



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**Resistencia de bacterias lácticas y
bifidobacterias a antitumorales**

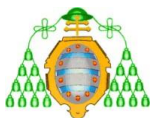
TRABAJO FIN DE MÁSTER

POR

GUILLERMO SOLACHE BERROCAL

JULIO, 2014





Máster en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dra. Dña. **Ana Belén Flórez García**, Instituto de Productos Lácteos de Asturias
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC)

CERTIFICA:

Que D. **Guillermo Solache Berrocal** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Máster al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, 8ª promoción curso 2013-2014.

Villaviciosa, 30 de junio de 2014

Ana Belén Flórez García

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Máster en Biotecnología Alimentaria

Quisiera reconocer, en primer lugar, la labor ejercida durante todos estos meses por mi tutora, la Dra. Ana Belén Flórez García. Sus enseñanzas, tanto en el laboratorio como a la hora de redactar esta memoria, me serán de gran ayuda en el futuro. Agradezco también la ayuda brindada por el resto de miembros del Grupo de Cultivos Lácteos Funcionales del IPLA: el Dr. Baltasar Mayo Pérez, a la cabeza del mismo, la Dra. Susana Delgado Palacio y la doctoranda Lucía Guadamuro García.

Igualmente, agradezco al resto de personal del centro el haber generado un ambiente de trabajo de lo más agradable, además de no haber dudado en ningún momento en echar una mano. No puedo dejar de mencionar a la Dra. Patricia Rúas Madiedo, quien colaboró con mi tutora en la planificación de los experimentos con líneas celulares.

Por último, decir que este curso no habría sido lo mismo sin mis amigos del máster, pues con los buenos momentos que hemos pasado juntos han hecho esta experiencia más enriquecedora. De entre todos ellos, me es obligatorio nombrar a Marta Colinas Rodríguez, David Fernández Fernández y Lei Wang, compañeros de fatigas en el IPLA.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS.....	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES.....	6
2.1. Fundamentos teóricos.....	7
2.1.1. Bacterias del Ácido Láctico (BAL)	7
2.1.2. El papel de los probióticos	8
2.1.3. Carcinogénesis, terapia anticancerígena y mucositis	9
2.1.4. Microbiota intestinal y antitumorales	12
2.2. Antecedentes	18
2.3. Fundamentos experimentales	19
3. MATERIAL Y MÉTODOS	22
3.1. Microorganismos, medios y condiciones de cultivo	23
3.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	24
3.3. Aislamiento del ADN total.....	25
3.4. Identificación molecular mediante ARDRA	26
3.5. Tipificación molecular mediante RAPD	26
3.6. Preparación de muestras para el co-cultivo	27
3.7. Ensayos de co-cultivo células epiteliales-BAL-compuesto antitumoral	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1. Estudio de la sensibilidad/resistencia a antitumorales en cepas tipo de BAL.....	30
4.2. Determinación del nivel de resistencia a afatinib y pemetrexed en bifidobacterias aisladas del TGI humano	36
4.3. Identificación y tipificación de los aislados de bifidobacterias	37
4.4. Selección de antitumoral y cepa para el co-cultivo	39
4.5. Ensayos de co-cultivo HT29-L43-afatinib	40
5. CONCLUSIONES	43
6. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	45
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

RESUMEN

El cáncer es la principal causa de muerte de la población mundial. En la quimioterapia, su tratamiento más frecuente, se utilizan fármacos con propiedades antineoplásicas cuya toxicidad provoca una serie de efectos secundarios. Uno de ellos, la mucositis, resulta en un conjunto de síntomas a nivel del epitelio del tracto gastrointestinal (TGI) capaces de comprometer la vida de los enfermos. No posee una cura efectiva, lo cual lleva a buscar terapias novedosas como el uso de probióticos. Conocer el grado en que los antitumorales comprometen la viabilidad de estos microorganismos es fundamental. Por ello, como objetivo final del presente trabajo se ha propuesto la selección de bacterias del ácido láctico (BAL) resistentes a compuestos anticancerígenos para su futura administración a pacientes sometidos a quimioterapia.

Con este fin, y siguiendo un método de microdilución, se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de fármacos empleados en el tratamiento de los cánceres de mama y pulmón en 23 cepas tipo de BAL. Las bacterias mostraron resistencia a 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de capecitabina, ciclofosfamida, docetaxel, erlotinib, gefitinib, irinotecán y paclitaxel. Sin embargo, los valores de CIM para el 5-fluorouracilo, la gemcitabina y, especialmente, el pemetrexed fueron notablemente diferentes según la cepa analizada. Además, de manera sorprendente, muchas cepas mostraron sensibilidad al afatinib, un agente de terapia dirigida. En general, la resistencia a los antitumorales en las BAL fue inferior a la de algunas especies de Gram-negativas, así como a la de otras bacterias comensales del TGI.

La distribución de CIM frente al afatinib en 32 aislados de distintas especies de bifidobacterias procedentes del TGI humano ha permitido determinar un punto de corte para la población en 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$, discriminando así entre bacterias resistentes y sensibles. En cambio, no se asignó un valor para el compuesto pemetrexed, ya que muchos aislados crecieron en la mayor concentración analizada. Además, la distribución observada para este último antitumoral podría ser indicativa de una resistencia diferencial y característica de especie y/o cepa.

Finalmente, tras la tipificación de los aislados, se seleccionó la cepa L43, resistente al afatinib, para estudiar su efecto protector sobre la línea celular epitelial HT29 en presencia del antitumoral. Tras 24 h de co-cultivo se detectó una protección de la monocapa epitelial frente a todas las concentraciones analizadas del fármaco, siendo este efecto superior cuando se incrementó la densidad bacteriana. Como consecuencia, la cepa L43 podría ser utilizada en un futuro como probiótico para evitar que los enfermos de cáncer a los que se administra afatinib desarrollen mucositis, lo cual repercutiría en una mejora de su calidad de vida.

ABSTRACT

Cancer is the leading cause of death of the world's population. Chemotherapy, its most common treatment, employs drugs with antineoplastic properties. These chemicals exhibit several side effects including mucositis, which results in a series of symptoms affecting the gastrointestinal tract (GIT) epithelium that can impair life expectancy of cancer patients. Since there is no effective cure for this pathology, novel therapies as the use of probiotics are being evaluated. Knowing the degree in which antitumor drugs affect the viability of these microorganisms is fundamental. Therefore, the selection of antitumor-resistant lactic acid bacteria (LAB) for their future administration to cancer patients undergoing chemotherapy has been proposed as the main aim of the present work.

For this purpose, minimum inhibitory concentrations (MICs) of drugs employed in the treatment of breast and lung cancer for 23 type strains of LAB were determined by a microdilution method. These bacteria showed resistance to 128 $\mu\text{g/mL}$ of capecitabine, cyclophosphamide, docetaxel, erlotinib, gefitinib, irinotecan and paclitaxel. However, MICs against fluorouracil, gemcitabine and, especially, pemetrexed were different depending on the analysed strain. Surprisingly, many strains showed susceptibility to afatinib, a targeted therapy drug. Globally, resistance of LAB to antitumor chemicals was lower than that of Gram-negative bacteria and other commensal microorganisms of the GIT.

The distribution of MICs against afatinib in 32 bifidobacteria isolates from the human GIT belonging to different species allowed the determination of a cutoff value for the population at 512 $\mu\text{g/mL}$, thus discriminating between resistant and susceptible bacteria. On the contrary, a cutoff value for pemetrexed could not be assigned, as many of the isolates grew at the highest concentration tested. In addition to this, the distribution of MICs against this last compound might be indicative of a differential and species or strain-characteristic resistance.

Lastly, once the isolates were typed, the afatinib-resistant strain L43 was selected to study its protective effect on the epithelial cell line HT29 in the presence of the drug. After a 24-hour co-culture of HT29-L43-afatinib, protection of the epithelial monolayer against all the analysed concentrations was detected, this effect being greater when bacterial density was increased. As a consequence, the strain L43 could be used in the future as a probiotic to avoid the development of mucositis in those cancer patients treated with afatinib, which might result in an improvement of their quality of life.

LISTA DE FIGURAS

NÚMERO	TÍTULO	PÁGINA
Figura 1	Gráfico en el que se recogen la incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en España durante el año 2012.	2
Figura 2	Representación esquemática de los objetivos propuestos para el trabajo.	5
Figura 3	Árbol filogenético basado en el análisis comparativo de secuencias del ARN ribosomal 16S. En él se recogen los principales grupos filogenéticos de BAL.	8
Figura 4	Representación de la mucosa gastrointestinal y los cambios que ocurren en ella durante cada una de las fases del modelo de Sonis para la mucositis.	12
Figura 5	Representación del aparato digestivo humano en la cual se indican las densidades microbianas que pueden encontrarse en algunas de sus partes. Las cifras se expresan en UFC/mL de contenido luminal.	13
Figura 6	Diagramas de cajas que muestran los filos y géneros bacterianos más abundantes en la microbiota intestinal humana.	15
Figura 7	Representación de las rutas por las cuales las bacterias probióticas pueden prevenir y/o disminuir el grado de mucositis: 1-Procesos inflamatorios, 2-Permeabilidad intestinal, 3-Composición de la capa de mucus, 4-Resistencia a estímulos tóxicos y reparación epitelial y 5-Inducción y producción de moléculas efectoras del sistema inmune.	16
Figura 8	Placa microtituladora de 96 pocillos.	19
Figura 9	A) Modelo explicativo de la técnica de identificación molecular ARDRA. Los aislados del ejemplo pertenecen a especies distintas. B) Modelo explicativo de la técnica de tipificación molecular RAPD. Los aislados son diferentes cepas.	20

NÚMERO	TÍTULO	PÁGINA
Figura 10	Bases del funcionamiento del equipo xCELLingence RTCA DP.	21
Figura 11	Distribución de las CIM para afatinib y pemetrexed en los 32 aislados de bifidobacterias procedentes del TGI humano.	37
Figura 12	Diferenciación de especies mediante la técnica molecular ARDRA. En la imagen se muestran los diferentes perfiles obtenidos tras la amplificación de un fragmento del ARN ribosómico 16S y su digestión con varios enzimas de restricción (A: BamHI, B: HinfI, C: HindIII). La calle M se corresponde con el marcador molecular “GRS Universal Ladder” (Grisp).	38
Figura 13	Diferenciación de cepas mediante la técnica molecular RAPD. En la imagen se muestran algunos de los diferentes perfiles obtenidos (calles 1 a 14) tras amplificar el ADN total de los aislados con el oligonucleótido OPA18. La calle M se corresponde con el marcador molecular “GRS Universal Ladder”.	39
Figura 14	Gráfico en el que se reflejan los resultados del ensayo de co-cultivo HT29-L43-afatinib en el cual la suspensión bacteriana tenía una densidad de 10^8 UFC/mL. Se recogen, en ordenadas, los valores del IC devueltos por el equipo xCELLingence RTCA DP y, en abscisas, el tiempo transcurrido en horas.	41
Figura 15	Gráfico para el ensayo con la suspensión bacteriana de 10^9 UFC/mL.	42

LISTA DE TABLAS

NÚMERO	TÍTULO	PÁGINA
Tabla 1	Clasificación de los agentes antitumorales siguiendo como criterio su modo de acción.	10
Tabla 2	Medios y condiciones de cultivo utilizados para llevar a cabo los ensayos de microdilución.	24
Tabla 3	Relación de los fármacos antitumorales utilizados en el tratamiento del cáncer de mama empleados en este trabajo.	30
Tabla 4	Relación de los fármacos antitumorales utilizados en el tratamiento del cáncer de pulmón empleados en este trabajo.	31
Tabla 5	CIM obtenidas para las 23 cepas tipo de BAL.	32
Tabla 6	CIM obtenidas para las 7 cepas tipo de bacterias intestinales no lácticas y las 4 cepas de bacterias Gram-negativas aisladas de una industria láctea.	35

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es en la actualidad la principal causa de muerte a nivel mundial. En las últimas décadas se ha visto un notable incremento en la incidencia de la enfermedad, el cual puede deberse a una mayor exposición a agentes carcinogénicos (como algunos contaminantes químicos o radiaciones), a la disminución de la muerte por otras causas o al aumento de la esperanza de vida. La tasa de mortalidad asociada al cáncer fue de 8,2 millones de personas en 2012 según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014). En España, ese mismo año, la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM, 2014) registró 215.535 casos. Los tipos de cáncer con mayor incidencia en nuestro país son: el colorrectal (15%), el de próstata (12,9%), el de pulmón (12,4%) y el de mama (11,7%), encontrándose a su vez entre los que mayor mortalidad producen (Figura 1) (SEOM, 2014).

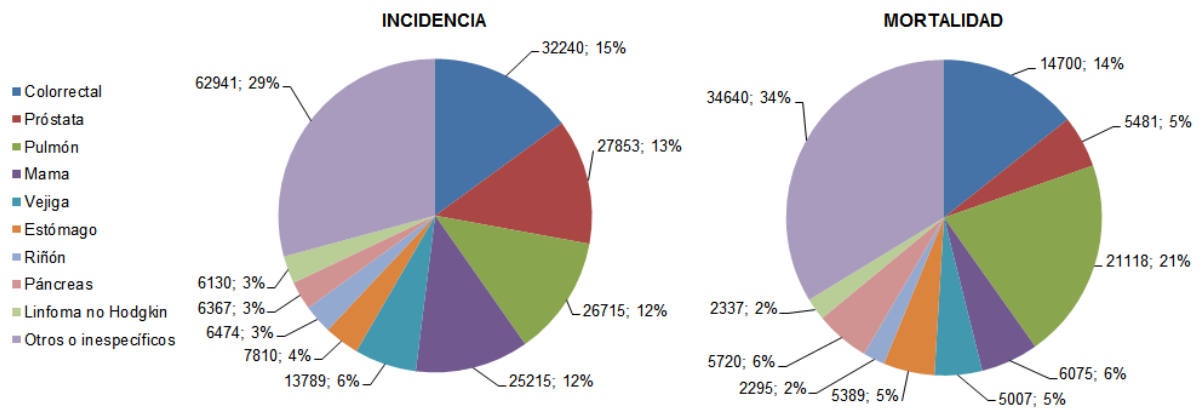


Figura 1: Gráfico en el que se recogen la incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en España durante el año 2012. Datos tomados de SEOM, 2014.

La quimioterapia con compuestos antineoplásicos es parte del arsenal terapéutico empleado para combatir los distintos tipos de cánceres. Los fármacos utilizados en esta forma de tratamiento, denominados antitumorales, ejercen su acción sobre células que se encuentran en división activa, pero son incapaces de distinguir aquéllas pertenecientes a tejidos normales de las cancerosas. Como consecuencia, se originan una serie de efectos secundarios.

Entre ellos se encuentra la mucositis, una patología caracterizada por la inflamación y pérdida de células de la mucosa del TGI (Sonis, 2004). En primer lugar, los antitumorales afectan a la capacidad de renovación del tejido y, en último término, provocan la muerte celular. Las formas más leves de mucositis consisten en una irritación superficial del epitelio y en los cuadros más graves, en cambio, se forman úlceras en la mucosa del TGI. Clínicamente, la enfermedad se manifiesta causando los siguientes efectos fisiopatológicos:

nauseas, vómitos, hinchazón, dolor abdominal y diarreas severas. Además, se asocia a bacteremias, malnutrición, empleo de nutrición parenteral e incremento en el uso de analgésicos intravenosos, conduciendo todo ello a mayores tiempos de hospitalización. Estos graves problemas llevan a reducir las dosis o introducir periodos de interrupción y/o fraccionamiento en los tratamientos quimioterapéuticos administrados a pacientes con mucositis. Por tanto, su efectividad puede verse sustancialmente comprometida.

Aunque han sido muchas las investigaciones dirigidas a encontrar una cura para la mucositis, hoy por hoy no se dispone de un tratamiento eficaz. Como resultado, los trastornos del TGI inducidos por los antitumorales afectan a un gran número de los enfermos de cáncer (entre el 40 y el 100%) (Keefe y col., 2000). La proporción de pacientes que se ven obligados a reducir la dosis asciende hasta el 60%, de los cuales el 35% está abocado a pasar por un tratamiento discontinuo. De esta manera, el desarrollo de mucositis durante los regímenes quimioterapéuticos no solamente posee consecuencias clínicas muy serias, sino que también tiene un notable efecto económico. Por tanto, si se lograra conseguir una reducción en la incidencia de la enfermedad se esperaría de ella un impacto socio-económico de primera magnitud.

El TGI se distingue por poseer una compleja comunidad microbiana. En los humanos ésta se encuentra dominada principalmente por los filos Bacteroidetes y Firmicutes (Turnbaugh y col., 2006), perteneciendo al último las BAL y el género relacionado *Bifidobacterium*. Se trata de un conjunto de microorganismos muy estudiado y caracterizado, ya que sus miembros se utilizan en la elaboración de diversos alimentos fermentados. El vínculo entre estas bacterias y la salud humana se hizo patente cuando se demostró que algunas especies del grupo son capaces de mantener el estado de salud o combatir trastornos intestinales (Ouwenhand y col., 2002). De hecho, existen muchos otros trabajos que revelan el papel de las BAL y las bifidobacterias en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades (Mayo y col., 2008). Sin embargo, los estudios sobre la aplicación de probióticos en los desórdenes del TGI derivados de la quimioterapia son muy escasos.

A raíz de la situación actual, este trabajo se ha orientado a buscar una forma de mejorar la salud de las personas sometidas a quimioterapia mediante la administración de BAL y/o bifidobacterias. A causa de los numerosos beneficios que se asocian al consumo de tales microorganismos, también podrían proteger frente al desarrollo mucositis. Así se evitarían los citados síntomas, mejorando notablemente la calidad de vida de los enfermos, y se podría

prescindir de la interrupción de los tratamientos, repercutiendo en un descenso de la mortalidad por cáncer. El conocimiento del grado de sensibilidad/resistencia de los probióticos a los compuestos antitumorales es imprescindible previa su utilización en el tratamiento de los desórdenes del TGI derivados de la quimioterapia. Por ello, y teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, se proponen los siguientes objetivos para el presente trabajo (Figura 2):

OBJETIVOS

- 1 Ensayo de sensibilidad/resistencia a compuestos antitumorales en cepas tipo de BAL y bifidobacterias.
- 2 Determinación de puntos de corte en bifidobacterias, aisladas del TGI humano, para los antitumorales pemetrexed y afatinib.
- 3 Tipificación y selección de cepas resistentes a compuestos antitumorales.
- 4 Estudio del efecto protector que las bacterias resistentes ejercen sobre una línea celular intestinal expuesta a un antitumoral.

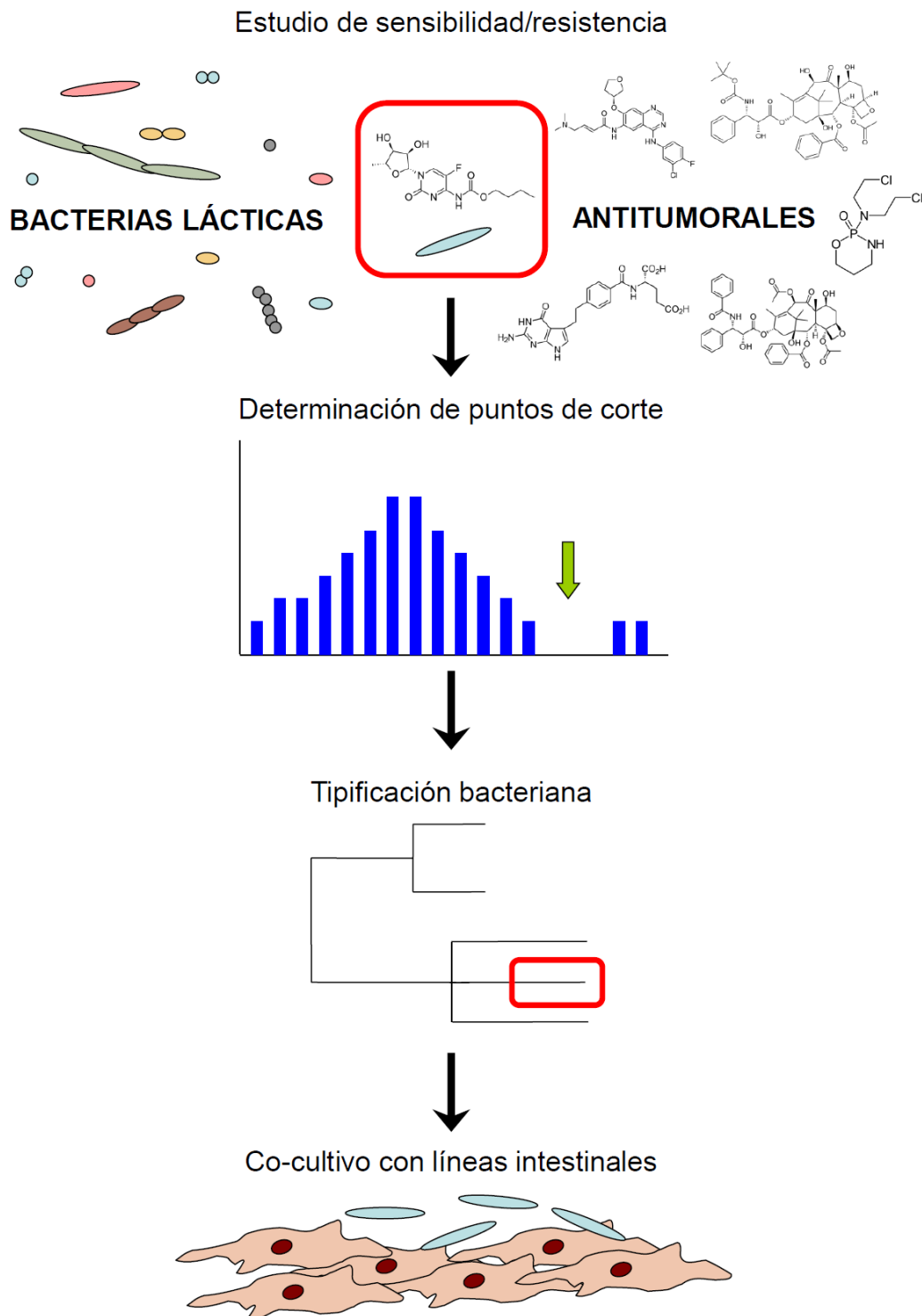


Figura 2: Representación esquemática de los objetivos propuestos para el trabajo.

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES

2.1. Fundamentos teóricos

2.1.1. Bacterias del Ácido Láctico (BAL)

Las BAL constituyen un grupo taxonómicamente diverso de cocos y bacilos Gram-positivos, no esporulados ni pigmentados y catalasa negativos. Habitualmente se agrupan atendiendo a sus características metabólicas y fisiológicas comunes, entre las cuales destaca su capacidad para fermentar carbohidratos produciendo ácido láctico. Son microorganismos de naturaleza anaerobia o aerotolerante que, a causa de su limitada capacidad biosintética, siempre se encuentran en nichos ecológicos ricos en nutrientes, como pueden ser la superficie de las plantas, el material vegetal en descomposición, o el TGI y el tracto genitourinario de los vertebrados. Estas bacterias tienen una gran importancia aplicada, ya que se utilizan a modo de contaminantes naturales o bien mediante su adición como cultivos iniciadores en la elaboración de una gran variedad de alimentos fermentados (quesos, yogures, embutidos, etc.). El hombre ha consumido BAL a través de los productos fermentados desde tiempos ancestrales, por lo que las instituciones alimentarias europeas y americanas las consideran seguras desde el punto de vista de la salud (Qualified Presumption of Safety, QPS; Generally Regarded As Safe, GRAS).

Las BAL más representativas se clasifican en los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y la especie *Streptococcus thermophilus*. Asimismo, en función de su metabolismo fermentativo se dividen en las homofermentadoras, heterofermentadoras facultativas y heterofermentadoras estrictas. Mientras que las primeras liberan solamente ácido láctico al medio como producto de estas reacciones, el resto producen al mismo tiempo compuestos como etanol, CO₂ y ácido acético.

Las bifidobacterias son microorganismos Gram-positivos pertenecientes al género *Bifidobacterium*, denominado así por la forma ramificada o “bífida” de sus miembros. Éstos comparten numerosas características fenotípicas y funcionales con las BAL “típicas”, por lo que tradicionalmente y a efectos prácticos se han reunido en un mismo grupo a pesar de no estar relacionados filogenéticamente (Figura 3). Además, las bifidobacterias poseen un contenido en G+C en su ADN de entre el 55 y el 67%, mientras que en las BAL “típicas” el valor es siempre menor del 55% (Holzapfel y col., 2001). Pese a ello, en esta memoria se considerarán como integrantes de un mismo grupo con el fin de agilizar la lectura.

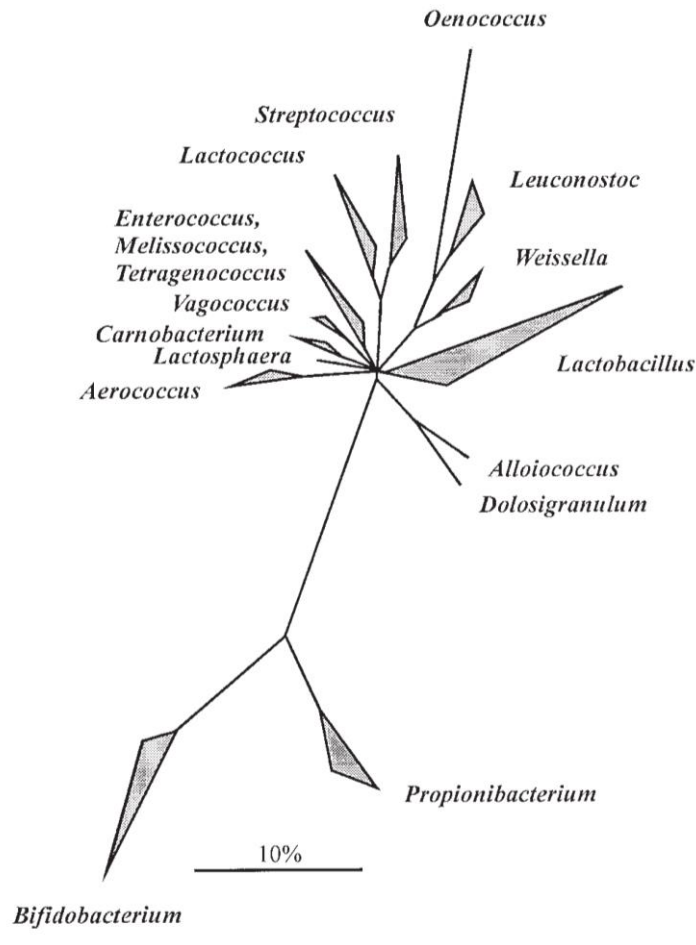


Figura 3: Árbol filogenético basado en el análisis comparativo de secuencias del ARN ribosomal 16S. En él se recogen los principales grupos filogenéticos de BAL (Holzapfel y col., 2001).

2.1.2. El papel de los probióticos

La relación de las BAL con la salud humana es más notoria en los últimos años, pues diversas investigaciones han demostrado que ciertas especies de este grupo son capaces de mantener el estado de salud o combatir enfermedades intestinales (Ouwenhand y col., 2002). En este contexto, la OMS define a los probióticos como «aquellos microorganismos vivos que cuando son administrados en una concentración adecuada confieren un beneficio en la salud del hospedador» (FAO/OMS, 2002).

El concepto fue introducido por el biólogo y Premio Nobel de Medicina Iliá Méchnikov (1907), quien afirmó que «la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por otros útiles». También a comienzos del siglo XX, el pediatra francés Henry Tissier (1906) vio cómo los niños con diarrea presentaban en sus heces

un escaso número de bacterias con morfología bífida o en Y, abundantes en los niños sanos. Además, sugirió la posibilidad de administrar estos microorganismos para facilitar el reestablecimiento de una composición bacteriana sana.

En la actualidad, la mayoría de las cepas utilizadas como probióticos pertenecen al grupo de las BAL, y muchas son miembros de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Numerosas evidencias científicas y clínicas lo avalan, habiéndose demostrado que algunos lactobacilos y bifidobacterias son capaces de ejercer su efecto beneficioso reduciendo el riesgo y los síntomas de diarreas severas, intolerancia a la lactosa, alergias (dermatitis atópica) o inflamación del intestino (Mayo y col., 2008). No obstante, las características de probiosis son dependientes de cepa, por lo que los resultados obtenidos en un experimento no pueden extenderse a otras cepas relacionadas con la estudiada aunque ambas pertenezcan al mismo género (Mayo y col., 2008). En algunos casos, se ha comprobado que tanto las células no viables de los probióticos como los componentes de las mismas pueden ser positivos para la salud humana (Jijon y col., 2004; Rachmilewitz y col., 2004). Además, recientemente se ha puesto de manifiesto el papel que los microorganismos comensales tienen sobre el metabolismo de su hospedador, pudiendo influir, en última instancia, sobre enfermedades tan dispares como la diabetes, la obesidad y el autismo (Mayo y col., 2008).

2.1.3. Carcinogénesis, terapia anticancerígena y mucositis

El término carcinogénesis hace referencia al proceso por el cual una célula normal se transforma en cancerosa. Durante este proceso se producen cambios en el material genético de la célula, que conllevan la activación de oncogenes y/o inhibición de genes supresores de tumores, conduciendo finalmente a una reprogramación completa que resulta en una replicación descontrolada (Hanahan y Weinberg, 2011). Existe también la posibilidad de que las células neoplásicas inicien una metástasis, fenómeno cuyo desarrollo consiste en la extensión del foco canceroso más allá de sus límites habituales, invadiendo regiones adyacentes u otros órganos. Este proceso supone la principal causa de muerte por cáncer.

La quimioterapia con compuestos antineoplásicos es el tratamiento más ampliamente usado con fines curativos y/o paliativos en distintos tipos de cánceres. Muchos de los antitumorales aplicados de forma sistémica se administran por vía oral. Sin embargo, cuando los pacientes no pueden ingerir líquidos o píldoras por presentar náuseas, vómitos o diarrea se eligen otras vías como la intravenosa, intramuscular o incluso subcutánea. Las dosis son muy

variables, pues tienen en cuenta factores como la edad, el peso corporal o el estado nutricional del individuo, así como las posibles interferencias con otras medicinas. Además, se suministran tanto de forma continuada como en intervalos. Los fármacos empleados en quimioterapia, a pesar de perseguir un único objetivo, se dividen en una serie de categorías según su mecanismo de acción específico (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación de los agentes antitumorales siguiendo como criterio su modo de acción¹.

CLASIFICACIÓN	MODO DE ACCIÓN	EJEMPLOS
Agentes alquilantes	Se unen al ADN para prevenir que las células cancerosas puedan reproducirse	Busulfán, carboplatino, carmustina, ciclofosfamida, cisplatino, lomusitina, mecloretamina
Agentes de terapia dirigida	Actúan sobre características bioquímicas particulares de las células cancerosas	Afatinib, erlotinib, gefitinib
Antibióticos antitumorales	Interfieren en el funcionamiento de los enzimas implicados en la replicación del ADN. Su nombre deriva de su origen fúngico o bacteriano	Bleomicina, dactinomicina, doxorubicina, mitomicina C
Antimetabolitos	Entorpecen la síntesis de los ácidos nucleicos sustituyendo a los componentes de los mismos o a cofactores de los enzimas que los producen	Capecitabina, desoxicofuracilina, 5-fluorouracilo, fludarabina, gemcitabina, metotrexato, pemetrexed
Inhibidores de la mitosis	Detienen la división celular o inhiben a los enzimas productores de los componentes necesarios para que tenga lugar	Docetaxel, paclitaxel, vincristina, vinblastina
Inhibidores de las topoisomerasas	Interfieren con los enzimas que ayudan a separar las dos hebras del ADN, impidiendo que éstas se copien	Irinotecán, topotecán, rubitecán

¹ Adaptado de American Cancer Society (ACS): <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002995-pdf.pdf>

Uno de los principales efectos tóxicos de estos fármacos es la mucositis, definida como la lesión de la barrera mucosa del TGI (Sonis, 2004). Los compuestos antitumorales afectan a las células gastrointestinales reduciendo su capacidad de renovación y provocando en último

término su muerte. Este proceso ocasiona atrofia y ulceración del epitelio, lo cual se asocia a fuertes dolores y síntomas como náuseas, vómitos, hinchazón, dolor abdominal y diarreas severas. Constituye asimismo un factor clínicamente significativo de riesgo de sepsis. Después de una terapia anticancerígena, el intestino delgado es la zona más afectada por mucositis, aunque también es frecuente que se vean alterados la cavidad oral, el esófago, el estómago y el intestino grueso (Sonis y col., 2004).

En las últimas décadas se han recavado numerosos datos epidemiológicos de la enfermedad. Dependiendo de la dosis y del tipo de compuesto antitumoral, entre el 40 y el 100% de los pacientes desarrollan mucositis gastrointestinal (Keefe y col., 2000). Además, se ha progresado en el entendimiento de los mecanismos moleculares que causan las lesiones. Debido a su complejidad, y aunque se trate de un proceso dinámico que en numerosas ocasiones se desarrolla en un corto tiempo, se puede dividir en estadios con el fin de facilitar su estudio. De acuerdo con Sonis (2004), la mucositis se desarrolla siguiendo un modelo de cinco etapas biológicas (Figura 4):

- 1. *Iniciación:*** La quimioterapia produce daños en el ADN causando la muerte celular de un pequeño número de células epiteliales basales y células de la submucosa.
- 2. *Respuesta al daño primario:*** Los sucesos de la fase previa activan una cascada de respuestas que conllevan la liberación de factores tales como el factor nuclear kappa B (NFkB), regulador de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6.
- 3. *Amplificación de la señal:*** Las proteínas liberadas en el estadio anterior, además de producir un daño en el tejido, tienen la capacidad de amplificar mediante un sistema positivo de “feedback” el daño ocasionado por la quimioterapia.
- 4. *Ulceración:*** Posteriormente, la integridad de la mucosa comienza a disminuir formándose lesiones muy dolorosas (úlceras) a través de las cuales se pueden producir colonizaciones bacterianas.
- 5. *Curación:*** Una vez terminado el tratamiento con antineoplásicos, el epitelio suele entrar en una fase curativa en la que determinadas señales en la matriz extracelular hacen migrar, proliferar y diferenciarse a las células epiteliales formándose de nuevo un epitelio intacto.

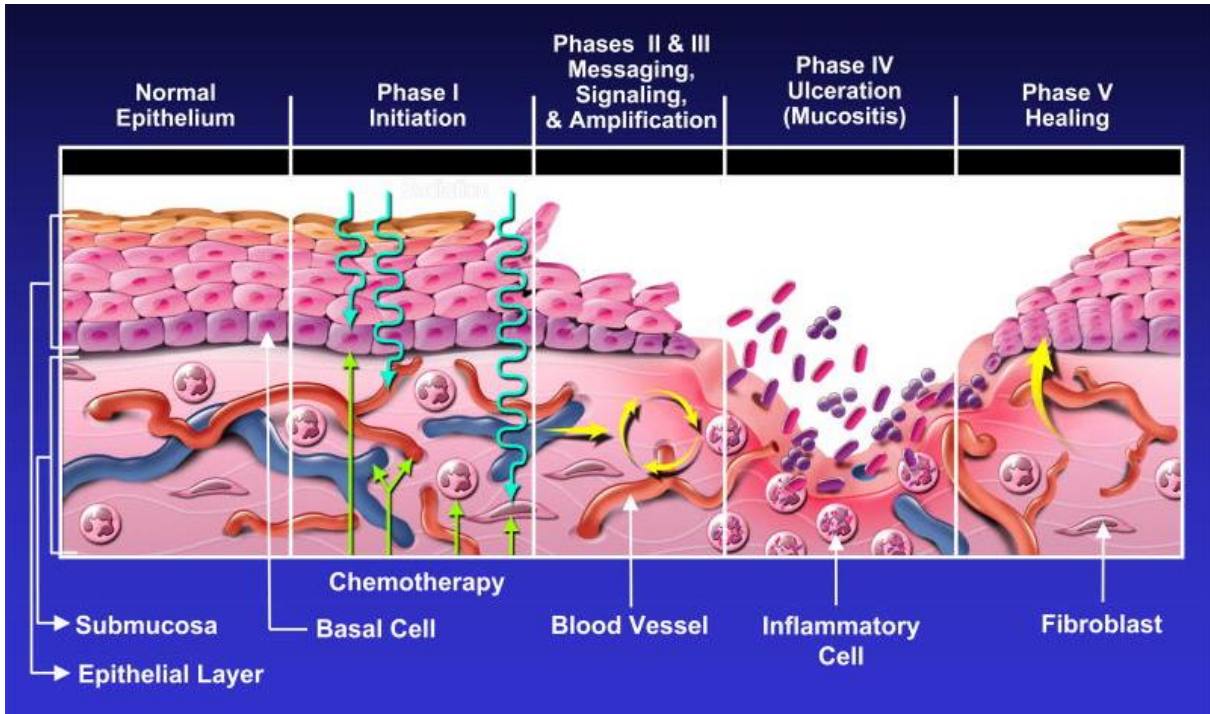


Figura 4: Representación de la mucosa gastrointestinal y los cambios que ocurren en ella durante cada una de las fases del modelo de Sonis para la mucositis (Lalla y col., 2008).

2.1.4. Microbiota intestinal y antitumorales

El término microbiota se utiliza para designar al conjunto de acompañantes microbianos que habitan en o sobre el cuerpo humano. Integrando esta compleja comunidad se pueden encontrar representantes de los principales taxones en los cuales se agrupan todas las formas de vida: eucariotas, bacterias, arqueas y virus (Clemente y col., 2012). Estos variados componentes no sólo son importantes por su mera presencia, pues también interactúan entre sí y con el hospedador influyendo en la salud y fisiología humanas.

El establecimiento de la microbiota se inicia en el momento del nacimiento, al verse expuestos los neonatos a un sinnúmero de microorganismos procedentes de diferentes ambientes, siendo colonizados en primer lugar por aquéllos ubicados en la vagina o la piel de la madre, según haya sido el parto natural o por cesárea (Clemente y col., 2012). A partir de entonces, la diversidad microbiana irá incrementándose con el tiempo, aunque esta tendencia puede interrumpirse por cambios importantes en la composición taxonómica derivados de eventos tales como el uso de antibióticos o antitumorales. Hasta qué punto la diversidad se desarrolla a partir del inóculo inicial o se adquiere a través de la exposición a factores externos, aún se desconoce. Sin embargo, algunos estudios sugieren que las primeras especies en poblar nuestro organismo son muy relevantes a la hora de determinar la naturaleza de la

comunidad permanente en los adultos (Ducluzeau, 1993). De hecho, en el epitelio intestinal algunas bacterias pioneras pueden modular la expresión de ciertos genes y crear así un hábitat que les favorezca (Hooper y col., 2001). Distintas colonizaciones tempranas explicarían la existencia de diferencias significativas entre individuos sanos a nivel de su microbiota, aunque otros agentes como la dieta, el entorno y la genética del hospedador también parecen estar implicados (Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Las bacterias ocupan todas las superficies del cuerpo humano expuestas al medio, residiendo en su mayoría en las mucosas, de las cuales la más extensa es la del TGI. Si bien órganos como la boca (Nasidze y col., 2009), la vagina (Ravel y col., 2011) o la piel (Grice y col., 2009) presentan comunidades bien definidas, la microbiota endógena del aparato digestivo es sin lugar a dudas la más importante, albergando cada individuo entre 300 y 500 especies bacterianas (Simon y Gorbach, 1984), cuyas células superan en número a las células eucariotas (Bengmark, 1998). Dentro del TGI no todas las regiones poseen la misma densidad microbiana, ya que las secreciones ácidas, biliares y pancreáticas entorpecen la colonización del estómago y el intestino delgado proximal. No obstante, la presencia de microorganismos se incrementa en el intestino delgado distal, y en el intestino grueso se alcanzan valores aproximados de 10^{11} a 10^{12} unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), lo cual contribuye al 60% de la masa fecal (O'Hara y Shanahan, 2006) (Figura 5).

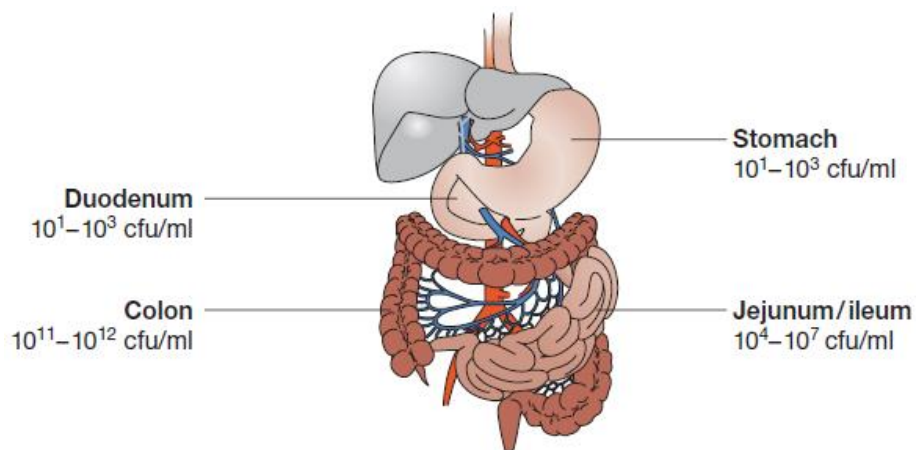


Figura 5: Representación del aparato digestivo humano en la cual se indican las densidades microbianas que pueden encontrarse en algunas de sus partes. Las cifras se expresan en UFC/mL de contenido luminal (O'Hara y Shanahan, 2006).

La correcta identificación de los diferentes taxones que constituyen la microbiota intestinal depende de la precisión de la metodología utilizada. Inicialmente, ésta se basaba en

aspectos fenotípicos de los microorganismos, como por ejemplo su morfología o propiedades bioquímicas características. Además de ser muy laboriosas, las técnicas tradicionales no proporcionan la resolución necesaria para analizar la microbiota, puesto que muchos microorganismos no pueden ser cultivados en las condiciones de laboratorio. Este problema resulta en una subestimación del número de especies diferentes que componen la comunidad microbiana (Salminen y col., 1998). Por ello, en estos momentos se opta por emplear técnicas independientes de cultivo, como la electroforesis en gradiente desnaturizante o la secuenciación de ácidos nucleicos. De hecho, Suau y col. (1999) detectaron numerosas secuencias de ADN correspondientes a microorganismos no descritos hasta entonces en muestras de heces.

La implementación en los últimos años de nuevas técnicas de secuenciación masiva ha hecho posible un estudio más profundo de la composición microbiana del TGI. Utilizando 22 metagenomas fecales de sendos individuos europeos, Arumugam y col. (2011) determinaron que los filos Firmicutes y Bacteroidetes constituyen la inmensa mayoría de la microbiota intestinal humana. El género más abundante es *Bacteroides*, seguido de *Faecalibacterium* y *Bifidobacterium*. También se encontraron algunas BAL típicas como *Streptococcus*, aunque en posiciones más alejadas (Figura 6).

El efecto que la comunidad microbiana del aparato digestivo posee sobre la fisiología y la patología de su hospedador ha sido evaluado mediante el uso de animales libres de gérmenes (Shanahan, 2002). De esta manera, en el TGI de estos animales se dan una serie de cambios como disminuciones en la tasa de recambio celular de la mucosa, actividad de los enzimas digestivos, producción de citocinas, cantidad de tejido linfático asociado a mucosas, etc.; así como un aumento del aporte calórico necesario para mantener el peso corporal. Además, se ha demostrado que estos animales son más proclives a sufrir infecciones (Taguchi y col., 2002).

Existen muchos factores capaces de producir disbiosis, es decir, cambios importantes en la constitución normal de la microbiota que pueden desembocar en enfermedades. Tanto los tratamientos con fármacos antitumorales como los tratamientos con antibióticos utilizados conjuntamente cuando se produce una bacteriemia, afectan a la composición y diversidad de la microbiota intestinal (Zwiehler y col., 2011; Perez-Cobas y col., 2012).

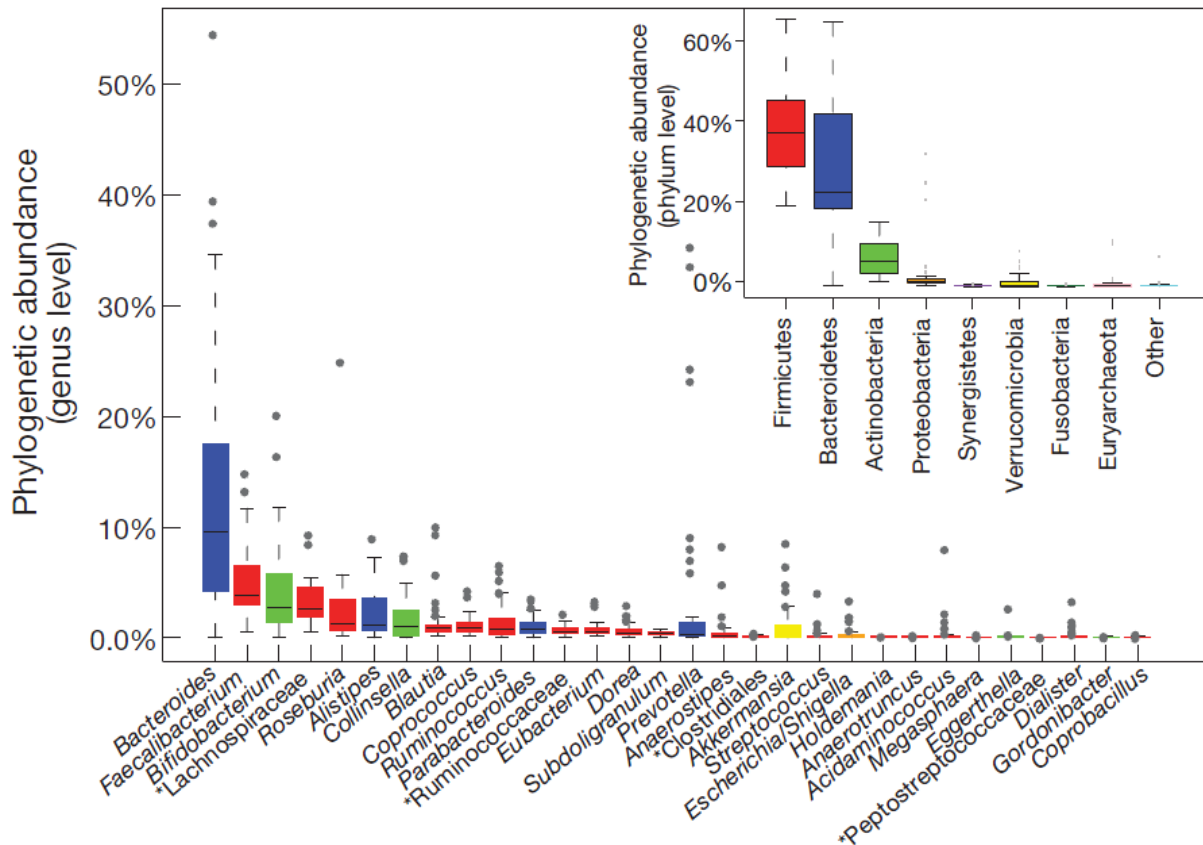


Figura 6: Diagramas de cajas que muestran los filos y géneros bacterianos más abundantes en la microbiota intestinal humana (Arumugam y col., 2011).

Estudios recientes sugieren que la microbiota intestinal podría tener efectos protectores frente al desarrollo de la mucositis. En la Figura 7 se representan las diferentes rutas por las cuales los microorganismos influirían favorablemente en este aspecto (van Vliet y col., 2010), tal y como se comenta a continuación:

1. *Proceso inflamatorio:* El intestino sano se encuentra en un estado de inflamación basal continua como consecuencia de la exposición constante de los receptores de tipo Toll (TLR), situados en la membrana externa de las células epiteliales, a ligandos como el peptidoglicano, lipopolisacárido o ADN microbiano. Paradójicamente, las bacterias comensales también son capaces de disminuir los procesos inflamatorios severos mediante la reducción del nivel de endotoxinas o interleuquinas proinflamatorias.
2. *Permeabilidad intestinal:* La microbiota intestinal reduce la permeabilidad intestinal mediante un aumento en la producción de proteínas que forman las uniones estrechas, la fosforilación de la quinasa C a través de los ligandos TLR-2, la inducción de proteínas “heat shock” (HSP), o bien mediante la síntesis de ácidos grasos de cadena corta.

3. Composición de la capa mucosa: Los genes que codifican las mucinas (genes *MUC*), unas proteínas producidas por el tejido epitelial, están directamente regulados por las bacterias y sus productos. De esta forma se fortalece la mucosa gastrointestinal y se reduce la posibilidad de que se alojen microorganismos en ella.

4. Reparación epitelial: La unión de las bacterias comensales y sus productos a los TLR no sólo mantiene un nivel de inflamación bajo, sino que estimula también la reparación de los daños mecánicos ocasionados en el epitelio

5. Producción de efectores inmunológicos: Las bacterias residentes en el aparato digestivo y los productos de las mismas son capaces de regular la síntesis de moléculas como la inmunoglobulina A (IgA), fundamental para mantener la homeostasis intestinal. Además, la microbiota intestinal regula también la producción de sustancias como la lectina, con actividad antimicrobiana.

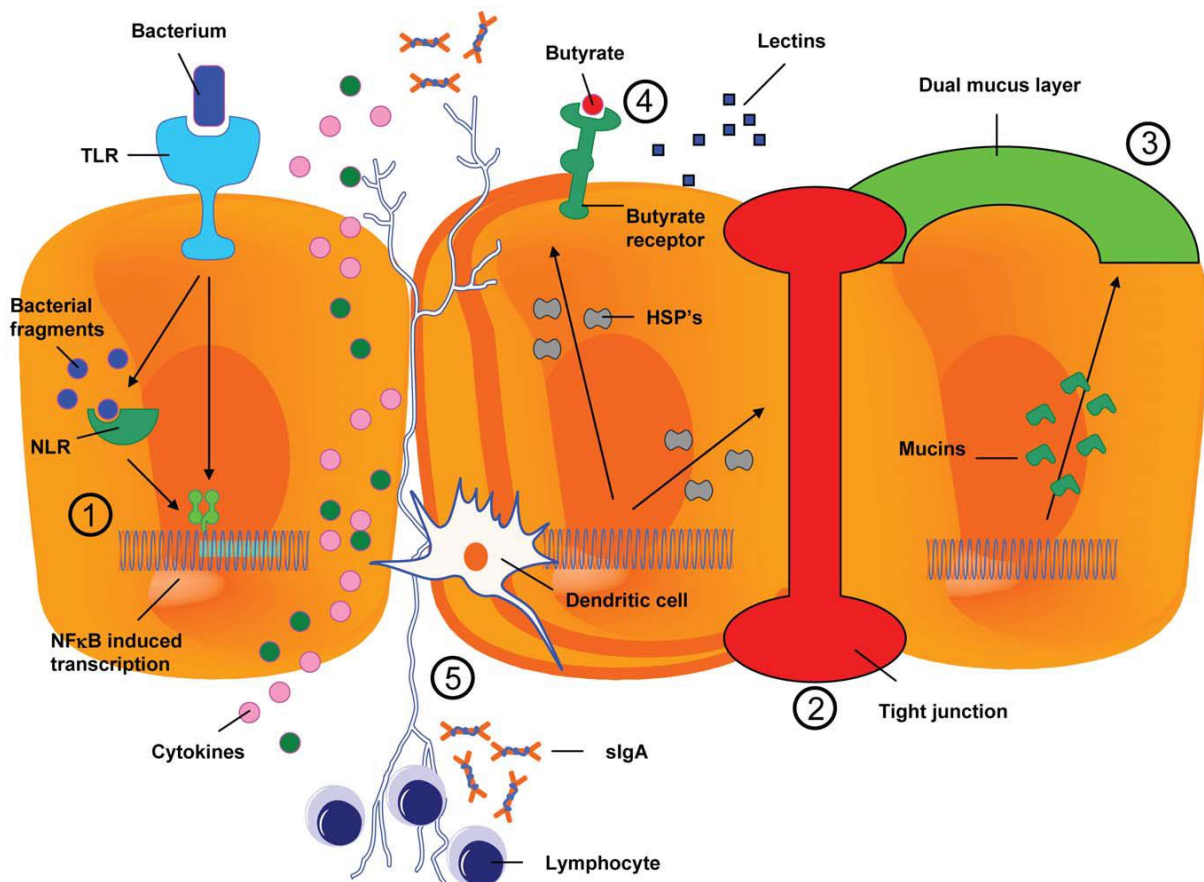


Figura 7: Representación de las rutas por las cuales las bacterias probióticas pueden prevenir y/o disminuir el grado de mucositis: 1-Procesos inflamatorios, 2-Permeabilidad intestinal, 3-Composición de la capa de mucus, 4-Resistencia a estímulos tóxicos y reparación epitelial y 5-Inducción y producción de moléculas efectoras del sistema inmune (van Vliet y col., 2010).

Por tanto, mediante el restablecimiento de la composición microbiana normal del intestino de los pacientes podría incrementarse la dosis de antitumorales, alcanzándose de esta forma un mayor éxito en el tratamiento. Puesto que a consecuencia de la terapia contra el cáncer los pacientes presentan en ocasiones condiciones de inmunodepresión, para evitar problemas derivados de infecciones, las bacterias viables y completas podrían sustituirse por partes de las mismas en un hipotético complemento probiótico paralelo a la quimioterapia.

2.2. Antecedentes

Los compuestos antitumorales destruyen rápidamente las células que se están dividiendo y el TGI se hace muy vulnerable. Desde el primer día de quimioterapia ya se observa un incremento de la apoptosis en células de las paredes intestinales, seguido de una reducción del tamaño de las criptas y del área de las vellosidades, así como un descenso del índice mitótico. La atrofia del epitelio intestinal continúa hasta el quinto día y no se recupera el estado fisiológico normal hasta dos semanas después de finalizar el tratamiento (Keefe y col., 2000).

El tiempo de hospitalización y el nivel de infección se incrementa en los pacientes con tumores sólidos que desarrollan mucositis (Elting y col., 2003). Esta enfermedad se relaciona también con una ralentización en la cura del cáncer como consecuencia de las dosis reducidas que se tienen que emplear en estos pacientes, o debido a los periodos de interrupción y/o fraccionamiento de la quimioterapia.

Durante los últimos años no ha habido grandes avances en el tratamiento de la mucositis, no existiendo ningún principio activo o asociación que suponga una mejora importante. Por tanto, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias que protejan el TGI durante los tratamientos con quimioterapia. Actualmente, existen trabajos que demuestran el efecto de bacterias probióticas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en el re-establecimiento de las funciones epiteliales y en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades (Mayo y col., 2008). Sin embargo, hay muy pocos estudios sobre el tratamiento de los desórdenes gastrointestinales derivados de la quimioterapia con bacterias probióticas. Tooley y col. estudiaron el efecto de una cepa de *Streptococcus thermophilus* sobre el desarrollo de la mucositis inducida por el compuesto metotrexato, obteniendo resultados contradictorios (Tooley y col., 2006, 2011). También se ha ensayado el producto probiótico comercial VSL#3, compuesto por 4 cepas de lactobacilos, 3 cepas de bifidobacterias y 1 cepa de *S. thermophilus* (Bowen y col., 2007). Aunque se observó una reducción en el grado de toxicidad inducida por el irinotecán, estas bacterias no han sido seleccionadas de forma específica para los tratamientos y cumplen simplemente los criterios generales de los probióticos.

2.3. Fundamentos experimentales

En este proyecto se estudiará la resistencia a los compuestos antitumorales en las BAL, y se seleccionarán cepas resistentes para su futuro uso como probióticos en pacientes con cáncer sometidos a terapia antitumoral.

Para alcanzar esta propuesta, se comenzará por determinar el grado de sensibilidad/resistencia de las BAL a diversos antitumorales. En esta primera aproximación, el trabajo se centrará en dos de los tipos de cáncer mayoritarios: el de mama y el de pulmón. El estudio se llevará a cabo utilizando la técnica de microdilución en placa microtituladora (Figura 8). Huys y col. (2010) estandarizaron la cantidad de inóculo, medio y condiciones de cultivo para la determinación del grado de sensibilidad/resistencia a antibióticos en BAL. Sus indicaciones han permitido definir puntos de corte para la mayoría de los compuestos antimicrobianos en este grupo de microorganismos, pudiendo así discriminar entre bacterias sensibles y resistentes. No existe, en cambio, ningún tipo de caracterización sobre el nivel de resistencia que las BAL pueden ofrecer a los compuestos citotóxicos o citostáticos utilizados en la terapia anticancerígena. Puesto que no hay ninguna publicación al respecto, se utilizará la técnica de microdilución para determinar la resistencia a los antitumorales en cepas de BAL de referencia, así como en aislados procedentes del TGI.



Figura 8: Placa microtituladora de 96 pocillos (<http://www.edgebio.com/products/96-well-treated-microplates-u-bottom-50063>).

Todos los aislados deben ser identificados y tipificados, y para ello se utilizarán las técnicas de Análisis de Restricción de ADN Ribosómico Amplificado (ARDRA) y la Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD), respectivamente. La técnica ARDRA

ha sido ampliamente empleada en la identificación de BAL (Rodas y col., 2003). Este método comienza con una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar un fragmento de ADN que codifica el ARN de la subunidad ribosomal 16S. Puesto que el amplicón posee una secuencia muy conservada a nivel de especie, se pueden distinguir especies tras su digestión con distintos enzimas de restricción (Figura 9A). Por otro lado, la técnica RAPD se encuentra entre las manejadas frecuentemente en la tipificación de BAL (Bunešová y col., 2012). Este método también se basa en una reacción de PCR, pero en la cual se utiliza un solo oligonucleótido. De esta forma, sin necesidad de conocer la secuencia del ADN molde se amplificarán fragmentos de manera aleatoria, obteniendo perfiles idénticos en aquellos aislados de una misma cepa (Figura 9B).

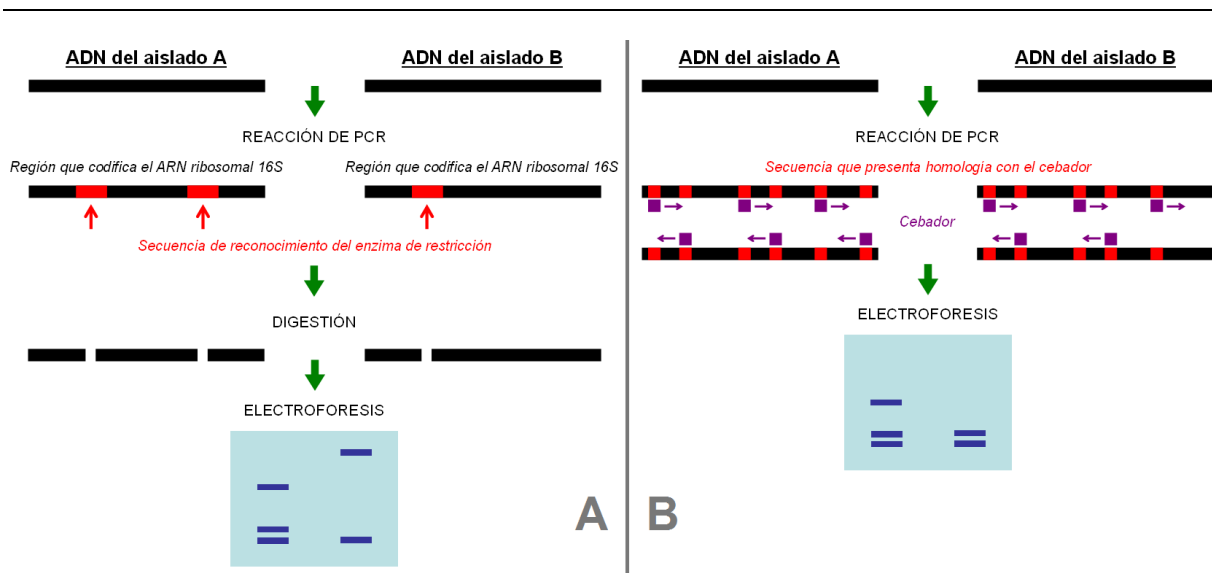


Figura 9: A) Modelo explicativo de la técnica de identificación molecular ARDRA. Los aislados del ejemplo pertenecen a especies distintas. B) Modelo explicativo de la técnica de tipificación molecular RAPD. Los aislados son diferentes cepas.

En trabajos previos (Hidalgo-Cantabrana y col., 2013) se ha estudiado el efecto que distintas BAL ejercen sobre el crecimiento y proliferación de las líneas celulares epiteliales HT29 y Caco-2, así como su influencia en la producción de citoquinas. En este proyecto se utilizará la misma metodología para ensayar la posible protección que las BAL resistentes a antitumorales pueden mostrar para una línea epitelial en presencia de estos fármacos.

Una línea celular es un cultivo celular perpetuado generado a partir de una muestra inicial. Todas sus células son descendientes de aquellas que formaron el cultivo primario. La línea HT29 está formada por células con morfología epitelial procedentes de un adenocarcinoma colorrectal humano. Es habitualmente empleada como modelo experimental

para el cáncer de colon (Anitha y col., 2014) y, a su vez, se utiliza en estudios *in vitro* de absorción, transporte y secreción en células intestinales (Colombini y col., 2013). Además, numerosos grupos han investigado las respuestas epiteliales a las bacterias con ella (Otte y col., 2004).

En el IPLA se dispone de un sistema biosensor micro-electrónico (xCELLingence RTCA DP, ACEA Biosciences) que permite analizar el comportamiento y la dinámica de células eucariotas adherentes en tiempo real y sin necesidad de marcaje. Las microplacas en las que crecen las células poseen microelectrodos-sensores situados en su parte inferior. El equipo se encarga de medir el cambio en la impedancia registrado al modificarse el ambiente iónico local en la interfaz electrodo/solución de cultivo. La impedancia es una magnitud eléctrica que expresa la oposición que un circuito presenta al paso de la corriente cuando se aplica un voltaje, y extiende el concepto de resistencia a la corriente alterna. Por tanto, cuanto mayor es el número de células que se fijan a los electrodos, mayor es el incremento de la impedancia. La señal así producida es transmitida e integrada por un software de análisis que permite la monitorización del cultivo mediante gráficos. Éstos muestran la progresión en tiempo real del índice celular (IC), un parámetro adimensional que expresa el cambio medido en la impedancia, es decir, el aumento o disminución del número de células o su expansión (Figura 10). De esta manera, si alguna de las cepas de BAL resistentes redujese la toxicidad de un antitumoral, se podría detectar en directo.

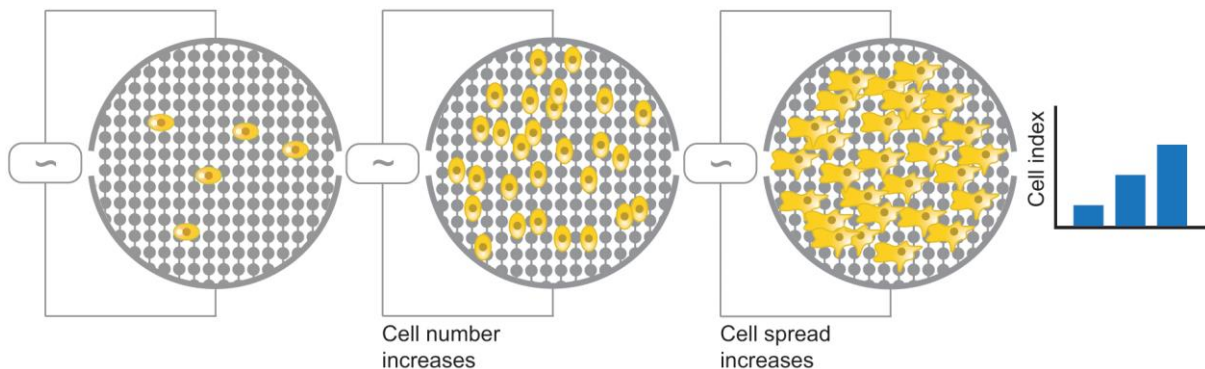


Figura 10: Bases del funcionamiento del equipo xCELLingence RTCA DP (Limame y col., 2012).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos, medios y condiciones de cultivo

Los microorganismos empleados en la realización de este trabajo fueron: 23 cepas tipo de BAL pertenecientes a las Colecciones Belgas Coordinadas de Microorganismos (LMG), 7 cepas tipo de bacterias intestinales no lácticas de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ), 4 cepas de bacterias Gram-negativas aisladas de una industria láctea y 32 aislados de bifidobacterias procedentes de heces y mucosa gastrointestinal humanas (en las tablas 5 y 6 se recogen todas las especies analizadas).

Las cepas de *Lactobacillus casei*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum* y *Lb. sakei* subsp. *sakei* se recuperaron en medio de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar (Scharlau), y se incubaron en una atmósfera aerobia a una temperatura de 32 °C durante 48 h. Las pertenecientes al género *Bifidobacterium*, así como *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. fermentum*, *Lb. gasseri*, *Lb. helveticus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. reuteri* y *Lb. rhamnosus*, se cultivaron en MRS Agar suplementado con un 0,25% de cisteína (VWR) (MRSc), y se incubaron en anaerobiosis y a 37 °C durante 48 h. Las cepas del género *Lactococcus* se cultivaron en medio M17 Agar (Oxoid) con un 1% de glucosa (Merck), y se incubaron en aerobiosis y a 32 °C durante 48 h. *Streptococcus termophilus* se cultivó en medio M17 Agar suplementado con un 1% de lactosa (Merck), incubándose en condiciones de anaerobiosis y 42 °C durante 48 h.

Las bacterias intestinales *Bacteroides* sp., *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus obeum*, *Blautia cocoides* y *Slackia* sp. se cultivaron en los medios Gifu Anaerobic Broth (GAM) Agar (Nissui), Reinforced Clostridial Medium (RCM) Agar (Merck), 50% RCM (Merck)/50% Brain Heart Infusion (BHI) Agar (Merck), y GAM Agar suplementado con un 0,5% de arginina (Merck), respectivamente. Todas las cepas se incubaron en condiciones de anaerobiosis y 37 °C durante 48 h.

Por último, las cepas Gram-negativas se crecieron en medio BHI (Merck) y se incubaron en una atmósfera aerobia a 37 °C durante 24 h.

Tras el periodo de incubación a la temperatura y atmósfera adecuadas se obtuvieron colonias aisladas para cada una de las cepas o aislados objeto de estudio.

Los microorganismos se conservaron a -80 °C en las versiones líquidas de los medios previamente descritos, suplementados con un 20% de glicerol como agente crioprotector.

3.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

La CIM de 12 compuestos antitumorales diferentes para las bacterias citadas en el apartado anterior se determinó mediante el método de dilución en placa microtituladora.

Con el fin de preparar inóculos estandarizados, se resuspendieron varias colonias aisladas de cada cepa o aislado en 5 mL de una solución salina estéril (0,9% NaCl) hasta conseguir una densidad óptica (DO) correspondiente con 1 en la escala de McFarland o con una DO_{590nm} equivalente de 0,16-0,20. Este inóculo se corresponde con una densidad bacteriana de 3×10^8 UFC/mL. A partir de esta suspensión se realizó un inóculo 1:1000 en el medio de cultivo utilizado para cada microorganismo.

Las CIM se obtuvieron tras incubar 100 μ L de la suspensión bacteriana junto con 100 μ L del medio de cultivo líquido adecuado, suplementado con los distintos antitumorales en un rango de concentraciones entre 0,0625-128 μ g/mL o 2-256 μ g/mL, en placas microtituladoras de 96 pocillos. El valor de CIM para cada cepa o aislado se corresponde con la primera concentración de antitumoral para la que visualmente no se observa crecimiento.

En la Tabla 2 se recogen los medios y condiciones de cultivo en las cuales se llevó a cabo el ensayo de sensibilidad/resistencia a antitumorales para cada microorganismo o grupo de microorganismos estudiados.

Tabla 2. Medios y condiciones de cultivo utilizados para llevar a cabo los ensayos de microdilución.

ESPECIE	MEDIO	TEMPERATURA	ATMÓSFERA
LACTOCOCOS			
<i>Lactococcus sp.</i>	IST ¹	32 °C	Aerobia
ESTREPTOCOCOS			
<i>S. thermophilus</i>	IST + 1% lactosa	42 °C	Anaerobia
LACTOBACILOS HETEROFERMENTADORES FACULTATIVOS			
<i>Lb. brevis</i>	LSM ²	37 °C	Anaerobia
<i>Lb. casei</i>	IST	32 °C	Aerobia
<i>Lb. fermentum</i>	LSM	37 °C	Anaerobia
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	LSM	32 °C	Aerobia
<i>Lb. pentosus</i>	LSM	32°C	Aerobia
<i>Lb. plantarum</i>	IST	32 °C	Aerobia
<i>Lb. reuteri</i>	LSMc ³	37 °C	Anaerobia

Tabla 2 (continuación)

ESPECIE	MEDIO	TEMPERATURA	ATMÓSFERA
LACTOBACILOS HETEROFERMENTADORES FACULTATIVOS			
<i>Lb. rhamnosus</i>	LSMc	37 °C	Anaerobia
<i>Lb. sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	LSM	32 °C	Aerobia
LACTOBACILOS HOMOFERMENTADORES			
<i>Lb. acidophilus</i>	LSMc	37 °C	Anaerobia
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	LSMc	37 °C	Anaerobia
<i>Lb. gasseri</i>	LSMc	37 °C	Anaerobia
<i>Lb. helveticus</i>	LSM	37 °C	Anaerobia
<i>Lb. johnsonii</i>	LSMc	37 °C	Anaerobia
BIFIDOBACTERIAS			
<i>Bifidobacterium</i> sp.	LSMc	37 °C	Anaerobia
BACTERIAS INTESTINALES NO LÁCTICAS			
<i>Bacteroides</i> sp.	M1 ⁴	37 °C	Anaerobia
<i>B. coccoides</i>	M1	37 °C	Anaerobia
<i>F. prausnitzii</i>	M1	37 °C	Anaerobia
<i>R. obeum</i>	M1	37 °C	Anaerobia
<i>Slackia</i> sp.	M1	37 °C	Anaerobia
GRAM-NEGATIVAS			
<i>Escherichia coli</i>	IST	37 °C	Aerobia
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IST	37 °C	Aerobia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IST	37 °C	Aerobia
<i>Serratia marcescens</i>	IST	37 °C	Aerobia

¹ Isosensitest (IST, Oxoid); ² Lactic acid bacterium Susceptibility test Medium (LSM: 90% IST + 10% MRS); ³ LSMc (LSM + 0,03% cisteína); ⁴ M1 (IST + 10% GAM + 0,25% cisteína).

3.3. Aislamiento del ADN total

El ADN total se obtuvo a partir de extractos celulares. Varias colonias aisladas de los microorganismos a analizar se resuspendieron en 100 µL de H₂O de grado molecular (Sigma) hasta obtener una DO aproximada de 2 en la escala de McFarland. La lisis bacteriana se llevó a cabo mediante tratamiento térmico a 98 °C durante 15 min. Posteriormente, se añadieron 100 µL de cloroformo al lisado y se agitó durante 10 s para completar la lisis y mezclar los reactivos. Por último, se centrifugó la mezcla durante 5 min a 13200 rpm y se recogió la fase

superior, en la cual se encuentra el ADN libre de restos celulares. Las muestras de ADN total se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

3.4. Identificación molecular mediante ARDRA

Para la identificación molecular mediante ARDRA se amplificó un fragmento de 1,5 kpb correspondiente al gen que codifica el ARN ribosomal 16S utilizando los oligonucleótidos universales para bacterias 27F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane y col., 1985). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL, los cuales contenían: 7 µL del extracto libre de células; 25 µL de la mezcla "Taq Master Mix" 2× (Ampliqon) que incluye ADN polimerasa, tampón del enzima polimerasa y nucleótidos; 1,5 µL de cada cebador (10µM) y 15 µL de H₂O de grado molecular.

La amplificación se realizó en un termociclador "MyCycler" (Bio-Rad) y las condiciones de PCR fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C de 5 min de duración; 40 ciclos a 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 45 s y 72 °C durante 2 min; y un ciclo final de extensión a 72 °C durante 10 min.

Los productos de PCR se visualizaron exponiéndose a luz ultravioleta (UV), tras electroforesis a 75 V en geles de agarosa (1,2%) durante 60 min y posterior tinción en una solución de bromuro de etidio (0,5 mg/mL).

A continuación, los productos de PCR se digirieron con los enzimas de restricción BamHI, HindIII y HinfI. En esta reacción se utilizaron 4 µL del amplicón, 1 µL del enzima de restricción, 1 µL del tampón de digestión y 4 µL de H₂O de grado molecular, los cuales se incubaron a 37 °C durante 1 h.

Los diferentes perfiles de restricción se pusieron de manifiesto mediante electroforesis en gel de agarosa, tinción con bromuro de etidio y exposición a luz UV.

3.5. Tipificación molecular mediante RAPD

La tipificación molecular a nivel de cepa se llevó a cabo utilizando la técnica RAPD. Se realizó una reacción de PCR en un volumen final de 25 µL, que contenían: 5 µL del extracto de ADN total, 12,5 µL de la mezcla "Master Mix" 2× (Ampliqon), 5 µL del cebador OPA18 (5'-AGGTGACCGT-3') (Mättö y col., 2004) y 2,5 µL de H₂O de grado molecular.

La amplificación se llevó a cabo utilizando las condiciones de PCR que se describen a continuación: un ciclo a 95 °C de 5 min; 35 ciclos a 95 °C durante 1 min, a 32 °C durante 1 min y 72 °C durante 2 min; y un ciclo final a 72 °C durante 10 min.

Los amplicones obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa, tinción en bromuro con etidio y se visualizaron tras su exposición a la luz UV.

3.6. Preparación de muestras para el co-cultivo

Previamente a la realización del co-cultivo, se llevaron a cabo una serie de ensayos para asegurarse de que el microorganismo seleccionado no afectase a las células eucarióticas. En primer lugar, se comprobó si la cepa de BAL elegida era capaz de crecer en el medio de cultivo de la línea HT29: Medio de McCoy (Sigma) suplementado con un 20% de suero fetal bovino inactivado por calor (Sigma) y glutamina (Sigma) 3 mM. Para ello, se inoculó la bacteria en 10 mL de medio MRSc líquido y se incubó durante 18 h en condiciones de anaerobiosis a 37 °C. Después, se centrifugó el cultivo a 8000 rpm durante 5 min, y el precipitado obtenido se lavó en dos ocasiones con Tampón Fosfato Salino (PBS). Seguidamente, se resuspendieron los precipitados en 10 mL del medio de la línea celular y se incubaron a 37 °C y en una atmósfera con un 5% de CO₂ (mismas condiciones en las que se cultivan las líneas celulares). Los ensayos se repitieron utilizando esta vez el mismo medio de la línea HT29 suplementado con la siguiente combinación de antibióticos: 50 µg/mL de estreptomina-penicilina, 50 µg/L de gentamicina y 1,25 µg/L de anfotericina B (todos ellos de la casa comercial Sigma).

Con el fin de obtener suficiente inóculo bacteriano para realizar los ensayos de co-cultivo, se partió de un cultivo bacteriano de 18 h y se realizó un inóculo al 2% en volúmenes superiores de medio MRSc líquido. Tras 24-48 h de incubación se llevó a cabo una estimación de la densidad celular mediante recuentos en placa y espectrofotometría a 600 nm de longitud de onda. Paralelamente, se centrifugaron los cultivos a 10000 rpm durante 5 min y se lavó el precipitado obtenido con PBS. A continuación, las células bacterianas se resuspendieron en 20 mL del mismo tampón y se inactivaron sometiéndolas a radiación UV durante tres ciclos de 30 min. Por último, las células se centrifugaron una vez más y se resuspendieron en PBS para su posterior congelación rápida en nitrógeno líquido, evitándose así la ruptura de las bacterias. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

La línea HT29 se propagó rutinariamente en Medio de McCoy suplementado con un 20% de suero fetal bovino inactivado por calor y glutamina 3 mM. Las incubaciones tuvieron lugar a una temperatura de 37 °C y en una atmósfera con un 5% de CO₂. Los medios de cultivo se cambiaron cada dos días y las células fueron tripsinizadas semanalmente utilizando una disolución de tripsina-EDTA (Sigma) al 0,25%.

3.7. Ensayos de co-cultivo células epiteliales-BAL-compuesto antitumoral

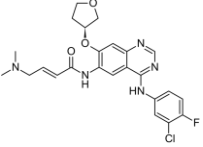
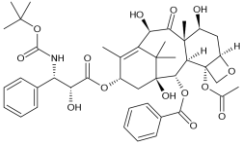
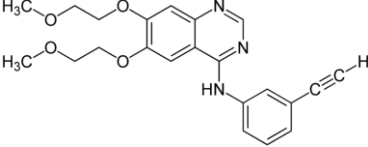
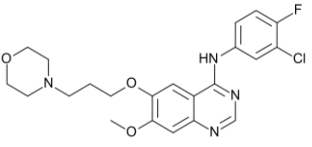
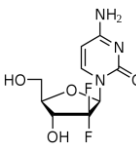
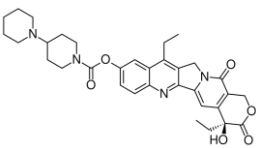
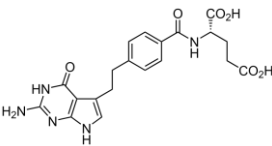
Al menos 2 h antes de realizar cada ensayo, el equipo xCELLingence RTCA DP se introdujo en un incubador a 37 °C y una atmósfera con un 5% de CO₂.

Las línea HT29 se cultivó en el mismo medio en el cual fue propagada, esta vez en placas E-plate (Roche) de 16 pocillos conectadas al sistema biosensor. Tras determinar la viabilidad celular mediante exclusión por azul de tripán, se depositaron 2×10^5 células HT29 por pocillo (100 µL) para obtener un cultivo en confluencia, estado que más se asemeja al epitelio intestinal, a las 20-22 h.

Pasado este periodo de tiempo, se hicieron ensayos en los cuales se cultivaron durante 24 h: células eucarióticas, células eucarióticas y bacterianas, células eucarióticas en presencia de un antitumoral o células eucarióticas y bacterianas en presencia de un antitumoral. Para ello se añadieron a los pocillos 200 µL de medio McCoy con suspensión bacteriana de 10^8 o 10^9 UFC/mL y/o una concentración final del antitumoral entre 16 y 128 µg/mL.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4: Relación de los fármacos antitumorales utilizados en el tratamiento del cáncer de pulmón empleados en este trabajo¹.

CÁNCER DE PULMÓN			
COMPUESTO	ESTRUCTURA QUÍMICA	TIPO DE FÁRMACO	MODO DE ACCIÓN
Afatinib		Agente de terapia dirigida	Inhíbe al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)
Docetaxel		Agente antimicrotúbulos	Promueve el ensamblaje de los microtúbulos e impide su desensamblaje
Erlotinib		Agente de terapia dirigida	Inhíbe al EGFR
Gefitinib		Agente de terapia dirigida	Inhíbe al EGFR
Gemcitabina		Antimetabolito	Antagonista de las bases nitrogenadas pirimidínicas
Irinotecán		Inhibidor de las topoisomerasas	Inhíbe a la topoisomerasa I
Pemetrexed		Antimetabolito	Antagonista del ácido fólico

¹Fuente: <http://www.chemocare.com/>

En la página siguiente (Tabla 5) se recogen los valores de CIM para 23 cepas tipo de BAL frente a los antitumorales reflejados en las tablas anteriores, obtenidos a partir de los ensayos de microdilución descritos en el apartado previo.

Tabla 5: CIM obtenidas para las 23 cepas tipo de BAL.

ESPECIE	CÓDIGO	CIM (µg/mL)											
		A ¹	CA ²	CI ³	DC ⁴	DX ⁵	E ⁶	F ⁷	GF ⁸	GM ⁹	I ¹⁰	PE ¹¹	PA ¹²
LACTOCOCOS													
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	LMG6987	32	> 128	> 128	> 128	32	> 128	> 128	> 128	16	> 128	> 128	> 128
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	LMG6890	32	> 128	> 128	> 128	4	> 128	64	> 128	0,5	> 128	> 128	> 128
ESTREPTOCOCOS													
<i>S. thermophilus</i>	LMG6896	128	> 128	> 128	> 128	8	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
LACTOBACILOS HETEROFERMENTADORES FACULTATIVOS													
<i>Lb. brevis</i>	LMG6906	128	> 128	> 128	> 128	4	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Lb. casei</i>	LMG6904	64	> 128	> 128	> 128	8	> 128	> 128	> 128	16	> 128	8	> 128
<i>Lb. fermentum</i>	LMG6902	128	> 128	> 128	> 128	4	> 128	> 128	> 128	16	> 128	> 128	> 128
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	LMG13087	64	> 128	> 128	> 128	16	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	16	> 128
<i>Lb. pentosus</i>	LMG10755	64	> 128	> 128	> 128	4	> 128	8	> 128	0,5	> 128	> 128	> 128
<i>Lb. plantarum</i>	LMG6907	128	> 128	> 128	> 128	16	> 128	> 128	> 128	2	> 128	> 128	> 128
<i>Lb. reuteri</i>	LMG9213	64	> 128	> 128	> 128	4	> 128	128	> 128	> 128	> 128	≤ 0,0625	> 128
<i>Lb. rhamnosus</i>	LMG6400	> 128	> 128	> 128	> 128	16	> 128	> 128	> 128	128	> 128	> 128	> 128
<i>Lb. sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	LMG9468	32	> 128	> 128	> 128	64	> 128	128	> 128	1	> 128	> 128	> 128
LACTOBACILOS HOMOFERMENTADORES													
<i>Lb. acidophilus</i>	LMG9433	64	> 128	> 128	> 128	2	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	LMG6901	128	> 128	> 128	> 128	1	> 128	0,25	> 128	0,5	> 128	0,125	> 128
<i>Lb. gasseri</i>	LMG9203	> 128	> 128	> 128	> 128	8	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Lb. helveticus</i>	LMG6413	128	> 128	> 128	> 128	2	> 128	> 128	> 128	2	> 128	> 128	> 128
<i>Lb. johnsonii</i>	LMG9436	> 128	> 128	> 128	> 128	8	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
BIFIDOBACTERIAS													
<i>B. adolescentis</i>	LMG10502	128	> 128	> 128	> 128	1	> 128	32	> 128	> 128	> 128	128	> 128
<i>B. animalis</i>	LMG10508	64	> 128	> 128	> 128	4	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	≤ 0,0625	> 128
<i>B. longum</i> biotipo <i>longum</i>	LMG13197	128	> 128	> 128	> 128	4	> 128	128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	LMG11571	128	> 128	> 128	> 128	8	> 128	128	> 128	> 128	> 128	≤ 0,0625	> 128
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	LMG11569	64	> 128	> 128	> 128	4	> 128	128	> 128	> 128	> 128	≤ 0,0625	> 128
<i>B. termophilum</i>	LMG21813	64	> 128	> 128	> 128	4	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	0,5	> 128

¹A= Afatinib, ²CA = Capecitabina, ³CI = Ciclofosfamida, ⁴DC = Docetaxel, ⁵DX = Doxorubicina, ⁶E = Erlotinib, ⁷F = 5-fluorouracilo, ⁸GF = Gefitinib, ⁹GM = Gemcitabina, ¹⁰I = Irinotecán, ¹¹PE = Pemetrexed, ¹²PA = Paclitaxel.

Como se puede observar en la tabla, existen ciertos patrones comunes con respecto a los perfiles de sensibilidad/resistencia de las BAL a los compuestos antitumorales.

Las 23 cepas ensayadas mostraron resistencia a altas concentraciones ($> 128 \mu\text{g/mL}$) de capecitabina, ciclofosfamida, docetaxel, erlotinib, gefitinib, irinotecán y paclitaxel.

En cuanto al docetaxel y el paclitaxel, la elevada resistencia de las bacterias a los mismos entra dentro de lo esperado, pues los microtúbulos, dianas de acción de ambos compuestos, son estructuras exclusivas de las células eucarióticas.

Del mismo modo, la resistencia que las BAL analizadas presentan frente a erlotinib y gefitinib podría ser debida a que se trata de agentes de terapia dirigida, fármacos cuya diana de acción es un aspecto característico de las células cancerosas. En este caso tienen como blanco el EGFR, el cual se desregula por sobreexpresión o mutaciones que provocan su activación contribuyendo al desarrollo de algunos tipos de cáncer.

Además, las BAL también mostraron valores de CIM mayores de $128 \mu\text{g/mL}$ para capecitabina, ciclofosfamida e irinotecán. Estos agentes anticancerígenos actúan interfiriendo en la división celular tanto de células eucariotas como procarióticas a través de la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos o desestabilizando la doble hebra del ADN. Por tanto, esta resistencia podría derivar de la presencia de estructuras tales como la pared celular, ausente en las células animales, y que en estas bacterias actuaría como una barrera protectora que los antitumorales no pueden sortear. La resistencia de las BAL a los aminoglicósidos es un ejemplo de resistencia intrínseca por un ineficiente transporte de compuestos tóxicos (antimicrobianos) al interior de la célula (Danielsen y Wind, 2003). Otros mecanismos de resistencia a antibióticos descritos previamente en BAL podrían ser también el origen de su resistencia a antitumorales. Entre ellos cabe destacar la resistencia por modificación de la diana celular sobre la que actúa el compuesto (Flórez y col., 2007), o bien el transporte específico o inespecífico del mismo al exterior de la bacteria (Margolles y col., 2006; Ammor y col., 2008).

De forma contraria a lo detallado en los párrafos anteriores, entre estas 23 cepas tipo se puede apreciar una gran sensibilidad a la doxorubicina, con CIM que oscilan entre 1 y $16 \mu\text{g/mL}$, a excepción de las cepas *Lc. lactis* subsp. *cremoris* LMG6987 y *Lb. sakei* subsp. *sakei* LMG9468 con valores ligeramente superiores (32 y $64 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). La sensibilidad a este compuesto antitumoral podría deberse a su naturaleza antimicrobiana

frente a bacterias Gram-positivas. La doxorubicina pertenece a la familia de las antraciclinas, un grupo de sustancias con propiedades citotóxicas producidos por bacterias del género *Streptomyces*, que entorpecen la división celular afectando a aspectos comunes a todas las formas de vida. Además, su citotoxicidad también es debida a la generación de radicales libres de oxígeno, perjudiciales para eucariotas y procariotas de igual manera.

Sorprendentemente, muchas de las BAL estudiadas presentan cierta sensibilidad al afatinib. Este compuesto pertenece al grupo de agentes de terapia dirigida al igual que los antitumorales erlotinib y gefitinib, para los cuales las mismas cepas mostraron una alta resistencia. La sensibilidad al afatinib, y no al erlotinib y gefitinib, podría deberse a una unión diferencial de estos compuestos a las proteínas sobre las que actúan. Mientras que los antitumorales erlotinib y gefitinib se unen al EGFR mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, de carácter reversible, el afatinib ejerce su efecto inhibitorio mediante uniones covalentes, de naturaleza irreversible (Solca y col., 2012). Además, el EGFR pertenece a la familia de las tirosina quinasa, un amplio grupo de proteínas responsables de numerosas funciones de gran importancia para las células, como el control del ciclo celular, la mitosis y los procesos de transducción de señales, en el caso de aquellas que se encuentran en el citosol; o la señalización transmembrana, en el caso de las que funcionan como receptores. Como consecuencia de todo esto, el afatinib podría unirse a alguna tirosina quinasa de estructura similar al EGFR cuya actividad sea indispensable para el crecimiento bacteriano.

Por último, las cepas tipo de BAL mostraron perfiles de sensibilidad/resistencia muy diversos para los compuestos antitumorales 5-fluorouracilo, gemcitabina y pemetrexed. Las CIM para el 5-fluorouracilo y la gemcitabina variaron entre 0,25-0,5 y $> 128 \mu\text{g/mL}$ según la especie analizada. Estas diferencias se hacen más acusadas en el pemetrexed, con el cual se registraron CIM tan dispares como $> 128 \mu\text{g/mL}$ y $\leq 0,0625 \mu\text{g/mL}$. Estos compuestos antitumorales actúan como antimetabolitos y podrían entorpecer la maquinaria metabólica de cualquier célula. Sin embargo, los microorganismos con los que se realizó el análisis pertenecen a diferentes géneros y especies bacterianas. Aunque todas ellas se asocian al grupo de las BAL, muestran multitud de diferencias estructurales y/o metabólicas que pueden explicar el heterogéneo grado de sensibilidad/resistencia a estos compuestos antitumorales.

Se analizaron también 7 cepas tipo de bacterias intestinales no lácticas y 4 cepas de especies Gram-negativas aisladas en una industria láctea. Estos grupos se añadieron al estudio con el fin de comparar los perfiles de sensibilidad/resistencia de las bacterias Gram-positivas

con los de otras bacterias representantes de los grupos microbianos mayoritarios del TGI, así como con las Gram-negativas. En la página siguiente (Tabla 6) se recogen los valores CIM obtenidos para estos microorganismos.

Tabla 6: CIM obtenidas para las 7 cepas tipo de bacterias intestinales no lácticas y las 4 cepas de bacterias Gram-negativas aisladas de una industria láctea.

ESPECIE	CÓDIGO	CIM (µg/mL)											
		A ¹	CA ²	CI ³	DC ⁴	DX ⁵	E ⁶	F ⁷	GF ⁸	GM ⁹	I ¹⁰	PE ¹¹	PA ¹²
BACTERIAS INTESTINALES NO LÁCTICAS													
<i>Bacteroides fragilis</i>	DSM2151	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	DSM2079	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Blautia coccooides</i>	DSM935	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	DSM17677	> 128	> 128	> 128	> 128	32	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Ruminococcus obeum</i>	DSM25238	> 128	> 128	> 128	> 128	64	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Slackia equolifaciens</i>	DSM24851	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Slackia isoflavoniconvertens</i>	DSM22006	> 128	> 128	> 128	> 128	32	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
GRAM-NEGATIVAS													
<i>Escherichia coli</i>	-	> 128	> 128	> 128	> 128	128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	> 128	> 128	> 128	> 128	128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Serratia marcescens</i>	-	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128

¹A= Afatinib, ²CA = Capecitabina, ³CI = Ciclofosfamida, ⁴DC = Docetaxel, ⁵DX = Doxorrubicina, ⁶E = Erlotinib, ⁷F = 5-fluorouracilo, ⁸GF = Gefitinib, ⁹GM = Gemcitabina, ¹⁰I = Irinotecán, ¹¹PE = Pemetrexed, ¹²PA = Paclitaxel.

En general, las bacterias intestinales no lácticas y las Gram-negativas mostraron niveles de resistencia muy elevados (> 128µg/mL) para el conjunto de los antitumorales analizados, muy superiores a los detectados en las BAL para la mayoría de los compuestos.

Solamente se observó cierto nivel de sensibilidad frente al antitumoral doxorrubicina (32 µg/mL) en algunas cepas de bacterias intestinales no lácticas como *F. prausnitzii* DSM17677 y *S. isoflavoniconvertens* DSM22006.

La resistencia de las 4 cepas de Gram-negativas procedentes de una industria láctea a todos los compuestos ensayados podría deberse a una de las principales características que las distinguen de las bacterias Gram-positivas: la estructura de las envueltas celulares. Mientras que los microorganismos Gram-negativos poseen una membrana interna y una membrana

externa entre las cuales hay una capa de peptidoglicano, los Gram-positivos poseen una única membrana celular, cubierta en este caso por una capa de peptidoglicano de mayor grosor.

El alto nivel de resistencia a los antitumorales observado en el grupo de las bacterias intestinales no lácticas (todas Gram-positivas a excepción de *Bacteroides* sp.) puede ser debido a los mecanismos de resistencia intrínseca o adquirida descritos anteriormente para las BAL: ineficaz transporte del fármaco al interior de la célula, modificación de la diana celular sobre la que actúa el antitumoral o transporte específico e inespecífico del compuesto fuera de la bacteria.

A modo de recopilación, los datos obtenidos en este estudio de sensibilidad/resistencia sugieren que la población de BAL, presentes en el TGI o bien en otras mucosas como la de la cavidad oral, ve disminuida su viabilidad durante un tratamiento de quimioterapia con respecto a otras poblaciones bacterianas comensales tales como enterobacterias, bacteroides o clostridiales.

4.2. Determinación del nivel de resistencia a afatinib y pemetrexed en bifidobacterias aisladas del TGI humano

El género *Bifidobacterium* fue elegido para realizar un estudio más profundo a nivel poblacional de la resistencia a pemetrexed y afatinib. Se trata de una categoría taxonómica cuya presencia es importante en la microbiota intestinal, ya que se le atribuyen numerosas cualidades probióticas. En cuanto a los dos compuestos, se seleccionaron de entre todos los empleados en este trabajo en base a la gran variabilidad que presentaron en relación a su efecto sobre la viabilidad de las BAL, descrito en el apartado anterior. Además, las cepas tipo pertenecientes al grupo de las bifidobacterias mostraban diversidad de CIM para estos agentes químicos.

Por tanto, se analizó mediante microdilución en placa microtituladora la resistencia al afatinib y el pemetrexed en 32 aislados de bifidobacterias recuperados a partir de heces y mucosa gastrointestinal humanas. En estudios previos, éstos fueron asociados a las especies *B. animalis*, *B. longum* y *B. pseudocatenolatum* mediante análisis fenotípicos y posterior secuenciación de su ARN ribosomal 16S (Delgado Palacio, 2005). En la página siguiente (Figura 11) se expone la distribución de los valores de CIM obtenidos en estos ensayos.

Mientras que las CIM detectadas para el compuesto afatinib se acercan a una distribución normal, para el pemetrexed muestran una distribución mucho más asimétrica.

Además, las concentraciones a las cuales el afatinib inhibe el crecimiento bacteriano se concentran en el intervalo entre 32 y 256 $\mu\text{g/mL}$ estando, por el contrario, los valores de CIM para el pemetrexed distribuidos por todo el rango ensayado. Aunque para definir puntos de corte se necesitaría analizar un mayor número de aislados, en el caso del afatinib el 75% de los mismos no son capaces de resistir concentraciones superiores a 128 $\mu\text{g/mL}$ y el 100% es sensible al agente antineoplásico por encima de 256 $\mu\text{g/mL}$. Esto llevaría a proponer un punto de corte de 512 $\mu\text{g/mL}$ considerándose, por tanto, a los aislados cuya CIM fuese superior como resistentes al compuesto. De manera opuesta, la diversidad de CIM detectadas en las bifidobacterias para el antitumoral pemetrexed no permite establecer un punto de corte para la población dentro del rango de concentraciones analizado. En este caso, se observó que 3 aislados poseen una CIM ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ frente al compuesto, mientras que el 56% tienen una CIM ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$. Esta diferencia en el grado de resistencia al pemetrexed podría ser específica de especie y/o cepa, tendencia que se puede percibir en las dos cepas de *B. pseudolongum* de la Tabla 5.

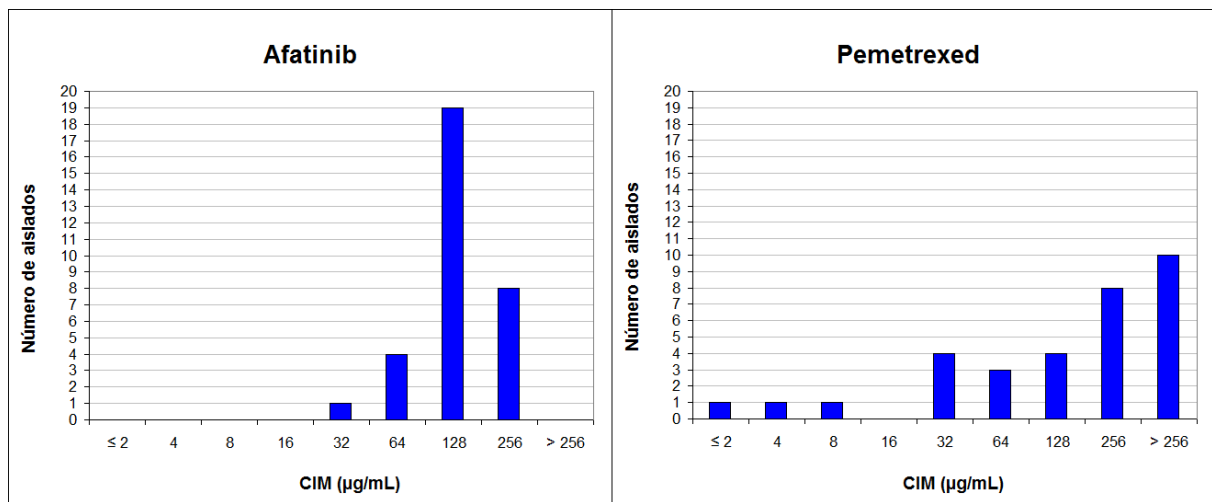


Figura 11: Distribución de las CIM para afatinib y pemetrexed en los 32 aislados de bifidobacterias procedentes del TGI humano.

4.3. Identificación y tipificación de los aislados de bifidobacterias

La identificación de los 32 aislados de bifidobacterias se realizó mediante la técnica molecular ARDRA. Para ello, se digirió un fragmento de 1,5 kpb del gen que codifica el ARN ribosómico 16S con diferentes enzimas de restricción: BamHI, HinfI y HindIII. Los resultados de esta prueba, visualizados tras electroforesis en geles de agarosa, se muestran en la siguiente página (Figura 12).

Como se puede apreciar en la imagen, con los enzimas BamHI y HinfI se obtuvo un único perfil de ARDRA para todos los aislados. Por tanto, no pueden ser utilizados para diferenciar las especies bacterianas a las que pertenecen los microorganismos. En cambio, la digestión con el enzima HindIII dio como resultado dos perfiles de restricción diferentes (Figura 12C), lo cual indicaría la presencia de dos especies bacterianas distintas, en contraposición con las tres a las que se habían asignado previamente. El primero de estos dos perfiles se correspondería con el obtenido por Delgado Palacio (2005) para la especie *B. animalis*, y el segundo con *B. longum* y *B. pseudocatenolatum*. Las especies *B. longum* y *B. pseudocatenolatum* se encuentran más relacionadas filogenéticamente entre sí que cada una de ellas con *B. animalis*, de ahí que sea más difícil su diferenciación mediante ARDRA. No obstante, estos resultados no coinciden con los tamaños esperados teóricamente mediante la digestión *in silico* del fragmento de 1,5 kpb del gen que codifica el ARN ribosomal 16S. Tales discrepancias pueden ser debidas a numerosos factores, encontrándose entre ellos el hecho de que la homología entre los genomas de dos cepas bacterianas pertenecientes a una misma especie no llega al 100%, pudiendo localizarse las heterogeneidades en sus operones ribosomales.

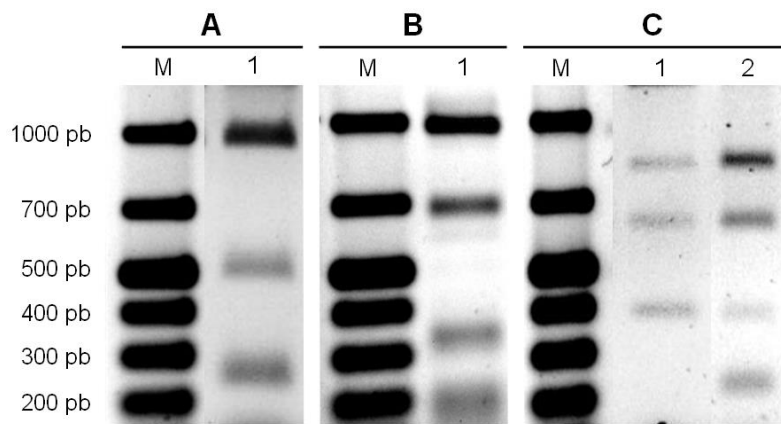


Figura 12: Diferenciación de especies mediante la técnica molecular ARDRA. En la imagen se muestran los diferentes perfiles obtenidos tras la amplificación de un fragmento del ARN ribosómico 16S y su digestión con varios enzimas de restricción (A: BamHI, B: HinfI, C: HindIII). La calle M se corresponde con el marcador molecular "GRS Universal Ladder" (Grisp).

Posteriormente, los 32 aislados de bifidobacterias se tipificaron mediante la técnica RAPD con el fin de determinar si realmente se estaban manejando cepas diferentes, o algunas de éstas eran aislados de una misma. En la Figura 13 se muestran algunos de los diferentes perfiles obtenidos con el oligonucleótido OPA18. En total, el 90% de los aislados de bifidobacterias presentaron un perfil diferente.

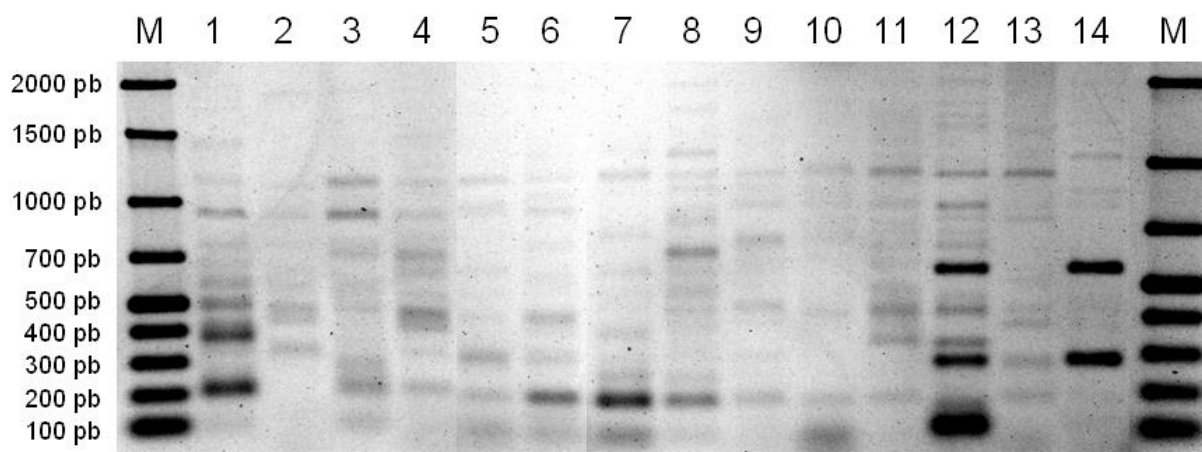


Figura 13: Diferenciación de cepas mediante la técnica molecular RAPD. En la imagen se muestran algunos de los diferentes perfiles obtenidos (calles 1 a 14) tras amplificar el ADN total de los aislados con el oligonucleótido OPA18. La calle M se corresponde con el marcador molecular “GRS Universal Ladder”.

4.4. Selección de antitumoral y cepa para el co-cultivo

Se seleccionó un único compuesto antitumoral de entre todos los ensayados para continuar con los experimentos. Las limitaciones de este proyecto no permiten incorporar todos los agentes antineoplásicos recopilados en las tablas 3 y 4, por lo que el elegido fue el afatinib, para el que ya se obtuvieron resultados llamativos.

También se decidió centrar el trabajo en un solo grupo de BAL. Al igual que en ensayos anteriores, se seleccionó el género *Bifidobacterium*, del cual se disponía de un buen número de cepas, para llevar a cabo el último objetivo.

Como criterios para seleccionar la cepa a utilizar en el co-cultivo se tuvieron en cuenta su sensibilidad a compuestos antimicrobianos y que su resistencia a afatinib fuese elevada. Un probiótico nunca debe presentar resistencia a antibióticos, porque existiría la posibilidad de que transmitiese los elementos genéticos que le confieren tal propiedad a microorganismos patógenos. Por otro lado, la bifidobacteria ha de soportar concentraciones elevadas de afatinib en el medio para poder mantener la viabilidad y conservar su actividad metabólica. La cepa L43 de *Bifidobacterium* aislada del TGI humano cumplía ambas condiciones, pues se determinó que era sensible a numerosos compuestos antimicrobianos, y además su CIM para afatinib tiene un valor de 128 µg/mL.

Antes de realizar el ensayo de co-cultivo se debe asegurar que la cepa L43 no crece en el medio de cultivo de la línea HT29: Medio de McCoy con un 20% de suero fetal bovino inactivado por calor y glutamina 3 mM, o alternativamente el mismo medio suplementado con

antibióticos. Sin embargo, la cepa L43 era capaz de crecer en el medio de cultivo de la línea HT29 y además se registraron bajadas de pH hasta valores de 4 y 5. Esta acidez es incompatible con las células epiteliales, por lo que, a pesar de haber dirigido el trabajo hacia el estudio de la sensibilidad/resistencia a antitumorales en bacterias vivas resistentes a antitumorales, se optó por inactivar con radiación UV la cepa L43 y, por lo tanto, dejar el co-cultivo con bacterias vivas para futuros ensayos *in vivo* y/o empleando otra tecnología.

Como paso previo a la realización del co-cultivo, se prepararon suspensiones concentradas de la cepa L43 inactivada, que se congelaron previamente en nitrógeno líquido para evitar la lisis celular y posteriormente se almacenaron a -80 °C hasta que fue necesario su uso. A partir de estas suspensiones celulares, se llevó a cabo una medida la DO_{600nm} de los inóculos que se habían preparado, así como una estimación del número de células viables que poseía el cultivo, obteniendo valores de 0,6 y 4×10^8 UFC/mL, respectivamente.

4.5. Ensayos de co-cultivo HT29-L43-afatinib

Para estudiar el efecto protector que la cepa L43 puede proporcionar a las células gastrointestinales, se realizó una primera aproximación *in vitro*. El experimento, llevado a cabo en el equipo xCELLingence RTCA DP, consistió en estudiar la interacción entre dicha bacteria y la línea epitelial de colon HT29 en presencia del antitumoral afatinib. Mediante la medida continua del IC se obtuvieron gráficos que muestran de forma indirecta el crecimiento de las células adherentes y los cambios producidos en su morfología.

La línea celular se inoculó a una densidad de 2×10^5 células/pocillo, sabiendo que tras 20-22 h de incubación se encontrarían en fase confluyente (Hidalgo-Cantabrana, 2013). En las figuras 14 y 15 se reflejan los resultados del co-cultivo, entendiendo como tiempo 0 el momento en el que a la línea HT29 se le añaden 10^8 o 10^9 UFC/mL de la cepa L43 y las distintas concentraciones de afatinib.

Los valores de IC se normalizaron respecto al control, un cultivo de células HT29 exclusivamente, de ahí que éste posea un valor constante a lo largo de todo el ensayo.

En las muestras en las cuales se creció la línea HT29 junto con la suspensión bacteriana (indicadas como “L43” en los gráficos), tanto en el inóculo con 10^8 UFC/mL como con 10^9 UFC/mL, se registró un rápido aumento del IC. Esta tendencia, observada previamente por Hidalgo-Cantabrana y col. (2013), puede deberse a una modificación en la forma o el tamaño de las células eucarióticas inducida por las bacterias (Yu y col., 2006).

En los casos en los cuales se incubó la línea epitelial en presencia de afatinib se registraron disminuciones del valor del IC, indicativas de una disminución en la impedancia medida por el biosensor y, por tanto, del número de células adherentes. Esta tendencia se observó en todas las concentraciones ensayadas de antitumoral (128, 64, 32 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Además, las disminuciones del IC fueron menores al aplicar menores concentraciones del fármaco, lo cual indica una dependencia de la dosis en el efecto tóxico de los agentes antitumorales. Estos resultados representarían el efecto que el afatinib posee sobre las células gastrointestinales ya que, al igual que el resto de compuestos empleados en quimioterapia, tiene efectos tóxicos que derivan en la enfermedad conocida como mucositis, ampliamente desarrollada en el apartado “Consideraciones Teóricas y Experimentales”. De nuevo, los aumentos del IC registrados durante las primeras horas del experimento podrían ser resultado de cambios producidos en la línea HT29, aunque esta vez como consecuencia de la adición de afatinib al medio de cultivo.

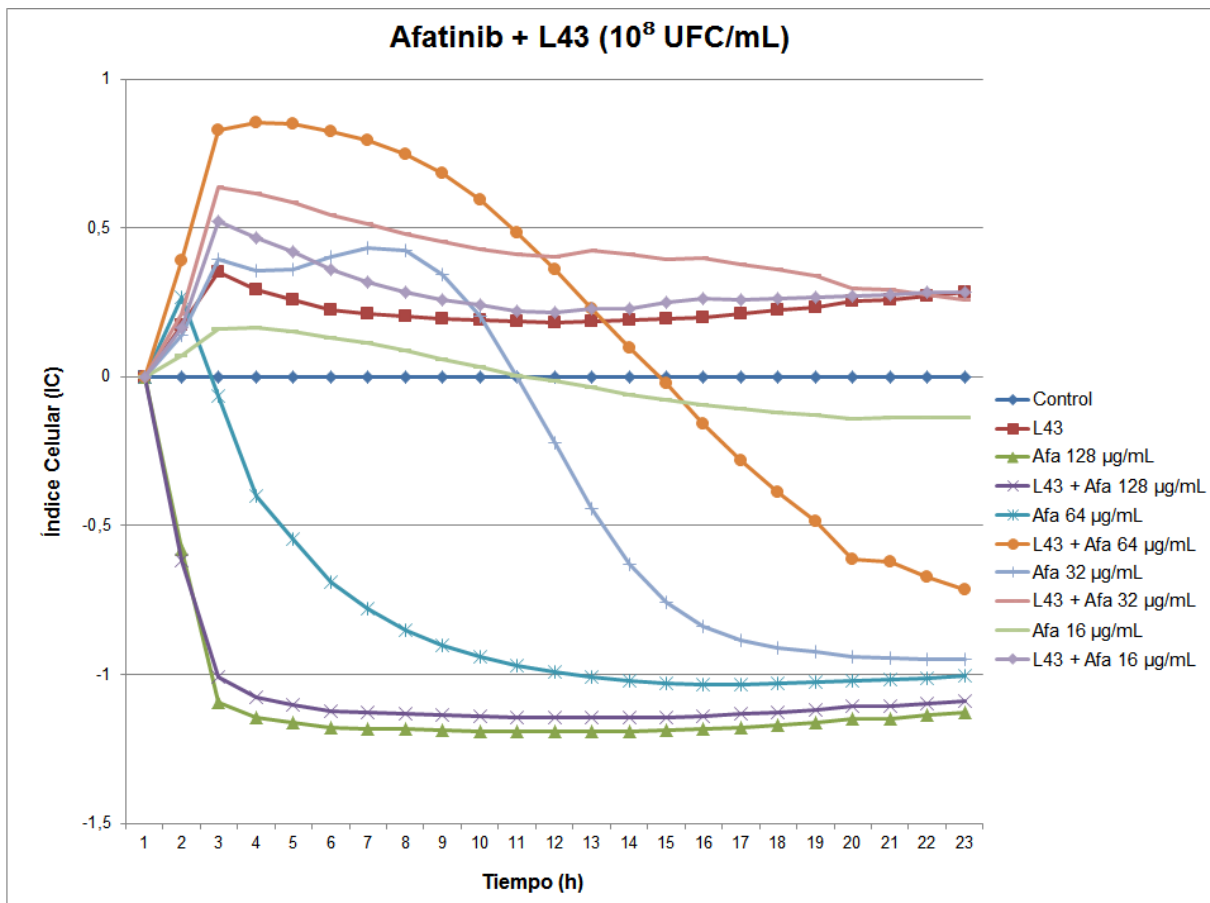


Figura 14: Gráfico en el que se reflejan los resultados del ensayo de co-cultivo HT29-L43-afatinib en el cual la suspensión bacteriana tenía una densidad de 10^8 UFC/mL. Se recogen, en ordenadas, los valores del IC devueltos por el equipo xCELLingence RTCA DP y, en abscisas, el tiempo transcurrido en horas.

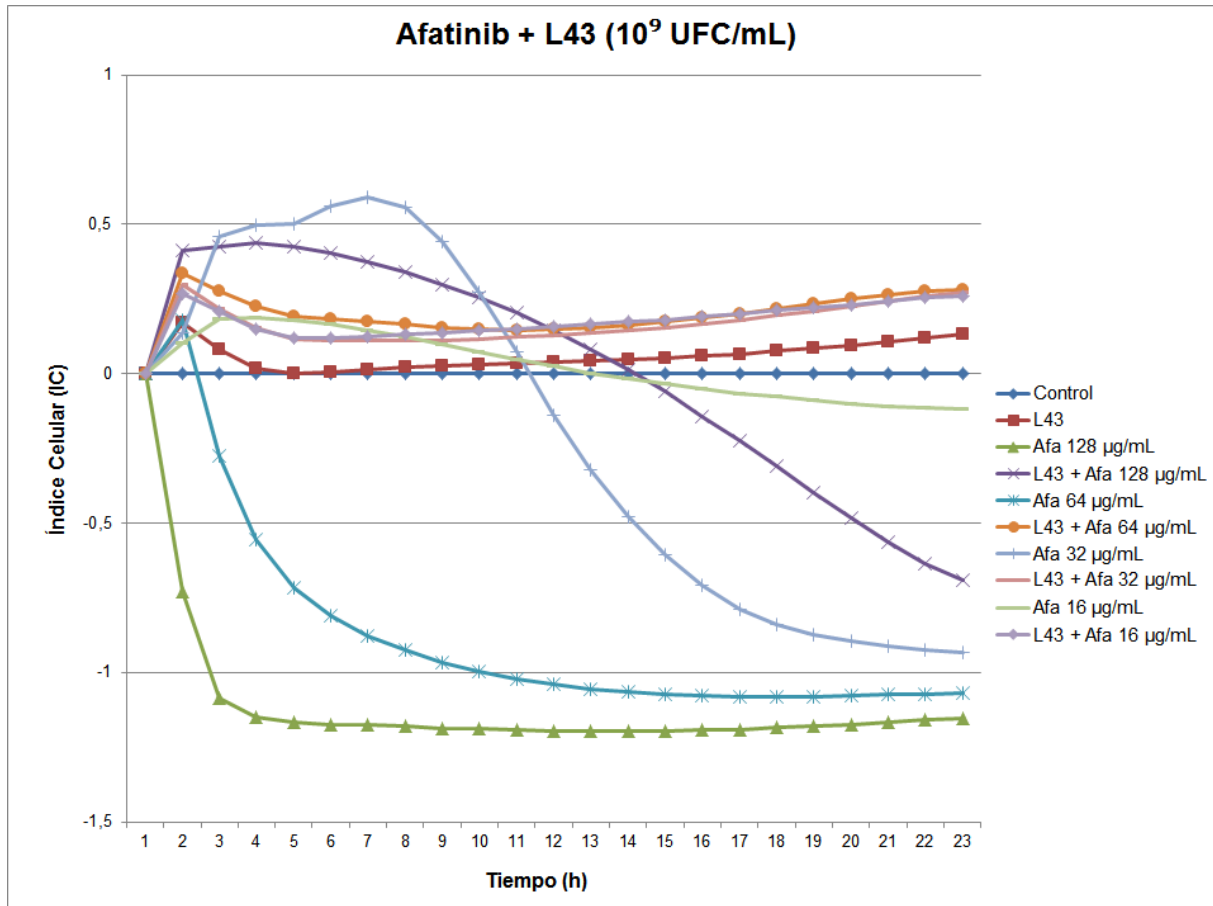


Figura 15: Gráfico para el ensayo con la suspensión bacteriana de 10^9 UFC/mL.

En todos los casos en los que se llevó a cabo un co-cultivo HT29-L43 en presencia del antitumoral se registró una menor disminución del IC que en las muestras en las cuales se cultivó la línea epitelial únicamente en presencia del compuesto quimioterapéutico. Estos datos sugieren que la bifidobacteria ejerce un efecto protector sobre la línea epitelial en presencia del antitumoral.

Por último, al comparar las figuras 14 y 15, se puede observar cómo el efecto protector de la cepa L43 es superior cuando se añade un inóculo de 10^9 UFC/mL. Así, con un inóculo de 10^8 UFC/mL, a una concentración de 32 $\mu\text{g/mL}$ o inferior de afatinib, se ejerce una protección que deriva en un IC equiparable al que muestra HT29 en presencia de L43. En cambio, con un inóculo de 10^9 UFC/mL esta protección frente al efecto tóxico del antitumoral ya se observa a una concentración de 64 $\mu\text{g/mL}$.

A partir de todos estos datos se puede sugerir a la cepa L43 como potencial probiótico frente a la toxicidad inherente a los compuestos empleados en quimioterapia para aquellos pacientes con cáncer de pulmón tratados con afatinib.

5. CONCLUSIONES

- 1.** Las BAL presentan patrones comunes con respecto a sus perfiles de sensibilidad/resistencia frente a numerosos compuestos antitumorales: son resistentes a altas concentraciones de capecitabina, ciclofosfamida, docetaxel, erlotinib, gefitinib, irinotecán y paclitaxel y, sin embargo, son muy sensibles a la doxorrubicina. Las concentraciones de los compuestos afatinib, 5-fluorouracilo, gemcitabina y pemetrexed que inhiben su crecimiento son, en cambio, dependientes de especie.

- 2.** La resistencia de las BAL a los agentes quimioterapéuticos es menor que la de otros grupos microbianos con representación en el aparato digestivo humano, así como de la mostrada por las bacterias Gram-negativas. Esto repercutiría en la composición de la microbiota intestinal tras la aplicación de quimioterapia, favoreciéndose el crecimiento de microorganismos a los que en su mayoría no se han asociado cualidades probióticas.

- 3.** Las bifidobacterias exhiben CIM para el afatinib concentradas en un pequeño rango de valores, permitiendo establecer un punto de corte tentativo de 512 µg/mL. Las CIM para el pemetrexed, por el contrario, se distribuyen en un intervalo mucho más amplio, no pudiendo definirse ningún punto de corte.

- 4.** La cepa L43, perteneciente al género *Bifidobacterium*, es capaz de ejercer un efecto protector frente a la toxicidad del afatinib sobre la línea epitelial de colon HT29, el cual depende de la dosis de antitumoral y de la densidad del inóculo bacteriano. Este hecho lleva a proponer a la cepa L43 como complemento probiótico en los enfermos de cáncer en cuyo tratamiento se incluya afatinib.

6. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A	Afatinib
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARDRA	Análisis de Restricción de ADN Ribosómico Amplificado
ARN	Ácido ribonucleico
BAL	Bacterias del Ácido Láctico
BHI	Brain Heart Infusion
°C	Grados Celsius
CA	Capecitabina
CI	Ciclofosfamida
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CO₂	Dióxido de carbono
col.	Colaboradores
DC	Docetaxel
DO	Densidad Óptica
DX	Doxorrubicina
E	Erlotinib
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
etc.	Etcétera
F	5-fluorouracilo
G+C	Guanina y Citosina
GAM	Gifu Anaerobic Broth
GF	Gefitinib
GM	Gemcitabina
GIT	Gastrointestinal tract
h	Horas
H₂O	Agua
I	Irinotecán
IC	Índice Celular
IST	Isosensitest
IPLA	Instituto de Productos Lácteos de Asturias
kpb	Kilopares de bases
LAB	Lactic Acid Bacteria
LSM	Lactic acid bacterium Susceptibility test Medium

LSMc	Medio LSM suplementado con un 0,03% de cisteína
µg	Microgramos
µL	Microlitros
M1	Medio IST suplementado con un 10% de GAM y un 0,25% de cisteína
mg	Miligramos
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe
MRS_c	Medio MRS suplementado con un 0,25% de cisteína
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Paclitaxel
pb	Pares de bases
PBS	Tampón Fosfato Salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PE	Pemetrexed
pH	Potencial de hidrógeno
RAPD	Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico
RCM	Reinforced Clostridial Medium
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
S	Unidades Svedberg
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
sp.	Especie
subsp.	Subespecie
TGI	Tracto gastrointestinal
TLR	Receptor de Tipo Toll
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
V	Voltios

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ammor MS, Flórez AB, van Hoek AH, de Los Reyes-Gavilán CG, Aarts HJ, Margolles A, Mayo B**, 2008. *Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 14(1-3): 6-15.
- Anitha A, Deepa N, Chennazhi KP, Lakshmanan VK, Jayakumar R**, 2014. *Combinatorial anticancer effects of curcumin and 5-fluorouracil loaded thiolated chitosan nanoparticles towards colon cancer treatment*. Biochimica et Biophysica Acta, 1840(9): 2730-2743.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernández L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J, MetaHIT Consortium, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P**, 2001. *Enterotypes of the human gut microbiome*. Nature, 473(7346): 174-180.
- Bengmark S**, 1998. *Ecological control of the gastrointestinal tract: the role of probiotic flora*. Gut, 42(1): 2-7.
- Bowen JM, Stringer AM, Gibson RJ, Yeoh AS, Hannam S, Keefe DM**, 2007. *VSL#3 probiotic treatment reduces chemotherapy-induced diarrhea and weight loss*. Cancer Biology & Therapy, 6(9): 1449-1454.
- Bunešová V, Vlková E, Rada V, Ročková S, Svobodová I, Jebavý L, Kmet' V**, 2012. *Bifidobacterium animalis subsp. lactis strains isolated from dog faeces*. Veterinary Microbiology, 160(3-4): 501-505.
- Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R**, 2012. *The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view*. Cell, 148(6): 1258-1270.
- Colombini A, Perego S, Ardoino I, Marasco E, Lombardi G, Fiorilli A, Biganzoli E, Tettamanti G, Ferraretto A**, 2013. *Evaluation of a possible direct effect by casein phosphopeptides on paracellular and vitamin D controlled transcellular calcium transport mechanisms in intestinal human HT29 and Caco-2 cell lines*. Food and Function, 4(8): 1195-1203.

- Danielsen M, Wind A**, 2003. *Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents*. International Journal of Food Microbiology, 82: 1-11.
- Delgado Palacio S**, 2005. *Microbiota intestinal humana: análisis y evolución de poblaciones representativas e identificación de bacterias probióticas*. Universidad de Oviedo (Tesis Doctoral).
- Ducluzeau R**, 1993. *Installation, équilibre et rôle de la flore microbienne du nouveau-né*. Annales Pédiatriques, 4(1): 13-22.
- Elting LS, Cooksley C, Chambers M, Cantor SB, Manzullo E, Rubenstein EB**, 2003. *The burdens of cancer therapy. Clinical and economical outcomes of chemotherapy-induced mucositis*. Cancer, 98(7): 1531-1539.
- FAO/OMS**, 2002. *Directrices para la evaluación de los probióticos en los alimentos*. Informe del Grupo de Trabajo Conjunto FAO/OMS.
- Flórez AB, Ladero V, Alvarez-Martín P, Ammor MS, Álvarez MA, Mayo B**, 2007. *Acquired macrolide resistance in the human intestinal strain Lactobacillus rhamnosus E41 associated with a transition mutation in 23S rRNA genes*. International Journal of Antimicrobial Agents, 30(4): 341-344.
- Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard GG, Blakesley RW, Murray PR, Green ED, Turner ML, Segre JA**, 2009. *Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome*. Science, 324(5931): 1190-1192.
- Hanahan D, Weinberg RA**, 2011. *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 144(5): 646-674.
- Hidalgo-Cantabrana C, Kekkonen R, de los Reyes-Gavilán CG, Salminen S, Korpela R, Gueimonde M, Rúas-Madiedo P**, 2013. *Effect of bacteria used in food industry on the proliferation and cytokine production of epithelial intestinal cellular lines*. Journal of Functional Foods, 6: 348-355.
- Holzapel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U**, 2001. *Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition*. The American Journal of Clinical Nutrition, 73(Suppl. 2): 365S-373S.
- Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI**, 2001. *Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine*. Science, 291(5505): 881-884.

- Human Microbiome Project Consortium**, 2012. *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome*. *Nature*, 486(7402): 207-214.
- Huys G, D'Haene K, Cnockaert M, Tosi L, Danielsen M, Flórez AB, Mättö J, Axelsson L, Korhonen J, Mayrhofer S, Egervärn M, Giacomini M, Vandamme P**, 2010. *Intra- and interlaboratory performances of two commercial antimicrobial susceptibility test methods for bifidobacteria and nonenterococcal lactic acid bacteria*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(6): 2567-2574.
- Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D, McKaigney C, De Simone C, Madsen K**, 2004. *DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function*. *Gastroenterology*, 126(5): 1358-1373.
- Keefe DM, Brealey J, Goland GJ, Cummins AG**, 2000. *Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans*. *Gut*, 47(5): 632-637.
- Lalla RV, Sonis ST, Peterson DE**, 2008. *Management of oral mucositis in patients who have cancer*. *Dental Clinics of North America*, 52(1): 61-77.
- Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR**, 1985. *Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(20): 6955-6959.
- Limame R, Wouters A, Pauwels B, Franssen E, Peeters M, Lardon F, De Wever O, Pauwels P**, 2012. *Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays*. *PLOS One*, 7(10): e46536.
- Margolles A, Flórez AB, Moreno JA, van Sinderen D, de los Reyes-Gavilán CG**, 2006. *Two membrane proteins from Bifidobacterium breve UCC2003 constitute an ABC-type multidrug transporter*. *Microbiology*, 152(12): 3497-3505.
- Mättö J, Malinen E, Suihko ML, Alander M, Palva A, Saarela M**, 2004. *Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria*. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 459-470.
- Mayo B, Delgado S, Rodríguez JM, Gueimonde M**, 2008. *Old and new facts of probiotics: where we are and where we are going*. *CAB Reviews*, 3(55): 1-17.
- Méchnikov I**, 1907. *Essais optimistes*. A. Maloine, Éditeur.

- Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M**, 2009. *Global diversity in the human salivary microbiome*. Genome Research, 19(4): 636-643.
- O'Hara AM, Shanahan F**, 2006. *The gut flora as a forgotten organ*. EMBO Reports, 7(7): 688-693.
- OMS**, 2014. *Nota descriptiva N° 297*.
- Otte JM, Podolsky DK**, 2004. *Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms*. American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology. 286(4): G613-G626.
- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E**, 2002. *Probiotics: an overview of beneficial effects*. Antonie van Leeuwenhoek, 82(1-4): 279-289.
- Pérez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A, Knecht H, Artacho A, Eismann K, Otto W, Rojo D, Bargiela R, von Bergen M, Neulinger SC, Däumer C, Heinsen FA, Latorre A, Barbas C, Seifert J, dos Santos VM, Ott SJ, Ferrer M, Moya A**, 2012. *Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach*. Gut, 62(11): 1591-1601.
- Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, Raz E**, 2004. *Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis*. Gastroenterology, 126(2): 520-528.
- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ**, 2011. *Vaginal microbiome of reproductive-age women*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108 (Supl. 1): 4680-4687.
- Rodas AM, Ferrer S, Pardo I**, 2003. *16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine*. Systematic and Applied Microbiology, 23(6): 412-422.
- Salminen S, Bouley C, Boultron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I**, 1998. *Functional food science and gastrointestinal physiology and function*. The British Journal of Nutrition, 80 (Supl. 1): S147-S171.
- SEOM**, 2014. *Las cifras del cáncer en España*.

- Shanahan F**, 2002. *The host-microbe interface within the gut*. Best Practice and Research Clinical Gastroenterology, 16(6): 915-931.
- Simon GL, Gorbach SL**, 1984. *Intestinal flora in health and disease*. Gastroenterology, 86(1): 174-193.
- Solca F, Dahl G, Zoephel A, Bader G, Sanderson M, Klein C, Kraemer O, Himmelsbach F, Haaksmá E, Adolf GR**, 2012. *Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 343(2): 342-350.
- Sonis ST**, 2004. *The pathobiology of mucositis*. Nature Reviews. Cancer, 4(4): 277-284.
- Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, Bekele BN, Raber-Durlacher J, Donnelly JP, Rubenstein EB**, 2004. *Perspectives on cancer-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients*. Cancer, 100 (Supl. 9): 1995-2025.
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson G, Collins MD, Dore J**, 1999. *Direct rDNA analysis reveals a myriad of novel bacterial lineages within the human gut*. Applied and Environmental Microbiology, 65: 4799-4807.
- Taguchi H, Takahashi M, Yamaguchi H, Osaki T, Komatsu A, Fujioka Y, Kamiya S**, 2002. *Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxigenic enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7, strain 6*. Journal of Medical Microbiology, 51(4): 336-343.
- Tissier H**, 1906. *Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin*. Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie, 60: 359-361.
- Tooley KL, Howarth GS, Lynn KA, Lawrence A, Butler RN**, 2006. *Oral ingestion of Streptococcus termophilus diminishes severity of intestinal mucositis in methotrexate treated rats*. Cancer Biology and Therapy, 5(6): 593-600.
- Tooley KL, Howarth GS, Lynn KA, Lawrence A, Butler RN**, 2011. *Oral ingestion of Streptococcus termophilus does not affect mucositis severity or tumor progression in the tumor-bearing rat*. Cancer Biology and Therapy, 12(2): 131-138.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI**, 2006. *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature, 444(7122): 1027-1031.

van Vliet MJ, Harmsen HJ, de Bont ES, Tissing WJ, 2010. *The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis*. PLOS Pathogens, 6(5): e1000879.

Yu N, Atienza JM, Bernard J, Blanc S, Zhu J, Wang X, Xu X, Abassi YA, 2006. *Real-time monitoring of morphological changes in living cells by electronic cell sensor arrays: an approach to study G protein-coupled receptors*. Analytical Chemistry, 78(1): 35-43.

Zwielehner J, Lassel C, Hippe B, Pointner A, Switzeny OJ, Remely M, Kitzweger E, Ruckser R, Haslberger AG, 2011. *Changes in human fecal microbiota analyzed by TaqMan-PCR, 454 sequencing and PCR-DGGE fingerprinting*. PLOS One, 6(12): e28654.

Páginas web:

<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002995-pdf.pdf>

<http://www.chemocare.com/>

(Consultadas por última vez el 15/07/2014)