



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE *Lactobacillus casei*, *L. helveticus* y *L. rhamnosus* SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON Y PRÓSTATA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
QFB. Elena Sierra Prieto

TUTORA PRINCIPAL
Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González Sarabia
[Facultad de Química, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. María Elena Ibarra Rubio
Facultad de Química, UNAM

Dr. Lorenzo Segovia Forcella
Instituto de Biotecnología, UNAM

Ciudad de México, Mayo, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres, a mis hermanos y a Fernando. Con todo el amor. Gracias por tanto.

SINODALES DESIGNADOS
Presente

Estimado académico:

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 18 de mayo del presente año, conocieron la solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS** del/la estudiante **Sierra Prieto Elena**, con la tesis "**Actividad citotóxica de Lactobacillus casei, L. helveticus y L. rhamnosus sobre líneas celulares de cáncer de colon y próstata**", dirigida por el/la Dr(a). **Farrés González-Sarabia Amelia María de Guadalupe**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

		Acepto	
PRESIDENTE	Pedraza Chaverri José	Si__ No__	_____ fecha firma
VOCAL	Valverde Ramírez Mahara Angélica	Si__ No__	_____ fecha firma
VOCAL	Martha Robles Flores	Si__ No__	_____ fecha firma
VOCAL	Ruiz Azuara Lena	Si__ No__	_____ fecha firma
SECRETARIO	Escalante Lozada José Adelfo	Si__ No__	_____ fecha firma

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 18 de mayo de 2020

Dra. Aana Brígida Clornda Arias Álvarez
Coordinadora

Agradecimientos (El orden de los factores no altera el producto)

- A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme una oportunidad más de pertenecer a ella y seguirme formando profesionalmente en una de las mejores Universidades de México.
- Al CONACYT por el apoyo y la beca 867368 otorgada a lo largo de este proyecto.
- A la Dra. Amelia Farrés, tutora de este proyecto, por abrirme las puertas al laboratorio, por su confianza, apoyo, ayuda, entusiasmo, y paciencia. Por sus conocimientos y experiencias como persona y Académica. Sin ella, este trabajo no hubiera sido posible.
- A todo el equipo de la UNIPREC. A la M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora, por permitirme trabajar en sus instalaciones. A todo el equipo de cultivo celular, Mariano, Ale y Denisse, gran parte de este trabajo fue gracias a ustedes.
- A la M. en C. Cindy Estrada, mano derecha del laboratorio. Por su ayuda, apoyo y sus consejos.
- A mis compañeros del laboratorio, Vianey, Augusto, Luza, Novia y María. Por hacer la vida y el trabajo mucho más divertido y ameno. Por su ayuda, consejos y apoyo, son unos grandes profesionistas.
- A mis amigos de la vida. Jenni, Melina, Steph, Dani, Hachi, Brett, Nibsen, Tuli, Palomo y Natan. Por su incondicional apoyo, por todas las experiencias buenas y malas que hemos pasado, compartir grandes experiencias, por su confianza, fe, motivación e inigualable amistad. Mejores amigos no pude haber encontrado en la vida.
- A mis amigas Gaby, Bri, Mar, Mitzy, Luna, Tamara y Vicky. Por su amistad y apoyo siempre. Por su forma de ver y enfrentarse a la vida, por compartirme parte de ella. Las admiro mucho.
- A Fernando. Por mostrarme que en donde uno menos lo espera puede encontrar lo más bello y valioso de la vida. Por compartir tu vida conmigo, por motivarme, por tu apoyo incondicional, por no dejarme caer, por estar siempre en las buenas y en las malas, por hacerme una mejor persona y hacerme crecer. Por ir caminando y creciendo juntos en esto que llamamos vida y sobre todo por tu invaluable amor.
- A mis padres, Rodolfo y Carolina, por su incondicional apoyo y motivación por tantos años y por todo su amor, una vida no es suficiente para agradecerles todo, gracias por tanto. A mis hermanos, Alex, Randi y Mariana, los mejores confidentes que pude tener en mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Cáncer.....	4
2.1.1 Cáncer de colon.....	5
2.1.2 Cáncer de próstata.....	7
2.2 Líneas celulares.....	8
2.3 Ensayos de citotoxicidad <i>in vitro</i>	9
2.4 Probióticos.....	10
2.4.1 Crecimiento microbiano.....	12
2.4.2 Lactobacilos como probióticos y su uso contra el cáncer.....	14
2.4.2.1 <i>Lactobacillus casei</i>	17
2.4.2.2 <i>Lactobacillus casei</i> en cáncer.....	17
2.4.2.3 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	19
2.4.3.4 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> en cáncer.....	20
2.4.4.5 <i>Lactobacillus helveticus</i>	21
2.4.5.6 <i>Lactobacillus helveticus</i> en cáncer.....	22
3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
3.1 Justificación.....	24
3.2 Hipótesis.....	25
3.3 Objetivo general.....	25
3.3.1 Objetivos particulares.....	25
4. EXPERIMENTAL.....	26
4.1 MATERIAL Y EQUIPO.....	26
4.1.1 CEPAS Y LÍNEAS CELULARES DE ESTUDIO	26
4.2 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	26
4.2.1 Medios.....	26

4.2.2 Reactivación de cepas.....	26
4.2.3 Cinéticas de crecimiento.....	27
4.2.4 Ensayos de citotoxicidad de las muestras de cultivo en MRS en la línea celular de cáncer de colon HCT-15.....	27
4.2.5 Pruebas de actividad citotóxica de las muestras de cultivo en MRS en la línea celular de cáncer de colon Caco-2.....	29
4.2.6 Pruebas de actividad citotóxica de las muestras de cultivo en MRS en la línea celular de cáncer de próstata PC-3.....	29
4.3 Cálculo de efecto citotóxico.....	29
4.4 Análisis estadístico.....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1 Cinéticas de crecimiento.....	30
5.2 Ensayos de citotoxicidad.....	31
5.2.1 Caco-2 es sensible a <i>L. casei</i> y <i>L. rhamnosus</i> a las 48 horas de tratamiento de forma dependiente de la concentración.....	31
5.2.2 La línea celular HCT-15 de cáncer de colon es sensible a las 3 cepas de lactobacilos en ciertas concentraciones a las 24 y 48 horas de tratamiento.....	35
5.2.3 La citotoxicidad observada en la línea celular PC-3 es a tiempos de contacto y concentraciones muy específicas.....	41
6. DISCUSIÓN.....	46
7. RESUMEN DE RESULTADOS.....	57
8. CONCLUSIÓN.....	58
9. PERSPECTIVAS.....	59
10. Referencias.....	60

ÍNDICE FIGURAS, GRÁFICOS Y TABLAS

Gráfica 1 Casos estimados de cáncer.....	5
Tabla 1 Factores asociados al cáncer colorrectal.....	6
Figura 1 Esquema de la próstata y su localización.....	8
Tabla 2 Criterios de definición de los probióticos.....	10
Figura 2 Mecanismos de los probióticos.....	12
Figura 3 Crecimiento bacteriano.....	13
Tabla 3 Ejemplos de <i>L. casei</i> en diferentes tipos de cáncer.....	19
Tabla 4 Ejemplos de <i>L. rhamnosus</i> sobre distintos tipos de cáncer.....	21
Tabla 5 Ejemplos de <i>L. helveticus</i> sobre distintos tipos de cáncer.....	22
Figura 4 Modelo de la placa con las muestras y dosis a estudiar de cada cepa 28	
Figura 5 Cinéticas de crecimiento.....	30
Tabla 6 Concentración bacteriana.....	31
Gráfica 2 Citotoxicidad de <i>L. casei</i> vs. Caco-2 a las 24 horas.....	32
Tabla 7 Porcentajes de citotoxicidad de <i>L. casei</i> vs. Caco-2 a las 48 horas de tratamiento.....	32
Gráfica 3 Citotoxicidad de <i>L. casei</i> vs. Caco-2 a las 48 horas.....	33
Tabla 8 Porcentajes de citotoxicidad de <i>L. rhamnosus</i> vs. Caco-2 a las 48 horas de tratamiento.....	33
Gráfica 4a Citotoxicidad de <i>L. rhamnosus</i> vs. Caco-2 a las 48 horas.....	34
Gráfica 4b Citotoxicidad de <i>L. rhamnosus</i> vs. Caco-2 a las 48 horas.....	34
Tabla 9 Porcentajes de citotoxicidad <i>L. casei</i> vs. HCT-15 a las 24 horas de tratamiento.....	35
Gráfica 5 Citotoxicidad <i>L. casei</i> vs. HCT-15 a las 24 horas.....	36
Tabla 10 Porcentajes de citotoxicidad de <i>L. casei</i> vs. HCT-15 a las 48 horas de tratamiento.....	36
Gráfica 6 Citotoxicidad de <i>L. casei</i> vs. HCT-15 a las 48 horas.....	37

Tabla 11 Porcentajes de citotoxicidad de <i>L. helveticus</i> vs. HCT-15 a las 24 horas de tratamiento.....	37
Gráfica 7a Citotoxicidad de <i>L. helveticus</i> vs. HCT-15 a las 24 horas de tratamiento.....	38
Gráfica 7b Citotoxicidad de <i>L. helveticus</i> vs. HCT-15 a las 24 horas de tratamiento.....	38
Tabla 12 Porcentajes de citotoxicidad de <i>L. helveticus</i> vs. HCT-15 a las 48 horas de tratamiento.....	39
Gráfica 8 Citotoxicidad de <i>L. helveticus</i> vs. HCT-15 a las 48 horas de tratamiento.....	39
Tabla 13 Porcentajes de citotoxicidad de <i>L. rhamnosus</i> vs. HCT-15 a las 24 horas de tratamiento.....	40
Gráfica 9 Citotoxicidad de <i>L. rhamnosus</i> vs. HCT-15 a las 24 horas de tratamiento.....	40
Tabla 14 Porcentajes de citotoxicidad de <i>L. rhamnosus</i> vs. HCT-15 a las 48 horas de tratamiento.....	41
Gráfica 10 Citotoxicidad de <i>L. rhamnosus</i> vs. HCT-15 a las 48 horas de tratamiento.....	41
Tabla 15 Porcentajes de citotoxicidad de <i>L. casei</i> vs. PC-3 a las 24 horas de tratamiento.....	42
Gráfica 11 Citotoxicidad de <i>L. casei</i> vs. PC-3 a las 24 horas de tratamiento...	42
Gráfica 12 Citotoxicidad de <i>L. helveticus</i> vs. PC-3 a las 24 horas de tratamiento	43
Tabla 16 Porcentajes de citotoxicidad obtenidas de <i>L. rhamnosus</i> vs. PC-3 a las 24 horas de tratamiento.....	43
Gráfica 13 Citotoxicidad de <i>L. rhamnosus</i> vs. PC-3 a las 24 horas de tratamiento.....	44
Tabla 17 Porcentajes de citotoxicidad obtenidas de <i>L. rhamnosus</i> vs. PC-3 a las 48 horas de tratamiento.....	44
Gráfica 14 Citotoxicidad de <i>L. rhamnosus</i> vs. PC-3 a las 48 horas de tratamiento.....	45

ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluoracil
ANOVA	Análisis de varianza
BAL	Bacterias ácido lácticas
CC	Cáncer colorrectal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EEM	Error estándar de la media
h	Hora
IARC	Agencia Internacional Para la Investigación del cáncer (del inglés International Agency for Research on Cancer)
IFN- γ	Interferón gama
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
LC	Concentración letal
NF-κB	Factor nuclear kappa B
MRS	De Man Rogosa y Sharpe
NO	Óxido nítrico
PSA	Antígeno prostático específico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TLRs	Receptores tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Se denomina cáncer a un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento descontrolado de células anormales. En mujeres, el cáncer colorrectal ocupa a nivel mundial el segundo lugar en ocurrencia, solo después del cáncer de mama y, en el caso de los hombres, ocupa el tercer lugar tras el cáncer de pulmón y próstata. El cáncer de próstata ocupa el segundo lugar a nivel mundial, solo después del cáncer de pulmón (WHO, 2018).

Por la ocurrencia de efectos secundarios en los tratamientos convencionales, en los últimos años se ha puesto gran interés en el empleo como tratamiento de soporte de diferentes especies de probióticos que parecen tener actividad anticancerígena y citotóxica, además de los diversos beneficios que le confieren al organismo.

En este trabajo se pusieron a prueba 3 cepas de lactobacilos, *Lactobacillus casei* R0215, *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009 y *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150, para determinar si tienen actividad citotóxica en dos líneas celulares de cáncer de colon y en una de cáncer de próstata. Además, determinar la concentración a la que los lactobacilos de estudio presentan actividad citotóxica, determinar la fase de crecimiento del lactobacilo en cuestión en la que se presenta mayor actividad citotóxica y determinar el tiempo de contacto (entre los lactobacilos y la línea celular) requerido para que se presente el efecto citotóxico.

Se reactivaron las tres cepas de lactobacilos y a cada una se le realizó una cinética de crecimiento de 30 horas. Se tomaron las muestras de los tiempos de crecimiento 12, 24 y 30 horas, se liofilizaron y se utilizaron para los ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Estos se hicieron en una placa de 96 pozos, una placa para cada línea celular, en las que se colocaron 20 000 células por pozo, y se probaron 3 concentraciones diferentes (baja, media y alta) de cada lactobacilo en sus 3 tiempos de crecimiento, que se dejaron interactuar 24 y 48 horas. El efecto citotóxico se detectó con el método colorimétrico de sulforrodamina B.

De las líneas celulares de cáncer de colon, Caco-2, es sensible a *L. casei* y *L. rhamnosus* a las 48 horas de tratamiento de forma dependiente de la concentración. La línea celular HCT-15 es sensible a las 3 cepas de lactobacilos en ciertas concentraciones a las 24 y 48 horas de tratamiento. En el caso, de la línea celular de cáncer de próstata, PC-3 es poco sensible a las tres cepas de lactobacilos probadas y también es la línea celular menos sensible de las estudiadas.

En conclusión, las 3 cepas de lactobacilos estudiadas en este trabajo tienen actividad citotóxica para alguna de las tres líneas celulares estudiadas. Las

muestras cosechadas a 30 horas de cultivo fueron, en general, las que presentaron mayor actividad citotóxica contra estas líneas celulares.

1. INTRODUCCIÓN

Se denomina cáncer a un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento descontrolado de células anormales. Entre los múltiples tipos de cáncer que existen, toman relevancia para este trabajo el cáncer de colon y próstata. El cáncer colorrectal en mujeres, ocupa a nivel mundial el segundo lugar con el 9.5%, solo después del cáncer de mama y, en el caso de los hombres, ocupa el tercer lugar con el 10.9%, solo detrás del cáncer de pulmón y próstata. El cáncer de próstata ocupa el segundo lugar a nivel mundial con el 13.5% de los casos, solo después del cáncer de pulmón (WHO, 2018).

Se ha descrito un efecto de algunas especies de bacterias ácido lácticas (BAL) sobre el desarrollo de estas enfermedades. Se denomina probióticos a las bacterias que, suministradas en dosis adecuadas, proveen de un efecto benéfico para el organismo. Entre estas bacterias, entra el género *Lactobacillus*, y sus especies, por mencionar algunos ejemplos, *casei*, *rhamnosus*, *lactis* y *helveticus*, que se ha encontrado tienen un efecto antiproliferativo y/o citotóxico contra células de distintos tipos de cáncer, tanto en estudios *in vivo* como en estudios *in vitro*. Aunque no se tienen identificadas específicamente las moléculas o compuestos responsables de esta actividad, existen informes que señalan péptidos, polisacáridos y ácidos grasos producidos por algunas cepas de *Lactobacillus* como posibles responsables de esta actividad.

Por lo anterior, en este trabajo se pretenden probar en líneas celulares de cáncer de próstata y colon la posible actividad citotóxica de *Lactobacillus helveticus*, *L. rhamnosus* y *L. casei* de las especies ATCC® 15009, R0011 150 y R0215 respectivamente.

Para este proyecto se tienen 3 preguntas principales:

1. ¿*L. helveticus*, *L. rhamnosus* y *L. casei* poseen actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer de colon y próstata?
2. ¿Cuál es la concentración de estos lactobacilos a la que se presenta esta actividad?
3. ¿Cuál es la fase de crecimiento a la que se presenta mayor actividad?

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Cáncer

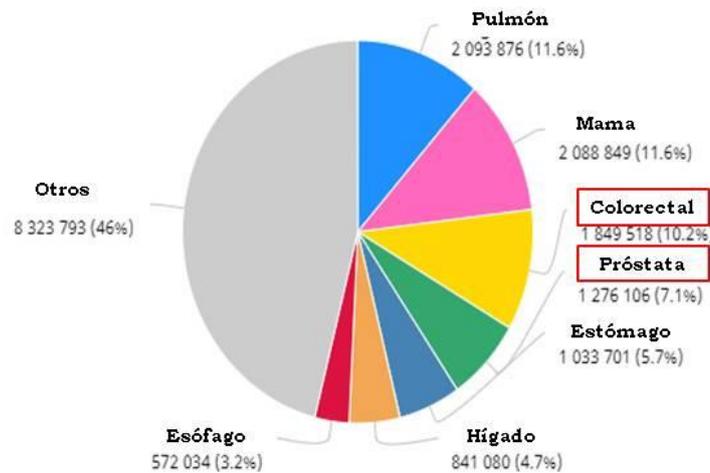
Se denomina cáncer a un amplio grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento descontrolado de células anormales. Algunas de las células del cuerpo sufren mutaciones en los genes de control de división y crecimiento celular (Morris, 2018) empiezan a dividirse sin detenerse y tienen la capacidad de invadir a los tejidos cercanos (American Cancer Society, 2019). Las células viejas o dañadas sobreviven cuando deberían morir, y células nuevas se forman cuando no son necesarias. Estas células adicionales pueden dividirse sin interrupción y pueden formar masas que se llaman tumores.

El cáncer es una enfermedad multifactorial ya que no hay una sola causa del cáncer *per se*, sino que se presenta por la influencia de varios factores como edad, mutaciones, herencia, exposición al alcohol, rayos ultravioleta (UV), productos químicos, infecciones, obesidad y el estilo de vida como la alimentación o el sedentarismo (Cancer Research UK, 2018).

Entre otros factores, la acumulación de múltiples alteraciones en el genoma es responsable de la carcinogénesis. El daño y modificaciones al ácido desoxirribonucleico (DNA) causado por un exceso en las especies reactivas del oxígeno (ROS) y de nitrógeno, conduciendo a las alteraciones del genoma y modificaciones en las diferentes vías de señalización que llevan a la célula a apoptosis. Estos cambios en la información genética son causados por mutaciones o translocaciones cromosomales, llevando a la activación de oncogenes o a la inactivación de genes supresores de tumores (Sugimura, 1992). El estrés oxidante, desbalance entre la formación de radicales libres y los antioxidantes, puede aumentar la incidencia de cáncer, aunque los antioxidantes tienen un papel de prevención y/o tratamiento para ciertos tipos de cáncer, disminuyendo las reacciones que inducen proliferación, no solo *in vitro*, sino también *in vivo* (Kim, *et al.*, 2000, Kozu, *et al.*, 2009).

En el 2018, los tipos de cáncer que se presentaron mayormente en la población mundial en ambos sexos fueron pulmón, mama, colorrectal, próstata y de estómago, como se presenta en la gráfica 1 (GLOBOCAN, 2018). En este trabajo, nos enfocaremos en el cáncer colorrectal (CC) y el de próstata.

Casos estimados de cáncer en 2018, a nivel mundial, ambos sexos, todas las edades



Data source: GLOBOCAN 2018
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>)
© International Agency for Research on Cancer 2019

Total : 18 078 957

International Agency for Research on Cancer
World Health Organization

Gráfica 1. Casos estimados de cáncer en 2018 a nivel mundial, en ambos sexos todas las edades. (GLOBOCAN, 2018).

Existen diversos tratamientos contra el cáncer como la cirugía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y la terapia hormonal. La elección del tratamiento a utilizar depende del tipo de cáncer, así como de la etapa en que éste se encuentre. Se puede utilizar un solo tipo de tratamiento o una combinación de tratamientos. Sin embargo, éstos llevan consigo efectos secundarios como anemia, anorexia, alopecia, delirio, diarrea, dolores, estreñimiento, fatiga, náuseas, vómito, neuropatías, moretones, problemas de concentración y memoria, así como efectos mutagénicos y apoptosis en las células sanas y, por ende, resultan contraproducentes para el paciente, afectando su calidad de vida, además de su alto costo. Se ha demostrado que el uso de probióticos como complemento al tratamiento contra diversos tipos de cáncer ayuda a reducir los efectos secundarios y, en algunos casos, a prevenirlo (National Cancer Institute, 2017).

2.1.1 Cáncer de colon

El CC es uno de los más comunes a nivel mundial, ocupando en mujeres el segundo lugar a nivel mundial con el 9.5%, solo después del cáncer de mama y en el caso de los hombres ocupa el tercer lugar con el 10.9%, solo detrás del cáncer de pulmón y próstata (WHO, 2018). De acuerdo con la International Agency for Research on Cancer (IARC), en 2018, el cáncer de colon ocupa el segundo lugar de causa de muerte en hombres y mujeres en México. El CC es multifactorial y depende de varios factores de riesgo como la herencia, el estilo de vida y la dieta (Kahouli, *et al.*, 2013; Kumar, *et al.*, 2015). Uno de los

mayores factores de riesgo para el desarrollo de CC es la inflamación crónica intestinal, ya que quienes padecen enfermedades inflamatorias del intestino son 6 veces más propensos a padecer CC que aquellos que no (Mattar, *et al.*, 2011). También en los últimos años se ha puesto en materia de estudio la importancia del equilibrio de la microbiota intestinal (Raman, *et al.*, 2013) ya que su alteración, conocida como disbiosis, representa también un factor de riesgo para el CC al afectar diversas funciones intestinales, así como el mantenimiento de la barrera epitelial (Baffoni, *et al.*, 2011; Wieczorska, *et al.*, 2019), los cambios metabólicos y las condiciones fisicoquímicas en el intestino (Molska y Regula, 2019). En la TABLA 1 se enlistan algunos factores asociados al CC.

Tabla 1. Factores asociados a cáncer colorrectal.

Factores asociados a cáncer colorrectal
<p>Desequilibrio en la microbiota intestinal: ↑ <i>Bacteroides</i>, <i>Proteobacterium</i>, <i>Eubacterium</i>, <i>Salmonella</i>, y <i>Fusobacterium</i>.</p>
<p>Condiciones fisicoquímicas del colon alteradas: Alcalosis, fermentación incompleta, absorción de agua en el colon, contenido de agua fecal genotóxica.</p>
<p>Daño en la barrera epitelial: Muerte celular epitelial normal, reordenamiento en las proteínas de unión, translocación de patógenos, ↑ permeabilidad.</p>
<p>Enzimas bacterianas dañinas: Azorreductasa, nitrorreductasa, alcohol deshidrogenasa, β-glucuronidasa producidas por algunas bacterias patógenas de los géneros <i>Bacteroides</i>, <i>Clostridium</i>, <i>Enterococcus</i>, <i>Salmonella</i> y <i>Staphylococcus</i> como por ejemplo</p>
<p>Productos carcinogénicos: Acetaldehído, ureasa, compuestos nitrogenados, aminas aromáticas, benzo(α)pireno, sales biliares secundarias transformadas, sulfuro de hidrógeno.</p>
<p>Daño a DNA</p>
<p>Alteración en el ciclo celular: Crecimiento celular anormal: Displasia y formación tumoral.</p>
<p>Inflamación intestinal</p>

Modificado de Kahouli, 2013.

Aunque existen varios marcadores para el CC, es difícil de detectar, ya que cuando éstos y los síntomas clínicos aparecen y es diagnosticado, normalmente la enfermedad se encuentra ya en etapas avanzadas, donde la esperanza de vida y éxito del tratamiento son bajas. Para este tipo de cáncer existen múltiples tratamientos, sin embargo, en la mayoría de los casos tienen un índice de bajo éxito, bajo índice de supervivencia y un alto índice de recurrencia (Mishra, *et al.*, 2013). La principal elección de tratamiento contra este tipo de cáncer consiste en el 5-Fluoroacil (5-FU) que mezclan con el compuesto citotóxico oxaliplatino (FOLFOX) que se utiliza como quimioterapia estándar para etapas avanzadas y metastáticas de cáncer de colon (Chang, *et al.*, 2018). En este caso, por los diferentes beneficios a la salud que tienen los probióticos, son grandes prospectos para beneficiar al paciente con CC como

suplemento alimenticio profiláctico o como un adyuvante a las terapias convencionales (Kumar, *et al.*, 2015), así como su capacidad de disminuir la mucositis intestinal, uno de los efectos adversos de estos medicamentos (Picó y Mingot, 2019).

Para este trabajo se estudiarán las líneas celulares de cáncer de colon HCT-15 y Caco-2. Ambas líneas son de origen humano, con la diferencia de que HCT-15 corresponde al CC en estadio C de Dukes y las células Caco-2 pertenecen a un adenocarcinoma colorrectal (ATCC, 2018).

2.1.2 Cáncer de próstata

La próstata es un órgano endócrino que se encuentra en la pelvis por debajo de la vejiga delante del recto, rodeando el primer segmento de la uretra y produce un líquido que se convierte en parte del semen. Las células epiteliales de la zona acinar son las encargadas de producir el Antígeno Prostático Específico (PSA) y la fosfatasa ácida prostática (Wang, *et al.*, 1979). Un crecimiento anormal de la próstata lleva consigo un aumento del PSA en sangre, el marcador más importante para la detección del cáncer de próstata.

En la próstata se distinguen 3 zonas: la zona central cruzada por los conductos eyaculadores que supone un 25% de la glándula, la zona transicional, que rodea a la uretra posterior, con un 5% del volumen glandular y la zona periférica, que ocupa un 70% del volumen glandular. Es en esta última zona en la que se desarrollan el 68% de los cánceres, mientras que en la zona Central ocurre un 8% y en la zona Transicional, un 24%. En esta última las células del parénquima pueden sufrir una hiperplasia formando masas nodulares, comprimiendo la uretra y ocasionando los síntomas de la hiperplasia prostática benigna. La zona Periférica es accesible al tacto rectal mientras que los tumores que se desarrollan en las zonas Central y Transicional se valoran mejor con la ecografía.

En la FIGURA 1 se presenta un esquema de la próstata y su localización.

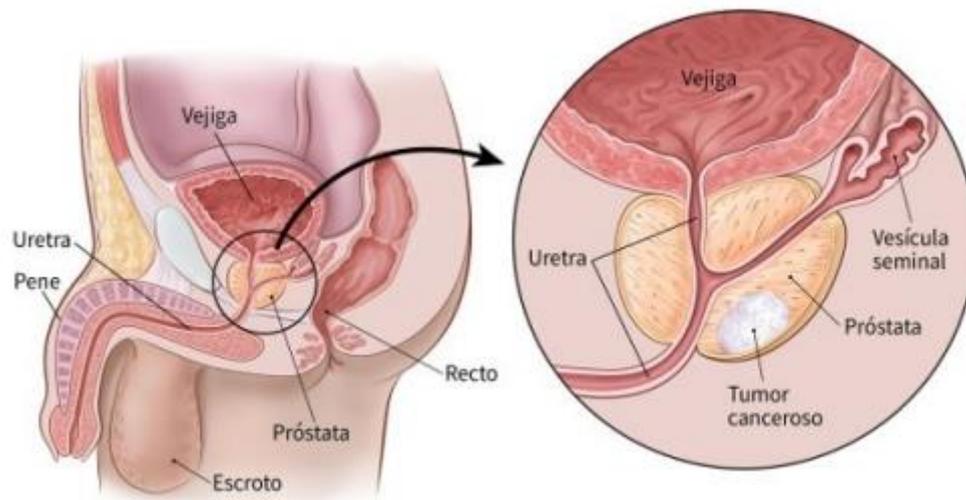


Fig 1. Esquema de la próstata y su localización. (American Cancer Society, 2020).

El cáncer de próstata ocupa el segundo lugar en tipos de cáncer en hombres a nivel mundial con el 13.5% de los casos, solo después del cáncer de pulmón (WHO, 2018). De acuerdo a la IARC, en 2018, el cáncer de próstata ocupó el primer lugar de causa de muerte en hombres en México. En 1999, el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica, junto con la SSA y el INEGI, informaron el 12.45% de las defunciones por cáncer de próstata en varones entre 15-64 años y el 87.5% en varones mayores de 65 años. Señalaron como factores de riesgo, además de la predisposición genética, raza y exposición a hormonas, así como infecciones, inflamación prostática, altos niveles de estrógenos y bajos niveles de andrógenos (De Marzo, *et al.*, 2007; Porter, *et al.*, 2018).

Casi todos los cánceres de próstata son adenocarcinomas, que se desarrollan a partir de las células de la glándula, las que producen el líquido prostático que se agrega al semen. El carcinoma prostático es una enfermedad asociada a la edad: a mayor edad, mayor riesgo de padecer cáncer en alto grado. Clínicamente es raro en menores de 50 años, pero la incidencia aumenta con la edad más rápido que cualquier otro tipo de cáncer.

En este trabajo se estudiará la línea celular de cáncer metastático de próstata PC-3. Es una línea celular proveniente de humano y es de un adenocarcinoma de grado IV (ATCC® CRL1435™).

2.2 Líneas celulares

Las líneas celulares son células de origen animal o humano que se han ido adaptando para poder vivir en cultivo. Es importante conocer las

especificaciones de procedencia de las células como la especie, el sexo, edad, tejido de procedencia, la patología, así como la manipulación previa que se le da a la línea celular. La identidad de la línea celular debe estar validada y autenticada (Freshney, 2002).

Estas líneas celulares poseen la capacidad de proliferación ilimitada, debido a que sufrieron un proceso de transformación que pudo ocurrir de manera espontánea o ser inducido por compuestos químicos o radiaciones que compromete sus características de crecimiento, como la administración del medio adecuado fresco (dependiendo de la línea celular) o el espacio adecuado para su crecimiento (Ulrich y Pour, 2001).

Las líneas celulares pueden dividirse en adherentes y no adherentes. Para este trabajo nos enfocaremos en las células adherentes, las cuales crecen en monocapa con la capacidad de fijarse o adherirse a la placa donde sean cultivadas y en células transformadas, que provienen de tumores o han sido manipuladas de algún modo (Cell Culture Basics, 2016).

2.3 Ensayos de citotoxicidad *in vitro*

La citotoxicidad se define como un daño celular provocado por alguna sustancia que puede ser detectado. La evaluación citotóxica es una vía simple, rápida y económica para obtener información de los compuestos a estudiar, por ejemplo, en la identificación de nuevos compuestos posiblemente anticancerígenos. Por ello es importante obtener resultados reproducibles en estudios *in vitro* para posteriormente continuar con estudios *in vivo*. Muchos de estos estudios tienen el propósito de determinar el potencial citotóxico de los compuestos estudiados para determinar si pueden ser usados como fármacos o cosméticos al ser no tóxicos, o en el caso de compuestos anticancerígenos, la toxicidad es de importancia (Freshney, 2000). Para los estudios *in vitro* se tiene el sustrato biológico al que se le añaden los compuestos de estudio. Las alteraciones que sufre el material biológico se pueden estudiar con las modificaciones estructurales o fisiológicas que sufren y que son esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones.

Los ensayos de citotoxicidad sirven, entre otras cosas, para medir viabilidad, para medir la proporción de las células que se mantienen intactas después de un tratamiento dañino y se puede evaluar la citotoxicidad de un compuesto mediante la concentración letal (LC) (Cordero, 2002).

En este trabajo se pretende demostrar el efecto citotóxico de tres cepas de lactobacilos en líneas celulares. Esto con el método *in vitro* de la sulforrodamina B. Este ensayo se basa en la capacidad que tiene la sulforrodamina de unirse a proteínas de las células que han sido fijadas en

placas con ácido tricloroacético. Este compuesto es un colorante de color rosa con dos grupos sulfónicos, los cuales se unen a los residuos básicos de las proteínas en condiciones ácidas, y se disocia en condiciones básicas. Debido a que la unión del colorante es estequiométrica, la cantidad de colorante es directamente proporcional a la concentración de células vivas (Rahman, *et al.*, 2001). Esta unión de colorante con los residuos básicos de proteínas se realiza sobre los de las células restantes en la placa, una vez después de realizado el tratamiento con posible efecto citotóxico.

2.4 Probióticos

Entre las herramientas que se podrían emplear para generar citotoxicidad se encuentran los probióticos, que pueden usarse como remediación en distintos tipos de cáncer, como suplemento alimenticio profiláctico o adyuvante en terapias convencionales (Irecta, *et al.*, 2017).

Los probióticos son microorganismos vivos que en cantidades adecuadas confieren al hospedero un efecto benéfico (FAO/WHO, 2002), mayor a 10^6 unidades formadoras de colonia (UFC)/g para compensar la pérdida de células al pasar por el tracto gastrointestinal (Tamime, *et al.*, 2005). El beneficio mejor conocido de ellos es la restauración de la microbiota intestinal cuando se ha administrado un antibiótico y el aumento de la inmunidad del tracto gastrointestinal. Para la selección de microorganismos probióticos se deben considerar tres aspectos fundamentales: seguridad, aspectos funcionales y aspectos tecnológicos. Los criterios utilizados actualmente para considerar una bacteria como probiótico se enlistan en la TABLA 2.

Tabla 2. Criterios para la definición de microorganismos para ser considerados como probióticos

Un probiótico debería:

- Ser no patógeno
- Ser resistente a la destrucción por procesamientos técnicos
- Ser resistente al ácido gástrico o biliar
- Adherirse al tejido epitelial del intestino
- Ser capaz de colonizar el tracto gastrointestinal, aunque sea por un corto periodo de tiempo
- Producir sustancias antimicrobianas
- Modular la respuesta inmune
- Influenciar en el metabolismo humano (por ejemplo, acumulación del colesterol, producción de vitaminas, etc.)

Modificado de Teitelbaum y Walker, 2002; Castañeda, 2018.

Diversos alimentos y productos de consumo humano contienen probióticos como leches fermentadas, quesos, frutas, cereales, aceitunas, pan, cerveza, vino y salsas y pueden ser un solo probiótico o una mezcla de ellos (Dsouza, *et*

al., 2002). De igual forma se pueden encontrar en preparaciones farmacéuticas.

Los probióticos generan beneficios que pueden ser aplicados para resolver problemas de salud, entre los que se encuentran la inhibición de bacterias patógenas, reducción de los niveles de colesterol y triglicéridos, pueden modular el sistema inmune, tienen efectos benéficos en diversos tipos de cáncer, producen vitaminas, previenen y tratan diarreas infecciosas y causadas por antibióticos y mejoran la función intestinal. Además, ayudan a controlar la microbiota intestinal de manera favorable (He, 2017).

Una vez ingeridos, los probióticos deben llegar al lumen intestinal, colonizarlo y de ahí, ejercer su efecto benéfico. Los mecanismos exactos por los que los probióticos ejercen sus efectos aún no se describen ni se entienden totalmente, ya que es importante saber que cada probiótico tiene propiedades únicas y el mecanismo por el cual puede ejercer sus actividades benéficas se ve afectado por diversos parámetros moleculares y celulares, sus propiedades metabólicas, incluyendo su crecimiento y división, así como los genes que posee, su capacidad de adaptarse al hospedero, las moléculas presentes en su superficie, algún componente secretado o incluso de la misma célula bacteriana como el DNA o su peptidoglicano (Oelschlaeger, 2010, Saxami, *et al.*, 2012). Los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* presentan propiedades antiinflamatorias en el intestino, por lo que, una disminución de estos promueve un aumento de un estado proinflamatorio a nivel sistémico (Molska y Regula, 2019).

En el tracto gastrointestinal se adhieren al epitelio intestinal por receptores celulares, estabilizando las uniones estrechas bloqueando la unión de los patógenos y el transporte de sus toxinas que podrían pasar de forma paracelular. De igual forma, aumentan la expresión de MUC2 y MUC3 para proteger la mucosa intestinal (Tlaskalová-Hogenová, *et al.*, 2011). Otro mecanismo que pueden usar los probióticos y que previene la colonización de patógenos, es creando un ambiente desfavorable para ellos secretando factores antimicrobianos como bacteriocinas, óxido nítrico (NO), defensinas y peróxido de hidrógeno, así como alterando el pH del medio por medio de la producción de ácido láctico, de ácido acético y de ácidos grasos. Los probióticos pueden interactuar con las toxinas de los patógenos. Otra vía por la cual los probióticos son benéficos, es porque estimulan el sistema inmune a través de las células presentadoras de antígeno, células NK, linfocitos T, citocinas y anticuerpos, pueden unirse a los receptores tipo Toll (TLRs) y bloquean factor nuclear kappa B (NF- κ B). Por otro lado, los probióticos pueden prevenir la apoptosis activando la cascada de señalización Akt/MAPK y bloqueando citocinas proinflamatorias como interferón

gama (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1) (Khani, *et al.*, 2012).

Los mecanismos por los cuales los probióticos pueden ejercer su efecto benéfico se presentan en la FIGURA 2.

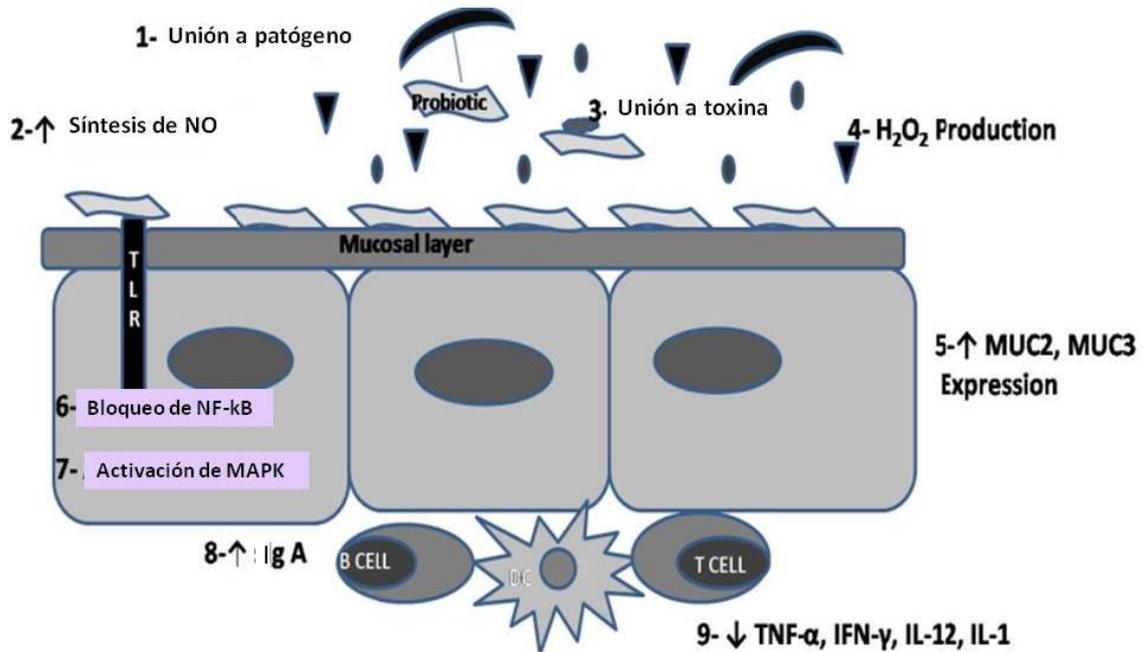


Fig. 2. Mecanismos por los que los probióticos dan tienen efectos benéficos en el organismo. NO: Óxido nítrico; H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno; MUC2: Mucina 2; MUC 3: Mucina 3; NF- κ B: Factor nuclear kappa B; MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitosis; IgA: Inmunoglobulina A; TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa; IFN- γ : Interferón gama; IL-1: Interleucina 1; IL-12: Interleucina 12 (Modificado de Khani, 2012).

Como se mencionó anteriormente, los probióticos ayudan a modular la microbiota intestinal de manera favorable. Esto es importante ya que en diversos estudios se ha demostrado que la misma tiene influencia fisiológica y bioquímica en la carcinogénesis del cáncer de colon (Uronis, *et al.*, 2009; Sobhani, *et al.*, 2011).

2.4.1 Crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano es el aumento en el número de bacterias en una población, este es de manera exponencial. El crecimiento bacteriano necesita de los nutrientes adecuados, ya que este se afecta por las condiciones en que se realice el cultivo bacteriano, como lo son el pH del medio, temperatura, presencia de oxígeno y la composición del medio por mencionar algunos ejemplos, ya que estos dependen del tipo de microorganismo que nos interese cultivar (Rogers y Kadner, 2019).

Todo crecimiento bacteriano tiene principalmente 4 fases de crecimiento, las cuales se pueden representar en una curva de crecimiento bacteriano, estas se ilustran en la FIGURA 3.



Fig 3. Figura que muestra la dinámica del crecimiento microbiano. (Trevan, 1990).

Una vez inoculado en el medio, el microorganismo que deseamos cultivar entra en una fase de latencia o fase *lag*. Esta es una fase de adaptación metabólica a las nuevas condiciones, aquí no hay un crecimiento celular: Sin embargo, las células inoculadas aumentan de tamaño individualmente y son metabólicamente activas, ya que, en este punto, sintetizan enzimas y metabolitos necesarios para la división celular. Esta fase presenta una mayor o menor duración dependiendo de algunos factores como el tamaño del inóculo o el estado metabólico previo del inóculo.

Posteriormente, los microorganismos entran en una fase de crecimiento exponencial o fase *log*. En esta fase, la velocidad de crecimiento es máxima; las bacterias consumen los nutrientes del medio a gran velocidad y esta fase continúa hasta que los nutrientes se agoten, punto en el que disminuye la velocidad de crecimiento bacteriano y algunas células comienzan a morir (Rogers y Kadner, 2019). En este punto, comienza una fase pre estacionaria o estacionaria temprana, donde termina la fase *log*. Aquí se da paso a la fase estacionaria, caracterizada porque no existen cambios significativos en la densidad celular, es decir, hay un balance entre los microorganismos vivos y muertos, esto hace que la población microbiana se mantenga constante. Aquí ya se agotaron los nutrientes esenciales del medio, el pH del medio cambia y, por lo tanto, comienza a ser inadecuado para el crecimiento celular, y es importante mencionar que en esta fase se produce acumulación y liberación de metabolitos secundarios de la bacteria (Salvucci, 2019).

Por último, se entra en la fase de muerte en la que comienza una disminución progresiva de las células viables y por lo tanto, predominan los organismos

mueren; esto se debe al agotamiento de nutrientes y a que las condiciones del medio ya son adversas para el crecimiento. El período de tiempo antes del inicio de la fase de muerte depende de la especie y el medio. Las bacterias no mueren necesariamente incluso cuando carecen de nutrientes, y pueden permanecer viables durante largos períodos de tiempo (Rogers y Kadner, 2019).

La producción de metabolitos puede ocurrir en cualquiera de las etapas de crecimiento. Como se menciona a continuación, no hay muchos detalles acerca de las moléculas responsables de los efectos anticancerígenos, por lo que es necesario evaluar células cosechadas en diferentes fases de crecimiento por si su producción está relacionada con el mismo.

2.4.2 Lactobacilos como probióticos y su uso contra el cáncer

El grupo de las BAL está integrado por bacterias Gram-positivas, anaerobias facultativas con un metabolismo fermentativo, capaces de producir ácido láctico como producto final de la fermentación de carbohidratos. Incluye a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, constituyentes de la biota nativa humana y son generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés (Chandra, 2016)). Sin duda, la principal aplicación de estas bacterias es durante la elaboración de diferentes productos lácteos fermentados, en donde las más utilizadas son *S. thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Los lactobacilos pertenecen de forma natural a la microbiota del tracto digestivo, además de ser reconocidos como probióticos (Regulski, *et al.*, 2012). *L. casei*, *L. helveticus* y *L. rhamnosus* son algunos ejemplos de probióticos que se encuentran en la microbiota intestinal de manera predominante (Hati, *et al.*, 2016), además, a nivel clínico, tienen actividades antimicrobianas, antitumorales y antiinflamatorias (Sadhu y Ganguly, 2017).

Los lactobacilos no poseen plásmidos y producen L-ácido láctico al llegar al intestino, dando como resultado una disminución del pH evitando así el crecimiento de bacterias putrefactivas y disminuyendo la microbiota patógena. Poseen factores de adhesión para su interacción con los enterocitos (Rondon, *et al.*, 2015).

Son capaces de generar en su metabolismo peróxido de hidrógeno, disminuyen la concentración de oxígeno, así como son capaces de generar bacteriocinas para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas (Baffoni, 2011). Estas mismas bacteriocinas también son capaces de inhibir el crecimiento de células cancerígenas (Kaur y Kaur, 2015). También, cepas de *L. casei*, *L. gasseri*, *L.*

acidophilus y *L. rhamnosus* presentaron un efecto de disminución de apoptosis y protector en líneas celulares HT-29 a través de sus proteínas de membrana por medio de la activación de enzimas antioxidantes y disminuyendo la acumulación de especies reactivas (Zhao, *et al.*, 2017).

Se ha estudiado el uso de probióticos como tratamiento o adyuvante contra distintos tipos de cáncer por sus múltiples beneficios a la salud. Los tratamientos convencionales contra el cáncer, como lo son la quimioterapia o radioterapia confieren ciertos efectos secundarios como la diarrea, náusea, alopecia, daño a la mucosa intestinal, anorexia, neuropatía, entre otros, que afectan la salud y la calidad de vida del paciente. Existen estudios preclínicos y clínicos del uso de probióticos destinados para proteger de los tratamientos convencionales como contra sus efectos secundarios (Mego, *et al.*, 2013; Picó y Mingot, 2019), así como estudios que exhiben que los probióticos son capaces de restaurar la microbiota perdida por efectos de la quimioterapia (Ichim, *et al.*, 2018).

Algunos son capaces de inhibir a los carcinógenos, y la formación de mutágenos alterando el metabolismo de absorción y eliminación de metabolitos (Foo, *et al.*, 2011) disminuyendo compuestos genotóxicos (Kumar y Suman, 2017). En un estudio en 1984 se demostró que adicionando a la dieta *L. acidophilus* se disminuye la actividad de enzimas de bacterias fecales, como la β -D- glucuronidasa, nitrorreductasa y azorreductasa, cuyos sustratos en la dieta pueden convertirse en carcinógenos por reacciones metabólicas de las bacterias intestinales (Goldin y Gorbach, 1984).

Algunas cepas de lactobacilos tienen la capacidad de unirse a algunos mutágenos, esto depende de la composición de su peptidoglicano, polisacáridos, glicoproteínas secretoras, de su fase de crecimiento y del tipo de mutágeno (Raman, *et al.*, 2013).

Datos epidemiológicos, así como distintos estudios, han demostrado que el consumo de ciertas cepas de BAL, así como la ingestión de productos fermentados pueden ayudar a disminuir el riesgo de desarrollo a ciertos tipos de cáncer, así como de inhibir el crecimiento tumoral (Kato, *et al.*, 1994), ya que tienen efectos pro apoptóticos, inhiben migración tumoral, así como la proliferación celular, esto último por efecto de algunas bacteriocinas secretadas por los mismos lactobacilos (Sadhu y Ganguly, 2017). Este beneficio puede obtenerse por diversas razones. Se ha observado que algunos probióticos ejercen su efecto en diversos pasos de la cascada de invasión y metástasis de las células cancerígenas, afectando la adhesión célula-célula y el microambiente tumoral, así como alterando la expresión de algunos genes implicados en la transformación, migración e invasión celular (Motevaseli, *et al.*, 2017). Algunos lactobacilos tienen la capacidad de unirse a ciertos carcinógenos, otros son capaces de modular enzimas intestinales que pueden

ser procarcinogénicas, otros pueden afectar el estrés oxidativo o directamente la apoptosis. Los lactobacilos son capaces de producir péptidos bioactivos o compuestos benéficos como por ejemplo, vitaminas del complejo B (Baffoni, *et al.*, 2011). En algunos casos funcionan como citomoduladores, que son capaces de inhibir el crecimiento de células cancerosas, así como son capaces de estimular células inmunocompetentes para aumentar la respuesta inmune (Chandra, 2016), por ejemplo *L. gasseri* inhibió la proliferación y aumentar la fagocitosis en un modelo de dimetilhidrazina asociado a CC, así como la reducción del tamaño del tumor (Foo, *et al.*, 2011). En modelos animales se ha demostrado también que, con una dieta de suplementos alimenticios ricos en lactobacilos, disminuyen la latencia de cáncer de colon inducido de manera experimental, siendo capaces de inhibir lesiones precancerosas y el desarrollo del tumor (Foo, *et al.*, 2011). Como se puede ver, en la última década se ha puesto especial atención a modelos animales y a estudios *in vitro* con líneas celulares, sobre todo por su efecto reductor de la invasión y metástasis en distintos tipos de cáncer (Motevaseli, *et al.*, 2017).

Los probióticos producen metabolitos bioactivos como algunos ácidos orgánicos o algunas proteínas, por mencionar algunos ejemplos, posiblemente responsables de su efecto anticancerígeno (Sharma, *et al.*, 2019). Se ha observado que algunos metabolitos de algunos lactobacilos, como *L. casei*, *L. rhamnosus* y *L. acidophilus*, por ejemplo y de algunas cepas de bifidobacterias son capaces de inhibir la proliferación tumoral de manera directa o indirecta (Hirayama y Rafter, 2000; Commane, *et al.*, 2005). Por ejemplo, *L. plantarum* facilita la actividad de las células *Natural Killer* del sistema inmune contra la línea celular de cáncer de próstata PC-3 (Horinaka, *et al.*, 2010).

Diversas cepas de probióticos son capaces de convertir el ácido linoleico en ácido linoleico conjugado (Kumar, *et al.*, 2010), un compuesto derivado del ácido linoleico que confiere beneficios a la salud por sus propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas. Se ha demostrado también, que este compuesto es capaz de reducir la incidencia de cáncer de colon, piel, mama, y próstata en modelos animales (Belury, 2002).

Existen muchos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que demuestran actividad antígenotóxica que poseen los probióticos; esto es de gran importancia en la investigación contra el cáncer, ya que en el proceso de carcinogénesis también se ven implicados cambios genéticos (daños al DNA, cambio en el equilibrio entre oncogenes y supresores de tumores, mutaciones, entre otras) (Grivennikov, 2013); así mismo, existe una vasta cantidad de estudios que demuestran la capacidad de los probióticos de regular la respuesta del sistema inmune innato, modular procesos de inflamación, fortalecer funciones de la barrera epitelial del colon (en el caso del CC), todos estos procesos también son de suma importancia en el caso de tumorigénesis y/o carcinogénesis (Swee, 2013).

Mucho del efecto anticancerígeno que se ha observado en diferentes estudios, es gracias al exopolisacárido de los lactobacilos (Wei, *et al.*, 2019) estudiados como el de Zahran en 2017 con *L. rhamnosus* en un modelo *in vivo* de CC (Zahran, *et al.*, 2017) o el caso de *L. plantarum*, estudiado en 2017 por Zhou, en un modelo *in vitro* en líneas celulares de cáncer colorrectal CT26 de ratón y Caco-2 de humano (Zhou, *et al.*, 2017).

Las propiedades que contienen cada especie de probióticos son diversas y la combinación individual de estas determina su acción específica y, como consecuencia, su aplicación de forma efectiva para el tratamiento o prevención de algunas enfermedades (Oelschlaeger, 2010). Existen estudios que exhiben que los lactobacilos pueden producir su efecto deseado usando cepas vivas o muertas por calor (Gonet, *et al.*, 2007; Hu, *et al.*, 2015), el sobrenadante del cultivo bacteriano, la pared celular o su citoplasma (Wang, *et al.*, 2014), este último afectando el ciclo celular. Estos resultados, pueden ser con una sola cepa, o incluso, se ha observado que un coctel de lactobacilos diversos es capaz de aumentar su efecto inhibitorio y disminuye vías de señalización de proliferación celular, así como se aumenta la inducción de apoptosis (Ghanavati, *et al.*, 2020).

2.4.2.1 *Lactobacillus casei*

La bacteria *L. casei* es Gram-positiva, anaerobia facultativa, sin motilidad y no formadora de esporas. Tiene carácter ácido tolerante, con metabolismo estrictamente homofermentativo, siendo el ácido láctico su producto final principal. Se encuentra de forma natural en la leche, carne, vegetales fermentados, en el organismo humano y en el ambiente (Mori *et al.*, 1997). De igual forma, al no ser patógena, *L. casei* se encuentra de forma comercial en diversos suplementos alimenticios en varios países.

Usualmente es seleccionada por ser resistente a los ácidos gástricos y a la digestión biliar, así como por su capacidad de colonizar fácilmente el tracto gastrointestinal (Teitelbaum y Walker, 2002).

2.4.2.2 *Lactobacillus casei* en cáncer

En general, se ha encontrado que *L. casei* puede incrementar la producción de ácidos grasos de cadena corta como el butirato, que se ha encontrado que ayuda a disminuir e inducir apoptosis en el caso de células dañadas (Kumar, *et al.*, 2013).

Se ha encontrado que diferentes cepas de *L. casei* tienen un efecto antiproliferativo en distintas líneas celulares de cáncer, incluyendo de cáncer de

colon HT-29 de humanos y CT-26 en el caso de ratones y que este efecto se ejerce a través de la apoptosis, reduciendo la viabilidad de ambas líneas celulares y con efecto antiproliferativo de forma dependiente de la concentración así como del tiempo de incubación (Tiptri, *et al.*, 2016), un experimento similar fue realizado pero con exopolisacárido de *L. casei*, dando como resultado una disminución en la viabilidad de la línea celular HT-29 con un efecto antiproliferativo (Liu, *et al.*, 2011). En un modelo de ratón, Kumar en 2010, describió que *L. casei* produce un polisacárido capaz de inhibir la carcinogénesis en colon a través de la supresión en la síntesis de interleucina 6 (IL-6) y la transducción de señales en la transcripción del gen STAT 3 (importante en procesos de crecimiento celular y apoptosis) (Kumar, *et al.*, 2010). Otro estudio reciente, prueba que *L. casei* es capaz de inhibir el crecimiento tumorigénico de cáncer de colon en un modelo *in vivo* por medio de la modulación del sistema inmune (Aindelis, *et al.*, 2020), así como en otro tipo de tumores (Bibas, *et al.*, 2007).

En 1994, Fichera probó que la cepa *L. casei* ATCC25180 tiene actividad citotóxica contra 2 líneas tumorales murinas (linfoma YAC-1 y mastocitoma P815) y una línea tumoral humana de leucemia (K562), y que esta actividad es mayor cuando únicamente se expone el peptidoglicano de esta cepa contra estas líneas tumorales (Fichera y Giese, 1994).

L. casei Shirota fue capaz de suprimir la tumorigénesis en un modelo *in vivo* de CC de inducción con un carcinógeno, azoximetano con tratamientos en periodos cortos y largos (8, 12 y 25 semanas) (Yamakazi, *et al.*, 2000). En 2009, Matsumoto describió que esta cepa produce un polisacárido efectivo en la prevención del cáncer colorrectal por medio del sistema inmune disminuyendo la síntesis de IL-6, así como el transductor de la señal activadora de la transcripción en un modelo murino (Matsumoto, *et al.*, 2009).

En el caso de *L. casei* BL23, presenta efectos antiinflamatorios en 2 modelos murinos diferentes cuando existe colitis inducida químicamente (Rochat, *et al.*, 2007; Leblanc, *et al.*, 2011), así como propiedades antitumorales en ratones para un modelo con virus del papiloma humano y en un modelo de cáncer de colon inducido por dimetilhidrazina (Lenoir, *et al.*, 2016). Esta misma cepa exhibió un efecto antitumoral y apoptótico en un modelo de CC inducido con azoximetano (Jacouton, *et al.*, 2017).

En 2018, Di *et al.* probaron el exopolisacárido crudo y acidificado de 9 cepas diferentes de *L. casei* y *L. rhamnosus* contra la línea celular HT-29 de cáncer de colon obteniendo un efecto antiproliferativo dependiente de la dosis (Di, *et al.*, 2018).

Se ha comprobado que *L. casei* YIT9018 ejerce un efecto protector en ratones con melanoma al suprimir el crecimiento de los tumores primarios, así como el

desarrollo de metástasis a pulmón por medio de la modulación del sistema inmune (Matsuzaki, *et al.*, 1988).

En 2018, Riaz demostró que 2 cepas distintas de *L. casei* y una cepa de *L. paracasei* aisladas de leche humana tienen diferentes actividades probióticas, incluyendo su actividad anticancerígena en la línea celular HeLa de cáncer de cérvix mediante la activación de moléculas que llevan a la célula a apoptosis (Riaz, *et al.*, 2018).

En la TABLA 3 se describen algunos ejemplos de distintas cepas de *L. casei* sobre algunos tipos de cáncer.

TABLA 3: Ejemplos de *L. casei* en diferentes tipos de cáncer

Tipo de cáncer	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Efecto	Referencia
Cáncer colorrectal		Ratones BALB/c	Previene la recurrencia del cáncer.	Chang <i>et al.</i> , 2018.
		Ratones hembras C57BL/6	Efecto protector vs. CRC inducido por DMH debido a la modulación del sistema inmune.	Lenoir <i>et al.</i> , 2016.
	HT-29; CT-26		Aumento de apoptosis.	Tiptri, 2016.
Cáncer de vejiga		58 pacientes	Disminuye diarrea y mucositis y restaura microbiota causada por FOLFOX.	Aso & Akazan, 1992.
Melanoma		Ratones C57BL/6	Suprime crecimiento de tumores primarios. Evita metástasis a pulmón.	Matsuzaki <i>et al.</i> , 1988.

2.4.2.3 *Lactobacillus rhamnosus*

Lactobacillus rhamnosus (*L. rhamnosus*) es un tipo de bacteria ácido-láctica Gram-positiva, anaerobia facultativa y produce ácido láctico y etanol en condiciones de anaerobiosis (Narayanan, *et al.*, 2004). Es resistente al ácido y a la bilis y tiene la capacidad de producir agentes antimicrobianos (Behzadi *et al.*, 2017). Se sabe que secreta las proteínas LGG_00324 o p75 y LGG_00031 ó p40, capaces de promover la supervivencia y el crecimiento de las células

epiteliales intestinales previniendo la apoptosis inducida por citocinas y promoviendo la homeostasis de las células epiteliales intestinales (Claes *et al.*, 2012).

Se ha descrito que diferentes cepas de *L. rhamnosus* contienen hidrolasas que pueden prevenir y tratar la colitis dependiente de un mecanismo de un receptor de crecimiento (Claes *et al.*, 2012).

2.5.2.4 *Lactobacillus rhamnosus* en cáncer

En un estudio realizado en 2007, se demostró que *L. rhamnosus* GG enriquecida con oligofruktosa propició la maduración de células dendríticas, importantes en la respuesta inmune innata y reforzando la respuesta inmune contra células tumorales (Roller, *et al.*, 2007). En 2010, Altonsy demostró que *L. rhamnosus* es capaz de inducir apoptosis en células Caco-2 de cáncer de colon (Altonsy, *et al.*, 2010). En combinación con vitamina K, una cepa viable de *L. rhamnosus* GG fue capaz de inhibir proliferación celular, inducir apoptosis y arrestar el ciclo celular contra líneas celulares de cáncer de colon, Caco-2, HT-29 y SW480 de forma dosis dependiente (Orlando, *et al.*, 2016).

L. rhamnosus es de las especies probióticas que en modelos animales funciona como adyuvante en tratamientos para inhibir a *Helicobacter pylori*, un microorganismo patógeno factor altamente asociado al cáncer gástrico (Zhu y Liu, 2017).

Se ha comprobado de forma *in vitro*, la capacidad de *L. rhamnosus* de inhibir el factor inducible por hipoxia- 1 α (HIF-1 α) (factor expresado en condiciones de hipoxia, adapta a la célula en condiciones de hipoxia y asociado a distintos tipos de cáncer), en líneas celulares triple negativo de cáncer de mama MDA-MB-231 (Esfandiary, *et al.*, 2016).

En 2011 Kandasamy comprobó que *L. rhamnosus* GG tiene un efecto antiinflamatorio contra cáncer de vejiga por medio de la producción de interleucina 10 (IL-10) por medio de células dendríticas y neutrófilos activando células T (Kandasamy, *et al.*, 2010).

En un modelo *in vivo*, *L. rhamnosus* GG inhibió el crecimiento de lesiones preneoplásicas inducidas por el carcinógeno dimetilhidrazina, así como la actividad de enzimas fecales (previamente mencionadas) responsables de la carcinogénesis química (Verma y Shukla, 2013).

En un modelo *in vivo*, el exopolisacárido de la cepa *L. rhamnosus* ATCC 7469 en interacción con una baja dosis de radioterapia de forma sinérgica, controla la progresión del CC a través de la modulación de las vías de señalización de

factores de crecimiento asociados con inflamación y proliferación celular (Zahran, *et al.*, 2017).

En la TABLA 4 se describen algunos ejemplos de distintas cepas de *L. rhamnosus* sobre algunos tipos de cáncer.

TABLA 4. Ejemplos de *L. rhamnosus* sobre distintos tipos de cáncer

Tipo de cáncer	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Efecto	Referencia
Cáncer de colon	Caco-2; HT-29		Agente proapoptótico.	Orlando <i>et al.</i> , 2016.
	Caco-2		Inmunomodulación de IL-8.	López <i>et al.</i> , 2008.
		Ratas	Antiproliferativo o inhibición de angiogénesis e inflamación.	Goldin <i>et al.</i> , 1996. Gamallet <i>et al.</i> , 2016.
		Ratas Sprague Dawley	Disminuye número de ACF y disminuye actividad de enzimas procarcinogénicas.	Verma & Shukla, 2013.
Cáncer de mama	MDA-MB-231		Inhibidor de HIF-1 α	Esfandiary, 2016.
Cáncer de vejiga		Ratones hembras C57BL/6.	Regresión tumoral.	Seow <i>et al.</i> , 2010.

En 2014, Sadeghi observó un efecto antiproliferativo de *L. rhamnosus* GG inactivada por calor sobre la línea celular de cáncer de colon Caco-2 dando pie a la idea de que el efecto de los probióticos sobre el efecto citotóxico en líneas celulares no depende necesariamente de la viabilidad del microorganismo (Sadeghi, *et al.*, 2014).

2.4.2.5 *Lactobacillus helveticus*

Lactobacillus helveticus (*L. helveticus*) pertenece a las BAL. Es una bacteria fermentativa estricta, Gram-positiva y anaerobia facultativa. *L. helveticus* tiene la capacidad de influir en la salud de manera positiva. En diversos estudios *in vitro* se han demostrado las propiedades como probiótico de esta bacteria como su capacidad de sobrevivir al tracto gastrointestinal, su capacidad de adherirse a las células epiteliales y antagonizar patógenos (Taverniti y Guglielmetti, 2012).

En estudios *in vivo* en modelos murinos se demostró que *L. helveticus* puede prevenir infecciones gastrointestinales, estimula la protección contra

patógenos, modula la respuesta inmune del hospedero y afecta la composición de la microbiota intestinal (Taverniti y Guglielmetti, 2012).

2.4.2.6 *Lactobacillus helveticus* en cáncer

En un modelo *in vitro* con líneas celulares HT29 de cáncer de colon, se observó que *L. helveticus* o algunos compuestos producidos por este lactobacilo son capaces de interactuar directamente con estas células y, por lo tanto, fueron capaces de disminuir su tasa de crecimiento e inducir su diferenciación (Ucello, *et al.*, 2012). De igual forma, en leche desnatada, diversas cepas de *L. helveticus* tienen compuestos con actividad contra esta línea celular de cáncer de colon a distintos tiempos de fermentación, estos compuestos con propiedades multifuncionales, de los cuales tanto sus características como su actividad dependen de la cepa, así como del mismo tiempo de fermentación (Elfahri, *et al.*, 2016). En 2008, dos cepas de *L. helveticus* revelaron su capacidad de unión a 5 aminas aromáticas heterocíclicas, inactivando en estas su capacidad mutagénica (Stidl, *et al.*, 2008). *L. helveticus* en leche fermentada es capaz de reducir de forma significativa la tasa de crecimiento de la línea celular de cáncer de colon HT-29 (Baricault, *et al.*, 1995).

En la TABLA 5 se presentan algunos ejemplos de distintas cepas de *L. helveticus* sobre algunos tipos de cáncer.

TABLA 5. Ejemplos de *L. helveticus* sobre distintos tipos de cáncer

Tipo de cáncer	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Efecto	Referencia
Cáncer de colon	T84		Reduce invasión de <i>Campylobacter jejuni</i> .	Ternhag <i>et al.</i> , 2008.
Hiperplasia de colon		Ratones	Mejora de mucosa y del epitelio del colon.	Gareau <i>et al.</i> , 2010.
Cáncer de mama		Modelo murino dependiente de hormonas.	Retrasaron o detuvieron crecimiento tumoral. Aumento de IL-4, IL-10 y disminución de IL-6.	Moreno <i>et al.</i> , 2005.

En general, las moléculas, compuestos bioactivos o mecanismos que ejercen el efecto citotóxico de los lactobacilos todavía no se entienden totalmente ni están completamente dilucidados. Conforme va progresando el crecimiento bacteriano (ver 2.4.1 Crecimiento bacteriano), sus fases de crecimiento (ver

FIGURA 5), así como su metabolismo, se van sintetizando diferentes y determinadas moléculas, enzimas, compuestos y metabolitos que han demostrado ser responsables de la citotoxicidad presentada en estas cepas y que pudieran, en este caso, ser responsables de algunos de los efectos citotóxicos observados en este trabajo. Por lo general, las fases de crecimiento bacteriano que presentan una mayor actividad metabólica son en la fase exponencial y estacionaria, por lo que estos puntos fueron los que se tomaron para este trabajo.

3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Justificación

En múltiples estudios se han comprobado múltiples beneficios contra distintos tipos de cáncer con el uso de lactobacilos. El mecanismo por el cual los lactobacilos ejercen su actividad benéfica es poco claro ya que se tienen 3 hipótesis distintas. Algunos investigadores tienen la hipótesis de que los lactobacilos se pueden unir a compuestos mutagénicos y pueden ser excretados vía urinaria o fecal. Sin embargo, dependiendo el tipo de lactobacilo usado, los resultados son variables o no se observa una reducción significativa. La segunda hipótesis consiste en que como las bacterias patógenas tienen la capacidad de llevar a cabo reacciones metabólicas que pueden convertir ciertos metabolitos que pueden ser procarcinogénicos y pasar a carcinogénesis utilizando varias enzimas, mientras que los lactobacilos son capaces de disminuir la actividad de estas enzimas biotransformadoras, sin embargo, al estudiar esto con diversos lactobacilos, los resultados fueron ser muy diversos. Y la tercera hipótesis consiste en una desactivación de la carcinogénesis; sin embargo, se han obtenido resultados muy diversos e igual dependiendo de la bacteria que se estudie (Teitelbaum y Walker, 2002). Además, aun teniendo el mismo diseño experimental los resultados fueron inconsistentes entre ellos (de Roos y Katan, 2000). En general se necesitan más estudios para conocer qué es lo que le da a los probióticos su capacidad citotóxica, así como el mecanismo de acción, ya que aún es poco conocido debido a que también este efecto benéfico contra determinados tipos de cáncer depende de la cepa de lactobacilo de estudio, así como del tipo de cáncer en cuestión, por lo que los resultados de un estudio no se pueden extrapolar a otro.

Por la relevancia que tienen el cáncer de colon y próstata tanto a nivel mundial como en México (previamente mencionada), en este trabajo se estudió la posible actividad citotóxica de tres cepas de lactobacilos (por su facilidad de manejo y cultivo) sobre una línea celular de cáncer de próstata, PC-3 y dos líneas celulares de cáncer de colon, Caco-2 y HCT-15. Tanto en PC-3 como en Caco-2 se estudia por presencia de metástasis y gravedad del cáncer y en HCT-15 por la invasión del tipo de tumor en las zonas cercanas a éste y una supervivencia de quien la padece entre un 30%-60%.

3.2 Hipótesis

Las bacterias *Lactobacillus casei* R0215, *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009 y *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 poseen actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer de colon y próstata.

3.3 Objetivo general

Determinar si *Lactobacillus casei* R0215, *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009 y *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 poseen actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de colon (HCT-15 y Caco-2) y cáncer de próstata (PC-3).

3.3.1 Objetivos particulares

1. Determinar la concentración a la que los lactobacilos de estudio presentan actividad citotóxica.
2. Determinar la fase de crecimiento del lactobacilo en cuestión en la que se presenta mayor actividad citotóxica.
3. Determinar el tiempo de contacto requerido para que se presente el efecto citotóxico.

4. EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAL Y EQUIPO

4.1.1 CEPAS Y LÍNEAS CELULARES DE ESTUDIO

Cepas utilizadas

- *Lactobacillus casei* R0215 y *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 proporcionadas por Laboratorios Lallemand, Estado de México, México.
- *Lactobacillus helveticus* (ATCC® 15009™), proporcionada por ATCC, Manassas, Virginia, Estados Unidos; distribuida por Científica Senna S.A. de C.V, Ciudad de México, México.

Líneas celulares (ATCC distribuidas por Científica Senna S.A. de C.V)

- Caco-2 de adenocarcinoma colorrectal
- HCT-15 de cáncer colorrectal en estadio C de Dukes
- PC-3 adenocarcinoma de próstata estadio IV

4.2 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

4.2.1 Medios (Oxoid, Cheshire, Inglaterra; distribuidos por Comercial Biomédico Ramírez SA de CV, San Nicolás de los Garza, Monterrey, México)

Caldo de Man Rogosa y Sharpe (MRS)

Se pesaron 52 g/L de medio MRS OXOID CM0359 en balanza ADAM ACB plus-1000 y se disolvieron en 1 L de agua destilada a temperatura ambiente. Se esterilizó en autoclave YAMATO Sterilizer SM 300 a 121°C por 15 minutos.

Agar MRS

Se pesaron 62 g/L de Agar MRS OXOID en balanza ADAM ACB plus-1000 y se disolvieron en 1 L de agua destilada a temperatura ambiente. Se esterilizó en autoclave YAMATO Sterilizer SM 300 a 121°C por 15 minutos.

4.2.2 Reactivación de cepas

Para la reactivación de cepas, se tomaron 50 µL de *L. casei* y *L. rhamnosus* en polvo y se resuspendieron en 10 mL de caldo MRS. Se dejaron incubando 24 h

a 37°C con agitación constante a 300 rpm (en radio de rotor) en incubadora New-Brunswick. Posteriormente se tomó 1 mL de inóculo y se transfirió a un tubo con 10 mL de medio MRS y se dejó incubando 24 h a 37°C con agitación constante a 300 rpm (en radio de rotor). Tras este tiempo se sembraron en placa de Agar MRS y se seleccionó una colonia; para corroborar la pureza de las cepas, se realizó tinción de Gram y se observó al microscopio.

Para la reactivación de *L. helveticus*, se tomaron 400 µL y se transfirieron a 10 mL de caldo MRS. Se dejó en incubación en condiciones anaerobias por 48 h a 37°C sin agitación en estufa estática E-71 y posteriormente 1 mL se transfirieron a 10 mL de caldo MRS y se dejó en incubación 24 h. Se sembró en placa de Agar MRS y se seleccionó una colonia; para corroborar su pureza, se realizó tinción de Gram y se observó al microscopio.

4.2.3 Cinéticas de crecimiento

Las 3 cepas se cultivaron en MRS. *L. casei* y *L. rhamnosus* se incubaron en condiciones aerobias a 37°C con agitación constante a 300 rpm (en radio de rotor). *L. helveticus* se incubó en una jarra de anaerobiosis sin agitación a 37°C.

En MRS:

De un cultivo en tubos con 10 mL de caldo MRS con los lactobacilos saturados se calculó el inóculo a tomar para una densidad óptica (DO) de 0.1. Se transfirió a un matraz de 250 mL con 50 mL de MRS. Se tomaron muestras de 4 mL cada 2 h hasta las 30 h y se tomó lectura en el espectrofotómetro. Para cada muestra se realizaron diluciones para llevar a cabo el conteo en placa de agar MRS y obtener así las UFC (UFC/mL). Todas las muestras analizadas se pusieron en congelación y posteriormente se liofilizaron para su conservación.

4.2.4 Ensayos de citotoxicidad de las muestras de cultivo en MRS en la línea celular de cáncer de colon HCT-15

Para determinar el efecto citotóxico de las muestras de cultivo se utilizó el ensayo con sulforrodamina B. Cada muestra se analizó ocho veces y se realizó una réplica del ensayo. Para este ensayo se realizó la siguiente metodología general:

1. Se sembró en una placa de 96 pozos 20 000 células / pozo en medio RPMI y se incubó a 37°C, 5% CO₂, durante 24 h.
2. Después del tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo y se colocaron 90 µL de medio RPMI + suero fetal bovino 10% + penicilina/estreptomicina 1%. Se incubaron las células por 1 h a

37°C, 5% CO₂. Se adicionaron 10 µL de cada muestra (cepa de lactobacilo en t12, t24 o t30) con 3 concentraciones diferentes, baja (3.3 mg/mL), media (6.6 mg/mL) y alta (9.9 mg/mL) y se incubaron las placas durante 24 y 48 h (esto último de acuerdo a un estudio realizado por Orlando *et al.*, 2016), a 37°C, 5% CO₂. Se utilizó una caja para cada cepa utilizada. El orden utilizado en las placas de las concentraciones y los tiempos estudiados se ilustran en la FIGURA 4.

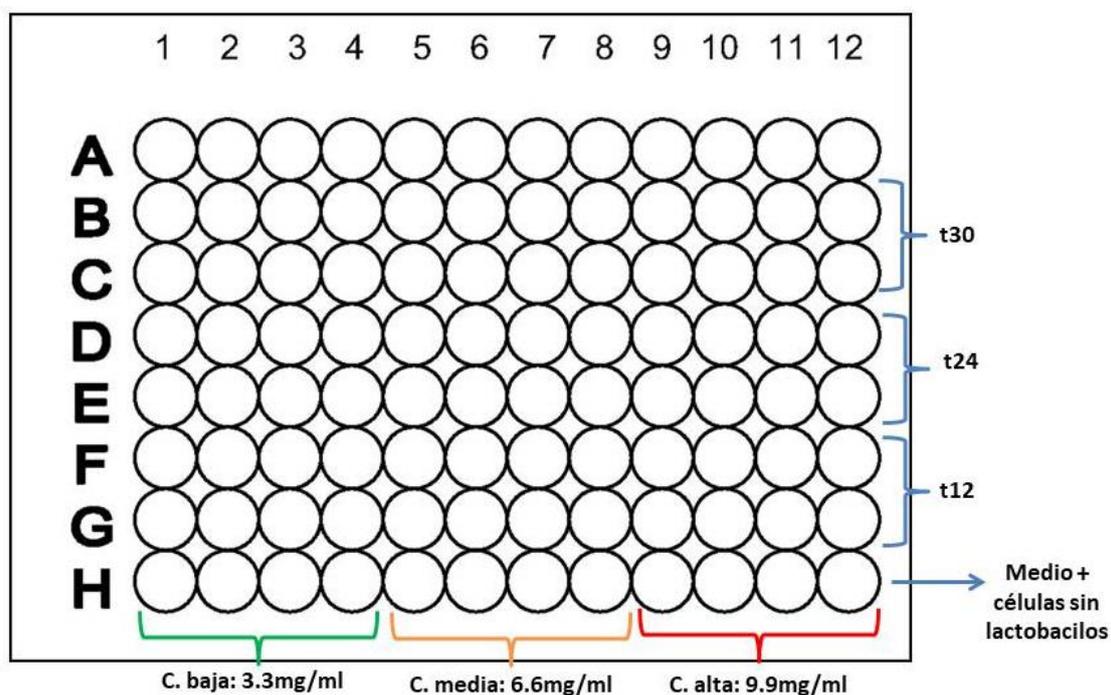


Fig. 4. Modelo de la placa con las muestras y dosis a estudiar de cada cepa. t: Tiempo de crecimiento bacteriano en horas; C: Concentración.

3. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se retiró el medio de cultivo, se agregaron 100 µL de TCA 10% y se incubaron las placas a 4°C durante una hora. Después de la incubación, se realizaron 5 lavados con agua y se secaron las placas a temperatura ambiente.
4. Se agregaron 50 µL de una solución de sulforrodamina B (explicado en el punto 2.3 de este trabajo) 0.4% en ácido acético 1%. Se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron 5 veces en ácido acético 1% y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se adicionaron 100 µL del amortiguador tris 100 mM, pH 10.5 para solubilizar y se leyeron las placas a 490 nm.

4.2.5 Pruebas de actividad citotóxica de las muestras de cultivo en MRS en la línea celular de cáncer de colon Caco-2

Para el cultivo de la línea celular de cáncer de colon, Caco-2 se realizó el método previamente descrito. La única diferencia fue el medio. Para el cultivo de esta línea celular el medio utilizado es EMEM Gibco con las mismas condiciones de cultivo celular previamente descritas, 37°C al 5% de CO₂.

Para las pruebas citotóxicas se utilizó el método previamente descrito de sulforrodamina B. Se colocaron 20,000 células por pozo, se probaron las 3 cepas de lactobacilos, *L. casei*, *L. helveticus* y *L. rhamnosus* con las 3 concentraciones utilizadas (3.3, 6.6 y 9.9 mg/mL) en los mismos tiempos de tratamiento, 24 y 48 h.

4.2.6 Pruebas de actividad citotóxica de las muestras de cultivo en MRS en la línea celular de cáncer de próstata PC-3

Para el cultivo de la línea celular de cáncer de próstata PC-3 se realizó el método previamente descrito. La única diferencia fue el medio. Para el cultivo de esta línea celular, el medio utilizado es FI2K, con las mismas condiciones de cultivo celular previamente descritas, 37°C al 5% de CO₂.

Para las pruebas citotóxicas se utilizó el método previamente descrito de sulforrodamina B. 20,000 células por pozo, se probaron las 3 cepas de lactobacilos, *L. casei*, *L. helveticus* y *L. rhamnosus* con las 3 concentraciones utilizadas (3.3, 6.6 y 9.9 mg/mL) en los mismos tiempos de tratamiento, 24 y 48 horas.

4.3 Cálculo de efecto citotóxico

Se consideró como control el medio + líneas celulares como el 100% y se calculó el porcentaje de supervivencia de las células que permanecieron en el pozo, ya que el método de sulforrodamina B muestra células vivas. El cálculo de la citotoxicidad se realizó restando 100%- % de células vivas de cada condición evaluada.

4.4 Análisis estadístico

Los datos se presentan como media±error estándar de la media (EEM). Se aplicó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de 2 factores para evaluar los datos experimentales con el programa GraphPad Prism 6. Los valores de p menor al 0.05 (P<0.05) se consideraron significativos.

5. RESULTADOS

Se probaron los lactobacilos *Lactobacillus casei* R0215, *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009 y *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 en líneas celulares de cáncer de próstata, PC-3 y dos de cáncer de colon HCT-15 y Caco-2 a tres concentraciones diferentes: 3.3 mg/mL (baja), 6.6 mg/mL (media) y 9.9 mg/mL (alta) a dos tiempos de tratamiento diferentes, 24 y 48 horas.

5.1 Cinéticas de crecimiento

En la FIGURA 5 se presentan las curvas de crecimiento de las 3 cepas en MRS. Estas se realizaron en condiciones de incubación de 37°C y 300 rpm (en radio del rotor), solo para *L. casei* y *L. rhamnosus*. *L. helveticus* se incubó a 37°C en condiciones anaerobias y sin agitación. Las cinéticas se realizaron por triplicado.

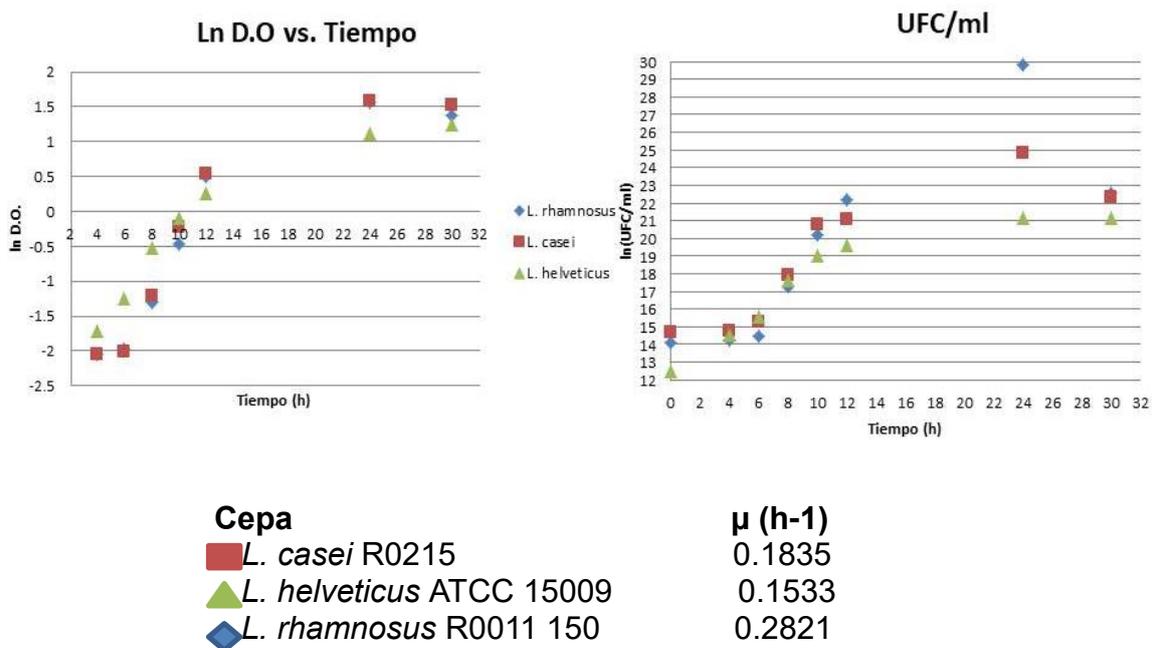


Fig. 5. Cinéticas de crecimiento de *L. casei* R0215 (café), *L. helveticus* ATCC 15009 (verde) y *L. rhamnosus* R0011 150 (azul) en medio MRS. A la izquierda se observa el ln de la densidad óptica vs. el tiempo de cultivo. La gráfica de la derecha enseña las unidades formadoras de colonias de cada cepa. En la parte inferior se encuentra la velocidad específica de crecimiento (μ) de cada cepa expresada en h⁻¹.

Se observa que, de las 3 cepas, *L. rhamnosus* es la que presenta una mayor velocidad de crecimiento en MRS. En cuanto a la densidad óptica (izquierda) y

a la gráfica de UFC (derecha), las 3 cepas tienen un crecimiento muy similar respecto a su tendencia.

Las 3 cepas se encuentran en fase *lag* desde su inóculo (tiempo 0) y hasta las 6 horas de crecimiento. Los 3 lactobacilos entraron en fase exponencial desde las 6 horas de incubación y, hasta las 24 horas de crecimiento en el caso de los tres lactobacilos. *L. casei* y *L. rhamnosus* entraron en fase de muerte entre sus 24 y 30 horas de incubación (tiempo en que terminó la cinética de crecimiento).

L. helveticus permaneció en su fase estacionaria desde las 24 y hasta el fin del cultivo (30 horas de incubación).

La concentración que alcanzaron los microorganismos en los 3 tiempos de incubación que se probaron en las pruebas de citotoxicidad contra las líneas celulares se puede observar en la TABLA 6.

Tabla 6. Concentración bacteriana de los 3 lactobacilos en sus 3 tiempos de incubación probados en los ensayos de citotoxicidad.

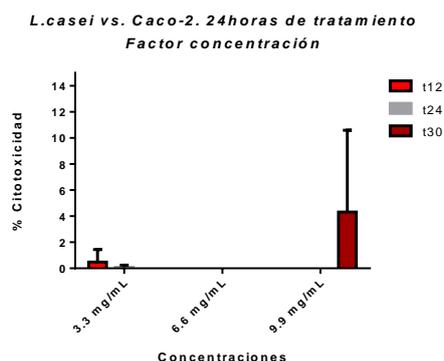
Tiempo de incubación	Concentración bacteriana (UFC/mL)		
	<i>L. casei</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
t12	1.1x10 ⁹	2.4x10 ⁹	1.9x10 ¹⁰
t24	6.0x10 ¹⁰	5.0x10 ⁹	1.1x10 ¹⁰
t30	5.0x10 ⁹	8.0x10 ⁹	1.1x10 ¹⁰

5.2 Ensayos de citotoxicidad

5.2.1 La línea Caco-2 es sensible a *L. casei* y *L. rhamnosus* a las 48 horas de tratamiento de forma dependiente de la concentración

De los tres lactobacilos probados, únicamente *L. helveticus* no tuvo efecto citotóxico alguno a ninguna concentración probada en ninguno de sus tiempos de crecimiento evaluada.

En el caso de *L. casei*, a las 24 horas de tratamiento, únicamente presentó efecto citotóxico en la concentración más alta (9.9 mg/mL) en el tiempo de 30 horas de su crecimiento con un 5.75% de citotoxicidad, sin diferencia significativa respecto a las tres concentraciones evaluadas (P=0.2) ni al tiempo de crecimiento de *L. casei* (P=0.2). Esto se puede observar en la GRÁFICA 2.

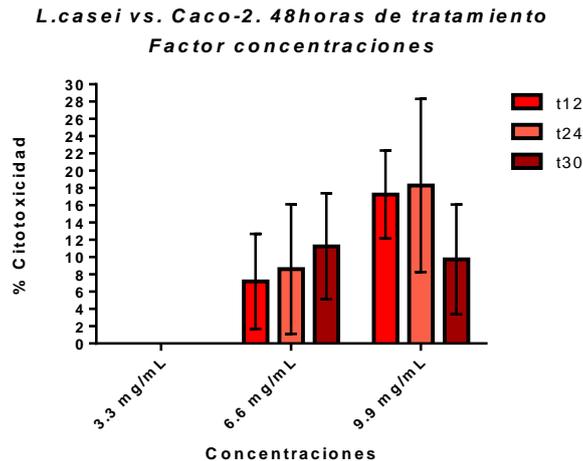


Gráfica 2. Citotoxicidad de *L. casei* vs. Caco-2 a las 24 horas de tratamiento. Los datos ilustran promedio \pm EEM. Ningún factor afecta el efecto citotóxico. ($P > 0.05$)

Al evaluar *L. casei* a las 48 horas de tratamiento, no se presentaron efectos citotóxicos en la concentración más baja (3.3 mg/mL). Para la concentración media, 6.6 mg/mL, en el tiempo 12 de crecimiento se obtuvo un 7.19% de citotoxicidad, en el tiempo 24, 8.62% y a las 30 horas de crecimiento, 11.25%. En la concentración más alta, 9.9 mg/mL, los efectos obtenidos fueron de 17.25%, 18.29 y 9.73% en sus tiempos de crecimiento 12, 24 y 30 respectivamente. Estos resultados se observan en la TABLA 7 y en la GRÁFICA 3. Los efectos citotóxicos sí se afectan por un efecto de concentración de forma significativa con un valor de $P = 0.013$ ($P < 0.05$), en cambio, el tiempo de crecimiento de *L. casei* no afecta de forma significativa ($P = 0.7$).

Tabla 7. Porcentajes de citotoxicidad con su desviación estándar de *L. casei* vs. Caco-2 a las 48 horas de tratamiento

L. casei 48 horas			
Tiempo/ Concentración	3.3 mg/mL	6.6 mg/mL	9.9 mg/mL
t12	0	7.19 \pm 4.4	17.25 \pm 4.1
t24	0	8.62 \pm 6.1	18.29 \pm 8.1
t30	0	11.25 \pm 5.0	9.73 \pm 5.1



Gráfica 3. *L. casei* vs. Caco-2 a las 48 horas de tratamiento. Los datos ilustran promedio \pm EEM y como factor que afecta el efecto citotóxico las concentraciones. $P=0.014$ ($P<0.05$).

L. helveticus no presenta algún efecto citotóxico contra Caco-2 ni a las 24 ni 48 horas de tratamiento en ninguna de las 3 concentraciones probadas.

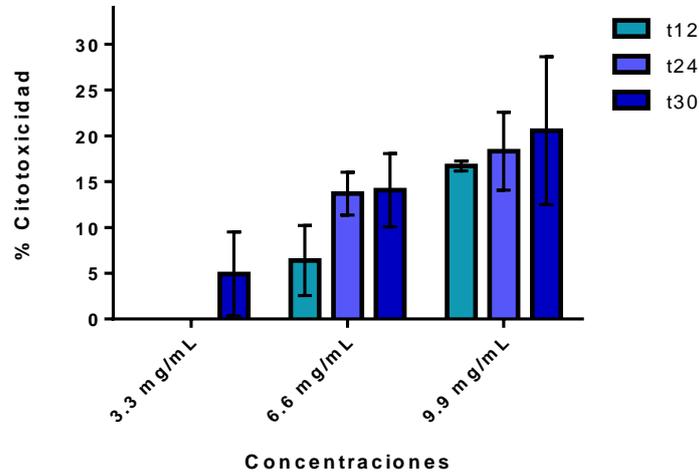
L. rhamnosus no presentó efectos citotóxicos a las 24 horas de tratamiento de exposición contra la línea celular Caco-2. A las 48 horas de tratamientos los efectos se presentaron en las tres concentraciones probadas, pero con algunas diferencias. En la concentración más baja (3.3 mg/mL), el efecto únicamente se observó en el tiempo 30 de crecimiento bacteriano con un 4.9% de citotoxicidad. La concentración de 6.6 mg/mL presentó efectos citotóxicos crecientes de acuerdo al tiempo de crecimiento de *L. rhamnosus*; en el tiempo 12 el efecto fue de 6.4%, en el tiempo 24, 13.7% y a las 30 horas de crecimiento fue de 14.1%. De igual manera, un efecto creciente se observa en la concentración alta de 9.9 mg/mL, 16.7% de citotoxicidad en el tiempo 12 de crecimiento, a las 24 horas de crecimiento, el efecto es de 18.3% y a las 30 horas el efecto citotóxico observado es de 20.6%. En este caso, el efecto citotóxico se afecta significativamente por las concentraciones ($P=0.01$), como se observa en la GRÁFICA 4a, así como por el tiempo de crecimiento de *L. rhamnosus* ($P=0.02$) observado en la GRÁFICA 4b. Estos resultados se observan en la TABLA 8 y en las GRÁFICAS 4a y 4b.

Tabla 8. Porcentajes de citotoxicidad con desviación estándar de *L. rhamnosus* vs. Caco-2 a las 48 horas de tratamiento.

L. rhamnosus 48 horas			
Tiempo/ Concentración	3.3 mg/mL	6.6 mg/mL	9.9 mg/mL
t12	0	6.4 \pm 3.1	16.7 \pm 0.4
t24	0	13.7 \pm 1.9	18.3 \pm 3.4

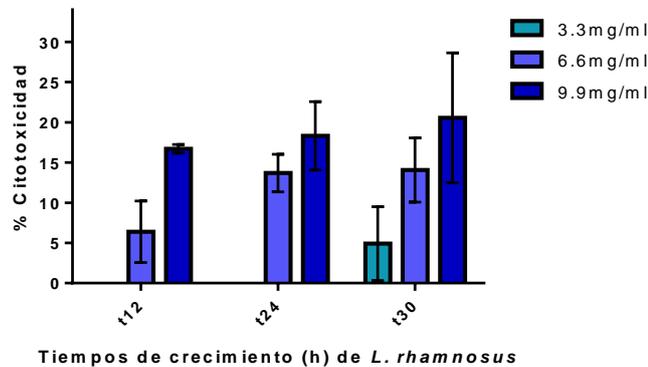
t30	4.9±3.4	14.1±3.2	20.6±6.5
------------	---------	----------	----------

***L. rhamnosus* vs. Caco-2. 48 horas de tratamiento
(Factor concentración)**



Gráfica 4a. Citotoxicidad de *L. rhamnosus* vs. Caco-2 a las 48 horas de tratamiento. Los datos ilustran promedio ± EEM y como factor que afecta al efecto citotóxico la concentración. $P=0.01$ ($P<0.05$).

***L. rhamnosus* vs. Caco-2. 48 horas de tratamiento
(Factor crecimiento bacteriano)**



Gráfica 4b. Citotoxicidad de *L. rhamnosus* vs. Caco-2 a las 48 horas de tratamiento. Los datos ilustran promedio ± EEM y como factor que afecta el efecto citotóxico el tiempo de crecimiento bacteriano. $P=0.0291$ ($P<0.05$).

5.2.2 La línea celular HCT-15 de cáncer de colon es sensible a las 3 cepas de lactobacilos en determinadas concentraciones a las 24 y 48 horas de tratamiento

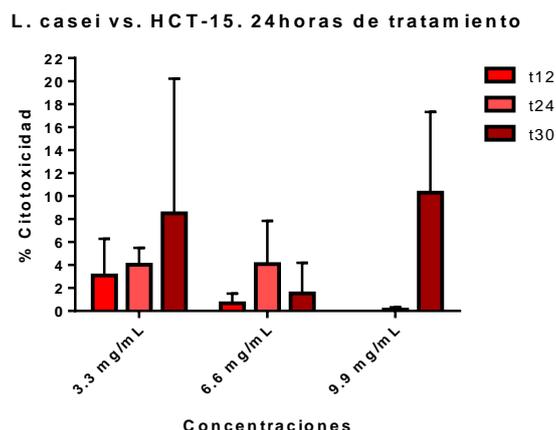
Se probaron las tres cepas de lactobacilos (*L. casei* R0215, *L. helveticus* ATCC® 15009™ y *L. rhamnosus* R0011 150) sobre la línea celular HCT-15 de cáncer de colon a 3 concentraciones diferentes: 3.3 mg /mL, 6.6 mg/mL y 9.9 mg/mL y las placas se dejaron a dos tiempos diferentes, 24 y 48 horas.

L. casei R0215 ejerce un efecto citotóxico sobre la línea celular HCT-15 a las 24 horas de tratamiento en las 3 concentraciones probadas en los diferentes tiempos de crecimiento de la cepa. En la TABLA 9 se pueden observar estos datos.

Tabla 9. Porcentajes de citotoxicidad con desviación estándar de *L. casei* vs. HCT-15 a las 24 horas de tratamiento.

<i>L. casei</i>			
24 hrs			
	3.3 mg/mL	6.6 mg/mL	9.9 mg/mL
t=12	3.1±3.1	1.0±0.8	0
t=24	4.0±1.4	6.1±1.7	0.1±0.1
t=30	8.5±11.7	1.5±2.6	10.3±7.0

Se observa en la TABLA 9 que, tanto en la concentración baja como alta, los efectos citotóxicos presentados aumentan respecto al tiempo de crecimiento bacteriano, siendo el efecto más alto de 10.3% en la concentración de 9.9 mg/mL en el tiempo 30 de crecimiento bacteriano. La concentración media (6.6 mg/mL) a pesar de presentar citotoxicidades en todos los tiempos de crecimiento bacteriano, no existe alguna tendencia. En este caso, la concentración no es un factor significativo en el efecto citotóxico presentado (P=0.4) ni tampoco resulta significativo el tiempo de crecimiento en el que se encuentre *L. casei* (P=0.08). En la GRÁFICA 5 se pueden observar estos resultados.



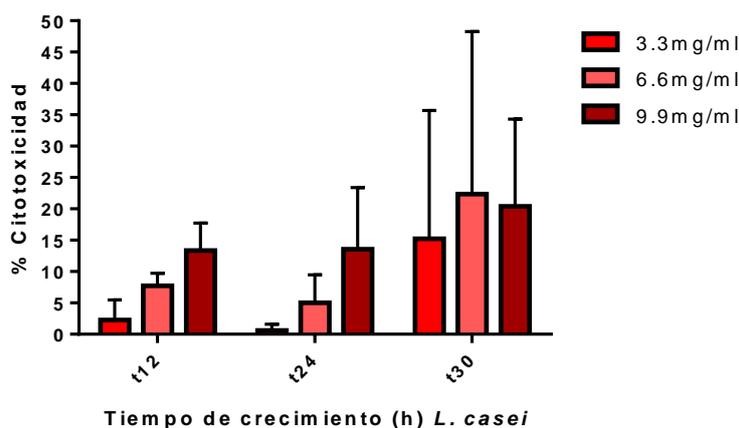
Gráfica 5. Citotoxicidad *L. casei* vs. HCT-15 a las 24 horas de tratamiento. Los datos ilustran promedio \pm EEM. Ningún factor afecta al efecto citotóxico. ($P>0.05$).

Al aplicar el tratamiento por 48 horas con *L. casei*, se presentan efectos citotóxicos en las tres concentraciones de prueba en los tres tiempos de crecimiento del lactobacilo. Tanto el efecto citotóxico más bajo, casi nulo, (0.6%) como la citotoxicidad más alta (22.8%) de este tratamiento se presentan en la concentración baja. En la concentración media, aparentemente no hay alguna tendencia que dependa de la concentración probada o el tiempo de crecimiento de la bacteria. En este caso, el efecto citotóxico más bajo fue del 5.0% y el más alto, en este caso, del 22.3%. La concentración alta, 9.9 mg/mL, presenta efectos similares entre el tiempo 12 y 24 de crecimiento bacteriano (cerca del 13%), mientras que en el tiempo 30 de crecimiento bacteriano, la citotoxicidad presentada fue del 20.4%. En este caso, la concentración no afecta significativamente al efecto citotóxico presentado ($P=0.3$), así como tampoco se afecta por el tiempo de crecimiento en que se encontrara el lactobacilo ($P=0.1$). Estos resultados se observan en la TABLA 10, así como en la GRÁFICA 6.

Tabla 10. Porcentajes de citotoxicidad con desviación estándar de *L. casei* vs. HCT-15 a las 48 horas de tratamiento.

<i>L. casei</i>			
48 hrs			
	3.3 mg/mL	6.6 mg/mL	9.9 mg/mL
t=12	2.3 \pm 3.2	7.7 \pm 1.9	13.3 \pm 4.3
t=24	0.6 \pm 0.836	5.0 \pm 4.4	13.6 \pm 9.8
t=30	22.8 \pm 22.1	22.3 \pm 25.9	20.4 \pm 13.9

***L. casei* vs. HCT-15. 48 horas de tratamiento**



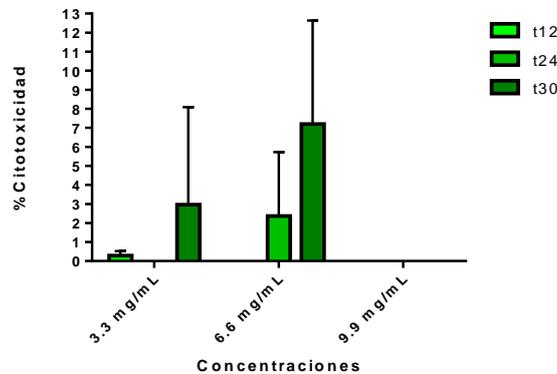
Gráfica 6. Citotoxicidad de *L. casei* vs. HCT-15 a las 48 horas de tratamiento. Los datos ilustran promedio \pm EEM. Ningún factor afecta al efecto citotóxico. ($P > 0.05$).

De igual forma, se evaluó la cepa de *L. helveticus* (ATCC® 15009™) contra HCT-15. A las 24 horas de tratamiento, únicamente no hay efecto citotóxico en la concentración alta (9.9 mg/mL) en ninguno de los tres tiempos de crecimiento del lactobacilo. Sin embargo, existieron efectos en la concentración baja en el tiempo de crecimiento 12 (0.4%) y en el tiempo 30 de crecimiento (4.4%) sin presentar citotoxicidad en el tiempo 30 de su crecimiento. En la concentración media (6.6 mg/mL) no se presentó efecto en el tiempo 12 del crecimiento de la cepa. En los tiempos 24 y 30 sí se presenta citotoxicidad con el 2.4% y el 7.2% respectivamente. En este tratamiento la concentración resulta significativa para que se presente el efecto citotóxico con un valor de $P = 0.01$ ($P < 0.05$), así como también resulta significativo el tiempo de crecimiento en que se encuentre la cepa de *L. helveticus*, $P = 0.01$ ($P < 0.05$). Estos resultados se observan en la TABLA 11, así como en las GRÁFICAS 7a y 7b.

Tabla 11. Porcentajes de citotoxicidad con desviación estándar de *L. helveticus* vs. HCT-15 a las 24 horas de tratamiento.

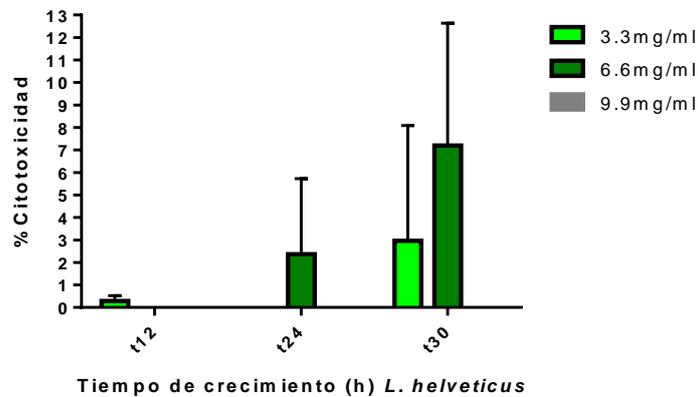
<i>L. helveticus</i>		
24 hrs		
	3.3 mg/mL	6.6 mg/mL
t=12	0.4 \pm 0.0	0
t=24	0	2.4 \pm 3.3
t=30	4.4 \pm 6.2	7.2 \pm 5.4

***L. helveticus* vs. HCT-15. 24 horas de tratamiento**
Factor concentraciones



Gráfica 7a. Citotoxicidad de *L. helveticus* vs. HCT-15 a las 24 horas de tratamiento. Los datos ilustran promedio \pm EEM y como factor que afecta al efecto citotóxico las concentraciones. $P=0.0152$ ($P<0.05$)

***L. helveticus* vs. HCT-15. 24 horas de tratamiento**
Factor crecimiento bacteriano



Gráfica 7b. Citotoxicidad de *L. helveticus* vs. HCT-15 a las 24 horas de tratamiento. Los datos ilustran promedio \pm EEM y como factor que afecta al efecto citotóxico el tiempo de crecimiento bacteriano. $P=0.008$ ($P<0.05$)

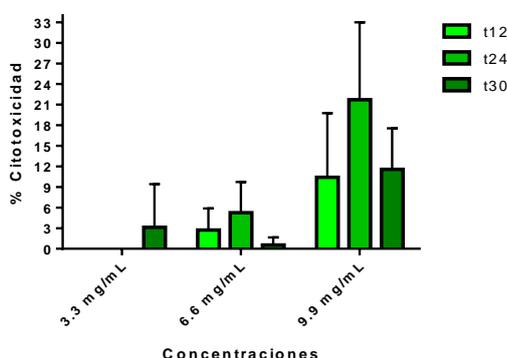
También se evaluó el efecto citotóxico que pudiera ejercer *L. helveticus* contra HCT-15 a las 48 horas de tratamiento. En la concentración baja, únicamente se presenta efecto citotóxico cuando el lactobacilo se encuentra en su tiempo 30 de crecimiento, siendo este del 3.1%. En el caso de la concentración media (6.6 mg/mL) las muestras de los tres tiempos de crecimiento bacteriano tuvieron efecto citotóxico, presentándose el menor (0.6%) en el tiempo 30 y el mayor efecto (5.3%) se presenta a sus 24 horas de crecimiento. En la

concentración de 9.9 mg/mL, las tres muestras de los tres tiempos de crecimiento probados tuvieron efecto. La mayor citotoxicidad (21.7%) es en el tiempo 24, mientras que el menor efecto (10.4%) fue a las 12 horas. La concentración es un factor que afecta significativamente a la citotoxicidad presentada en este caso ($P=0.02$). No es significativo el tiempo de crecimiento en que se encuentre el lactobacilo en cuestión ($P=0.1$). Estos resultados se presentan en la TABLA 12 y en la GRÁFICA 8.

Tabla 12. Porcentajes de citotoxicidad con desviación estándar de *L. helveticus* vs. HCT-15 a las 48 horas de tratamiento.

<i>L. helveticus</i>			
48 hrs			
	3.3 mg/mL	6.6 mg/mL	9.9 mg/mL
t=12	0	2.7±2.7	10.4±9.3
t=24	0	5.3±3.8	21.7±11.2
t=30	3.1±6.2	0.6±0.9	11.6±5.9

L. helveticus vs. HCT-15. 48 horas de tratamiento
Factor crecimiento bacteriano



Gráfica 8. Citotoxicidad de *L. helveticus* vs. HCT-15 a las 48 horas de tratamiento. Los datos ilustran promedio ± EEM y como factor que afecta al efecto citotóxico las concentraciones. $P=0.023$ ($P<0.05$).

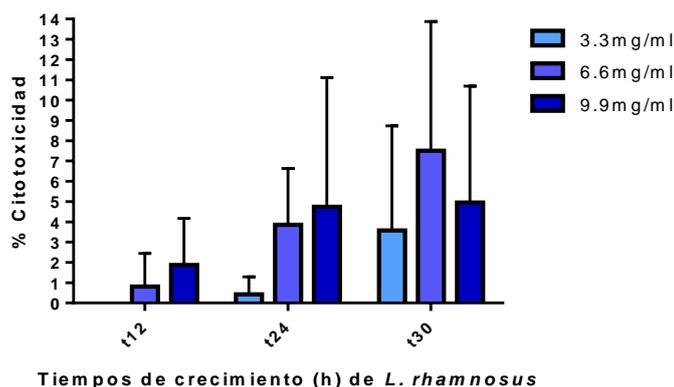
En el tratamiento de 24 horas de *L. rhamnosus* contra HCT-15, las tres concentraciones probadas tuvieron efecto citotóxico sobre esta línea celular. En la concentración baja, el único efecto presentado es en la muestra del tiempo 30 de crecimiento bacteriano con un 3.6%. La concentración de 6.6 mg/mL presenta efecto citotóxico en los 3 tiempos de crecimiento probados, t12 (0.8%), t24 (3.9%) y t30 (7.5%). La concentración alta también ejerce citotoxicidad sobre esta línea celular en las 3 muestras probadas, un efecto del 1.9% en el tiempo 12 de crecimiento de este lactobacilo, mientras que, en los tiempos de crecimiento de 24 y 30 horas, se presentaron efectos similares cercanos al 4%. En este caso, la concentración no resulta significativa sobre la

citotoxicidad presentada, $P=0.2$ ($P>0.05$), mientras que, en la muestra, el tiempo de crecimiento en que se encontrara este lactobacilo, sí es significativo, $P= 0.04$ ($P<0.05$). Estos resultados se observan en la TABLA 13 y en la GRÁFICA 9.

Tabla 13. Porcentajes de citotoxicidad con desviación estándar de *L. rhamnosus* vs. HCT-15 a las 24 horas de tratamiento.

<i>L. rhamnosus</i>			
24 hrs			
	3.3 mg/mL	6.6 mg/mL	9.9 mg/mL
t=12	0	0.8±1.6	1.9±2.3
t=24	0	3.9±2.7	4.7±6.3
t=30	3.5±5.1	7.5±6.3	4.9±5.7

L. rhamnosus vs. HCT-15. 24 horas de tratamiento
(Factor crecimiento bacteriano)



Gráfica 9. Citotoxicidad de *L. rhamnosus* vs. HCT-15 a las 24 horas de tratamiento. Los datos ilustran promedio \pm EEM y como factor que afecta al efecto citotóxico el tiempo de crecimiento bacteriano. $P=0.04$ ($P<0.05$).

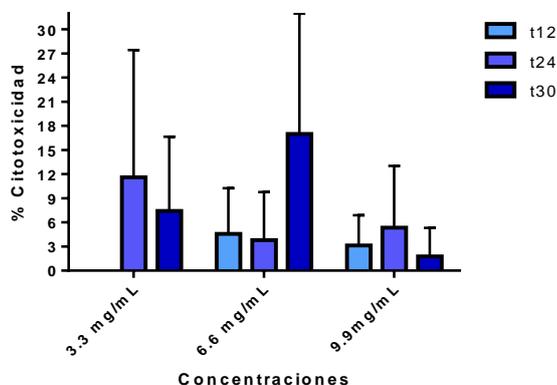
En las 48 horas de tratamiento de *L. rhamnosus* contra HCT-15 las 3 concentraciones probadas presentan efectos citotóxicos. En la concentración más baja, se presentan efectos en la muestra del tiempo 24 de crecimiento de la bacteria (11.6%) y en el 30 del 7.4%. En la concentración de 6.6 mg/mL los 3 tiempos de crecimiento de la cepa presentan citotoxicidades, la más baja se presenta en el tiempo 24 de 3.8% mientras que el efecto más alto es en el tiempo 30 del 17.0%. La concentración alta no presenta efectos en el tiempo 30 de crecimiento bacteriano, mientras que en los tiempos 12 y 24 se presentan efectos del 3.2% y del 5.3%, respectivamente. En este caso se presenta un efecto citotóxico que no depende ni de la concentración ($P=0.4$) ni del tiempo

de crecimiento en el que se encuentre la bacteria (P=0.2). Estos resultados se pueden observar en la TABLA 14 y en la GRÁFICA 10.

Tabla 14. Porcentajes de citotoxicidad con desviación estándar de *L. rhamnosus* vs. HCT-15 a las 48 horas de tratamiento.

<i>L. rhamnosus</i>			
48 hrs			
	3.3mg/mL	6.6mg/mL	9.9mg/mL
t=12	0	4.6±5.6	3.1±3.7
t=24	11.6±15.8	3.8±5.9	5.3±7.6
t=30	7.4±9.2	17.0±14.9	0

L. rhamnosus vs. HCT-15. 48 horas de tratamiento



Gráfica 10. Citotoxicidad de *L. rhamnosus* vs. HCT-15 a las 48 horas de tratamiento. Los datos ilustran promedio ± EEM. Ningún factor afecta al efecto citotóxico. (P>0.05).

5.2.3 La citotoxicidad observada en la línea celular PC-3 es a tiempos de contacto y concentraciones muy específicas

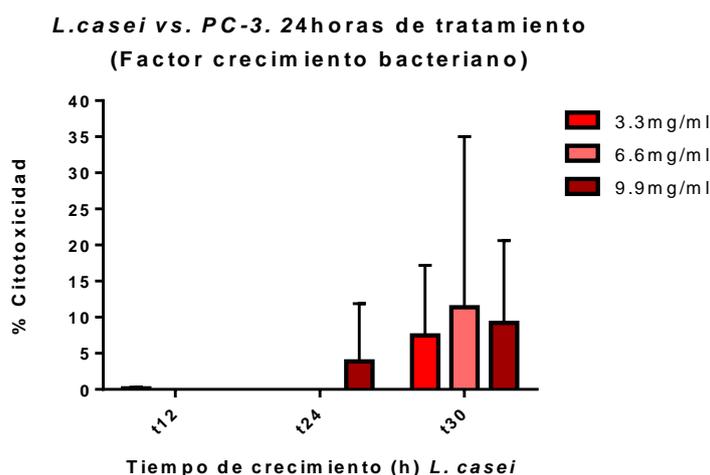
Se probaron las 3 cepas de lactobacilos contra la línea celular de cáncer de próstata metastásico en hueso, PC-3 a las 24 y 48 horas de tratamiento con 3 concentraciones de prueba, 3.3, 6.6 y 9.9 mg/mL.

L. casei R0215 no presentó efectos a las 48 horas de tratamiento. Sin embargo, a las 24 horas de exposición con la línea celular PC-3, se obtuvieron efectos citotóxicos en las tres concentraciones de prueba. En la concentración baja, únicamente se presentó efecto citotóxico del 7.5% en el tiempo 30 de crecimiento bacteriano; mismo caso en la concentración media, de 6.6 mg/mL, únicamente en el tiempo 30 del crecimiento bacteriano se presentó un efecto citotóxico, pero en esta ocasión del 11.4%. Ya en la concentración más alta, 9.9 mg/mL, se presentaron efectos citotóxicos a las 24 horas de crecimiento bacteriano de 3.9% y en el tiempo 30, de 9.2%. En el tiempo 12 de crecimiento bacteriano no se presentaron efectos citotóxicos a ninguna de las

concentraciones de prueba. La concentración en el efecto citotóxico no es significativo ($P=0.5$), sin embargo el tiempo de crecimiento bacteriano parece ser significativo para ejercer un efecto citotóxico contra PC-3 ($P=0.01$). En la TABLA 15 se observan estos valores obtenidos con sus respectivas desviaciones estándar, así como en la GRÁFICA 11.

Tabla 15. Porcentajes de citotoxicidad obtenidas de *L. casei* vs. PC-3 a las 24 horas de tratamiento

<i>L. casei</i>			
24 hrs			
	3.3 mg/mL	6.6 mg/mL	9.9 mg/mL
t=12	0	0	0
t=24	0	0	3.9±7.9
t=30	7.5±9.6	11.4±23.6	9.2±11.4

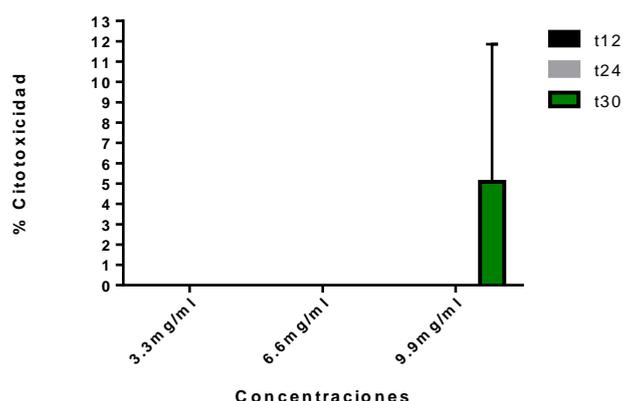


Gráfica 11. Citotoxicidad de *L. casei* vs. PC-3 a las 24 horas de tratamiento. Los datos ilustran promedio \pm EEM y como factor que afecta el efecto citotóxico el tiempo de crecimiento bacteriano. $P=0.005$ ($P<0.05$).

L. helveticus ATCC® 15009™ no presenta efectos citotóxicos a las 48 horas de tratamiento a ningún tiempo de crecimiento bacteriano ni a ninguna de las tres concentraciones probadas.

A las 24 horas de tratamiento, *L. helveticus* ATCC® 15009™ únicamente presenta efecto citotóxico del 5.1% en la concentración más alta, 9.9 mg/mL, cuando proviene de la muestra de 30 h de crecimiento. Ni la concentración ni el tiempo de crecimiento del lactobacilo afectan significativamente al efecto citotóxico ($P=0.4$).

L. helveticus vs. PC-3. 24 horas de tratamiento



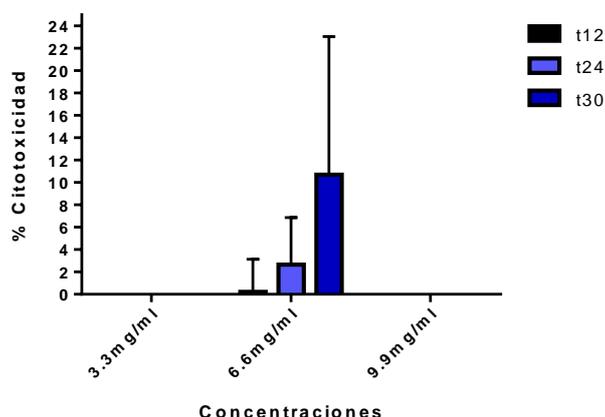
Gráfica 12. Citotoxicidad de *L. helveticus* vs. PC-3 a las 24 horas de tratamiento. Los datos ilustran promedio \pm EEM. Ningún factor afecta al efecto citotóxico. ($P > 0.05$).

L. rhamnosus R0011 150 a las 24 horas de tratamiento contra PC-3 no presenta efectos citotóxicos salvo en la concentración media de 6.6 mg/mL con las muestras tomadas en los tres tiempos de crecimiento, en el tiempo 12 de 0.2%, en el 24 de 2.7 y en el tiempo 30 de su crecimiento de 10.7%. La concentración afecta de forma significativa el efecto citotóxico, $P = 0.02$ ($P < 0.05$), sin embargo, el tiempo de crecimiento bacteriano no es significativo en este caso ($P = 0.15$). Estos resultados se presentan en la TABLA 16 y en la GRÁFICA 13.

Tabla 16. Porcentajes de citotoxicidad obtenidas de *L. rhamnosus* vs. PC-3 a las 24 horas de tratamiento en la concentración media (6.6mg/mL)

<i>L. rhamnosus</i>	
24 hrs	
6.6 mg/mL	
t=12	0.2 \pm 2.9
t=24	2.6 \pm 4.1
t=30	10.7 \pm 12.3

***L. rhamnosus* vs. PC-3. 24 horas de tratamiento
(Factor concentración)**



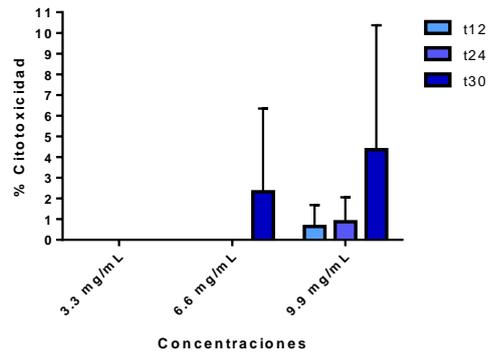
Gráfica 13. Citotoxicidad de *L. rhamnosus* vs. PC-3 a las 24 horas de tratamiento. Los datos ilustran promedio \pm EEM y como factor que afecta al efecto citotóxico, la concentración. $P=0.02$ ($P<0.05$).

A las 48 horas de tratamiento de *L. rhamnosus* sobre la línea celular PC-3, no se presenta efecto citotóxico en la concentración baja (3.3 mg/mL) en ninguno de los tiempos de crecimiento de la cepa que se probaron. En la concentración media, únicamente se presentó efecto citotóxico en el tiempo 30 de crecimiento de la bacteria del 2.323%; los tiempos 12 y 24 de crecimiento no presentaron citotoxicidad. En el caso de la concentración de 9.9 mg/mL, se presentaron efectos bajos en los tiempos de crecimiento bacteriano 12 (0.6%) y 24 (0.9%), y en el caso del tiempo 30, el efecto fue un poco más elevado (4.4%). En este caso ni la concentración ($P=0.1662$) ni el tiempo de crecimiento bacteriano ($P=0.09$) afectan significativamente al efecto citotóxico ($P>0$). Estos resultados se presentan en la TABLA 17 y en la GRÁFICA 14.

Tabla 17. Porcentajes de citotoxicidad obtenidas de *L. rhamnosus* vs. PC-3 a las 48 horas de tratamiento en las concentraciones media y alta.

<i>L. rhamnosus</i>		
48 hrs	6.6 mg/mL	9.9 mg/mL
t=12	0	0.6 \pm 1.0
t=24	0	0.9 \pm 1.1
t=30	2.3 \pm 4.0	4.4 \pm 6.0

L. rhamnosus vs. PC-3. 48 horas de tratamiento



Gráfica 14. Citotoxicidad de *L. rhamnosus* vs. PC-3 a las 48 horas de tratamiento. Los datos ilustran promedio \pm EEM. Ningún factor afecta al efecto citotóxico. ($P > 0.05$).

6. Discusión

A lo largo de este proyecto se pretendía evaluar el efecto citotóxico de tres cepas de lactobacilos diferentes: *Lactobacillus casei* R0215, *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009 y *Lactobacillus rhamnosus* R0011 150 en líneas celulares de cáncer de próstata, PC-3 y dos de cáncer de colon HCT-15 y Caco-2 a tres concentraciones diferentes: 0.66 mg/mL, 3.3 mg/mL y 6.6 mg/mL, a dos tiempos diferentes de tratamiento, 24 y 48 horas.

En una primera etapa, cuyos resultados no se presentan en este trabajo, al realizar las cinéticas de crecimiento bacteriano, tomar muestras a diferentes tiempos y probar su efecto en las cepas en las líneas celulares de estudio se presentaban resultados inconsistentes respecto a su citotoxicidad: no se observaba alguna tendencia que dependiera de la concentración de estudio o del tiempo de crecimiento del lactobacilo de prueba, se obtuvieron en algunos casos, altas desviaciones estándar y el principal problema fue que en los tiempos 0 de los crecimientos de los microorganismos de prueba, se observaban altos efectos citotóxicos en varios casos incluso en cargas bacterianas muy bajas y en la concentración más baja no se observaron efectos citotóxicos o eran muy bajos, esto posiblemente debido al estado metabólico del que venía la cepa del inóculo inicial al usado para la cinética. Igualmente esto pudo haber sido posible porque en los tiempos previos a t12, las cepas no tenían la concentración mínima para ser consideradas como probióticos. Por este motivo, los resultados que aquí se presentan muestran los resultados obtenidos para las tres especies únicamente en su fase de crecimiento donde se presentó mayor concentración bacteriana (t12, t24 y t30) y se observó más consistencia en sus efectos citotóxicos ejercidos, excluyéndose la concentración previa más baja y agregando una concentración más alta. Al final, las concentraciones probadas fueron 3.3 mg/mL (baja), 6.6 mg/mL (media) y 9.9 mg/mL (alta).

En la cinética de crecimiento de los 3 lactobacilos estudiados (FIGURA 5) se observan claramente las fases de una cinética de crecimiento: la fase lag, exponencial o logarítmica, estacionaria y en algunos casos, la fase de muerte. Las cinéticas de crecimiento duraron 30 horas para que las bacterias alcanzaran todas las fases y se pudieran obtener por lo menos, las concentraciones mínimas requeridas para que una bacteria ácido láctica sea considerada probiótico (mayores a 10^6 y hasta 10^{11}) (Kumar, *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos en la etapa preliminar con las muestras obtenidas en los tiempos 0, 4, y 6 horas de crecimiento eran poco consistentes y sin claridad. Esto pudiera ser por la concentración de bacterias (no es la adecuada para considerarse probiótico) o del estado metabólico en el que se encontrara la bacteria al momento de inocularse: la muestra denominada t=0 provenía de un cultivo en fase logarítmica o estacionaria, por lo que metabólicamente era

diferente a muestras tomadas en tiempos correspondientes a la fase logarítmica. A diferencia de las muestras tomadas en t12, t24 y t30 que presentaron resultados más consistentes, por lo que al final se decidió que serían las muestras a estudiar por sus concentraciones alcanzadas y el metabolismo bacteriano en las fases en las que se encontraron.

En la FIGURA 5 de las cinéticas de crecimiento se observa que, en t12, las 3 bacterias ya se encontraban en la fase exponencial y también las 3 ya habían alcanzado una cantidad considerable para poder ejercer un efecto probiótico (TABLA 6) donde *L. casei* tenía una concentración de 1.1×10^9 UFC/mL, *L. helveticus* de 2.4×10^9 y *L. rhamnosus* de 1.9×10^{10} . En t24, las 3 cepas continúan en fase exponencial, *L. helveticus* alcanzó una concentración de 5.0×10^9 y tanto *L. rhamnosus* de 1.10×10^{10} y *L. casei* de 6.0×10^{10} y, en este punto, las 3 bacterias alcanzaron su máximo de crecimiento. Al término de la cinética, t30 y último punto a evaluar en este trabajo, *L. helveticus* parece entrar en su fase estacionaria, alcanzando una concentración de 8.0×10^9 ; sin embargo, tanto *L. casei* como *L. rhamnosus* ya se encuentran en su fase de muerte, donde alcanzaron concentraciones de 5.0×10^9 y 1.1×10^{10} . Sabemos las fases de crecimiento en la que se encuentran los lactobacilos en cada punto de su respectiva cinética observando la FIGURA 5 derecha, donde las UFC nos ilustran únicamente la concentración bacteriana viable, a diferencia de la FIGURA 5 izquierda, que nos presenta la densidad óptica, turbidez que va alcanzando el medio en el que se cultivan las cepas a lo largo de la cinética. Los 3 lactobacilos alcanzan las cantidades para ser considerados probióticos normativamente, obteniendo concentraciones de 10^9 a 10^{10} unidades. Respecto a la velocidad de crecimiento que presentaron los microorganismos, *L. rhamnosus* es, en este caso, el lactobacilo con una mayor velocidad de crecimiento (0.2821 h^{-1}) así como el que alcanza una mayor concentración de los 3 microorganismos. La velocidad de crecimiento de *L. casei* es menor que la de *L. rhamnosus* con 0.1835 h^{-1} y la que obtuvo la menor velocidad de crecimiento de los 3 probióticos es *L. helveticus* con 0.1533 h^{-1} . Esto mismo se puede observar en la FIGURA 5 derecha donde es proporcional su velocidad de crecimiento respecto a la concentración alcanzada de cada cepa.

En este trabajo se utilizaron 2 líneas celulares de cáncer de colon y una de próstata. Estudiamos Caco-2 por ser un adenocarcinoma, el tipo más común de los cánceres en general y de colon, HCT-15 es una línea celular en estadio C de Dukes, en el que la supervivencia del paciente es baja y ya existe invasión en los nódulos linfáticos cercanos. PC-3 nos permite estudiar un cáncer grave ya que es una línea celular metastásica, aunque los resultados obtenidos por cada línea celular no los podemos comparar entre sí, ya que todas las líneas celulares responden diferente a todos los tratamientos.

Caco-2 es una línea celular de un adenoma colorrectal de muy lento crecimiento *in vitro*. Es una línea que tiene la capacidad de formar monocapas

en la placa en la que se cultive. En este caso tiene características similares a las de una célula epitelial y muy similar a la de un enterocito con marcadores de colonocitos, con microvellosidades en su borde, uniones estrechas entre células y tiene una forma de cúpula que es semipermeable y tiene receptores para factores de crecimiento (Grasset, *et al.*, 1984; Sambuy, *et al.*, 2005). Su tumorigenicidad es relativamente lenta, ya que requiere al menos 20 días para formar un tumor palpable y aproximadamente 70-120 días para formar un tumor de 1 cm, su organización tisular es tubular y glandular y presenta infiltración de fibroblastos (Trainer, *et al.*, 1988). Parece ser una línea celular muy sensible a lactobacilos en general, posiblemente por la gran cantidad de enzimas, receptores y marcadores que esta línea celular presenta (Lea, 2015), ya que diversos estudios en la literatura hablan de los diferentes posibles mecanismos que ejercen estos sobre Caco-2 como lo pueden ser la reducción de la proliferación celular, alteraciones en ciertos elementos que participan en el ciclo celular, inducción de apoptosis, así como la acción de compuestos celulares específicos de las BAL que tienen efectos adyuvantes sobre la modulación del sistema inmune así como las vías de regulación de interleucinas y citocinas. De igual forma existen varios estudios que demuestran que los conjugados del ácido linoleico producidos por algunas cepas de lactobacilos, ejercen actividad citotóxica contra Caco-2, por ejemplo, la participación de estos conjugados en el metabolismo de lípidos y la expresión genética, así como por medio de la modulación de marcadores del sistema inmune, (Belury, 2002; Kumar, *et al.*, 2010; Pourmollae, *et al.*, 2020; Ren, *et al.*, 2020).

En este trabajo, únicamente *L. helveticus* (ATCC® 15009™) no presenta efectos citotóxicos contra Caco-2 en ninguno de sus tiempos de tratamiento, independientemente de la concentración o tiempo de crecimiento estudiado. Esto es distinto a un estudio realizado por Elfahri en 2016 con distintas cepas de *L. helveticus* cultivadas en leche y ejercieron un efecto citotóxico contra Caco-2 y otra línea celular de cáncer de colon, HT-29 debido a péptidos con posible actividad proteolítica (Elfahri, *et al.*, 2016). Sin embargo, como he mencionado, son cepas de *L. helveticus* diferentes, además de la forma de cultivo, en este estudio *L. helveticus* fue cultivada en MRS, lo que posiblemente pudiéramos pensar es que el medio de cultivo del lactobacilo en el que se realice el tratamiento (MRS o leche) pudiera ser un factor que afecte directamente el metabolismo bacteriano.

El efecto citotóxico de *L. casei*, sobre Caco-2 demuestra que es importante el tiempo de tratamiento al que se exponga el lactobacilo sobre la línea celular, ya que al exhibir a las 24 horas un único efecto en la concentración más alta y a sus 30 horas de crecimiento (carga bacteriana de 10^9), la citotoxicidad aumentó a las 48 horas de tratamiento (gráfica 3). En este caso la concentración resulta significativa ($P < 0.05$), ya que, aunque existan efectos tanto en la concentración

media como en la alta y en los 3 tiempos de crecimiento de la bacteria estudiados, en el caso de la concentración de 9.9 mg/mL, el efecto es mayor. Para este caso, su tiempo de crecimiento no resulta significativo por lo que mientras se utilicen estas concentraciones y el lactobacilo tenga una carga bacteriana entre 10^9 y 10^{10} , como las que tenía *L. casei* en este trabajo, se podría presentar efecto. Se ha encontrado que *L. casei* es capaz de sintetizar ácido linoleico conjugado, un ácido graso derivado del ácido linoleico y que presenta diferente isomería a este y que tiene diferentes beneficios a la salud por sus propiedades antidiabéticas, antiinflamatorias, y anticarcinogénicas (Maggiora, *et al.*, 2004; Kumar, *et al.*, 2010); y que de acuerdo con Ewaschuk. *et al.*, es capaz de inducir apoptosis y de reducir la viabilidad de líneas celulares de cáncer de colon Caco-2 (Ewaschuk, *et al.*, 2006), así como de inhibir su crecimiento celular (Lampen, *et al.*, 2005) en un efecto dosis-dependiente. Dallal en 2015 describió que lisados de la cepa *L. casei* ATCC 39392 en contacto con Caco-2 son capaces de disminuir proliferación celular, migración y capacidad invasiva, así como aumentar la apoptosis celular (Dallal, *et al.*, 2015). Además, una característica importante de cepas de *L. casei* es que en Caco-2 posee alta adherencia, y la adherencia es un requisito primordial en un probiótico (Tuomola y Salminen, 1998; Saxami, *et al.*, 2012).

El efecto citotóxico de *L. rhamnosus* sobre Caco-2 igual exhibe la importancia del tiempo de contacto de un tratamiento con la línea celular, ya que, a las 24 horas de tratamiento, no ejerce efectos citotóxicos en ninguna de las concentraciones utilizadas en ninguno de sus tiempos de crecimiento estudiados. Sin embargo, a las 48 horas de tratamiento, se observan efectos en las 3 concentraciones diferentes, siendo un factor significativo ($P < 0.05$) (GRÁFICA 4a) y haciendo que este sea mayor en su concentración más alta (9.9 mg/mL). En este caso también resulta significativo ($P < 0.05$) el tiempo de crecimiento en el que se encontrara la cepa, ya que en las 3 concentraciones, su efecto fue mayor en su tiempo 30 de crecimiento (GRÁFICA 4b), punto donde *L. rhamnosus* presentaba una carga de 1.10×10^{10} . En este estudio *L. rhamnosus* siempre presentó una carga bacteriana de 10^{10} en sus 3 tiempos de crecimiento (TABLA 6), mucho mayor que la descrita en la literatura, por lo que haber observado efectos citotóxicos es consistente con lo informado en otros estudios. En la TABLA 8 es clara la tendencia que existe de aumento en el porcentaje de citotoxicidad conforme aumentamos la concentración de una misma muestra (tiempo de crecimiento), así como el aumento de efecto que existe entre las mismas concentraciones conforme va aumentando el tiempo de crecimiento de la bacteria. Distintas cepas de *L. rhamnosus* de igual forma presentan efectos citotóxicos, y de acuerdo a Altonsy (2010), este lactobacilo es capaz de aumentar la apoptosis a una concentración de 10^8 UFC/mL contra Caco-2. De igual forma, en un estudio realizado en 2016 se demostró que una cepa viable de *L. rhamnosus* es capaz de inducir apoptosis, inhibir la proliferación de Caco-2 y arrestar el ciclo celular, y este efecto se ve

potencializado en combinación del lactobacilo con vitamina K (Orlando, *et al.*, 2016), sin embargo, lo interesante de esto, es que tanto en este artículo mencionado como en este trabajo realizado, el efecto es de forma dosis-dependiente, por lo que, posiblemente, este tipo de efecto sea en general, de la especie *L. rhamnosus* sobre esta línea celular. *L. rhamnosus*, viva o desactivada por UV, es capaz de disminuir la producción de IL-8, una citocina proinflamatoria y capaz de estimular la angiogénesis en un proceso carcinogénico (Lopez, *et al.*, 2008), o también por medio de la modulación del sistema inmune, se ha observado que esta especie ejerce efectos citotóxicos contra esta línea celular (Banna, *et al.*, 2017). En un estudio apenas realizado en 2019, demostró que *L. rhamnosus* posee diferentes compuestos de alto y bajo peso molecular, como ácidos carboxílicos, éteres, amidas y ésteres, responsables de su efecto citotóxico y genotóxico contra la línea celular Caco-2 (Sharma, *et al.*, 2019).

HCT-15 es una línea celular de cáncer de colon que tiene la capacidad de formar una monocapa *in vitro*, presenta proteínas de adhesión, microvellosidades, posee uniones estrechas entre células, su organización tisular es tubular y glandular y presenta infiltración de fibroblastos (Trainer, *et al.*, 1988).

En el caso de HCT-15, *L. casei* presenta efecto citotóxico a las 24 y 48 horas (GRÁFICAS 5 y 6) de tratamiento. Aunque en ninguno de los 2 tratamientos ninguna muestra y ninguna de las concentraciones probadas resultan significativas para los efectos presentados, a las 48 horas de tratamiento se duplica el mayor efecto presentado a las 24 horas de tratamiento, por lo que los efectos en este tiempo son mayores, e independientemente de la concentración utilizada, los mayores efectos se presentan en la muestra del tiempo 30 de crecimiento, donde el lactobacilo tiene una carga bacteriana de 5×10^9 UFC/mL, y en este caso, es ligeramente mayor en la concentración media, de 6.6 mg/mL (22.394%) aunque no hay mucha diferencia con el efecto presentado en la concentración alta (20.394%).

Algo que se observa en las muestras de t12 y t24 es que su efecto va incrementando conforme aumentamos la concentración. Sin embargo, en t30 los efectos son más elevados que t12 y t24, sin embargo, su efecto es muy similar entre sí, oscilando entre el 20 y 22%, por lo que, si quisiéramos utilizar esta cepa sobre HCT-15, debemos tener la carga de t30 (5×10^9 UFC/mL) utilizando la concentración media. Existen diferentes estudios de diferentes cepas de *L. casei* ejerciendo un efecto citotóxico contra líneas celulares de cáncer de colon. Algo que se ha observado *in vitro*, es que a mayor tiempo de contacto entre las células cancerosas y *L. casei*, va aumentando la inhibición de las líneas cancerosas (Tiptiri, *et al.*, 2016), algo similar que ocurre en este trabajo, el efecto aumentó de las 24 a las 48 horas. *L. casei* tiene la capacidad de adherirse a las células cáncer de colon de forma dependiente de la

concentración y del tiempo (Tiptiri, *et al.*, 2016). En este trabajo observamos que el tiempo de contacto es importante, la carga bacteriana de igual forma es importante, sin embargo, la concentración no lo es, mientras se cumpla con la carga bacteriana. Diversos autores le confieren esta actividad citotóxica de *L. casei* a su peptidoglicano (Fichera y Giese, 1994), a su exopolisacárido por sus propiedades fisicoquímicas o a extractos intracelulares para células de cáncer de colon (Liu, *et al.*, 2011), o alguna citocina capaz de regular la respuesta inmune (Aindelis, *et al.*, 2020; Choreño, *et al.*, 2020), así como afectar el ciclo celular.

Los resultados de *L. helveticus* son interesantes. A las 24 horas de tratamiento únicamente se observan efectos en la concentración baja y media, además esto siendo de forma significativa, ya que este efecto es evidentemente mayor en la concentración media entre las muestras probadas (GRÁFICA 7a). En ambos casos, los efectos fueron mayores en la muestra de t30 de crecimiento, donde *L. helveticus* se encontraba en su fase estacionaria de crecimiento y presentaba una carga bacteriana de 8×10^9 , esto hace que también la fase de crecimiento en que se encuentre esta cepa es significativo (GRÁFICA 7b), de forma dependiente de la concentración, es decir, la muestra de t30 presentó un efecto en la concentración baja, pero a concentración media, esta misma muestra tuvo un efecto mayor (TABLA 11).

Esta cepa, en este caso, también es una evidencia de la importancia del tiempo de contacto del tratamiento con las líneas celulares, ya que esta significancia del momento de crecimiento únicamente se observó a las 24 horas de tratamiento, aunque a las 48 horas de tratamiento igual se encontraron efectos citotóxicos. En el caso de las 48 horas de tratamiento, los efectos presentados son mucho mayores que a las 24 horas. Como mencioné previamente, en este tratamiento, ya no resulta significativo el tiempo de crecimiento bacteriano, porque no se observa un patrón entre las pruebas y las muestras, sin embargo, las concentraciones utilizadas, aquí permanecen siendo significativas (GRÁFICA 8). Se observa en la TABLA 12 cómo conforme aumentamos las concentraciones utilizadas, los efectos son mayores en todas las muestras. Los mayores efectos presentados son en la concentración más alta, y mientras que, en esta misma concentración, los efectos de t 12 y t 30 son muy similares, el efecto presentado en t24 de *L. helveticus* es mayor, por casi el doble. En t 24, *L. helveticus* tiene una carga bacteriana de 5.0×10^9 y en su último punto de la fase exponencial de su fase de crecimiento. El hecho que en este tratamiento de 48 horas el tiempo de crecimiento bacteriano no sea significativo y a las 24 horas sí, nos podría estar hablando de que una sustancia lábil sea la posible responsable del efecto citotóxico (Nepelska, *et al.*, 2017) y que para que pueda ejercer su efecto a las 48 horas de tratamiento ya se requiera una mayor concentración de este. Respecto a esto último, autores como Hati y Elfahri, ambos en 2016, le confieren la citotoxicidad y actividad anticancerígena de *L.*

helveticus a distintas moléculas de carácter proteico y antioxidante como enzimas β -glucosidasas endógenas (forman isoflavonas, capaces de protegernos contra distintos tipos de cáncer (Hati, *et al.*, 2016) o enzimas proteolíticas como la caspasa y otros componentes bioactivos dependientes del tiempo de fermentación, además de la cepa de *L. helveticus* que se utilice, cambios de pH, y concentración (Elfahri, *et al.*, 2016).

L. rhamnosus contra HCT-15 presentó efectos a las 24 y 48 horas de tratamiento. En el primer caso, 24 horas de tratamiento, resulta significativo el tiempo de crecimiento bacteriano, ya que como se puede observar en la GRÁFICA 9, los mayores efectos presentados comparados con las concentraciones de prueba fueron mayores en la muestra del tiempo 30 de crecimiento, donde la cepa, ya se encontraba en concentraciones de 10^{10} . También se observa cómo el efecto aumenta conforme aumenta el tiempo de crecimiento bacteriano, es decir, las pruebas de t24 son mayores respecto a las muestras de t 12 pero menores respecto a las de t30. En esta gráfica también es posible observar que el efecto citotóxico más alto se presenta en la muestra de t30 en la concentración media, con un 7.5% de citotoxicidad.

A las 48 horas, *L. rhamnosus* presenta mayor citotoxicidad que a las 24 horas de tratamiento, aunque en este caso ningún factor es significativo para el efecto citotóxico. No se aprecia alguna tendencia respecto a concentraciones o tiempo de crecimiento bacteriano, no obstante, en la TABLA 14 se puede observar claramente que, en la concentración alta, se ejercen los menores efectos de este tratamiento y es claro que la muestra de t30 con la concentración media tiene el efecto citotóxico más alto de todos con el 17% de citotoxicidad. Existe relación entre ambos tiempos de tratamiento, ya que en ambos podemos observar que en la muestra de t30 de crecimiento del lactobacilo en la concentración media, 6.6mg/mL se presenta el mayor efecto de todos. Aquí, la cepa presentaba una carga bacteriana de 1.10×10^{10} . Aquí también sucede lo mismo que *L. helveticus* en esta misma línea celular, mientras que el tiempo bacteriano es significativo a las 24 horas de tratamiento, a las 48 horas este deja de ser significativo, por lo que de igual forma, podría hablarnos de un compuesto bioactivo lábil (Nepelska, 2017) y de posible carácter proteolítico (Hati, *et al.*, 2016), (Kumari y Vij, 2015; Marazza, 2009) o inmune, ya que *L. rhamnosus* es capaz de estimular el sistema inmune contra líneas celulares de cáncer de colon (Hu, *et al.*, 2015).

PC-3 es una línea celular de cáncer de próstata metastásico de hueso y es altamente maligno (Voelkel, *et al.*, 2018). Esta línea celular tiene un crecimiento en monocapa y es capaz de anclarse, tiene alta capacidad migratoria, no responde a andrógenos ni a glucocorticoides, se le han identificado, por lo menos 10 marcadores, es de origen epitelial, posee microvellosidades, forma complejos de unión entre células, tiene cuerpos lipoidales y una de sus

características morfológicas principales es que es un adenocarcinoma pobremente diferenciado (Kaighn, *et al.*, 1979; Tai, *et al.*, 2011).

Al probar la cepa de estudio de *L. casei*, no se observó ningún efecto citotóxico a las 48 horas de tratamiento. Sin embargo, a las 24 horas, existe citotoxicidad de *L. casei* sobre esta línea celular dependiente del tiempo de crecimiento bacteriano de forma significativa. En la GRÁFICA 11 podemos observar que este se presenta en la muestra de las 30 horas de crecimiento en las 3 concentraciones diferentes, sin embargo, aunque entre estas no exista ninguna tendencia, es claro que, a la concentración media, el efecto es mayor. El que se presente citotoxicidad a las 24 horas y sea dependiente del tiempo de crecimiento, podría hablarnos de una sustancia secretada por el microorganismo en ese estado metabólico y además de carácter lábil al funcionar únicamente en un tiempo limitado, como podrían ser alguna con actividad proteolítica (Hati, *et al.*, 2016) o alguna citocina que pudiera estimular el sistema inmune (Horinaka, *et al.*, 2010; Choreño, *et al.*, 2020).

En el caso de *L. helveticus* contra PC-3, lo que sucede es similar a lo presentado en *L. casei*. A las 48 horas de tratamiento, *L. helveticus* no ejerce efectos citotóxicos en ninguna muestra en las concentraciones probadas. A las 24 horas de tratamiento se observa un efecto pareciera específico, al presentarse únicamente en la muestra de t30 en la concentración más alta, sin embargo, este es apenas del 6%. De igual forma, parece que la sustancia o molécula responsable de este efecto, pudiera ser lábil, al presentarse en un tiempo limitado. Se sabe que distintos probióticos, entre ellos *L. helveticus*, son capaces de generar péptidos bioactivos, así como diferentes proteinasas asociadas a pared celular o peptidasas intracelulares, así como también sintetizar compuestos bioactivos con una variedad de efectos, entre ellos, contra el cáncer de próstata (Mamo, 2016). En este caso se podrían probar diferentes fracciones de esta cepa a este tiempo de crecimiento y a esta concentración para encontrar específicamente

El caso de *L. rhamnosus* contra esta línea celular resulta diferente a los 2 casos anteriores. A las 24 horas de tratamiento únicamente se presentaron efectos citotóxicos en la concentración media, 6.6 mg/mL (GRÁFICA 13), de igual forma se puede observar en los valores de la tabla 15, una tendencia en los resultados, ya que, en esa concentración, el efecto se incrementa conforme avanza el tiempo de crecimiento de la bacteria, presentando el mayor efecto en la muestra de t30 con poco más del 10%. En este tratamiento, la concentración afecta de forma significativa al efecto citotóxico ($P < 0.05$). Sin embargo, al aplicar el tratamiento a las 48 horas, sigue sin presentarse un efecto en la concentración más baja. En el caso de la concentración media, ya únicamente se presenta un efecto en la muestra de t30 y el poco efecto que existía en las muestras de t12 y t24 a las 24 horas, ya es cero. En la concentración más alta, las 3 muestras presentaron efectos, muy bajos, el de la muestra del tiempo 30

siguió siendo el más elevado, pero con apenas el 4% de citotoxicidad. Ningún factor resulta significativo en este tratamiento y son resultados poco significativos los efectos observados en este punto. El máximo efecto observado a las 48 horas es en la concentración más alta del 4%, sin embargo, el resultado del tratamiento a las 24 horas es más del doble y resultaría más conveniente probarlo a futuro, además de que en este caso se presentó en la concentración media.

L. rhamnosus posee actividad contra la línea celular PC-3 como lo observó Celebioglu en un estudio reciente (Celebioglu, *et al.*, 2020). Al igual que *L. helveticus*, *L. rhamnosus* también es de las especies de probióticos capaces de sintetizar compuestos bioactivos con actividad contra el cáncer de próstata, así como de dipeptidasas intracelulares (Mamo, 2016) con actividad antioxidante y antiproliferativa (Suhargo, *et al.*, 2019). También es capaz de inhibir ciertos marcadores de cáncer de próstata evitando la tumorigénesis, migración celular, invasión y metástasis a través de ciertos genes (Boominathan, 2017).

El observar que el tiempo de tratamiento (24 o 48 horas) es importante para que se presente un mayor o menor efecto y que el tiempo de crecimiento bacteriano deje de ser significativo a las 48 horas en varios de los casos como *L. helveticus* y *L. rhamnosus* en HCT-15 o *L. casei* y, nuevamente *L. helveticus*, en PC-3 aquí presentados, nos hace pensar en que posiblemente las sustancias o agentes responsables del efecto citotóxico, son lábiles perdiendo su efecto a las 48 horas, esto corresponde a lo presentado en el estudio de Nepelska en 2017 donde sugiere una naturaleza termolábil de moléculas bioactivas susceptibles a desnaturalización, hidrólisis o evaporación (Nepelska, *et al.*, 2017). Es importante para estos casos, recordar que los probióticos, como es el caso de *L. helveticus* son capaces de producir bacteriocinas, sustancias que igual resultan lábiles y que poseen actividad antimicrobiana y antiinflamatoria (González, *et al.*, 2003; Pourmollae, *et al.*, 2020) por lo que también resultaría un buen blanco como estudio de sustancia responsable de un efecto citotóxico en estos casos.

Es importante recordar que los efectos citotóxicos que un lactobacilo puede presentar contra una línea celular dependen del tipo de línea celular de estudio, la cepa de lactobacilo de estudio así como la dosis o concentración que se administre, por lo que intentar extrapolar los resultados de una línea celular a otra (aunque sea del mismo tipo de cáncer) o entre cepas, no es correcto y no nos daría resultados similares o confiables, por lo que cada caso hay que tratarlo de una forma diferente y estudiarlo de manera independiente.

Los lactobacilos son de naturaleza variable. Posiblemente esto pueda dar una pequeña explicación a la variabilidad de resultados que existen entre los mismos tratamientos y entre estudios de la literatura, e incluso en este trabajo. Podemos observar que bacterias de la misma especie tienen distintos

resultados en cada línea celular estudiada, donde obtenemos efectos citotóxicos, por ejemplo *L. helveticus* no causa efectos en Caco-2, pero sí en HCT-15 esto nos dice que los beneficios para la salud que nos pudiera conferir un probiótico en específico, no se puede extrapolar a otro tipo de línea celular (Bibas, *et al.*, 2007), aunque sean del mismo tipo de cáncer.

Las diferentes líneas celulares de un mismo tipo de cáncer son diferentes respecto a morfología, ultraestructura, su expresión de antígenos asociados a tumor, capacidad de proliferación, crecimiento y anclaje *in vitro*, su expresión de oncogenes, así como su potencial maligno y tumorigénico. Por lo anterior, es importante recordar que el efecto de cada lactobacilo será distinto dependiendo su cepa y de la línea celular sobre la que se quiera observar dicho efecto, es por eso que, en cada línea celular y cepa de este trabajo, los efectos en algunos casos dependan de la concentración, así como del tiempo de crecimiento en el que se hayan encontrado. De t0 a t30 el metabolismo de cada bacteria va modificándose para su supervivencia, y el hecho que existan efectos a lo largo de su crecimiento y a distintas concentraciones, nos habla de que los agentes responsables de su citotoxicidad contra estas líneas celulares son distintos, entre bacteria como contra la línea celular.

De acuerdo con estos resultados observados y otros estudios encontrados en diversos artículos, es importante para el efecto citotóxico la cepa de estudio, la fase metabólica en la que se encuentre la bacteria, la concentración y el tiempo de tratamiento (Guiomar, *et al.*, 2020). Con los resultados obtenidos en este trabajo, se puede decir que, aunque las tres cepas de lactobacilos ejercen efectos citotóxicos contra las tres líneas celulares, existe una bacteria "ideal" contra cada tipo de línea celular donde resulta significativo tanto la concentración probada como el tiempo de crecimiento en el que se encuentre la bacteria a probar. Para Caco-2, *L. rhamnosus* R0011 150 es la más efectiva, ya que tanto la fase de crecimiento en la que se encuentre, así como la concentración utilizada (9.9 mg/mL) son factores significativos sobre su citotoxicidad con el tratamiento de 48 horas. Para HCT-15, *Lactobacillus helveticus* (ATCC® 15009™) es la más efectiva, ya que tanto la fase de crecimiento como la concentración utilizada (6.6 mg/mL) son factores significativos sobre su citotoxicidad a las 24 horas de tratamiento. Sin embargo, a las 48 horas de tratamiento, se obtiene un efecto mayor afectado significativamente por la concentración más alta. Para PC-3, *L. casei* R0215 es la más efectiva a las 24 horas de tratamiento, su efecto más alto es en la concentración media y significativamente el efecto citotóxico se afecta en la muestra de su tiempo de 30 horas de crecimiento. En los tres casos, la muestra de t30 resulta ser la más efectiva en este tipo de estudio.

Es importante el tiempo de contacto que existe (24 ó 48 horas) entre el tratamiento (los lactobacilos) contra las líneas celulares para tener o no efecto citotóxico, el cual, también se afecta por la concentración o el momento

metabólico en que se encuentre la bacteria. En estos casos, existe una bacteria “ideal” contra cada tipo de línea celular donde resulta significativo tanto la concentración probada como el tiempo de crecimiento en el que se encuentre la bacteria a probar.

El uso de probióticos podría ser una buena opción como complemento a terapias contra el cáncer por sus múltiples beneficios, la ventaja que pueden actuar de manera local o a distancia, bajo costo, por su facilidad de obtención y manejo. Sin embargo, es necesario realizar estudios posteriores, principalmente moleculares, para obtener resultados más concisos y puntuales que nos ayuden a precisar estos beneficios o posibles efectos secundarios que nos aportan los probióticos para poder hacer un uso óptimo de éstos de manera cotidiana así como terapia complementaria, buscando, estudiando y analizando el o los posibles agentes bioactivos, así como su mecanismo de acción.

7. RESUMEN DE RESULTADOS

- Las 3 cepas de lactobacilos estudiadas en este trabajo tienen actividad citotóxica.
- En general, el tiempo de 30 horas en una cinética del crecimiento bacteriano de estos lactobacilos estudiados, es la que posee mayor actividad citotóxica contra estas líneas celulares.
- Es importante el tiempo de contacto que existe (24 ó 48 horas) entre el tratamiento (los lactobacilos) contra las líneas celulares para tener o no efecto citotóxico, el cual, también se ve afectado por la concentración o el momento metabólico en que se encuentre la bacteria.
- En estos casos, existe una bacteria “ideal” contra cada tipo de línea celular donde resulta significativo tanto la concentración probada como el tiempo de crecimiento en el que se encuentre la bacteria a probar.
- Para Caco-2, *L. rhamnosus* R0011 150 es la más efectiva, ya que tanto la fase de crecimiento en la que se encuentre (t30) así como la concentración utilizada (9.9mg/mL) son factores significativos sobre su citotoxicidad con el tratamiento de 48 horas.
- Para HCT-15, *Lactobacillus helveticus* (ATCC® 15009™) es la más efectiva, ya que tanto la fase de crecimiento en la que se encuentre (t30) así como la concentración utilizada (6.6mg/mL) son factores significativos sobre su citotoxicidad a las 24 horas de tratamiento, sin embargo, a las 48 horas de tratamiento, se obtiene un efecto mayor afectado significativamente por la concentración más alta.
- Para PC-3, *L. casei* R0215 es la más efectiva a las 24 horas de tratamiento, su efecto más alto es en la concentración media y significativamente el efecto citotóxico se afecta con el tiempo en el que se encuentre de crecimiento (t30).

8. CONCLUSIÓN

En conclusión, las 3 cepas de lactobacilos estudiadas en este trabajo tienen actividad citotóxica para alguna de las tres líneas celulares estudiadas. Las muestras cosechadas a 30 horas de cultivo fueron, en general, las que presentaron mayor actividad citotóxica contra estas líneas celulares.

9. PERSPECTIVAS

Los probióticos son microorganismos que dentro de los múltiples beneficios que confieren a la salud, es la citotoxicidad sobre líneas celulares de distintos tipos de cáncer. Estos efectos dependen de la concentración usada, del tiempo de tratamiento, así como del estado metabólico de la bacteria; además, es una respuesta específica, ya que depende de la cepa de probiótico que estemos utilizando así como de la línea celular de estudio, ya que de esto también depende la respuesta que se presente. Es necesario estudios a futuro para conocer a detalle los compuestos o moléculas bioactivas responsables de este tipo de efecto, así como su mecanismo de acción sobre las líneas celulares.

Aislar de cada lactobacilo de este estudio en su tiempo de crecimiento de 30 horas, diferentes fracciones, para poder estudiar diferentes compuestos proteicos, lipídicos u oligosacáridos, su exopolisacárido, peptidoglicano, así como distintos compuestos y metabolitos sintetizados por cada lactobacilo y su contenido intracelular que pudieran ser los responsables de estos efectos citotóxicos observados por medio de estudios similares y ya de manera más específica, tomando como antecedentes los resultados obtenidos en este trabajo.

Investigar también en la genética y biología molecular microbiana, posibles compuestos bioactivos o genes que pudieran hacer que una misma especie, pero de diferente cepa de lactobacilo tenga efectos benéficos en distintas líneas celulares o que algún mismo compuesto de una misma cepa bacteriana pudiera ejercer un efecto citotóxico en distintas líneas celulares o que diferentes especies de lactobacilos pudieran compartir algún compuesto responsable de su actividad citotóxica.

10. REFERENCIAS

1. Altonsy M., Andrews SC, Yuohy KM. (2010). Differential Induction of Apoptosis in Human Colonic Carcinoma Cells (Caco-2) by *Atopobium*, and Commensal, Probiotic and Enteropathogenic Bacteria: Mediation by the Mitochondrial Pathway. *Int J food Microbiol*; 137:190- 203.
2. Aindelis G, Tiptiri A, Lampri E, Spyridopoulou K, Lamprianidou E, Kotsianidis I, Ypsilantis P, Pappa A, Chliclia K. (2020). Immune Responses Raised in an Experimental Colon Carcinoma Model Following Oral Administration of *Lactobacillus casei*. *Cancers*; 12(368): 1-15.
3. Baffoni L, Gaggia F, Di Gioia D, Biavati B. (2011). Role of Intestinal Microbiota in Colon Cancer Prevention. *Ann Microbiol*; 62: 15-30.
4. Banna G, Torino F, Marietta F, Santagati M, Salemi R, Cannarozzo E, Falzone L, Ferrau F, Libra M. (2017). *Lactobacillus rhamnosus* GG: An Overview to Explore the Rationale of Its Use in Cancer. *Front. Pharmacol*; 8: 1-10.
5. Baricault L, Denariáz G, Hourí JJ, Bouley C, Sapin C, Trugnan G. (1995). Use of HT-29, a Cultured Human Colon Cancer Cell Line, To Study the Effect of Fermented Milks on Colon Cancer Cell Growth and Differentiation. *Carcinogenesis*, 16:245-252
6. Behzadi, E, Hosseini M, Imani A. (2017). The Inhibitory Impact of *Lactobacillus rhamnosus* GG- Derived Extracellular Vesicles on the Growth of Hepatic Cancer Cells. *Microbial Pathogenesis*. 110: 1-6.
7. Belury, MA. (2002). Inhibition of Carcinogenesis by Conjugated Linoleic Acid: Potential Mechanisms of Action. *J Nutr*, 132:2995–2998.
8. Bibas M, Fontenla S, Mesón O, Perdígón, G. (2007). Antitumor Effect of *Lactobacillus casei* CRL 431 on Different Experimental Tumors. *Food Agr. Immunol* ; 16(3): 181-191.
9. Boominathan, L. (2017). Probiotic-Based Therapy for Metastatic Prostate Cancer: *Lactobacillus rhamnosus* Inhibits the Expression of CDC42, CDC42EP3, RAC1 and ARPC5, and GAS6, Suppresses the Expression of Stem Cell Molecules CD44 and EZH2, Promotes Epithelial Phenotype, Suppresses Tumorigenesis, Migration, Invasion, Stem Cell Regeneration and Metastasis Via Upregulation of its Target Gene. Genome-2-BioMedicine Discovery center (GBMD),

- <http://genomediscovery.org>. (Consultado en línea el 5 de marzo de 2020, a las 11:32am)
10. Cancer Research UK. <https://www.cancerresearchuk.org/> (Consultado en línea el 10 de noviembre de 2018, a las 12:46pm).
 11. Carroll K, Morse S, Miller S, Mietzner T. (2016). Microbiología médica. McGraw-Hill Education.
 12. Castañeda, C. (2018). Probióticos, puesta al día. *Revista Cubana de Pediatría*; 90(2): 286-298.
 13. Celebioglu H, Celebi B, Erden Y, Evin E, Adali O. (2020). Cytotoxic Effects of Probiotic Bacteria *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus* Grown in the Presence of Oleuropein on Human Prostate Cancer Cells. *Celal Bayar University J. Sci*; 16(1): 55-59.
 14. Cell Culture Basics Handbook (2016). USA. Gibco/ Invitrogen.
 15. Chandra, P. (2016). Effect of *Lactobacillus* on Biological Properties: Anticancer, Immunomodulatory Properties and Improvement of Bone Health. *J. Microbiol. Biotech. Res*; 6(3): 17-23.
 16. Chang C, Liu C, Lee H, Huang Y, Li L, *et al.*, (2018). *Lactobacillus casei* Variety *rhamnosus* Probiotic Preventively Attenuates 5-Fluoruracil/ Oxaliplatin- Induced Intestinal Injury in a Syngenic Colorectal Cancer Model. *Front. Microbiol.* 9: 1-15.
 17. Choreño-Parra JA, Thirunavukkarasu S, Zúñiga J, Khader SA. (2020). The Protective and Pathogenic Roles of CXCL17 in Human Health and Disease: Potential in Respiratory Medicine. *Cytokine Growth F. R.* 53: 53-62.
 18. Claes I, Schoofs G, Regulski K, Courtin P, Chapot M, Rolain T, Hols P, Ossowski I, Reunanen J, de Vos W, Palva A, Vanderleyden J, Keersmaecker S, Lebeer S. (2012). Genetic and Biochemical Characterization of the Cell Wall Hydrolase Activity of the Major Secreted Protein of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *PlosOne.* 7(2):1-8.
 19. Commane D, Hughes R, Shortt C, Rowland I. (2005). The Potential Mechanisms Involved in the Anti-carcinogenic Action of Probiotics. *Mut. Res- Fund Mol. M.* 591(1-2), 276–289.

20. Cordero, C.C. (2002). Implementación de un método *in vitro* de evaluación preliminar de actividad anticáncer de extractos vegetales empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia.
21. Dallal MMS, Mojarrad M, Baghbani F, Raoofian R, Mardaneh J, Salehipour Z. (2015). Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* on Colorectal Tumor Cells Activity (CaCo-2). *Arch Iran Med*; 18: 167 -72.
22. De Marzo A, Platz E, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake C, Nakai Y, Isaacs W, Nelson W. (2007). Inflammation in Prostate Carcinogenesis. *Nature*; 7: 256-269.
23. De Roos N, & Katan M. (2000). Effects of Probiotic Bacteria on Diarrhoea, Lipid Metabolism, and Carcinogenesis: A Review of Papers Published between 1999 and 1998. *Am. J Clin Nutr.* 71: 405-11.
24. Di W, Zhang L, Yi H, Han X, Zhang Y, Xin L. (2018). Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus* Strains Suppress HT-29 Cell Growth Via Induction of G0/G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Oncol. Lett*; 16: 3577- 3586.
25. Dsouza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. (2002). Probiotics in Prevention of Antibiotic Associated Diarrhoea: Meta analysis. *BMJ*, 324(7350), 1361.
26. Elfahri K, Vasiljevic T, Yeager T, Donkor O. (2016). Anti-colon Cancer and Antioxidant Activities of Bovine Skim Milk Fermented by Selected *Lactobacillus helveticus* Strains. *J.Dairy Sci.* 99:31-40.
27. Esfandiary A, Taherian-Esfahani Z, Abedin-Do A, Mirafakhraie R, Shirzad M, Ghafouri-Fard S, Motevaseli E. (2016). Lactobacilli Modulate Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway in Triple Negative Breast Cancer Cell Line. *Cell J*;18: 237-44.
28. Ewaschuk JB, Walker JW, Diaz H, Madsen KL. (2006). Bioproduction of Conjugated Linoleic Acid by Probiotic Bacteria Occurs *in vitro* and *in vivo* in Mice. *J. Nutr*; 136: 1483-87.
29. Fichera, G. & Giese, G. (1994). Non- Immunologically- Mediated Cytotoxicity of *Lactobacillus casei* and Its Derivate Peptidoglycan Against Tumor Cell Lines. *Cancer lett*, 85: 93-103.

30. Foo NP, Yang HO, Chiu HH, Chan HY, Liao CC, Yu CK, Wang YJ. (2011). Probiotics Prevent the Development of 1, 2-dimethylhydrazine (DMH)-Induced Colonic Tumorigenesis Through Suppressed Colonic Mucosa Cellular Proliferation and Increased Stimulation of Macrophages. *J Agric Food Chem* 59:13337–45.
31. Freshney, R. (2000). Culture of Animal Cell. A Manual of Basic Technique. Quinta edición. John Wiley and Sons Inc. New York; 359.
32. Freshney, R. (2002). Cell Line Provenance. *Cytotechnology*. 39: 55-67.
33. Ghanavati R, Asadollahi P, Bahrololomi M, Razavi S, Talebi M, Rohani M. (2020). Inhibitory Effects of *Lactobacilli* Cocktail on HT-29 Colon Carcinoma Cells Growth and Modulation of the Notch and Wnt/b- catenin Signaling Pathways. *Microbial Pathogenesis*; 139: 1-9.
34. Goldin, B. & Sherwood Gorbach. (1984). Alterations of the Intestinal Microflora by Diet, Oral, Antibiotics, and *Lactobacillus*: Decreased Production of Free Amines From Aromatic Nitro Compounds, Azo Dyes, and Glucuronides. *JNCI*; 73(3): 689-695.
35. Gonet AK, Strus M, Heczko PB. (2007). Influence of Lactobacilli Probiotic Strains on Apoptosis of Colon Cancer Cells Lines. *Int J Antimicrob Agents*; 29 (2 Suppl): S343-S344.
36. González B, GÓMEZ-TREVIÑO, Marivel; JIMÉNEZ-SALAS, Zacarias. Bacteriocinas de probióticos. *RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición*; 4(2): 1-9.
37. Grasset E, Pinto M., Dussaulx E, Zweibaum A, Desjeux JF. (1984). Epithelial Properties of Human Colonic Carcinoma Cell Line Caco-2: Electrical Parameters. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 247(3), C260–C267.
38. Grivennikov S. (2013). Inflammation and Colorectal Cancer: Colitis Associated Neoplasia. *Semin Immunopathol*; 35:229–244.
39. Guiomar P, Potente S, Gouveia M, Días R, Vilela R. (2020). Preclinical Evidence of Probiotics in Colorectal Carcinogenesis: A Systematic Review. *Dig. Dis. Sci*; 1-14.
40. Hati, S, Patel N, Patel K, Prajapati J. (2017). Impact of Whey Protein Concentrate on Proteolytic Lactic Cultures for the Production of

- Isoflavones During Fermentation of Soy Milk. *J Food Process Preserv.* 41: 1-9.
41. He M, Shi B. (2017). Gut Microbiota as a Potential Target of Metabolic Syndrome: The Role of Probiotics and Prebiotics. *Cell Biosci.* 7:54.
 42. Hirayama, K., & Rafter, J. (2000). The Role of Probiotic Bacteria in Cancer Prevention. *Microbes Infect*, 2(6), 681–686.
 43. Horinaka, M, Yoshida T, Kishi, A, Akatani K, Yasuda T, Kouhara J, Wakada M, Sakai T. *Lactobacillus* Strains Induce TRAIL Production and Facilitate Natural Killer Activity Against Cancer Cells. *FEBS Letters.* 584: 577-582.
 44. Hu J, Wang C, Liping Y, Yang W, Huang H, Meng F, Shi S, Ding Z. (2015). Anti-tumor Immune Effect of Oral Administration of *Lactobacillus plantarum* to CT26 Tumor-bearing Mice. *J. Biosci;* 40(2): 269-279.
 45. Hu P, Song W, Shan Y, Du M, Huang M, Song C, Zhang L. (2015). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* M5L Induces Cell Cycle Arrest and Calreticulin Translocation Via the Generation of Reactive Oxygen Species in HT-29 Cell Apoptosis. *Food Function;* 6: 2257-2265.
 46. Ichim T, Kesari S, Shafer K. (2018). Protection From Chemotherapy-and Antibiotic- Mediated Dysbiosis of the Gut Microbiota by a Probiotic With Digestive Enzymes Supplement. *Oncotarget;* 9(56): 30919-30935.
 47. Irecta-Najera C, Huizar M, Casas J, Castro P, Santerre A. (2017). Protective Effect of *Lactobacillus casei* on DMH-Induced Colon Carciogenesis in Mice. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 9:163-171.
 48. Jacouton, E, Chain F, Sokol H, Langella P, Bermúdez L. (2017). Probiotic Strain *Lactobacillus casei* BL23 Prevents Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Front. Immunol,* 8, 1-10.
 49. Kahouli, I, Tomaro C, Prakash S. (2013). Probiotics in Colorectal Cancer (CRC) With Emphasis on Mechanisms of Actions and Current Perspectives. *J. Med. Microbiol,* 62, 1107-1123.
 50. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. (1979). Establishment and Characterization of a Human Prostatic Carcinoma Cell Line (PC-3). *Invest Urol,* 17(1): 16-23.

51. Kandasamy M, Bay BH, Lee YK, Mahendran R. (2011). Lactobacilli Secreting a Tumor Antigen and IL-15 activates Activates Neutrophils and Dendritic Cells and Generates Cytotoxic T Lymphocytes Against Cancer Cells. *Cell Immunol*; 271: 89-96.
52. Kato I, Endo K, Yokokura T. (1994). Effects of Oral Administration of *Lactobacillus casei* on Antitumor Responses Induced by Tumor Resection in Mice. *Int J Immunopharmacol*; 16, 29–36.
53. Kaur S, Kaur S. (2015). Bacteriocins as Potential Anticancer Agents. *Front. Pharmacol.* 6:272.
54. Khani S, Hosseini H, Taheri M, Nourani M, Imani A. (2012). Probiotics as an Alternative Strategy for Prevention and Treatment of Human Diseases: A Review. *Inflamm & Allergy.* 11(2): 79-89.
55. Kim SE, H. Kim J, Kim Y, Kang H, Woo and H. Lee. (2000). Anticancer Activity of Hydrophobic Peptides From Soy Proteins. *Biofactors*; 12:151–155.
56. Kozu TG, Linuma Y, Ohashi Y, Saito T, Akasu D, Saito D, Alexander M, Iigo T, Kakizoe, H. Tsuda. (2009). Effect of Orally Administered Bovine Lactoferrin on The Growth of Adenomatous Colorectal Polyps in a Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Cancer Prev. Res. (Phila)*; 2:975–983.
57. Kumar KS, Sastry N, Polaki H, Mishra, V. (2015). Colon Cancer Prevention Through Probiotics: An Overview. *J Cancer Sci Ther*; 7(2):081–092
58. Kumar M, Kumar A, Nagpal R, Mohania D, Behare P, Verma V, Kumar P, Poddar D, Aggarwal PK, Henry CJK, Jain S, Yadav H. (2010). Cancer-Preventing Attributes of Probiotics: An Update. *Int J Food Sci Nutr*, 61(5):473–496
59. Kumar M, Nagpal R, Verma V, Kumar A, Kaur N, Hemalatha R, Gautam SK, Singh B. (2013). Probiotic Metabolites as Epigenetic Targets in the Prevention of Colon Cancer. *Nutr Rev.* 71(1):23–34.
60. Kumar R. & Suman Dhanda. (2017). Mechanistic Insight of Probiotics Derived Anticancer Pharmaceuticals: A Road Forward for Cancer Therapeutics. *Nutr. Cancer*, 69:3, 375-380.

61. Kumari S, Shilpa Vij. (2015). Growth and Antimicrobial Activity of Proteolytic Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* C6 in Soymilk and Whey. *Indian J. Dairy Sci*; 68(3): 229-238.
62. Lampen A, Leifheit M, Voss J, Nau H. (2005). Molecular and Cellular Effects of Cis-9, Trans-11-Conjugated Linoleic Acid in Enterocytes: Effects on Proliferation, Differentiation, and Gene Expression. *Biochim Biophys Acta*; 1735:30–40.
63. Lea T, et al.,. (2015) Caco-2 Cell Line. In: Verhoeckx K. (eds) *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer, Cham.
64. Leblanc JG, Del Carmen S, Miyoshi A, Azevedo V, Sesma F, Langella P, Bermúdez LG, Watterlot L, Perdigon G, de Moreno, G. (2011). Use of Superoxide Dismutase and Catalase Producing Lactic Acid Bacteria in TNBS Induced Crohn's Disease in Mice. *J Biotechnol* 151:287–93.
65. Lenoir M, Del Carmen S, Cortes-Perez NG, Lozano-Ojalvo D, Muñoz-Provencio D, Chain F, Langella P, de Moreno A, LeBlanc J, Bermúdez LG. (2016). *Lactobacillus casei* BL23 Regulates Treg and T17 T-cell Populations and Reduces DMH-Associated Colorectal Cancer. *J Gastroenterol* 51(9):862–73.
66. Liu CT, Chu FJ, Chou CC, Yu RC. (2011). Antiproliferative and Anticytotoxic Effects of Cell Fractions and Exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01. *Mutat. Res*; 721: 157-162.
67. Lopes F, De Abreu L, Campos M, Font G, Colombo L, Rossi E, Zeppone I. (2012). A Soy-Based Product Fermented by *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus helveticus* Inhibits the Development of Murine Breast Adenocarcinoma. *Food Chem Toxicol*; 50(11): 4144-4148.
68. Lopez M, Li N, Kataria J, Russell M, Neu J. (2008). Live and Ultraviolet-Inactivated *Lactobacillus Rhamnosus* GG Decrease Flagellin- Induced Interleukin-8 Production in Caco-2 Cells. *Journal of Nutrition. J. Nutr. Immunol*: 2264-2268.
69. Maggiora M, Bologna M, Ceru MP, Possati L, Angelucci A, Cimini A, Miglietta A, Bozzo F, Margiotta C, Muzio G, Canuto RA. (2004). An Overview of the Effect of Linoleic and Conjugated-Linoleic Acids on the Growth of Several Human Tumor Cell Lines. *Int J Cancer*; 112: 909–919.

70. Mamo, G. (2016). Anaerobes as Sources of Bioactive Compounds and Health Promoting Tools. In: R. Hatti, G. Mamo and B. Mattiasson. *Anaerobes in Biotechnology*. Switzerland: Springer, p.448.
71. Marazza JA, Garro MS, Savoy de Giori G. (2009). Aglycone Production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 During Soymilk Fermentation. *Food Microbiol*, 26(3), 333–339.
72. Matsumoto S, Hara T, Nagaoka M, Mike A, Mitsuyama K, Sako T, Yamamoto M, Kado S, Takada T. (2009). A Component of Polysaccharide Peptidoglycan Complex on *Lactobacillus* Induced an Improvement of Murine Model of Inflammatory Bowel Disease and Colitis-Associated Cancer. *Immunology* 128:e170–e180
73. Matsuzaki T, Yokokura T, Mutai M. (1988). The Role of Lymph Node Cells in the Inhibition of Metastasis by Subcutaneous Injection of *Lactobacillus casei* in Mice. *Med Microbiol Immunol*; 177: 245-53.
74. Mattar MC, Lough D, Pishvaian MJ, Charabaty A. (2011). Current Management of Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res*; 4:53–61.
75. Mego M, Holec V, Drgona L, Hainova K, Ciernikova S, Zajac V. (2013). Probiotic Bacteria in Cancer Patients Undergoing Chemotherapy and Radiation Therapy. *Complement. Ther. Med*; 21: 712-723.
76. Mishra J, Drummond J, Quazi SH, Karanki SS, Shaw JJ, Chen B, Kumar N. (2013). Prospective of Colon Cancer Treatments and Scope for Combinatorial Approach to Enhanced Cancer Cell Apoptosis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 86(3):232–250.
77. Molska M, Reguła J. (2019). Potential Mechanisms of Probiotics Action in the Prevention and Treatment of Colorectal Cancer. *Nutrients*, 11(10): 2453.
78. Mori K, Yamazaki K, Ishiyama T, Katsumata M, Kobayashi K, Kaawai Y, Inoue N, Shinano H. (1997). Comparative Sequence Analyses of the Genes Coding for 16S RNA of *Lactobacillus casei*-related Taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 47:54-57.
79. Morris J. (2018). Optimise the Microbial Flora With Milk and Yoghurt to Prevent Disease. *Med. Hypotheses*; 114: 13-17.

80. Motevaseli E, Dianatpour A, Ghafouri S. (2017). The Role of Probiotics in Cancer Treatment: Emphasis on Their *In Vivo* and *In Vitro* Anti-Metastatic Effects. *Int J Mol Cell Med Spring*. 6(2): 66-76.
81. Narayanan N, Roychoudhury P, Srivastava A. (2004). Isolation of *adh* Mutant of *Lactobacillus rhamnosus* for Production of L (+) Lactic acid. *Elect. J. Biotec*. 7(1): 72- 84.
82. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos> (Consultado en línea el 4 de septiembre de 2018, a las 11:44am)
83. Nepelska M, de Wouters T, Jacouton E, Béguet F, Lapaque N, Doré J, Arulampalam V, Blottière H. (2017). Commensal Gut Bacteria Modulate Phosphorylation- Dependent PPAR γ Transcriptional Activity in Human Intestinal Epithelial Cells. *Sci. Rep*; 7: 1-13.
84. Oelschlaeger T. (2010). Mechanisms of Probiotic Actions- A Review. *International J. Med, Microbiol*; 300: 57-62.
85. Orlando A, Linsalata M, Russo F. (2016). Antiproliferative Effects on Colon Adenocarcinoma Cells Induced by Co-Administration of Vitamin K1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Int. J. Oncol*; 48: 2629-2638.
86. Picó J, José Manuel Mingot. (2019). Search and Selection of Probiotics That Improve Mucositis Symptoms in Oncologic Patients. A Systematic Review. *Nutrients*; 11: 2322.
87. Porter C, Shrestha E, Peiffer L, Sfanos, K. (2018). The Microbiome in Prostate Inflammation and Prostate Cancer. *Nature*; 21: 345-354.
88. Pourmollae S, Barzegari A, Farshbaf A, Nori M, Fattahi A, Shahnazi M, Dittrich R. (2020). Anticancer Effect of Bacteria on Cervical Cancer: Molecular Aspects and Therapeutic Implications. *Life Sci*; 246: 1-9.
89. Rahman A, Choudhary MI, Thomsen WJ. (2001). Bioassay Techniques for Drug Development. In: Manual of Bioassay Techniques for Natural Products Research, Harwood Academic Publishers, Netherlands; pp. 27.
90. Raman M, Ambalam P, Kondepudi K, Pithva S, Kothari C, Patel A, Purama R, Dave J, Vyas B. (2013). Potential of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics for Management of Colorectal Cancer, *Gut microbes*, 4:3; 181-192.

91. Regulski K, Courtin P, Meyrand M, Claes IJJ, Lebeer S, Vanderleyden J, Hols P, Guillot A, Chapot MP. (2012). Analysis of the Peptidoglycan Hydrolase Complement of *Lactobacillus casei* and Characterization of the Major c-D-Glutamyl-L-Lysyl-Endopeptidase. *PLoS ONE* 7(2): e32301
92. Ren Q, Yang B, Zhi G, Wang S, Fu C, Zhang Ross R, Stanton C, Chen H, Chen W. (2020). Antiproliferation Activity and Mechanism of c9, t11, c15-CLNA and t9, t11, c15-CLNA from *Lactobacillus plantarum* ZS2058 on Colon Cancer Cells. *Molecules*; 25: 1-17.
93. Riaz M, Zhao H, Lu Y, Lian Z, Li N, Hussain N, Shao D, Jin M, Li Q, Shi J. (2018). Anticancer Potential Against Cervix Cancer (HeLa) Cell Line of Probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* Strains Isolated from Human Breast Milk. *Food Func*: 9; 2705-2715.
94. Rochat T, Bermudez-Humaran L, Gratadoux JJ, Fourage C, Hoebler C, Corthier G, Langella P. (2007). Anti-Inflammatory Effects of *Lactobacillus casei* BL23 Producing or not a Manganese-Dependant Catalase on DSS-Induced Colitis in Mice. *Microb Cell Fact* 6:22.
95. Rogers K, Kadner R. (2019). Bacteria. *Encyclopædia Britannica*, Encyclopædia Britannica, inc. <https://www.britannica.com/science/bacteria> (Consultado en línea el 14 de noviembre de 2019, a las 17:17hrs).
96. Roller M, Clune Y, Collins K, Rechkemmer G, Watzl B. (2007). Consumption of Prebiotic Inulin Enriched With Oligofructose in Combination With the Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* Has Minor Effects on Selected Immune Parameters in Polypectomised and Colon Cancer Patients. *Br J Nutr*. 97, 676–684.
97. Rondon L, Añez R, Salvatierra A, Meneses R, Heredia M. (2015). Probióticos: generalidades. *Arch Venez Puer Ped*; 78(4): 123-128.
98. 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. *Iran J Basic Med Sci*; 17: 815-19
99. Sadhu A, Ganguly KK. (2017). *Lactobacillus* sp. –A threat to Pathogenic Microorganisms and Tumor Cells. *J. Cancer Ther*. 8, 96-111.

100. Salvucci, E. (2019). Hacia una nueva biología: Crecimiento microbiano. Consultado el 18 de noviembre, 2019, obtenido de: <https://esalvucci.wordpress.com/crecimiento-microbiano/>
101. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino M, Stammati A, Zucco F. (2005). The Caco-2 Cell Line as a Model of the Intestinal Barrier: Influence of Cell and Culture-Related Factors on Caco-2 Cell Functional Characteristics. *Cell Biol Toxicol*; 21: 1-26.
102. Saxami G, Ypsilantis P, Sidira M, Simopoulus C, Kourkutas Y, Galanis A. (2012). Distinct Adhesion of Probiotic Strain *Lactobacillus casei* ATCC 393 to Rat Intestinal Mucosa. *Anaerobe*, 18: 417-420.
103. Sharma M, Deepika C, Geeta S. (2019): Antigenotoxicity and Cytotoxic Potentials of Metabiotics Extracted from Isolated Probiotic, *Lactobacillus rhamnosus* MD 14 on Caco-2 and HT-29 Human Colon Cancer Cells. *Nutr. Cancer*; 1-11.
104. Sobhani I, Tap J, Roudot-Toraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, Corthier G, Tran J, Furet J. (2011). Microbial Dysbiosis in Colorectal Cancer (CRC) Patients. *PLoS One*; 6:e16393.
105. Stidl R, Sontag G, Koller V, Knasmuller, S. (2008). Binding of Heterocyclic Aromatic Amines by Lactic Acid Bacteria: Results of a Comprehensive Screening Trial. *Mol. Nutr. Res.* 52: 322-329.
106. Sugimura T. (1992). Multistep Carcinogenesis: A 1992 Perspective. *Science* 258: 603-607.
107. Suhargo, L, Wahyuningsih SPA, Supriandono H, Supriyanto A. (2019). The Effect of *Lactobacillus rhamnosus* Protein on Cell Proliferation of Mice Hyperplasia Prostate. *INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGY AND APPLIED SCIENCE (ICOBAS)*.
108. Swee E. (2013). A Potential Role of Probiotics in Colorectal Cancer Prevention: Review of Possible Mechanisms of Action. *World J Microbiol Biotechnol*: 1-24.
109. Tai S, Sun Y, Squires J, Zhang H, Oh W, Liang C, Huang J. (2011). PC3 Is a Cell Line Characteristic of Prostatic Small Cell Carcinoma. *Prostate*; 71: 1668-1679.
110. Tamime AY, Saarela M, Korslund Sondergaard A, Mistry VV, Shah NP. (2005). Production and Maintenance of Viability of Probiotic

Micro-Organisms in Dairy Products. London: Tamime AY: Probiotic Dairy Products, Blackwell Publishing Ltd; pp. 39e72.

111. Taverniti V, Guglielmetti S. (2012). Health-Promoting Properties of *Lactobacillus helveticus*. *Front. Microbiol*, 3: 392.
112. Teitelbaum J, Walker A. (2002). Nutritional Impact of Pre and Probiotics as Protective Gastrointestinal Organism. *Annu. Rev. Nutr.* 22: 107- 138.
113. Tiptiri-Kourpeti A, Spyridopoulou K, Santarmaki V, Aindelis G, Tompoulidou E, Lamprianidou EE, Saxami G, Ypsilantis P, Lampri ES, Simopoulos C, Kotsianidis I, Galanis 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
114. Tlaskalová-Hogenová H, Stepánková R, Kozáková H, Hudcovic T, Vannucci L, Tucková L, Rossmann P, Hrnčir T, Kverka M, Zakostelska Z, Klimesová K, Pribylová J, Bártová J, Sanchez D, Fundová P, Borovská D, Srutková D, Zídek ZM, Schwarzer M, Drastich P, Funda D. (2011). The Role of Gut Microbiota (Commensal Bacteria) and the Mucosal Barrier in the Pathogenesis of Inflammatory and Autoimmune Diseases and Cancer: Contribution of Germ-free and Xenobiotic Animal Models of Human Diseases. *Cell Mol Immunol* 8, 110–120.
115. Trainer D, McCabe F, Faucette L, Field J, Chaikin M, Anzano M, Rieman D, Hoffstein S, Li D. (1988). Biological Characterization and Oncogene Expression in Human Colorectal Carcinoma Cell Lines. *Int. J. Cancer*; 41: 287-296.
116. Tuomola E, Seppo Salminen. (1998). Adhesion of Some Probiotic and Dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 Cell Cultures. *Int. J. Food. Microbiol*; 41: 45-51.
117. Uccello M, Malaguarnera G, Basile F, D'agata V, Malaguarnera M, Bertino G, Vacante M, Drago F, Biondi A. (2012). Potential Role of Probiotics on Colorectal Cancer Prevention. *BMC Surg*12 Suppl 1: S35.
118. Ulrich AB, Pour PM. (2001). Cell Lines. *Encyclopedia of Genetics*. Academic Press.

<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/cell-lines> Consultado en línea el 7 de enero, 2020 a las 20:03hrs.

119. Uronis JM, Muhlbauer M, Herfarth HH, Rubinas TC, Jones GS, Jobin C. (2009). Modulation of the Intestinal Microbiota Alters Colitis-Associated Colorectal Cancer Susceptibility. *PLoS One*. 4:e6026
120. Verma A, Geeta Shukla. (2013). Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* Suppresses DMH-Induced Procarcinogenic Fecal Enzymes and Preneoplastic Aberrant Crypt Foci in Early Colon Carcinogenesis in Sprague Dawley Rats. *Nutr Cancer*, 65:1, 84-91.
121. Voelkel-Johnson C, Norris JS, White-Gilbertson S. (2018). Interdiction of Sphingolipid Metabolism Revisited: Focus on Prostate Cancer. *Sphingolipids in Cancer*, 265–293.
122. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. (1979). Purification of a Human Prostate Specific Antigen. *Invest Urol*, 17: 159-163.
123. Wang S, Zhang L, Fan R, Han X, Yi H, Zhang L, Xue C, Li H, Zhang Y, Shigwedha N. (2014). Induction of HT-29 cells Apoptosis by Lactobacilli Isolated from Fermented Products. *Res. Microbiol*, XX: 1-13.
124. Wei Y, Li L, Huang L, Li Q. (2019). Genetic and Biochemical Characterization of an Exopolysaccharide With *in vitro* Antitumoral Activity Produced by *Lactobacillus fermentum* YL-11. *Front. Microbiol*; 10: 1-11.
125. Wiczorska, K, Stolarek M, Stec R. (2019). The Role of the Gut Microbiome in Colorectal Cancer: Where Are We? Where Are We Going? *Clin Colorectal Canc*; 19(1): 5-12.
126. World Health Organization, 2018. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (Consultado en línea el 15 de octubre, 2018, a las 18:54pm).
127. Yamazaki K, Tsunoda A, Sibusawa M, Tsunoda Y, Kusano M, Fukuchi K, Yamanaka M, Kushima M, Nomoto K, Moroyomi M. (2000). The Effect of an Oral Administration of *Lactobacillus casei* Strain Shirota on Azoxymethane-Induced Colonic Aberrant Crypt Foci and Colon Cancer in the Rat. *Oncol Rep* 7:977–982.

128. Zahran W, Elsonbaty S, Moawed F. (2017). *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 Exopolysaccharides Synergizes with Low Level Ionizing Radiation to Modulate Signaling Molecular Targets in Colorectal Carcinogenesis in Rats. *Biomed. Pharmacoter*; 92: 384-393.
129. Zhao B, Meng J, Zhang Q, Kang T, Lu R. (2017). Protective Effect of Surface Layer Proteins Isolated from Four *Lactobacillus* Strains on Hydrogen-Peroxide- Induced HT-29 Cells Oxidative Stress. *Int. J. Biol. Macromolecules*; 102: 76-83.
130. Zhou X, Hong T, Yu Q, Nie S, Gong D, Xiong T, Xie M. (2017). Exopolysaccharides from *L. plantarum* NCU116 Induce c-Jun Dependent Fas/FasL-Mediated Apoptosis Via TLR-2 in Mouse Intestinal Epithelial Cancer. *Nat. Scientific Reports*; 7: 14247. 1-13.
131. Zhu X, Fei Liu. (2017). Probiotics as an Adjuvant Treatment in *Helicobacter pylori* Eradication Therapy. *J. Diges Dis*; 18: 195-202.