



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO DEL ÁCIDO BUTÍRICO SOBRE LA
PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN, MORFOLOGÍA Y
PRODUCCIÓN DE INTERLEUCINAS EN CÉLULAS
MCF-7.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

ELISA MUNGUÍA CASTRO

TUTORA: Dra. PATRICIA GONZÁLEZ ALVA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Al laboratorio de Ingeniería de Tejidos de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México, así como al programa PAPIP (número de programa: IA201214) por el apoyo en la realización del presente trabajo.

Al laboratorio de Inmunología de Mucosas de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, en especial a la Dra. Ana Lilia García Hernández por el apoyo en la adquisición de imágenes y análisis estadístico en los ensayos de migración y proliferación celular.

A mis padres, porque se esforzaron más que yo para llevar a término este proyecto; su apoyo incondicional expresado en diversas formas estuvo presente en todo momento y me alentó e impulsó a dar mi mayor esfuerzo durante toda mi trayectoria escolar, gracias por demostrarme y recordarme día con día que la constancia y la dedicación deben ser cualidades indispensables en mi vida personal y laboral.

A mis hermanos, por que estuvieron para mí en todo momento, siempre dispuestos a colaborar, escuchar y opinar. Les agradezco todo el tiempo que invirtieron en mí o en mis intereses, les aseguro que valió la pena y que el apoyo será recíproco.

A mis amigos, por acompañarme a lo largo de estos años, por permitirme conocer y convivir con excelentes seres humanos como ustedes, por todas las experiencias que compartieron conmigo y que amenizaron nuestro desarrollo académico y personal.

A mis profesores, por contribuir a mi formación profesional mediante su conocimiento, opiniones y experiencias. Agradezco de manera especial a la Dra. Santa Rita Arroyo Cruz por la confianza mostrada, por alentarme y ayudarme en la realización de este trabajo, mi más sincera gratitud y admiración.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de formarme académicamente en tan prestigiosa institución.

ÍNDICE

Resumen	
Introducción	
Marco teórico	1
1.1 Ácido butírico	1
1.1.1 Definición y generalidades.....	1
1.1.1 Efectos del ácido butírico en células intestinales	4
1.1.2 Efectos del ácido butírico en la cavidad oral.....	5
1.1.4 Efectos del ácido butírico en distintas líneas celulares	8
1.2 Migración e invasión celular.....	9
1.2.1 Definición	9
1.2.2 Modelos migratorios	10
1.2.3 Importancia de la migración / invasión en el cáncer.....	12
Planteamiento del problema.....	13
Justificación	13
Hipótesis	14
Objetivo General	14
Objetivos específicos	14
Material y métodos.....	15
2.1 Materiales	15
2.1.1 Reactivos de cultivo celular	15
2.1.2 Reactivos para el ensayo de migración celular	15
2.1.3 Reactivos para el ensayo de viabilidad celular.....	15
2.1.4 Reactivos de ensayo ELISA	15
2.2 Métodos	16
2.2.1 Cultivo celular	16
2.2.2 Ensayo de migración celular (ensayo de raspado).....	17
2.2.3 Tinción de hematoxilina en células de cultivo	17
2.2.4 Ensayo de viabilidad / proliferación celular utilizando alamarBlue®	18
2.2.5 Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).....	18
2.2.6 Análisis estadístico	19
Resultados	20
3.1 El ácido butírico inhibe la capacidad migratoria de las células MCF-7	20
3.2 El ácido butírico influye en la morfología de la línea celular MCF-7	24

3.3 El ácido butírico afecta la viabilidad celular de la línea MCF-7	27
3.4 El ácido butírico afecta la expresión de IL-6 y TNF- α en la línea MCF-7..	30
Discusión	36
Conclusiones	43
Anexos	45
1. Glosario	45
2. Tablas (datos crudos)	48
Referencias bibliográficas	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ensayo de migración celular en la línea MCF-7	23
Tabla 2. Ensayo de viabilidad celular línea MCF-7 / AB 1:1000	27
Tabla 3. Ensayo de viabilidad celular línea MCF-7 / AB 1:5000	28
Tabla 4. Ensayo de viabilidad celular línea MCF-7 / AB 1:10000	28
Tabla 5. Ensayo de viabilidad celular línea MCF-7 / AB 1:20000	29
Tabla 6. Viabilidad celular (promedio %)	30

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Representación gráfica de la paradoja del butirato.....	3
<i>Figura 2.</i> Múltiples efectos locales del ácido butírico en el intestino.	4
<i>Figura 3.</i> Migración de un hepatocito.	10
<i>Figura 4.</i> Microfotografías realizadas durante el ensayo de migración en la línea celular MCF-7.....	21
<i>Figura 5.</i> Microfotografías del ensayo de migración celular realizado en células MCF-7 estimuladas con AB analizadas con el programa ImageJ.....	22
<i>Figura 6.</i> Representación gráfica de la distancia promedio de la zona acelular de cada uno de los tratamientos de AB contra el control a las 48 h.	23
<i>Figura 7.</i> Ensayo de migración de la línea celular MCF-7 sin tratamiento de ácido butírico.....	24

<i>Figura 8.</i> Ensayo de migración celular de la línea celular MCF-7 estimuladas con ácido butírico en concentración 1:1000.	25
<i>Figura 9.</i> Ensayo de migración celular de la línea celular MCF-7 estimulada con ácido butírico en concentración 1:5000.	26
<i>Figura 10.</i> Ensayo de migración celular de la línea celular MCF-7 estimulada con ácido butírico en concentración 1:10000	26
<i>Figura 11.</i> Representación gráfica del comportamiento de la viabilidad celular respecto a las horas del ensayo realizado a la línea celular MCF-7.	30
<i>Figura 12.</i> Nivel de la expresión de la IL-6 (ng/mL) a las 24 y 48 horas de estímulo con ácido butírico en la línea MCF-7.	32
<i>Figura 13.</i> Representación gráfica de las concentraciones de IL-6 obtenidas con las muestras de cultivo celular a 24 y 48 horas de incubación de la línea celular MCF-7.	33
<i>Figura 14.</i> Nivel de la expresión de TNF- α (pg/mL) a las 24 y 48 horas de estímulo con ácido butírico en la línea MCF-7.	35
<i>Figura 15.</i> Representación gráfica de las concentraciones de TNF- α obtenidas con las muestras de cultivo celular a 24 y 48 horas de incubación de la línea celular MCF-7.	35

Resumen

La elevada incidencia de enfermedades crónico-degenerativas, como el cáncer, alcanzada recientemente en nuestro país nos obliga a estudiar nuevas líneas de investigación que estén encaminadas a prevenir, detectar y tratar estas enfermedades.

Actualmente se analizan agentes que inhiben la desacetilación de las proteínas histonas y las no histonas como principales objetivos de las terapias epigenéticas dirigidas al tratamiento del cáncer; el ácido butírico es capaz de llevar a cabo esta reacción química, por lo tanto, es necesario estudiar sus efectos en distintas células.

El ácido butírico pertenece a la familia de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y contribuye de manera importante en los procesos de salud y homeostásis del sistema digestivo, sin embargo, sus efectos son diferentes en otros tejidos.

En la cavidad oral el ácido butírico está presente en el fluido crevicular de bolsas periodontales de pacientes que cursan con periodontitis crónica, estos niveles de ácido butírico, producido por bacterias periodontopatógenas, se relacionan con la severidad de esta enfermedad.

Con el propósito de analizar los efectos del ácido butírico sobre el adenocarcinoma de mama, la línea celular MCF-7 fue estimulada con dicho ácido y se estudiaron los efectos de éste sobre la morfología, migración, expresión de moléculas relacionadas con la inflamación (IL-6 y TNF- α) y proliferación de dicha línea celular.

Por medio del ensayo de migración celular se observó que la adición de diferentes concentraciones de ácido butírico en la línea celular MCF-7 inhibe las características migratorias de esta línea celular.

Además, el ensayo de AlamarBlue® demostró que al estimular las células MCF-7 con ácido butírico durante cortos periodos de tiempo, es decir ≤ 5 horas, la

tasa de proliferación en dicha línea celular se incrementó; contrariamente, el estímulo sostenido por más de 5 horas disminuía considerablemente la tasa de proliferación de las células MCF-7.

Mediante un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) se observó que el ácido butírico inhibe la expresión de IL-6 y TNF- α en las células MCF-7, en comparación con la expresión de estas citocinas producidas por las células estimuladas con el lipopolisacárido bacteriano de *E. coli*. Lo anterior sugiere que el ácido butírico tiene la capacidad de alterar las moléculas relacionadas con la inflamación en células de carcinoma de mama.

Una investigación exhaustiva, la creación de nuevos diseños experimentales y estudios adicionales son requeridos para establecer la posible utilidad del ácido butírico como un agente terapéutico para terapia oncológica.

Summary

In Mexico, the incidence of degenerative and chronic diseases, such as cancer, has been increasing in the last decades. Therefore, it is critical to establish a sustainable research aim to prevent, detect and treat these diseases.

Nowadays, the histone deacetylase inhibitors have emerged as new group of therapeutic agents for cancer treatment, and this therapy is known as an epigenetic therapy. Among these agents, butyric acid is capable to inhibit the removal of acetyl groups from lysine residues from histone and non-histone proteins.

Butyric acid is an acid of short fatty chain that contributes different normal and pathological process in the digestive tract; however, their effects over other types of tissues are different.

In the oral cavity, the butyric acid is present in the crevicular fluid and in the periodontal pockets of chronic periodontal patients, and it is a byproduct of periodontopathogenic bacteria.

In the present study, the effects of treatment with butyric acid, on MCF-7 human breast cancer cells were analyzed. Cell migration was inhibited by low concentrations of butyric acid (dilution 1:10,000 of 1M). Cell proliferation was also inhibited after low period of exposure (≥ 5 h), suggesting that activities of butyric acid increased over time. Our data also showed that expression of the inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α was also inhibited with butyric acid, and that the expression of IL6 and TNF- α was lower in cells treated with butyric acid, compare with cells treated with a lipopolysaccharide of *E. coli*. The data suggest that butyric acid could have an effect over inflammatory mediators in the MCF-7 cell line.

Due to its effectiveness as a dietary supplement, butyric acid should be considered for use in combination strategies with cancer treatment, especially in breast cancer; however, more studies are required to elucidate de properties of butyric acid in breast cancer and other types of cancer.

Introducción

En las últimas décadas México ha atravesado por una transición epidemiológica, la cual se relaciona con un aumento en la frecuencia de las enfermedades crónico-degenerativas, como la diabetes, la hipertensión y el cáncer; además de observarse un incremento en el número de muertes relacionadas con las mismas.

El cáncer, ocupa el tercer lugar como causa de muerte en nuestro país, por lo tanto, la mejora de los procesos de diagnóstico, el desarrollo de nuevos tratamientos, y métodos de seguimiento de la enfermedad es de suma importancia para salvar vidas y reducir los costos tanto sociales como económicos de dicha enfermedad.

En años recientes, la investigación no solo del cáncer, sino de muchas enfermedades, se ha centrado principalmente en la transcripción de genes, el control epigenético de la expresión génica, la genómica y la biología molecular.

La evolución de dicha investigación ha dado como consecuencia las llamadas terapias dirigidas, las cuales se diseñan con el objetivo de atacar las células tumorales sin dañar a las células sanas; y las terapias epigenéticas, las cuales se centran en la expresión de genes relacionados con el proceso tumoral.

Los inhibidores de la desacetilación pertenecen a una clase emergente de agentes terapéuticos utilizados para terapia epigenética, y actualmente existen resultados prometedores sobre el efecto de estos inhibidores; sin embargo, su utilidad no ha sido clarificada por completo, por lo que la exploración de la función de estos inhibidores representa una aportación importante en el estudio del cáncer.

El ácido butírico (AB), considerado como un inhibidor de la desacetilación en histonas y en proteínas no histonas, es un ácido graso de cadena corta producido por bacterias anaerobias ubicadas principalmente en el intestino y desempeña un papel importante en la homeostasis del sistema digestivo, sin embargo, se ha

reportado diversos efectos de este ácido graso en distintos tejidos y líneas celulares de cáncer.

Algunas bacterias periodontopatógenas son capaces de producir ácido butírico en el tejido gingival lo que puede repercutir en el comportamiento celular y el desarrollo de células de carcinoma; esta información se aborda de manera adecuada en la sección de marco teórico.

En el presente trabajo se estudió el efecto del ácido butírico, un inhibidor de la desacetilación, en la línea celular MCF-7 derivada de un carcinoma de mama, con la finalidad de ver el efecto de este ácido graso de cadena corta sobre la proliferación, migración, morfología y la expresión de interleucinas sobre dicha línea celular.

En el marco teórico se mencionan antecedentes y se describen las bases teóricas que sustentan el presente estudio, se abordan la descripción y metabolismo del ácido butírico y como el estudio de este agente podría significar un avance importante en la terapia contra el cáncer.

Posteriormente en la sección de materiales y métodos se mencionan y describen los materiales consumibles así como los procedimientos utilizados en la realización de los estudios in vitro de la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama diseñados para profundizar en el entendimiento del papel que desempeña el ácido butírico en las enfermedades sistémicas.

En la investigación se evaluaron las siguientes 3 características de la línea celular MCF-7 estimulada con diferentes concentraciones de ácido butírico: la migración celular, la viabilidad celular y la expresión de interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

Los resultados obtenidos muestran que la estimulación con ácido butírico de la línea celular MCF-7 inhibe la migración de las células de carcinoma.

En cuanto a la viabilidad celular, el ácido butírico mostró un efecto dual dependiente de la concentración del estímulo y el tiempo de exposición a él, es decir, concentraciones elevadas de ácido butírico en tiempos cortos estimulan la

viabilidad celular, sin embargo, en periodos largos de tiempo se observó una inhibición de la proliferación en la línea MCF-7.

Por último, se observó la expresión de moléculas relacionadas con la inflamación, específicamente, IL-6 y TNF- α . Los experimentos del presente estudio demostraron que la estimulación de la línea celular MCF-7 con ácido butírico, aumenta la expresión de IL-6 a tiempos largos, sin embargo, su expresión se encuentra por debajo de la estimulación generada por un lipopolisacárido de *E. coli* utilizado como control. Por otro lado, la expresión de TNF- α disminuye en las células MCF-7 al ser estimuladas con el ácido butírico, ambos efectos dependen del tiempo de exposición al estímulo.

Estos resultados sugieren que el ácido butírico producto del metabolismo anaerobio bacteriano puede modificar de manera importante el metabolismo y la movilidad de las células MCF-7 derivadas de adenocarcinoma de mama.

Marco teórico

El presente estudio hace necesario la revisión de conceptos relevantes para la realización del mismo como son la migración celular y el ácido butírico.

1.1 Ácido butírico

1.1.1 Definición y generalidades

Los metabolitos de la microbiota humana se encuentran íntimamente relacionados con el hospedero, especialmente en aquellos tejidos conformados por mucosas como el intestino y la nasofaringe [1].

Un metabolito que puede afectar a los procesos celulares son los ácidos grasos; estas moléculas son ácidos carboxílicos acíclicos y con cadenas alifáticas que se utilizan como criterio para su clasificación [2].

Por lo tanto, los ácidos grasos con cadena alifática constituida por menos de 6 carbonos son llamados ácidos grasos de cadena corta (AGCC), mientras que los ácidos grasos de cadena media y larga están conformados por una cadena alifática de 6 a 12 carbonos y más de 12 carbonos respectivamente [2].

Los AGCC incluyen ácido fórmico, ácido valérico, ácido caprónico y ácido butírico [1-3]; y cada uno de ellos puede tener efectos locales en el lugar de producción, así como sistémicos a través de la circulación sanguínea [1].

El ácido butírico es un AGCC de cuatro carbonos, que se encuentra en los aceites vegetales y las grasas animales, sin embargo, en los seres humanos se producen por múltiples bacterias anaerobias que se encuentran en el intestino y la cavidad oral [2].

En el colon humano, la mayoría de las bacterias productoras de butirato son anaerobias y pertenecen al género *Clostridium* grupos IV y XIVa [4], numéricamente, dos de los grupos más importantes parecen ser *Faecalibacterium prausnitzii* (*Clostridium* IV) y *Eubacterium rectale* (*Clostridium* XIVa) [5].

Estas bacterias productoras de AB utilizan polisacáridos fermentables (fibras dietéticas o almidón resistente) para producir niveles elevados de este metabolito en el colon humano [3, 4].

El mecanismo de producción que utilizan estas bacterias es un metabolismo fermentativo, es decir, obtienen energía en forma de ATP a través de la fosforilación a nivel sustrato mediante la degradación de un sustrato oxidativo. Las moléculas reducidas resultantes (NADH), son transferidos a intermediarios metabólicos lo que lleva a la formación de grandes cantidades de productos finales reducidos como el butirato [5, 6].

Después de haber sido producido en la luz del colón (20mM), el AB y en general los AGCC, son transportados a través del epitelio por distintos mecanismos como difusión, atravesando directamente la barrera epitelial, transporte de baja afinidad controlado por intercambiadores de AGCC/ HCO₃ [4], o bien, utilizando transporte activo mediado por dos receptores principales: el transportador de monocarboxilato 1 (MCT-1) y el transportador de monocarboxilato 1 acoplado a sodio (SMCT-1) [3, 4, 6].

Una vez transportados al epitelio, el butirato, representa el sustrato de energía preferido para las células del colon. Los colonocitos exhiben una gran capacidad para metabolizar el AB oxidándolo completamente en CO₂ o utilizándolo como precursor de cuerpos cetónicos o lípidos, por lo tanto, cantidades insignificantes de butirato (4-10mM) están presentes en la sangre periférica: 30mM en la vena porta y 12mM en la vena hepática aproximadamente [4, 6].

Estos datos sugieren que el AB puede ser absorbido desde el intestino y totalmente metabolizado en el colon o en el hígado, lo que hace improbable un efecto directo del butirato a través de la circulación sanguínea [6].

Como se mencionó anteriormente, otro sitio de producción de AGCC es la cavidad oral donde han sido específicamente detectados en el fluido crevicular presente en las bolsas periodontales [2, 7, 8].

El metabolismo de bacterias periodontopáticas, como las *Porphyromonas*, *Prevotella* y el *Fusobacterium spp.*, se caracteriza por la producción de AGCC, por ejemplo, ácido acético, ácido propionico y ácido butírico como principal subproducto de su metabolismo anaerobio [8-10]. Sin embargo, la producción de AB en la cavidad oral se atribuye principalmente a *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* [2].

Los efectos del AB en los tejidos donde se produce este metabolito bacteriano pueden ser tanto beneficiosos como perjudiciales, lo que se conoce como la paradoja del butirato; dichos efectos contrastantes se relacionan con la ubicación del tejido (cavidad oral o intestino) y la concentración (alta o baja) de AB [2].

Esta idea se explica con las características propias de cada uno de los tejidos, es decir, el AB entrara en mayor cantidad en el tejido oral que en el tejido intestinal debido a que la capa de mucina de la cavidad oral es más delgada en comparación a la mucosa intestinal (figura 1) y el AB tendrá mayor retención en los tejidos gingivales debido a la baja permeabilidad de las células escamosas que constituyen el epitelio oral, en contraste con la alta permeabilidad del epitelio cilíndrico del intestino [2].

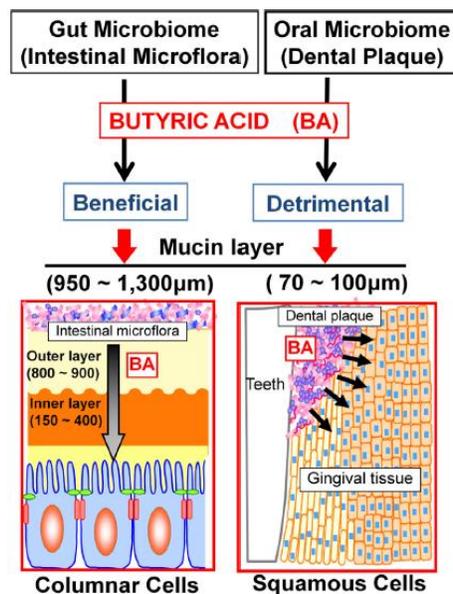


Figura 1. Representación gráfica de la paradoja del butirato.

Se observa la diferencia en el grosor de la capa de mucina en ambos tejidos, la constitución celular de cada uno de ellos y cómo estas características afectan la concentración de AB y el tiempo en que este metabolito bacteriano se encuentre en contacto con las células de cada tejido. Este fenómeno puede explicar los distintos efectos del AB presentados en la cavidad oral y en el intestino.

Fuente: Tomado [2].

De esta manera, el AB tiene funciones y efectos variados tanto en el tejido oral como en el tejido intestinal.

1.1.2 Efectos del ácido butírico en células intestinales

En el intestino delgado, el AB aumenta la proliferación, diferenciación, maduración y reduce la apoptosis de los enterocitos normales, mediante su influencia en la expresión génica y la síntesis proteica [6].

Mientras que el butirato es un promotor clave de la salud y la integridad del colon, este sustrato metabólico proporciona entre un 60 y 70% de energía necesaria para la proliferación y diferenciación de colonocitos [3].

Además, el AB participa en el mecanismo de defensa de las células epiteliales del colon mediante la producción de mucina (MUC), la mejoría de la permeabilidad intestinal y la modulación de citoquinas inflamatorias, promoviendo una barrera epitelial eficaz [3, 6].

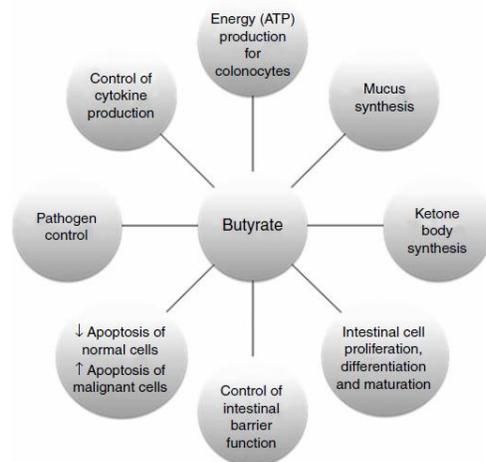


Figura 2. Múltiples efectos locales del ácido butírico en el intestino.

Fuente: Tomada [6].

La comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos protectores del AB en el colon ha sido difícil debido a que interactúan con múltiples moléculas de señalización expresadas por el epitelio del colon [4].

Sin embargo, podemos mencionar que las células pueden ser afectadas por el AB en tres formas diferentes: uniéndose a receptores celulares que regulan la proliferación y diferenciación celular, entrar en las células por medio de

transportadores específicos e implicar directamente en el metabolismo celular; o bien, puede inhibir la actividad de las enzimas que desacetilan las histonas (HDAC) en los núcleos celulares [1].

Los inhibidores de la desacetilación pertenecen a una clase emergente de agentes terapéuticos utilizados en la llamada terapia epigenética. Actualmente existen resultados prometedores sobre el efecto de estos inhibidores sobre la leucemia, sin embargo, su utilidad no ha sido clarificada por completo. Por lo anterior, la exploración de función de estos inhibidores representa una aportación importante en el estudio del cáncer.

Como hemos revisado, el AB en células normales del tracto digestivo actúa como un factor de supervivencia; sin embargo, es un inductor de la apoptosis en células de carcinoma de colon humano [6].

La apoptosis es un importante proceso regulador contra el cáncer, pero varios mecanismos pueden llevar a la células a un estado proapoptótico [6]; por ejemplo, la expresión del transportador de butirato SMCT-1 en células de cáncer de colon es esencial para la función antitumoral del AB [3].

En la línea celular de cáncer de colon humano RKO, el butirato indujo la apoptosis a través de un mecanismo que implicaba la quinasas c-Jun N-terminal (JNK) y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) [6].

También se ha reportado que la activación del ácido hidroxicarboxílico 2 o receptor de ácido graso libre (GPR109A) inducida por el AB puede inhibir directamente el crecimiento del cáncer de colon mediante la inducción de apoptosis [3].

1.1.3 Efectos del ácido butírico en la cavidad oral

Los efectos del AB en el epitelio oral son distintos a los ya descritos anteriormente.

Los AGCC contribuyen de manera importante en las interacciones ecológicas y biológicas de la microbiota oral. Específicamente, la acumulación de AB en el

tejido gingival se ha correlacionado con la iniciación y establecimiento de la enfermedad periodontal [2].

Podemos definir a la periodontitis como una infección que provoca la destrucción de los tejidos periodontales como resultado de la interacción entre las bacterias anaerobias y la respuesta específica de los mecanismos inmunológicos del huésped [10].

La periodontitis crónica es una enfermedad de progresión generalmente lenta que induce una inflamación de los tejidos periodontales a través de mediadores inflamatorios como prostaglandina E2, el tromboxano B2, las interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-17), el factor de necrosis tumoral (TNF) y las colagenasas [11].

Estos mediadores inflamatorios, así como las citoquinas involucradas y las toxinas bacterianas presentes en la periodontitis crónica han demostrado tener un potencial de transformación maligno in vitro [11].

De igual manera, se ha descrito que la estimulación continua de la proliferación celular mediada por moléculas involucradas en la inflamación crónica puede ser responsable de la presencia de carcinoma de células escamosas poco diferenciado, y por lo tanto se ha tratado de establecer que la periodontitis crónica, y el posible papel que desempeña el AB en esta enfermedad, representa un perfil clínico de alto riesgo para el cáncer oral [12].

Como mencionamos anteriormente, los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el ácido acético, ácido propionico, y el ácido butírico (AB) son los principales productos metabólicos de las bacterias periodontopatógenas gram-negativas [8-10].

El AB ha sido detectado en el fluido crevicular de las bolsas periodontales [7, 8]. La concentración media de AB recolectado en sitios con periodontitis severa es de 2.6 mM, en contraste con los 0.2 mM en los sitios con periodontitis leve e indetectable en los sitios sanos [7].

Debido a estos datos, las elevadas cantidades de este producto bacteriano se han relacionado con el grado de destrucción periodontal, lo que impacta de manera directa en la severidad de la periodontitis crónica [8-10].

Además, se ha demostrado que concentraciones elevadas de AB suprimen la diferenciación osteoblástica, y alteran la formación de nódulos de mineralización en la línea celular de osteoblastos de ratón ROS17/2.8 [8].

El AB también posee efectos negativos en la reparación y regeneración de los tejidos periodontales al inducir el arresto del ciclo celular en diferentes fases de este proceso, promoviendo de esta manera la inhibición del crecimiento de fibroblastos gingivales humanos [7].

Sin embargo, se ha descrito que las células epiteliales y los fibroblastos gingivales humanos sanos son resistentes a la inducción de apoptosis producida por la estimulación de ácido butírico, mientras que los fibroblastos gingivales humanos inflamados, presentes en pacientes adultos con enfermedad periodontal, son altamente susceptibles a la apoptosis inducida por el AB [10].

En estudios in vitro, la estimulación con AB de células del sistema inmunitario como, monocitos y macrófagos, aumenta significativamente la fragmentación del DNA celular y disminuye la viabilidad celular de manera dosis dependiente. Esta acción puede comprometer el sistema inmune innato de los tejidos periodontales [10].

Los efectos del AB no se limitan al establecimiento de la periodontitis crónica, sino que también se encuentran relacionados con la generación y progresión del cáncer oral de células escamosas (COCE).

Siguiendo esta línea de investigación, se ha reportado el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) en cultivos de fibroblastos gingivales humanos estimulados con ácido butírico, lo cual puede inducir alteraciones genéticas y epigenéticas que contribuyan al proceso de carcinogénesis [7].

La estimulación de las líneas celulares de COCE con AB, mostró un ligero aumento en la expresión de la deaminasa de citosina inducida por activación

(AID). Esta enzima participa de manera activa en la producción de anticuerpos específicos por parte de las células B. También se ha reportado que la expresión de AID, induce mutaciones del gen p53 en células de cáncer; por lo tanto, dichos resultados sugieren que el ácido butírico, puede actuar como un factor de desarrollo del cáncer oral a través de la inducción en la expresión de AID [13].

Por el contrario, múltiples estudios han demostrado que el AB induce el arresto del ciclo celular y la apoptosis de las células de cáncer oral en una forma dependiente de la dosis y el tiempo [14].

1.1.4 Efectos del ácido butírico en distintas líneas celulares

Resultados diferentes, que soportan la paradoja del ácido butírico, también se han reportado en distintos tejidos y líneas celulares.

Experimentos realizados en ratones han demostrado que altas concentraciones de AB en sangre periférica aumentan el estrés oxidativo mitocondrial de manera gradual después de 60 y 180 minutos de ser inyectado, así como la actividad catalítica de las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa [15].

El butirato de sodio, el cual es la sal del ácido butírico, ha demostrado suprimir la proliferación celular e inducir el bloqueo del ciclo celular en las fases G1/S y G2/M in vitro en varias células como células de cáncer de colon, neuroblastoma, leucemia y mieloma. También puede inducir la apoptosis in vitro de algunas células de cáncer de mama y cáncer de colon [16].

El tratamiento in vitro de células de hepatoma humano con AB, aumento la expresión de genes inhibidores del ciclo celular y pareció remitir el fenotipo maligno a través de la inhibición de la HDAC [3].

Bailón y colaboradores evaluaron los efectos del butirato en la proliferación y estados de activación de diferentes líneas celulares involucradas en la enfermedad inflamatoria intestinal: células epiteliales intestinales, macrófagos y linfocitos T. Las concentraciones bajas de butirato inhibieron la proliferación de todas las células inmunitarias, mientras que indujo la apoptosis sólo en linfocitos T activados, células epiteliales no diferenciadas y macrófagos [6].

El butirato también puede inhibir la producción de IL-2 y la proliferación de linfocitos en cultivo [3]. Además, un estudio reciente demostró que este compuesto fue capaz de inhibir el crecimiento celular y la migración e invasión de la línea celular HT1080 de fibrosarcoma [6].

Otro efecto interesante del AB y de otros AGCC como el acetato es que poseen propiedades bacteriostáticas y/o bactericidas dependiendo del estado fisiológico de las bacterias y de las características físico-químicas del ambiente externo [3, 6].

El AB, en concentraciones micromolares es capaz de ejercer efectos bactericidas y/o bacteriostáticos sobre algunos microorganismos orales además de modular la formación del biofilm [3, 9].

Sin embargo, no todas las interacciones microbianas del AB son beneficiosas, debido a que se ha reportado que el butirato es capaz de reactivar infecciones virales latentes [1, 9].

1.2 Migración e invasión celular

1.2.1 Definición

La gran mayoría de células eucariotas, bajo las condiciones apropiadas de su medio ambiente celular, son capaces de realizar algún tipo de movimiento, y gracias a esta acción, cumplen funciones importantes de la fisiología normal humana [17].

Los procesos fisiológicos que involucran la migración e invasión celular incluyen la morfogénesis embrionaria, desarrollo del sistema nervioso, así como la cicatrización de heridas; también hay situaciones patológicas, como la tumorigénesis, proceso en el que el movimiento celular desregulado es altamente significativo [17-19].

La migración celular se define como el movimiento dirigido de las células sobre un sustrato como la membrana basal, fibras de la matriz extracelular (ME) o bien placas de plástico. Mientras tanto, el proceso de invasión implica el movimiento celular con reestructuración del entorno, por lo general, este tipo de movimiento

involucra la degradación de la ME por medio de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) [18].

El movimiento celular se basa en el establecimiento de fuerzas físicas de protrusión que conducen a la producción de extensiones de la membrana citoplasmática celular y las fuerzas de tracción que permiten que la célula se contraiga y se deslice hacia delante. Estas deformaciones del cuerpo celular se producen a través del citoesqueleto de actina-miosina [17].

Gracias a estos cambios morfológicos, las células muestran polaridad direccional, con un borde de ataque en la parte delantera y un borde de retracción en la parte posterior del cuerpo de la célula [18].

Está bien establecido que las señales químicas y mecánicas pueden inducir la migración celular [17, 19], sin embargo, la polaridad celular, definida como el resultado de la especialización funcional y estructural de regiones distintas de la célula, es un requisito indispensable para todos los tipos de locomoción celular [17].

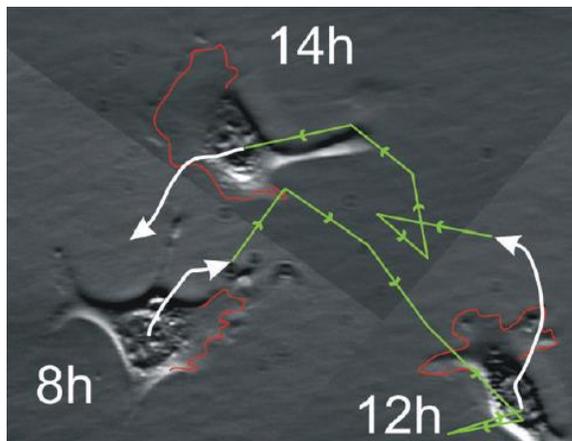


Figura 3. Migración de un hepatocito.

Desplazamiento de un hepatocito cultivado en una placa durante 24 horas. Se observa la posición de la célula en un periodo de tiempo de 8, 12 y 14 horas. La línea roja indica la polaridad de la célula y las líneas verdes indican la trayectoria seguida por la misma.

Fuente: modificada de [17].

1.2.2 Modelos migratorios

Los dos tipos principales de movimiento son la migración celular colectiva y el movimiento celular individual, subdividido en movimiento ameboides y mesenquimal [18].

La migración ameboide se caracteriza por células de cuerpo elipsoidal que se adhieren de manera débil al sustrato y utilizan la presión hidrostática creada por la acumulación de vesículas de propulsión en el borde delantero de la célula para lograr la locomoción celular [17, 18].

El movimiento ameboide permite que las células viajen a través de diferentes entornos de tejido, independientemente de la composición química de la matriz extracelular (MEC) [17], por tal motivo, este tipo de migración se observa en leucocitos, células madre hematopoyéticas y algunas células tumorales in vivo e in vitro [17, 18].

Por otro lado, la migración celular de tipo mesenquimal implica una fuerte adhesión celular a la MEC, contractilidad del citoesqueleto y cuerpos celulares alargados en forma de uso, además de extensiones citoplasmáticas [17, 18].

Estas protuberancias planas, llamadas lamellipodia, se estabilizan mediante la creación de nuevos puntos de contacto (adhesiones focales) con el sustrato, lo que favorece el mantenimiento de la polaridad celular y permite el avance de la célula [17].

Es bien reconocido que en varios procesos biológicos, por ejemplo, la gastrulación, cicatrización de heridas y la metástasis del cáncer, las células migran colectivamente o en grupos, preservando uniones célula-célula funcionales [18, 19].

El movimiento celular colectivo incluye uniones adherentes formadas por interacciones homotípicas de cadherinas entre las células adyacentes, lo que permite un proceso continuo de comunicación entre las células por medio de su citoesqueleto [17].

En la migración colectiva, se ha observado que algunas células podrían comportarse como células “líder”, siendo capaz de arrastrar “seguidores” en la dirección apropiada [19].

Por lo tanto, los requisitos necesarios para la motilidad celular colectiva se pueden resumir en: la disponibilidad de espacio, la capacidad para estabilizar las

protuberancias de la membrana citoplasmática para generar las fuerzas físicas y la comunicación intercelular necesaria para asegurar la coordinación espacial de las fuerzas generadas [17].

1.2.3 Importancia de la migración / invasión en el cáncer

La progresión del cáncer se manifiesta por medio de la metástasis lo que implica una serie de procesos que originan el movimiento celular [18].

La migración de células de cáncer, puede cambiar entre diferentes comportamientos móviles para adaptar su morfología a la topografía y a las limitaciones de su microambiente, siendo las formas más estudiadas la transición epitelio-mesenquimal (TEM), mientras que el movimiento celular colectivo en el modo mesenquimal es menos entendido [17, 20].

La TEM es un evento biológico en el que las células epiteliales pierden sus características fenotípicas propias y adquieren propiedades de células mesenquimales [21-23].

En el curso de este proceso, las uniones intercelulares mediadas por cadherinas presentes en las células epiteliales, se rompen, lo que conduce a la pérdida de la polaridad apical-basolateral y a la adquisición de un fenotipo migratorio carente de polarización celular con alta movilidad [17, 21].

La capacidad de las células tumorales de invadir tejidos locales, ganglios linfáticos regionales y provocar metástasis a órganos distantes, esta pues influenciada por la TEM [22].

Los factores moleculares y los sistemas de señalización que intervienen en la TEM, son diversos y complejos, e incluyen la expresión de proteínas relacionadas con la reorganización del citoesqueleto y la producción de MMPs. Estas moléculas se utilizan como biomarcadores para demostrar que una célula ha cursado por este proceso [22].

Planteamiento del problema

El ácido butírico, un ácido graso de cadena corta producido por bacterias anaerobias localizadas principalmente en el intestino y en la cavidad oral, ha demostrado diversos efectos en sus tejidos de origen, sin embargo la relación que guarda con diferentes enfermedades sistémicas como el cáncer no es clara.

De esta manera, y con la finalidad de obtener más datos relacionados con este problema, se examinó la asociación entre el ácido butírico, y la producción de citocinas inflamatorias, características morfológicas y migratorias de las células de carcinoma de mama a fin de establecer si existe un cambio en dichas características.

Justificación

Las aportaciones teóricas que brindará esta investigación están enfocadas al análisis de la información existente sobre los efectos del ácido butírico, como inhibidor de la desacetilación, en el cáncer.

De igual manera, la recolección, síntesis y presentación de la información revisada aportará nuevas bases teóricas para elaborar y realizar modelos experimentales que permitan un mejor entendimiento de los diversos mecanismos utilizados por el ácido butírico para interactuar con células de adenocarcinoma de mama.

Además del marco conceptual, el presente trabajo tiene una aportación operacional, ya que los modelos de migración, viabilidad celular y cuantificación de expresión de interleucinas propuestos permitirán abordar la relación entre el ácido butírico y la morfología migratoria, proliferación celular y respuesta inflamatoria de las células de cáncer de mama.

Por otro lado, los resultados obtenidos con el presente trabajo pueden apoyar el desarrollo a largo plazo de nuevos fármacos que constituyan una terapia epigenética dirigida a atacar células tumorales de cáncer de mama, eliminando o atenuando de esta manera los efectos adversos de la quimioterapia convencional.

Hipótesis

La estimulación con ácido butírico en la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama deberá mostrar efectos sobre la viabilidad celular, expresión de interleucinas, migración y morfología celular.

Objetivo General

Investigar la influencia del ácido butírico en la proliferación, morfología, migración, y sobre la producción de IL-6 y TNF- α en la línea celular MCF-7 de carcinoma de mama.

Objetivos específicos

Revisar conceptos generales acerca de la migración celular, producción de interleucinas y la relación del ácido butírico con enfermedades sistémicas como el cáncer.

Realizar ensayos de migración in vitro en la línea celular de carcinoma de mama MCF-7 estimulada con ácido butírico para determinar si existe algún cambio en la motilidad celular.

Analizar por medio de un ensayo la viabilidad/proliferación en la línea celular MCF-7 estimulada con ácido butírico para determinar si existe alguna alteración en la actividad metabólica de estas células.

Examinar mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) la expresión de la citocina IL-6 y el TNF- α en la línea celular MCF-7 estimulada con diferentes concentraciones de ácido butírico.

Material y métodos

2.1 Materiales

2.1.1 Reactivos de cultivo celular

El material plástico así como el medio de cultivo RPMI 1640 utilizado para realizar el cultivo de las líneas celulares fue adquirido a la empresa Corning (Life Sciences, USA, New York). El suero fetal bovino (SFB) se adquirió a Gibco (Thermo Fisher scientific, US).

De igual manera, se utilizaron soluciones antibióticas de penicilina y estreptomycin de la marca Gibco (Thermo Fisher scientific, US, Carlsbad). Para la criopreservación celular se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) adquirido en Sigma-aldrich, así como una solución de tripsina al 0.025%.

2.1.2 Reactivos para el ensayo de migración celular

Para la realización del ensayo de migración celular se utilizó ácido butírico adquirido a la empresa Sigma-aldrich, una solución de formaldehído al 10%, buffer de fosfatos salinos (PBS); para realizar la tinción celular se utilizó hematoxilina de Harris y soluciones de alcohol a diferentes concentraciones.

2.1.3 Reactivos para el ensayo de viabilidad celular

En la realización de este ensayo de viabilidad celular se utilizó ácido butírico en distintas concentraciones adquirido a la empresa Sigma-aldrich, de igual manera, se empleó el colorante alamarBlue® (ThermoFisher DAL 1100), el cual es un indicador redox que permite medir la actividad metabólica y la alteración celular.

2.1.4 Reactivos de ensayo ELISA

Para la realización del ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas se emplearon los siguientes Kits: Human IL-6 Standard ABTS ELISA Development Kit (PeproTech, USA 900-K16) y Human TNF- α Standard ABTS ELISA Development Kit (PeproTech, USA 900-K25).

De acuerdo a las instrucciones del fabricante se utilizó como muestras los cultivos celulares después de 24 y 48 horas de incubación de la línea celular MCF-7 estimulados con diferentes concentraciones de AB (1:1000, 1:5000 y 1:10000) partiendo de una solución 1M. También se empleó PBS Tween como solución de lavado, buffer de bloqueo, buffer de dilución de anticuerpos, anticuerpo de captura, anticuerpo de detección, avidina peroxidasa, una solución de peróxido de hidrógeno al 3% y ácido 2,2 azino bis (3-etilbenzo tiazolin-6 sulfónico) (ABTS) adquirido a Sigma- Aldrich y lipopolisacáridos (LPS) de *E. coli* como grupo control positivo.

2.2 Métodos

2.2.1 Cultivo celular

Para los experimentos realizados con modelos celulares en el presente estudio se empleó la línea celular MCF7.

La línea celular MCF7 son células tumorales de adenocarcinoma de mama estrógeno dependientes procedentes de un derrame pleural de un paciente de sexo femenino de 69 años de edad con adenocarcinoma de mama metastásico [24]. Esta línea celular fue adquirida a través de American Type Culture Collection (ATCC) con el número de catálogo HTB-22, y fue mantenida en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina, suero fetal bovino (SFB) al 10% y un coctel antibiótico de penicilina y estreptomina al 1%.

Las células fueron mantenidas en un incubador New Brunswick (Galaxy 14s, Eppendorf Company) a un ambiente saturado de humedad con 95% de aire y 5% de CO₂ a 37°C de temperatura.

Para la realización de los experimentos, las células fueron separadas del sustrato mediante incubación con tripsina al 0.25%. Todas las centrifugaciones se realizaron a 5000 rpm durante 5 minutos.

2.2.2 Ensayo de migración celular (ensayo de raspado)

Mediante conteo celular en cámara de Neubauer, se sembraron 50,000 células/ml en placas de 46 pozos, manteniendo las mismas condiciones de incubación antes descritas.

En un periodo de tiempo de 24 horas previo a la realización del ensayo de migración celular, se procedió a retirar el medio de cultivo suplementado con 10% de SFB y en seguida se colocó medio RPMI 1640 con 1% de SFB, dejando de esta manera, las células en ayuno.

Transcurridas las 24 horas de ayuno, se reemplazó el medio de los cultivos celulares y se añadieron los siguientes tratamientos: concentraciones de AB al 1:1000, 1:5000 y 1:10,000, así como medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB carente de AB.

Posteriormente con una punta de micropipeta de 200 μ l, se realizó un raspado en la parte central de la monocapa celular de cada uno de los pozos de cultivo. Este procedimiento se realizó a intervalos de 2 y 3 horas durante 48 horas.

Transcurridas las 48 horas, las células fueron fijadas con formaldehído al 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente o bien, a 4°C durante toda la noche.

2.2.3 Tinción de hematoxilina en células de cultivo

Una vez fijadas las células del cultivo se aplicaron 2 lavados con alcohol a una concentración del 100% y en seguida un lavado con alcohol al 96% durante 2 minutos, posteriormente se tiñeron con hematoxilina durante 5 minutos y finalmente se utilizaron alcoholes seriados en sentido ascendente para aclarar la tinción.

Los resultados fueron observados en un microscopio invertido (Axi Vert. A1 Zeiss).

2.2.4 Ensayo de viabilidad / proliferación celular utilizando alamarBlue®

Las células MCF-7 se tripsinizaron a partir de los cultivos en aproximadamente 80% de confluencia.

Para la realización de este ensayo se sembraron 50,000 células/ ml en placas de 46 pozos, manteniendo las mismas condiciones de cultivo e incubación antes descritas.

Una vez transcurridas las primeras 24 horas de incubación, se procedió a remover el medio de cultivo suplementado con SFB y en seguida se colocó medio RPMI 1640 sin SFB, dejando de esta manera, las células en ayuno.

Posteriormente, 24 horas después, se añadieron los distintos tratamientos de ácido butírico, los cuales incluyen las siguientes concentraciones: 1:1,000, 1:5,000, 1:10,000 y 1:20,000., y también se adicionó la solución de alamarBlue® (50 µl/pozo); una vez terminado el lapso de tiempo de cultivo establecido para este ensayo (0, 1, 3, 5, 7, 24 y 48 horas) se procedió a realizar la medición de absorbancia de cada una de las muestras con métodos espectrofotométricos (ChroMate Awareness Technology Inc) a 570 nm.

Es importante tener en cuenta, que el alamarBlue® se incubo en las muestras durante 1-4 horas antes de realizar las lecturas de absorbancia.

Este ensayo se realizó 8 repeticiones por cada tratamiento de ácido butírico.

2.2.5 Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

En la elaboración del ensayo se utilizaron microplacas de plástico tratado de 96 pocillos, en cada pozo se colocaron 100µl de anticuerpo de captura 1:100, y se incubo a 20°C durante toda la noche.

Posteriormente se realizaron 3 lavados con una solución de PBS Tween seguido de la colocación de 300µl de buffer de bloqueo en cada pozo y se procedió a incubar durante 1 hora.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS Tween y se colocaron 100µl por pozo de las muestras de los diferentes cultivos celulares, así como 100µl de las soluciones estándar de los controles positivos. Una vez terminado este procedimiento, las placas se cubrieron en su totalidad y se incubaron durante toda la noche a 20°C.

Después de los 3 lavados correspondientes se colocaron 100µl de anticuerpo de detección y se incubó durante 2 horas, tras este periodo de tiempo y realizados los 3 lavados posteriores a este, se colocaron 100µl/ pozo de la solución de avidina y se incubó por 30 minutos.

Por último, y después de 3 lavados con PBS Tween, se adicionaron 100µl de la solución de ABTS en cada pozo, se monitoreo la reacción colorimétrica y se realizaron las lecturas en un espectrofotómetro para microplacas cada 5 minutos.

2.2.6 Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos de cada experimento fue evaluado estadísticamente a partir de la media estándar. Se aplicó un ANOVA de una cola, seguido de un test de Tukey para analizar las relaciones entre los diferentes grupos experimentales una $p \leq 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

Resultados

3.1 El ácido butírico inhibe la capacidad migratoria de las células MCF-7

Los resultados del estudio de migración realizado en la línea celular MCF-7, se obtuvieron a partir de microfotografías tomadas durante el ensayo (figura 4). Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ con la finalidad de obtener datos cuantitativos acerca de la distancia de la zona acelular, con respecto a dos variables: el tiempo y la concentración de ácido butírico empleado como estímulo (figura 5).

Las células MCF-7 sin estímulo de ácido butírico alcanzaron el cierre total del raspado después de 48 horas.

Por otro lado, las células MCF-7 estimuladas con las diferentes concentraciones de AB no alcanzaron el cierre total después de 48 horas de duración del ensayo; lo que se tradujo en espacios vacíos y visibles.

La inhibición de la migración fue mayor a menores concentraciones de AB (figura 6).

La máxima inhibición en el cierre de la herida se observó con la dilución de AB 1:10,000, debido a que después de 48 horas de ensayo la brecha aún era perfectamente visible (figura 5 y 6).

La tabla 1 muestra que a menor dilución el AB logra el menor porcentaje de inhibición de la migración en las células MCF-7, mientras que a mayor dilución se observa mayor efecto inhibitorio sobre la migración en las células MCF-7.

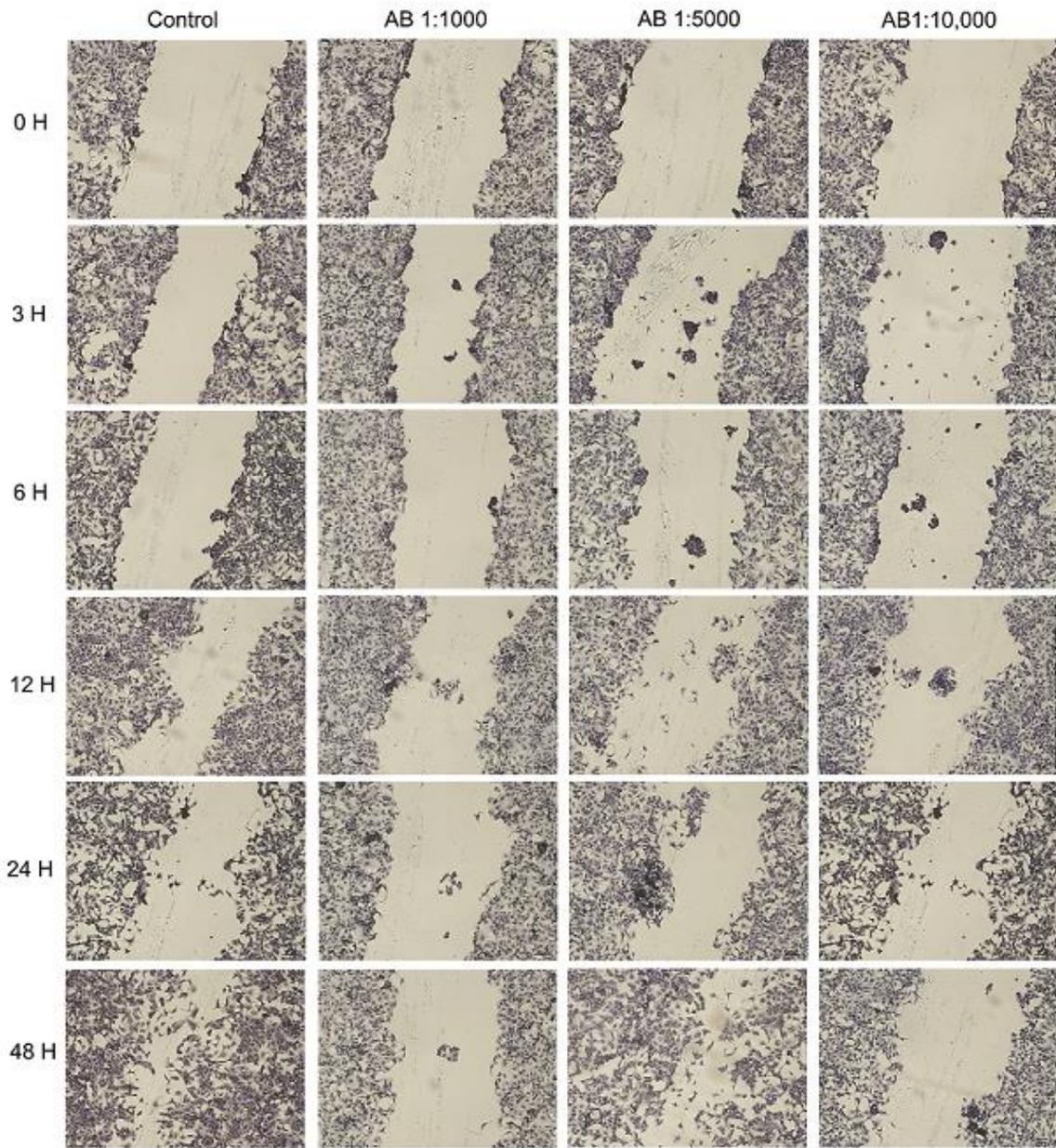


Figura 4. Microfotografías realizadas durante el ensayo de migración en la línea celular MCF-7.

Fuente: elaboración propia.

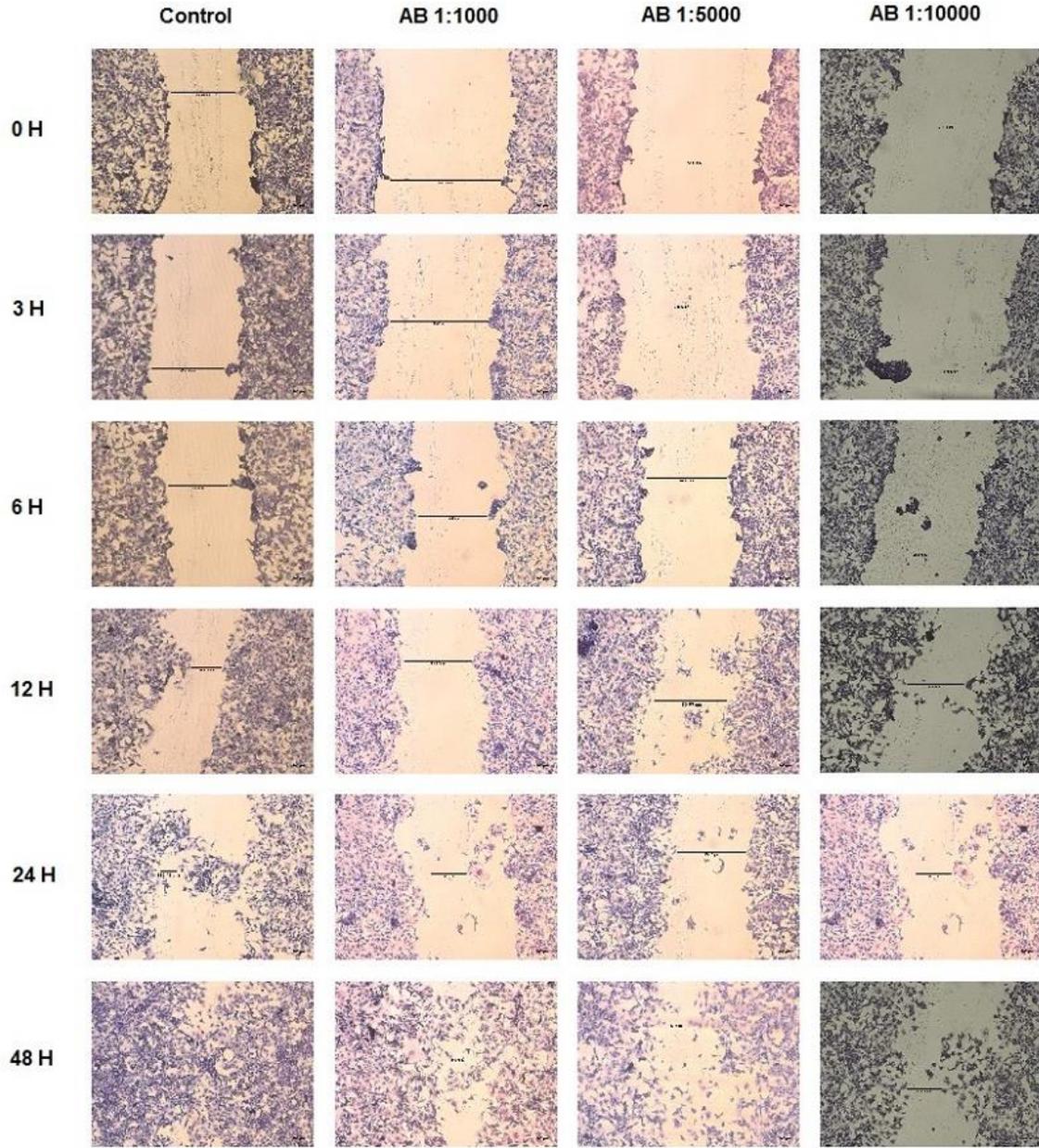


Figura 5. Microfotografías del ensayo de migración celular realizado en células MCF-7 estimuladas con AB analizadas con el programa ImageJ.
Fuente: elaboración propia.

Tabla 1. Ensayo de migración celular en la línea MCF-7

Tiempo (horas)	Tratamiento			
	Sin tratamiento	1:1000	Ácido butírico 1:5000	1:10000
0 horas	426.04 μm	720.21 μm	773.96 μm	730 μm
3 horas	478.13 μm	637.5 μm	723.96 μm	776 μm
6 horas	390.62 μm	450.0 μm	519.79 μm	542 μm
12 horas	196.88 μm	445.57 μm	470.83 μm	456 μm
24 horas	110.42 μm	234.63 μm	454.17 μm	376 μm
48 horas	0 μm	58.33 μm	143.75 μm	418 μm
MEDIA	267.015	424.373	514.41	549.66
% RZC	100%	91.91%	81.43%	46.14%

Distancia en micras de la longitud de la brecha en cada uno de los cultivos celulares.

% RZC= porcentaje de reducción de la zona acelular; estos porcentajes fueron obtenidos a partir de la distancia máxima y mínima mostrada en cada cultivo.

Fuente: elaboración propia.

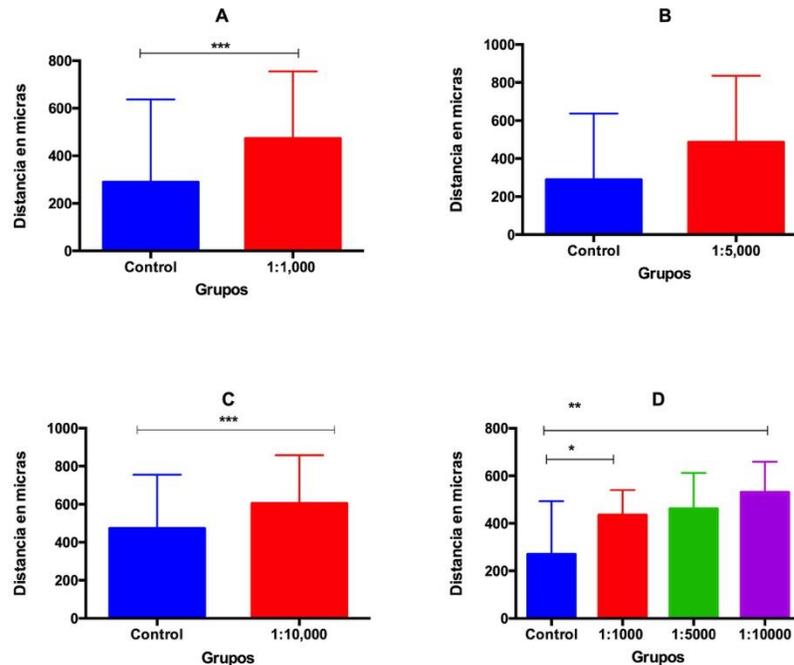


Figura 6. Representación gráfica de la distancia promedio de la zona acelular de cada uno de los tratamientos de AB contra el control a las 48 h. Las barras representan el promedio de los tres experimentos. **A**, el grupo control cerro un 58.9% más que las células estimuladas con AB 1:1000. **B**, el tratamiento de AB al 1:5000 no tuvo diferencias significativas comparado con el grupo control. **C**, las células estimuladas con AB al 1:10000 migraron un 105.85% menos que el grupo control, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.005$). **D**, comparación de los tres grupos contra el control.

Fuente: elaboración propia

3.2 El ácido butírico influye en la morfología de la línea celular MCF-7

Las células MCF-7 mostraron una morfología redonda y/o cuadrada y se agruparon en aglomerados y hojas pequeñas dentro de las primeras 24 horas (figura 7a).

Después de 48 horas de cultivo se observó una morfología poligonal, de tamaño pequeño y con escaso espacio intercelular, que asemeja en conjunto, la organización del tejido glandular (figura 7b).

Por el contrario las células MCF-7 estimuladas con AB a diferentes concentraciones y después de 24 y 48 horas mostraban una morfología alargada, aplanada con prolongaciones citoplasmáticas largas con escaso espacio intercelular entre célula y célula.

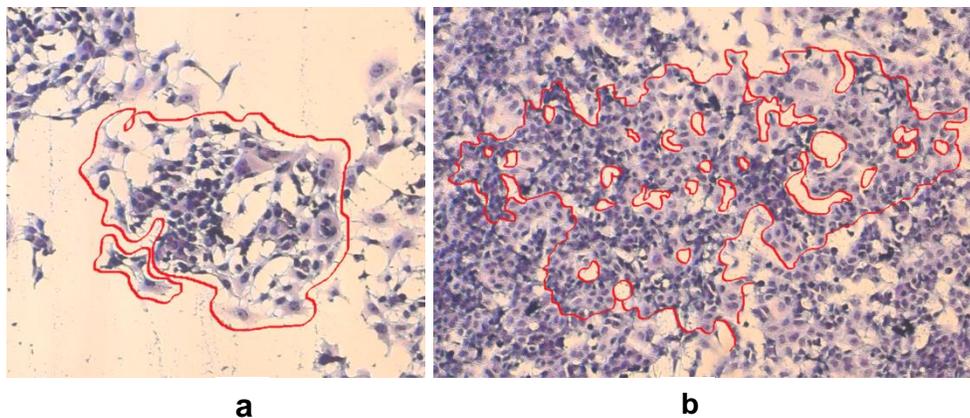


Figura 7. Ensayo de migración de la línea celular MCF-7 sin tratamiento de ácido butírico. **A.** Microfotografía de las células MCF-7 a las 24 horas de cultivo; **B.** 48 horas de cultivo. Tinción con hematoxilina, 10x.

Fuente: elaboración propia.

Además, dicha morfología alargada en las células MCF-7 de tipo epitelial, adquirida posterior al estímulo de AB, semejaba una morfología de tipo mesenquimal, y el desarrollo de numerosas prolongaciones citoplasmáticas también está asociada a los fenotipos mesenquimales (figura 8a).

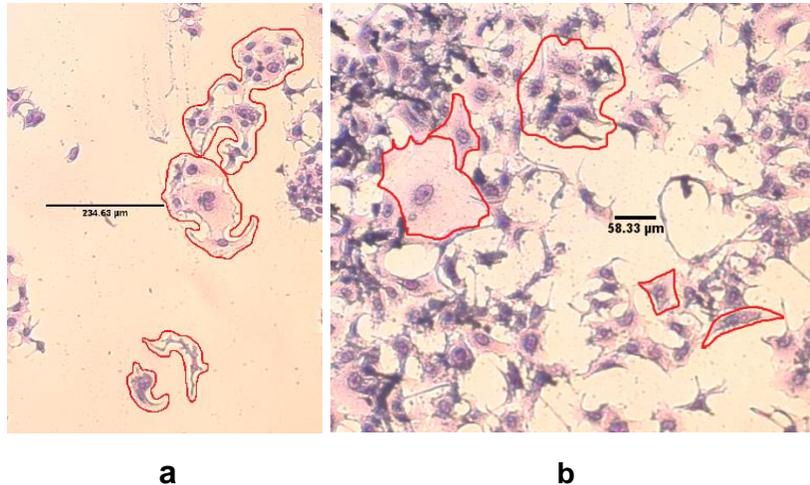


Figura 8. Ensayo de migración celular de la línea celular MCF-7 estimuladas con ácido butírico en concentración 1:1000. **A.** Microfotografía de la morfología y comportamiento celular a las 24 horas de ensayo; **B.** 48 horas de cultivo. Tinción con hematoxilina, 10x.
Fuente: elaboración propia.

Las células MCF-7 estimuladas con AB en concentración 1:5,000, a las 12 horas de cultivo, mostraron aglomerados de células pequeñas y redondas que se dirigían al centro de la zona del raspado, así como células individuales pequeñas de forma ahusada y estrellada localizadas, de igual forma, en el centro del raspado (figura 9a).

A tiempos más largos, es decir, a las 24 horas, los aglomerados celulares del centro fueron reemplazados por células individuales de forma estrellada (figura 9b), de tal manera que, transcurridas 48 horas, la morfología pequeña, estrellada y con prolongaciones citoplasmáticas más pequeñas se mantuvo y fue más evidente que en el tratamiento con AB 1:1,000 (figura 9c).

Por último, las células MCF-7 estimuladas con AB en concentraciones 1:10,000, después de 12 horas en cultivo, mostraron una organización en conglomerados celulares de forma circular, dotados en la orilla de los mismos de pequeñas prolongaciones citoplasmáticas alargadas y numerosas (figura 10a). Transcurridas 24 horas en presencia del estímulo se aprecian células individuales con prolongaciones citoplasmáticas alargadas y con polarización en dirección al centro del raspado (figura 10b).

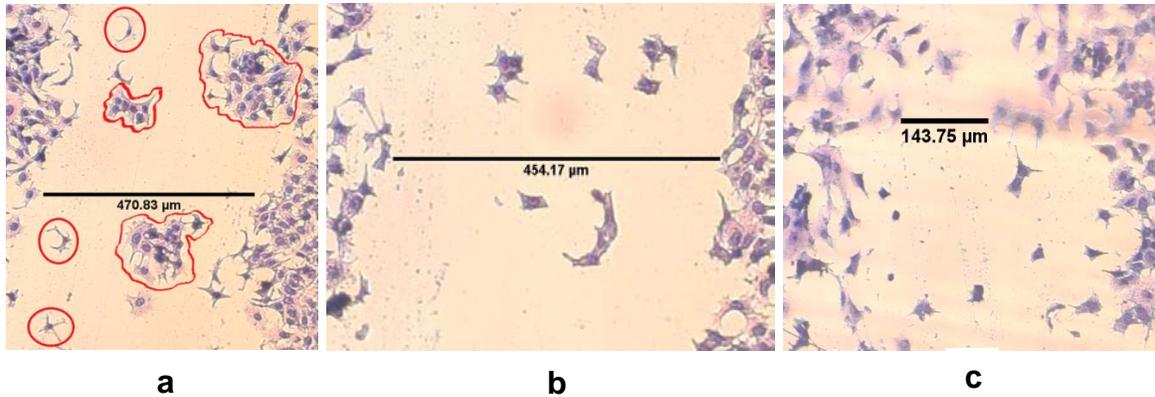


Figura 9. Ensayo de migración celular de la línea celular MCF-7 estimulada con ácido butírico en concentración 1:5000. **A.** Microfotografía de la morfología a las 12 horas del ensayo; **B.** 24 horas; **C.** 48 horas. Tinción con hematoxilina, 10x.
Fuente: elaboración propia.

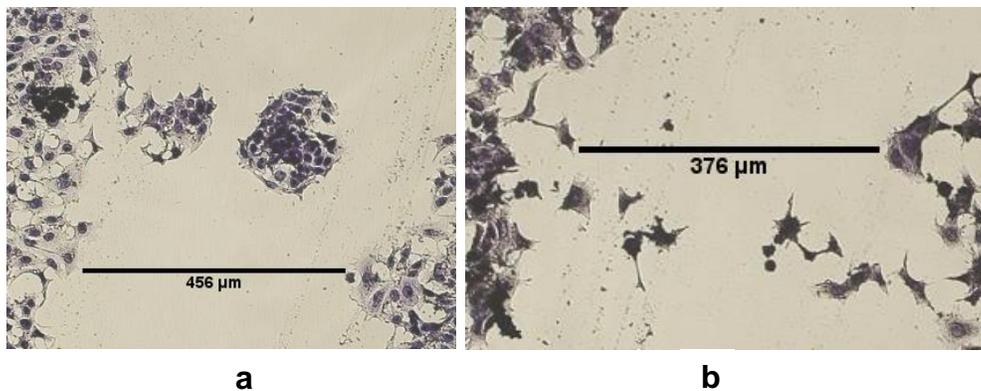


Figura 10. Ensayo de migración celular de la línea celular MCF-7 estimulada con ácido butírico en concentración 1:10000. **A.** Microfotografía de la morfología celular a las 12 horas del ensayo; **B.** 24 horas. Tinción con hematoxilina, 10x.
Fuente: elaboración propia.

Otra observación importante en cuanto a la morfología de las células MCF-7 estimulada con AB a tiempos largos, fue la presencia de vesículas en el citoplasma, acompañadas de un incremento en la cromatina; lo anterior sugiere la presencia de vesículas apoptóticas y por consiguiente una disminución en la viabilidad celular de la línea MCF-7.

3.3 El ácido butírico afecta la viabilidad celular de la línea MCF-7

Los resultados de viabilidad celular obtenidos en este ensayo se expresan en porcentaje de absorbancia producida por el cambio de color del medio celular como resultado de la reacción de reducción que sufre la resazurina presente en la solución alamarBlue®.

El nivel de absorbancia es proporcional al número de células vivas y corresponde al número de células con actividad metabólica, el control utilizado para este estudio fue una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (datos no mostrados).

La estimulación de las células MCF-7 con AB en concentración 1:1,000, mostró un incremento de 23.9% en la viabilidad celular en la primera hora de iniciado el estímulo con AB; y de 13.9% a un 3.6% a las 3 y 5 horas respectivamente. A partir de las 7 horas, la viabilidad celular fue disminuyendo gradualmente hasta alcanzar una disminución del 29.5% de la tasa de proliferación a las 24 horas del estímulo, comparado con la del grupo control a las 24 horas de ensayo (Tabla 2).

Tabla 2. Ensayo de viabilidad celular línea MCF-7 / AB 1:1000

Horas	Media
0	100
1	123.93975
3	113.9963875
5	103.6269075
7	98.714875
24	89.208635
48	70.59248625

Relación entre la viabilidad celular y el tiempo de exposición al estímulo. Se presenta el porcentaje promedio de la viabilidad celular; para observar los datos completos diríjase a la sección de tablas en anexos. Fuente: elaboración propia.

La dilución de AB de 1:5,000 no disminuyó considerablemente la viabilidad en la línea celular MCF-7 en la primera hora después de aplicado el estímulo. Posteriormente, se observó un incremento en la proliferación a las 3 horas después de colocar el estímulo (Tabla 3). Una vez transcurridas 3 horas de exposición al AB, la viabilidad celular comenzó a disminuir de manera constante, hasta alcanzar una disminución de 28.2% al finalizar el ensayo. Esta tendencia de

disminución de la de viabilidad celular se observó también con diluciones de 1:1,000, pero sin diferencias significativas.

Tabla 3. Ensayo de viabilidad celular línea MCF-7 / AB 1:5000

Horas	Media
0	100
1	96.03126125
3	98.378005
5	92.18778875
7	89.65483
24	80.5101375
48	71.74855375

Relación entre la viabilidad celular y el tiempo de exposición al estímulo. Se presenta el porcentaje promedio de la viabilidad celular; para observar los datos completos diríjase a la sección de tablas en anexos. Fuente: elaboración propia.

La estimulación de la línea celular MCF-7 con AB en diluciones de 1:10,000, también tuvo un efecto sobre la viabilidad celular, mostrando una disminución en la primera hora de un 5%, seguido de un aumento de la viabilidad 2 horas más tarde. Sin embargo, las lecturas posteriores mostraron una disminución constante de la viabilidad celular, de hasta un 27% a las 48 horas del ensayo (Tabla 4).

Tabla 4. Ensayo de viabilidad celular línea MCF-7 / AB 1:10000

Horas	Media
0	100
1	95.08753875
3	97.7832725
5	92.13139
7	89.44229375
24	80.44473625
48	72.97688

Relación entre la viabilidad celular y el tiempo de exposición al estímulo. Se presenta el porcentaje promedio de la viabilidad celular; para observar los datos completos diríjase a la sección de tablas en anexos. Fuente: elaboración propia.

La línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama estimulada con AB en concentración 1:20,000 mostró un descenso marcado en la viabilidad celular dentro de la primera hora de ensayo. Seguido de un incremento en la viabilidad, pero sin lograr alcanzar un 100% después de 3 horas de cultivo. A partir de este leve aumento en la proliferación, y después de 3 horas de ensayo, la viabilidad

celular sufre nuevamente un marcado descenso a las 5 y 7 horas de ensayo (Tabla 5). Después de 24 y 48 horas de exposición al estímulo, el registro de absorbancia que se obtuvo fue inferior al registrado por el grupo control, y similar al de las diferentes diluciones utilizadas.

Tabla 5. Ensayo de viabilidad celular línea MCF-7 / AB 1:20000

Horas	Media
0	100
1	86.484795
3	94.5393125
5	90.03873125
7	88.73548125
24	78.37778
48	73.6271675

Relación entre la viabilidad celular y el tiempo de exposición al estímulo. Se presenta el porcentaje promedio de la viabilidad celular; para observar los datos completos diríjase a la sección de tablas en anexos. Fuente: elaboración propia.

Realizando una comparación de los promedios de porcentajes de viabilidad celular de cada una de las concentraciones a las distintas horas de cultivo observamos una disminución significativa entre los porcentajes presentados por el AB 1:1,000 y AB 1:5,000 dentro de las primeras 7 horas de estudio, pero transcurridas 24 horas, la diferencia entre ambos grupos disminuye; incluso al llegar a las 24 horas de cultivo el porcentaje de viabilidad mostrado por la concentración 1:5,000 (71.74) es superior al valor mostrado por las células estimuladas con AB 1:1,000 (Tabla 6).

Los datos obtenidos entre el AB 1:5,000 y 1:10,000 fueron muy similares entre sí y para el término del estudio, el AB en concentración 1:10,000 mostró un porcentaje de viabilidad celular ligeramente superior al obtenido por el AB 1:5,000. Este comportamiento se mantuvo aun con el AB 1:20,000 debido a que esta concentración obtuvo el porcentaje de viabilidad celular más alto registrado a las 48 horas de ensayo (Tabla 6 y Figura 11).

Tabla 6. Viabilidad celular (promedio %)				
HORAS	AB 1:1000	AB 1:5000	AB 1:10000	AB 1:20000
0	100	100	100	100
1	123.93975	96.0312613	95.0875388	86.484795
3	113.996388	98.378005	97.7832725	94.5393125
5	103.626908	92.1877888	92.13139	90.0387313
7	98.714875	89.65483	89.4422938	88.7354813
24	89.208635	80.5101375	80.4447363	78.37778
48	70.5924863	71.7485538	72.97688	73.6271675

Comparación del promedio de porcentaje de viabilidad de los distintos tratamientos de AB respecto al tiempo de exposición al estímulo.
Fuente: elaboración propia.

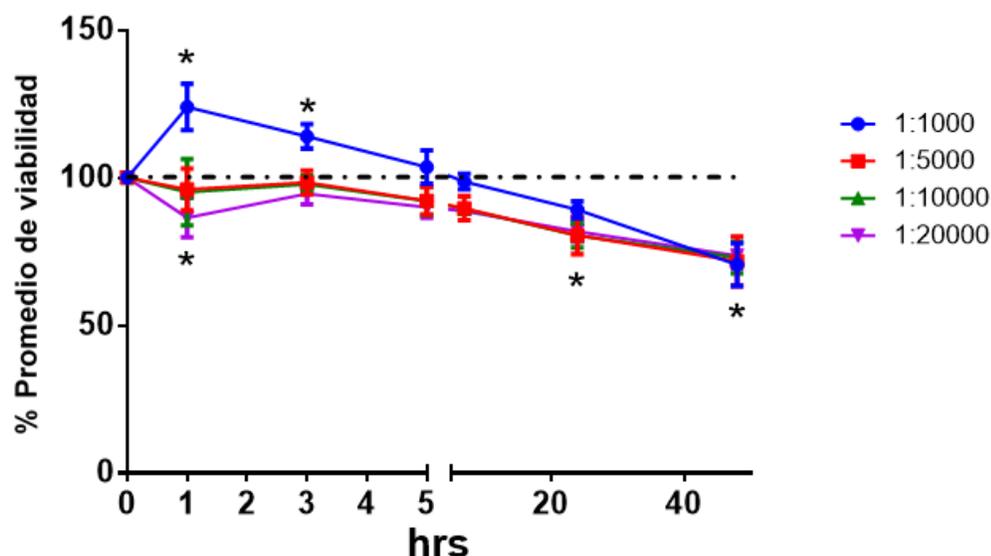


Figura 11. Representación gráfica del comportamiento de la viabilidad celular respecto a las horas del ensayo realizado a la línea celular MCF-7.*Datos estadísticamente significativos.

Fuente: elaboración propia.

3.4 El ácido butírico afecta la expresión de IL-6 y TNF- α en la línea MCF-7

Los niveles de absorbancia obtenidos de las lecturas realizadas durante las 48 horas de estudio, fueron sometidos a un análisis de varianza simple (ANOVA) seguido por un test de Tukey, por lo cual, los resultados se expresan en variación estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) a partir de la comparación de las medias de los diferentes grupos de estudio.

3.4.1 Medición de IL-6 en células MCF-7

La detección de IL-6 en los medios de cultivo de 24 horas de la línea celular MCF-7 estimulada con diferentes concentraciones de AB mostró variaciones importantes en la concentración de esta citocina. Comparados con el grupo control, la concentración de AB 1:1,000 y 1:5,000 mostraron un descenso en la expresión de IL-6, siendo el AB en concentración 1:1000 la que presentó el nivel de expresión más bajo. Por otro lado, la expresión de IL-6 en las células MCF-7 estimulas con AB en concentraciones 1:10,000 exhibió un comportamiento similar al grupo control. Es importante mencionar que la expresión de IL-6 registrada en los cultivos celulares de la línea MCF-7 estimulada con AB se ubicaron por debajo del control positivo de LPS (figura 12a).

Una comparación entre los datos obtenidos del AB en concentración 1:1,000 y el AB en concentración 1:5,000 reveló que las altas concentraciones de AB disminuyeron la expresión de IL-6 en la línea celular MCF-7; sin embargo, y como se mencionó anteriormente, ambas concentraciones se encuentran por debajo de los datos arrojados por el grupo control (figura 12a).

La expresión de IL-6 en células de adenocarcinoma de mama MCF-7 demostró ser mayor al ser estimulada con concentraciones bajas de AB; debido a que la expresión de IL-6 registrada por el medio suplementado con AB en concentración 1:10,000 aumento 6 veces en comparación con la lectura de absorbancia obtenida en el AB 1:1,000 y casi el doble a la expresión mostrada por el AB 1:5,000 (figura 12a).

Por otro lado, la expresión de IL-6 en las células MCF-7 a 48 horas de cultivo disminuye en comparación a la expresión observada en el grupo estimulado con el LPS de *E.Coli*. Las células estimuladas con AB en concentraciones 1:1,000 y 1:5,000 mostraron una disminución en la producción de IL-6 en comparación con el grupo control, mientras que la dilución 1:10,000 de AB mostró un incremento en la expresión de IL-6 (figura 12b).

Los niveles de absorbancia presentados por el AB en diluciones de 1:1,000 y 1:5,000 sobre la expresión de IL-6 no mostraron diferencias significativas entre ellas. En contraste, con la dilución de AB 1:10,000 la expresión de IL-6 es similar a la que se observa sin el estímulo de AB, por lo que dicha concentración parece no tener efecto sobre la expresión de la citocina IL-6 en la línea MCF-7 (figura 12b).

Para el análisis estadístico se utilizó un test de Tukey, mismo que hace una comparación entre los diferentes grupos de estudio; dicha prueba reveló que la dilución de AB 1:1,000 fue la que tuvo mayor efecto sobre la expresión de IL-6 en la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama en un periodo de 24 y 48 horas de cultivo.

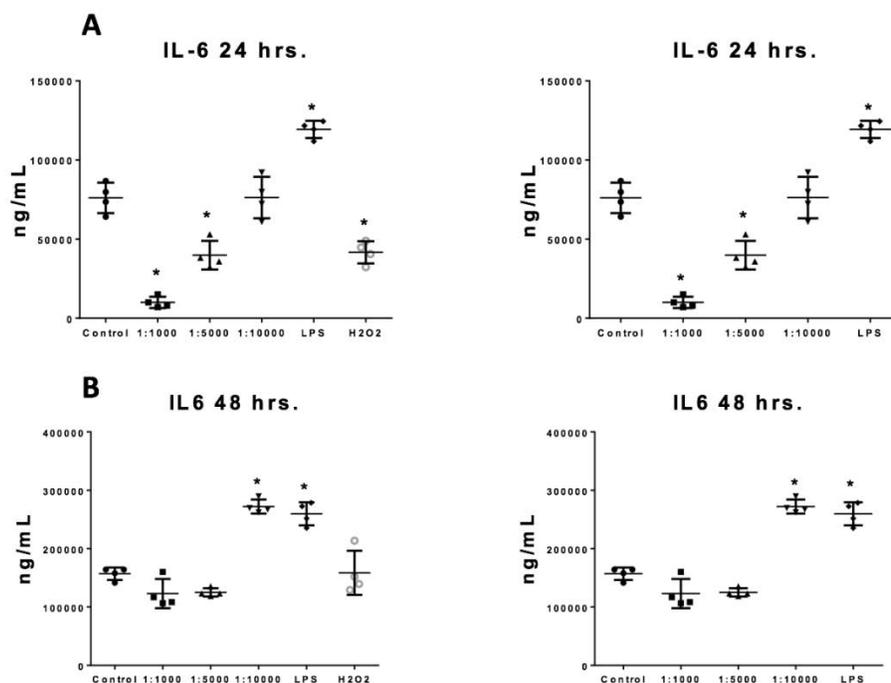


Figura 12. Nivel de la expresión de la IL-6 (ng/mL) a las 24 y 48 horas de estímulo con ácido butírico en la línea MCF-7. **A**, a las 24 horas la concentración de ácido butírico 1:1,000 muestra la mayor inhibición de la citocina IL-6 comparado con el control; y ninguna de las concentraciones alcanza la expresión lograda con el lipopolisacárido de *E. coli* ($p < 0.005$). **B**, a las 48 horas del estímulo la mayor expresión de IL6 se observó con las concentraciones de 1:10,000 y esta expresión fue mayor que la estimulada por el lipopolisacárido de *E. coli* ($p < 0.005$). (*) Significancia estadística ($p \leq 0.05$). Fuente: elaboración propia.

Los dos grupos experimentales con diluciones de AB a 1:1,000 y 1:5,000 provocaron una disminución en la expresión de IL-6 a las 24 horas del estímulo comparados con el control, pero fue menor a la sobreexpresión de IL-6 provocada por el LPS de *E.coli*; mientras que el peróxido de hidrógeno también disminuyó la expresión de IL-6 en las células MCF-7. No se observaron diferencias significativas entre el control y la dilución de 1:10,000 a las 24 horas del estímulo.

Por el contrario, después de 48 horas, la dilución 1:10,000 incremento significativamente los niveles de IL-6 en las células MCF-7, superando incluso a la expresión estimulada con LPS de *E.coli* y al peróxido de hidrógeno (figura 13).

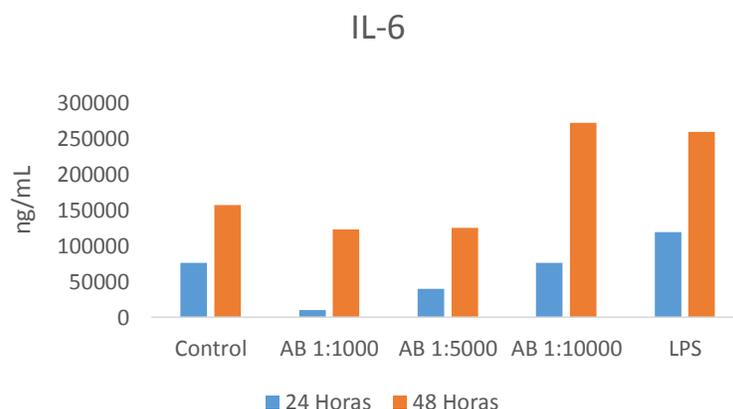


Figura 13. Representación gráfica de las concentraciones de IL-6 obtenidas con las muestras de cultivo celular a 24 y 48 horas de incubación de la línea celular MCF-7. Se observó incremento en la expresión de IL-6 a las 24 horas con diluciones de 1:1,000 y 1:5,000. Sin embargo, después de 48 horas, la dilución de 1:10,000 fue la que provocó un mayor efecto en la expresión de IL-6. Fuente: elaboración propia.

3.4.2 Medición de TNF- α en células MCF-7

La expresión de TNF- α en las células MCF-7 de adenocarcinoma de mama, a las que se agregó AB en las tres diluciones 1:1,000, 1:5,000 y 1:10,000, después de 24 horas de estímulo, disminuyó con respecto al grupo control, y con respecto a la expresión alcanzada con el LPS de *E.coli* y con el peróxido de hidrógeno (figura 14a).

Después de 48 horas, la dilución de 1:1,000 disminuyó considerablemente la expresión de TNF- α con respecto al grupo control. Por otro lado, la estimulación con diluciones de 1:5,000 y 1:10,000 mantuvo la expresión del TNF- α muy similar al del control, y siempre por debajo de la expresión alcanzada al estimular las células MCF-7 con LPS de *E.coli* y con peróxido de hidrógeno.

Es decir, en las primeras 24 horas, la diferencia entre la expresión de TNF- α obtenidas en el sobrenadante de las células MCF-7 suplementadas con AB diluido 1:1,000 y en 1:5,000 no fue significativa, mientras que, el AB 1:10,000 registró una expresión de TNF- α dos veces mayor a la mostrada por el AB 1:1,000.

A las 48 horas, la concentración de TNF- α obtenida con las diluciones de AB 1:5,000 y 1:10,000 no mostraron un descenso significativo en relación a la concentración mostrada por el grupo control, sin embargo, la expresión de TNF- α con diluciones de AB 1:1,000 disminuyó aproximadamente a la mitad (figura 14a y figura 14b).

Para finalizar, la expresión de esta citocina en las células estimuladas con AB en diluciones de 1:5,000 y 1:10,000 fueron muy similares, por lo tanto, no se mostró diferencia significativa entre ambas concentraciones (figura 14b).

Analizando la expresión de TNF- α obtenida en las diferentes muestras del estudio en los tiempos registrados observamos que a las 48 horas, la expresión de TNF- α era mayor a las 24 horas de cultivo; y la mayor diferencia en relación con la expresión del TNF- α se presentó con la concentración de 1:5,000, a las 48 horas, y fue 5 veces superior a la registrada a las 24 horas (figura 15).

Por otro lado, la expresión de TNF- α en células de MCF-7 estimuladas con una dilución de AB de 1:1,000 a las 48 horas fue significativamente superior a su homóloga de 24 horas, mientras que la expresión de TNF- α en células MCF-7 estimulados con una dilución de AB 1:10,000 a las 48 horas fue superior en comparación a la mostrada en el cultivo de 24 horas (figura15).

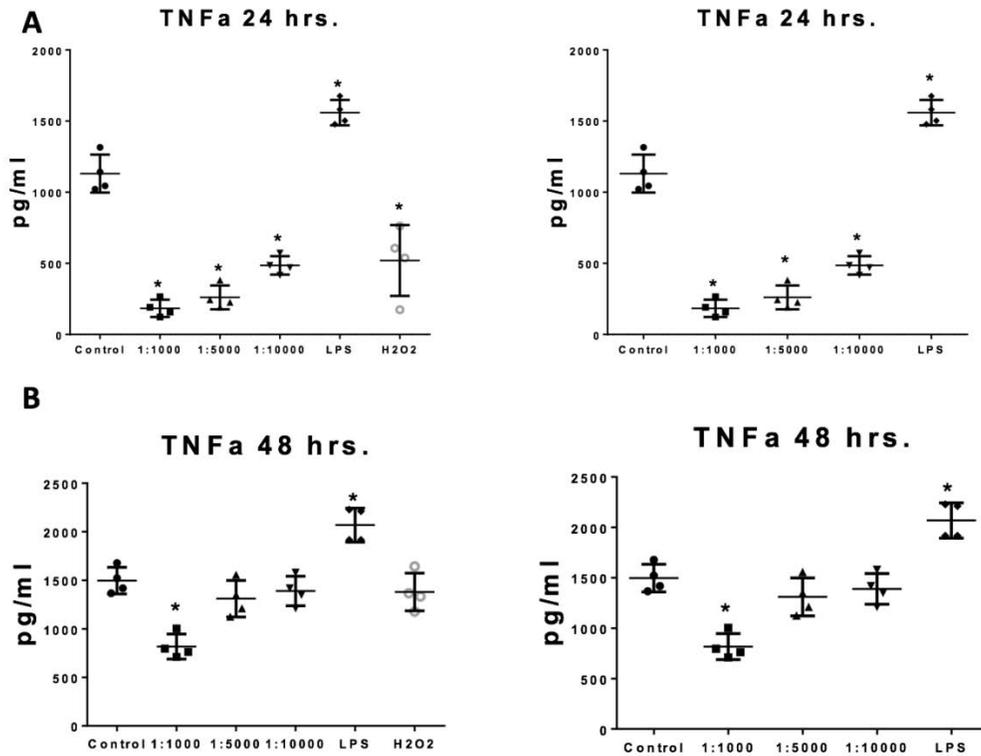


Figura 14. Nivel de la expresión de TNF- α (pg/mL) a las 24 y 48 horas de estímulo con ácido butírico en la línea MCF-7. **A**, comparados con el grupo control la expresión de TNF- α se inhibió utilizando diluciones de AB de 1:1,000, 1:5,000 y 1:10,000 a las 48 horas. **B**, Después de 48 horas la expresión de TNF- α disminuyó de manera significativa con la dilución de AB 1:1,000, con respecto al control, al lipopolisacárido de *E. coli* y al peróxido de hidrógeno. (*) Datos estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$). Fuente: elaboración propia.

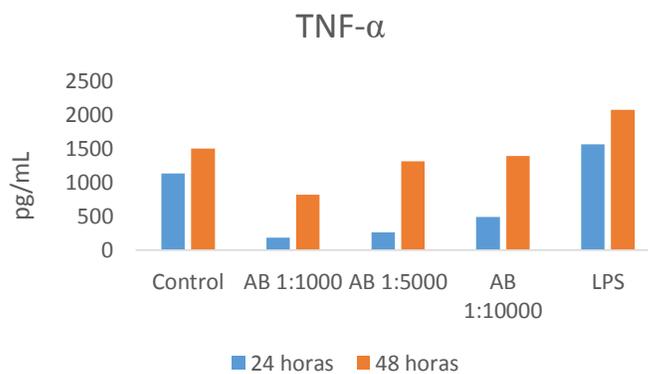


Figura 15. Representación gráfica de las concentraciones de TNF- α obtenidas con las muestras de cultivo celular a 24 y 48 horas de incubación de la línea celular MCF-7. La expresión de IL6 aumento después de 48h en relación a las obtenidas con las muestras de 24 horas, los porcentajes de aumento fueron 344.42% para el AB 1:1000, 402.43% y 185.87% para el AB 1:5000 y 1:10000 respectivamente. Fuente: elaboración propia.

Discusión

En el presente estudio, el AB un metabolito de bacterias anaerobias, mostró tener un efecto sobre la migración, morfología, viabilidad celular y expresión de moléculas relacionadas con la inflamación en las células MCF-7 de adenocarcinoma de mama.

En los ensayos de migración celular, la adición de AB en cualquiera de las diluciones/concentraciones utilizadas inhibió la migración de las células MCF-7 impidiendo el completo cierre de la brecha acelular creada.

Los resultados mostraron que la inhibición de la migración celular se relaciona con la concentración de AB utilizada como estímulo; es decir, concentraciones bajas de ácido butírico provocaron una mayor inhibición de la migración celular en comparación con concentraciones altas.

Esto sugiere que el AB podría ser un potente inhibidor de la migración de células de carcinoma de mama, sin embargo, se requieren estudios adicionales para investigar esta posibilidad y conocer los mecanismos de inhibición en la migración de células MCF-7, así como las condiciones necesarias por las cuales se lleva a cabo este comportamiento.

En la revisión de la literatura que se llevó a cabo para la realización de la presente investigación, no se encontró otro estudio en el que se investigara los efectos del AB en la migración de las células MCF-7.

Sin embargo, Miyazaki y colaboradores (2010) reportaron que la estimulación con AB de las líneas celulares HSC-2 y HSC-4 de carcinoma oral de células escamosas (COCE) de lengua, inhibió la migración de estas células; mientras que las concentraciones bajas de butirato de sodio utilizadas en la estimulación de la línea celular HSC-3 promovió ligeramente la migración celular [25]; se requieren estudios adicionales para investigar las repercusiones del AB en la migración de diferentes líneas celulares.

Por otro lado, los efectos del AB en la morfología de las células MCF-7 mostraron cambios principalmente en aquellas células cercanas a la brecha creada, como un aumento en el número y longitud de prolongaciones citoplasmáticas en comparación con el grupo control.

Estas características fenotípicas son distintivas de las células que atraviesan por la TEM, evento biológico en el cual las células epiteliales pierden sus características fenotípicas propias como la polaridad y la adhesión célula-célula, y adquieren propiedades de células mesenquimales con un alto grado de motilidad celular, lo que promueve la migración, repercutiendo de esta manera en los procesos de invasión y metástasis del cáncer [22].

Estudios adicionales que evalúen la expresión de biomarcadores relacionados con la TEM, son necesarios para evaluar si el AB es capaz de inducir este evento biológico en las células de adenocarcinoma de mama.

Otros cambios morfológicos importantes presentados por las células MCF-7 estimuladas con AB en diferentes concentraciones, en comparación con el grupo control, fue la presencia de vesículas citoplasmáticas y fragmentación celular ocasional.

Ying Wang y colaboradores (2016) observaron características similares al estimular las células MCF-7 con butirato de sodio durante un periodo de tiempo de 48 horas. Estos autores describieron una morfología celular redondeada, con núcleos apoptóticos y con aumento de vacuolas citoplasmáticas, sugiriendo que se trataba de características relacionadas con la apoptosis celular [26].

Esta información plantea la idea de que el AB disminuye la viabilidad celular de la línea MCF-7 induciendo la apoptosis.

Tomando en cuenta lo anterior, se midió la viabilidad celular de la línea MCF-7 de adenocarcinoma de mama estimulada con diferentes diluciones de AB. Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que la estimulación con AB de la línea celular MCF-7 es capaz de afectar la viabilidad celular y que estos

efectos dependen de la concentración del estímulo y el tiempo de exposición al mismo.

Kuniyasu y colaboradores (2009) han documentado que las altas concentraciones de AB (5mM) son capaces de inhibir la proliferación celular a través de la citotoxicidad y la apoptosis de diversas líneas celulares [9].

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que este metabolito bacteriano tuvo un efecto dual en la viabilidad de nuestra línea celular, es decir, a concentraciones altas y tiempo de estimulación corto, el AB mostró favorecer la proliferación celular de la línea MCF-7, en concordancia con la paradoja del butirato.

Mientras que a concentraciones altas y tiempos largos, el AB disminuye la viabilidad celular. Se requiere más estudios para esclarecer los mecanismos celulares que inician y regulan este proceso celular.

Es importante señalar que aún la estimulación con concentraciones medias y bajas de AB disminuyó la viabilidad celular de la línea MCF-7 desde la primera hora de exposición al estímulo.

La relación entre la concentración del AB y el tiempo de exposición de la línea celular MCF-7 a este estímulo han sido descritas anteriormente. Por ejemplo, Ying Wang y colaboradores demostraron que el aumento de las dosis de AB y el aumento de los tiempos de incubación de la línea celular MCF-7 estimulada con este metabolito bacteriano, dio lugar a reducciones graduales en los niveles de absorbancia de las células [26].

Andrade y colaboradores (2012) también reportaron un descenso significativo en la proliferación celular de la línea MCF-7 estimulada con una concentración de 5mM de AB dentro de las primeras 48 horas de cultivo, mientras que concentraciones inferiores de AB sólo mostraron inhibir la proliferación celular después de 120 horas de cultivo [27].

Nuestros resultados sugieren que tanto la migración como la viabilidad celular se ven afectadas por el estímulo de AB a tiempos similares, sin embargo, en este

estudio, no se utilizó un inhibidor de la proliferación celular durante el ensayo de migración, lo que podría explicar esta relación. Por lo tanto, se requieren estudios posteriores más específicos para validar esta posible relación.

Los, resultados del presente trabajo, sugieren el posible papel del AB como un potente inhibidor de proliferación y migración celular en la línea MCF-7.

Por otro lado, se ha reportado que la IL-6 puede modular la susceptibilidad, el desarrollo y la progresión de una serie de enfermedades autoinmunes e inflamatorias así como de neoplasias malignas [28].

La IL-6 es una proteína soluble multifuncional sintetizada por macrófagos, neutrófilos, queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales en respuesta a estímulos como infección o trauma [28].

La naturaleza de la participación de IL-6 en el cáncer ha sido muy controvertida, ya que se han descrito papeles dicotómicos para esta citoquina tanto en las actividades promotoras y supresoras de tumores incluido el carcinoma de mama [29].

Sin embargo, la IL-6 está implicada en la progresión del cáncer a través de la disminución de la adhesión y el aumento de la motilidad de las células cancerosas, la inducción de la trombopoyesis, el aumento de la proliferación de las células cancerosas y la estimulación en la expresión del antígeno específico del tumor [30].

Células de cáncer expuestas a IL-6 o que segregan la citocina como factor autócrino, muestran características malignas, por ejemplo, una mayor capacidad de invadir la matriz extracelular y un aumento de la resistencia a los fármacos [31].

La IL-6 promueve la proliferación celular del carcinoma de próstata, carcinoma de colon, leucemia, melanoma y carcinoma de células renales, mientras que también se ha reportado que inhibe la proliferación celular en líneas celulares de melanoma y células de leucemia M1 [30].

Estudios previos han mostrado que la IL-6 por sí sola no tiene efecto significativo en la proliferación de células MCF-7, sin embargo, la presencia de IL-1 α e IL-6 en conjunto inhibieron el crecimiento de células de cáncer de mama MCF-7 [30].

El mecanismo molecular de acción de IL-6 sobre las células MCF-7 no se ha aclarado por completo; sin embargo, estudios recientes han demostrado que una disminución en el RNAm y en la expresión de la proteína IL-6 se asocia con la inhibición de la proliferación celular en estas células [30]. Por lo tanto, tratamientos dirigidos a bloquear la IL-6 son candidatos potenciales para la terapia contra el cáncer.

En el presente estudio observamos que la estimulación con altas concentraciones de AB de la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama disminuyen la expresión de IL-6 en tiempos largos, mientras que las concentraciones bajas de AB con tiempo de estimulación largo aumentan significativamente la expresión de esta citocina en comparación con el grupo control de LPS.

Esto es relevante debido a que las altas concentraciones de IL-6 presentes en el suero de pacientes con cáncer de mama se asocian con un mal pronóstico [30-32], lo que sugiere que las concentraciones bajas de AB en estas células podrían potencializar este dato clínico.

Teniendo en cuenta las posibles repercusiones de la IL-6 en el desarrollo y mantenimiento del adenocarcinoma de mama, la presente investigación se enfocó en estudiar los efectos del AB en la expresión de citoquinas inflamatorias como IL-6 y TNF- α en la línea celular MCF-7.

Al igual que la IL-6, los altos niveles de TNF- α presentes en el suero de pacientes diagnosticados con diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, se asocia con un comportamiento agresivo y un mal pronóstico [33-35].

El TNF- α es una citocina multifuncional implicada en apoptosis, inflamación y en los procesos de inmunidad innata [34]; esta molécula, es producida

principalmente por macrófagos activados y es capaz de regular las células del sistema inmune, inducir la producción de interleucinas y la muerte celular [35].

Inicialmente se describió que el tratamiento con anticuerpos dirigidos al TNF- α inducía la muerte celular en células de cáncer, estudios recientes han demostrado que también puede ejercer actividades promotoras de tumores tales como la inducción de transformación, proliferación, angiogénesis, invasión y metástasis [33].

Por lo tanto, el TNF- α puede promover la proliferación, supervivencia y migración de células tumorales, y de igual manera es capaz de inducir la muerte de células cancerosas; el resultado de la respuesta celular dependerá pues de los diversos mecanismos de señalización que desencadene el TNF- α en las distintas células [33, 36].

En el presente estudio se midió la expresión de TNF- α en la línea celular MCF-7. Se observó que, la estimulación de estas células con AB en cualquier concentración, disminuía la expresión de esta citocina proinflamatoria en tiempos largos.

Wolczyk y colaboradores (2016) utilizando un ensayo de raspado y un ensayo de migración *Transwell* demostraron que la estimulación de las células MCF-7 con 10ng de TNF- α durante 24 horas promueve la migración de esta línea celular acompañada de un aumento en la producción de MMP-9.

Por otro lado, se ha probado que el tratamiento de células de cáncer de mama con un anticuerpo monoclonar para TNF- α combinado con otros agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, hexaoxido de arsénico (As_4O_6), withaferin A (WA) y celastrol (cel) disminuyó la proliferación celular al promover la apoptosis de las células [35, 36].

Estos datos plantean la posibilidad de utilizar el TNF- α como diana terapéutica en el cáncer de mama, ya sea potencializando su débil actividad apoptótica con otros agentes como se mencionó anteriormente, o bien, disminuyendo las

concentraciones de TNF- α con AB para disminuir la migración de estas células, estudios posteriores son necesarios para validar estas posibilidades.

Conclusiones

Los AGCC son importantes moléculas que se encargan del mantenimiento y protección de diversos tejidos.

Sin embargo, los efectos de los AGCC como el ácido butírico, están condicionados a las características propias del tejido y a las condiciones físicas y químicas del entorno subyacente en donde se produce o en donde es utilizado como estímulo.

Conociendo el abanico de posibilidades que representa el estudio del AB en el campo de la medicina evaluamos la capacidad de regulación del ácido butírico en las distintas características morfológicas, proliferativas y migratorias de la línea celular MCF-7.

Concluimos que la concentración y el tiempo de exposición al ácido butírico tienen efectos significativos sobre la línea celular MCF-7.

En la serie de experimentos de proliferación celular observamos la dualidad del AB, la capacidad de estimular la proliferación de la línea celular MCF-7 en concentraciones altas y tiempos cortos, mientras que el efecto se invierte con concentraciones bajas.

El presente estudio demuestra la actividad antiinflamatoria del AB en las células de adenocarcinoma de mama, debido a que la estimulación con este ácido en concentraciones altas y medias disminuyó la expresión de IL-6 y TNF- α en 24 y 48 horas de cultivo. Aunque, las concentraciones bajas de AB en tiempos largos incrementó la expresión sólo de IL-6, dicha expresión no supera a la estimulación con un lipopolisacárido de *E. coli* o con el peróxido de hidrógeno.

Por último, el AB mostró una actividad inhibitoria en la migración de la línea celular de estudio, este efecto se presentó con cualquier concentración de AB utilizada como estímulo pero fue más marcada con concentraciones bajas.

Los mecanismos moleculares mediante los cuales el AB ejerce este comportamiento u otros distintos son variados, complejos y no se han esclarecido

por completo, sin embargo están condicionados de igual manera por las variables expuestas anteriormente.

El AB presenta diferentes efectos en los distintos tejidos y líneas celulares en los que se ha realizado su estudio, probablemente esto se deba a su acción como inhibidor de la desacetilación, lo que representa un mecanismo epigenético. Por lo tanto, se requieren de más estudios sobre las vías moleculares afectadas por el ácido butírico para clarificar su posible utilización como agente terapéutico en diferentes tipos de cáncer.

Anexos

1. Glosario

Absorbancia. Relación logarítmica entre la intensidad de la luz que incide sobre una muestra y la intensidad de la misma luz que es transmitida por la misma muestra. La absorbancia se emplea para la cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas, además de reacciones colorimétricas como las usadas en el test ELISA.

Ácido butírico. Ácido graso de cadena corta (4 carbonos) producido por bacterias anaerobias y periodontopatógenas.

AID. Deaminasa de citidina inducida por activación, es una enzima de 24kDa que genera mutaciones en el DNA intercambiando las bases nitrogenadas C-G por A-T, estos cambios son esenciales para originar la diversidad de anticuerpos por parte de las células B.

Biomarcador. Sustancia biológica con la propiedad de ser medible de manera objetiva, que indica un proceso biológico natural, patológico o de respuesta a un tratamiento farmacológico.

Butirato de sodio. Es la sal producida a partir del ácido butírico, mantiene las mismas características que el ácido de cuatro carbonos antes mencionado.

Citotoxicidad. Alteración de las funciones celulares básicas que conlleva un daño celular.

DMSO. El dimetilsulfóxido es líquido orgánico incoloro utilizado para la criopreservación celular.

Espectrofotómetro. Instrumento usado en el análisis químico que sirve para medir, en función de la longitud de onda, la relación entre valores de una misma magnitud fotométrica relativos a dos haces de radiación y la concentración o reacciones químicas que se miden en una muestra.

HDAC. Enzimas implicadas en la eliminación de los grupos acetilo de los residuos de lisina en las histonas.

Inmunohistoquímica. Técnica de laboratorio que permite detectar antígenos y su localización en diferentes componentes celulares y extracelulares por medio de anticuerpos específicos.

Interacciones homotípicas. Uniones o interacciones entre la misma molécula presente en diferentes células, por ejemplo, la interacción de las moléculas de E-cadherina situadas en la membrana plasmática de dos células continuas. Este tipo de uniones son indispensables en la adhesión celular.

Invasión celular. Movimiento celular a través de una matriz tridimensional que se acompaña de una reestructuración del microambiente.

Lamellipodia. Proyección citoesquelética de actina que se expresa principalmente en el borde delantero de la célula que impulsa a ésta a través de un sustrato.

LPS. Los lipopolisacáridos o endotoxinas son los principales constituyentes de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas.

Matriz extracelular. Red tridimensional compuesta por proteínas, proteoglicanos y glucoproteínas que rodea todos los órganos, tejidos y células del organismo.

Medio de cultivo. Formulación de sustancias, en forma líquida, semisólida o sólida, que contienen constituyentes naturales y/o sintéticos destinados a mantener la multiplicación, o a preservar la viabilidad de los microorganismos o líneas celulares.

Metaloproteinasas de la matriz extracelular. Familia de endopeptidasas neutras dependientes de zinc, capaces de degradar los componentes esenciales de la matriz extracelular.

Migración celular. Movimiento celular dirigido sobre un sustrato.

PBS. Tampón o buffer fosfato salino, suele utilizarse como solución de lavado celular o como agente diluyente.

Polaridad celular. Propiedad determinada por regiones (extremos o dominios) estructuralmente y/o funcionalmente diferentes.

SFB. Suero fetal bovino, sustancia utilizada en cultivos celulares.

Tripsinización. Procedimiento mediante el cual se aplica una solución de tripsina a células adheridas para que estas se suelten del sustrato.

2. Tablas (datos crudos)

Ensayo de migración celular línea MCF-7				
HORAS	NO TX	AB 1:1000	AB 1:5000	AB 1:10000
0	426.04	720.21	773.96	736.46
3	478.13	637.5	723.96	509.38
6	390.62	450.0	519.79	582.38
12	196.88	445.57	470.83	377.08
24	110.42	234.63	454.17	380.21
48	0	58.33	137.5	219.79

Ensayo de migración celular línea MCF-7				
HORAS	NO TX	AB 1:1000	AB 1:5000	AB 1:10000
0	645.33	610.67	688.74	722.67
3	410.67	373.33	631.86	769.54
6	476.00	489.33	490.07	545.33
12	205.33	387.92	374.67	457.33
24	168.21	514.67	292.00	379.87
48	42.95	486.67	183.89	423.84

Tabla 2. Ensayo de viabilidad celular línea MCF-7

HORAS	AB 1:1000								Media
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	127.3732	135.5785	134.9335	121.8607	119.4815	120.3028	116.0767	115.9111	123.93975
3	109.7184	116.6389	118.1527	112.4758	110.9619	111.9351	110.9619	121.1264	113.9963875
5	110.4351	110.0741	109.3521	103.7115	100.6882	99.96616	96.22081	98.56729	103.6269075
7	100.0939	100.7661	102.3873	99.38216	97.4446	98.6704	93.72765	97.24689	98.714875
24	93.13277	88.42381	84.76128	91.0399	90.51668	87.90059	86.33094	91.56311	89.208635
48	77.45665	63.58382	60.11561	71.6763	74.56647	64.73988	71.6763	80.92486	70.59248625

Tabla 3. Ensayo de viabilidad celular línea MCF-7

HORAS	AB 1:5000								Media
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	102.7783	93.84687	101.9465	94.70688	88.10172	107.1347	90.70995	89.02517	96.03126125
3	94.85019	91.71435	100.3649	98.90516	97.66164	105.0146	97.5535	100.9597	98.378005
5	102.3126	87.15075	94.59632	92.20472	90.17411	91.61809	89.40699	90.03873	92.18778875
7	93.88582	80.24384	90.32705	89.69437	89.29895	91.19697	91.71101	90.88063	89.65483
24	89.99346	67.49509	81.09876	79.5291	80.57554	77.95945	83.71485	83.71485	80.5101375
48	85.54913	55.49133	72.83237	69.9422	71.6763	68.20809	75.72254	74.56647	71.74855375

Tabla 4. Ensayo de viabilidad celular línea MCF-7

HORAS	AB 1:10000									Media
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100.6847	107.8079	98.99284	100.6247	98.71439	97.37151	83.50208	73.00219		95.08753875
3	96.47218	100.2027	99.22956	99.55395	99.01329	100.0405	96.03965	91.71435		97.7832725
5	101.8614	96.49156	91.88884	91.0766	89.81311	90.21923	88.73012	86.97026		92.13139
7	92.02735	89.85254	86.96598	87.55911	88.5872	89.89208	90.95972	89.69437		89.44229375
24	85.2845	79.5291	75.86658	73.77371	80.57554	81.09876	85.80772	81.62198		80.44473625
48	77.45665	68.20809	65.31792	81.50289	72.25434	69.9422	76.87861	72.25434		72.97688

Tabla 5. Ensayo de viabilidad celular línea MCF-7

HORAS	AB 1:20000									Media
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	83.72765	93.04678	84.71102	88.36959	89.50805	93.46974	86.30768	72.73785		86.484795
3	87.44312	97.33724	92.74161	95.28272	95.87745	98.95923	95.60712	93.06601		94.5393125
5	96.13056	95.18294	89.58749	87.0605	88.41424	88.41424	87.19588	88.324		90.03873125
7	89.61529	88.82445	87.16369	84.94934	88.78491	88.42903	90.2875	91.82964		88.73548125
24	84.76128	79.5291	79.00589	76.3898	83.19163	80.57554	58.2845	85.2845		78.37778
48	79.19075	73.4104	71.09827	65.31792	75.14451	71.6763	76.87861	76.30058		73.6271675

Referencias bibliográficas

1. Astakhova, L., et al. *Short Chain Fatty Acids (SCFA) Reprogram Gene Expression in Human Malignant Epithelial and Lymphoid Cells*. PLoS One, 2016. 11(7): p. 1-18.
2. Cueno, M.E. and K. Ochiai. *Re-discovering periodontal butyric acid: New insights on an old metabolite*. Microb Pathog, 2016. 94: p. 48-53.
3. Tan, J., et al. *The role of short-chain fatty acids in health and disease*. Adv Immunol, 2014. 121: p. 91-119.
4. Sivaprakasam, S., P.D. Prasad, and N. Singh. *Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis*. Pharmacol Ther, 2016. 164: p. 144-51.
5. Louis, P. and H.J. Flint. *Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine*. FEMS Microbiol Lett, 2009. 294(1): p. 1-8.
6. Guilloteau, P., et al. *From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate*. Nutr Res Rev, 2010. 23(2): p. 366-84.
7. Chang, M., et al. *Butyrate induces reactive oxygen species production and effects cell cycle progression in human gingival fibroblast*. 2013, Journal of periodontal research. p. 66-73.
8. Morozumi, A. *High concentration of sodium butyrate suppresses osteoblastic differentiation and mineralized nodule formation in ROS17/2.8 cells*. 2011, Journal of Oral Science: Journal of Oral Science. p. 509-516.
9. Ochiai, K. *Effects of butyric acid on the periodontal tissue*. 2009, Japanese Dental Science Review. p. 75-82.
10. Abe, K. *Butyric acid induces apoptosis in both human monocytes and lymphocytes equivalently*. Journal of Oral Science, 2012. 54(1): p. 7-14.
11. Moergel, M., et al. *Chronic periodontitis and its possible association with oral squamous cell carcinoma - a retrospective case control study*. Head Face Med, 2013. 9: p. 39.
12. Tezal, M., et al. *Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. 18(9): p. 2406-12.
13. Miyazaki, Y., et al. *Activation-induced cytidine deaminase mRNA expression in oral squamous cell carcinoma-derived cell lines is upregulated by inflammatory cytokines*. J Oral Sci, 2012. 54(1): p. 71-5.
14. Yamamura, T., et al. *Sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, regulates Lymphangiogenic factors in oral cancer cell line HSC-3*. Anticancer Res, 2014. 34(4): p. 1701-8.

15. Cueno, M.E., et al. *Butyric acid retention in gingival tissue induces oxidative stress in jugular blood mitochondria*. Cell Stress & Chaperones, 2013. 18(5): p. 661-665.
16. Xiao, M., et al. *Sodium butyrate induces apoptosis of human colon cancer cells by modulating ERK and sphingosine kinase 2*. Biomed Environ Sci, 2014. 27(3): p. 197-203.
17. Binamé, F., et al. *What makes cells move: requirements and obstacles for spontaneous cell motility*. Mol Biosyst, 2010. 6(4): p. 648-61.
18. Kramer, N., et al. *In vitro cell migration and invasion assays*. 2013, Mutation Research: Austria. p. 10-24.
19. Vedula, S.R., et al. *Collective cell migration: a mechanistic perspective*. Physiology (Bethesda), 2013. 28(6): p. 370-9.
20. Wicki, A. and G. Christofori. *The potential role of podoplanin in tumour invasion*. Br J Cancer, 2007. 96(1): p. 1-5.
21. Costa, L.C., et al. *Expression of epithelial-mesenchymal transition markers at the invasive front of oral squamous cell carcinoma*. J Appl Oral Sci, 2015. 23(2): p. 169-78.
22. Natarajan, J., C. Chandrashekar, and R. Radhakrishnan. *Critical biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in the head and neck cancers*. J Cancer Res Ther, 2014. 10(3): p. 512-8.
23. de Freitas Silva, B.S., et al. *E-cadherin downregulation and Twist overexpression since early stages of oral carcinogenesis*. J Oral Pathol Med, 2014. 43(2): p. 125-31.
24. Soule, H.D., et al. *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1973. 51(5): p. 1409-16.
25. Miyazaki, Y., et al. *Association of butyric acid produced by periodontopathic bacteria with progression of oral cancer*. 2010, Journal of Cancer Science y Therapy. p. 26-32.
26. Wang, Y., et al. *Sodium butyrate-induced apoptosis and ultrastructural changes in MCF-7 breast cancer cells*. Ultrastruct Pathol, 2016. 40(4): p. 200-4.
27. Andrade, F.O., et al. *Efficacy of the dietary histone deacetylase inhibitor butyrate alone or in combination with vitamin A against proliferation of MCF-7 human breast cancer cells*. Braz J Med Biol Res, 2012. 45(9): p. 841-50.
28. Nibali, L., et al. *Interleukin-6 in oral diseases: a review*. Oral Dis, 2012. 18(3): p. 236-43.
29. Schafer, Z.T. and J.S. Brugge. *IL-6 involvement in epithelial cancers*. J Clin Invest, 2007. 117(12): p. 3660-3.
30. Jiang, X.P., et al. *Down-regulation of expression of interleukin-6 and its receptor results in growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells*. Anticancer Res, 2011. 31(9): p. 2899-906.

31. Sanguinetti, A., et al. *Interleukin-6 and pro inflammatory status in the breast tumor microenvironment*. World J Surg Oncol, 2015. 13: p. 129.
32. Osuala, K.O., et al. *Il-6 signaling between ductal carcinoma in situ cells and carcinoma-associated fibroblasts mediates tumor cell growth and migration*. BMC Cancer, 2015. 15: p. 584.
33. Wolczyk, D., et al. *TNF- α promotes breast cancer cell migration and enhances the concentration of membrane-associated proteases in lipid rafts*. Cell Oncol (Dordr), 2016. 39(4): p. 353-63.
34. Zhou, X.L., et al. *The clinical significance of PR, ER, NF- κ B, and TNF- α in breast cancer*. Dis Markers, 2014. 2014: p. 494581.
35. Kim, M.J., et al. *Arsenic hexoxide enhances TNF- α -induced anticancer effects by inhibiting NF- κ B activity at a safe dose in MCF-7 human breast cancer cells*. Oncol Rep, 2014. 31(5): p. 2305-11.
36. Lu, L., et al. *Tumor necrosis factor- α sensitizes breast cancer cells to natural products with proteasome-inhibitory activity leading to apoptosis*. PLoS One, 2014. 9(11): p. e113783.