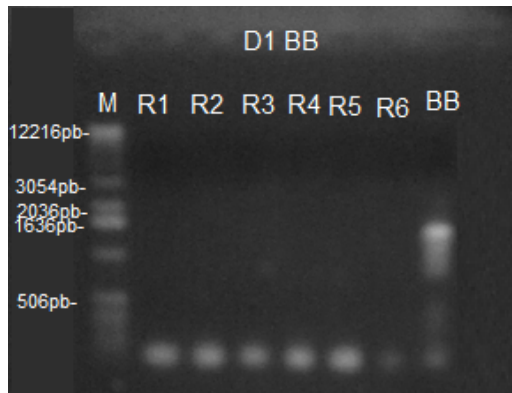


Figura 4.- Gel de agarosa al 1% con muestras del grupo D1 BB (identificadas del 1 al 6), marcador de DNA al inicio del gel (M) y al final del gel se tiene el DNA extraído de *Bifidobacterium sp* (BB).

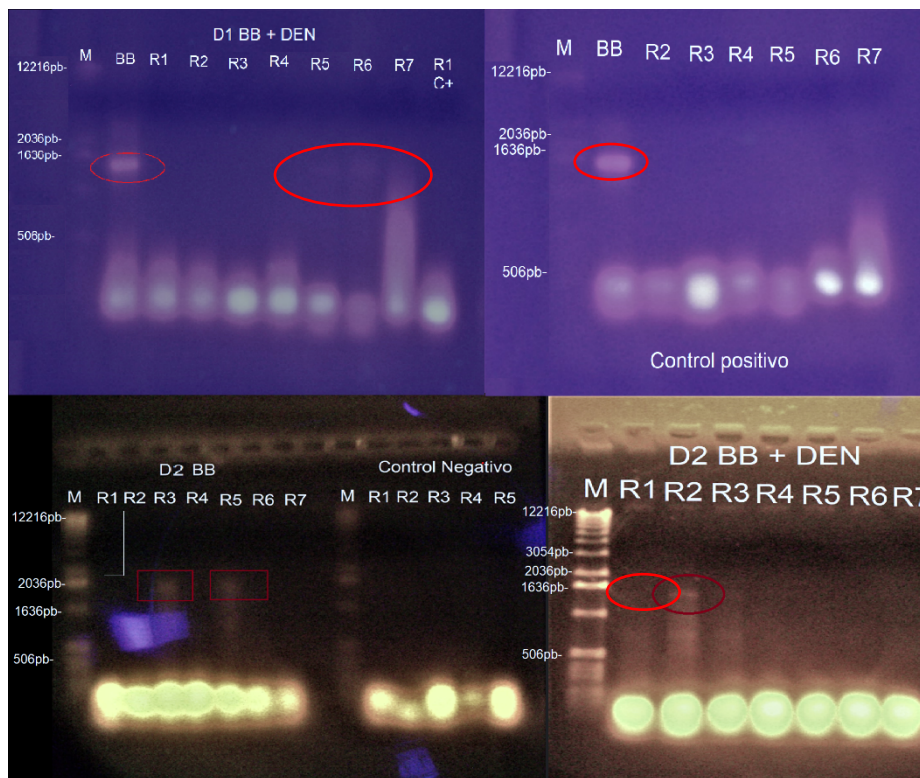


Figura 5.- Gel agarosa de la técnica de PCR convencional de los distintos grupos D1 BB+DEN, C+, D2 BB, C- Y D2 BB + DEN, en los que se les observa encerrados en rojo la señal del gen RNAr 16S, en las muestras se observa una banda tenue como se visualiza en el gel marcado como D1 BB y D2 BB+DEN.

6.5 PCR tiempo real

En la figura 6 se presenta la gráfica obtenida de la PCR en tiempo real donde se observan para todas las muestras, un crecimiento exponencial del producto de PCR, la gráfica nos indica que en los primeros ciclos del 1 al 14 se puede observar una señal muy débil sin incremento siendo este el ruido de la amplificación, hasta el ciclo 16 se observó una señal que se puede catalogar como amplificación del DNA de *Bifidobacterium sp* (control positivo de DNA, línea roja) teniendo una fase inicial desde el ciclo 16 y continúa con su fase lineal hasta el ciclo 28 llegando a la meseta (tope de amplificación) cerca del ciclo 30; teniendo un umbral de señal de fluorescencia muy largo en comparación con la señal de la muestra. Dando una señal que pudiera indicar la presencia del gen RNAr 16S por los primers utilizados y la sonda TaqMan. En contraste con las demás muestras y diluciones que tienen un paso de fase inicial a la meseta muy corto de aproximadamente 8 ciclos, donde se puede ver la probable deficiencia de las condiciones de los pasos de la PCR en tiempo real o cantidades muy deficientes de DNA que pudieran propiciar la amplificación hasta ciclos cercanos al final del análisis.

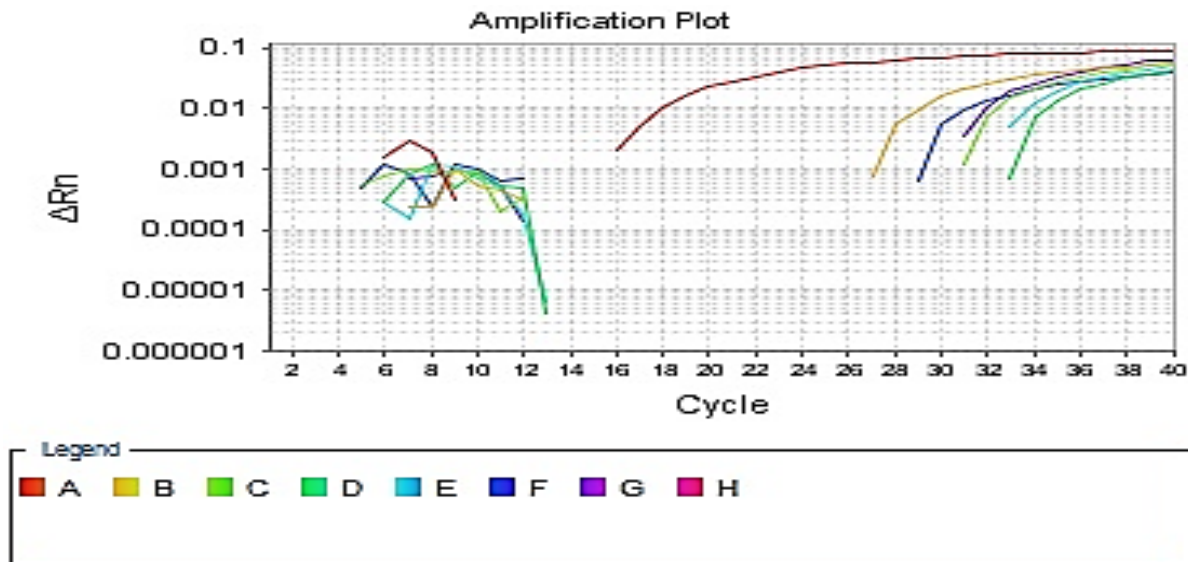


Figura 6.- Gráfica de amplificación de PCR en tiempo real, muestra A Control positivo (*Bifidobacterium sp*), muestra B rata 6 de grupo D2 BB, muestra C rata 6 grupo D2 BB en una dilución 1:10, muestra D rata 5 grupo D1 BB + DEN, muestra E rata 3 grupo D2 BB dilución 1:10, muestra F rata 3 grupo D2 BB y por último muestra G Rata 6 grupo C+

En cuanto a la técnica de PCR en tiempo real el resultado de las amplificaciones no fue el adecuado para poder deducir si hay o no presencia de bifidobacterias, ya que los resultados dados en la gráfica de la figura 6, los valores en los primeros 14 ciclos muestran señal ruido, siendo hasta el ciclo 16 donde el control positivo (*Bifidobacterium* sp.) comienza a presentar señal de fluorescencia (ΔR_n) y llegando fase lineal hasta el ciclo 30, que en contraste las demás muestras comienzan a producir una señal hasta el ciclo 26 aproximadamente teniendo en cuenta que datos obtenidos en la cuantificación de DNA son bajos y se realiza diluciones 1:10 por lo que puede propiciar la aparición de la amplificación hasta estos ciclos, Debido a que solo cuenta con resultado en esta prueba es recomendable realizar un análisis mejorando las técnicas de extracción de DNA y las condiciones de la técnica para obtener valores más confiables.

6.6 Tinción de Masson del ciego de la rata

En la figura 7 se puede ver la comparativa de las muestras obtenidas de la tinción de Masson de los distintos grupos de administración usándose como referencia a las ratas identificadas con el número 3. En las imágenes mostradas se nota en color azul el colágeno que se encuentra en la submucosa (rectángulo blanco) donde las muestras de los grupos Control positivo y D1 BB el colágeno se puede observar en color azul se encuentra muy concentrado, en comparación con los grupos a los que se les administró DEN, otra clara diferencia es que tanto las ratas que fueron administradas con bifidobacterias en las diferentes dosis conservan las estructuras esféricas de la capa muscular.

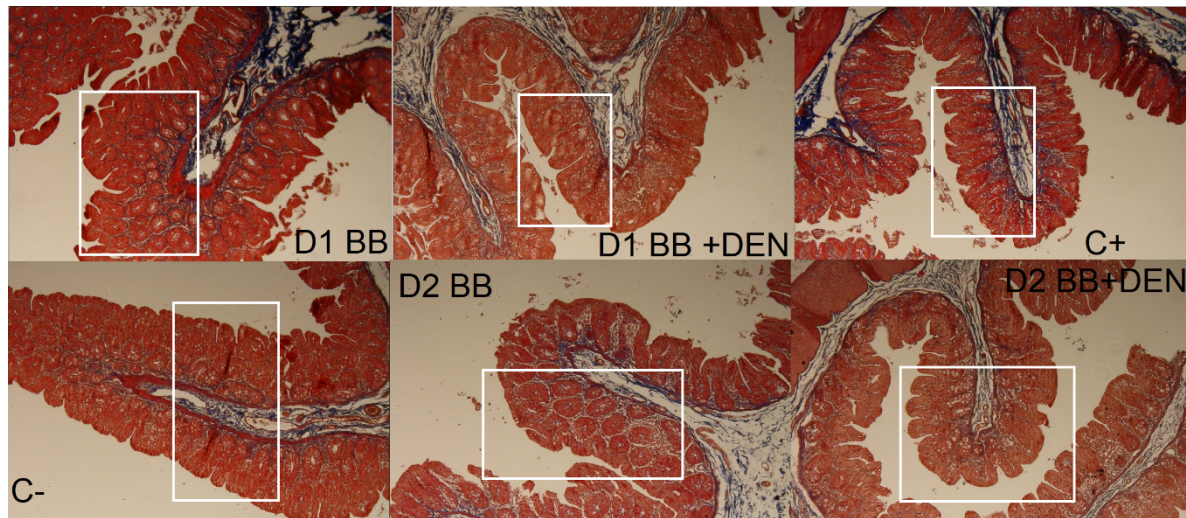


Figura 7.- Imágenes representativas de cada grupo de la Tinción de Masson usándose como referencia a las muestras de intestino de la rata identificada con el número 3 de cada grupo: D1 BB, D2 BB + DEN 2, C-, C+, D2 BB y D2 BB + DEN.

Asimismo en las técnicas histológicas (Tinción de Masson y H&E) se tuvo un resultado muy característico de los grupos con dosis alta de bifidobacterias en comparación con la dosis baja, teniendo una protección en la estructura del ciego, siendo esto comprobable con las estructuras esféricas que en los grupos de dosis de bifidobacterias y en el control negativo se mantienen y que en el control positivo se carecen de estas estructuras y el colágeno solo en dos grupos se puede observar muy concentrado en comparación de los demás grupos debido a que el colágeno ayuda a crear estructuras de barrera en contra de moléculas de acuerdo a señales de las criptas y vellosidades del intestino (Verbeke P, *et al.*, 2001), se puede deducir que las ratas con administración de bifidobacterias al conservar las estructuras; de acuerdo a la comparación con el control negativo; pueden tener una mayor protección contra moléculas dañinas que puedan propiciar la permeabilidad de alguna molécula dañina para el organismo.

6.7 Tinción de Hematoxilina-Eosina del ciego de la rata.

La figura 8 se muestra una imagen representativa de cada grupo de trabajo de administración, de la misma forma que la tinción de Masson se observa en los grupos sin administración de dietilnitrosamina y el grupo con mayor dosis de bifidobacterias y administración conjunta con dietilnitrosamina (D2 BB + DEN) la conservación de las

células caliciformes conservando su morfología normal (se pueden observar marcados con un ovalo de color negro) y en óvalos de color blanco se observa la ausencia o el cambio de forma de estas células, por lo que se puede ver el efecto protector de estas bifidobacterias.

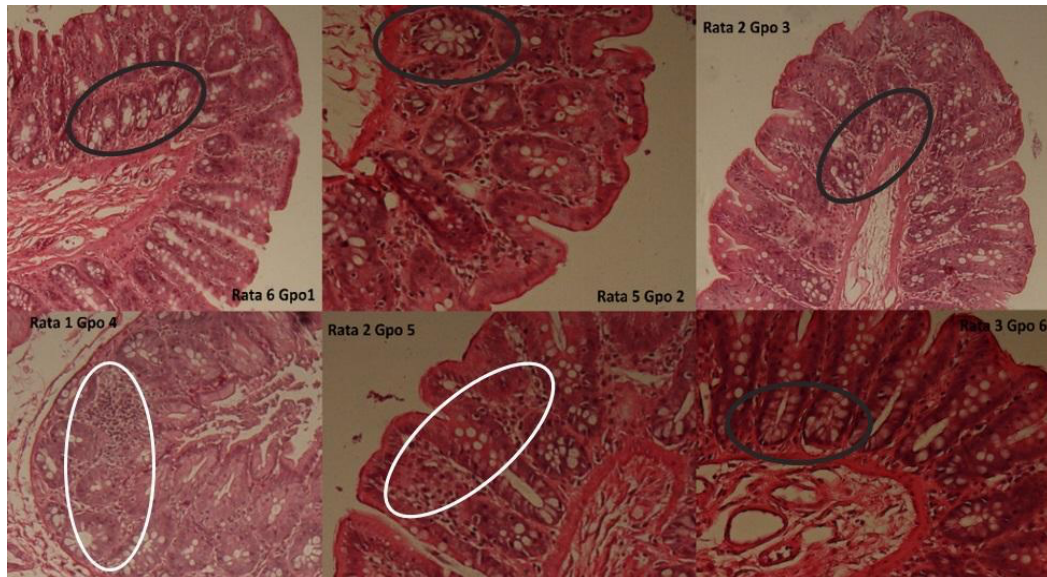


Figura 8.- Imagen representativa de la tinción H&E Grupo 1 (D1 BB), Grupo 2 (DA BB +DEN), Grupo 3 (C-), Grupo 4 (C+), Grupo 5 (D2 BB) y Grupo 6 D2 BB + DEN).

6.8 Técnica de FISH

En la figura 9 se puede ver el TMA que se realizó para poder llevar a cabo esta prueba, como se observa ya se encuentra en el portaobjetos después de ser cortado y listo para la hibridación para la técnica de FISH. La figura 10 muestra, las imágenes representativas de cada grupo en el microarreglo de tejidos, observada a través del microscopio electrónico. Como se puede observar la diferencia que se tiene entre el control positivo y negativo (C+ y C-) observándose una señal verde en el grupo positivo y una señal roja en el control negativo, así mismo en los grupos con una dosificación de 1×10^9 bifidobacterias/mL se puede observar esta señal fluorescente que se observa en el control positivo, en cambio en los grupos de administración de 1×10^6

bifidobacterias/mL no se cuenta con la señal que se pueda comparar con el grupo control positivo.

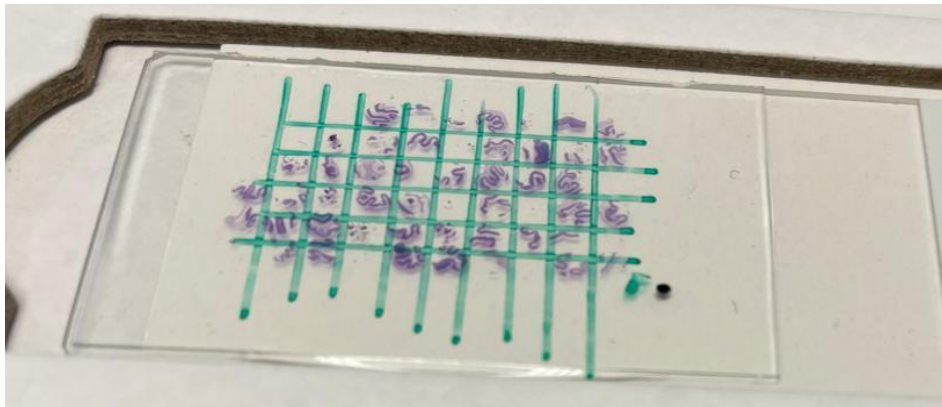


Figura 9.- Laminilla de vidrio que contiene el TMA elaborado con cortes de intestino de los diferentes grupos experimentales.

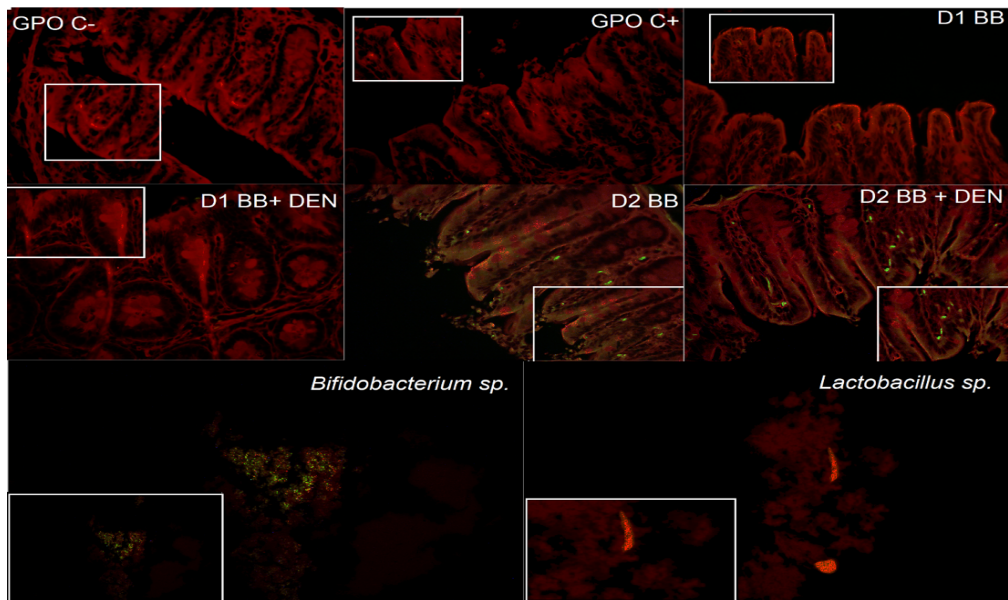


Figura 10.- Imagen representativa de la técnica FISH observada desde un microscopio electrónico de barrido usando la sonda FICT se observa una señal fluorescente en color verde en los grupo D2 BB, D2 BB +DEN y grupo C+ en cambio los grupo C-, D2 BB y D2 BB + DEN no se muestra una señal fluorescente que se pueda comparar con el control *Bifidobacterium sp.*

Al realizarse un microarreglo con porciones de ciego de rata y con el uso de marcadores de fluorescencia se buscó la hibridación de estos marcadores con porciones de DNA, pero al observar los resultados usando un microscopio electrónico para poder observar la fluorescencia en cada punto del microarreglo, se puede observar en el control positivo del método, una muestra de *Bifidobacterium* sp., una fluorescencia de color verde indicando la hibridación de la sonda FICT, esto se puede constatar debido a que en el control negativo, una muestra de *Lactobacillus* sp. el cual no se observa fluorescencia color verde en contraste se puede visualizar una señal color rojo (figura 10), siendo este característico de la sonda DAPI indicando la hibridación de este marcador en la muestra de lactobacilos, siendo así estas señales nuestros controles para poder descartar o no la presencia de bifidobacterias en las porciones de ciego que se usaron para la técnica, de tal forma que al observarse las muestras se puede constatar la presencia de la fluorescencia de la sonda FICT únicamente en las porciones de muestra tomadas de los grupos con mayor administración de bifidobacterias ya que se puede observar claramente las señales producidas por la hibridación del fluorocromo. Por esta razón se puede deducir que en esta técnica la presencia de bifidobacterias en el ciego de rata se encuentran en los grupos de mayor dosificación, pero esto no es un resultado alentador ya que en los análisis anteriores se encontraron dificultades para poder aseverar este resultado, en este sentido es alentador saber que mediante esta técnica se puede observar la presencia pudiendo ser una técnica discriminativa para saber si tenemos o no presencia y poder seleccionar en que dosis o muestras podremos encontrar la presencia de bifidobacterias y poder decidir si se sigue o no con los siguientes análisis.

7. Conclusiones

Se identificaron bifidobacterias en intestino de ratas tratadas con dietil nitrosamina, sin embargo, es necesaria una estandarización de la técnica.

Las ratas wistar utilizadas en el presente proyecto, no poseen bifidobacterias como parte de su microbiota intestinal, ya que no se detectó la presencia de éstas en el contenido intestinal de los grupos a los que no se les administró la bacteria.

Utilizando los primers y sonda TaqMan específicas para el género *Bifidobacterium*, en la PCR en tiempo real, se puede identificar la presencia de bifidobacterias en muestras de contenido intestinal, sin embargo, es necesario optimizar las condiciones de reacción.

El primer intento de hacer un microarreglo de tejido intestinal de ratas administradas con bifidobacterias, fue positivo, ya que logramos observar en el microscopio de fluorescencia la presencia de bifidobacterias pero únicamente en las muestras del grupo al que se le administró la dosis 2×10^9 ufc/mL y no así en el grupo al que se le administró 1×10^6 ufc/mL.

8. Referencias

- Aguilar, O., Gutiérrez, G., Motola, I. & Snachez, M., 2015. Prevalencia del carcinoma hepatocelular en hígado no cirrótico. *Invest Med Sur Mex*, 22(3), pp. 124-126.
- Aldaco, S. y otros, 2012. Mortalidad por cáncer en México 200-2010: el recuento de los daños. *GAMO*, 11(6), pp. 371-379.
- Arboatti, A. y otros, 2018. Diethylnitrosamine Increases Proliferation in Early Stages of Hepatic Carcinogenesis in Insulin-Treated Type 1 Diabetic Mice. *Biomed Research International*, Volumen 2018, p. 10.
- Barrenetxe, J. y otros, 2006. Modulación de la fisiología gastrointestinal mediante cepas probióticas de *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum*. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 29(3), pp. 337-347.
- Bayani, J. & Squire, J. A., 2004. Fluorescent In Situ Hybridization (FISH). *Current Protocols in Cell Biology*, 23(1), pp. 22.4.1-22.4.52.
- Bibiloni, R., Membrez, M. & Chou, C. J., 2009. Microbiota intestinal, obesidad y diabetes. *Anales Nestlé*, Volumen 67, pp. 39-48.
- Burns, A. & Rowland, I., 2003. Prebióticos y probióticos en la prevención del cáncer de colon. *Gastroenterol Hepatol*, 26(1), pp. 73-84.
- Carnice, R. T., 2016. Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. *Anales de Pediatría*, Volumen 04, pp. 30-41.
- Cisternas, D., 2011. El uso de probióticos en algunas enfermedades gastrointestinales. *Medwave*, 11(06), pp. 50-51.
- Conn, P. M., 2017. *Animal Models for the Study of Human Disease*. Segunda ed. United States : Academic Press.
- Domínguez, A. M., Luz, V. & RamosGabriela, 2009. Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59(4), pp. 358-368.
- Fedor, H. L. & Marzo, N. M. D., 2005. Practical Methods for Tissue Microarray Construction.. *Pancreatic Cancer*, Volumen 103, pp. 89-101.
- Fernández, E. F., Marval, M. B., Salazar, E. & Ysasis, L. A., 2017. Características Morfo-tintoriales en el ciclo celular de *Acinetobacter baumannii* por los métodos de Gram y 4,6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro. *Univerisidad de Oriente, Venezuela*, Volumen 29, pp. 628-640.
- Garibyan, L. & Avashia, N., 2013. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol*, Volumen 3, p. 133.
- González-Aguirre, A. y otros, 2013. Carcinoma hepatocelular: Diagnostico y tratamiento. *Gaceta mexicana de oncología*, 12(5), pp. 334-343.
- Guerrero-Urbina, C., Sol, M. d. & Fonseca, G. M., 2020. Métodos Histoquímicos e Inmunohistoquímicos para la estimación del intervalo postmortem en tejidos humanos: Una revisión. *International Journal of Morphology*, 38(2), pp. 241-246.

- Hani A, A., Faris M, T. & Zuhair M, M., 2016. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Global Journal of Health Science*, 8(3), pp. 72-79.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L. & Dewaard, J. R., 2003. Biological identifications DNA Barcodes.. *The Royal Society*, Volumen 270, pp. 313-321.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. & Griffi, R., 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA. *Biotechnology*, Volumen 10, pp. 413-417.
- Iñiguez, C. & Acedo, E., 2006. Mecanismos de adhesión al tracto intestinal y antagonismo de Bifidobacterium. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 7(2).
- Iosif, C., Nikolaou, C., Georgiou, B. & Dimitriou, E., 2008. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 14(42), pp. 6453-6457.
- Jack Wands, M., 2017. Hepatocellular Carcinoma and Sex. *The New England Journal of Medicine*, 357(19), pp. 1974-1976.
- Kaufmann, P., Pfefferkorn, A., Teuber, M. & Meile, L., 1997. Identification and Quantification of Bifidobacterium Species Isolated from Food with Genus-Specific 16S rRNA-Targeted Probes by Colony Hybridization and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4), pp. 1268-1273.
- Leu, R. K. L. y otros, 2010. Synbiotic intervention of Bifidobacterium lactis and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. *Carcinogenesis*, 31(2), pp. 246-251.
- Liu, Q. y otros, 2019. Alteration in gut microbiota associated with hepatitis B and non-hepatitis virus related hepatocellular carcinoma. *Gut Pathogens*, 11(1), pp. 1-13.
- Martínez, R. R., 2011. Empleo de la técnica hibridación in situ fluorescente para visualizar microorganismos. *Universidad Industrial de Santander Salud*, 43(3), pp. 307-316.
- Mirela, H. & Andreu, F., 2013. Evidencia existente sobre la influencia de la ingesta de prebióticos sobre el riesgo de cáncer colorrectal. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 17(1), pp. 27-33.
- Muriel, P., 2017. *Liver Pathophysiology*. Primera ed. Mexico City: Academic Press.
- Musumeci, G., 2014. Past, present and future: overview on histology and histopathology. *Journal of Histology and Histopathology*, 1(5), pp. 1-5.
- Natalia, B., 2007. Probióticos y prebióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterología Hepatología*, 30(7), pp. 419-425.
- Ogawa, K., 2009. Molecular pathology of early stage chemically induced hepatocarcinogenesis.. *Pathology International*, 59(9), pp. 605-622.
- Ortiz-Ortiz, K. & Ortiz, A. P., 2012. El cáncer de Hígado en Puerto Rico. *Boletín del Registro del Cáncer*, 5(1), pp. 1-21.
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J. & Olsen, G. J., 1986. The Analysis Of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences.. *Advances in Microbial Ecology*, Volumen 9, pp. 1-55.
- Pacheco-Perez, R. y otros, 2018. El tratamiento multidisciplinario del hepatocarcinoma y el cáncer renal metastático. Conclusiones de la primera reunión interinstitucional IMSS-ISSSTE. *Revista Especialidades Médicas Quirúrgicas*, Volumen 23, pp. 139-144.

- Rodicio, M. d. R. & Mendoza, M. d. C., 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22(4), pp. 238-245.
- Romero, G., 2016. Influencia de la microbiota intestinal en la enfermedad hepática crónica. Su rol en el hepatocarcinoma. *Gen*, 70(2).
- Sánchez, K. L., Aguilar, N. H. & Moleón, V. R., 2016. Hibridación in situ Fluorescente: Herramienta en el diagnóstico de las he,opatías malignas. *Revista cubana de Hematología, Inmunol y Hemoter*, 32(1), pp. 99-109.
- Sanz, Y., Collado, M. & Dalmau, J., 2006. Contribución de la microbiota intestinal y del género «Bifidobacterium» a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales. *Acta Pediatr Esp.*, Volumen 64, pp. 74-78.
- Schiffer, E., Housset, C. & Cacheux, W., 2005. Gefitinib, an EGFR Inhibitor, Prevents Hepatocellular Carcinoma Development in the Rat Liver With Cirrhosis. *Hepatology*, 41(2), pp. 307-314.
- Schultz, M., Schölmerich, J. & Rath, H., 2003. Rationale for Probiotic and Antibiotic Treatment Strategies in Inflammatory Bowel Diseases. *Digestive Diseases*, Volumen 21, pp. 105-128.
- Schwabe, R. F., 2015. Cáncer de colon y de hígado: La microbiota intestinal ofrece alternativas para su futuro diagnóstico y tratamiento. *GUT Microbiota for health*, Hoja informativa(3), pp. 1-4.
- Simancas-Escorcia, Leal-Betancur, Díaz-Caballero & Orozco-Páez, 2021. Comparación de métodos histoquímicos para el análisis histológico de muestras de encía humana. *Revista Cubana Estomatología*, 58(4).
- Soriano, G., Sánchez, E. & Guaner, C., 2013. Probióticos en las enfermedades hepáticas. *Nutrición hospitalaria*, 28(3), pp. 558-563.
- Tamay de Dios L, I. C. & C. V., 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real.. *Investigación en Discapacidad*, 2(2), pp. 70-78.
- Tovar, V., Villanueva, A. & Llovet, J. M., 2007. Biología celular y genética en el cáncer de hígado.. *Gastroenterología Hepatología*, 30(6), pp. 360-369.
- Upadhy, S. C. & Ravindranath, V., 2000. Cytochrome P4502E (CYP2E) in Brain: Constitutive Expression, Induction by Ethanol and Localization by fluorescence in Situ Hybridization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volumen 373, pp. 23-24.
- Valenzuela-Gonzales, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E. & Vargas-Albores, F., 2015. The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41(4), pp. 297-313.
- Vazquez, Z., Mayans, R. & Monjaraz, T., 2017. Importancia de la microbiota gastrointestinal en pediatría. *Acta Pediatr Mex.*, 38(1), pp. 49-62.
- Verbeke P, S., Gotteland R, M., Fernández G, M. & Brunser T, O., 2001. Role of the connective tissue in the morphology and fuction of intestinal mucosa. Its participation in the pathogenesis of celiac disease.. *Revista médica de Chile*,, 129(11), p. 1333.
- Verna, L. & Williams, G., 1996. N-Nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: Bioactivation, DNA-Adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacology and Therapeutics*, Volumen 71, pp. 57-81.

Vinueza-Burgos, C., 2009. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *Revista Electronica de Veterinaria*, 10(2), pp. 1-13.

You, H. J., Oh, D.-K. & Ji, G. E., 2004. Anticancerogenic effect of a novel chiroinonitol-containing polysaccharide from Bifidobacterium Bifidum BGN4. *FEMS Microbiology Letters*, 240(2), pp. 131-136.