



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE FARMACIA**

**ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE *Lactobacillus*  
*fermentum* UCO\_979C SOBRE CÉLULAS DE  
CÁNCER HUMANAS**

**POR PEDRO FELIPE ALARCÓN ZAPATA**

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción  
para optar al grado académico de Magíster en Bioquímica Clínica e  
Inmunología

Profesor guía: Dr. Felipe Zúñiga Arbalti  
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

Profesora co-guía: Dra. Apolinaria García Cancino  
Departamento de Microbiología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Marzo, 2018  
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.





“Cuanto más comprendo la Ciencia, más creo en Dios por la maravilla de la  
amplitud, sofisticación e integridad de su creación”  
-John Lennox

Dedicado a mi esposa, nuestro bebé que viene en camino y a mi familia.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la oportunidad de continuar mi formación científica en una gran Universidad, y estar conmigo en cada etapa de mi vida. A mi amada esposa por su ayuda incondicional, comprensión y amor, quien siempre confiando en mi construyendo un camino juntos en Dios para siempre. A mis Padres por tanto esfuerzo y amor, por su gran entrega, que sin duda alguna, han dado fruto. A mi hermano Pablito por su cariño y gran apoyo, y a mi amiga, hermana y colega Barbara.

Agradezco al Dr. Felipe Zúñiga, quien más que un guía, ha sido un mentor en mi formación científica y personal, por su apoyo, paciencia y ejemplo con su familia. También, a la Dra. Apolinaria García por su apoyo en mi formación y a su equipo de trabajo del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, en especial a Cristián Parra quien colaboró directamente en el desarrollo de la tesis.

Agradezco a mi iglesia, por todo su cariño y apoyo fundamental, quienes nunca han dudado en mis capacidades. A mis amigos, quienes siempre me han apoyado en mis estudios.

A los Docentes del Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia, por su gran entrega a la labor docente, y compañeros de laboratorio, con quienes el trabajo se ha hecho muy grato en un ambiente de amistad.

## TABLA DE CONTENIDOS

	<b>Página</b>
AGRADECIMIENTOS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	IX
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. PROBIÓTICOS.....	1
1.1.1. Mecanismos de acción de los probióticos.....	4
1.1.2. Proteínas y factores secretados por <i>Lactobacillus</i> spp.....	7
1.2. CÁNCER Y PROBIÓTICOS.....	8
1.2.1. Mecanismos de acción de los Probióticos y cáncer....	9
1.3. CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C.....	12
1.4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	13
1.5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	14
1.6. HIPÓTESIS.....	14
1.7. OBJETIVO GENERAL.....	15
1.7.1 Objetivos específicos.....	15
2. METODOLOGÍA.....	16
2.1. CÉLULAS HUMANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	16
2.1.1. Células de cordón umbilical humano.....	16
2.1.2. Líneas celulares tumorales.....	17
2.2. CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	18
2.2.1. Condiciones de cultivo de <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C.....	18
2.2.2. Extracción de proteínas totales de <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C.....	18
2.2.3. Cuantificación de proteínas totales.....	19
2.3. EFECTO CITOTÓXICO DE <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C SOBRE CÉLULAS.....	21
2.3.1. Estandarización de la técnica de Sulforrodamina B....	21
2.3.2. Efecto de la cepa UCO_979C sobre la viabilidad en	

células humanas.....	22
2.3.3. Efecto de <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C sobre la liberación de citoquinas en células humanas.....	24
2.4. EFECTO DEL LISADO DE <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C CÉLULAS HUMANAS.....	25
2.5. EFECTO DEL LISADO FRACCIONADO DE <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C CÉLULAS HUMANAS.....	25
2.5.1. Caracterización parcial del lisado fraccionado.....	25
2.5.2. Efecto de fracciones de lisados de <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C en células de adenocarcinoma gástrico.....	27
2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	28
3. RESULTADOS.....	29
3.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE SULFORODAMINA B.....	29
3.1.1. Determinación de la curva de densidad y proliferación celular.....	29
3.1.2. Determinación de la toxicidad celular de Doxorubicina.....	32
3.2. EFECTO DE <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C SOBRE CÉLULAS HUMANAS.....	33
3.2.1. Efecto de <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C en células obtenidas de cordón umbilical humano.....	33
3.2.2. Efecto de <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C en células de adenocarcinoma gástrico.....	36
3.2.3. Efecto de <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C en células de adenocarcinoma de colon.....	39
3.2.4. Efecto de <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C en células de carcinoma colorrectal humano.....	41
3.2.5. Efecto de <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C en otras células tumorales.....	44
3.3. EFECTO DE LISADOS BACTERIANOS OBTENIDOS DE <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C SOBRE CÉLULAS HUMANAS.....	47
3.3.1. Efecto de lisados de <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C en células de adenocarcinoma gástrico.....	47
3.4. ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL LISADO DE <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.....	50
3.4.1. Caracterización parcial del lisado fraccionado mediante equipo OFF GEL.....	50
3.4.2. Efecto de fracciones de lisados de <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C en células de adenocarcinoma gástrico.....	51

3.5. EFECTO DE <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C EN LA SECRECIÓN DE CITOQUINAS EN CÉLULAS TUMORALES Y NORMALES.....	53
3.5.1. Efecto de <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO_979C en la secreción de citoquinas en células HUVEC y AGS.....	53
4. DISCUSIÓN.....	57
5. CONCLUSIÓN.....	70
6. GLOSARIO.....	71
7. BIBLIOGRAFÍA.....	72



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
2-1	Conversión de McFarland a concentración bacteriana.....	23
2-2	Condiciones de corrida de Isoelectroenfoco.....	26



## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
2-1	Curva de calibración de proteínas totales de lisados de <i>L. fermentum</i> UCO_979C.....
	20
3-1	Curva de densidad celular de células AGS.....
	30
3-2	Curva de crecimiento celular de células AGS.....
	31
3-3	Determinación de toxicidad celular de Doxorubicina en células AGS.....
	32
3-4	Viabilidad celular de células HUVEC expuestas a <i>L. fermentum</i> UCO_979C.....
	35
3-5	Viabilidad celular de células AGS expuestas a <i>L. fermentum</i> UCO_979C.....
	38
3-6	Viabilidad celular de células CACO-2 expuestas a <i>L. fermentum</i> UCO_979C.....
	40
3-7	Viabilidad celular de células HCT-116 expuestas a <i>L. fermentum</i> UCO_979C.....
	44
3-8	Viabilidad celular de células SK MEL expuestas a <i>L. fermentum</i> UCO_979C.....
	45
3-9	Viabilidad celular de células HaCaT expuestas a <i>L. fermentum</i> UCO_979C.....
	46
3-10	Viabilidad celular de células AGS expuestas a lisados de <i>L. fermentum</i> UCO_979C.....
	50
3-11	Efecto de las fracciones del lisado <i>L. fermentum</i> UCO_979C sobre la viabilidad de células AGS.....
	52

3-12 Determinación de citoquinas en células HUVEC y AGS expuestas durante 72 horas a <i>L. fermentum</i> UCO_979C.....	54
3-13 Determinación de IL-6 en células HUVEC expuestas a <i>L. fermentum</i> UCO_979C.....	56
4-1 Viabilidad celular de distintas células expuestas a <i>L. fermentum</i> UCO_979C.....	63



## RESUMEN

Los probióticos son microorganismos vivos que, administrados adecuadamente, confieren beneficios al huésped. Actualmente, se han descrito propiedades quimiopreventivas, siendo capaces de reducir el riesgo de cáncer. El probiótico *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C, es capaz de inhibir a *Helicobacter pylori*, quien puede causar cáncer gástrico. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad citotóxica de *L. fermentum* UCO\_979C y su lisado sobre células humanas normales y tumorales. Se evaluó la citotoxicidad a través de la técnica de Sulforrodamina B.

Se observó citotoxicidad de la cepa UCO\_97C con mayor sensibilidad células tumorales gastrointestinales AGS, CACO-2 y HCT-116, sin efecto citotóxico en células normales HUVEC. También, un análisis proteómico de su lisado bacteriano de la cepa UCO\_979C presentó efectos citotóxicos en células de adenocarcinoma gástrico.

En conclusión, la cepa probiótica de *L. fermentum* UCO\_979C presenta actividad citotóxica en líneas celulares cancerígenas del tracto gastrointestinal, y también, en otras líneas celulares tumorales. Finalmente, existen productos intracelulares de *L. fermentum* UCO\_979C con potencial citotóxico en células de cáncer gástrico. Se proyecta el uso del probiótico *L. fermentum* UCO\_979C podría utilizarse para futuros ensayos relacionados en cáncer, tanto *in vitro*, como *in vivo*.

## 6. ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms, which, if administered in adequate amounts, can confer benefits to the host. Currently, probiotics are considered as potential chemopreventive agents, capable to reduce the risk of cancer. The probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C, isolated of a human stomach, is capable to inhibit *Helicobacter pylori*, which can induce gastric cancer. The aim of this work was to determine the cytotoxic activity of *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C and its lysate in normal and tumor cells using the Sulforhodamine B method.

Results showed that UCO\_979C strain has a cytotoxic activity in several tumor cell lines. Besides, there was no cytotoxic effect on HUVEC cells, which are non-cancerous cells. Furthermore, using a proteomic approach, we observed a cytotoxic effect on gastric adenocarcinoma cells of several fractions of the *L. fermentum* UCO\_979C lysate.

Overall, the probiotic *L. fermentum* UCO\_979C strain showed cytotoxic activity over tumor cells, being gastrointestinal cancer cells more sensitive than other types of tumor cells. Finally, intracellular products of the *L. fermentum* UCO\_979C strain exert a potential cytotoxic effect in gastric cancer cells. The probiotic strain UCO\_979C, could be used for future research in cancer, on *in vitro* and *in vivo* models.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 PROBIÓTICOS

Los humanos vivimos en asociación con un amplio número de microorganismos presentes en la piel, la boca, el sistema genitourinario femenino, y el tracto gastrointestinal, conocidos y descritos como microbiota humana normal, un concepto que ha evolucionado desde flora comensal hasta microbioma. Sin embargo, las mayores concentraciones de organismos comensales se encuentran en el tracto gastrointestinal, el cual tiene un área aproximada de 400m<sup>2</sup> de superficie, constituyendo la segunda superficie más grande en el cuerpo después del tracto respiratorio (Bäckhed, 2004) y albergando una rica microbiota de 10<sup>14</sup> microorganismos bacterianos con una densidad de la colonización creciente desde el estómago hasta el colon distal y más de 500 especies bacterianas diferentes; de estas, se ha podido cultivar *in vitro* solo 300-500 especies. Estas bacterias tienen funciones importantes en la salud, tales como estimular el sistema inmune, proteger al huésped ante la invasión de patógenos (Mizock, 2015) y mejorar la digestión, especialmente de carbohidratos complejos (Borchers, 2009).

La microbiota gastrointestinal es adquirida rápidamente después del nacimiento, siendo relativamente estable durante la vida y esencial para la homeostasis humana. En el parto, el recién nacido deja el ambiente intrauterino libre de gérmenes y entra en uno extrauterino altamente contaminado; es en las

primeras horas después del nacimiento donde tiene lugar el proceso de colonización intestinal. Una gran variedad de factores influye en el proceso de colonización inicial, tales como la edad gestacional, el tipo de parto, la alimentación neonatal y factores genéticos (Hernández, 2018). La microbiota materna constituye una fuente predominante de la colonización inicial. Las primeras bacterias en colonizar el colon neonatal son cepas de *Escherichia coli* y diversas especies de *Enterococcus*, junto con anaerobios estrictos. En los bebés alimentados con leche materna, las especies de *Bifidobacterium* predominan en la colonización, mientras que los neonatos alimentados con fórmula son colonizados por especies de *Bacteroides* y solo unos pocos *Bifidobacterium* sp. (Ruemmele, 2009). Cuando la microbiota intestinal se está desarrollando, la interacción de ésta con el huésped resulta en la evolución de un sistema inmune intestinal único y distinto. El desafío que enfrenta el sistema inmune de la mucosa del huésped es discriminar entre patógenos y organismos benignos mediante la estimulación protectora de la inmunidad, sin generar una respuesta inflamatoria excesiva que pudiera alterar la integridad de la mucosa gastrointestinal (Alarcón, 2016)

Distintos estudios han demostrado que los microorganismos presentes en el sistema gastrointestinal de personas sanas cambian de aquellas personas que presentan alguna enfermedad (Parvez, 2006). Además, diversas investigaciones sugieren que la microbiota intestinal puede ser regulada con microorganismos beneficiosos que, reemplazando microorganismos patógenos,

pueden establecer un equilibrio microbiano y prevenir enfermedades. La FAO & WHO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, y Organización Mundial de la Salud) define un probiótico como la administración de microorganismos vivos que, en condiciones adecuadas, confieren beneficios al huésped (Hill, 2014).

Los microorganismos usados como probióticos deben ser generalmente reconocidos como seguros y deben poseer una serie de características como: ser resistentes a la bilis, al ácido clorhídrico y a los jugos pancreáticos, estimular el sistema inmune, tener una reducida permeabilidad intestinal, producir ácido láctico y tener la capacidad de sobrevivir bajo condiciones tanto ácidas del estómago como alcalinas del duodeno (Gupta, 2009). Es necesario mencionar que los microorganismos para uso como probióticos son sometidos a diferentes procesos para lograr generar la formulación farmacéutica adecuada para su administración, por lo tanto, una preparación ideal de probióticos debe tener las siguientes propiedades (Harmsen, 2000):

1. Alta viabilidad celular.
2. Habilidad para persistir en el intestino incluso si la cepa probiótica no puede colonizar el intestino.
3. Adherencia al epitelio intestinal para neutralizar los efectos de lavado de los movimientos peristálticos.
4. Deben ser capaces de interactuar y/o enviar señales a las células del sistema inmunológico asociadas con el intestino.

5. No deben ser patógenos.
6. Resistentes al tratamiento en la preparación de matrices alimentarias.
7. Debe tener la capacidad para influenciar la actividad metabólica local.

Además, los probióticos deben cumplir con que el origen de las cepas sea humano, esto de preferencia si van a ser usados en humanos, no deben presentar patogenicidad y ausencia de genes de resistencia a antibióticos transferibles, todos estos aspectos deben ser evaluados para cada cepa (Saarela, 2000).

#### **7.1.1 Mecanismos de acción de los probióticos.**

Los probióticos tienen características similares a las bacterias comensales que existen en el organismo humano debido a que ellas participan en diversas funciones ya sea defendiendo y/o modulando el sistema inmune, y produciendo tolerancia al entrar en contacto con diversos antígenos que son inhalados al respirar o ingeridos en los alimentos. También participan en la resistencia a la colonización de bacterias patógenas ya que compiten con ciertas moléculas en la adhesión de patógenos impidiendo la unión de las bacterias patógenas por lo que estas últimas no se pueden unir a la célula blanco. Además, pueden expresar y liberar moléculas conocidas como bacteriocinas (Oh, 2000). Se ha demostrado que bacterias probióticas son capaces de responder, *in vitro*, contra bacterias patógenas (Michail, 2002). La capacidad de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* para ejercer efectos beneficioso

en la salud humana es específica y característica de cada especie y cepa (Ramos, 2013).

Los mecanismos moleculares exactos de cómo las cepas probióticas participan en la prevención y el tratamiento de enfermedades crónicas del intestino no están del todo descritos; sin embargo, la investigación tanto *in vitro* como con modelos animales apunta a los efectos sobre las células epiteliales intestinales y en el sistema inmune de mucosas. Estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* ejercen efectos directos sobre la función de barrera del epitelio intestinal, evidenciado por la disminución de la permeabilidad intestinal y una mayor resistencia de la función de barrera intestinal epitelial. La exposición de células epiteliales de colon T84 a una combinación de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* induce un aumento en la fosforilación de la actina y las ocludinas, contribuyendo a la formación de uniones estrechas (Resta-Lenert, 2003). Se ha demostrado que los probióticos intervienen en los efectos deletéreos de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  en la permeabilidad epitelial y el transporte de iones (Resta-Lenert, 2006). Además, la suplementación con *Bifidobacterium* sp. ha inducir una mayor producción de anticuerpos clase IgA y cambios en la inmunidad mediada por células, incluyendo la presentación de antígenos (Park, 2002). También se ha demostrado que *Lactobacillus casei* DN-114 001 atenúa la respuesta proinflamatoria epitelial intestinal producida por *Shigella flexneri* patógena (Tien, 2006).

Es válido admitir que los probióticos son capaces de reducir la respuesta inmune inflamatoria, induciendo la apoptosis de células T inflamatorias y de suprimir la expansión clonal de células T. Además, diversas investigaciones están intentando determinar si cepas de probióticos son capaces de alterar la función de las células dendríticas presentadoras de antígeno. Las células dendríticas tratadas con cepas probióticas, en un modelo de colitis experimental con ácido trinitrobenceno sulfónico, confieren protección contra el desarrollo de la colitis y los análisis moleculares indican que los probióticos fueron capaces de inducir células T reguladoras en este modelo (Foligne, 2007). Otro mecanismo teórico se basa en la supresión, inducida por probióticos, del crecimiento de patógenos a través de la secreción de factores antimicrobianos, tales como el ácido láctico y bacteriocinas. También es posible que algunas cepas probióticas puedan inhibir la interacción de los agentes patógenos con células epiteliales intestinales, demostrado con *L. casei* DN-114 001, en un experimento que logró reducir la adherencia e invasión de una cepa de *E. coli* enteroinvasiva aislada de pacientes con Enfermedad de Crohn (Ingrassia, 2005).

### 1.1.2 Proteínas y factores secretados por *Lactobacillus* spp.

Los sobrenadantes de cultivo de *Lactobacillus* spp. han tenido efectos similares a los de bacterias atenuadas o vivas. Se ha descrito que el sobrenadante de cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* GG es capaz de promover la integridad de la barrera intestinal en células CACO-2 cultivadas en condiciones alcohólicas (estimuladas con etanol) y en un modelo murino de enfermedad alcohólica hepática, con un aumento en la expresión de ocludina mediado por una inhibición de miR122a (Zhao, 2015). Por otro lado, se han caracterizado proteínas con actividad antibacteriana desde sobrenadantes libres de bacterias como de sobrenadantes de bacterias lisadas. Desde el sobrenadante de *Lactobacillus paracasei* SD1 se aisló y caracterizó una bacteriocina de 24 kDa con actividad antimicrobiana hacia bacterias del tipo Gram positiva y Gram negativas (Wannun, 2014). También se han descrito y caracterizado, mediante espectrometría de masa por ionización electrospray, tres bacteriocinas: Sakacina D98a de 3660,3 Da, Sakacina D98b de 4692,8 Da y Sakacina D98c de 3558,3 Da, todas aisladas desde sobrenadante de cultivo de *Lactobacillus sakei* d98 Sawa (Sawa, 2013).

Además, se ha descrito que *Lactobacillus plantarum* expresa una proteína de 48 kDa de masa molecular aparente identificada por MALDI-TOF como  $\alpha$ -enolasa EnoA1 involucrada en adhesión celular (Salzillo *et al.*, 2015), esto es de importancia dada la capacidad de los probióticos de inhibir la unión

de patógenos mediante su unión a las células epiteliales de sistema gastrointestinal.

## 1.2. CÁNCER Y PROBIÓTICOS

Los cánceres del tracto gastrointestinal representan el 25% de todas las neoplasias y el 9% de muerte de todas las causas en el mundo. El cáncer de colon y gástrico sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo (Brenner, 2009; Lepage, 2010).

Se han propuesto muchas estrategias para prevenir los distintos tipos de cánceres gastrointestinales, tales como, la vigilancia de pólipos y quimioprevención. La quimioprevención se puede describir como todos los tratamientos, nutricionales o farmacológicos, que previenen, detienen o retroceden el crecimiento neoplásico (Bazuro, 2008). En este contexto, los probióticos son considerados como potenciales agentes quimiopreventivos, siendo capaces de reducir el riesgo de cáncer a través de varios mecanismos. Estos mecanismos incluyen: la unión y la degradación de compuestos carcinogénicos potenciales; la producción de compuestos antitumorogénicos o antimutagénicos; el mejoramiento de la respuesta inmune generando efectos beneficiosos sobre la fisiología del huésped (Rafter, 2003; Saikali, 2004); supresión del crecimiento de microbiota implicada en la producción de mutágenos y carcinógenos y la protección del ADN celular frente al daño oxidativo (Abedin-Do, 2015). En resumen, los probióticos pueden ejercer un

papel clave en la prevención y progresión del cáncer (Linsalata, 2005), así como en el control de mecanismos de crecimiento celular (de LeBlanc, 2010).

### **1.2.1 Mecanismos de acción de los probióticos y cáncer.**

Dentro de los mecanismos propuestos del efecto de probióticos en el cáncer y procesos tumorales, se describen los siguientes:

Uniones célula-célula: Las uniones estrechas entre las células epiteliales y endoteliales tienen un papel crítico en el mantenimiento de la integridad entre células. Los defectos o pérdida en estas estructuras son la base del aumento de la proliferación celular y posterior invasión en procesos tumorales (Martin, 2009). Por otro lado, las metaloproteinasas de matriz (MMP) son importantes en la invasión celular, jugando un papel en la degradación de diversas proteínas de la matriz extracelular que permiten procesos de migración e invasión por células cancerosas (Martin, 2013). Se ha demostrado que sobrenadantes libres de bacterias de *L. casei* y *Lactobacillus rhamnosus* GG previenen la invasión por células de cáncer de colon, sugiriendo la liberación de sustancias bioactivas antimetastásicas que pueden participar en la disminución de la invasión celular *in vitro* (Escamilla, 2010). También se ha demostrado que sobrenadantes libres de bacterias de *L. rhamnosus* y *Lactobacillus crispatus* pueden disminuir la expresión de la metaloproteinasa-2 de la matriz (MMP-2) y MMP-9 en células HeLa y aumentar la expresión de sus inhibidores y *L. rhamnosus* también mostró este efecto sobre células HT-29 (Nouri, 2016).

En células de adenocarcinoma de colon humano CACO-2, se ha demostrado que el kéfir, el cual contiene bacterias probióticas, ejerce un efecto antiproliferativo acompañado de inducción de detención del ciclo celular en la fase G1, inducción de la apoptosis, regulación al alza en la relación Bax: Bcl-2 y un aumento en la expresión de p53 (Khoury, 2014). Sobrenadantes libres de bacterias de *L. casei* y *L. rhamnosus* GG inhibieron la invasión de células por cáncer de colon al influir en la actividad de la MMP-9 y los niveles de la proteína de unión zona occludens-1 (ZO-1) en células de carcinoma colorrectal humano metastático HCT-116, sugiriendo una macromolécula como una proteína, ácido nucleico o un polisacárido como compuesto inhibidor luego de un fraccionamiento del sobrenadante (Escamilla, 2012).

Transición epitelial-mesenquimal (EMT): EMT es un proceso biológico que permite que una célula epitelial polarizada, que normalmente interactúa con la membrana basal a través de su superficie basal, lleve a cabo numerosas alteraciones bioquímicas que resultan en un cambio de un fenotipo a una célula mesenquimal. Este cambio de fenotipo provoca una mayor capacidad migratoria y capacidad de invasión (Bui, 2015). Se ha demostrado que *L. acidophilus* NCFM ejerce efectos antimetastásicos a través de la regulación negativa de la expresión de CXCR4, que participa en la EMT, en el colon, los ganglios linfáticos mesentéricos y el bazo de ratones portadores de tumores (Keith, 2007). También se ha observado que *L. casei* induce muerte celular apoptótica en líneas celulares de carcinoma de colon tanto murino (CT26) como humano

(HT29), así como en un modelo de tumor experimental asociado con la regulación al aumento de la expresión de un ligando inductor de apoptosis relacionado con el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) (Tiptiri-Kourpeti, 2016). Además, se ha demostrado que el sobrenadante libre de bacterias de *L. plantarum* suprime varias rutas de NF- $\kappa$ B el cual se asocia con EMT y el potencial metastásico en varios cánceres (Petrof, 2009). Además, recientemente se detectó la sobreexpresión de SFRP2, un antagonista de la vía Wnt en células de cáncer colorrectal HT-29 después del tratamiento con *L. rhamnosus* y en células HeLa después de tratamientos con *L. rhamnosus* y *L. crispatus*, considerando la participación de la vía Wnt en metástasis de cáncer colorrectal

Microambiente tumoral: El microambiente tumoral se construye a través de las interacciones entre las células tumorales y normales. Estas últimas, tienen un papel activo y promotor de tumores en todas las etapas de la tumorigénesis. Los principales tipos de células no malignas que se detectan en este microambiente son las células del sistema inmune, vasculares tumorales y linfáticas, así como fibroblastos, pericitos y adipocitos (Zhu, 2014). Se ha demostrado que la administración de leche fermentada por *L. casei* CRL 431 disminuye o inhibe el crecimiento tumoral con disminución de la vascularización tumoral, extravasación de células tumorales y metástasis pulmonares. Estos beneficios se acompañan con la disminución de infiltración de macrófagos tanto en el tumor como en los pulmones y una mayor respuesta antitumoral asociada

los linfocitos CD<sub>8</sub><sup>+</sup> y CD<sub>4</sub><sup>+</sup> (Aragon, 2015). Se ha demostrado que *L. rhamnosus* GG ejerce una actividad antioxidante a través de la disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad fagocítica en neutrófilos (Vong, 2014). También, se ha detectado efectos antimetastásicos de *L. casei* Shirota en células tumorales trasplantables mediado por el aumento de la citotoxicidad de células NK (Takagi, 2001).

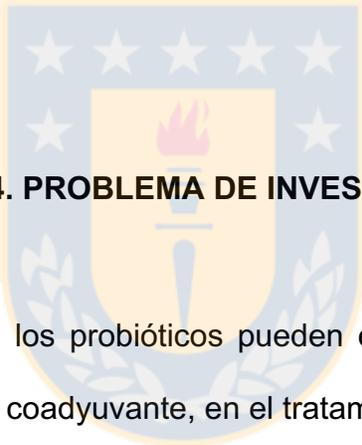
### 1.3. CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C

La cepa bacteriana *L. fermentum* UCO- 979C fue obtenida del cepario del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Departamento de Microbiología en la Universidad de Concepción. Se aisló desde biopsia gástrica de un individuo con indicación de endoscopia digestiva alta (EDA).

Se ha demostrado que *L. fermentum* UCO\_979C cumple con varias características probióticas como: tolerancia a pH ácido, tolerancia a la bilis, susceptibilidad antibiótica (Márquez, 2011; García, 2017). El genoma de la cepa UCO\_979C se encuentra parcialmente publicado, donde se reporta que presenta genes de proteínas de unión a colágeno y a fibronectina, entre otros (Karlyshev, 2015). Por otro lado, varios resultados del laboratorio de Patogenicidad Bacteriana muestran evidencia que *L. fermentum* UCO\_979C presenta actividad inhibitoria anti *Helicobacter pylori*, siendo capaz de inhibir la adhesión del patógeno y modular la respuesta inflamatoria. *H. pylori* es capaz

de inducir distintas patologías gastroduodenales, que van desde una simple gastritis aguda/crónica, atrofia gástrica, linfoma MALT, cáncer gástrico, y úlceras pépticas (Sachs, 2012).

Finalmente, se ha demostrado la capacidad de *L. fermentum* para formar biopelículas *in vitro*, sobre superficie de vidrio, poliestireno y en las líneas celulares AGS (adenocarcinoma gástrico) y CACO-2 (adenocarcinoma de colon humano), siendo capaz de inhibir la colonización por *H. pylori* (Salas-Jara, 2016).

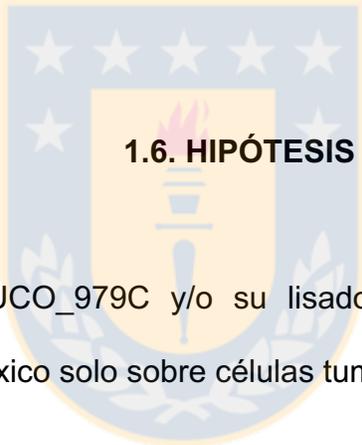


#### 1.4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Se ha visto que los probióticos pueden ejercer un efecto preventivo, e incluso participar como coadyuvante, en el tratamiento del cáncer. Por otro lado, *L. fermentum* UCO\_979C posee características probióticas y efecto supresor sobre el patógeno *H. pylori*, que puede desencadenar procesos inflamatorios y tumorales. Para seguir caracterizando las propiedades de *L. fermentum* UCO\_979C, para su uso potencial como probiótico, se hace necesario evaluar si presenta actividad citotóxica en líneas celulares humanas normales y tumorales.

## 1.5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Considerando que se ha demostrado que algunas cepas bacterianas probióticas tienen efecto antitumoral y siendo *L. fermentum* UCO\_979C un probiótico, cabe preguntar si ¿Tiene *L. fermentum* UCO\_979C y/o su lisado bacteriano, tienen la capacidad de generar un efecto citotóxico sobre células tumorales?



## 1.6. HIPÓTESIS

*L. fermentum* UCO\_979C y/o su lisado bacteriano son capaces de ejercer un efecto citotóxico solo sobre células tumorales.

## 1.7. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad citotóxica de *L. fermentum* UCO\_979C y su lisado bacteriano sobre células humanas tumorales.

### 1.7.1 Objetivos Específicos

1. Determinar la actividad citotóxica de *L. fermentum* UCO\_979C y su lisado bacteriano sobre células normales humanas (células de cordón umbilical humano, HUVEC)
2. Determinar la actividad citotóxica de *L. fermentum* UCO\_979C y su lisado bacteriano sobre células tumorales humanas (adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma de colon, carcinoma colorrectal, melanoma, queratinocitos)
3. Analizar actividad citotóxica del lisado fraccionado de *L. fermentum* UCO\_979C.
4. Determinar el efecto de *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C sobre la liberación de citoquinas en células de cordón umbilical humano y de adenocarcinoma gástrico.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. CÉLULAS HUMANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

#### 2.1.1. Células de cordón umbilical humano.

Para los ensayos realizados en este trabajo, se definió como células normales, aquellas que fuesen obtenidas desde cultivo primario no proviniendo desde una línea celular tumoral. Se utilizó como modelo células obtenidas desde cordón umbilical humano -HUVEC- (Nami, 2014). Para la obtención de las células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) se utilizó el método de Jaffe (Jaffe, 1973).

En condiciones de esterilidad, se canuló la vena del cordón y fue lavada con Buffer Fosfato Salino (PBS) 10 mM estéril. Posteriormente, fue sometido a digestión enzimática con Colagenasa tipo II (Gibco, Life Technologies) (0.33 mg/mL), incubando durante 10 minutos a 37°C. Luego, el medio con las células fue recuperado en un tubo estéril y centrifugado a 450 g por 10 minutos. Finalmente, el sobrenadante fue descartado y el pellet (células) resuspendidas en 5 mL de medio de cultivo M-199 (Corning) suplementado con 20% de suero bovino fetal (SBF) (Corning) y L-glutamina 3,2 mM (Corning), penicilina/estreptomicina (Biological Industries) y factor de crecimiento endotelial (*Endothelial Cell Growth Supplement*, Merck). Las células fueron

cultivadas en placas de 100 mm recubiertas con gelatina 1% p/v, e incubadas en una atmósfera de un 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, hasta lograr una confluencia de un 90%.

### **2.1.2. Líneas celulares tumorales.**

Considerando que *L. fermentum* UCO\_979C proviene de estómago humano, se utilizó de células tumorales gástricas y de colon humano, las cuales fueron: la línea celular AGS (ATCC CRL-1739, células de adenocarcinoma gástrico humano), CACO-2 (ATCC HTB-37, células de adenocarcinoma de colon humano) y HCT-116 (ATCC CCL-247, células de carcinoma colorrectal). Las líneas celulares, fueron expandidas, cultivadas y mantenidas a 37°C en atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub> en medio Dulbecco modificado (DMEM, Gibco), con 10% de SBF y 100 U/mL de la mezcla antibiótica penicilina/estreptomicina. Para evaluar el efecto de *L. fermentum* UCO\_979C e incluyó otras líneas celulares tumorales: la línea celular SK-MEL (ATCC HTB-67, células de melanoma maligno de piel humano), y la línea HaCaT (transformada de queratinocitos humanos), las cuales fueron gentilmente donadas por el Dr. Patricio Oyarzún de la Universidad San Sebastián, Concepción, Chile.

Las líneas celulares HCT-116 y HaCaT, fueron expandidas, cultivadas y mantenidas a 37°C en atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub> en medio

Dulbecco modificado (DMEM) (Gibco), con 10% de SBF y 100 U/mL de la mezcla antibiótica penicilina/estreptomicina (Biological Industries). La línea celular SK-MEL fue mantenida en las mismas condiciones anteriores, pero con medio de cultivo RPMI (Corning).

## **2.2. CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO.**

### **2.2.1. Condiciones de cultivo de *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C.**

La cepa de *L. fermentum* UCO\_979C fue sembrada desde el cepario (Glicerol 20% v/v, crioconservado a -80°C) en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS, Difco) en una atmósfera microaerófila (10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 85% N<sub>2</sub>) a 37°C por 24 horas. Luego, fue traspasada a una placa con agar MRS (*Lactobacilli* MRS Broth, BD Difco) cultivándola bajo las mismas condiciones anteriores durante 24 a 48 horas para obtener colonias aisladas.

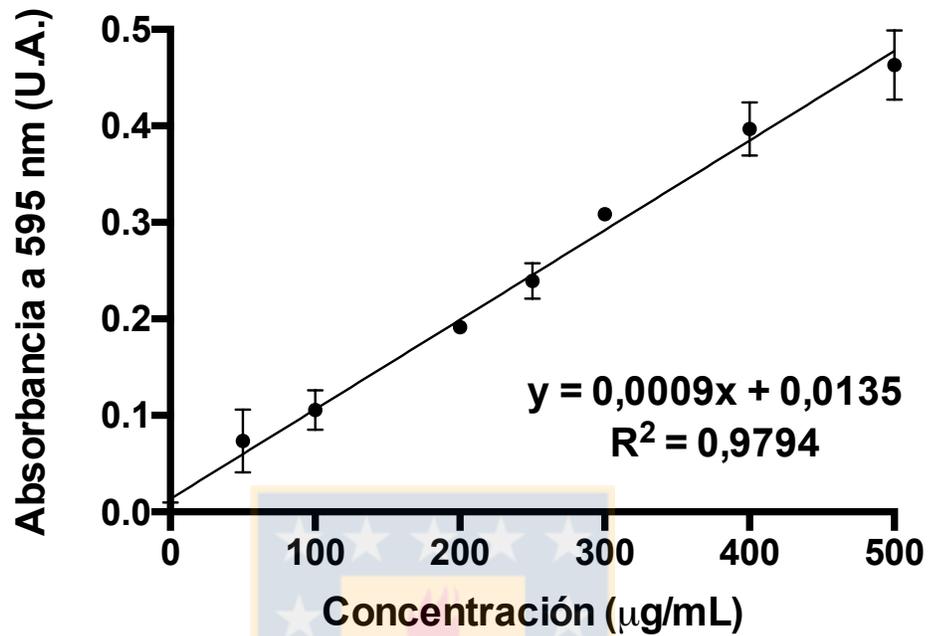
### **2.2.2. Extracción de proteínas totales de *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C.**

La cepa *L. fermentum* UCO\_979C fue conservada en medio líquido (caldo MRS). Se cultivó un inóculo en 1000 mL de medio de cultivo, por 24 hrs a

37°C (Ocaña, 2001). La suspensión bacteriana fue centrifugada por 8 min a 6000 g, posteriormente lavada tres veces con PBS 10 mM, pH 7,4. El pellet obtenido fue resuspendido en 35 mL de PBS 10 mM estéril, pH 7,4 y luego las suspensiones bacterianas fueron sometidas a ruptura mecánica en Prensa French con un flujo aproximado de 15 gotas/minuto a una presión de 1000 psi, para obtener un lisado bacteriano. Posteriormente, el lisado bacteriano, que contiene proteínas y otros productos bacterianos solubles, fue centrifugado 12800 g por 15 min a 4°C, fue filtrado usando filtros de 0,22  $\mu$ M (Millipore), guardando el sobrenadante a menos 80°C (Cirpus, 2006).

### **2.2.3. Cuantificación de proteínas totales.**

La determinación de la concentración de las proteínas obtenidas del lisado bacteriano de *L. fermentum* UCO\_979C fue realizada mediante el método de Bradford. La curva de calibración fue realizada desde un stock de BSA (Sigma) 1mg/mL, con lectura a una longitud de onda de 595 nm en el lector de multi microplaca *Synergy 2* (BioTek Instruments) (Figura 8-1). Al interpolar la absorbancia en la respectiva curva de calibración, se obtuvo una concentración de 4 mg/mL, información que fue base para el desarrollo del trabajo.



**Figura 2-1. Curva de calibración de proteínas totales de lisados de *L. fermentum* UCO\_979C.** Se grafican los resultados en unidades de absorbancia (U.A) a 595 nm y concentración de proteínas ( $\mu\text{g/mL}$ ). La línea negra representa la determinación de la ecuación de la recta entregada por el *Software Graph Prism 6.0*, utilizando regresión lineal. Las barras de error muestran la desviación estándar. Experimento realizado por triplicado. Fuente: Elaboración propia.

## 2.3. EFECTO CITOTÓXICO DE *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C SOBRE CÉLULAS.

### 2.3.1. Estandarización de la técnica Sulforrodamina B.

Para evaluar la actividad citotóxica de *L. fermentum* UCO\_979C y/o su lisado sobre las células en cultivo, se utilizó la técnica de Sulforrodamina B. Esta técnica permite medir la viabilidad celular, la cual consiste en la habilidad de unir componentes proteicos de las células que han sido fijadas a la placa de cultivo con ácido tricloroacético (TCA) (Vichai, 2006)

En general, las células fueron sembradas y crecidas durante 24 horas en placas de 96 pocillos a 37°C en atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub> para la técnica de Sulforrodamina B. Luego, 100 µL de ácido tricloroacético al 10% p/v, fueron adicionados sobre el medio de cada pocillo de la placa e incubado durante 1 hora a 4°C. Finalizada la incubación, la placa fue lavada cuatro veces con ácido acético al 1% v/v y se dejó secar a temperatura ambiente. Luego, se adicionaron 100 µL de solución de Sulforrodamina B al 0,057% p/v preparada en ácido acético al 1% v/v, y la placa fue dejada durante 30 minutos. Terminado los 30 minutos, la placa fue lavada cuatro veces con ácido acético al 1% v/v y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionaron 200 µL de tris base 10mM pH 10,5 dejando en agitación durante 5 minutos, luego la

absorbancia fue cuantificada en el lector de multi microplaca *Synergy 2* (*BioTek Instruments*) a una longitud de onda de 510 nm.

Las células AGS fueron sembradas en concentraciones de 5.000, 10.000, 20.000, 40.000, 80.000, 100.000 células en placas de 96 pocillos para determinar la curva de densidad celular. Además, 20.000 células fueron sembradas para realizar seguimiento del crecimiento celular hasta las 96 horas de cultivo. Como control de muerte celular se utilizó el fármaco antineoplásico Doxorubicina (Sigma) en concentraciones de: 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16  $\mu\text{M}$  (Vichai, 2006).

### **2.3.2. Efecto de la Cepa UCO\_979C sobre la viabilidad en células humanas.**

La cepa *L. fermentum* UCO\_979C fue cultivada durante 24 horas en placas con agar MRS en condiciones de microaerofilia a 37°C. Se prepararon las distintas suspensiones bacterianas a una concentración aproximada de 0,5, 1, 2, 4 y 6 McFarland en medio de cultivo sin antibiótico para células HUVEC, AGS, CACO-2 y HCT-116. Se presenta la equivalencia a concentración bacteriana (UFC/mL) (Tabla 8-1).

**Tabla 2-1. Conversión de McFarland a concentración bacteriana.**

McFarland	Densidad Bacteriana aproximada (UFC/mL)
0,5	$1,5 \times 10^8$
1	$3,0 \times 10^8$
2	$6,0 \times 10^8$
4	$1,2 \times 10^9$
6	$1,5 \times 10^9$

Fuente: Elaboración propia.

Células HUVEC, AGS, CACO-2 y HCT-116 fueron sembradas en placas de 96 pocillos (BD Falcon) en concentración de 20.000 células/pocillo durante 24 horas. Posteriormente, el medio de cultivo fue removido, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 10 mM y el medio reemplazado con la suspensión de bacterias en concentraciones ajustadas a 0,5, 1, 2, 4 y 6 McFarland en medio de cultivo celular para cada célula donde se incubó durante 4 horas. Luego, el medio fue retirado y las células fueron lavadas 1 o 2 veces con PBS 10 mM para dejar solo las bacterias adherentes y se adicionó medio de cultivo sin antibiótico, dejando el cultivo durante 24, 48 y 72 horas a 37°C en atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, se determinó las células viables mediante la técnica de Sulforrodamina B, descrita en el punto 8.3.1.

Las líneas celulares SK-MEL y HaCaT, fueron sembradas en las mismas condiciones descritas anteriormente. Sin embargo, el medio fue reemplazado con una suspensión bacteriana de 2 McFarland.

### **2.3.3. Efecto de *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C sobre la liberación de citoquinas en células humanas.**

Células HUVEC y AGS fueron sembradas en placas de 96 pocillos (BD Falcon) en concentración de 20.000 células/pocillo durante 24 horas en el medio de cultivo M199 y DMEM respectivamente. Posteriormente, el medio de cultivo fue removido, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 10 mM y el medio reemplazado con la suspensión de bacterias en concentraciones de 1 McFarland, donde se incubó durante 4 horas. Luego, el medio fue retirado y las células fueron lavadas 1 o 2 veces con PBS 10 mM para dejar solo las bacterias adherentes, y se adicionó medio de cultivo sin antibiótico, dejando el cultivo durante 24, 48 y 72 horas. Luego el medio de removido y centrifugado durante 10 minutos a 11.337 g.

Finalmente se determinó a través de citometría de flujo, en el equipo Forteza X20, las siguientes citoquinas: IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , utilizando el kit comercial *Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines* (Becton Dickinson) según el protocolo indicado por el fabricante en el kit.

## **2.4. EFECTO DEL LISADO de *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C CÉLULAS HUMANAS.**

Células AGS fueron sembradas en placas de 96 pocillos (BD Falcon) en concentración de 20.000 células/pocillo durante 24 horas en medio de cultivo DMEM. Posteriormente, el medio de cultivo fue removido, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 10 mM, y fueron expuestas durante 24, 48 y 72 horas a concentraciones de 10, 50, 100, 200, 800 y 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en medio de cultivo celular. Finalmente, se determinó las células viables mediante la técnica de Sulforrodamina B.



## **8.5. EFECTO DEL LISADO FRACCIONADO de *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C CÉLULAS HUMANAS.**

### **8.5.1. Caracterización parcial del lisado fraccionado.**

La separación de proteínas fue realizada mediante la técnica de electroforesis en gradiente de dos dimensiones (DGGE). Para la separación de proteínas basadas en su punto isoelectrónico (isoelectroenfoco), se utilizó el equipo 3100 OFFGEL (*Agilent Technologies*) y el kit comercial OFFGEL pH 3-10 de 24 pocillos, ambos de la empresa *Agilent Technologies*. El protocolo utilizado fue uno predeterminado por el fabricante, el cual consistía en la utilización de un gel IPG de 24 cm de largo con un rango de pH lineal de 3 a 10.

Previo al isoelectroenfoque, el gel *IPG* fue puesto en el equipo y ensamblado. Luego, el gel fue rehidratado con 40  $\mu\text{L}$  de buffer de rehidratación *OFFGEL* por pocillo. Una alícuota de 1000  $\mu\text{g/mL}$  fue diluída a un volumen final de de 3,6 mL, cargándose en cada pocillo 150  $\mu\text{L}$  de la mezcla (Moreda-Piñeiro, 2014). Luego, se realizó el isoelectroenfoque de acuerdo al programa PAPR0124 *high resolution* predeterminado por el fabricante, las condiciones de corrida se indican en la Tabla 8-2.

**Tabla 2-2. Condiciones de corrida de isoelectroenfoque.**

<b>Condición</b>	<b>Valor</b>
Voltaje/Hora	64 kVh
Voltaje	4500 V
Corriente	50 $\mu\text{A}$
Poder	200 mW
Tiempo	100 Horas

Fuente: Elaboración propia.

Finalmente, las muestras fueron recuperadas desde cada pocillo y almacenadas a menos 80°C. Las muestras obtenidas desde el isoelectroenfoque *OFFGEL* fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE en

condiciones denaturantes usando un gel de poliacrilamida en gradiente desde el 10% al 20%. La electroforesis en dos dimensiones fue realizada en un gel de 16 x 20 cm utilizando la cámara *Biorad PROTEAN II xi Cell*, permitiendo separar proteínas entre 3 a 300 Kda y obtener una mejor resolución. Las condiciones de corrida fueron a 90 V durante 13 horas.

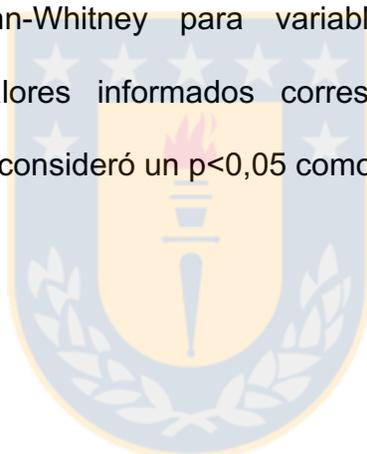
Finalmente, el gel fue teñido con tinción de nitrato de plata (39 mM) para la visualización del perfil de proteínas del lisado obtenido desde *L. fermentum* UCO\_979C. Para realizar la curva estándar se utilizó el marcador de peso molecular *AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder* (MaestroGen).

### **2.5.2. Efecto de fracciones de lisados de *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C en células de Adenocarcinoma gástrico.**

Células AGS fueron sembradas en placas de 96 pocillos (BD Falcon) en concentración de 20.000 células/pocillo durante 24 horas en medio de cultivo DMEM. Posteriormente, el medio de cultivo fue removido, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 10 mM, el medio de cultivo fue removido, y las células fueron expuestas durante 48 horas a 50  $\mu$ L de las fracciones del lisado de *L. fermentum* UCO\_979C obtenidas desde el isoelectroenfoco. Finalmente, se determinó las células viables mediante la técnica de Sulforrodamina B.

## 2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Los datos fueron procesados utilizando el *Software GraphPad Prism* versión 6.0c para Mac OS X. El análisis de las significancias estadísticas para más de dos muestras fue realizado mediante análisis de varianza (ANOVA) de una cola, según corresponda. Para los análisis entre dos muestras, fue realizado mediante análisis de las medias (*t de student*) para variables paramétricas y Mann-Whitney para variables no paramétricas, según corresponda. Los valores informados corresponden al promedio de las determinaciones, y se consideró un  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

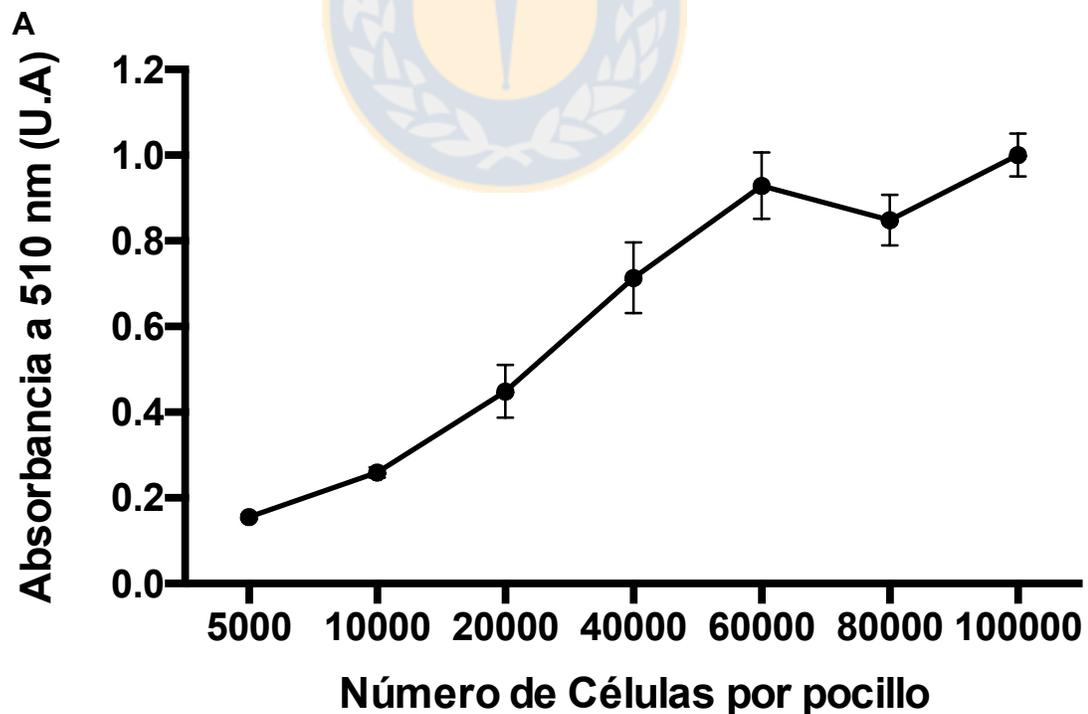


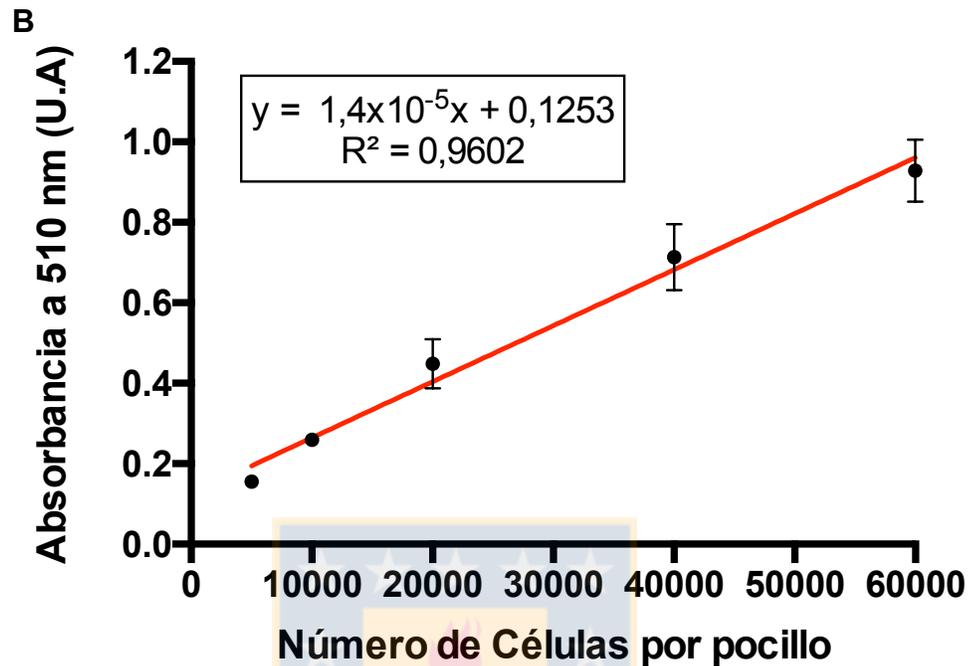
### 3. RESULTADOS

#### 3.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA SULFORRODAMINA B.

##### 3.1.1. Determinación de la curva de densidad y proliferación celular.

Al cultivar células de adenocarcinoma gástrico AGS, en concentraciones crecientes con el fin de determinar un perfil de densidad celular durante 24 horas (Figura 3-1A), se encontró una relación lineal hasta las 60.000 células (Figura 3-1B). A partir de estos resultados, se decidió trabajar con 20.000 células para los próximos experimentos.

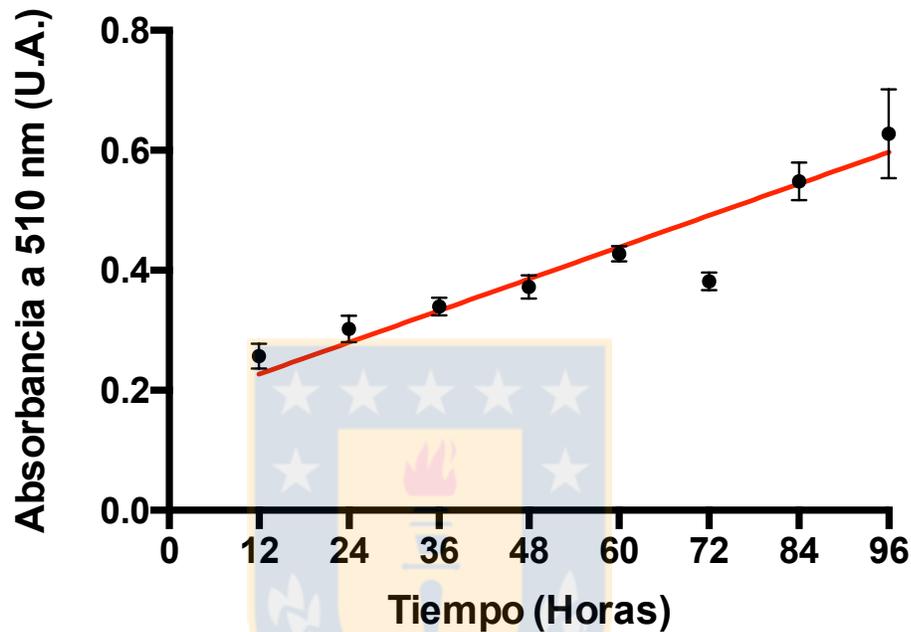




**Figura 3-1. Curva de densidad celular de células AGS.** Células AGS fueron sembradas durante 24 horas en cantidades crecientes, para determinar la curva de densidad celular. Se utilizó el método de Sulforrodamina B. Los puntos negros, corresponden a cada valor de unidades de absorbancia (U.A.) a 510 nm. A) Curva de densidad celular. B) Grafica de relación lineal entre número de células y unidades de absorbancia. La línea roja indica la relación lineal entre el número de células y unidades de absorbancia. Se presenta la ecuación de la recta entregada por el *Software Graph Prism 6.0*, utilizando regresión lineal con el coeficiente de correlación. U.A. corresponde a unidades de absorbancia. Las barras de error muestran la desviación estándar. Experimento realizado por triplicado. Fuente: Elaboración propia.

El ensayo de proliferación celular se realizó con las células AGS hasta las 96 horas de cultivo, con 20.000 células por pocillo. Los resultados muestran

un aumento de la absorbancia lineal en el tiempo, con un tiempo de duplicación celular de 12 horas (Figura 3-2).

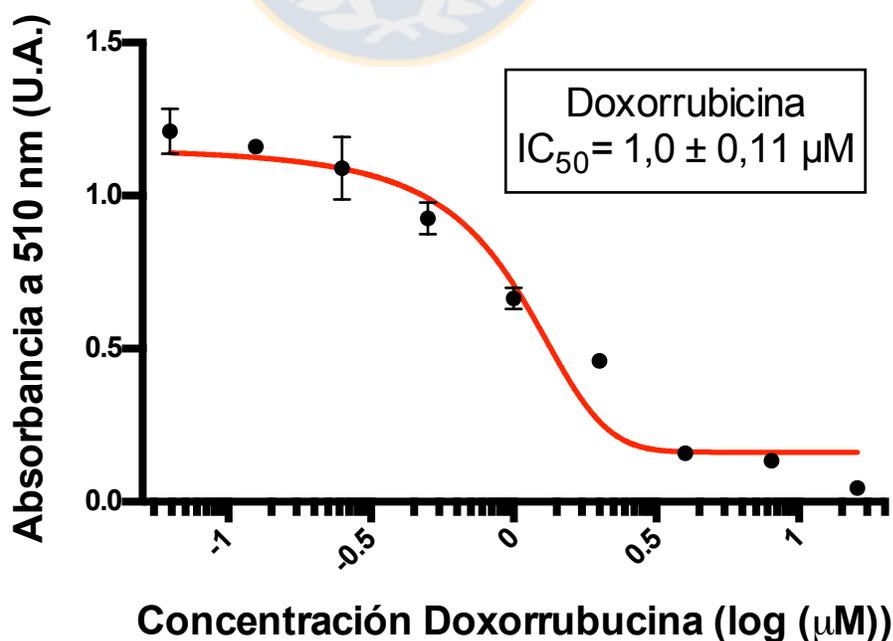


**Figura 3-2. Curva de crecimiento celular de células AGS.** Células AGS fueron cultivadas para evaluar el crecimiento en el tiempo. Se grafican los resultados en unidades de absorbancia (U.A.) a 510 nm con intervalos de tiempo de 12 horas entre determinaciones. U.A. corresponde a unidades de absorbancia. La línea roja corresponde a la relación lineal entre el número de horas y unidades de absorbancia. Las barras de error muestran la desviación estándar. Experimento realizado por triplicado. Fuente: Elaboración propia.

### 3.1.2. Determinación de la toxicidad celular de Doxorubicina.

Para verificar la técnica de Sulforrodamina B evaluar la citotoxicidad se utilizó como control de muerte el fármaco antineoplásico Doxorubicina. Este fármaco actúa intercalándose al ADN, inhibiendo la biosíntesis de ácidos nucleicos y dificultando el avance de la enzima topoisomerasa II durante la transcripción.

Las células AGS fueron sembradas en cantidad de 20.000 células por pocillo y expuestas a distintas concentraciones de Doxorubicina para determinar el efecto de citotoxicidad y determinación de  $IC_{50}$ . Los resultados muestran que a mayor concentración de doxorubicina se observa una disminución de la viabilidad celular obteniendo un  $IC_{50}$  de  $1,0 \pm 0,11 \mu M$  (Figura 3-3).



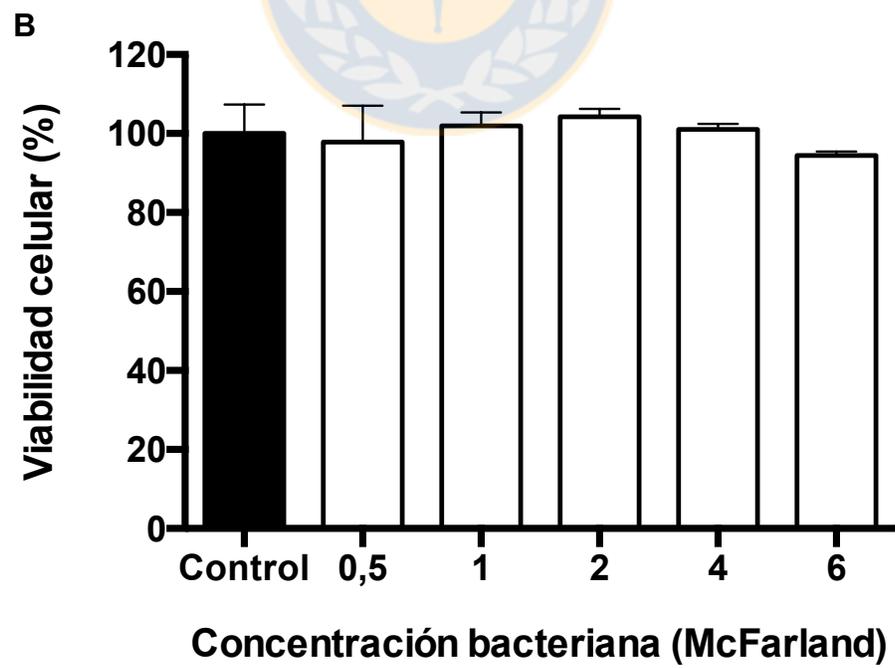
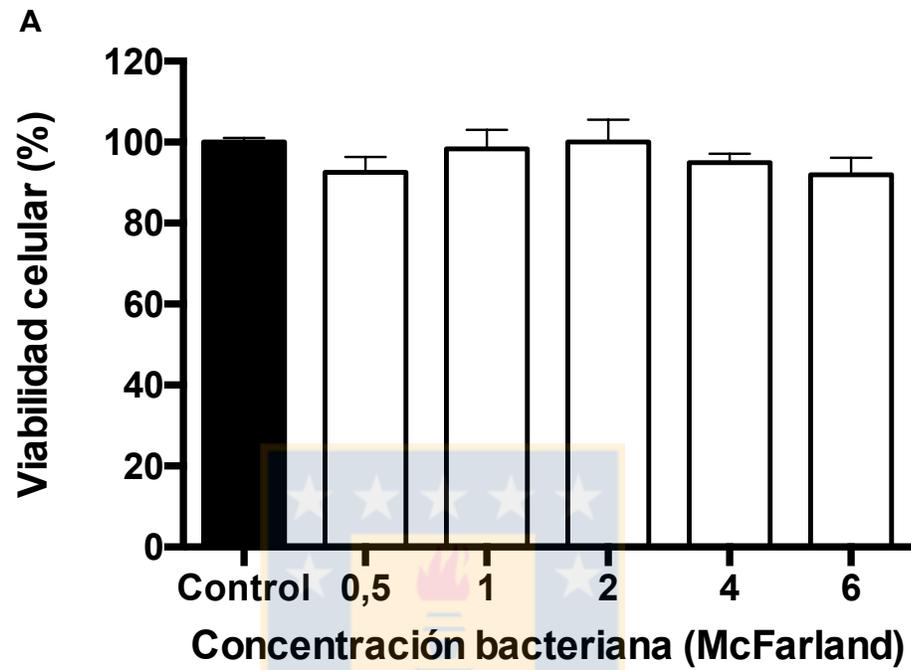
**Figura 3-3. Determinación de toxicidad celular de Doxorubicina en células AGS.**

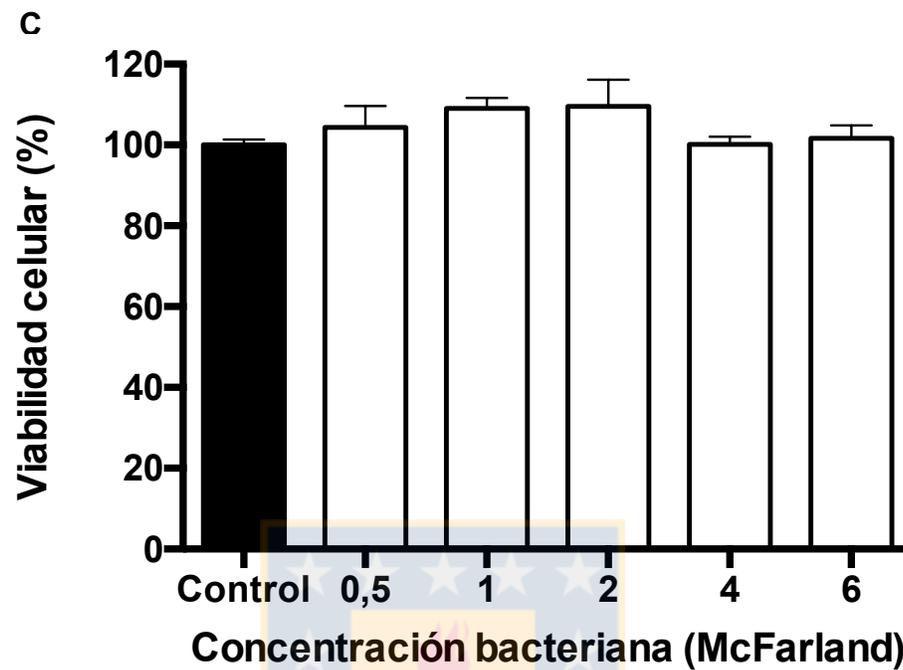
Células AGS fueron expuestas a concentraciones crecientes de doxorubicina. Se grafican los resultados en unidades de absorbancia (U.A) a 510 nm y el logaritmo de la concentración de doxorubicina para la determinación del IC<sub>50</sub>. La línea negra representa la determinación del IC<sub>50</sub> entregada por el *Software Graph Prism 6.0*, utilizando regresión logarítmica calculada por el porcentaje de inhibición de cada concentración de doxorubicina utilizada ( $\mu\text{M}$ ). Experimento realizado por triplicado. Fuente: Elaboración propia.

**3.2. EFECTO DE *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C SOBRE CÉLULAS HUMANAS.****3.2.1. Efecto de *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C en células obtenidas de cordón umbilical humano.**

Para evaluar el efecto citotóxico de *L. fermentum* UCO\_979C en células humanas normales, se analizó su actividad en un cultivo primario de células endoteliales obtenidas de cordón umbilical humano –HUVEC-, durante 24, 48 y 72 horas de exposición a las cepas.

Los resultados muestran que durante las 24, 48 y 72 horas de cultivo de células HUVEC con las distintas concentraciones expuestas de *L. fermentum* UCO\_979C, no se observan diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular respecto al control de células no expuestas a la bacteria (Figura 3-4A, 3-4B, 3-4C).





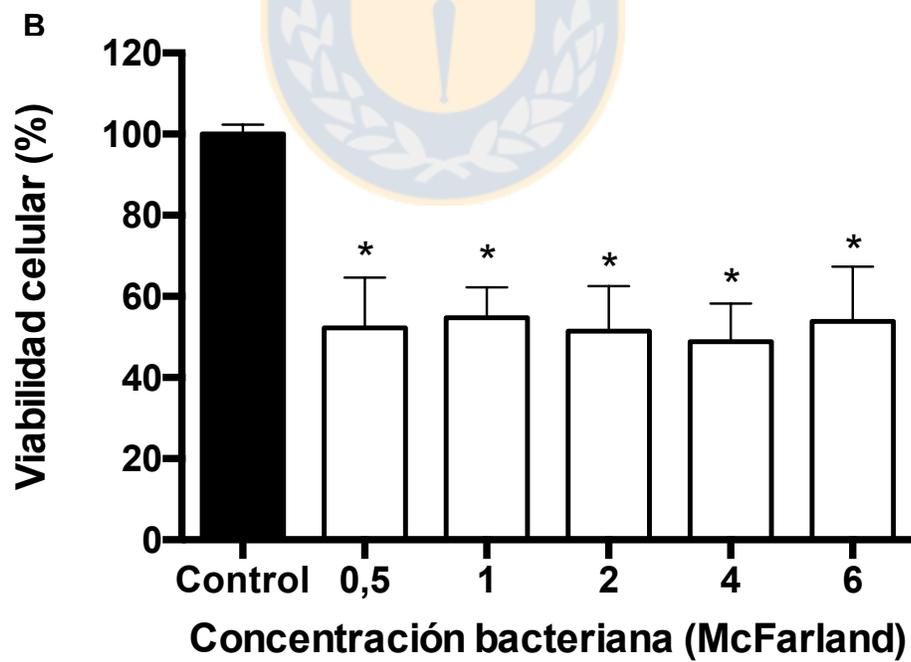
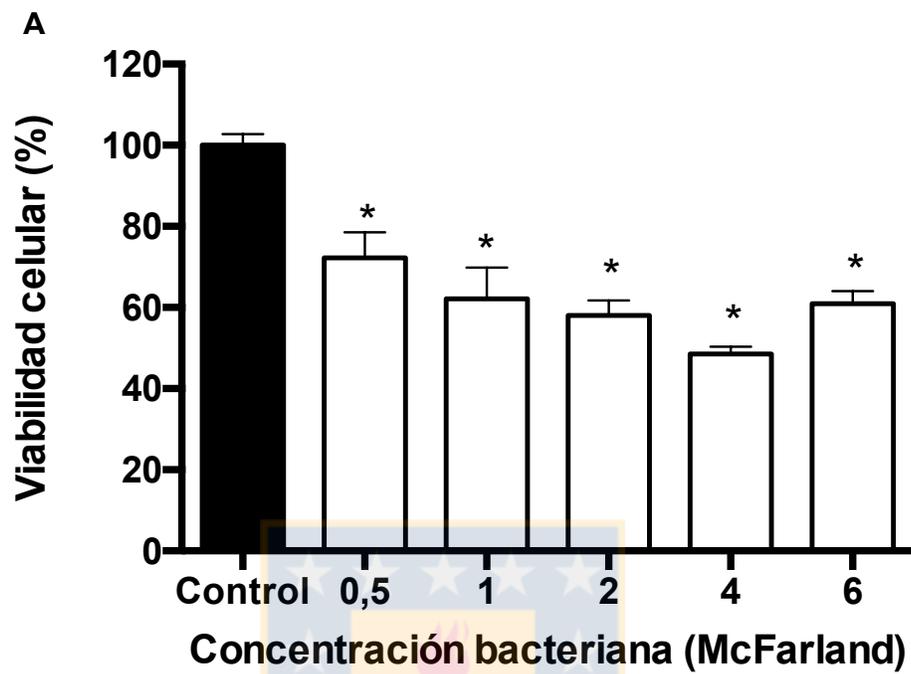
**Figura 9-4. Viabilidad celular de células HUVEC expuestas a *L. fermentum* UCO\_979C.** Células HUVEC fueron expuestas con distintas concentraciones de *L. fermentum* UCO\_979C, las barras negras indican el control correspondiente células no expuestas, las barras blancas representan las células con el estímulo bacteriano. A) Células HUVEC expuestas durante 24 horas. B) Células HUVEC expuestas durante 48 horas. C) Células HUVEC expuestas durante 72 horas. Las barras de error indican la desviación estándar. Experimento realizado por triplicado. Fuente: Elaboración propia.

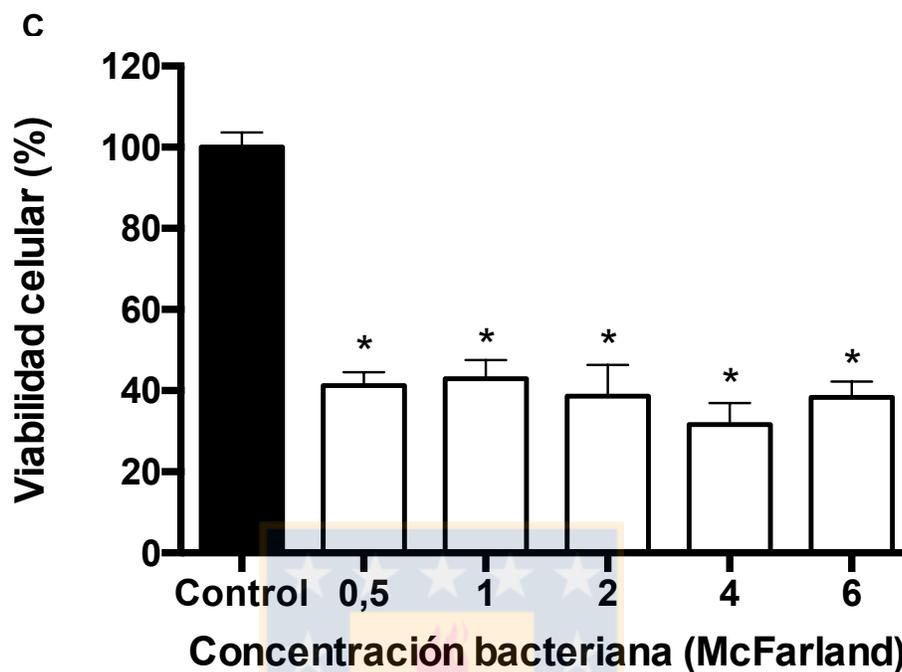
### 3.2.2. Efecto de *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C en células de adenocarcinoma gástrico.

Para evaluar el potencial efecto citotóxico de *L. fermentum* UCO\_979C sobre las células de adenocarcinoma gástrico AGS, se incubaron en cultivo distintas concentraciones de la cepa resuspendidas en medio de cultivo sin antibiótico durante 24, 48 y 72 horas de exposición a las bacterias.

A las 24 horas de cultivo de células AGS con *L. fermentum* UCO\_979C, se observa una disminución de la viabilidad celular estadísticamente significativo. Para la concentración de 0,5 MF se observa un 72% de viabilidad, para 1 y 2 MF un 62% y 58% de viabilidad respectivamente, para 4 MF un 48% de viabilidad, y para 6 MF un 60% de viabilidad (Figura 3-5A).

A las 48 de cultivo, se observa una disminución a un 52%, 55%, 51%, 49%, y 54% de viabilidad celular respectivamente, en las distintas concentraciones de *L. fermentum* UCO\_979C (Figura 3-5B). Finalmente, a las 72 de cultivo, se observa una disminución a un 41%, 43%, 39%, 32%, y 38% respectivamente de viabilidad celular, en las distintas concentraciones utilizadas de *L. fermentum* UCO\_979C (Figura 3-5C). Ambos resultados fueron estadísticamente significativos.





**Figura 3-5. Viabilidad celular de células AGS expuestas a *L. fermentum* UCO\_979C.** Células AGS fueron expuestas con distintas concentraciones de la cepa UCO\_979C, las barras negras indican el control correspondiente células sin estímulo, las barras blancas representan las células no expuestas a la bacteria. A) Células AGS expuestas durante 24 horas. B) Células AGS expuestas durante 48 horas. C) Células AGS expuestas durante 72 horas. Las barras de error muestran la desviación estándar. Experimento realizado por triplicado. (\*)  $p < 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.

### 3.2.3. Efecto de *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C en células de adenocarcinoma de colon.

Se analizó el efecto de distintas concentraciones *L. fermentum* UCO\_979C y su actividad citotóxica en la línea celular de adenocarcinoma de colon humano CACO-2.

Los resultados muestran que a las 24 horas de cultivo de células CACO-2 con *L. fermentum* UCO\_979C, se observa una disminución de la viabilidad celular estadísticamente significativa. Para la concentración de 0,5 MF un 74% de viabilidad, para 1 MF un 78%, para 2 MF hay 59%, para 4 MF un 22%, y para 6 MF un 20% de viabilidad celular (Figura 3-6A).

A las 48 de cultivo, se observa una disminución a un 59%, 19%, 19%, 22%, y 21% de viabilidad celular respectivamente, en todas las concentraciones de *L. fermentum* UCO\_979C (Figura 3-6B). Ambos resultados fueron estadísticamente significativos.

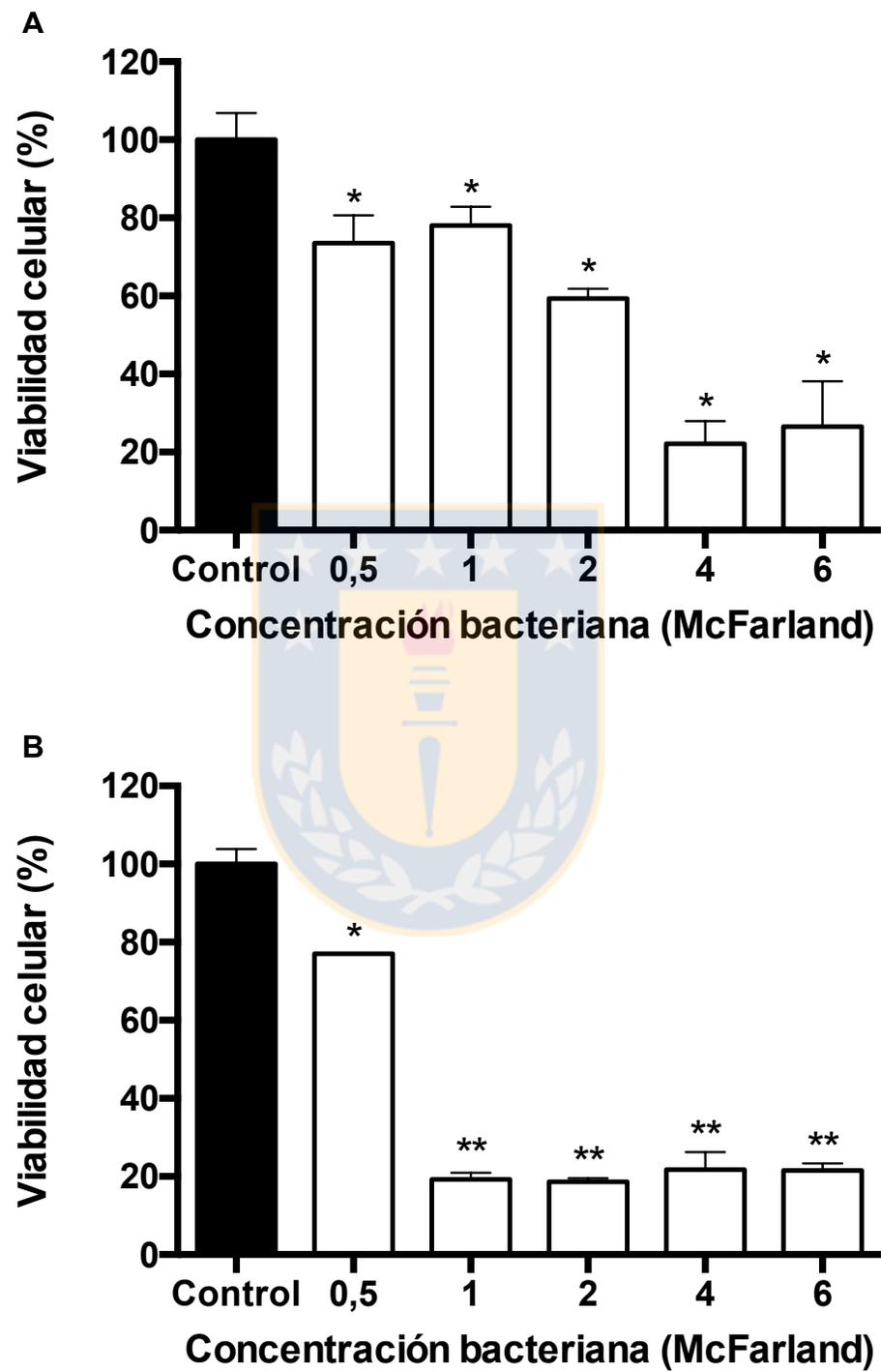


Figura 3-6. Viabilidad celular de células CACO-2 expuestas a *L. fermentum* UCO\_979C. Células CACO-2 fueron estimuladas con distintas concentraciones de *L.*

*fermentum* UCO\_979C, las barras negras indican el control correspondiente células sin estímulo, las barras blancas representan las células con el estímulo bacteriano. A) Células CACO-2 expuestas durante 24 horas. B) Células CACO-2 expuestas durante 48 horas. Las barras de error indican la desviación estándar. Experimento realizado por triplicado. (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,0001$ . Fuente: Elaboración propia.

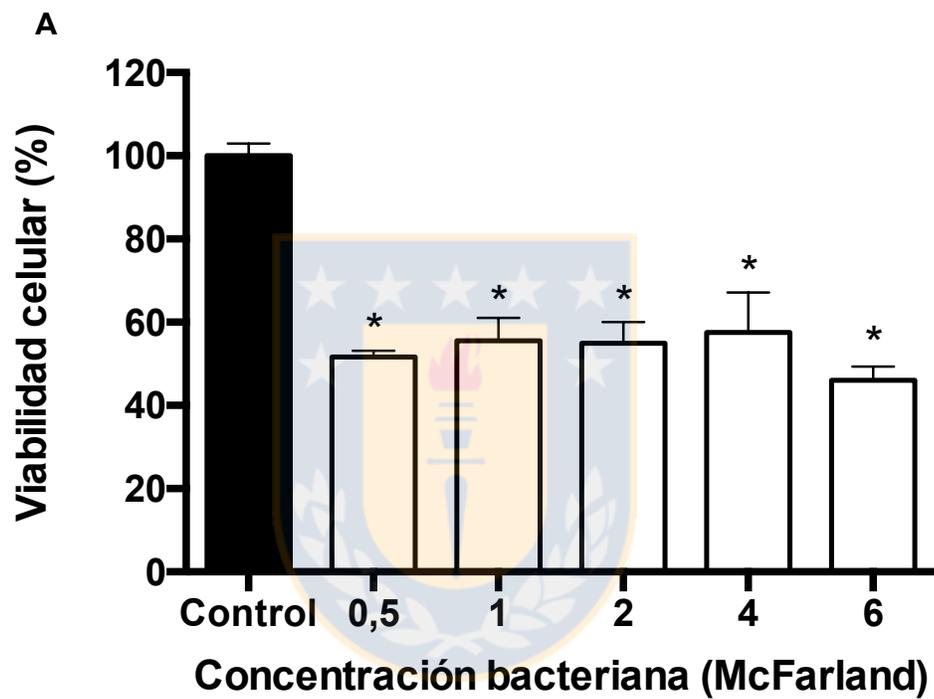
#### **3.2.4. Efecto de *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C en células de carcinoma colorrectal humano.**

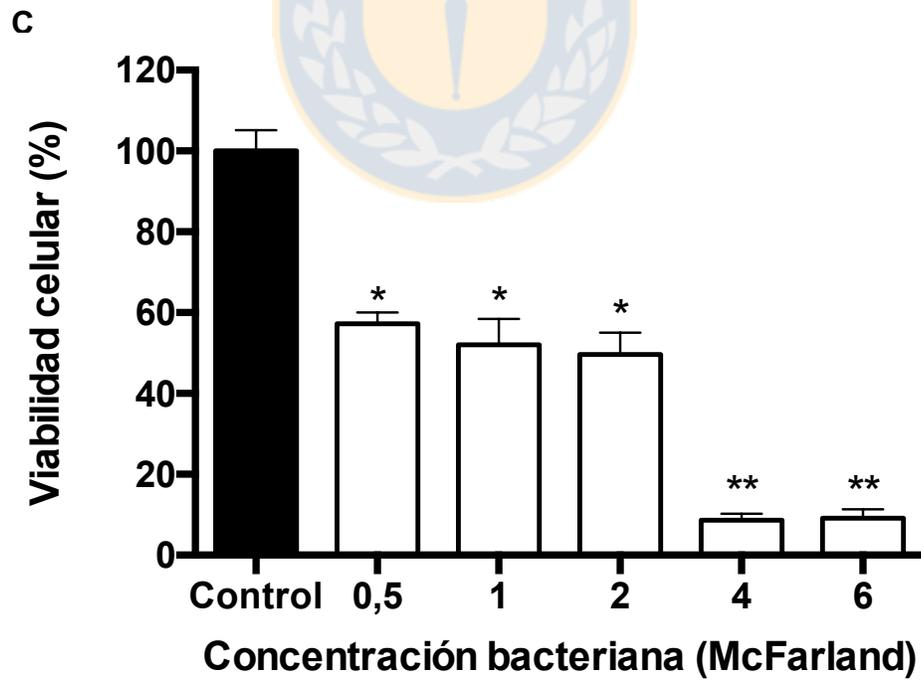
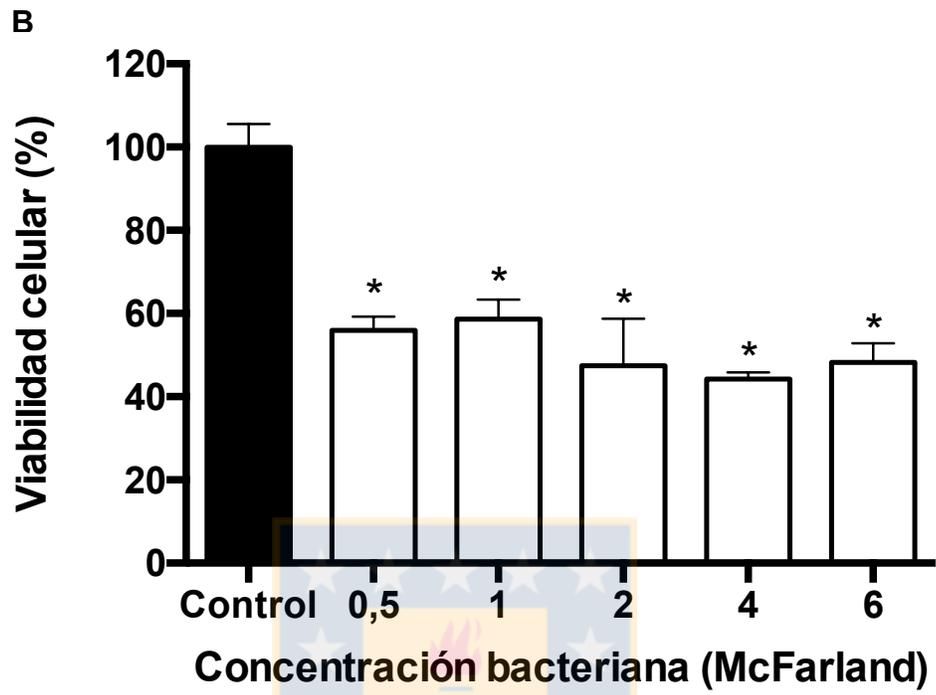
Se analizó el efecto de distintas concentraciones *L. fermentum* UCO\_979C y su actividad citotóxica en la línea celular de carcinoma colorrectal humano HCT-116.

Los resultados muestran que a las 24 horas de cultivo de células HCT-116 con *L. fermentum* UCO\_979C, se observa una disminución de la viabilidad celular estadísticamente significativa. Para la concentración de 0,5 MF un 52% de viabilidad, para 1 MF un 56%, para 2 MF hay 55%, para 4 MF un 58%, y para 6 MF un 46% de viabilidad celular (Figura 3-7A).

A las 48 de cultivo, se observa una disminución a un 51%, 58%, 48%, 33%, y 48% de viabilidad celular respectivamente, en todas las concentraciones de *L. fermentum* UCO\_979C (Figura 3-7B). Ambos resultados fueron estadísticamente significativos. Finalmente, a las 72 de cultivo, se observa una disminución a un 57%, 52%, 36%, respectivamente de viabilidad celular y a un

9% para las concentraciones de 4 y 6 MF, de *L. fermentum* UCO\_979C (Figura 3-7C). Ambos resultados fueron estadísticamente significativos.



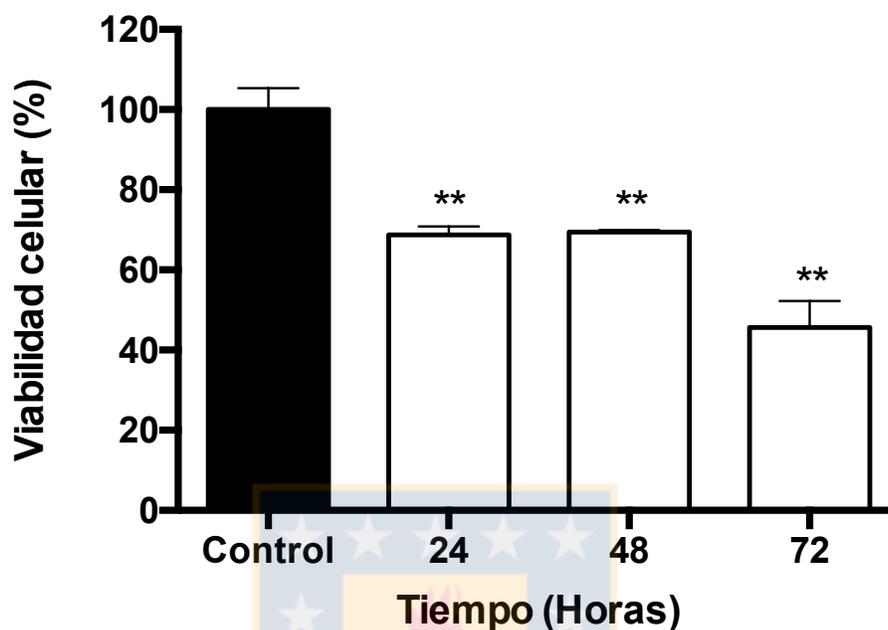


**Figura 9-7. Viabilidad celular de células HCT-116 expuestas a *L. fermentum* UCO\_979C.** Células HCT-116 fueron estimuladas con distintas concentraciones de *L. fermentum* UCO\_979C, las barras negras indican el control correspondiente células sin estímulo, las barras blancas representan las células con el estímulo bacteriano. A) Células HCT-116 expuestas durante 24 horas. B) Células HCT-116 expuestas durante 48 horas. C) Células HCT-116 expuestas durante 72 horas. Las barras de error indican la desviación estándar. Experimento realizado por triplicado. (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ . Fuente: Elaboración propia.

### 3.2.5. Efecto de *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C en otras células tumorales.

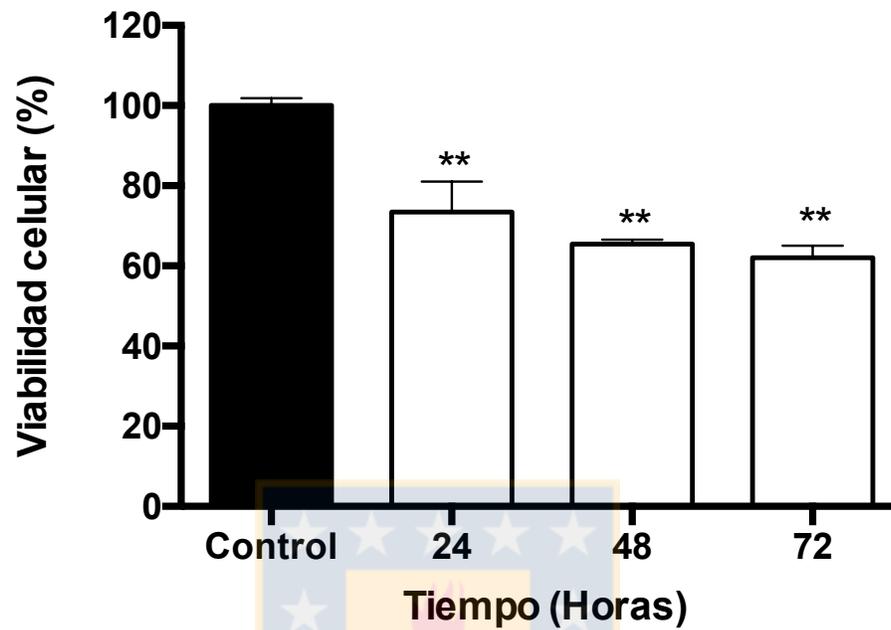
Se evaluó el potencial citotóxico de *L. fermentum* UCO\_979C, en distintas células tumorales, expuestas a una concentración de 2 McFarland, la cual presenta citotoxicidad en las otras células tumorales. Para esto se utilizaron células de melanoma maligno de piel humano SK-MEL, y la línea transformada de queratinocitos humanos HaCaT.

Células SK-MEL expuestas a *L. fermentum* UCO\_979C por 24 horas disminuyen su viabilidad respecto al control, no expuesto a la bacteria, a un 69%, efecto que se mantiene a las 48 horas, y a las 72 horas se incrementa el efecto citotóxico, reduciendo la viabilidad celular a un 46% (Figura 3-8).



**Figura 3-8. Viabilidad celular de células SK MEL expuestas a *L. fermentum* UCO\_979C.** Células SK MEL fueron estimuladas durante 24, 48 y 72 horas con 2 MF de *L. fermentum* UCO\_979C, las barras negras indican el control correspondiente células sin estímulo, las barras blancas representan las células con el estímulo bacteriano. Las barras de error indican la desviación estándar. Experimento realizado por triplicado. (\*\*)  $p < 0,01$ . Fuente: Elaboración propia.

Finalmente, en células HaCaT expuestas a *L. fermentum* UCO\_979C, se observa que a las 24 disminuyen su viabilidad respecto al control de células no expuestas a un 73%, efecto que se mantiene a las 48 horas con un 65% de viabilidad, y a las 72 horas con un 62% de viabilidad celular (Figura 3-9).



**Figura 3-9. Viabilidad celular de células HaCaT expuestas a *L. fermentum* UCO\_979C.** Células HaCaT fueron estimuladas durante 24, 48 y 72 horas con 2 MF de *L. fermentum* UCO\_979C, las barras negras indican el control correspondiente células sin estímulo, las barras blancas representan las células con el estímulo bacteriano. Las barras de error indican la desviación estándar. Experimento realizado por triplicado. (\*\*)  $p < 0,01$ . Fuente: Elaboración propia.

### **3.3. EFECTO DE LISADOS BACTERIANOS OBTENIDOS DE *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C SOBRE CÉLULAS HUMANAS.**

#### **3.3.1. Efecto de lisados de *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C en células de adenocarcinoma gástrico.**

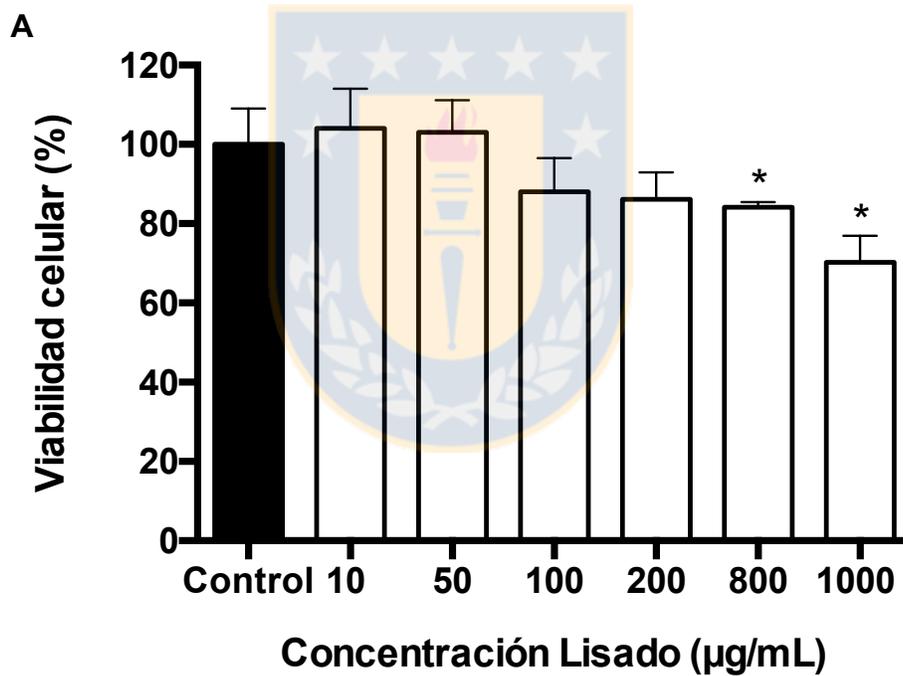
Se evaluaron distintas concentraciones de lisado bacteriano de *L. fermentum* UCO\_979C, generado mediante lisis mecánica, sobre la viabilidad de células de adenocarcinoma gástrico AGS durante 24, 48 y 72 horas de exposición.

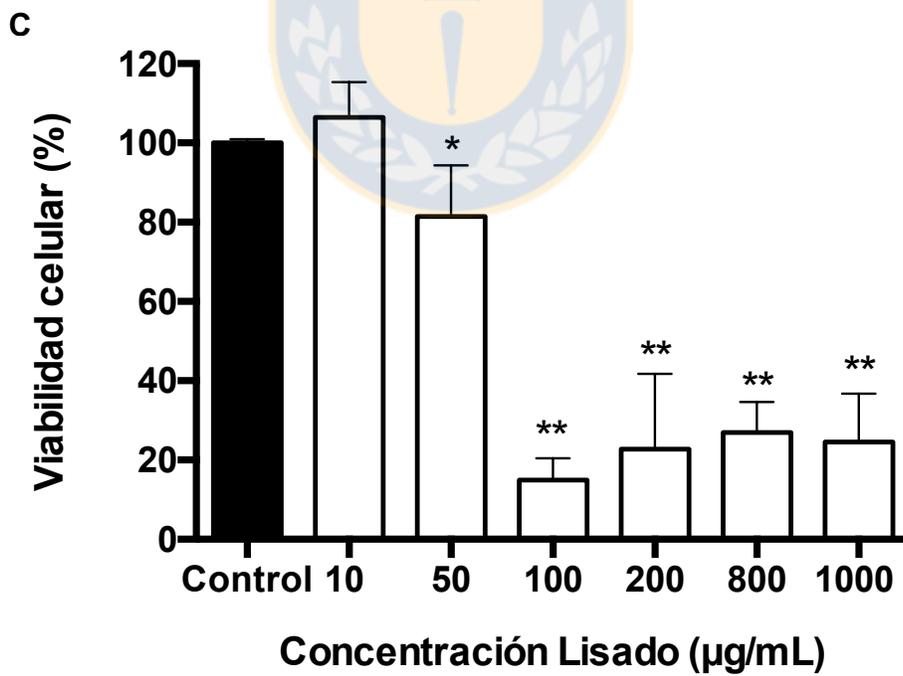
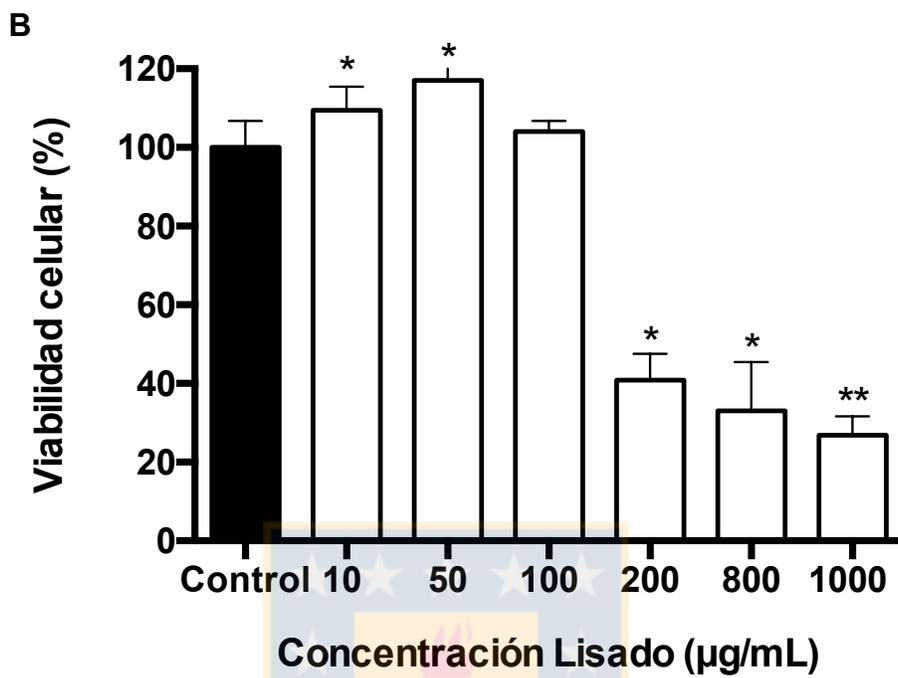
A las 24 horas de incubación con el lisado bacteriano se observa un efecto citotóxico leve sobre la viabilidad celular de las células AGS. Este efecto citotóxico aumenta gradualmente con la concentración de lisado en el medio de incubación, llegando a un 70% de viabilidad a una concentración de 1000  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 3-10A).

A las 48 de cultivo, se observa que las concentraciones de 10, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ , no muestran un efecto significativo sobre la viabilidad celular de las células AGS. Sin embargo, a concentraciones de 200, 800 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  se induce una disminución de un 41%, 33% y 27% de la viabilidad celular, respectivamente. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre ellos. (Figura 3-10B).

Finalmente, a las 72 de cultivo, se observa que la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  no muestra un efecto sobre la viabilidad celular. Para las

concentraciones de 50, 100, 200, 800 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  hay una disminución a un 81%, 15%, 23%, 27% y 25% de la viabilidad celular en las células expuestas al lisado respectivamente. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Figura 3-10C).





**Figura 3-10. Viabilidad celular de células AGS expuestas a lisados de *L. fermentum* UCO\_979C.** Células AGS fueron estimuladas con distintas concentraciones de lisado de *L. fermentum* UCO\_979C, las barras negras indican el control correspondiente células sin estímulo, las barras blancas representan las células con el lisado. A) Células AGS expuestas durante 24 horas. B) Células AGS expuestas durante 48 horas. C) Células AGS expuestas durante 72 horas. Las barras de error indican la desviación estándar. Experimento realizado por triplicado. (\*)  $p < 0,05$ , y (\*\*)  $p > 0,01$ . Fuente: Elaboración propia.

### 3.4. ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL LISADO DE *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.

#### 3.4.1. Caracterización parcial del lisado fraccionado mediante equipo OFF GEL.

El lisado bacteriano obtenido de *L. fermentum* UCO\_979C (1mg/mL), fue separado mediante el equipo OFF GEL líquido (3100 OFFGEL Fractionator, Agilent Technologies), que permite separar fracciones proteicas por su punto isoeléctrico en un gradiente de pH 3 a 10 de alta resolución (intervalos de pH de 0,28 aproximadamente) en fase líquida. Posteriormente, cada fracción (24) fue analizada por medio de una electroforesis SDS-PAGE en gradiente de 10 a 20%. El gel obtenido fue teñido mediante tinción de plata.

En la electroforesis del lisado total de *L. fermentum* UCO\_979C se observan aproximadamente 38 bandas, que van desde 175 a 7 kDa, las bandas

de mayor concentración se localizan entre 80 y 30 kDa. Respecto a las fracciones analizadas, se observa un aumento cualitativo en la intensidad de tinción desde la fracción F4 a F7, siendo más intensa en la fracción F7. Desde la fracción 22 a la 24, se observa una disminución cualitativa en la intensidad de la tinción (Figura 3-11A)

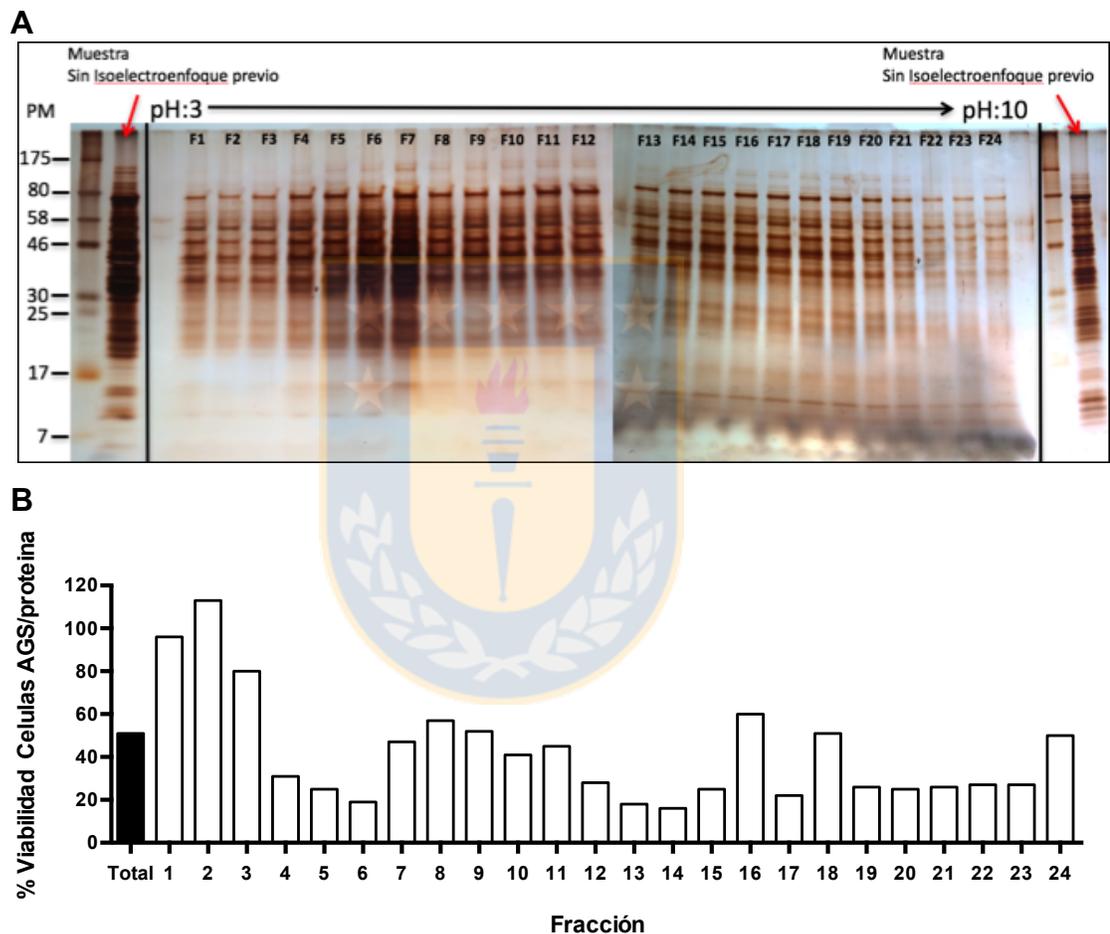
#### **3.4.2. Efecto de fracciones de lisados de *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C en células de adenocarcinoma gástrico.**

Se evaluó el efecto de las fracciones obtenidas mediante isoelectroenfoque líquido en la citotoxicidad de células de Adenocarcinoma gástrico AGS durante 48 horas de exposición.

Los resultados muestran que el lisado total produce un efecto citotóxico a las 48 hrs de incubación lo que disminuye la viabilidad de células AGS a un 49% aproximadamente. Al analizar las distintas fracciones generadas por el equipo OFF gel, podemos observar que existe una sensibilidad distinta al efecto citotóxico observado en células AGS.

Las tres primeras fracciones, (pH 3 – 3,84) se pierde el efecto citotóxico, sin embargo, desde la fracción 4 a la 6 se observa disminución de la viabilidad, siendo incluso mayor que el lisado total, alcanzando valores de viabilidad cercanos a un 20%. Desde la fracción 7 a la 11 se observa que el efecto sobre la viabilidad es cercano al lisado total. Las fracciones 13 a la 16 muestran la misma tendencia que las fracciones 4 a la 6 (20%). Las fracciones 16, 17 y 24

muestran un efecto similar al lisado total. Finalmente, se destaca que desde la fracción 19 a la 23, se observa una disminución de la viabilidad cercana a un 20% siendo este efecto mayor que el del lisado total y (Figura 3-11B).



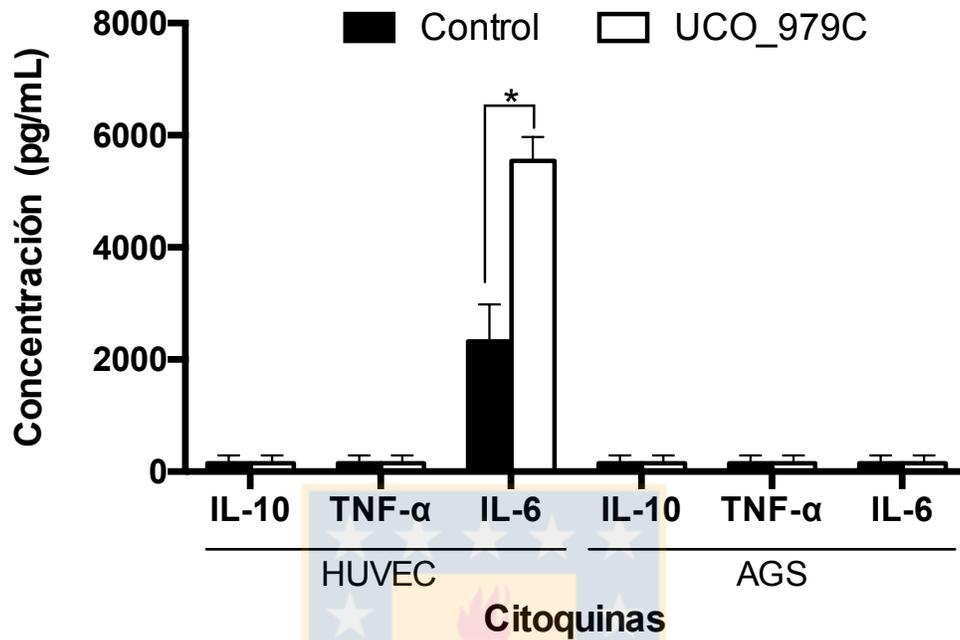
**Figura 3-11. Efecto de las fracciones del lisado *L. fermentum* UCO\_979C sobre la viabilidad de células AGS.** A) Gel de electroforesis de poliacrilamida SDS-PAGE en gradiente de 10 a 20%. Se utilizaron fracciones obtenidas desde el isoelectroenfoque del lisado bacteriano de *L. fermentum* UCO\_979C. En el gel se indica el marcador de peso molecular, el perfil electroforético de las muestras sin isoelectroenfoque, y el de

cada fracción indicando el gradiente de pH previo. B) Células AGS fueron estimuladas con las fracciones del lisado de *L. fermentum* UCO\_979C durante 48 horas. La barra negra corresponde al lisado total, y las barras blancas a cada fracción del lisado. Fuente: Elaboración propia.

### **3.5. EFECTO DE *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C EN LA SECRECIÓN DE CITOQUINAS EN CÉLULAS TUMORALES Y NORMALES**

#### **3.5.1. Efecto de *Lactobacillus fermentum* UCO\_979C en la secreción de citoquinas en células HUVEC y AGS.**

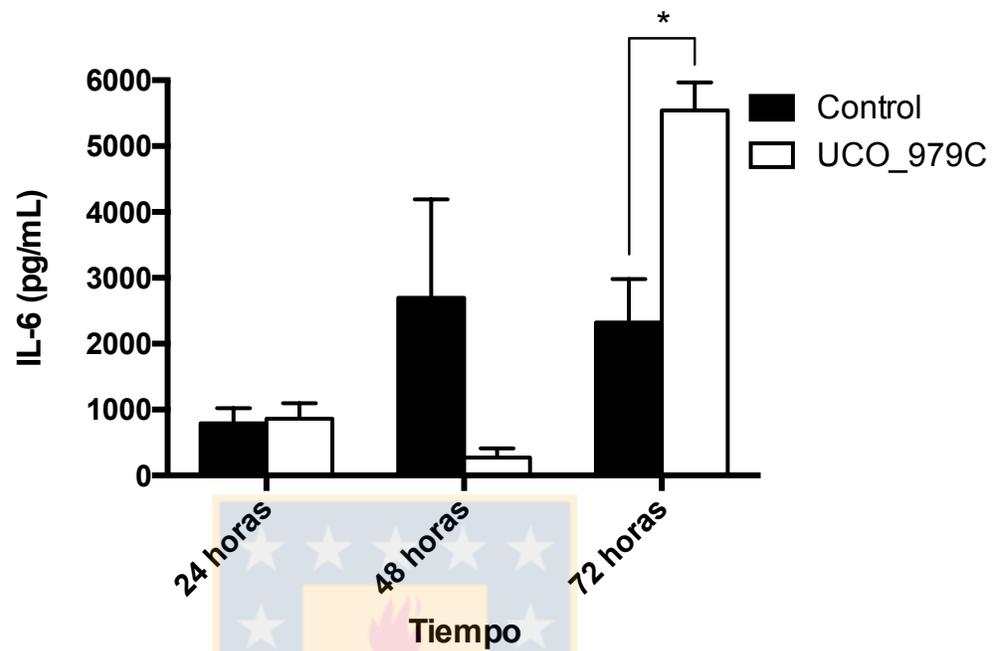
Al evaluar el efecto de *L. fermentum* UCO\_979C sobre la generación de citoquinas en células HUVEC por citometría de flujo, los resultados muestran que a las 72 horas de cultivo de células HUVEC expuestas a 1MF de *L. fermentum* UCO\_979C, no se observa liberación de TNF o IL-10 y sólo se observa la liberación de Interleucina 6 (IL-6) en el medio de cultivo. Las células control (no expuestas a la bacteria), muestran una concentración basal de IL-6 de  $2324 \pm 658$  pg/mL, en cambio al ser incubadas con *L. fermentum* UCO\_979C las células HUVEC se observa un aumento de la liberación de IL-6, llegando a una concentración de  $5544 \pm 424$  pg/mL, aproximadamente. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre las células control y las expuestas a *L. fermentum* UCO\_979C. En el caso de células AGS, no se observó secreción para ninguna de las citoquinas analizadas (Figura 3-12).



**Figura 3-12. Determinación de citoquinas en células expuestas durante 72 horas a *L. fermentum* UCO\_979C.** En la figura se presentan los resultados obtenidos para células HUVEC y AGS. Las células, fueron estimuladas con 1 MF de *L. fermentum* UCO\_979C, las barras negras indican el control correspondiente células sin estímulo, las barras blancas representan las células con el estímulo bacteriano. Las barras de error indican la desviación estándar. Experimento realizado por duplicado. (\*)  $p > 0,05$ .

Fuente: Elaboración propia.

Para evaluar el efecto de *L. fermentum* UCO\_979C sobre la secreción de IL-6 en el tiempo se determinó esta citoquina por 24, 48 y 72 horas en el sobrenadante de células HUVEC incubadas con *L. fermentum* UCO\_979C. Los resultados muestran que a las 24 horas de cultivo de células HUVEC expuestas a 1MF de *L. fermentum* UCO\_979C, las células control (no expuestas a la bacteria) muestran una concentración basal de IL-6 de  $791 \pm 230$  pg/mL, mientras que en las células expuestas a *L. fermentum* se determinó una concentración de IL-6 de  $864 \pm 233$  pg/mL, no mostrando diferencias estadísticamente significativas. A las 48 horas de cultivo, las células control, muestran una concentración de IL-6 de  $2697 \pm 1497$  pg/mL, mientras que las células expuestas a *L. fermentum* UCO\_979C fue de  $272 \pm 140$  pg/mL, no mostrando diferencias estadísticamente significativas. Finalmente, a las 72 horas de cultivo, las células control muestran una concentración de IL-6 de  $2324 \pm 658$  pg/mL, mientras que las células expuestas a *L. fermentum* UCO\_979C fue de  $5544 \pm 424$  pg/mL, mostrando diferencias estadísticamente significativas. (Figura 3-13).



**Figura 3-13. Determinación de IL-6 en células HUVEC expuestas a *L. fermentum* UCO\_979C.** Células HUVEC fueron estimuladas con 1 MF de *L. fermentum* UCO\_979C durante 24, 48 y 72 horas, las barras negras indican el control correspondiente células sin estímulo, las barras blancas representan las células con el estímulo bacteriano. Las barras de error indican la desviación estándar. Realizado por duplicado. (\*)  $p > 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.

#### 4. DISCUSIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas, pueden conferir un beneficio en el huésped (Mizock, 2015). Los tipos de bacterias más comunes, son las bacterias ácido lácticas, las cuales se han utilizado como probióticos, y algunas de ellas muestran atributos en la prevención del cáncer (Zhu, 2011). Las bacterias ácido lácticas son parte de la microbiota humana, las cuales pueden ser consideradas como probióticos beneficiosos para la salud. Varios estudios sugieren que los probióticos tienen efectos como: contrarrestar el cáncer de colon, sobre el colesterol sérico y competir con microorganismos patógenos, incluyendo *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* y *Staphylococcus aureus* (Živković, 2016; Satish Kumar, 2011). Por lo tanto, las bacterias ácido lácticas son microorganismos atractivos para combatir enfermedades gastrointestinales y bacterianas transmitidas por los alimentos (Shokryazdan, 2014). Además, poseen efectos anti-patógenos/antibacterianos, los cuales han sido atribuido a la producción de ácidos orgánicos, enzimas inhibidoras, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, competencia por sitios de adhesión y prevención del crecimiento de patógenos (Gueimonde, 2007).

Por otro lado, en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, se aisló y caracterizó la cepa *L. fermentum* UCO\_979C. Esta cepa es de origen humano y

proviene del ambiente gástrico. Además, presenta una fuerte actividad contra *H. pylori*, la cual presenta factores de virulencia relacionados con el cáncer gástrico (Kabamba, 2018), siendo el factor de virulencia *cagA*, conocido como la primera oncoproteína, capaz de manipular procesos como adhesión y polaridad para apoptosis celular, inflamación y progresión del ciclo celular (Tegtmeyer, 2017).

En cuanto a propiedades citotóxicas, para bacterias ácido lácticas se han demostrado propiedades anticancerígenas y anti-proliferativas. Estas son capaces de inhibir la formación de mutágenos y carcinógenos, inactivar y eliminar sustancias cancerígenas, modificar la microbiota colónica, modular la respuesta inmune del huésped, y regular de la proliferación y diferenciación celular (Shanahan, 2013).

Es por esto que este estudio tuvo como objetivo el determinar el potencial citotóxico de *L. fermentum* UCO\_979C y/o su lisado bacteriano sobre células humanas normales y tumorales como primera aproximación para otras aplicaciones del probiótico. Para evaluar la actividad citotóxica estandarizamos la técnica de SRB para determinar viabilidad celular. Esta técnica consiste en la cuantificación de proteínas totales de células fijadas por ácido tricloroacético en placas de cultivo. Los resultados muestran que hubo una relación directa entre el número de células y el valor de absorbancia al cuantificar con el reactivo de Sulforrodamina B en células AGS cuando se realizó una curva de densidad

celular. Al evaluar el efecto del control de Doxorubicina sobre células AGS, se observó un aumento en la curva de muerte relacionado directamente con un aumento de la concentración del reactivo. Se determinó el valor de  $IC_{50}$ , el cual fue de  $1,005 \pm 0,1124 \mu\text{M}$ , valor similar a lo reportado para estas células AGS (Zareian, 2016; Singh, 2018).

Varios estudios han mostrado que los resultados del ensayo SRB se correlacionan muy bien con ensayos de MTT (Vichai, 2006). La técnica de MTT es un ensayo colorimétrico basado en la reducción de tetrazolium en formazan dependiente de enzimas NADPH oxidorreductasas celulares, por lo tanto, del metabolismo celular (Berridge, 2005). Sin embargo, el ensayo SRB tiene varias ventajas sobre el ensayo MTT o XTT. Por ejemplo, algunos compuestos pueden interferir directamente con la reducción de MTT sin tener ningún efecto sobre la viabilidad celular, mientras que la tinción de SRB rara vez se ve afectada por este tipo de interferencia. La tinción de SRB es independiente de la actividad metabólica celular; por lo tanto, se requieren menos pasos para optimizar las condiciones de ensayo para líneas celulares específicas que en el ensayo MTT o XTT, el cual es un derivado de la técnica de MTT (Keepers, 1991). Por otro lado, el ensayo de MTT se utiliza para evaluar la formación de biopelículas bacterianas (Parai, 2018; Wijesundara, 2018), y está demostrado que *L. fermentum* UCO\_979C forma biopelículas (Salas-Jara, 2016), por lo tanto, podría ser conducente a falsos positivos el utilizar la técnica de MTT, proporcionando otra ventaja la utilización de la técnica de SRB. Además, se

desconoce si *L. fermentum* UCO\_979C altera el metabolismo celular, el cual puede interferir en la reacción de MTT. Lo anterior, justifica como válida la utilización de la técnica, ya que nuestros resultados son concordantes con lo descrito en literatura.

Las células AGS, de adenocarcinoma gástrico humano, han sido utilizadas para evaluar el efecto de potenciales anticarcinogénicos. En un estudio donde se evaluó el efecto de extractos de soya negra, con actividad antioxidante, se demostró en células AGS, toxicidad celular dosis-dependiente a las 48 horas de tratamiento con el extracto. Esta toxicidad fue confirmada con aumento en la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis como Bax, Bcl-2 y caspasa-3, postulando este extracto como un quimiopreventivo natural (Zou, 2011). Por otro lado, se ha publicado que la cepa de *Lactobacillus plantarum* 5BL también exhibe un comportamiento citotóxico selectivo sobre células tumorales como AGS (gástrica), HeLa (cervicouterina), HT-29 (intestinal) y MCF7 (mamas) sin que se presente un efecto citotóxico sobre células HUVEC utilizadas como control de células normales, (Nami, 2014).

Existe evidencia que leches fermentadas por *L. acidophilus* DSM9126 y *L. lactis* KX881782 mostraron efecto antiproliferativo en células CACO-2, y también en otras células tumorales como MCF7 y HeLa (Ayyash, 2017). Otro estudio demostró que *L. plantarum* A7 y *L. rhamnosus* GG mostraron un efecto citotóxico en células CACO-2 de un 60% y un 80% de viabilidad celular

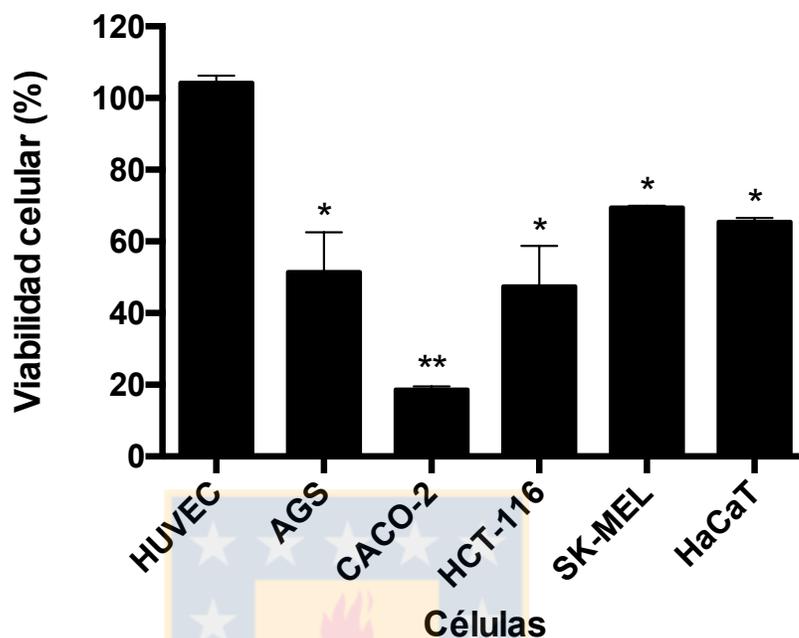
respectivamente, después de 48 horas de exposición. Efecto similar en células HT-29 (Sadeghi-Aliabadi, 2014). En otro estudio, se demostró que *L. rhamnosus* GG en concentración de  $10^8$  UFC/mL, también presentó un efecto citotóxico a las 48 horas de exposición sobre células CACO-2 reduciendo la viabilidad a un 60%, efecto que no fue observado en células HT-29 al mismo tiempo de exposición (Orlando, 2016). Finalmente, se ha reportado que una formulación de mezcla de probióticos (VSL#3), mostró un efecto citotóxico en células CACO-2 a las 48 horas de exposición de un 20% (Cinque, 2016).

En otras células de carcinoma de colon también se ha observado efecto citotóxico de probióticos. En células HT-29 se demostró que cepas de *L. delbreucki*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* y *L. brevis* mostraron un efecto citotóxico luego de 16 horas de exposición a las células HT-29 (Bibalan, 2017). En células HGC-27, se observó efecto citotóxico durante 24 y 48 horas da concentraciones de  $10^8$  UFC/mL de *L. rhamnosus* LGG y a *L. paracasei* IMPC2.1. Sugiriendo a *L. paracasei* IMPC2.1 como un probiótico para la prevención del cáncer (Orlando, 2012). Se ha sugerido que con un 20% de inhibición de la proliferación celular en células HT-29, puede ser reportado como un efecto antiproliferativo significativo (Grimoud, 2010).

Los resultados obtenidos en este estudio, muestran que *L. fermentum* UCO\_979C no tiene efecto sobre la viabilidad celular en células HUVEC, las cuales son cultivo primario que provienen de cordón umbilical humano, por lo

tanto, no vienen de un nicho tumoral. En cambio, en líneas celulares tumorales se observa en general una disminución de la viabilidad celular al ser expuestas a *L. fermentum* UCO\_979C, mismo efecto en las células tumorales SK-MEL y HaCaT, las cuales no son gastrointestinales.

Para analizar el efecto de *L. fermentum* UCO\_979C, se comparó el efecto sobre muerte celular en células HUVEC, AGS, CACO-2, SK-HCT-116, SK-MEL y HaCaT, expuestas a una concentración de 2 McFarland durante 48 horas. Los resultados mostraron que en células HUVEC expuestas a *L. fermentum* UCO\_979C, no hubo muerte celular a las 48 horas de cocultivo. En el caso de las células AGS, se observó un porcentaje de muerte celular de un 49%. Para células CACO-2, el porcentaje de muerte celular fue de un 81%. En células HCT-116 se observó un porcentaje de muerte celular de un 53%. Para células SK-MEL, el porcentaje de muerte celular fue de un 31%. Finalmente, en células HaCaT, se observó un porcentaje de muerte celular de un 35%. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas (Figura 4-1).



**Figura 10-1. Viabilidad celular de distintas células expuestas a *L. fermentum* UCO\_979C.** Células HUVEC, AGS, CACO-2, HCT-116, SK-MEL y HaCaT fueron estimuladas 48 horas con 2 MF de *L. fermentum* UCO\_979C. Las barras de error indican la desviación estándar. Realizado por triplicado. (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ . Fuente: Elaboración propia.

Al comparar los efectos en las distintas células analizadas, se observa que *L. fermentum* UCO\_979C exhibe un efecto citotóxico selectivamente en células tumorales, con pérdida de viabilidad en líneas celulares cancerígenas que corresponden al tracto gastrointestinal (AGS, CACO-2 y HCT-116) y en otras líneas celulares tumorales (SK-MEL y HaCaT). Esto indica que las células tumorales del tracto gastrointestinal son más sensibles al efecto citotóxico de *L.*

*fermentum* UCO\_979C, lo cual podría atribuirse a que *L. fermentum* UCO\_979C fue aislado desde estómago, donde su interacción era predominantemente con las células epiteliales gastrointestinales.

En la búsqueda de productos secretados con potencial citotóxico sobre células tumorales, se ha reportado que metabolitos secretados por *L. lactis* subespecie *lactis* 44 (40 µg/mL), luego de 48 horas de estímulo, presentaron efecto citotóxico en células AGS y en otras células tumorales HT-29, MCF7 y HeLa (Haghshenas, 2014). En células HT-29 se ha reportado que extractos intracelulares de *L. casei* 01 tuvieron un efecto citotóxico, demostrado por una viabilidad de un 89% en células HT-29 (Liu, 2011). Se ha demostrado que sobrenadantes de cultivo libre de bacterias (60 µg/mL) de cepas *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* y *L. plantarum* tuvieron efectos citotóxicos evidenciado por una reducción de la viabilidad promedio de un 60% en células CACO-2 y HT-29 luego de 48 de exposición (Faghfoori, 2017). Finalmente, fracciones citoplasmáticas de *L. rhamnosus* GG obtenidas mediante sonicación, mostraron tener un efecto citotóxico con una reducción de la viabilidad de un 60% en células de cáncer gástrico (HGC-27) administrado a una concentración de 1:1 v/v correspondiente a una concentración bacteriana de  $10^8$  U.F.C/mL (Russo, 2007).

Al exponer células AGS con el lisado de *L. fermentum* UCO\_979C, también se observaron efectos citotóxicos a las 24, 48 y 72 horas de cultivo. El lisado contenía todos los componentes solubles intracelulares bacterianos.

El isoelectroenfoque en medio líquido (OFF GEL), permite separar proteínas mediante su punto isoeléctrico, obteniendo fracciones de las proteínas a analizar ya sea para la caracterización proteica o para evaluar el efecto de fracciones proteicas (Moreda-Piñeiro, 2014). Para el presente trabajo, se realizó un análisis proteómico utilizando equipo *Agilent 3100 Fractionator OFFGEL*, el cual se ha utilizado para analizar proteínas bacterianas permitiendo obtener 24 fracciones en un rango de pH 3 a 10 (Hörth, 2006).

Se realizó una electroforesis en dos dimensiones a partir del isoelectroenfoque del lisado obtenido de *L. fermentum* UCO\_979C. La electroforesis del lisado total permitió observar aproximadamente 38 bandas, que van desde 175 a 7 kDa, las bandas de mayor concentración se localizan entre 80 y 30 kDa. Respecto a las fracciones analizadas, se observó un aumento cualitativo en la intensidad de tinción, la cual da cuenta de una mayor abundancia proteica, desde la fracción 4 a la 7 (pH 4 - 5) relacionado con una abundancia de proteínas, y desde la fracción 22 a la 24 (pH 9,1 - 9,7), se observó una disminución cualitativa en la intensidad de la tinción con nitrato de plata. En general, se logran discriminar proteínas en las fracciones, sin

embargo, se observan bandas compartidas en las fracciones, de aproximadamente, sobre 30 kDa.

Respecto a bandas de alto peso molecular, se ha descrito que en general, las proteínas de 42 a 114 kDa de *Lactobacillus*, están relacionadas con la adhesión, y se ha demostrado en la adherencia de *L. rhamnosus* PEN en células HT-29 (Polak-Berecka, 2014). Esto permitiría sugerir que el efecto citotóxico podría estar relacionado con proteínas de adhesión de bacterias a células humanas.

Se ha reportado que sobrenadantes de cultivo de 12 cepas de *Lactobacillus* sp. mostraron selectivamente efectos citotóxicos sobre células líneas celulares de cáncer, que potencialmente podrían ser el efecto de aminas biógenas (Shokryazdan, 2017). También se ha demostrado que fracciones solubles de peptidoglicán (800 µg/mL) obtenidos de *L. casei* ATCC 25180 a través de cromatografía de exclusión, mostraron distintos efectos citotóxicos en células de linfoma murino (YAC-1) y eritroleucemia humana (K562) relacionados con inhibición de la enzima hexoquinasa (Fichera, 2016). En otro estudio, se determinó el efecto de fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión de productos secretados por cepas de *L. casei* y *L. paracasei* sobre una línea celular de leucemia humana (K562). Los resultados mostraron que el lisado total tuvo un efecto citotóxico de un 80% a las 72 horas de exposición, sin embargo, hubo fracciones que contenían proteínas de alto peso

molecular que alcanzaron un efecto citotóxico de hasta un 90% en concentraciones de 1000  $\mu\text{g/mL}$  a las 72 horas de exposición, evidenciándose distintos efectos citotóxicos de fracciones (Nozari, 2016).

Al evaluar el efecto de las fracciones obtenidas mediante isoelectroenfoque líquido en la citotoxicidad de células de adenocarcinoma gástrico AGS durante 48 de exposición, se observó que el lisado sin fraccionar produce un efecto citotóxico con una viabilidad celular de aproximadamente 49%, sin embargo, el efecto es distinto en las fracciones. El análisis proteómico de cada fracción indicó que en las tres primeras fracciones el efecto citotóxico se pierde y es menor que el lisado sin fraccionar, pero, que desde la fracción 4 a la 6 se observa disminución de la viabilidad, siendo incluso mayor que el lisado sin fraccionar, estas bandas muestran mayor abundancia en el gel de proteínas evidenciado por una mayor tinción. Desde la fracción 7 a la 11 se observó que el efecto sobre la viabilidad es cercano al lisado sin fraccionar. Las fracciones 13 a la 16 muestran la misma tendencia que las fracciones 4 a la 6, sin embargo, la intensidad de la tinción es menor a las fracciones anteriores. Las fracciones 16, 17 y 24 muestran un efecto similar al lisado sin fraccionar. Además, se destaca que desde la fracción 19 a la 23, se observó una disminución de la viabilidad celular. Por lo tanto, las fracciones 4 a 6, 13 a 16, y 19 a 23, mostraron un efecto citotóxico mayor que el propio lisado sin fraccionar.

En el ensayo, se observó que 21 fracciones con punto isoeléctrico mayor a pH 3,84, mostraron efectos citotóxicos distintos sobre células AGS, sin embargo, hubo fracciones que presentaron un efecto citotóxico mayor. Por lo tanto, existen grupos de proteínas que al separarlas tienen un mejor efecto. El efecto citotóxico no está relacionado con la abundancia proteicas, si bien, hubo fracciones que se relacionaron (4-6), no hubo esta misma relación en las fracciones mayores. Por lo tanto, existe un grupo de proteínas podrían presentar el efecto citotóxico entre las fracciones, sin embargo, es posible analizar que existen proteínas que podrían estar siendo enmascaradas por otras, ya que, al separarlas, se observó que algunas fracciones tuvieron un efecto mayor en la citotoxicidad en células AGS.

Respecto al efecto de *L. fermentum* UCO\_979C en la liberación de citoquinas (IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-6), solo fue posible detectar Interleucina 6 en sobrenadantes de cultivo en células HUVEC. La IL-6 es una citoquina que típicamente se conoce por su efecto inflamatorio, sin embargo, se han descrito mecanismos que la hacen una citoquina bifuncional con acciones que pueden ser proinflamatorias o antiinflamatorias (Garbuzova-Davis, 2018). Existe evidencia que IL-6 es producida por células HUVEC y puede afectar su proliferación con capacidad de generar una respuesta inflamatoria que ayuda a movilizar proteínas plasmáticas de fase aguda y reclutar células del sistema inmune (May, 1989). En otro estudio, se observó que células HUVEC expuestas

a Ciclosporina A, disminuyó la proliferación celular relacionado con un aumento en la secreción y expresión de IL-6, existiendo una secreción basal de IL-6 (Storogenko, 1997). Finalmente, se ha demostrado que *S. aureus* y proteínas de unión a fibronectina (adhesinas) generan producción y liberación de IL-6 (Söderquist, 2006).

En el caso de células AGS, hubo toxicidad celular sin un aumento de IL-6, por lo tanto, esta interleucina no estaría relacionada con la citotoxicidad mediada por *L. fermentum* UCO\_979C. En células HUVEC, no se observó toxicidad celular, pero si un aumento en la secreción de IL-6 solo a las 72 horas de exposición a *L. fermentum* UCO\_979C. Por lo tanto, el aumento en la secreción de IL-6 en células HUVEC, solo da cuenta de células endoteliales activadas al estar expuestas a una bacteria.

Finalmente, se observa que *L. fermentum* UCO\_979C, es capaz de ejercer citotoxicidad en células tumorales, con mayor efecto en aquellas que corresponden al tracto gastrointestinal humano (AGS, CACO-2, HCT-116). El efecto citotóxico no se observa en células normales (HUVEC), pero si un aumento en la liberación de IL-6, que solo se relaciona con activación endotelial.

## 5. CONCLUSIÓN

La cepa probiótica de *L. fermentum* UCO\_979C presenta actividad citotóxica con mayor sensibilidad en líneas celulares cancerígenas que corresponden al tracto gastrointestinal, y también, selectivamente en otras líneas celulares tumorales. También, existen productos intracelulares de *L. fermentum* UCO\_979C con potencial citotóxico en células de cáncer gástrico. Finalmente, IL-6 no estaría relacionada con la citotoxicidad en células AGS, y en células HUVEC se relacionaría con activación inflamatoria endotelial.

Como proyección, es necesario investigar los mecanismos involucrados en la toxicidad celular por *L. fermentum* UCO\_979C que podrían inhibir la proliferación. Además, identificar que molécula o grupo de moléculas podrían estar generando el efecto citotóxico en el lisado.

La cepa probiótica *L. fermentum* UCO\_979C y su lisado, podría utilizarse para futuros ensayos relacionados con el cáncer, tanto *in vitro*, como en modelos *in vivo*, con el fin de estudiar sus potenciales efectos quimiopreventivos y/o terapéuticos.

## 6. GLOSARIO

- TNF: Factor de Necrosis Tumoral.
- INF- $\gamma$ : Interferón gama.
- IgA: Inmunoglobulina A.
- MMP: Metaloproteinasa de la matriz.
- Bax: *bcl-2-like protein 4*.
- Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*.
- CXCR4: *C-X-C chemokine receptor type 4*.
- NF- $\kappa$ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa.
- MALT: Tejido Linfoide Asociado a Mucosa.
- SFB: Suero fetal de bovino.
- PBS: Buffer fosfato salino.
- BSA: Albúmina de suero bovino.
- U.F.C: Unidades formadoras de colonias.
- IL-6: Interleuquina 6.
- IL-10: Interleuquina 10.
- IPG: Gradiente de pH inmovilizado.
- MF: McFarland.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Abedin-Do, A., Taherian-Esfahani, Z., Ghafouri-Fard, S., Ghafouri-Fard, S., & Motevaseli, E. (2015). Immunomodulatory effects of *Lactobacillus* strains: emphasis on their effects on cancer cells. *Immunotherapy*, 7(12), 1307-1329.

Alarcón, P., González, M., & Castro, É. (2016). Rol de la microbiota gastrointestinal en la regulación de la respuesta inmune. *Revista médica de Chile*, 144(7), 910-916.

Aragon, F., Carino, S., Perdigon, G., & de LeBlanc, A. D. M. (2015). Inhibition of growth and metastasis of breast cancer in mice by milk fermented with *Lactobacillus casei* CRL 431. *Journal of Immunotherapy*, 38(5), 185-196.

Ayyash, M., Al-Dhaheri, A. S., Al Mahadin, S., Kizhakkayil, J., & Abushelaibi, A. (2018). In vitro investigation of anticancer, antihypertensive, antidiabetic, and antioxidant activities of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Journal of dairy science*, 101(2), 900-911.

Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C., & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an

environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), 15718-15723.

Bazuro, G. E., Torino, F., Gasparini, G., & Capurso, L. (2008). Chemoprevention in gastrointestinal adenocarcinoma: for few but not for all?. *Minerva gastroenterologica e dietologica*, 54(4), 429-444.

Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 11, 127-152.

Bibalan, M. H., Eshaghi, M., Rohani, M., Esghaei, M., Darban-Sarokhalil, D., Pourshafie, M. R., & Talebi, M. (2017). Isolates of *Lactobacillus plantarum* and *L. reuteri* display greater antiproliferative and antipathogenic activity than other *Lactobacillus* isolates. *Journal of medical microbiology*, 66(10), 1416-1420.

Borchers, A. T., Selmi, C., Meyers, F. J., Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (2009). Probiotics and immunity. *Journal of gastroenterology*, 44(1), 26-46.

Brenner, H., Rothenbacher, D., & Arndt, V. (2009). Epidemiology of stomach cancer. In *Cancer Epidemiology* (pp. 467-477). Humana Press.

Bron, P. A., Van Baarlen, P., & Kleerebezem, M. (2012). Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 66.

Bui, V. T., Tseng, H. C., Kozłowska, A., Maung, P. O., Kaur, K., Topchyan, P., & Jewett, A. (2015). Augmented IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  induced by probiotic bacteria in NK cells mediate differentiation of stem-like tumors leading to inhibition of tumor growth and reduction in inflammatory cytokine release; regulation by IL-10. *Frontiers in immunology*, 6, 576.

Cinque, B., La Torre, C., Lombardi, F., Palumbo, P., Van der Rest, M., & Cifone, M. G. (2016). Production conditions affect the in vitro anti-tumoral effects of a high concentration multi-strain probiotic preparation. *PloS one*, 11(9), e0163216.

Cirpus, I. E., Geerts, W., Hermans, J. H., den Camp, H. J. O., Strous, M., Kuenen, J. G., & Jetten, M. S. (2006). Challenging protein purification from anammox bacteria. *International journal of biological macromolecules*, 39(1-3), 88-94.

de LeBlanc, A. D. M., & Perdigón, G. (2010). The application of probiotic fermented milks in cancer and intestinal inflammation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), 421-428.

Escamilla, J., Lane, M. A., & Maitin, V. (2010). Probiotic Lactobacilli Decrease Invasion of Metastatic Human Colon Cancer Cells In Vitro. *The FASEB Journal*, 24(1 Supplement), 928-21.

Escamilla, J., Lane, M. A., & Maitin, V. (2012). Cell-free supernatants from probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease colon cancer cell invasion in vitro. *Nutrition and cancer*, 64(6), 871-878.

Faghfoori, Z., Gargari, B. P., Saber, A., Seyyedi, M., Fazelian, S., & Khosroushahi, A. Y. (2017). Prophylactic effects of secretion metabolites of dairy lactobacilli through downregulation of ErbB-2 and ErbB-3 genes on colon cancer cells. *European Journal of Cancer Prevention*.

Fichera, G. A., Fichera, M., & Milone, G. (2016). Antitumoural activity of a cytotoxic peptide of *Lactobacillus casei* peptidoglycan and its interaction with mitochondrial-bound hexokinase. *Anti-cancer drugs*, 27(7), 609.

Foligne, B., Zoumpopoulou, G., Dewulf, J., Younes, A. B., Chareyre, F., Sirard, J. C., Pot, B., & Grangette, C. (2007). A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PloS one*, 2(3), e313.

Garbuzova-Davis, S., Ehrhart, J., Sanberg, P. R., & Borlongan, C. V. (2018). Potential Role of Humoral IL-6 Cytokine in Mediating Pro-Inflammatory Endothelial Cell Response in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 423.

García, A., Navarro, K., Sanhueza, E., Pineda, S., Pastene, E., Quezada, M., Henríquez, K., Karlyshev, A., Villena, J., & González, C. (2017). Characterization

of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-*Helicobacter pylori* activity. *Electronic Journal of Biotechnology*, 25, 75-83.

Grimoud, J., Durand, H., De Souza, S., Monsan, P., Ouarné, F., Theodorou, V., & Roques, C. (2010). In vitro screening of probiotics and synbiotics according to anti-inflammatory and anti-proliferative effects. *International journal of food microbiology*, 144(1), 42-50.

Gueimonde, M., Margolles, A., Clara, G., & Salminen, S. (2007). Competitive exclusion of enteropathogens from human intestinal mucus by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile—A preliminary study. *International journal of food microbiology*, 113(2), 228-232.

Gupta, V., & Garg, R. (2009). Probiotics. *Indian journal of medical microbiology*, 27(3), 202.

Haghshenas, B., Abdullah, N., Nami, Y., Radiah, D., Rosli, R., & Khosroushahi, A. Y. (2014). Different effects of two newly-isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 44Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. *Anaerobe*, 30, 51-59.

Harmsen, H. J., Wildeboer-Veloo, A. C., Raangs, G. C., Wagendorp, A. A., Klijn, N., Bindels, J. G., & Welling, G. W. (2000). Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular

identification and detection methods. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 30(1), 61-67.

Hernández, D. L. R., Cabeza, E. J. G., & Castañeda, N. S. (2018). La microbiota intestinal en el desarrollo del sistema inmune del recién nacido. *Revista Cubana de Pediatría*, 86(4), 502-513.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., & Sanders, M.E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506.

Hörth, P., Miller, C. A., Preckel, T., & Wenz, C. (2006). Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis. *Molecular & cellular proteomics*, 5(10), 1968-1974.

Ingrassia, I., Leplingard, A., & Darfeuille-Michaud, A. (2005). Lactobacillus casei DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive Escherichia coli isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. *Applied and environmental microbiology*, 71(6), 2880-2887.

Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., & Minick, C. R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of clinical investigation*, 52(11), 2745-2756.

Kabamba, E. T., Tuan, V. P., & Yamaoka, Y. (2018). Genetic populations and virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Infection, Genetics and Evolution*.

Keepers, Y. P., Pizao, P. E., Peters, G. J., van Ark-Otte, J., Winograd, B., & Pinedo, H. M. (1991). Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 27(7), 897-900.

Keith, B., & Simon, M. C. (2007). Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*, 129(3), 465-472.

Khoury, N., El-Hayek, S., Tarras, O., El-Sabban, M., El-Sibai, M., & Rizk, S. (2014). Kefir exhibits anti-proliferative and pro-apoptotic effects on colon adenocarcinoma cells with no significant effects on cell migration and invasion. *International journal of oncology*, 45(5), 2117-2127.

Lepage, C., Hamza, S., & Faivre, J. (2010). Epidemiology and screening of colon cancer. *La Revue du praticien*, 60(8), 1062-1067.

Linsalata, M., Russo, F., Berloco, P., Valentini, AM., Caruso ML., De Simone, C., Barone, M., Polimeno L., & Di Leo A. (2005). Effects of probiotic bacteria (VSL# 3) on the polyamine biosynthesis and cell proliferation of normal colonic mucosa of rats. *in vivo*, 19(6), 989-995.

Liu, C. T., Chu, F. J., Chou, C. C., & Yu, R. C. (2011). Antiproliferative and anticytotoxic effects of cell fractions and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 721(2), 157-162.

Márquez, F. 2011. Caracterización de la tolerancia a pH ácido, tolerancia a la bilis, susceptibilidad a antibióticos y de la colonización en gerbos de Mongolia de las cepas de *Lactobacillus* gástricas 25A y 979C. Tesis de Magíster en Ciencias, mención Microbiología, Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana.

Martin, T. A., & Jiang, W. G. (2009). Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(4), 872-891.

Martin, T. A., Ye, L., Sanders, A. J., Lane, J., & Jiang, W. G. (2013). Cancer invasion and metastasis: molecular and cellular perspective.

May, L. T., Torcia, G., Cozzolino, F., Ray, A., Tatter, S. B., Santhanam, U., Sehgal, P., & Stern, D. (1989). Interleukin-6 gene expression in human endothelial cells: RNA start sites, multiple IL-6 proteins and inhibition of proliferation. *Biochemical and biophysical research communications*, 159(3), 991-998.

Michail, S., & Abernathy, F. (2002). *Lactobacillus plantarum* reduces the in vitro secretory response of intestinal epithelial cells to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 35(3), 350-355.

Mizock, B. A. (2015). Probiotics. *Disease-a-Month*, 61(7), 259-290.

Moreda-Piñeiro, A., García-Otero, N., & Bermejo-Barrera, P. (2014). A review on preparative and semi-preparative offgel electrophoresis for multidimensional protein/peptide assessment. *Analytica chimica acta*, 836, 1-17.

Nami, Y., Abdullah, N., Haghshenas, B., Radiah, D., Rosli, R., & Khosroushahi, A. Y. (2014). Assessment of probiotic potential and anticancer activity of newly isolated vaginal bacterium *Lactobacillus plantarum* 5BL. *Microbiology and immunology*, 58(9), 492-502.

Nouri, Z., Karami, F., Neyazi, N., Modarressi, M. H., Karimi, R., Khorramizadeh, M. R., Taheri, B., & Motevaseli, E. (2016). Dual anti-metastatic and anti-

proliferative activity assessment of two probiotics on HeLa and HT-29 cell lines. *Cell Journal (Yakhteh)*, 18(2), 127.

Nozari, S., Mohammadzadeh, M., Faridvand, Y., Tockmechi, A., Movassaghpour, A., & Abdolalizadeh, J. (2016). The Study of Extracellular Protein Fractions of Probiotic Candidate Bacteria on Cancerous Cell Line. *Archives of Iranian Medicine (AIM)*, 19(11).

Oh, S., Kim, S. H., & Worobo, R. W. (2000). Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *Journal of Dairy Science*, 83(12), 2747-2752.

Orlando, A., Linsalata, M., & Russo, F. (2016). Antiproliferative effects on colon adenocarcinoma cells induced by co-administration of vitamin K1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International journal of oncology*, 48(6), 2629-2638.

Orlando, A., Refolo, M. G., Messa, C., Amati, L., Lavermicocca, P., Guerra, V., & Russo, F. (2012). Antiproliferative and proapoptotic effects of viable or heat-killed *Lactobacillus paracasei* IMPC2. 1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in HGC-27 gastric and DLD-1 colon cell lines. *Nutrition and cancer*, 64(7), 1103-1111.

Parai, D., Banerjee, M., Dey, P., Chakraborty, A., Islam, E., & Mukherjee, SK. (2018). Effect of reserpine on *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing mediated virulence factors and biofilm formation, *Biofouling*.

Park, J. H., Um, J. I., Lee, B. J., Goh, J. S., Park, S. Y., Kim, W. S., & Kim, P. H. (2002). Encapsulated *Bifidobacterium bifidum* potentiates intestinal IgA production. *Cellular immunology*, 219(1), 22-27.

Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of applied microbiology*, 100(6), 1171-1185.

Petrof, E. O., Claud, E. C., Sun, J., Abramova, T., Guo, Y., Waypa, T. S., He, S., Nakagawa, & Y., Chang, E. B. (2009). Bacteria-free solution derived from *Lactobacillus plantarum* inhibits multiple NF-kappaB pathways and inhibits proteasome function. *Inflammatory bowel diseases*, 15(10), 1537-1547.

Polak-Berecka, M., Waśko, A., Paduch, R., Skrzypek, T., & Sroka-Bartnicka, A. (2014). The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(4), 751-762.

Rafter, J. (2003). Probiotics and colon cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 849-859.

Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F., & Jespersen, L. (2013). Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food microbiology*, 36(1), 22-29.

Resta-Lenert, S., & Barrett, K. E. (2003). Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*, 52(7), 988-997.

Resta-Lenert, S., & Barrett, K. E. (2006). Probiotics and commensals reverse TNF- $\alpha$ -and IFN- $\gamma$ -induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 130(3), 731-746.

Ruemmele, F. M., Bier, D., Marteau, P., Rechkemmer, G., Bourdet-Sicard, R., Walker, W. A., & Goulet, O. (2009). Clinical evidence for immunomodulatory effects of probiotic bacteria. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 48(2), 126-141.

Russo, F., Orlando, A., Linsalata, M., Cavallini, A., & Messa, C. (2007). Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on the cell growth and polyamine metabolism in HGC-27 human gastric cancer cells. *Nutrition and cancer*, 59(1), 106-114.

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 84(3), 197-215.

Sachs, G., & Scott, D. R. (2012). *Helicobacter pylori*: Eradication or Preservation. *F1000 Med Rep*, 4, 7. doi: 10.3410/M4-7.

Sadeghi-Aliabadi, H., Mohammadi, F., Fazeli, H., & Mirlohi, M. (2014). Effects of *Lactobacillus plantarum* A7 with probiotic potential on colon cancer and normal cells proliferation in comparison with a commercial strain. *Iranian journal of basic medical sciences*, 17(10), 815.

Saikali, J., Picard, C., Freitas, M., & Holt, P. (2004). Fermented milks, probiotic cultures, and colon cancer. *Nutrition and cancer*, 49(1), 14-24.

Salas-Jara, M. J., Sanhueza, E. A., Retamal-Díaz, A., González, C., Urrutia, H., & García, A. (2016). Probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C biofilm formation on AGS and Caco-2 cells and *Helicobacter pylori* inhibition. *Biofouling*, 32(10), 1245-1257.

Salzillo, M., Vastano, V., Capri, U., Muscariello, L., Sacco, M., & Marasco, R. (2015). Identification and characterization of enolase as a collagen-binding protein in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of basic microbiology*, 55(7), 890-897.

Satish Kumar, R., Kanmani, P., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., & Arul, V. (2011). *Lactobacillus plantarum* AS1 binds to cultured human intestinal cell line HT-29 and inhibits cell attachment by enterovirulent bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. *Letters in applied microbiology*, 53(4), 481-487.

Sawa, N., Koga, S., Okamura, K., Ishibashi, N., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2013). Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* D98. *Journal of applied microbiology*, 115(1), 61-69.

Shanahan, F. (2013). The colonic microbiota in health and disease. *Current opinion in gastroenterology*, 29(1), 49-54.

Shokryazdan, P., Jahromi, M. F., Liang, J. B., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Idrus, Z., & Ho, Y. W. (2017). In Vitro Assessment of Bioactivities of *Lactobacillus* Strains as Potential Probiotics for Humans and Chickens. *Journal of food science*, 82(11), 2734-2745.

Shokryazdan, P., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Liang, J. B., Alitheen, N. B., Faseleh Jahromi, M., & Ho, Y. W. (2014). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed research international*, 2014.

Singh, P. K., Chibh, S., Dube, T., Chauhan, V. S., & Panda, J. J. (2018). Arginine- $\alpha$ ,  $\beta$ -dehydrophenylalanine Dipeptide Nanoparticles for pH-Responsive Drug Delivery. *Pharmaceutical research*, 35(2), 35.

Söderquist, B., Alriksson, I., Källman, J., & Kihlström, E. (2006). The influence of adhesive and invasive properties of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins on secretion of interleukin-6 by human endothelial cells. *Apmis*, 114(2), 112-116.

Storogenko, M., Pech-Amsellem, M. A., Kerdine, S., Rousselet, F., & Pallardy, M. (1997). Cyclosporin-A inhibits human endothelial cells proliferation through interleukin-6-dependent mechanisms. *Life sciences*, 60(17), 1487-1496.

Takagi, A., Matsuzaki, T., Sato, M., Nomoto, K., Morotomi, M., & Yokokura, T. (2001). Enhancement of natural killer cytotoxicity delayed murine carcinogenesis by a probiotic microorganism. *Carcinogenesis*, 22(4), 599-605.

Tegtmeyer, N., Neddermann, M., Asche, C. I., & Backert, S. (2017). Subversion of host kinases: a key network in cellular signaling hijacked by *Helicobacter pylori* CagA. *Molecular microbiology*.

Tien, M. T., Girardin, S. E., Regnault, B., Le Bourhis, L., Dillies, M. A., Coppée, J. Y., Bourdet-Sicard, R., Sansonetii P.J., & Pédrón, T. (2006). Anti-

inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *The Journal of Immunology*, 176(2), 1228-1237.

Tiptiri-Kourpeti, A., Spyridopoulou, K., Santarmaki, V., Aindelis, G., Tompoulidou, E., Lamprianidou, E., Saxami, G, Ypsilantis, P., Lampri, E.S., Simopoulus, C., Kotsianidis, I., Glanis, A., Kourkoutas, Y., Dimitrellou, D., & Chlichlia, K. (2016). *Lactobacillus casei* exerts anti-proliferative effects accompanied by apoptotic cell death and up-regulation of TRAIL in colon carcinoma cells. *PloS one*, 11(2), e0147960.

Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*, 1(3), 1112.

Vong, L., Lorentz, R. J., Assa, A., Glogauer, M., & Sherman, P. M. (2014). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of Immunology*, 192(4), 1870-1877.

Wannun, P., Piwat, S., & Teanpaisan, R. (2014). Purification and characterization of bacteriocin produced by oral *Lactobacillus paracasei* SD1. *Anaerobe*, 27, 17-21.

Wijesundara, N. M., & Rupasinghe, H. V. (2018). Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*. *Microbial pathogenesis*.

Zamberi, N. R., Abu, N., Mohamed, N. E., Nordin, N., Keong, Y. S., Beh, B. K., Zakaria, Z., Rahman, N., & Alitheen, N. B. (2016). The antimetastatic and antiangiogenesis effects of kefir water on murine breast cancer cells. *Integrative cancer therapies*, 15(4), NP53-NP66.

Zareian, B., Ghadbeighi, S., Amirhamzeh, A., Ostad, S. N., Shafiee, A., & Amini, M. (2016). Synthesis, Molecular Docking Study, and Cytotoxic Activity of 3, 4-diaryl-5-(4-pyridinyl)-1, 2, 4-oxadiazole. *Medicinal Chemistry*, 12(4), 394-401.

Zhao, H., Zhao, C., Dong, Y., Zhang, M., Wang, Y., Li, F., Li, X., McClain, C., Yang, S., & Feng, W. (2015). Inhibition of miR122a by *Lactobacillus rhamnosus* GG culture supernatant increases intestinal occludin expression and protects mice from alcoholic liver disease. *Toxicology letters*, 234(3), 194-200.

Zhu, H., Wang, D., Zhang, L., Xie, X., Wu, Y., Liu, Y., Shao, G., & Su, Z. (2014). Upregulation of autophagy by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  promotes EMT and metastatic ability of CD133+ pancreatic cancer stem-like cells during intermittent hypoxia. *Oncology reports*, 32(3), 935-942.

Zhu, Y., Luo, T. M., Jobin, C., & Young, H. A. (2011). Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer letters*, 309(2), 119-127.

Živković, M., Miljković, M. S., Ruas-Madiedo, P., Markelić, M. B., Veljović, K., Tolinački, M., Soković, S., Korać, A., & Golić, N. (2016). EPS-SJ

exopolisaccharide produced by the strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 is involved in adhesion to epithelial intestinal cells and decrease on *E. coli* association to Caco-2 cells. *Frontiers in microbiology*, 7, 286.

Zou, Y., & Chang, S. K. (2011). Effect of black soybean extract on the suppression of the proliferation of human AGS gastric cancer cells via the induction of apoptosis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(9), 4597-4605.

