

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

ESCUELA POLITÉCNICA DE ORIHUELA

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



UNIVERSITAS
Miguel Hernández



**Aislamiento de cepas bacterianas y estudio de la bioactividad de dos fracciones
extracelulares sobre la línea celular CaCo2**

Julio 2019

Autora: Sara Fandos Planelles

Tutora: Estefanía Valero Cases

Cotutores: Borja Sánchez García y Raquel Marcos Fernández

Índice

Resumen.....	4
Abreviaturas.....	5
1. Introducción.....	6
2. Material y Métodos.....	11
2.1. Preparación de medios de cultivo.....	11
2.2. Recogida de muestras fecales.....	11
2.3. Extracción de la microbiota a partir de materia fecal.....	12
2.4. Siembra de microbiota en placa.....	12
2.5. Aislamiento de colonias y preparación de stocks.....	13
2.6. Extracción de ADN y amplificación PCR.....	14
2.6.1. Reacción En Cadena Polimerasa (PCR).....	14
2.6.2. Extracción de ADN.....	14
2.6.3. Electroforesis en Gel de Agarosa.....	14
2.6.4. Secuenciación de ADN.....	15
2.7. Caracterización de los perfiles de proteínas extracelulares mediante SDS-PAGE.....	15
2.7.1. Precipitación de proteínas.....	15
2.7.2. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).....	16
2.8. Fraccionamiento bacteriano.....	16
2.8.1. Proteína extracelular.....	16
2.8.2. Compuestos polares de bajo peso molecular.....	17
2.9. Bioactividad anti-proliferativa de dos fracciones extracelulares sobre la línea CaCo2 ...	17
2.9.1. Proteína extracelular.....	17
2.9.2. Compuestos polares de bajo peso molecular.....	17
3. Resultados y discusión.....	18
3.1. Aislamiento de microorganismos de la microbiota fecal:.....	18
3.1.1. Selección de placas de cultivo:.....	18
3.1.2. Aislamiento de microorganismos.....	19
3.2. Identificación del ADN de las colonias aisladas.....	19
3.2.1. Visualización del ADN por Electroforesis en Gel de Agarosa.....	19
3.2.2. Secuenciación de ADN e identificación de especies.....	21
3.3. Selección de microorganismos para estudio.....	24
3.4. Fraccionamiento bacteriano.....	26
3.3.1. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con SDS-PAGE.....	26

3.5. Estudio de bioactividad de fracciones bacterianas sobre células CaCo2 con el software RTCA	27
3.5.1. Efecto de proteína extracelular en el crecimiento de células CaCo2.....	27
3.5.2. Efecto de extractos de bajo peso molecular sobre el crecimiento de células CaCo231	
4. Conclusiones.....	36
5. Anexos	37
6. Bibliografía	40



Resumen

La relación entre la microbiota intestinal y la salud es un campo muy interesante y en el que hoy en día hay mucha investigación. El propósito de este trabajo fue estudiar la actividad antiproliferativa de dos fracciones extracelulares (proteína extracelular y compuestos polares de bajo peso molecular) de cinco *Lactobacillus* y un *Clostridium* procedentes de la microbiota intestinal de heces de cerdo, sobre la línea celular CaCo2 de carcinoma colónico humano. Para ello se aislaron e identificaron diferentes cepas, de las cuales se extrajeron las dos fracciones anteriormente mencionadas que se incubaron con las células de carcinoma humano CaCo2. Se obtuvieron los resultados con el software xCELLigence RTCA y se compararon con un control negativo sin fracción bacteriana y dos controles positivos. Los resultados mostraron una tendencia de inhibición de crecimiento celular de CaCo2 por parte de ambas fracciones bacterianas.

Palabras clave: Microbiota, Cáncer colorrectal, Ácidos grasos de cadena corta, *Lactobacillus*, Fracciones extracelulares.

Abstract

The relationship between the gut microbiota and health is a very interesting field and in which there is a lot of research today. The purpose of this work was to study the antiproliferative activity of two extracellular fractions (extracellular protein and polar compounds of low molecular weight) of five *Lactobacillus* and one *Clostridium* from the intestinal microbiota of pig feces, on the human colon carcinoma cell line CaCo2. To this end, different strains were isolated and identified, from which the two mentioned fractions were extracted, which were incubated with the human carcinoma cells CaCo2. The results were obtained with the xCELLigence RTCA software and they were compared with a negative control without bacterial fraction and two positive controls. The results showed a tendency of inhibition of cellular growth of CaCo2 by both bacterial fractions.

Key words: Microbiota, Colorectal cancer, Short chain fatty acids, *Lactobacillus*, Extracellular fractions.

Abreviaturas

AGCC: ácidos grasos de cadena corta

CCR: Cáncer colorrectal

MC: medio de cultivo



1. Introducción

Con un 90% de bacterias en el organismo humano la relación entre microbiota intestinal y enfermedad es un factor muy relevante a considerar del que todavía se desconoce mucho y que está teniendo mucha importancia en la investigación (Banan-Daliri y Lee, 2015).

Diversos estudios de la microbiota intestinal demuestran la influencia en varios ámbitos de la salud, desde conexiones con el cerebro y con el sistema inmune hasta la posibilidad de revertir enfermedades. Según Wang *et. al.* (2018), 'La comunicación entre la microbiota, el intestino y el cerebro está impulsada por la regulación hormonal y neural, así como por las vías inmunes y metabólicas, sin embargo nuestra comprensión del desarrollo subyacente a esta comunicación es todavía limitada'.

El tracto digestivo humano es un perfecto hábitat para trillones de microorganismos vivos que constituyen la microbiota, conviven e interactúan constantemente con el sistema epitelial y el sistema inmune del huésped. La microbiota es específica para cada fracción que constituye el aparato digestivo. La siguiente imagen (Figura 1) muestra la relación de la microbiota en cada cavidad y el pH, siendo menos abundante a mayor acidez (Microbioenergética, 2014).

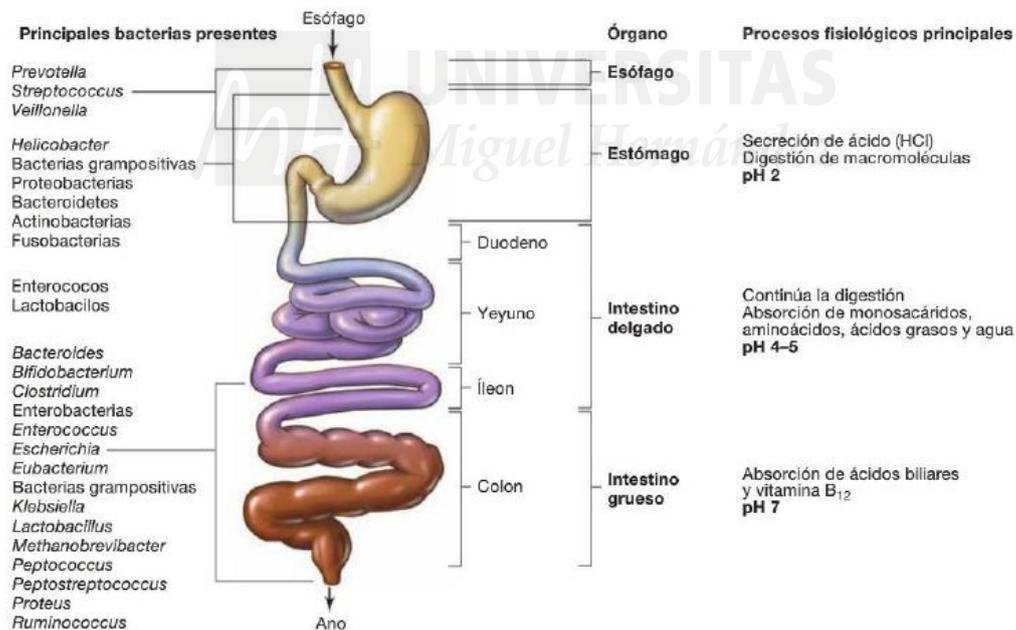


Figura 1. Especies bacterianas presentes en el tubo digestivo humano. Fuente: Microbioenergética, 2014.

En el intestino grueso existe una gran variedad y cantidad microbiana, con una cantidad media de 10^{12} unidades formadoras de colonias por gramo de contenido intestinal (UFC/g), y estas pueden representar un 50-60% de sedimento sólido de las heces. Los filos más abundantes son Firmicutes y Bacteroidetes. Predomina la presencia de géneros bacterianos como *Bacteroides* sp., *Faecalibacterium* sp., *Blautia* sp., *Prevotella* sp., *Clostridium* sp., *Ruminococcus* sp., y

Bifidobacterium sp. (Sánchez *et. al.*, 2017). También constituyen la microbiota intestinal arqueas, protozoos y hongos (levaduras) en menor cantidad (Suárez, J.E. 2013).

Cuando la función y la composición de la microbiota intestinal están alteradas, se conoce como disbiosis. Esta disbiosis se ha relacionado gracias a diversos estudios, con muchas afecciones como enfermedades crónicas inflamatorias, síndrome metabólico, cáncer, enfermedades autoinmunes, alergias, depresión, enfermedad del corazón, estrés, etc (Viennois, Gewirtz y Chassaing, 2019; Wang y Wan, 2019). Asimismo, entre los factores que influyen en la composición de la microbiota se hallan el estilo de vida, el entorno ambiental, la dieta (teniendo ésta una importancia considerable), el método de parto (vaginal o por cesárea), la alimentación en la edad temprana, el estrés etc.

La influencia del estrés sobre la constitución microbiana ha ganado bastante interés. Según Foster, Rinaman y F. Cryan (2017), la exposición al estrés incluso a corto plazo puede afectar a la composición de la microbiota, ya que altera la proporción de los principales tipos de bacterias, y la alteración experimental de la microbiota intestinal influye en la respuesta al estrés, comportamiento similar a la ansiedad. (Galley *et al.*, 2014).

Hay estudios que sugieren que la colonización microbiana comienza en el feto, gracias a los microbios presentes en la placenta y en el líquido amniótico¹, con una dominancia del filo Proteobacteria (Collado *et. al.*, 2016; Zhuang *et. al.*, 2019). En la madre embarazada, los metabolitos bacterianos son reconocidos por el sistema inmunológico y se transmiten al feto, donde refuerzan la inmunidad innata y la resistencia a patógenos (Gomez de Agüero *et. al.*, 2016; Eberl, 2018).

Se sabe que el nacimiento del bebé es clave en la composición de su microbiota. Los bebés nacidos por parto vaginal se exponen a una cantidad mayor de géneros beneficiosos como *Prevotella* spp., *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*; en cambio los nacidos por cesárea están expuestos a otro tipo de bacterias presentes en la piel de la madre, los utensilios y el entorno hospitalario, dominando microorganismos como *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Streptococcus*, etc (Bäckhed *et. al.*, 2015; Zhuang *et. al.*, 2019).

La alimentación juega un rol esencial en la proliferación de un tipo de microbiota u otro. La gran mayoría de bacterias intestinales son anaerobias estrictas, es decir, su crecimiento y supervivencia se da gracias a la energía que obtienen a través de la respiración anaerobia (en ausencia total de oxígeno) y la fermentación de los sustratos disponibles de la dieta, entre ellos los prebióticos (Organización Mundial de Gastroenterología, 2017). Según Corzo *et. al.* (2015), los prebióticos son 'ingredientes alimentarios no digeribles (oligosacáridos) que llegan al colon y sirven de sustrato a los microorganismos, originando energía, metabolitos y micronutrientes utilizados por el hospedador y estimulando el crecimiento selectivo de determinadas especies beneficiosas (principalmente los géneros *Bifidobacterium* sp. y *Lactobacillus* sp.) de la microbiota intestinal'.

¹ Líquido amniótico es una mezcla compleja de componentes maternos y fetales que rodea y amortigua al embrión y luego al feto en desarrollo en el interior del saco amniótico.

La alimentación del niño en la edad temprana, con leche materna o con fórmula, afecta al desarrollo de la microbiota intestinal. La leche materna está constituida por proteínas, grasas, hidratos de carbono, inmunoglobulinas y endocannabinoides, siendo los oligosacáridos uno de los componentes mayoritarios. Estos oligosacáridos, como el Galactooligosacárido (GOS) son fermentados principalmente por *Bifidobacterium*, y favorece la colonización por este género beneficioso. La leche materna también contiene hasta 600 especies bacterianas diferentes, sobretodo bacterias acido-lácticas como el género *Lactobacillus*. En niños alimentados con fórmula se encuentran diferencias entre las características de la microbiota, entre ellas una presencia excesiva de *Clostridium difficile*, una bacteria patógena (Tanaka y Nakayama, 2017).

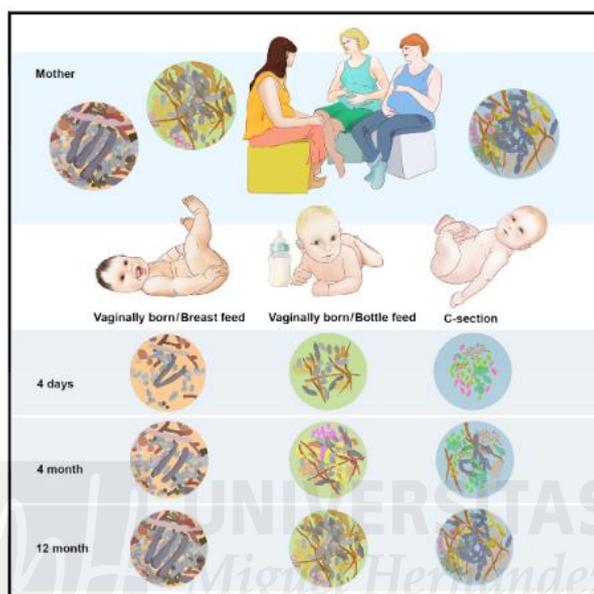


Figura 2. Representación gráfica de la maduración del microbioma intestinal de 98 madres y sus hijos durante el primer año de vida. Influencia en la composición de la microbiota del parto vaginal o por cesárea, y de la alimentación por lactancia o con biberón. Fuente: Bäckhed *et. al.*, (2015).

El citoplasma de ciertas bacterias alberga compuestos polares de bajo peso molecular conocidos como metabolitos. Gran parte de los beneficios de la microbiota intestinal son posibles gracias a la producción de metabolitos, entre ellos los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), por parte de la actividad fermentativa de las bacterias probióticas (Álvarez-Curto y Milligan, 2016). Los AGCC, principalmente butirato, propionato y acetato, evitan el crecimiento de microorganismos patógenos al disminuir el pH intestinal; también sirven de nutrientes a los enterocitos, células epiteliales con función de homeostasis y de barrera intestinal contra antígenos y toxinas, y encargadas de la absorción de nutrientes, agua y electrolitos (Suárez, J.E. 2013).

Los AGCC también neutralizan grupos amonio producidos por la desaminación de aminoácidos por parte de las bacterias. Se sabe que si el amoniaco alcanza niveles altos, actúa como tóxico junto a otras aminos biógenas. La producción de amoniaco es neutralizada por el ácido láctico formando lactato amónico, a partir del cual la microbiota intestinal es capaz de producir polipéptidos y vitaminas (Organización Mundial de Gastroenterología, 2017). La toxicidad de

estas aminas puede asociarse a patologías como el cáncer colorrectal (CCR). Un estudio reveló un incremento de 11 aminoácidos (41-80%) en muestras de heces de pacientes con CCR en comparación con personas sanas (Weir *et. al.*, 2013), lo cual podría ser explicado por una mayor presencia y/o actividad putrefactiva de bacterias proteolíticas como *Clostridium*, *Proteus* o *Pseudomonas*. (Corrales *et. al.*, 2015).

Se ha demostrado que los AGCC protegen contra la inflamación vascular, la producción de citoquinas pro-inflamatorias y el estrés oxidativo (Davie, 2003; Hoffman *et al.*, 2016; Li *et. al.*, 2018). Las citoquinas son moléculas que intervienen en la respuesta inmune del organismo y controlan el grado y el período de activación de la misma (Silk y Margolin, 2019). Una producción desmesurada de citoquinas conduce al desarrollo de afecciones inflamatorias como arterosclerosis, septicemia,... (Ross, 1999; Li *et. al.*, 2018).

Asimismo, una disbiosis intestinal se asocia a desórdenes inmunológicos por inflamación crónica (Gae *et. al.* 2018). Según Meng *et. al.* (2017), se ha considerado la inflamación crónica como una de las causas más importantes en el desarrollo del cáncer, ya que incita a la progresión tumoral y aumenta su velocidad de invasión y metástasis. El exceso de citoquinas participan directamente en el daño del ADN epitelial, y la consecuente metilación anómala de este ADN interfiere en la silencianción o sobreexpresión de genes sustanciales que desajustan la función celular normal y propician el inicio y la evolución tumoral (Yunda y Mancera, 2014).

Se ha estudiado que determinadas poblaciones de bacterias eran similares entre diversos casos de CCR, siendo distintas de los controles. Una revisión sistemática de artículos reveló que en personas enfermas existía una cantidad menor de géneros como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium spp.*, *Roseburia* (Sun y Kato, 2016).

En la línea de distinguir las bacterias que ejercen un efecto beneficioso en el organismo, se utiliza el concepto de probiótico. Según una declaración de consenso internacional, en 2014 se aceptó la denominación de bacteria probiótica por ser capaz de proporcionar beneficios en la salud del huésped, como la capacidad de mejorar alteraciones en la microbiota, regulación del tránsito intestinal, producción de metabolitos como AGCC y exclusión competitiva de patógenos por su habilidad de adhesión al intestino. Entre los géneros y las especies bacterianas probióticas más estudiadas se encuentran *Bifidobacterium* (*adolescentis*, *animalis*, *bifidum*, *breve*, y *longum*) y *Lactobacillus* (*acidophilus*, *casei*, *fermentum*, *gasseri*, *johnsonii*, *reuteri*, *paracasei*, *plantarum*, *ramnosus* y *salivarius*) (Ozogul y Hamed, 2016).

Las bacterias ácido-lácticas (LAB) son un género bacteriano probiótico importante perteneciente al filo Firmicutes. Estas bacterias producen ácido láctico como principal metabolito. Se ha comprobado que este metabolito ejerce un papel anti-tumoral en el que el sistema inmune juega un papel crítico, y sugiere la capacidad de prevenir o interrumpir el desarrollo del CCR, por medio de diversos mecanismos como su actividad antioxidante contra especies reactivas de oxígeno (ROS) y su influencia directa en la respuesta inmune que protege contra la inflamación y contra el desarrollo del tumor. (Zhong, Zhang, and Covasa., 2014).

Existen diversos compuestos extracelulares que podrían explicar mecanismos de acción de todos estos beneficios, son proteínas y enzimas secretadas y liberadas al entorno por bacterias probióticas, que interactúan directamente con células epiteliales e inmunes, regulando mecanismos y respuestas celulares como la secreción de citoquinas, péptidos antibacterianos, etc. (Sánchez et. al., 2008; Sánchez, Urdaci y Margolles, 2010). Ramiah *et. al.* (2008) mostró que algunas enzimas citoplasmáticas (como la elongación del factor Tu, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y trifosfato isomerasa (TPI)) se encontraron como proteínas de superficie de enlace con un rol en la adhesión de *Lactobacillus plantarum* 423 a células Caco2 (línea celular procedente de adenocarcinoma de colon).

El estudio de proteínas y fracciones extracelulares puede proporcionar nuevos horizontes en cuanto a aplicación clínica de bacterias probióticas (Sánchez, Urdaci y Margolles, 2010).



2. Material y Métodos

2.1. Preparación de medios de cultivo

El **medio de cultivo Urea Agar Stuart** se preparó haciendo una mezcla con agua ultrapura 1L donde se añadió agar 20g (Industrias Roko S.A, Spain), urea 20g (GE Healthcare Life Sciences, Sweden), rojo de fenol 0,012g (Panreac, Spain), extracto de levadura 0,1g (Biokar diagnostics), fosfato monopotásico 9,1g (Merck, Germany) y fosfato disódico 9,5g (VWR, Prolabo).

El **medio de cultivo Christensen (Urea Agar Base)** se preparó con agua ultrapura 1L donde se añadió agar 20g, urea 20g, rojo de fenol 0.012g, proteosa peptona 10g (Merck, Germany), fosfato monopotásico 2g, cloruro de sodio 5g (Merck, Germany) y glucosa 1g (Merck).

Se preparó un medio de cultivo **De Man Rogosa Sharpe (MRS)** mezclando agua ultrapura 1L con MRS (Biokar diagnostics y Difco TM Lactobacilli) y agar 20g, y también se preparó el mismo pero añadiendo urea 20g y rojo de fenol 0.012g.

El **medio de cultivo anaerobio** se preparó mezclando agua ultrapura con FAB (Oxoid, UK) y agar 20g, y también se hizo otro añadiendo urea y rojo de fenol.

Una vez hechos todos los medios de cultivo se agitaron en un agitador de medios (Benchmark) hasta que estuvieron bien disueltas, se cerraron y se esterilizaron en autoclave (Certoclav, Austria). Una vez esterilizados, se guardaron en una estufa de medios (Giralt, Precision) a 37 °C hasta su traspaso a placas de cultivo (Labbox, Spain).

2.2. Recogida de muestras fecales

Las muestras fecales se tomaron a partir de cerdos Asturceltas de una granja de la organización del Serida (Villaviciosa, Asturias). Para ello se utilizó una espátula estéril de heces para cada muestra (Bel-art products, USA) y botes estériles donde se depositó cada muestra de heces. Éstas fueron recogidas frescas y del suelo, del centro de las mismas para evitar la contaminación exterior. Inmediatamente se llevaron al laboratorio para proceder a la extracción de la microbiota.

Se realizaron un total de tres recogidas de muestras. La primera correspondió a un lechón de 6 meses y se denominó Muestra 3 (M3). En la segunda recogida se tomaron tres muestras, correspondientes a dos lechones menores de 2 años (M1 y M2) y otro cerdo mayor de 2 años al que se le estaba administrando probiótico (Mprob). En la tercera recogida de muestras se tomaron 4 muestras de lechones menores de dos años (M4), y una procedente de un cerdo adulto de unos 8 años (M5).

2.3. Extracción de la microbiota a partir de materia fecal

La microbiota fue separada del resto de la materia fecal siguiendo el protocolo de gradiente de densidad con solución de Nycodenz al 80% (w/v) (g soluto/100 mL solución) según el método de Hevia *et. al.* (2015) con alguna modificación.

En una cabina de bioseguridad (Telstar, Spain) se homogenizó (Stomacher, IUL Instruments, Barcelona) 1 g de las diferentes muestras fecales con 9 mL de NaCl estéril 0.9% (w/v) durante 1 min. A continuación se preparó 1 mL de solución Nycodenz al 80% (w/v) (progen) al cual se adicionaron 3 mL de muestra líquida fecal previamente homogeneizadas, quedando en dos fases (Figura 1. Img (A)). Las muestras se centrifugaron en ultracentrífuga (40 min, 10000 g, 4°C, Beckman coulter, Optima max 130000rpm), quedando en 5 fases (ver Figura 1. Img (B)). Se resuspendieron las 2 fases de microbiota en NaCl y se centrifugó (5 min, 10000 g, 20°C). Tras otro lavado se realizaron diluciones 1:7 (microbiota: NaCl) de todas las muestras.

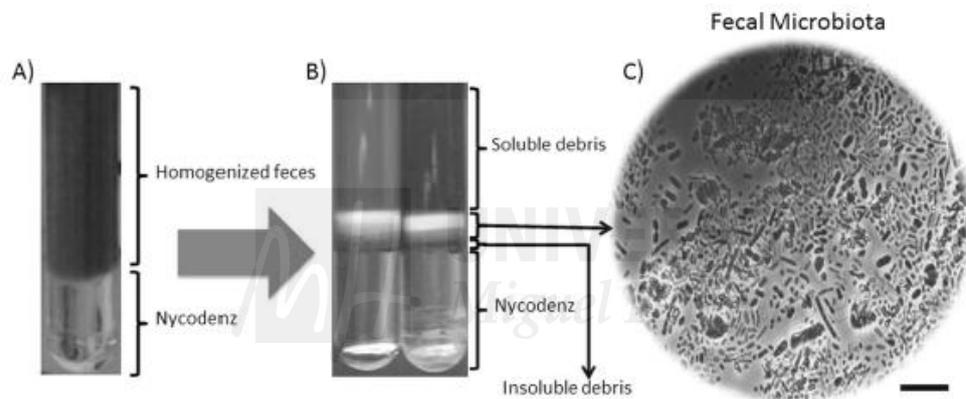


Figura 3. Proceso de la separación en fases de la microbiota sometida a centrifugación en gradiente.

(A) Muestra fecal diluida encima de la solución Nycodenz. (B) Muestra dividida en 5 fases tras ultracentrifugación: la fase superior contenía los desechos solubles; las dos fases siguientes, blanca y gris, correspondían a la microbiota fecal; la cuarta fase estaba compuesta por desechos insolubles y fibras; y la fase inferior correspondía al Nycodenz. (C) Fotografía de la capa de microbiota que muestra una gran diversidad de tamaños y formas. Bar, 10 µm. Fuente: Hevia, *et. al.* (2015)

2.4. Siembra de microbiota en placa

Se sembró a partir de las 3 diluciones menos concentradas de cada muestra de microbiota (-5,-6,-7) en los medios de cultivo previamente preparados. La siembra se realizó con un asa de cultivo (VWR, Germany).

En la primera y segunda recogida de muestras (M1, M2 y M3), se sembró por duplicado en los medios de MRS, FAB anaerobio, Stuart urea y Christensen urea, y se incubó en anaerobiosis (estufa de aerobiosis, Memmert) y aerobiosis (cabina de anaerobiosis, Whitley MG500

anaerobic Workstation, Dw scientific) (excepto el medio de cultivo FAB anaerobio) durante 48h a 37°C. La muestra (M3) también se cultivó en MRS con urea.

La muestra Mprob se sembró por duplicado en MRS y se incubó en anaerobiosis y aerobiosis durante 48h a 37°C.

Con respecto a la tercera recogida de muestras (M4 y M5), la siembra se realizó en medio de cultivo FAB anaerobio urea y MRS urea, y se incubaron en anaerobiosis y aerobiosis (48h, 37°C).

Según las distintas diluciones de microbiota realizadas (-5, -6, -7) se seleccionaron aquellas que presentaron un crecimiento mayor.

El objetivo inicial de la elección de medios con urea y el indicador rojo de fenol (Christensen urea, Stuart urea, MRS urea y FAB anaerobio urea) fue aislar y estudiar bacterias degradadoras de urea (ureasa positivas), las cuales hidrolizan la urea liberando amoníaco y CO₂ con la consecuente alcalinización del entorno y el viraje del medio de cultivo de amarillo a rosado. Como en los cultivos no se obtuvo la cantidad esperada, únicamente se aislaron para su identificación.

2.5. Aislamiento de colonias y preparación de stocks

Tras 48h de incubación se aislaron las bacterias con distintas formas y tamaños. Se dividieron en dos grupos, las bacterias ureasa negativas (cuyo medio de cultivo permaneció sin viraje) y las bacterias ureasa positivas (hicieron virar el medio de amarillo a rosado).

Para ello se realizó una segunda siembra en estría a partir de cada bacteria distinta, en los mismos medios de cultivo de donde fueron extraídas (con y sin urea según si el medio había virado o no). Se diluyeron previamente en 500 µL de medio, y se incubaron en anaerobiosis durante 48h a 37°C.

A continuación se realizó un pre-cultivo con cada colonia de bacteria aislada en MRS líquido (3-5 mL). Se incubaron un total de 53 pre-cultivos (24-48 h, 37°C en anaerobiosis): 17 correspondían a bacterias ureasa positivas de las muestras (M3, M4 y M5), y 37 correspondían al resto (M1, M2 y Mprob).

Tras la incubación se prepararon muestras stock, añadiendo 1 mL de cada pre-cultivo a 3 tubos de Eppendorf y se centrifugaron (5 min, 10000 g, 20 °C) para eliminar el medio (sobrenadante) y concentrar las bacterias en el pellet. Se añadió 1 mL de solución MRS con crioprotector (glicerol al 20%) y se almacenó todo a -20°C para su posterior análisis.

2.6. Extracción de ADN y amplificación PCR

2.6.1. Reacción En Cadena Polimerasa (PCR)

Se realizó inicialmente la PCR siguiendo el protocolo de Kit de Sigma 16s (VWR, Germany). La solución Mix empleada se compuso de dos primers a 0,6 µL, master mix a 12.5 µL, agua de sigma a 10.3 µL y Taq 2x master mix 1.5 mM MgCl₂. Los dos primers utilizados fueron PLB 16 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', anillamiento 60, posición 27F) y pH (5'-AAGGAGGTGATCCAGCGCA-3', anillamiento 55 posición 1600).

Se utilizó un termociclador de PCR (Benchmark, China) con los siguientes parámetros: tras una desnaturalización inicial de 95°C, 5 min, se sucedieron 35 ciclos (95°C 30 seg), templado (55°C, 4 min), y extensión (72°C, 5 min), finalizando el ciclo a 72°C, 10 min.

2.6.2. Extracción de ADN

Se llevó a cabo una extracción de ADN y una segunda PCR. Para ello se siguió un protocolo extracción de ADN con el kit de Sigma para bacterias Gram positivas (VWR, Germany).

Las muestras bacterianas almacenadas se descongelaron y se lavaron con PBS. Se procedió al lisado de ADN resuspendiendo el pellet en 200 µL de Lysis solution (0,045 g lisozima /mL solución lisis) (lisozima, Merck, Netherlands) y en 0,5 µL de mutanolisina (45 min en baño de agua a 37 °C) y en 20 µL de proteinasa K y 200 µL fr Lysis solution C (10 min en baño de agua a 55 °C). Se finalizó el lisado con Etanol absoluto.

A continuación se pasaron las muestras lisadas por columnas hidratadas previamente con Column prepared solution y se centrifugaron (1 min a 13000 g). Se realizaron dos lavados con 500 µL de Wash solution I y de Wash solution concentrate (centrifugación 1 min y 3 min, 13000 g). Tras centrifugar de nuevo (1 min a 13000 g), se añadió Agua de Sigma sobre las columnas colocadas en tubos Eppendorf y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Tras centrifugar (1 min a 13000 g) para obtener el ADN lisado en el pellet, se retiraron las columnas y se congelaron los pellets a -20 °C.

2.6.3. Electroforesis en Gel de Agarosa

La visualización de las bandas de ADN fue posible con la técnica de electroforesis en gel de agarosa, que consistió en el impulso de fragmentos de ADN por una corriente eléctrica a través de un gel, y se separaron según su tamaño. Se incluyó un marcador estándar de peso molecular, que contiene pesos de ADN de longitudes conocidas, y un negativo elaborado con mix de Sigma.

Se realizaron un total de 4 electroforesis en gel de agarosa, que permitió la visualización del ADN amplificado en 4 geles distintos.

Se cargó con las muestras procedentes de la PCR en el gel de agarosa 1% (Sigma, USA) solidificado previamente y se dejó reaccionar en el aparato de electroforesis (40 min, 90V y 1000^a, Bio-ral). El volumen de ADN restante que no se cargó en el gel y se congeló para la posterior secuenciación.

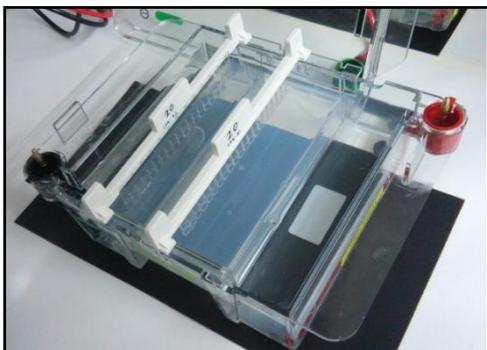


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos de ADN con igual longitud formaron una ‘banda’ en el gel que se puede visualizar a simple vista si el gel se tiñe con un pigmento que se una al ADN, en este caso se utilizó bromuro de etidio en la sala de revelación. Con el programa ‘Genesis’ se visualizaron e imprimieron las bandas de ADN procedentes de la electroforesis en gel de agarosa.

2.6.4. Secuenciación de ADN

Una vez extraído con éxito el ADN de las bacterias, un total de 53 muestras se enviaron a secuenciar a una base de secuenciación del amplicón, que envió los resultados vía e-mail. Estos resultados correspondían a las secuencias de ‘16S ribosomal RNA’ de todas las muestras de ADN analizadas, y se introdujeron en la base de datos Blast (secuencias 16S rRNA para bacterias) de National Center for Biotechnology Information (NCBI) (U.S. National Library of Medicine), que permitía saber género, especie y cepa de cada secuencia introducida y el porcentaje de viabilidad. (**Anexo 1**).

2.7. Caracterización de los perfiles de proteínas extracelulares mediante SDS-PAGE

2.7.1. Precipitación de proteínas

Previamente a la precipitación de proteínas, se hicieron pre-cultivos con MRS a partir de las muestras stock congeladas. Tras 24h (37°C, anaerobiosis) se hicieron pre-cultivos con 50 mL de MRS y se incubaron durante otras 24h en las mismas condiciones.

La precipitación de proteínas extracelulares se logró de acuerdo al método descrito por Sánchez *et. al.* (2008). Se centrifugaron las muestras durante 5 min (3500 rpm, 20°C). Los

sobrenadantes se mezclaron con ácido tricloroacético (TCA) al 6%, y se dejó que precipitaran las proteínas a 4°C durante 48 horas. Se recuperaron las proteínas por centrifugación (5 min, 3500 rpm) y se lavaron los pellets con 1 mL de acetona a 4°C. Se hicieron muestras stock de 1 mL por triplicado. Tras un segundo lavado con acetona, se dejó secando el pellet (conteniendo la proteína) en una campana de secado (Fumex, Sweden) durante 24h.

2.7.2. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

El principio que se utiliza en electroforesis se fundamenta en la atracción de cargas eléctricas. El dodecilsulfato sódico (SDS) se une a la proteína, la desnaturaliza y le confiere carga negativa, lo que ocasiona que migren hacia el ánodo a través del gel (carga contraria). La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa, más rápida es la migración.

Siguiendo el protocolo descrito por Sánchez *et. al.* (2008), se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida (Invitrogen, USA) con dodecilsulfato sódico (SDS) (Affymetrix, USA). Tras el secado de los pellets de proteína precipitada, se resuspendieron en 80 µL de SDS (Loading Sample Buffer) y se sometieron a un baño de ultrasonidos (4 ciclos, 10 min/ciclo, Selecta, Ultrasons-H). La electroforesis tuvo lugar durante 1h (200V, 40mA) en la máquina de electroforesis (Consort, modelo E455, Belgium). Se utilizó el peso molecular (Thermo Fisher, protein ladder, Lituania) que permitía comparar y averiguar el peso de las bandas proteicas de las muestras. Para el negativo se empleó *Lactobacillus rhamnosus* (LGG). Se lavaron los geles (5 min) por triplicado para eliminar el SDS con la ayuda de un agitador estático (Stuart, modelo gyro rocker 55L3). Por último se bañó cada gel en líquido de tinción azul de comasíe (Thermo scientific, USA) y se dejó 24h en agitación. Tras este periodo se lavó y se procedió al Scanner de los geles con el programa LabScan.

2.8. Fraccionamiento bacteriano

Se seleccionaron 6 cepas de bacteria para el estudio (*Lactobacillus Reuteri* (2 cepas distintas), *Lactobacillus Ruminis*, *L. Gasseri*, *L. amylovorus* y *Clostridium Baratti*) y se hizo un cultivo en 40 mL de MRS. Tras 24h de incubación (anaerobiosis, 37°C) se centrifugó (5 min a 3500 rpm) y se extrajeron los sobrenadantes para el estudio de proteína extracelular. Por otro lado se almacenaron los pellets con el ADN a -20°C hasta posterior fraccionamiento de compuestos polares de bajo peso molecular.

2.8.1. Proteína extracelular

Se realizó una segunda precipitación de proteínas siguiendo el modelo descrito por Sánchez *et. al.* (2008), con ácido tricloroacético (TCA) al 6% e incubando las proteínas a 4°C durante 48 horas, por triplicado para cada una de las 6 cepas. Tras recoger el precipitado se dejó secando 24h hasta su análisis con la línea celular CaCo2.

2.8.2. Compuestos polares de bajo peso molecular

Se resuspendieron los pellets de ADN de las cepas de bacteria seleccionada en 16 mL de Agua MiliQ. Se agitaron (agitador orbital, Stuart, modelo rotator SB3) durante 24h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se centrifugaron las 6 muestras (5 min, 3500 rpm y sin freno) y se obtuvieron tres fases: sobrenadante (gran parte de extractos de bajo peso molecular) y fases intermedia e inferior (agua MiliQ y pequeños restos de cloroformo y metanol).

Posteriormente se pipetearon 2 mL de cada sobrenadante y se sometieron a evaporación en una Speed back (centrifugación en vacío) (Eppendorf, Concentrator 5301) durante 24h. Se obtuvieron los pellets con los extractos sólidos de bajo peso molecular, que corresponden a los metabolitos producidos por la bacteria en el citoplasma.

2.9. Bioactividad anti-proliferativa de dos fracciones extracelulares sobre la línea CaCo2

2.9.1. Proteína extracelular

Se resuspendió la proteína desecada de cada bacteria en 50 μ L de medio de cultivo de la línea celular CaCo2 y se dejó a 4 °C durante 24h. Se añadieron 50 μ L más de medio de cultivo celular y se disolvieron con baño de ultrasonidos (Selecta, Ultrasons-H) durante 10 min y agitación en vortex (VWR, Germany).

Se prepararon tres controles, dos de ellos negativos, uno con medio de cultivo celular Caco2 (MC Caco2) y otro con proteína de MRS para distinguir las respuestas celulares a la proteína del MRS de las respuestas celulares a la propia bacteria; y un control positivo con 5 fluorouracilo (FU) 1mM (Ci=2mM) contenido en dimetil sulfóxido (DMSO) 10mM, siendo FU un control excelente para detener la mitosis.

Se prepararon distintas concentraciones de las soluciones de proteína resuspendidas (50 μ L, 25 μ L, 12,5 μ L, 6,25 μ L), completando hasta un volumen de 100 μ L con medio de cultivo (MC) Caco2. Se incubaron con 100 μ L de MC CaCo2 y se dejaron 48h conectadas al programa RTCA, un paquete de software integrado que ejecuta y analiza datos de células en tiempo real.

2.9.2. Compuestos polares de bajo peso molecular

Se tomaron las muestras preparadas anteriormente con extractos sólidos de bajo peso molecular y se calcularon y prepararon distintas concentraciones de 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 (mg/mL), completando hasta un volumen de 100 μ L con MC Caco2. Se prepararon dos controles, un control positivo con 5 fluorouracilo (FU) 1mM (Ci=2mM) contenido en dimetil sulfóxido (DMSO) 10mM, y un control negativo con medio de cultivo celular.

Se incubaron con 100 μ L de MC CaCo2 y se dejaron 48h conectadas al programa RTCA.

3. Resultados y discusión

3.1. Aislamiento de microorganismos de la microbiota fecal:

3.1.1. Selección de placas de cultivo:

Tras la siembra en placa y la incubación de microorganismos se observó el crecimiento en los distintos medios de cultivo. En la **Tabla 1** se muestran las placas seleccionadas para realizar el aislamiento de microorganismos según las muestras, los medios y las condiciones de almacenamiento empleadas (anaerobiosis y aerobiosis).

Tabla 1. Placas de cultivo seleccionadas para aislamiento de microorganismos.

Muestras	Medios de cultivo	N° placas seleccionadas	
		Anaerobiosis	Aerobiosis
(M3)	FAB (Anaerobio)	2	-
	Urea Stuart	-	-
	Urea Christensen	-	-
	MRS	2	1
(M1), (M2) y (Mprob)	FAB (Anaerobio)	2	-
	Urea Stuart	-	-
	Urea Christensen	2	-
	MRS	1	1
(M3) Ureasa +*	MRS Urea	1	-
(M4) y (M5) Ureasa +	Anaerobio (Fab)	-	-
	MRS Urea	4	-

M3 (Muestra primer muestreo); M1 (Muestra 1 segundo muestreo); M2 (Muestra 2 segundo muestreo); Mprob (Muestra de cerdo suplementado con probiótico segundo muestreo; solo se cultivó en MRS); M3 Ureasa + (Muestra primer muestreo utilizada para estudiar actividad ureasa); M4 y M5 Ureasa + (Muestra tercer muestreo para estudiar actividad ureasa). *Ureasa + = (Ureasa positiva).

Las muestras M3 correspondientes al primer muestreo en las que hubo mayor crecimiento fueron las sembradas en medio FAB anaerobio y en MRS anaerobio, seleccionando también una placa de cultivo incubada en aerobiosis. En cuanto al segundo muestreo, el crecimiento de las muestras M1 y M2 fue mayor en los medios MRS anaerobio, FAB anaerobio y Christensen agar urea anaerobio. Se seleccionaron dos placas de MRS, una aerobia y otra anaerobia, donde creció Mprob. Entre las muestras M4 y M5 correspondientes al tercer muestreo se observó que las colonias crecieron mejor en MRS urea anaerobio.

Las colonias crecieron en mayor abundancia en condiciones de anaerobiosis (ausencia de oxígeno). También se observó mayor crecimiento de bacterias ureasa negativas en medio MRS, con lo que cabe deducir que en su mayoría podían ser ácido láctico. Las bacterias ureasa positivas también mostraron mejor crecimiento en MRS urea.

3.1.2. Aislamiento de microorganismos

En la **Tabla 2** se refleja este recuento y la cantidad de colonias aisladas según los distintos medios y muestras de bacterias ureasa negativas.

Tabla 2. Aislamiento de bacterias ureasa negativas

	MRS Anaerobio	MRS Aerobio	FAB anaerobio	Christensen urea anaerobio	FAB anaerobio urea
M3	4 ais, >200 UFC	5 ais, 170 UFC			13 ais, >200 UFC
M1			6 ais, 28 UFC	4 ais, 57 UFC	
M2			1 ais, 1 UFC	2 ais, 144 UFC	
Mprob	3 ais*, 85 UFC	5 ais, 157 UFC			

*ais = número de colonias aisladas por placa, UFC = unidades formadoras de colonias. M3 (Muestra primer muestreo); M1 (Muestra 1 segundo muestreo); M2 (Muestra 2 segundo muestreo); Mprob (Muestra de cerdo suplementado con probiótico segundo muestreo; solo se cultivó en MRS). Número total de microorganismos aislados: 42.

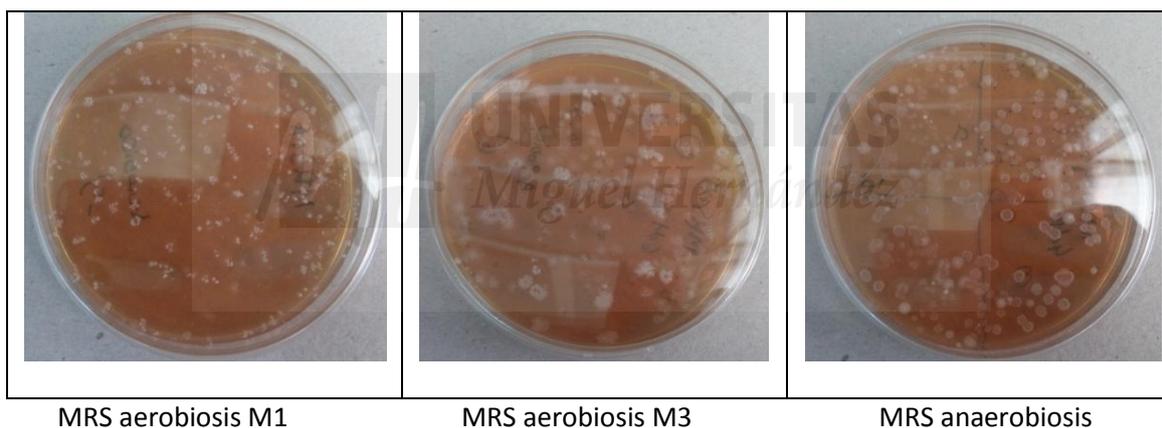


Figura 5. Diversidad de microorganismos que crecieron en los medios MRS aeróbico y anaeróbico, y de los cuales se aislaron varias colonias.

Los microorganismos aislados por distinta morfología física fueron 36 ureasa negativos (aquellos que no habían hecho virar el medio) y 17 ureasa positivos (aquellos que sí hicieron virar el medio de amarillo a rosado).

3.2. Identificación del ADN de las colonias aisladas

3.2.1. Visualización del ADN por Electroforesis en Gel de Agarosa

La **Figura 6** muestra varias especies de bacteria que, posteriormente a la identificación, se seleccionaron para realizar el estudio de fracciones extracelulares. Un total de 6 bacterias

Gram positivas: 4 lactobacilos (*L. Ruminis*, *L. Reuteri* (2), *L. Amylovorus* y *L. Gasseri*) y *Clostridium baratii*.

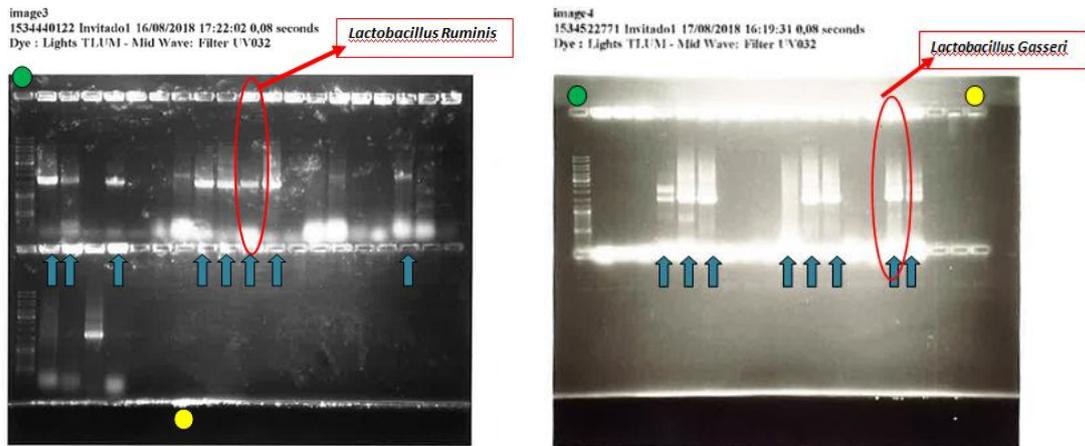


Figura 6. Geles 1 y 2. Visualización de ADN por Electroforesis en Gel de Agarosa.

● Negativo (Mix Sigma); ● Peso molecular;
↑ Bandas ADN: Gel 1: 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A /Gel 2: 9A, 10A, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A.
 (Recuento de izquierda a derecha)

La primera y segunda electroforesis mostraron 15 bandas de ADN extraído correctamente. Las bandas de ADN sin marcar indicaban que el ADN no se había extraído bien, un total de 15 en el Gel 1, y 11 en el Gel 2. Se sometió a dichas bacterias a una extracción de ADN y a una segunda PCR y electroforesis.

Las bandas de ADN señaladas muestran el nombre de la bacteria de estudio a la que pertenecen, siendo *Lactobacillus Ruminis* (6A) y *Lactobacillus Gasseri* (14A).



Figura 7. Gel 2. Visualización de ADN. Bacterias ureasa negativas (B) y ureasa positivas (C)

● Negativo (Mix Sigma); ● Peso molecular;
↑ Bandas de ADN: 1B, 2B, 3B, 4B, 5B, 6B, 7B, 8B, 9B, 10B, 11B, 12B, 13B, 14B, 15B, 16B, 17B, 18B, 19B, 20B, 21B, 1C, 2C, 3C, 4C. (Conteo de izquierda a derecha)

La **Figura 7** muestra la tercera electroforesis con las bandas pertenecientes a las bacterias cuyo ADN requirió de una extracción previa a PCR, ya que mostró un resultado incorrecto en la primera y segunda electroforesis. Hubo un total de 26 muestras. Se seleccionaron dos cepas de *Lactobacillus Reuteri* (2B y 7B), un *Lactobacillus Amylovorus* (11B) y *Clostridium Baratii* (21B). Las muestras 1C, 2C, 3C y 4C pertenecían a bacterias ureasa positivas que se aislaron de la muestra M2.



Figura 8. Visualización de ADN. *Bacterias ureasa positivas(C)*
● Negativo (Mix Sigma); ● Peso molecular;
Bandas de ADN: 5C, 6C, 7C, 8C, 9C, 10C, 11C, 12C, 13C, 14C, 15C, 16C, 17C, 18C.
(Conteo de izquierda a derecha)

Todas las especies aisladas ureasa positivas correspondían a la cuarta electroforesis, y fueron identificadas como un mismo género, *Streptococcus gallolyticus*.

3.2.2. Secuenciación de ADN e identificación de especies.

Se consideraron resultados viables con una coincidencia del 97 % o superior con respecto a la base de datos BLAST. Los resultados mostraron 45 muestras con resultados viables, y se expusieron a continuación, según la procedencia y el medio y condiciones de cultivo utilizados (**Anexo 1**).

En primer lugar se muestran los resultados de la muestra de heces **M3** correspondiente a la primera recogida de muestras de un lechón de 6 meses de edad.

Tabla 3. Recuento de microorganismos identificados de la muestra **M3**.

Género, especie y cepa	Medios y condiciones de cultivo				Total colonias
	FAB anaerobio	MRS anaerobio	MRS aerobio	MRS Urea	
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM20016	3	3	2		8
<i>Lactobacillus amylovorus</i> str 30SC	1	2	1		4
<i>Lactobacillus ruminis</i> ATCC 27782		1			1
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC9790	1				1
<i>Streptococcus uveris</i> 0140J	1				1
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subs DSM16831				3	3

M3 (muestra del lechón de 6 meses) es la muestra de heces en la que se observó más variedad y cantidad microbiana: tres lactobacilos (*L.reuteri* DSM20016, *L.amylovorus* str 30SC y *L.ruminis* ATCC 27782), un enterococo (*Enterococcus hirae* ATCC9790) y dos estreptococos (*Streptococcus uveris* 0140J y *Streptococcus gallolyticus* subs DSM16831).

Se observó que *Lactobacillus reuteri* es anaerobio facultativo, es decir, es anaerobio pero puede desarrollarse en presencia de oxígeno. Es el lactobacilo más abundante en la muestra analizada (8 colonias en 3 medios de cultivo distintos). *Lactobacillus amylovorus* también es anaerobio facultativo, y precedió a *L. reuteri* con 4 colonias en 3 medios distintos. *Lactobacillus ruminis* sólo se consiguió aislar del medio MRS anaerobio, y solo se detectó en esta muestra.

A continuación, se muestran los microorganismos aislados de las muestras **M1** y **M2** (Tabla 4) y **Mprob** (Tabla 5) correspondientes al segundo muestreo.

Tabla 4. Recuento de microorganismos identificados de las muestras **M1** y **M2**.

	Género, especie y cepa	Medios y condiciones de cultivo	
		FAB anaerobio	Christensen Urea anaerobio
M1	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM20016	1	
	<i>Enterococcus faecium</i>		1
	<i>Escherichia coli</i> str.K-12 substr. MG1655/ <i>Shigella</i> disenteria SD197		1
	<i>Escherichia coli</i> O83:H1 str NRG857C/ <i>Shigella dysenteriae</i> SD197	1	
M2	<i>Shigella dysenteriae</i> SD197		1
	<i>Escherichia coli</i> A12 substrain MG1655 / <i>Shigella flexneri</i> 2a str 301	1	
	<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC33323		1

Se observaron únicamente 2 lactobacilos (*L. reuteri* y *L. gasseri*). *L. gasseri* solo se logró aislar de esta muestra, y creció en medio de cultivo Christensen con urea en anaerobiosis.

El resto de colonias aisladas de estas muestras fueron *E.coli* y *Shigella*, y un enterococo (*Enterococcus faecium*).

Tabla 5. Recuento de microorganismos identificados de las muestras **Mprob**.

Género, especie y cepa	Medios y condiciones de cultivo	
	MRS anaerobio	MRS aerobio
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM20016		1
<i>Lactobacillus amylovorus</i> str 30SC	2	2
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subs DSM16831		1

En las heces del cerdo al que se administraba probiótico (Mprob) se identificaron más colonias de *L. amylovorus*, que creció en MRS, tanto en medio anaerobio como aerobio. *L. reuteri* también fue identificado, y una bacteria ureasa positiva, *Streptococcus gallolyticus*, aislada del medio aerobio.

Por último, de las muestras **M4** y **M5** correspondientes al tercer muestreo solo se aislaron bacterias ureasa positivas y el resultado fue una sola especie identificada: *Streptococcus Gallolyticus*, con un total de 13 colonias entre las distintas muestras, incubadas en MRS y condiciones de anaerobiosis.

La filogenia es el estudio de las relaciones evolutivas. Un análisis filogenético bacteriano no sólo nos indica las relaciones evolutivas entre las secuencias o especies, sino también cuales descienden de ancestros comunes y cuáles son las distancias entre ellas. Los métodos de reconstrucción filogenética más habituales asumen que todas las secuencias o especies provienen de partir un ancestro común mediante bifurcaciones. En la **Figura 8** se muestra el árbol filogenético de las especies identificadas.

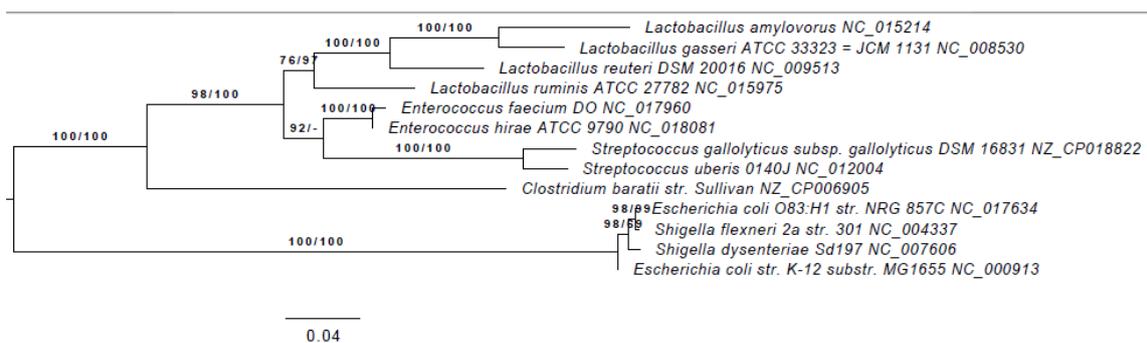


Figura 8. Árbol filogenético de todas las especies

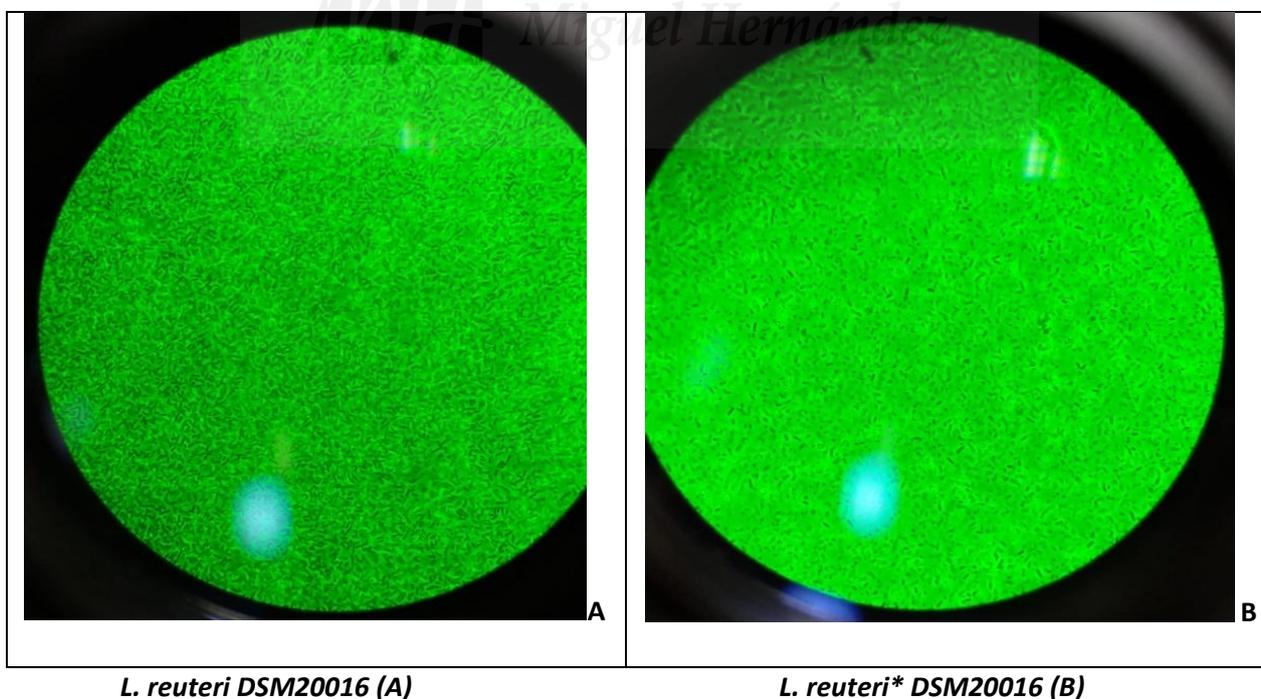
3.3. Selección de microorganismos para estudio

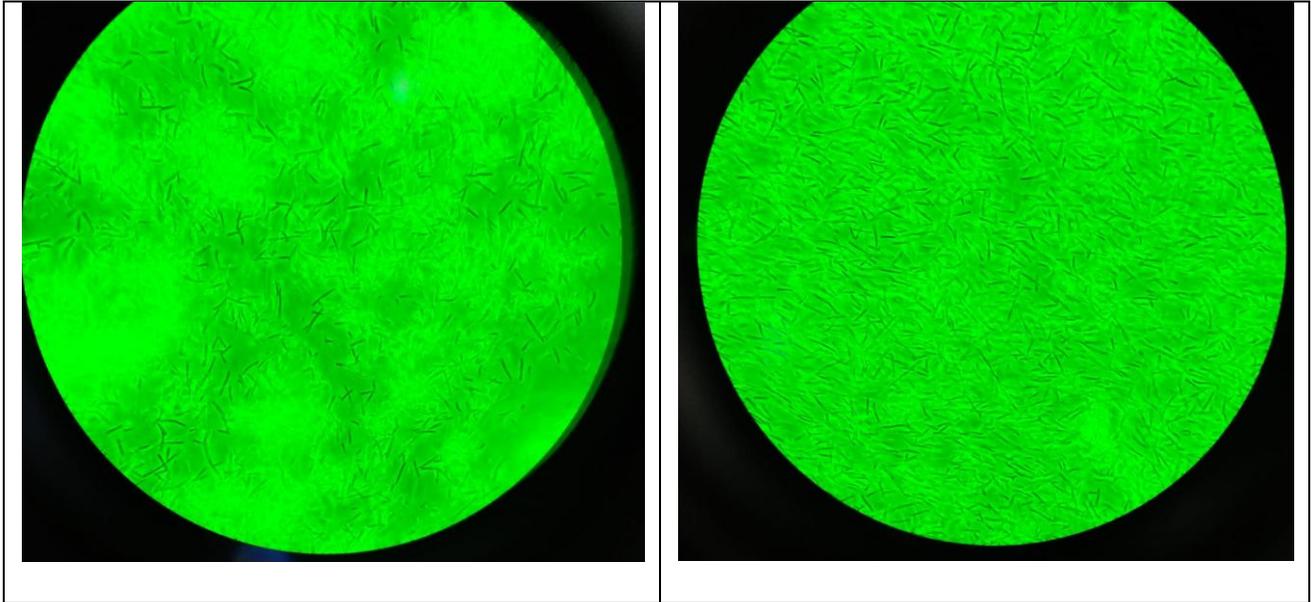
La **Tabla 6** muestra la selección de 4 especies anaerobias facultativas del género *Lactobacillus* y una especie anaerobia *Clostridium Baratii*.

Tabla 6. Especies seleccionadas e identificadas y porcentajes de viabilidad.

Muestra	Medio de cultivo	Código aislado	Género, especie y cepa	% Viabilidad
M3	FAB anaerobio	2B	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM20016.(A)*	99%
M3	FAB anaerobio	7B	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM20016.(B)*	99%
M3	MRS anaerobio	21B	<i>Lactobacillus amylovorus</i> str 30SC	99%
M1	FAB anaerobio	11B	<i>Clostridium baratii</i> str Sullivan	97%
M3	MRS anaerobio	6A	<i>Lactobacillus ruminis</i> ATCC 27782	99%
M2	Urea Christensen aerobio	14A	<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC33323	98%

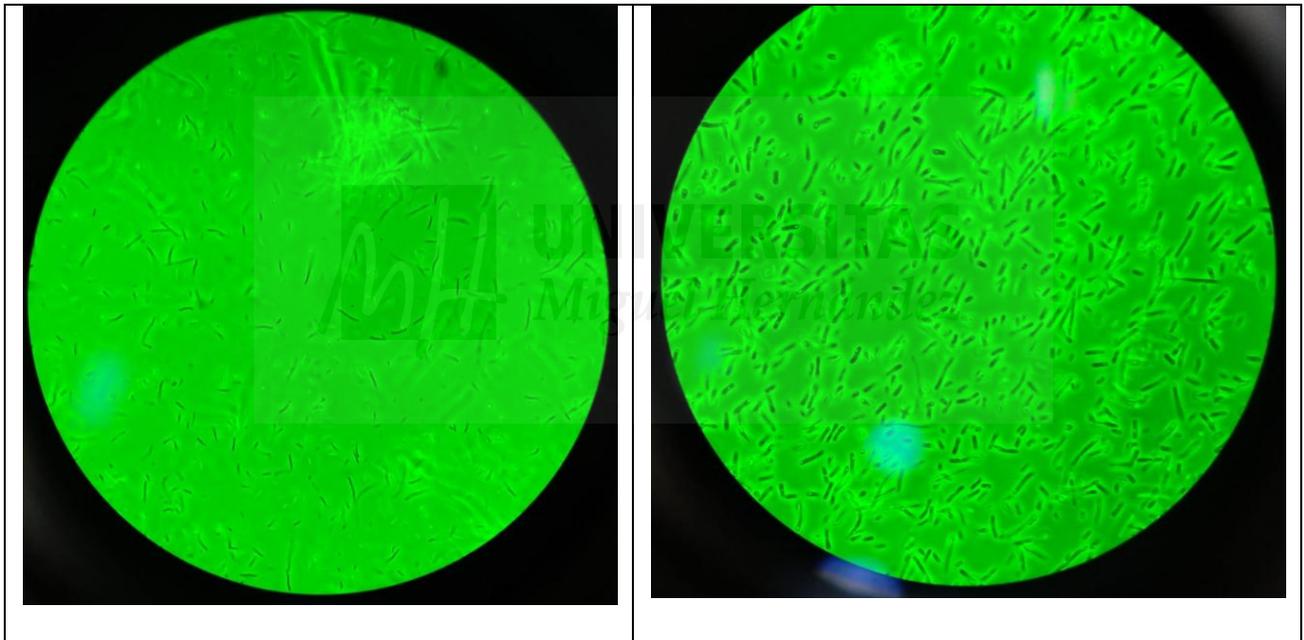
Se consideró viabilidad > 97%. (A)* = Cepa 1 y (B)* = Cepa 2 de *Lactobacillus reuteri* DSM20016. M3= Muestra 3, M2= Muestra 2, M1= Muestra 1. El código aislado hace referencia al código asignado en la secuenciación del ADN.





L. amylovorus str 305C

L. ruminis ATCC 27782



L. gasseri ATCC33323

Clostridium baratii str Sullivan

Figura 9. Morfología de las bacterias seleccionadas.

3.4. Fraccionamiento bacteriano

3.3.1. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con SDS-PAGE

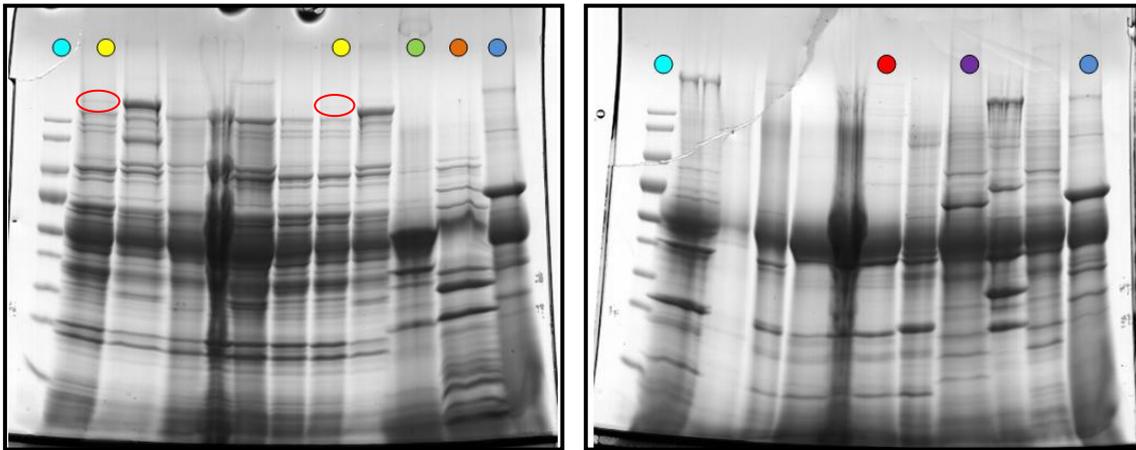


Figura 10 . Gel 1 y 2. Visualización de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida. ● *Lactobacillus reuteri* (A y B), ● *Lactobacillus ruminis*, ● *Clostridium baratii*, ● *Lactobacillus amylovorus*, ● *Lactobacillus gasseri*, ● *Lactobacillus rhamnosus* (control), ● Peso molecular. Los dos fragmentos rodeados en rojo de las bandas proteicas de *L.reuterii* indican una diferencia entre ambos perfiles proteicos.

Las cadenas polipeptídicas de la proteína formaron un complejo con moléculas cargadas negativamente de SDS y migraron a través de un gel poroso de poliacrilamida a una velocidad que reflejó su peso molecular.

Se señalaron las 6 especies bacterianas seleccionadas para el estudio. Se pudo apreciar una pequeña diferencia de la proteína migrada de las dos bacterias *L. reuterii*. Esto podría sugerir que ambas especies pertenecen a cepas distintas y podrían poseer características distintas, al tener distinto perfil proteico.

3.5. Estudio de bioactividad de fracciones bacterianas sobre células CaCo2 con el software RTCA

3.5.1. Efecto de proteína extracelular en el crecimiento de células CaCo2

Se realizaron 3 experimentos con 2 columnas de 8 pocillos cada una. Cada columna correspondía a la proteína extracelular de cada bacteria, y cada pocillo a una concentración distinta y a los controles positivos y negativos.

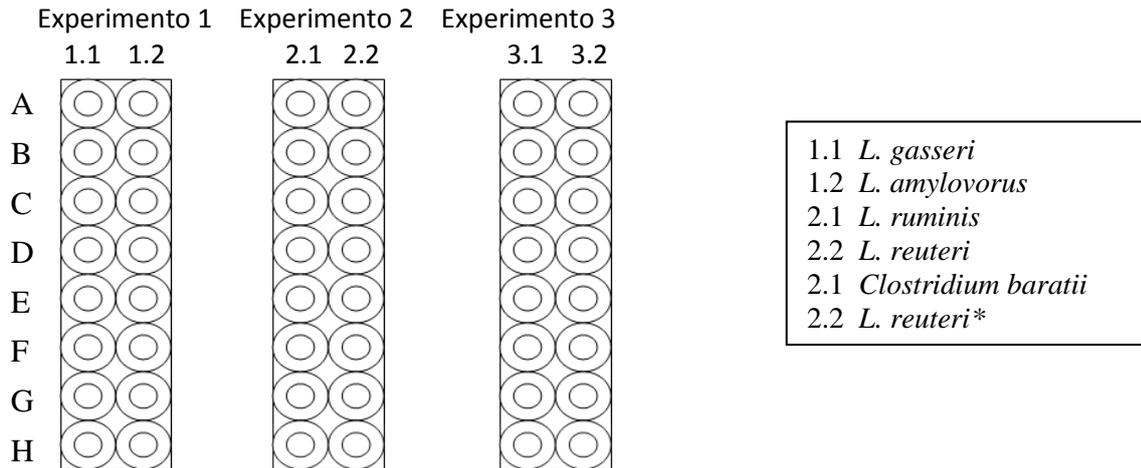


Figura 11. Se representan las 3 placas utilizadas (Experimento 1, 2 y 3) con proteína extracelular sobre la línea CaCo2 utilizando el programa RTCA.

1.1 L. GASSERI

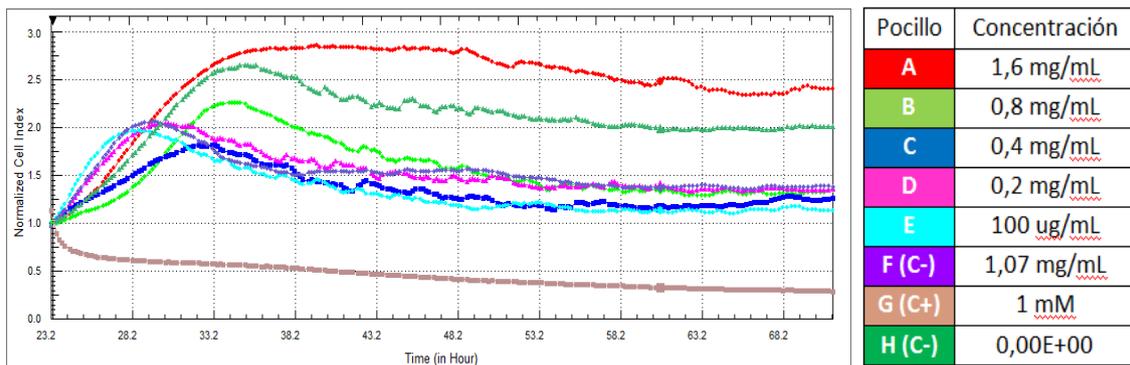


Figura 12. Crecimiento de la línea celular CaCo2 con distintas concentraciones de proteína extracelular de *L. gasseri* (A-B-C-D-E), control negativo MRS (F(C-)), control positivo con FU+DMSO (G(C+)), control negativo con medio de cultivo CaCo2 (H(C-)). (ug= µg)

1.2 L. AMYLOVORUS

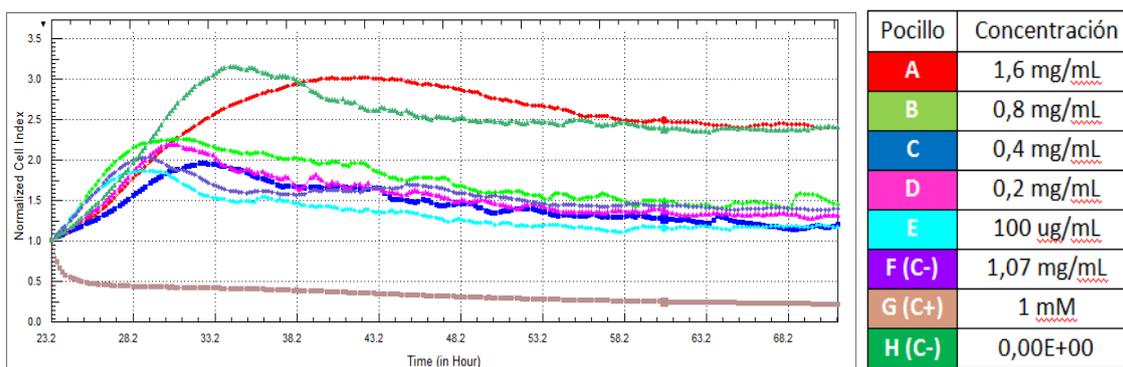


Figura 13. Crecimiento de la línea celular CaCo2 con distintas concentraciones de proteína extracelular de *L. amylovorus* (A-B-C-D-E), control negativo MRS (F(C-)), control positivo con FU+DMSO (G(C+)), control negativo con medio de cultivo CaCo2 (H(C-)). ($\mu\text{g} = \mu\text{g}$)

Se observó que la máxima concentración de proteína de *L. gasseri* y *L. amylovorus* (1,6 mg/mL) no ejercían un efecto apoptótico sobre las células, incluso superaban el crecimiento del control negativo con medio celular (H). El control negativo con proteína de MRS (F) mostró un efecto sobre el crecimiento celular, siendo muy similar al efecto de la concentración (D) de proteína extracelular (0,2 mg/mL). En general, a medida que disminuía la concentración proteica, el crecimiento celular fue menor en ambas bacterias, exceptuando la concentración (D) de 0,2 mg/mL, que favoreció el crecimiento más la concentración (C) con 0,4 mg/mL.

Según Meng, Bai, Brown, Hood y Tian (2018), 'las especies de *Lactobacillus* son los probióticos más utilizados en ensayos clínicos por la regulación de la respuesta inmune en el intestino de pacientes con CCR'. Estos resultados podían sugerir que la proteína extracelular en ciertas concentraciones puede inhibir parcialmente el crecimiento de las células CaCo2, y a más pequeña la concentración, más inhibición se observó.

2.1 L. RUMINIS

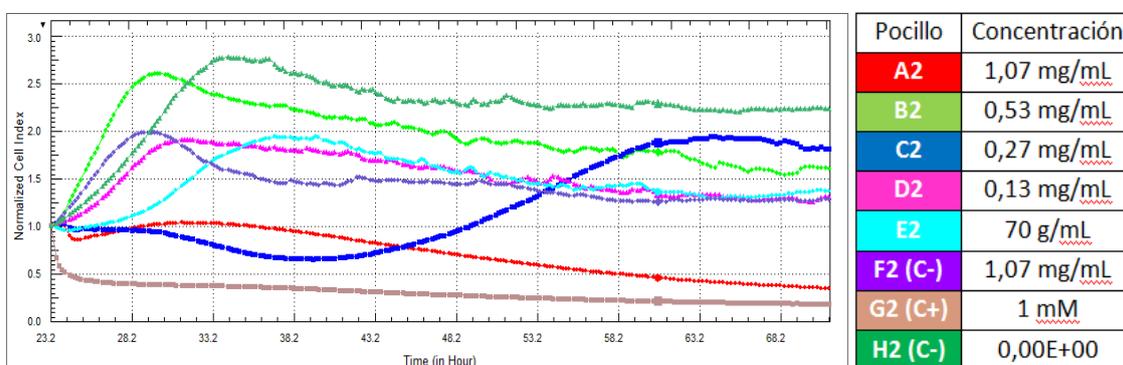


Figura 14. Crecimiento de la línea celular CaCo2 con distintas concentraciones de proteína extracelular de *L. ruminis* (A2-B2-C2-D2-E2), control negativo MRS (F2(C-)), control positivo con FU+DMSO (G2(C+)), control negativo con medio de cultivo CaCo2 (H2(C-)). ($\mu\text{g} = \mu\text{g}$)

La concentración más alta (A2) de la proteína extracelular de *L. ruminis* (1,07 mg/mL) presentó una tendencia apoptótica al disminuir el índice celular a niveles cercanos al control positivo (G2) con fluorouracilo (FU), que tiene la capacidad de detener la mitosis y por tanto la proliferación celular. El resto de concentraciones también provocaron un crecimiento menor al del control negativo de medio celular. Llamó la atención la concentración C2 (0,27 mg/mL), que inhibió el crecimiento celular en las primeras 24 horas, aunque luego éste aumentó hasta las 48 horas.

Lactobacillus ruminis es una de las principales bacterias reconocida como probiótico, que se sabe que abarca distintas acciones como la mejora del sistema inmune y la barrera intestinal, la proliferación celular e inducción de apoptosis en células cancerosas (Heydari, Rahaiae y Alizadeh, 2019).

2.2 L. REUTERI

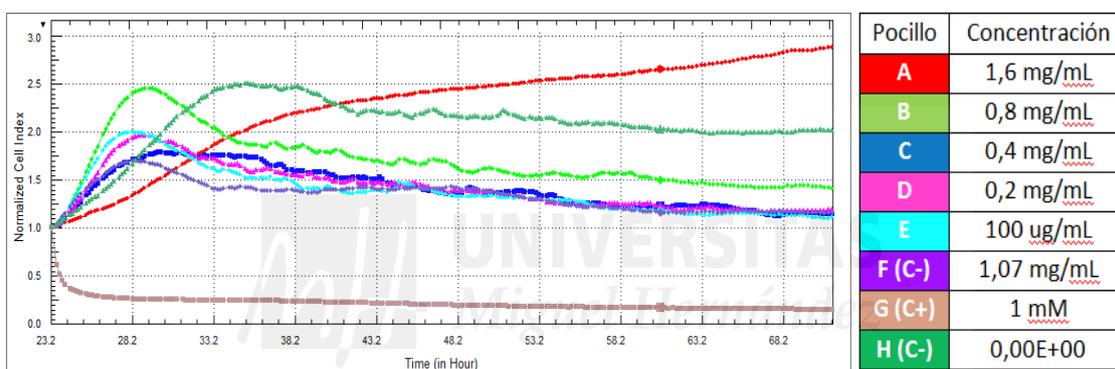


Figura 15. Crecimiento de la línea celular CaCo2 con distintas concentraciones de proteína extracelular de *L. reuteri* (A-B-C-D-E), control negativo MRS (F(C-)), control positivo con FU+DMSO (G(C+)), control negativo con medio de cultivo CaCo2 (H(C-)). (ug= µg)

Se observó que la máxima concentración (A) de proteína de *L. reuteri* (1,6 mg/mL) tuvo un crecimiento más bajo que el control negativo de medio celular (H) durante las primeras 17 horas (punto en la gráfica entre 38,2 h y 43,2 h), y luego la proliferación celular fue incrementando por encima de dicho control negativo. En el rango de la gráfica entre 33,2 h y 43,2 h se observó definitivamente como disminuyó la proliferación celular a medida que había una concentración menor de proteína de *L. reuteri* (B-C-D-E), siendo (E) y la proteína de MRS (F) las que menos proliferación inducían.

CLOSTRIDIUM BARATII

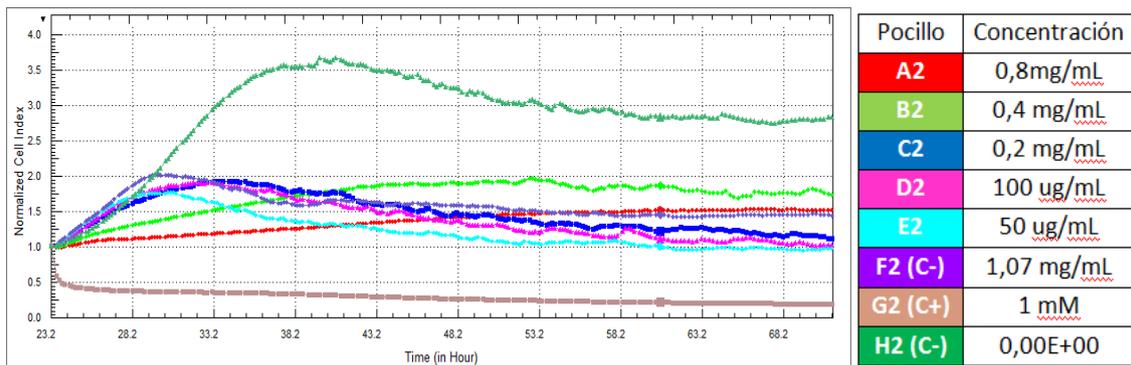


Figura 16. Crecimiento de la línea celular CaCo2 con distintas concentraciones de proteína extracelular de *L. reuteri* (A-B-C-D-E), control negativo MRS (F(C-)), control positivo con FU+DMSO (G(C+)), control negativo con medio de cultivo CaCo2 (H(C-)). (ug= µg)

Todas las concentraciones de proteína de *Clostridium baratii* presentaban una inhibición de crecimiento celular similar. Se observó en el intervalo entre 0 y 15 horas de incubación (en la gráfica es el intervalo entre 23,2 h y 38,2 h), un desarrollo celular más bajo con la concentración (A2) de proteína más alta (0,8 mg/mL), seguido de la concentración (B2) (0,4 mg/mL). Tras este intervalo, el resto de concentraciones (C2-D2-E2) inhiben la proliferación celular en mayor medida, situándose por debajo de la concentración (B2), y posteriormente por debajo de la (A2) en el intervalo de la gráfica entre 43,2 h y 50,2 h, correspondiente a un tiempo de incubación entre 20 y 30 horas.

La proteína extracelular de *Clostridium baratii* mostró inhibición de crecimiento celular CaCo2, muy similar a la inhibición observada en *Lactobacillus*, lo cual es interesante al ser la especie *Clostridium* considerada como causante de ciertas enfermedades como botulismo, tétanos, infecciones de tejido severas y diarrea. (Thind y Preis, 2014).

L. REUTERI*

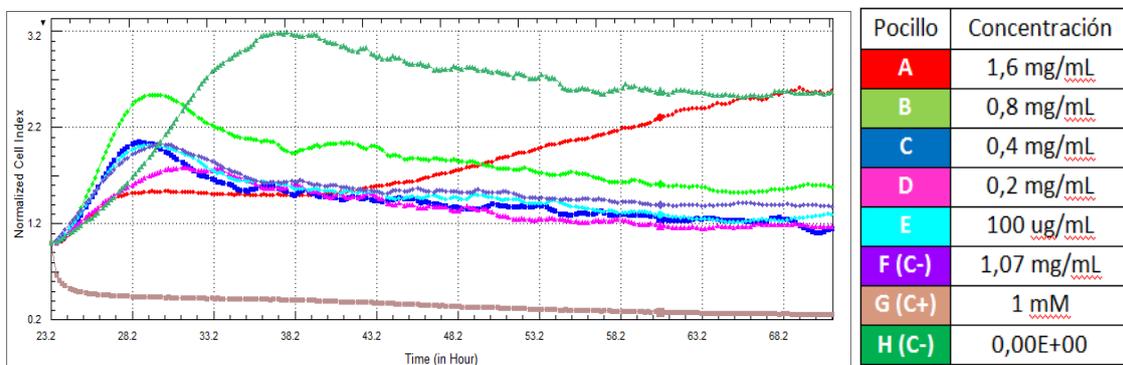


Figura 17. Crecimiento de la línea celular CaCo2 con distintas concentraciones de proteína extracelular de *L. reuteri* (A-B-C-D-E), control negativo MRS (F(C-)), control positivo con FU+DMSO (G(C+)), control negativo con medio de cultivo CaCo2 (H(C-)). (ug= µg)

La máxima concentración (A) de proteína extracelular de *L. reuteri** (1,6 mg/mL) presentaba una inhibición de proliferación celular inicial durante las primeras 20 horas (intervalo entre 23,2 h y 43,2 h), y un crecimiento paulatino que acaba llegando a la altura de crecimiento del control negativo de medio celular. El resto de concentraciones (B-C-D) se corresponden con una menor proliferación a medida que disminuye la concentración. Respecto a la concentración más baja (E) (100 µg/mL), presentó un efecto proliferativo mayor que (C), lo que pudo ser debido a algún error en el experimento.

Se comparó el efecto de la proteína extracelular de las dos bacterias en estudio *L. reuteri* y *L. reuteri** y se comprobó que la única diferencia fue la máxima concentración de esta proteína (A), que en el caso de *L. reuteri** sí que inhibió inicialmente el crecimiento celular.

3.5.2. Efecto de extractos de bajo peso molecular sobre el crecimiento de células CaCo2

Se realizaron 3 experimentos con 2 columnas de 8 pocillos cada una. Cada columna correspondía a la proteína extracelular de cada bacteria, y cada pocillo a una concentración distinta y a los controles positivos y negativos.

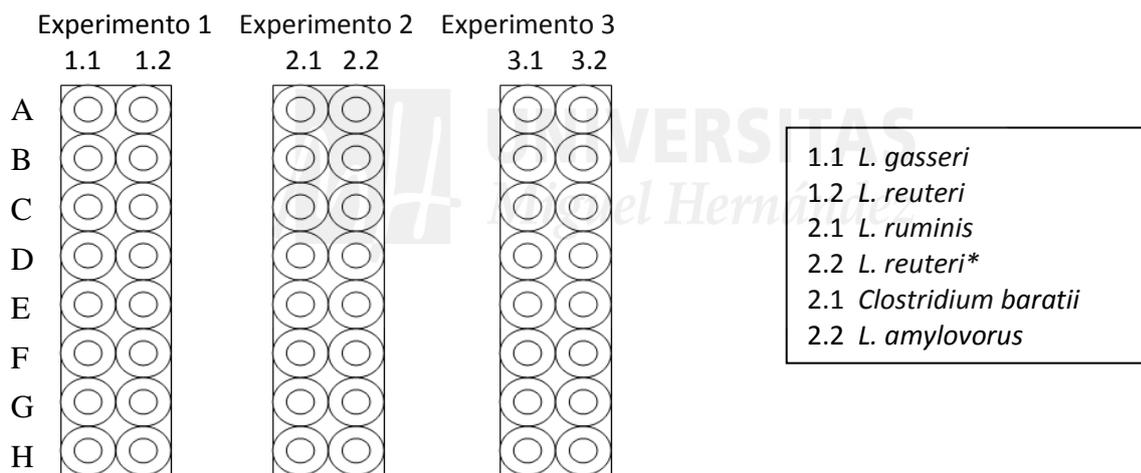


Figura 18. Se representan las 3 placas utilizadas (Experimento 1, 2 y 3) con extractos de bajo peso molecular sobre la línea CaCo2 utilizando el programa RTCA.

1.1 L. GASSERI

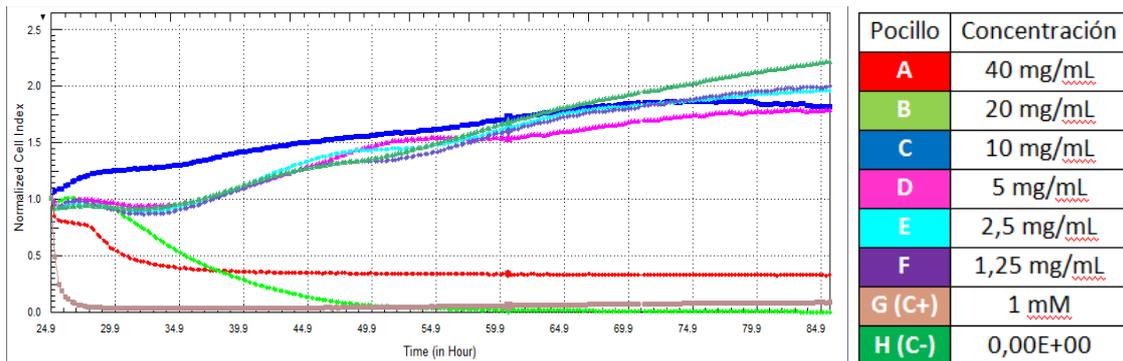


Figura 19. Crecimiento de la línea celular CaCo2 con distintas concentraciones de extractos de bajo peso molecular de *L. gasseri* (A-B-C-D-E-F), control positivo con FU+DMSO (G(C+)), control negativo con medio de cultivo CaCo2 (H(C-)). Se muestran 60 horas de incubación, comprendidas en el intervalo 24,9 h y 84,9 h de la gráfica.

Las concentraciones correspondientes a (A) 40 mg/mL y (B) 20 mg/mL mostraron una clara inhibición del crecimiento celular CaCo2. La concentración (B) descendió a niveles más bajos que la concentración más alta (A) a partir de las 13 horas de incubación (37 h en la gráfica), e incluso más bajos que el control positivo con FU (H) a las 30 horas (54,9 h en la gráfica). Las demás concentraciones solo mostraron influencia con respecto al control a partir de las 30 horas de incubación (en el punto 54,9 h de la gráfica).

Se sabe que el género *Lactobacillus* protege contra el riesgo de pólipos en el colon, que pueden llegar a ser cancerosos. (Sun y Kato, 2016). Los metabolitos de bajo peso molecular en las dos concentraciones utilizadas (A) y (B) mostraron un efecto inhibitorio de la proliferación de células Caco2.

1.2 L. REUTERI

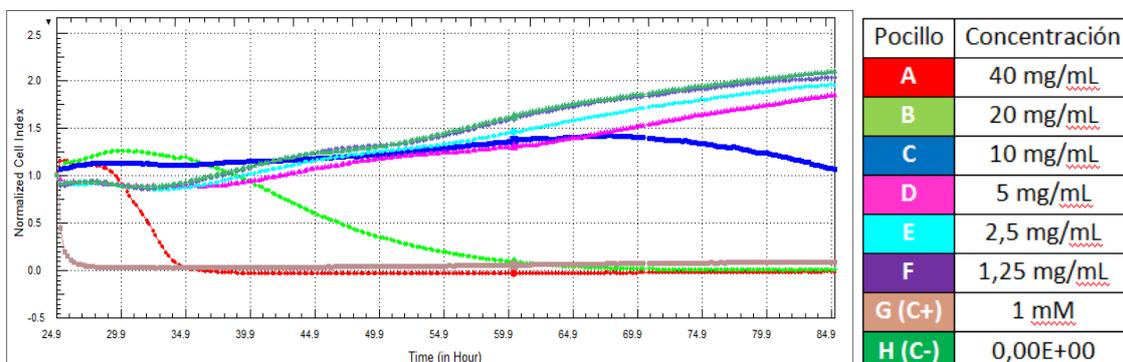


Figura 20. Crecimiento de la línea celular CaCo2 con distintas concentraciones de extractos de bajo peso molecular de *L. reuteri* (A-B-C-D-E-F), control positivo con FU+DMSO (G(C+)), control negativo con medio de cultivo CaCo2 (H(C-)). Se muestran 60 horas de incubación, comprendidas en el intervalo 24,9 h y 84,9 h de la gráfica.

Se observó un descenso inicial de la proliferación celular con la concentración más alta de compuestos polares (A) (40 mg/mL), y a partir de las 10 horas de incubación (punto 34,9 h en la gráfica) el crecimiento era nulo (cero) incluso por debajo del control positivo con FU (G). También se produjo un descenso un poco más paulatino de la concentración (B) (20 mg/mL). A medida que la concentración iba siendo menor, se producía un incremento de la proliferación celular.

Según Zhong, Zhang y Covasa (2014), *Lactobacillus reuteri* 'podría prevenir el cáncer colorectal regulando a la baja los productos génicos que regulan la proliferación celular y la supervivencia, además de suprimir su activación inducida por los factores de necrosis tumoral. Tales actividades de *L. reuteri* podrían estar involucradas en la vía extrínseca de la apoptosis mediante la cual el LAB actúa para proteger contra el CRC.'

2.1 L. RUMINIS

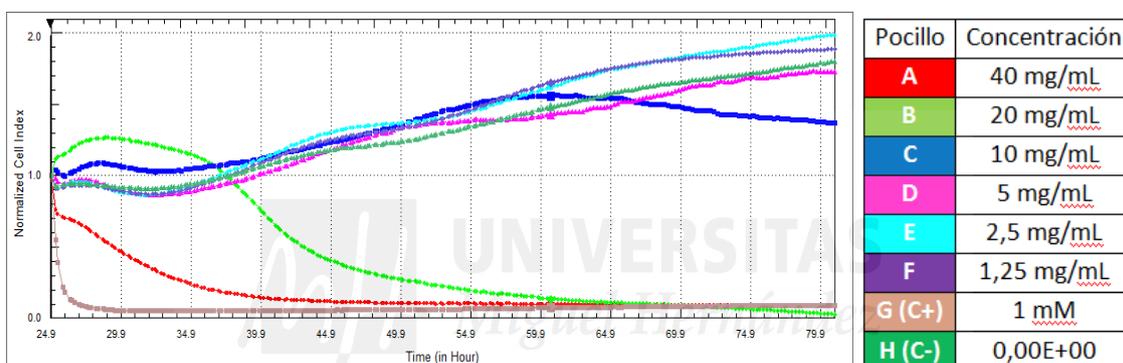


Figura 21. Crecimiento de la línea celular CaCo2 con distintas concentraciones de extractos de bajo peso molecular de *L. ruminis* (A-B-C-D-E-F), control positivo con FU+DMSO (G(C+)), control negativo con medio de cultivo CaCo2 (H(C-)).

La concentración más alta de compuestos polares (A) (40 mg/mL) provocó un descenso claro del crecimiento celular, llegando al mismo nivel que el control positivo a las 35 horas de incubación (punto 54,9 h de la gráfica). La concentración (B) (20 mg/mL) produjo un descenso más lento de la proliferación celular pero también llegó al mismo nivel del control a las 45 horas (punto 69,9 h en la gráfica). El resto de concentraciones no produjeron ningún efecto inhibitorio en el crecimiento celular.

Se ha demostrado que los metabolitos y el citoplasma de algunas cepas de *Lactobacillus* podrían ejercer un efecto antiproliferativo en las células cancerosas (Tuo *et. al.*, 2015). *L. ruminis* mostró este efecto con la proteína extracelular en su máxima concentración (A).

2.2 L. REUTERI*

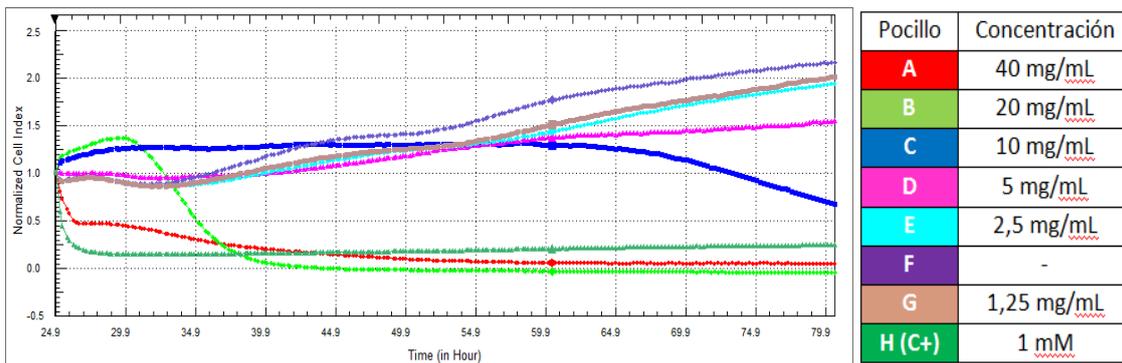


Figura 22. Crecimiento de la línea celular CaCo2 con distintas concentraciones de extractos de bajo peso molecular de *L. reuteri** (A-B-C-D-E-G) y control positivo con FU+DMSO (H(C+)). (F) se descartó debido a un error.

La concentración (A) indujo una inhibición del crecimiento celular muy similar a la del control positivo (H), siendo incluso mayor a partir de las 20 horas de incubación (punto 44,9 h de la gráfica). La concentración (B) presentó una inhibición total del crecimiento, más tardía pero más efectiva que la (A) y que el control positivo (H) a partir de las 10 y 15 horas de incubación (intervalo 34,9 h y 39,9 h de la gráfica).

Comparando *L. Reuteri* con *L. Reuteri** se observó que la efectividad del segundo para inhibir la proliferación celular CaCo2 era mayor, debido a la mayor rapidez de inhibición que se observó. Esto se podría explicar por el distinto perfil proteico de ambas cepas. Esto podría sugerir que diferentes cepas de una misma especie pueden actuar de forma distinta frente a la inhibición del crecimiento celular.

2.1 CLOSTRIDIUM BARATII

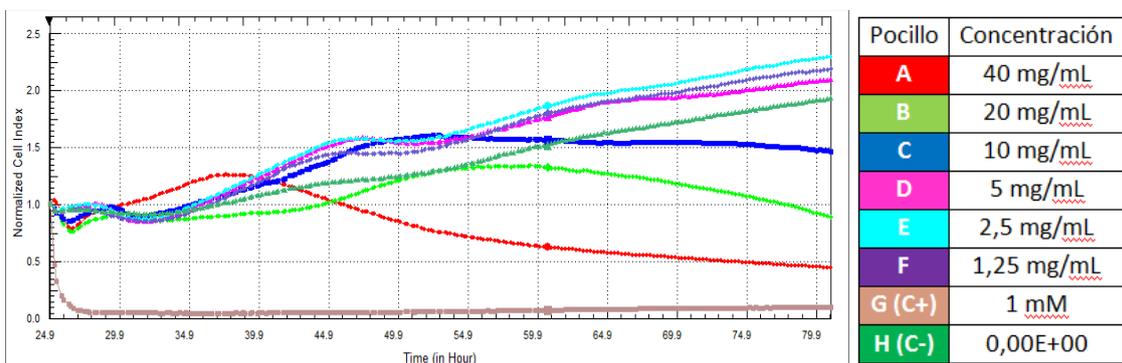


Figura 23. Crecimiento de la línea celular CaCo2 con distintas concentraciones de extractos de bajo peso molecular de *Clostridium baratii* (A-B-C-D-E-F), control positivo con FU+DMSO (G(C+)), control negativo con medio de cultivo CaCo2 (H(C-)).

Clostridiumm baratii mostró cierta inhibición de crecimiento celular con las concentraciones (A), (B) y (C), siendo mayor esta inhibición con la concentración más alta (A), y menor con la menos concentrada (C). El resto de concentraciones (D), (E) y (F) no inhibieron el crecimiento con respecto al control negativo de medio celular (H), y también era proporcional la proliferación más elevada con la concentración más baja.

Algunos grupos de *Clostridium* y bacterias ácido-lácticas aportan beneficio al huésped mediante la acción antiinflamatoria, antitumoral y de exclusión de patógenos (Sun y Kato, 2016). Este resultado mostró una inhibición tardía pero pronunciada de la proliferación de células CaCo2.

2.2 L. AMYLOVORUS

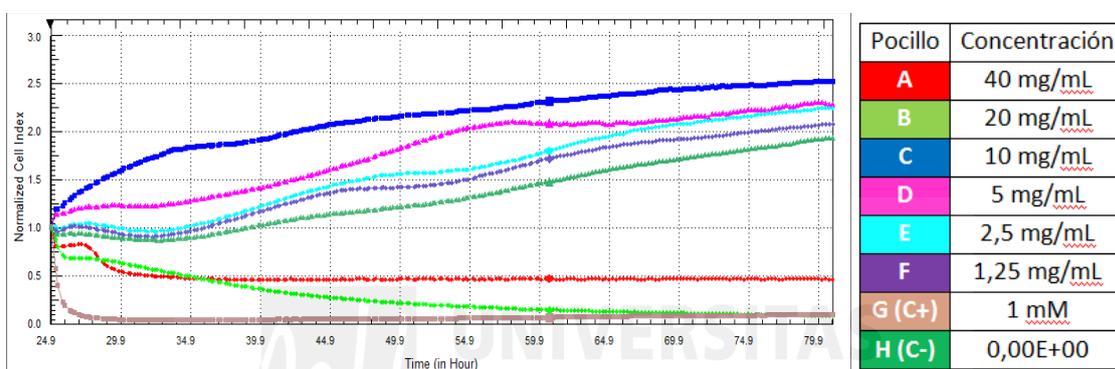


Figura 24. Crecimiento de la línea celular CaCo2 con distintas concentraciones de extractos de bajo peso molecular de *L. amylovorus* (A-B-C-D-E-F), control positivo con FU+DMSO (G(C+)), control negativo con medio de cultivo CaCo2 (H(C-)).

Se produjo una inhibición de proliferación celular por parte de las concentraciones más altas de compuestos polares (A) y (B), siendo (B) más efectiva al alcanzar el control positivo (G) en el punto 64,9 h de la gráfica, a unas 40 horas de incubación. El control negativo (H) estaba por debajo del resto de concentraciones (C), (D), (E) y (F). Esto sugiere que no fueron efectivas, ya que el control de medio celular sin componentes bacterianos tuvo menor crecimiento que con estos metabolitos, lo que a primera vista sugería que estos favorecen el crecimiento.

4. Conclusiones

La proteína extracelular de los *Lactobacillus* y *Clostridium* en estudio mostró tendencias inhibitorias y apoptóticas de las células CaCo2 procedentes de adenocarcinoma humano. Asimismo, los metabolitos de bajo peso molecular del citoplasma de las 6 cepas bacterianas mostraron una inhibición de la proliferación celular mucho más acentuada. Las cepas de *L. ruminis* y *L. reuteri** revelaron una mejor inhibición total respecto a las demás. No obstante, los mecanismos de acción entre la microbiota intestinal y el cáncer de colon son todavía desconocidos, y este estudio precisaría de más pruebas para poder concluir que los resultados obtenidos son viables.



5. Anexos

Anexo 1

Medio de cultivo	Código secuenciación	Género, especie y cepa	% Viabilidad
FAB anaerobio	2B	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM20016	99%
MRS anaerobio	11A	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM20016	99%
FAB anaerobio	12B	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM20016	99%
MRS anaerobio	12A	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM20016	98%
MRS aerobio	13A	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM20016	99%
FAB anaerobio	7B	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM20016	99%
MRS anaerobio	7A	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM20016	99%
MRS aerobio	16B	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM20016	99%
MRS anaerobio	18B	<i>Lactobacillus amylovorus</i> str 30SC	99%
MRS aerobio	3B	<i>Lactobacillus amylovorus</i> str 30SC	99%
FAB anaerobio	19B	<i>Lactobacillus amylovorus</i> str 30SC	99%
MRS anaerobio	21B	<i>Lactobacillus amylovorus</i> str 30SC	99%
MRS anaerobio	6A	<i>Lactobacillus ruminis</i> ATCC 27782	99%
FAB anaerobio	4A	<i>Enterococcus hirae</i> ATCC9790	100%
FAB anaerobio	5A	<i>Streptococcus uveris</i> 0140J	96%
MRS + Urea	1C	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subs DSM16831	97%
MRS + Urea	2C	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subs DSM16831	98%
MRS + Urea	4C	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subs DSM16831	97%

Tabla 1 Anexo 1. Identificación de microorganismos **M3** en base de datos Blast. Microorganismos marcados son los utilizados para el estudio. Se consideró viabilidad > 97%

Medio de cultivo	Código secuenciación	Género, especie y cepa	% Viabilidad
Muestra M1			
FAB anaerobio	10-A	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM20016	97%
Christensen Urea	1 -A	<i>Enterococcus faecium</i>	99%
Christensen Urea	8A	<i>Escherichia coli</i> str.K-12 substr. MG1655/ <i>Shyella</i> disenteria SD197	99%
FAB anaerobio	10-B	<i>Escherichia coli</i> O83:H1 str NRG857C/ <i>Shigella dysenteriae</i> SD197	98%
Muestra M2			
Christensen Urea	17B	<i>Shigella disenteriae</i> SD197	99%
FAB anaerobio	20-B	<i>Escherichia coli</i> A12 substrain MG1655 / <i>Shigella flexneri</i> 2a str 301	99%
Christensen Urea	14A	<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC33323	98%
Muestra Mprob			
MRS aerobio	2-A	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM20016	98%
MRS anaerobio	4-B	<i>Lactobacillus amylovorus</i> str 30SC	99%
MRS aerobio	13-B	<i>Lactobacillus amylovorus</i> str 30SC	97%
MRS anaerobio	15B	<i>Lactobacillus amylovorus</i> str 30SC	99%
MRS aerobio	9B	<i>Lactobacillus amylovorus</i> str 30SC	99%
MRS aerobio	3-A	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subs DSM16831	98%

Tabla 2 Anexo 1. Identificación de microorganismos M1, M2 y Mprob en base de datos Blast. Microorganismos marcados son los utilizados para el estudio. Se consideró viabilidad > 97%

Medio de cultivo	Código secuenciación	Género, especie y cepa	% Viabilidad
MRS	5C	<i>Streptococcus gallolyticus subs DSM16831</i>	99%
MRS	13-C	<i>Streptococcus gallolyticus subs DSM16831</i>	96%
MRS	6-C	<i>Streptococcus gallolyticus subs DSM16831</i>	97%
MRS	14-C	<i>Streptococcus gallolyticus subs DSM16831</i>	96%*
MRS	7C	<i>Streptococcus gallolyticus subs DSM16831</i>	98%
MRS	15-C	<i>Streptococcus gallolyticus subs DSM16831</i>	97%
MRS	8-C	<i>Streptococcus gallolyticus subs DSM16831</i>	99%
MRS	16-C	<i>Streptococcus gallolyticus subs DSM16831</i>	97%
MRS	9-C	<i>Streptococcus gallolyticus subs DSM16831</i>	98%
MRS	17-C	<i>Streptococcus gallolyticus subs DSM16831</i>	98%
MRS	10C	<i>Streptococcus gallolyticus subs DSM16831</i>	97%
MRS	18C	<i>Streptococcus gallolyticus subs DSM16831</i>	97%
MRS	11C	<i>Streptococcus gallolyticus subs DSM16831</i>	98%
MRS	12C	<i>Streptococcus gallolyticus subs DSM16831</i>	97%

Tabla 3 Anexo 1. Identificación de microorganismos **M4** y **M5** en base de datos Blast. Condiciones de anaerobiosis.

*No es viable < 97%. Se consideró viabilidad > 97%

6. Bibliografía

1. Anónimo. (2014) Microbioma humano. Microbioenergética. Rescatado de: <http://microbioenergetica.squarespace.com>
2. Bäckhed F., Roswall J., Peng Y., Feng Q., Jia H., Datchary P.K. (2015). Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 690-703. DOI: 10.1016/j.chom.2015.04.004
3. Banan E.- Daliri M. y Lee B.H. (2015). New perspectives on probiotics in health and disease. *Food science and human wellness*, 4 (2), 56-65. DOI: 10.1016/j.fshw.2015.06.002
4. Borre Y.E., O'Keeffe G.W., Clarke G., Stanton C., Dinan T.G., Cryan J.F. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. 20(9), 509-18. DOI: 10.1016/j.molmed.2014.05.002.
5. Borre Y.E., O'Keeffe G.W., Clarke G., Stanton C., Dinan T.G., Cryan J.F. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. 20(9), 509-18. DOI: 10.1016/j.molmed.2014.05.002.
6. Corzo N., Alonso J. L., Azpiroz F., Calvo M. A., Cirici M., Leis R. y otros. (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutr Hosp*, 31(Supl.1):99-118.
7. Curto A. E. y Milligan G. (2016). Metabolism meets immunity: The role of free fatty acid receptors in the immune system. *Biochemical Pharmacology* 114, 3–13. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.03.017.
8. Foster J.A., Rinaman L., Cryan J.F. (2017). Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. *Neurobiology of stress*, 19(7), 124-136. DOI: 10.1016/j.ynstr.2017.03.001.
9. Gae A., Goubet I., Daillère R., Routy B., Derosa L., Roberti P.M. y Zitvogel L. (2018). The impact of the intestinal microbiota in therapeutic responses against cancer. *C. R. Biologies* 341, 284–289.
10. Galley J.D., Nelson M.C., Yu Z., Dowd S.E., Walter J., Kumar P.S. y otros. (2014). Exposure to a social stressor disrupts the community structure of the colonic mucosa-associated microbiota. *BMC microbiology*, 14: 189. DOI: 10.1186/1471-2180-14-189.
11. Gérard Eberl. (2018). The microbiota, a necessary element of immunity. *Comptes Rendus Biologies*, 341 (5), 281-283. DOI: 10.1016/j.crv.2018.03.003.
12. Heydari Z., Ali M.R. y Alizadeh M. (2019). Different anti-inflammatory effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in hepatocellular carcinoma cancer mouse through impact on microRNAs and their target genes. 16. DOI:10.1016/j.jnim.2019.100096
13. Li M., van Esch B.C.A.M, Gerry T.M., Wagenaar G.T.M., Garssen J., Folkerts G. y Henricks P.A.J. (2018). Pro- and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. *European Journal of Pharmacology*, 831, 52–59. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.05.003.
14. Meng C., Bai C., Brown T.D., Hood L.E. y Tian Q. Human Gut Microbiota and Gastrointestinal Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 16 (2018) 33–49.
15. Organización Mundial de Gastroenterología. (2017). Probióticos y prebióticos. Recuperado de <http://www.worldgastroenterology.org/>
16. Ozogul F. Y Hamed I. (2015). Lactic acid bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus acidophilus*. Reference Module in Food Sciences DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.00852-0.

17. Ramiah K., van Reenen C.A. y Dicks L.M.T. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Res Microbiology*, 159, 470–475. DOI: 10.1016/j.resmic.2008.06.002.
18. Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., y Margolles, A. (2017). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. Review. *Mol. Nutr. Food Res.* 61, 1, 2017, 1600240, p.1-3.
19. Sánchez B, Urdaci M.C. y Margolles A. (2010). Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions. *Microbiology*, 156(Pt 11). DOI: 10.1099/mic.0.044057-0.
20. Silk A.W. y Margolin K. Cytokine Therapy Hematology/Oncology Clinics of North America. Volume 33, Issue 2, April 2019, Pages 261-274.
21. Suárez, J.E. (2013). Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutrición Hospitalaria*, 28(Supl. 1), 38-41.
22. Sun J. y Kato I. (2016). Gut microbiota, inflammation and colorectal Cancer. *Genes & Diseases*, 3 (2), 130-143. DOI: 10.1016/j.gendis.2016.03.004.
23. Tanaka M. & Nakayama J. (2017). Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergy International*, 66(4), 515-522. DOI: 10.1016/j.alit.2017.07.010.
24. Thind S.K. y Preis J.I. (2014). *Clostridium subterminale* septicemia in a patient with esophageal cancer. 1(3), 47-49. DOI: 10.1016/j.idcr.2014.06.003.
25. Tuo Y., Jiang S., Qian F., Mu G., Liu P., Guo Y. y Ma C. (2015) Short communication: Antiproliferative effect of 8 different *Lactobacillus* strains on K562 cells. 98(1), 106-110. DOI: 10.3168/jds.2014-8767.
26. Wang S., Harvey L., Martin R., van der Beek E. M., Knol J., Cryan J. F. y Renes I.B. (2018) Targeting the gut microbiota to influence brain development and function in early life. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 95, 191-201. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2018.09.002.
27. Wang L., Wan Y.Y. (2019). The role of gut microbiota in liver disease development and treatment. *Liver Research*, 3(1), 3-18. DOI: 10.1016/j.livres.2019.02.001
28. Weir T.L., Manter D.K., Sheflin A.M., Barnett B.A., Heuberger A.L. y Ryan E.P. (2013). Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults. 8(8). DOI: 10.1371/journal.pone.0070803.
29. Yunda D.F.U., Mancera F.M.C. (2014) DNA methylation and implications in carcinogenesis. *Revista Cubana Investigación Biomédica*, 33 (1), 81-93.
30. Zhong L., Zhang X. y Covasa M. (2014). Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20(24). DOI: 10.3748/wjg.v20.i24.7878.
31. Zhuang L., Chen H., Zhang S., Zhuang J., Li Q., Feng Z. (2019). Intestinal microbiota in early life and its implications on childhood health. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 17 (1), 13-25. DOI: 10.1016/j.gpb.2018.10.002.