

ESTUDIO DE FUNCIONALIDAD ANTIINFLAMATORIA DE UN MICROORGANISMO PROBIÓTICO

Trabajo de Fin de Máster

Máster interuniversitario en Nutrición y
Metabolismo - Itinerario en Alimentos Saludables

Alumna: María del Mar Tena Alejandre

Tutores profesionales:

Verónica Martínez Ríos y Guillermo García Laínez

Tutor académico: Miquel Mulero Abellán



ADM – Biopolis SL.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Universitat de Rovira y Virgili, Tarragona



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Universitat de Barcelona

Valencia, 2023-2024

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1 Definición de prebiótico, probiótico y postbiótico.....	4
2.2 Diferencias entre probiótico y postbiótico.....	5
2.3 Propiedades beneficiosas de los probióticos (funcionalidades).....	6
2.4 Géneros de bacterias más importantes como probióticos y características.....	8
2.5 Búsqueda e identificación de nuevas bacterias probióticas y retos para el futuro.....	9
2.6 Métodos para el recuento bacteriano.....	10
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	10
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
4.1 Técnicas microbiológicas	11
a) Cultivo líquido bacteriano.....	11
b) Inactivación bacteriana.....	12
c) Recuento en placa.....	12
d) Citometría de flujo.....	14
4.2 Técnicas de cultivos celulares.....	15
a) Mantenimiento línea celular HT29.....	15
b) Ensayo de inflamación y uso cámara de Neubauer.....	17
c) Ensayo de citotoxicidad celular.....	18
d) Determinación de la liberación de IL-8 en el Luminex.....	19
4.3 Análisis estadístico.....	20
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
5.1 Comparativa de técnicas para el recuento bacteriano.....	21
5.2 Verificación de viabilidad celular e inactivación bacteriana con métodos de tinción en citometría de flujo.....	23
5.3 Ensayos de inflamación en células HT29.....	25
6. CONCLUSIONES.....	27
7. AGRADECIMIENTOS.....	28
8. BIBLIOGRAFÍA.....	28

ABREVIATURAS

SCFAs → Ácidos grasos de cadena corta, del inglés Short Chain Fatty Acids

TNF α → Factor de Necrosis Tumoral alfa

SN → Sobrenadante

SS → Solución Salina

PI → Yoduro de Propidio, del inglés Propidium Iodide

FBS → Suero Bovino Fetal, del inglés Fetal Bovine Serum

IL-8 → Interleucina 8

PBS → Tampón Fosfato Salino, del inglés Phosphate Buffered Saline

MTT → 3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo) – 2,5-bromuro de difeniltetrazolio

DMSO → Dimetilsulfóxido

1. RESUMEN

Los probióticos son microorganismos vivos capaces de proporcionar propiedades beneficiosas a la salud del huésped al ser suministrados en cantidades adecuadas. Pueden ser transformados en postbióticos, son los mismos microorganismos, pero inactivados y también con propiedades funcionales. Estas propiedades funcionales influyen desde el tracto gastrointestinal (donde residen estos agentes microbiológicos de interés en este estudio), hasta la salud sistémica general. Entre ellas se encuentran el mantenimiento de la barrera epitelial y la mucosa, la detoxificación, potenciación del sistema inmunitario y la influencia en la composición de la microbiota. El objetivo de este trabajo es la identificación de nuevas cepas con potencial probiótico antiinflamatorio mediante un cribado de 5 cepas bacterianas. Para ello, se ha llevado a cabo una comparación entre las técnicas de recuento en placa y citometría de flujo. A continuación, se ha realizado el cribado de las cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, tanto en su forma viva como en su forma inactivada verificando lo segundo mediante una tinción. Además, se ha medido su nivel de citotoxicidad en las células del epitelio intestinal para comprobar y asegurar la viabilidad de estas células. Eventualmente se ha comprobado la mayor utilidad de la citometría de flujo frente a otras técnicas, como el recuento por placa de Petri. Los resultados obtenidos en los ensayos han identificado a la cepa L2 en su forma de probiótico con potencial antiinflamatorio, sin afectar a la viabilidad celular de los enterocitos humanos. Para esta cepa de *Lactobacillus*, serían necesarios en un futuro otros

ensayos funcionales para validar su capacidad probiótica con el fin de poder identificarla como tal y poder ser comercializada para el desarrollo de productos funcionales para la salud de las personas en forma de alimentos funcionales.

2. INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos están rodeados de microorganismos y los seres humanos no son una excepción. Se convive con ellos tanto en los objetos de alrededor como en el propio cuerpo, ya sea en el exterior, en la piel, o en el interior, el tracto gastrointestinal en su gran mayoría.

Se define microbiota como el conjunto de microorganismos que residen en una relación de simbiosis en nuestro cuerpo. ⁽¹⁾ La microbiota tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis interna y el correcto funcionamiento del organismo del huésped. Mantenerla, en cantidad y diversidad, es muy importante para prevenir una desregulación que conlleve a una patología, por ejemplo, síndrome del intestino irritable. Este desequilibrio se conoce como disbiosis. ⁽¹⁾

En humanos la microbiota está compuesta por más de 1000 especies distintas conocidas. Casi el 90 % de ellas son *Firmicutes* (*Lactobacillus* y *Ruminococcus*, 65 %) y *Bacteroidetes* (*Bacteroides* y *Prevotella*, 23 %), ambas especialistas en fermentar la fibra ingerida en la dieta dando como resultado ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) como butirato (principal fuente de energía para los colonocitos). El tercer filo más abundante son *Actinobacterias* (5 %) y su función principal es fortalecer la barrera mucosa estableciendo competencia de unión con patógenos. El resto pertenecen a otros filos minoritarios, aunque comunes en todos los humanos, como *Proteobacterias*, donde se incluyen oportunistas como *Escherichia* y *Salmonella*. ⁽²⁾

2.1 Definición de prebiótico, probiótico y postbiótico

En la naturaleza existen cepas bacterianas que tras aislarlas se ha demostrado que tienen funciones beneficiosas para el huésped, reciben el nombre de probiótico. Por lo tanto, un probiótico es aquel microorganismo vivo que suministrado en cantidades adecuadas confiere beneficios para la salud del hospedador. ⁽²⁾ Además, deben ser capaces de sobrevivir a los pH bajos del tracto gastrointestinal.

Otros de los requisitos que han de cumplir para ser aceptados como probióticos son: no tener efectos nocivos, capaz de resistir a organismos patógenos y a las condiciones de procesado, capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, que se encuentren en la microbiota sana habitual y tener un corto tiempo de producción. ⁽³⁾ Algunos de ellos los podemos encontrar de manera natural en yogures, kéfir, suplementos y otros alimentos fermentados, ⁽²⁾ Pero no hay que olvidar que han de estar documentados como probióticos con estudios clínicos que lo respalden.

Aunque este trabajo no se centre en diferencias, no se debe confundir el término prebiótico con probióticos. Los prebióticos son compuestos de la dieta que sirven para el crecimiento y desarrollo de los segundos. Son sustancias dietéticas no digeribles, normalmente oligosacáridos y otra fibra insoluble, que promueven el desarrollo de los probióticos y las actividades beneficiosas que les caracterizan mediante una estimulación selectiva de estos. ⁽²⁾ Estas fibras se encuentran en verduras como espárragos, cebolla, ajo, bananas u otras fuentes industriales.

Por último, un postbiótico consiste en una preparación de microorganismos inactivados y/o de sus componentes que también confieren beneficios para la salud del huésped. Pueden ser:

- Microorganismos inactivados, es decir, cepas de probióticos que han sido sometidas a tratamientos de pérdida de viabilidad mediante diversas técnicas como calor o ultrasonidos, etc.
- Fragmentos celulares o estructuras de microorganismos, como lipopolisacáridos.
- Metabolitos de microorganismos, como vitaminas o serotonina, e incluso hormonas.
- Compuestos de un medio de cultivo donde han crecido microorganismos. ⁽⁴⁾

2.2 Diferencias entre probiótico y postbiótico

Una vez claras las definiciones de probiótico y postbiótico es importante entender las principales diferencias entre ellos. Ambos ejercen funciones beneficiosas en el organismo del huésped y el probiótico está vivo a diferencia del postbiótico que no

tiene viabilidad. Este hecho conlleva a una mayor vigilancia del probiótico para asegurar que llega viable al colon donde desarrollará su función. (1,2,4)

El reto logístico del probiótico lo hace más sensible a los cambios del entorno como las variaciones de pH, temperatura y secreción de enzimas entre las distintas zonas del tracto gastrointestinal. Por lo tanto, un postbiótico es más estable a este entorno al ser menos sensible, ya que al no tener viabilidad no se verá afectado y llegará en perfectas condiciones al colon donde también desarrollará su función. (2,4)

Es esta viabilidad del probiótico la que hace que, por otra parte, se necesite que esté más vigilado y dirigirlos a la población sana. Además, cabe mencionar, que, en ciertas patologías como la obesidad, ciertos postbióticos, como los SCFAs, pueden apoyar el mantenimiento de la patología teniendo que prestarles relativa atención en esos casos. (1)

2.3 Propiedades beneficiosas de los probióticos (funcionalidades)

Como se ha mencionado anteriormente la función principal de los probióticos es mantener la homeostasis interna y restaurarla en condiciones de resiliencia o redundancia funcional para asegurar el buen metabolismo fisiológico del huésped y prevenir patologías. Estos efectos son específicos de cada cepa, es decir distintas cepas de una misma especie pueden ejercer efectos diferentes. Los mecanismos más importantes son los siguientes: (4,5,6,7,8)

a) Potenciación del sistema inmunitario:

Potencian la respuesta inmune del individuo interactuando en el intestino grueso con dos estructuras relacionadas con la inmunidad: Placas de Peyer y folículos linfoides. Gracias a los probióticos, se pueden generar citoquinas antiinflamatorias o células natural killers, entre otros, mejorando así la función de antígenos tanto en la respuesta innata como en la adaptativa.

b) Detoxificación:

También se ha visto que los probióticos metabolizan y eliminan metabolitos nocivos de otras vías metabólicas del organismo como el ácido úrico o ROS, lo que promueve aun más un ambiente sano, protegiendo órganos como el hígado.

c) Mantenimiento de la barrera epitelial y la mucosa (mucina):

Los probióticos evitan el paso de tóxicos al torrente sanguíneo al promover expresión de proteínas como las mucinas o las proteínas situadas en las uniones estrechas de los enterocitos como las claudinas u ocludinas a la vez que establecen competencia con microorganismos patógenos exógenos u oportunistas de la microbiota. Relacionado con lo anterior, reducen la resistencia a antibióticos de amplio espectro mediante la inhibición crecimiento de los oportunistas y la competencia a sitios de unión.

d) Influencia en el metabolismo del huésped:

Algunas cepas características pueden utilizar otros componentes y nutrientes dietéticos como lactosa y oxalatos ayudando a su digestión y minimizando intolerancias o síndromes de malabsorción. También se ha observado su participación en la degradación de metales pesados e incluso células carcinogénicas.

e) Efectos en la composición de la microbiota:

Los probióticos ingeridos pueden afectar a la composición de la microbiota, es decir, el número de microorganismos de una cepa y por lo tanto enriquecer la diversidad. Se han evaluado diferentes grados de influencia por parte de la microbiota en el eje intestino-piel. A partir de la función anteriormente explicada con capacidad para modular el sistema inmune, desencadena en alteraciones en la piel, es decir existe un vínculo entre la disbiosis intestinal y la pérdida de la homeostasis en la piel desencadenando enfermedades inflamatorias en esta.

Por ejemplo, el acné facial se ha demostrado que puede ser causado por la proliferación de *Cutibacterium acnes*, una cepa presente en la microbiota, junto con otras causas, como la hiperplasia de las glándulas sebáceas bajo influencia

androgénica. Distintas cepas probióticas inhiben el crecimiento de *C. acnes*, entre ellos, *Streptococcus thermophilus* mediante la activación de ceramidas ya que estas retienen agua en la piel y algunas de ellas presentan propiedades antiinflamatorias. ⁽¹⁰⁾

2.4 Géneros de bacterias más importantes como probióticos y características

Las cepas más relevantes como probióticos corresponden a los siguientes géneros:

- Género *Bifidobacterium*: las bacterias de este género son anaerobias y grampositivas. Además, no liberan gases ni forman esporas para sobrevivir. Tampoco presentan movilidad, permanecen fijadas en un tejido. Corresponden al tercer género más abundante en la microbiota, como se ha comentado anteriormente representando cerca del 25% del total. Sus distintas cepas presentan la capacidad de aliviar la diarrea asociada a antibióticos (como *B. lactis* ATCC 27536), síndrome del intestino irritable, estreñimiento, entre otras. Se ha identificado 20 especies, otro ejemplo sería *Bifidobacterium bifidum*. ^(3,6)
- Género *Lactobacillus*: estas bacterias se caracterizan por poder crecer en medios tanto con oxígeno como sin él, es decir son anaerobias facultativas. Son grampositivas, no forman esporas y no poseen flagelos. Aunque, algunas cepas, sí producen gases al ser estrictamente fermentadoras. Son bastante sensibles al verse afectadas por factores del entorno gastrointestinal como el pH y la presencia de oxígeno, nutrientes e interacciones bacterianas. Corresponden al género más abundante en la microbiota humana gastrointestinal y se han llegado a identificar 56 especies distintas. Sus empleos son múltiples como, por ejemplo, contra el tratamiento de diarrea aguda, coadyuvantes para el tratamiento de *Helicobacter pylori* y presentan varios efectos sobre el sistema inmune. Como cepa representativa tendríamos el *Lactobacillus paracasei*^(3,6) y *Lactobacillus rhamnosus*, LGG (ATCC 53103).⁽⁹⁾
- Género *Bacillus*: Son bacterias aerobias estrictas o facultativas y se consideran gram positivas. Forman endosporas y se agrupan en cadenas además poseen flagelación y por lo tanto son móviles. Se adhieren a tejido aun así y son productoras de sustancias antimicrobianas como enzimas hidrolasas. Su uso como probióticos es relativamente reciente ya que se usan desde hace 50 años. Una especie representativa de este género sería *Bacillus coagulans*. ⁽¹¹⁾

- Además, existen otros géneros menos abundantes como *enterococcus*, *streptococcus* o *lactobacilus lactis*. En el caso de los *Enterococcus*, son bacterias gram positivas, no presentan endoesporas ni generan gases y no son motiles generalmente. Presentan una dualidad, por ello solo cepas específicas de *Enterococcus* se consideran probióticas. Por un lado, son muy estables al entrono gastrointestinal, incluso en presencia de niveles hasta letales de sales biliares y detergentes lo que les confiere resistencia, por ejemplo en hospitales, y poseen propiedades tecnológicas de interés, como su capacidad glicolítica, lipolítica y proteolítica. Pero por otro lado, determinados componentes celulares pueden actuar como factores de virulencia en infecciones enterocócicas. ⁽¹²⁾

2.5 Búsqueda e identificación de nuevas bacterias probióticas y retos para el futuro

En los últimos años numerosos estudios han investigado la aplicación de probióticos al tratamiento de distintas patologías en animales y humanos, y en estudios preclínicos en tejidos, y varios de ellos han demostrado su potencial como avance tecnológico. Hasta ahora las investigaciones se han centrado en patologías como el intestino irritable, la diarrea y otras infecciones. Aunque también existe bibliografía sobre la reducción de peso, reducción de la presión arterial, reducción en infecciones sistémicas, hiperuricemia, etc. ^(2,4)

Actualmente, se ha visto la importancia del estudio de probióticos y sus postbióticos conjuntamente debido a que se complementan en sus funciones e influencia en varias enfermedades. En cuanto a especies, *Akkermansia muciniphila* y *Faecalibacterium prausnitzii* se consideran la siguiente generación de cepas probióticas con efectos beneficiosos. ⁽⁶⁾ Muchos de los mecanismos por los que los prebióticos, probióticos y postbióticos ejercen sus funciones aun no se conocen, ese desconocimiento implica que no se pueda optimizar su uso en varias enfermedades. ^(2,4)

En el futuro, se espera poder desarrollar terapias probióticas personalizadas e individualizadas es la razón principal por la que se necesita conocer a las nuevas

cepas y se realizan estudios de funcionalidad, entre otros, y aun mejor si se combinan con el desarrollo de las ómicas. ^(2,4)

2.6 Métodos para el recuento bacteriano

La realización de ensayos funcionales con cepas probióticas requiere realizar una enumeración previa de la suspensión bacteriana para obtener resultados fiables y reproducibles. El método tradicional ampliamente establecido para el recuento bacteriano es el recuento en placa y dilución seriada. ⁽⁵⁾

Este método, aunque estima de forma adecuada este recuento, es lento para obtener resultados (48 h). Otro método existente más rápido consiste en medir la densidad óptica del cultivo bacteriano (600 nm), sin embargo, se ha comprobado que no hay una correlación exacta entre el recuento en placa y la medida de la densidad. ⁽¹³⁾

Por esta razón, en los últimos años se han desarrollado otras técnicas fiables para la enumeración de bacterias de forma rápida y sencilla como la citometría de flujo. Es necesario realizar estudios comparativos que demuestran la equivalencia de ambas técnicas. ⁽¹⁴⁾

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La empresa Biopolis SL tiene entre sus objetivos la identificación de nuevos microorganismos probióticos para fines industriales y relacionados con la salud. En este contexto, se requiere el escrutinio mediante ensayos funcionales para seleccionar aquellas cepas funcionales. Así, este trabajo de Fin de Máster set ha llevado a cabo en el Laboratorio de Cultivos Celulares perteneciente al Departamento de Desarrollo Preclínicos. En el mismo, se realizan ensayos de funcionalidad mediante la tecnología de los cultivos celulares para el cribado de cepas.

De tal forma, la hipótesis y el objetivo principal fue identificar cepas microbianas de la colección de Biopolis SL. con potencial probiótico en ensayos antiinflamatorios. Las propiedades beneficiosas de los probióticos son cepa específicos, por ello se requiere de herramientas de cribado experimental.

Objetivos secundarios o específicos:

- Comparar las técnicas de recuento en placa y citometría de flujo para la enumeración de cepas probióticas y sus versiones inactivadas (postbióticos).
- Evaluar el efecto antiinflamatorio de las cepas en su forma de probiótico y de postbiótico, sobre las células HT29 (ATCC HTB-38) del epitelio intestinal tras un estímulo proinflamatorio en el medio con Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Técnicas microbiológicas

a. Cultivo líquido bacteriano

Los trabajos de microbiología se realizan en cabina de bioseguridad, o en bancada utilizando un mechero bunsen para crear el ambiente aséptico y utilizando siempre material fungible estéril (tubos eppendorf, tubos Corning, puntas de pipeta, etc.).

Se trabajó con 5 cepas pertenecientes al cepario interno de Biopolis SL.: 3 cepas del género *Lactobacillus* (L1, L2 y L3) y 2 cepas de *Bifidobacterium* (B1 y B2).

Las condiciones óptimas de crecimiento para los dos géneros bacterianos se recogen en la Tabla 1. Las 5 cepas se incubaron a 37°C y en condiciones de anaerobiosis. Los medios empleados fueron agar Man-Rogosa-Sharpe, MRS (Scharlau) para *Lactobacillus* y agar de Propionato, TOS (Merk Life Science) o MRS en el caso de las bifidobacterias.

En el caso de las bifidobacterias, al ser anaerobias estrictas, es importante añadir cisteína debido a que tiene capacidad de oxidarse al captar el O₂ disuelto en el medio de cultivo. Las cepas de *Lactobacillus* tienen un crecimiento más rápido, mientras que para las Bifidobacterias es importante una incubación más larga (48h). Las condiciones de anaerobiosis se generaron mediante el uso de bolsas de generación de atmósfera anaerobiótica (AnaeroGen™ 2,5 L de Thermo Fisher). Se introdujeron los cultivos junto a las bolsas en un recipiente de anaerobiosis.

Tabla 1. Condiciones empleadas en la incubación de las cepas de Lactobacillus y Bifidobacterium.

Géneros	T (°C)	Tiempo (h)	Aireación	Medio de cultivo
Lactobacillus	37	18-24	Anaerobiosis	MRS
Bifidobacterium	37	24-48	Anaerobiosis	MRS + cisteína
				TOS + cisteína

Cada una de las cepas seleccionadas en este trabajo, se sembró a partir de glicerizados mantenidos a -80 °C, una porción recogida con un asa de siembra loop en 10 mL de medio de cultivo apropiado (MRS o MRS/cisteína) y se incubó en condiciones de anaerobiosis, utilizando el sistema de generación de atmósfera anerobiótica GasPak (BD Vacutainer) a 37 °C en condiciones estáticas. Los cultivos se incubaron durante 24-48 h.

b. Inactivación bacteriana

Algunos ensayos de funcionalidad requieren el uso de postbióticos, así que el ensayo también se realizó con las mismas cepas inactivadas. Tras evaluar el cultivo fresco se realizó un tratamiento térmico de las suspensiones bacterianas en el autoclave para su inactivación, es decir pasar de probióticos a postbióticos.

Las condiciones de autoclavado son 121 °C durante 20 minutos a 1 atm. Para validar o verificar la eficacia del tratamiento térmico se hace el recuento por citometría con los colorantes de tinción, de esta manera un porcentaje muy elevado o la totalidad de las bacterias aparecen teñidas con yoduro de propidio, PI, indicativo de muerte celular. El modo de funcionamiento de estos colorantes se explica en el apartado de citometría de flujo. Cabe destacar que no se puede realizar el recuento en placa en las cepas inactivadas ya que no crecen, así que una vez pasadas por el autoclave se procede al citómetro. ⁽⁴⁾

c. Recuento en placa

Los cultivos frescos una vez crecidos se sometieron a una centrifugación a 3500 rpm durante 5' para separar el medio del pellet celular. Se retiró el sobrenadante, SN, y las células se lavaron con 5 mL de solución salina, SS (a 0,9 % de NaCl). Tras el lavado de las células quedaron resuspendidas en 3-4 mL de SS. Por último, se dejan los

tubos agitando en el vortex automático 5-10 minutos para que queden homogeneizados.

El siguiente paso consistió en realizar diluciones seriadas 1:10, en agua de peptona (Tryptona 10,0 g/L y sodio cloruro 5 g/L con tween 80 con un pH de $7,2 \pm 0,2$) y sembrarlas en placas Petri en profundidad. El procedimiento de siembra es el siguiente, también recogido en la Figura 2:

- Las diluciones se hacen en base 10, empezando con 500 μ L de la suspensión bacteriana, llevada a 5 mL de volumen final (tubos contendrán 4,5 mL de agua de peptona).
- El volumen de siembra de cada dilución es de 1 mL por duplicado (en dos placas).
- El medio de cultivo se mantiene en estufa a 65 °C para evitar su solidificación. Antes de adicionar el medio a las placas se atempera y se suplementa con cisteína a una concentración final de 0,5 mg/mL.

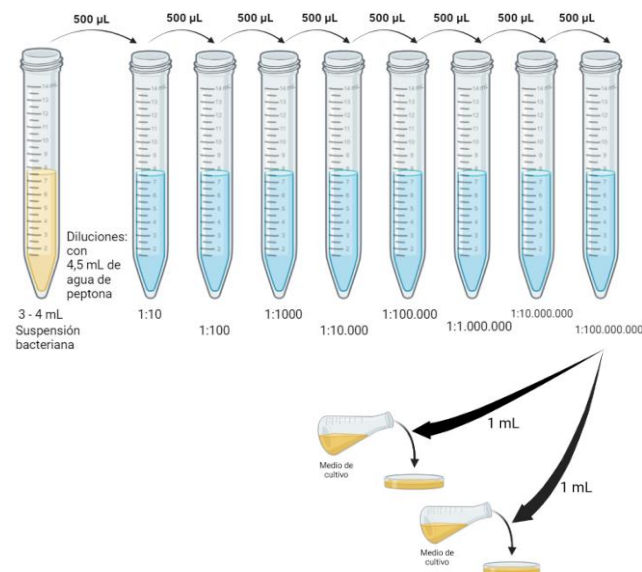


Figura 1. Ejemplo de las diluciones a partir de la suspensión bacteriana con la adición del medio de cultivo específico. Los volúmenes en las imágenes de los tubos no corresponden con los volúmenes utilizados en el ensayo.

Una vez sembrado, se mantuvo en reposo hasta su solidificación y tras ello se incubó 24-48 h a 37 °C en la estufa en condiciones anaerobias (dentro del incubador de

anaerobiosis y con 2 bolsas de captación de oxígeno, las mismas condiciones anteriores en el cultivo en placa.).

Se procedió al recuento de las placas entre 30-300 colonias, a mano o en con el Scan400 de Interscience. Es importante verificar que las diferentes diluciones presentan un orden lógico en los resultados obtenidos (Figura 4). Finalmente, para obtener el número de ufc/mL de la suspensión bacteriana de células vivas inicial se multiplican los números contados en las placas por el factor de dilución.

d. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una tecnología que analiza y cuantifica a la vez varias características de las células a medida que un fluido las transporta y son incididas por un haz de luz. El flujo mide la granularidad (complejidad), el tamaño y la fluorescencia relativa de la célula bacteriana. El sistema para determinar tales características consiste en una parte óptica acoplada a un procedimiento electrónico que graba cómo la célula dispersa el haz de luz y mide la fluorescencia. ⁽¹⁴⁾

Una de las aplicaciones de esta técnica corresponde al recuento celular y se aplica tanto a los cultivos bacterianos frescos como inactivados obtenidos anteriormente. Para llevar a cabo la técnica, se inició con la recogida del cultivo líquido y la separación y lavado del pellet celular en las mismas condiciones que en el sembrado en placa.

Una vez se dispuso de las suspensiones celulares, se realizaron las diluciones 1:10 seriadas con 900 µl de SS y 100 µl de la suspensión bacteriana. Se busca la dilución adecuada, donde el paso de células a través del láser en el citómetro (Beckman Coulter) fuera en torno a 1000 events/s, es decir, un flujo medio. Conforme la muestra está siendo medida por el equipo, el software va dibujando una nube de puntos según el tamaño y complejidad de las bacterias. El programa nos permite seleccionar el área de medida, ajustada a la población bacteriana específica discriminando las partículas de debris celular de un tamaño menor.

Además, podemos ver una tabla resumen con los events/ μL y demás información relevante. Las medidas quedan registradas y con ellas se calculó la concentración celular de cada cultivo bacteriano. El dato de events/ μL de cada medida se utiliza para calcular las células/mL en nuestra suspensión celular, aplicando los cálculos necesarios. Estos son multiplicar por el factor de dilución (1000x) y realizar un cambio de unidades de μL a mL.

Lo realizado hasta ahora ha sido un recuento total de células, pero también se realizó una tinción para diferenciar las células vivas de las dañadas/muertas. Se utilizaron los colorantes Syto9 (Thermo Fisher) y yoduro de propidio, PI (Sigma Aldrich). Syto9 se introduce en todas las células, puede traspasar la membrana celular dotando a la célula de un color amarillo con fluorescencia verde. Mientras que PI solo entra en las inactivas al encontrarse la membrana desestructurada, desplazando el Syto9 e indicando que la célula está dañada o muerta y dotándola de un color naranja con fluorescencia roja. ⁽¹⁵⁾

Acto seguido, se tomó una alícuota de 500 μl de la dilución a la cual se le había hecho el recuento total de bacterias y se añadieron 5 μl de 0,1 mM Syto9, y 5 μl de 0,5 mM de PI de los colorantes en un tubo eppendorf nuevo (para teñir ya no se necesitaba esterilidad).

Para finalizar se incubó a 700 rpm durante 15' en el termobloque (Eppendorf) a 37 °C y se volvió a medir en el citómetro. Una vez terminado el trabajo de citometría se asegura la correcta limpieza del equipo.

4.2 Técnicas de cultivos celulares

a) Mantenimiento línea celular HT29

Las células HT29 (ATCC HTB-38)⁽¹⁶⁾ forman parte del epitelio intestinal humano y están en estrecho contacto con los alimentos que ingerimos convirtiéndolas en células representativas del tracto gastrointestinal y un relevante modelo de cáncer de colon. Mantienen la misma estructura que pequeños células de intestino grueso (Figura 2), son secretoras de moco y fortalecen la barrera protectora, es por ello por lo que son

buenas candidatas para su estudio in vitro, más específicamente en este trabajo en estudio de funcionalidad frente a la inflamación. ⁽¹⁷⁾

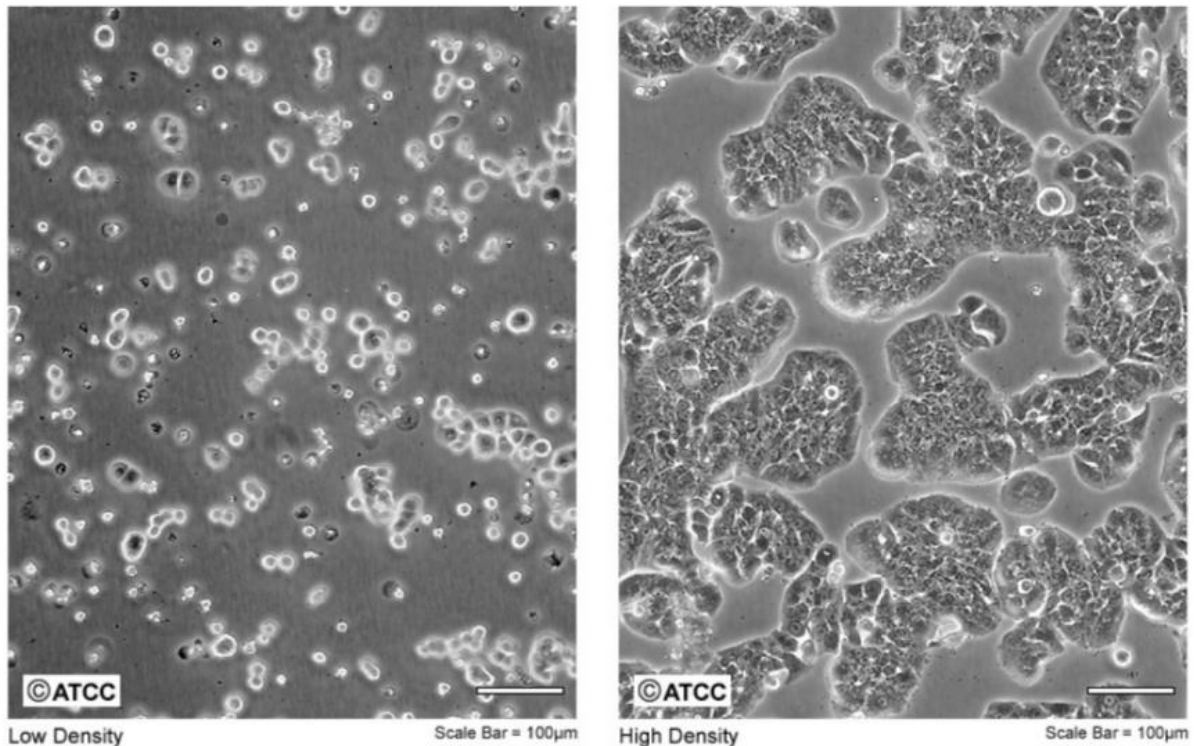


Figura 2. Morfología en forma poligonal de las células HT29 observadas con microscopio invertido de contraste de fase. Adaptado de [Ji, J., Jin, W., Liu, S.-J., Jiao, Z., & Li, X. (2023). Probiotics, prebiotics, and postbiotics in health and disease. *MedComm*, 4(6), e420. <https://doi.org/10.1002/mco2.420>]⁽¹⁶⁾

Se partió de un vial conservado en nitrógeno líquido de densidad celular 2×10^6 cel/mL, donde se encuentran las reservas de las líneas celulares y el banco de trabajo de cada una de ellas. Se descongeló y se introdujo en un flask de 75 cm² con el medio de crecimiento adecuado, medio McCoy's 5A suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) y antibióticos Penicilina-Estreptomicina (Los 3 químicos de Thermo Fisher). Se conserva en el incubador de CO₂ a 37 °C y 5 % de CO₂ controlando su crecimiento en el microscopio óptico invertido de contraste de fase, hasta un adecuado grado de confluencia (75-90 %), en el cual ya estaría listo para iniciar el ensayo y por lo tanto, preparar la placa si ese es el caso o para pasar las células a otro flask y seguir el mantenimiento. ⁽¹⁸⁾

b) Ensayo de inflamación y uso de la cámara Neubauer

Se inicia el ensayo de funcionalidad sobre células HT29. Este ensayo consiste en inducir en la célula una inflamación con el inductor proinflamatorio TNF α (Merck) que se traducirá en una producción y secreción de interleucina 8, IL-8 (Merck).⁽¹⁹⁾ El ensayo se realizó sobre células sembradas en placa 96w (Thermo Fisher) a 50000 cel/pocillo y tras un periodo de incubación de 5-7 días para permitir su diferenciación.

A partir de un flask de células HT29, en correcto estado de confluencia e inferior a 20 pases, se levantan las células de la monocapa para hacer recuento y ajustar la dosis para preparar la placa de 96w. Los pasos para seguir en el proceso de levantamiento son los siguientes:

- Retirada, por aspiración automática, del medio de cultivo.
- Lavado de la monocapa con PBS 1x (Thermo Fisher).
- Adición de 0,25 % tripsina/EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Thermo Fisher) (3 mL).
- Incubación a 37 °C entre 3-5'.
- Neutralizar tripsina con 6-10 mL de medio de cultivo.

Se procedió en este momento al recuento celular en Cámara Neubauer (Figura 3). Esta es una técnica que sirve para conocer la concentración celular de cualquier ensayo. Se contaron los cuadrantes de 0,1 mm y se aplicó el factor de dilución adecuado para obtener las cel/mL de la suspensión celular.

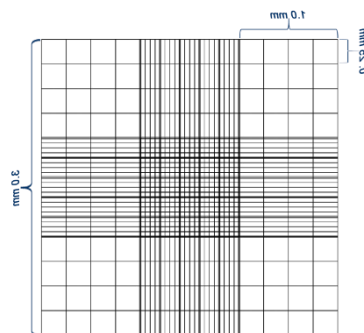


Figura 3. Áreas de medida de la cámara de Neubauer.

El día del ensayo, se preparó el medio utilizado en la preparación de la placa, pero sin los antibióticos junto con TNF α a una concentración de 2 ng/mL hasta entonces conservado a -20 °C.

Por otro lado, se prepararon las muestras de las células bacterianas probióticas o inactivadas (postbióticos, autoclavadas 20' a 121 °C, 1 atm) de la misma forma que se ha explicado en el apartado de técnicas microbiológicas en referencia a la obtención de cultivos bacterianos e inactivación bacteriana.

Una vez teníamos el recuento de las suspensiones bacterianas, vivas o inactivadas, se prepararon las dosis a ensayar. En el caso de probióticos se ensayó la dosis 1x10⁸ cel/mL mientras que para postbióticos se ensayaron 1x10⁸ y 1x10⁹ cel/mL. Los tratamientos se ensayan por triplicado (3 pocillos de la placa), de igual manera que el control negativo (medio de cultivo sin TNF α), medio con TNF α (2 ng/mL y control positivo antiinflamación (cepa *Lactobacillus rhamnosus*, LGG, ATCC 53103).⁽⁹⁾ Una vez estuvo todo dispensado en la placa se dejó incubando 3 horas a 37°C / 5 % CO₂.

Finalizado el tiempo de ensayo, el SN se retiró a otra placa 96w y se almacenó a -20 °C hasta la realización del ensayo en el Luminex que determinará la concentración de IL-8. Cabe mencionar que sobre la monocapa celular se evaluó la citotoxicidad de los tratamientos.

c) Ensayo de citotoxicidad celular

En el ensayo de citotoxicidad se realiza la determinación de viabilidad celular sobre la monocapa con el compuesto químico 3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo) – 2,5-bromuro de difeniltetrazolio, MTT (Thermo Fisher). Servirá para evaluar si las concentraciones de probióticos y postbióticos han resultado dañinas para la monocapa de células HT29. Las células vivas con su metabolismo activo convierten el MTT en formazán un compuesto insoluble en agua. Se obtiene un cambio de color (de amarillo a morado) y una precipitación de este compuesto en el fondo de los pocillos. Las células muertas por lo tanto no muestran ninguna transformación del compuesto.⁽²⁰⁾

A partir de una solución de MTT (5 mg/mL) se realizó una dilución 1:10 en el medio de cultivo y se dispensó 100 µL de la dilución final en cada pocillo de la placa 96w. Se incubó a 37 °C durante 30-40'. Tras esta incubación el formazán formado precipitó al final de los pocillos, se retiró el SN y se añadió dimetilsulfóxido, DMSO (Merck), para solubilizar. Una vez solubilizado el producto se midió la absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro para determinar el % de citotoxicidad y el % de viabilidad.

d) Determinación de la liberación de IL-8 en el Luminex

Luminex (Thermo Fisher) es una plataforma de lectura mediante la tecnología xMAP que consiste en combinar fluidos, óptica y procesamiento de señales digitales con microesferas o perlas magnéticas marcadas con fluorescencia lo que permite la captura de hasta 80 analitos proteicos o genes a partir de una única reacción midiendo cada perla individualmente, técnica llamada ProcartaPlex. ⁽²¹⁾

El protocolo de manera resumida para llevar a cabo el ensayo en el Luminex es el siguiente:

- Se centrifuga la placa a 4000 rpm durante 10' a 4 °C.
- Se preparan los reactivos:
 - o Se prepara la solución de lavado 1x a partir del reactivo Wash Buffer 10x con agua doble destilada.
 - o Se prepara la solución con las bolitas magnéticas a partir del reactivo Simplex Beads y la solución de lavado.
 - o Se prepara la curva patrón a partir del standard suministrado en el kitt comercial.
- Se reparten las bolitas en los pocillos en los cuales hay muestras.
- Se pipetea las muestras y los estándares en sus correspondientes pocillos en la placa.
- Se realiza una incubación durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación.
- Se retiran las muestras líquidas permaneciendo las bolitas en la placa (la placa se manipula adherida a un soporte magnético para retener las bolitas). Se realizan 2 lavados y se añade el anticuerpo de detección y se incuba 30' en las mismas condiciones.

- Se vuelven a lavar las bolitas y se añade la estreptavidina-ficoeritrina. Se incuban 30' en las mismas condiciones y se vuelve a lavar.
- Se añade el buffer de lectura y se procesa la placa en el lector de fluorescencia Luminex.

En nuestro caso se pretendía detectar la molécula IL-8, sintetizada y secretada al exterior celular. Se utilizaron las bolitas magnéticas marcadas internamente con un fluoróforo a las cuales se unen IL-8 y los anticuerpos de captura necesarios para esta unión. Posteriormente, la unión de un segundo anticuerpo (anticuerpo de detección específico) también marcado con fluorescencia, permitió la detección de nuestro analito.

En este ensayo solo se trabajó con un tipo de bolitas y la intensidad de fluorescencia registrada para cada pocillo es directamente proporcional con la cantidad de IL-8. Para el análisis de los resultados, el software interpola los datos de cada una de las muestras analizadas en una recta patrón característica de cada analito obtenida a partir de los estándares previamente elaborados.

4.3 Análisis estadístico

Para corroborar que los resultados obtenidos tienen evidencia, se realizaron entre 2 y 3 experimentos independientes por cada una de las dos técnicas microbiológicas y en cada experimento se analizaron 2 réplicas de cada cepa por duplicado cada una. En cuanto a los ensayos de inflamación se realizaron entre 2 y 3 ensayos tanto con probióticos como con postbióticos. Todos ellos (los ensayos de inflamación) con el ensayo de citotoxicidad asociado.

Se realizó un T-test para dos muestras independientes para comparar las técnicas de citometría y recuento por placa, así confirmar que los datos obtenidos en ambas técnicas no difieren tanto y se pueden considerar como no significativas con un P-valor $< 0,05$. Por otro lado, fue realizada una prueba Anova para confirmar si hubo citotoxicidad con las dosis del tratamiento sobre las células HT29 y para calcular si el porcentaje de inhibición de IL-8 fue significativo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Comparativa de técnicas para el recuento de bacterias

En primer lugar, en este trabajo se llevó a cabo una comparación entre las metodologías recuento en placa y citometría de flujo para validar su equivalencia. Estas técnicas microbiológicas tienen el objetivo de contar la concentración de células bacterianas de los caldos cultivados para poder ajustar la dosis de bacterias en los ensayos funcionales.

Con respecto al recuento en placa, es importante que las diluciones en la técnica de cultivo en placa tengan un orden lógico de dilución (Figura 4), es decir, en la dilución 10^{-9} han de existir menos unidades formadoras de colonias por mL que en la dilución 10^{-8} y así progresivamente. Este orden lógico significa que las diluciones se realizaron de manera correcta. En el caso de no ser como se describe se descarta la réplica alterada en el orden.

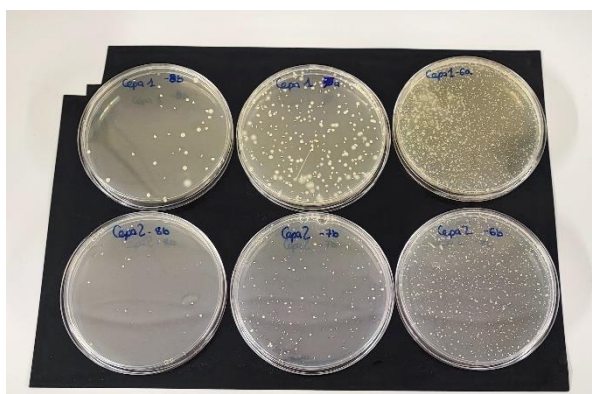


Figura 4. Resultados del recuento en placa de la R2 de L1 y L2 (1 de las 2 placas) que muestran un orden lógico de dilución.

Se realizó el recuento comparativo de 5 cultivos microbianos utilizando tecnologías mencionadas. En ambas técnicas microbiológicas (recuento en placa y citometría) se hicieron 2 réplicas. En los resultados de los recuentos obtenidos, mostrados en la Tabla 2, no se observan diferencias significativas en los recuentos de células bacterianas vivas entre las 2 técnicas.

Tabla 2. Comparación de los resultados de las técnicas de recuento en placa y citometría de flujo en células vivas.

	R1		R2		Promedio (cel/mL)		SD		Significativad Estadística (P-valor < 0,05) T-test
	Citometría	Placa	Citometría	Placa	Citometría	Placa	Citometría	Placa	
L1	1,83E+09	2,61E+09	1,86E+09	2,25E+09	1,85E+09	2,43E+09	2,30E+07	2,55E+08	ns
L2	3,89E+09	4,19E+09	3,95E+09	6,15E+09	3,92E+09	5,17E+09	4,74E+07	1,39E+09	ns
L3	2,08E+09	1,13E+09	2,08E+09	1,91E+09	2,08E+09	1,52E+09	4,24E+06	5,52E+08	ns
B1	5,04E+09	4,65E+09	6,23E+09	4,70E+09	5,63E+09	4,68E+09	8,43E+08	3,54E+07	ns
B2	3,56E+09	8,90E+09	3,31E+09	3,10E+09	3,44E+09	6,00E+09	1,75E+08	4,10E+09	ns

R, Réplica; SD, Desviación Estándar; ns, No Significativa.

La significancia estadística se ha realizado en base al T-test para dos muestras independientes.

La no significancia estadística quiere decir que ambas técnicas son equivalentes para determinar la concentración de células bacterianas vivas en una muestra, como también se puede observar en las gráficas de barras de la Figura 5.

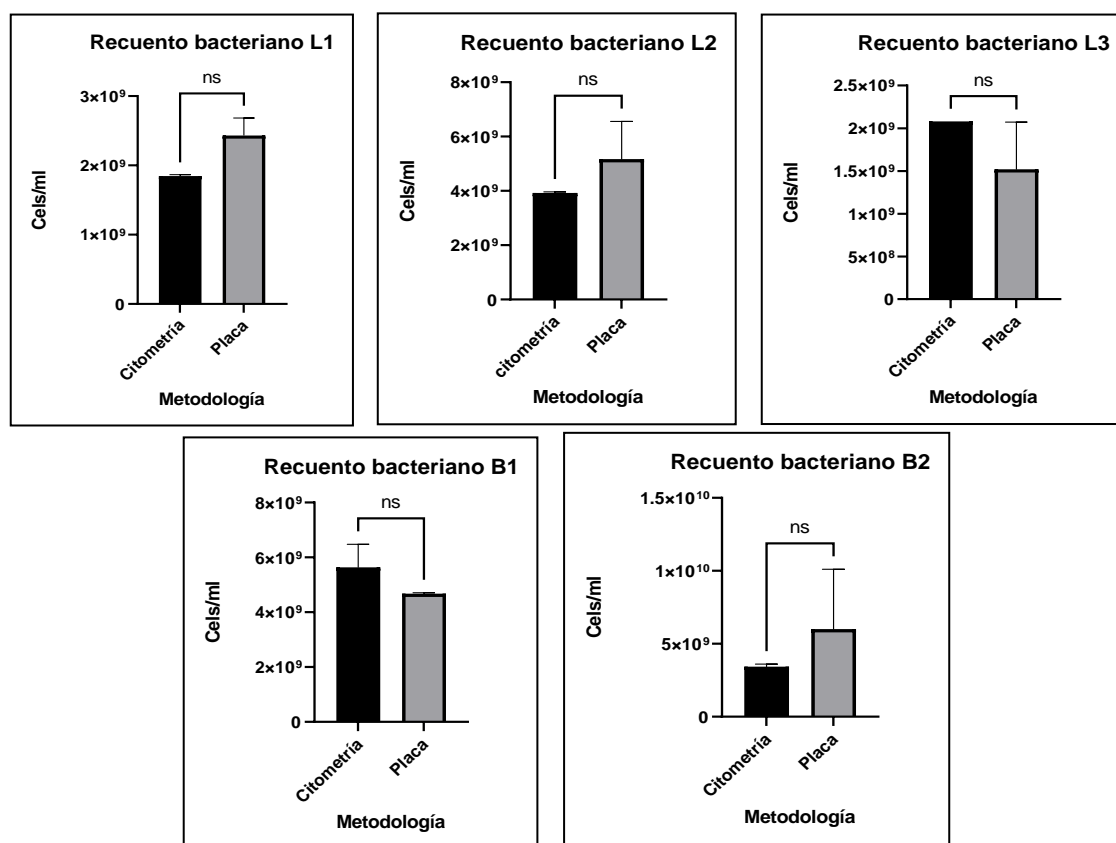


Figura 5. Gráficas comparativas entre recuentos bacterianos vivos en placa y por citometría.

Estos ensayos de funcionalidad requieren tener el cultivo listo para su empleabilidad al momento. Por esta razón la citometría de flujo es la más indicada al permitir obtener la

concentración de bacterias en apenas unos minutos, mientras que con la técnica del recuento en placa el proceso se demora entre 24 y 48 horas. ⁽¹³⁾

Utilizar la placa de Petri tiene además otra limitación. En la placa solo crecen las bacterias vivas. Al ser un medio rico en nutrientes donde solo las células viables poseen el metabolismo activo para poderlos aprovechar, las bacterias dañadas o muertas no proliferan no siendo posible su recuento. Al quedar las posibles bacterias sin viabilidad sin poderse contar no sería posible realizar los ensayos de funcionalidad con las cepas inactivadas en el autoclave, quedando el uso del citómetro como única opción aplicable, ya que el citómetro cuenta todas las unidades celulares sean viables o no.

5.2 Verificación de viabilidad celular e inactivación bacteriana con métodos de tinción en citometría de flujo

Cuando un cultivo bacteriano no está teñido el citómetro no nos permite saber la viabilidad de las células ya que el láser solo detecta el cuerpo celular y no tiene la capacidad de caracterizar si la bacteria tiene el metabolismo activo o tiene la membrana dañada o rota. Por ello en la Tabla 3 se muestra el recuento de las células HT (inactivadas) sin teñir, donde hay un recuento total y no diferenciado en la viabilidad celular. Con el objetivo de verificar que la inactivación bacteriana fue correcta, se llevó a cabo la tinción de las células con los colorantes Syto9 y PI.

Tabla 3. Recuento en citometría de flujo de los cultivos bacterianos inactivados (HT) sin teñir.

	events/ μ L		DF	R1		R2	
	R1	R2		cel/mL	SD	cel/mL	SD
HT-L1	2550	2681	1000	2,55E+09	7,28E+07	2,68E+09	5,73E+07
	2447	2762	1000	2,45E+09		2,76E+09	
HT-L2	4742	4808	1000	4,74E+09	1,54E+08	4,81E+09	3,32E+08
	4524	4339	1000	4,52E+09		4,34E+09	
HT-L3	2649	2700	1000	2,65E+09	4,24E+06	2,70E+09	5,66E+06
	2643	2692	1000	2,64E+09		2,69E+09	
HT-B1	4586	3636	1000	4,59E+09	3,17E+08	3,64E+09	6,51E+07
	4137	3544	1000	4,14E+09		3,54E+09	
HT-B2	3361	2355	1000	3,36E+09	2,61E+08	2,36E+09	1,91E+07
	2992	2382	1000	2,99E+09		2,38E+09	

R, Réplica; DF, Factor de Dilución; SD, Desviación Estándar.

Como se ha explicado anteriormente en el apartado 4 de Material y Métodos Syto9 se introduce en todas las células independientemente de su viabilidad y es desplazado por PI en las bacterias con la pared celular dañada o rota. Este mecanismo nos permite conocer el estado físico de la célula. En las Tablas 4 y 5 se puede ver lo mencionado, la diferenciación por

viabilidad del recuento, distinguiendo entre células vivas y células dañadas o muertas (inactivadas) gracias a la tinción con estos colorantes.

Tabla 4. Recuento bacteriano en citometría de flujo de los cultivos bacterianos vivos con tinción.

	Citometría con tinción (events/ μ L)						DF	Promedio R1		Promedio R2		Promedio R3	
	R1		R2		R3			Totales	Vivas	Totales	Vivas	Totales	Vivas
	Totales	Vivas	Totales	Vivas	Totales	Vivas							
L1	2105	2013	2219	2005	2819	2723	1000	2,07E+09	1,98E+09	2,31E+09	2,07E+09	2,71E+09	2,61E+09
	2037	1939	2391	2139	2597	2491	1000						
L2	4073	3596	3986	3427	5628	4364	1000	4,07E+09	3,55E+09	3,83E+09	3,29E+09	5,67E+09	4,32E+09
	4071	3501	3675	3155	5710	4269	1000						
L3	2577	2076	2173	1965	2639	2361	1000	2,42E+09	1,94E+09	2,20E+09	1,97E+09	2,60E+09	2,33E+09
	2260	1811	2226	1980	2559	2302	1000						
B1	4637	4286	5667	4413	5488	4530	1000	4,62E+09	4,17E+09	5,75E+09	4,47E+09	5,40E+09	4,56E+09
	4595	4045	5835	4524	5316	4596	1000						
B2	3665	3169	3897	3413	3616	3505	1000	3,74E+09	3,20E+09	3,82E+09	3,35E+09	3,62E+09	3,51E+09
	3812	3223	3744	3286	3632	3516	1000						

R, Réplica; DF, Factor de Dilución.

Tabla 5. Recuento bacteriano en citometría de flujo de los cultivos bacterianos inactivos o HT con tinción.

	Citometría con tinción (events/ μ L)				DF	Promedio R1		Promedio R2	
	R1		R2			Totales	Dañadas	Totales	Dañadas
	Totales	Dañadas+Muertas	Totales	Dañadas+Muertas					
HT-L1	2630	2541	2768	2760	1000	2,55E+09	2,54E+09	2,77E+09	2,72E+09
	2466	2531	2768	2681	1000				
HT-L2	4499	4408	4734	4688	1000	4,44E+09	4,35E+09	4,73E+09	4,78E+09
	4388	4291	4733	4878	1000				
HT-L3	2693	2629	2552	2513	1000	2,65E+09	2,59E+09	2,62E+09	2,58E+09
	2598	2560	2685	2640	1000				
HT-B1	3955	3802	3293	3207	1000	4,09E+09	3,93E+09	3,30E+09	3,22E+09
	4234	4058	3300	3235	1000				
HT-B2	2894	2860	2378	2330	1000	2,89E+09	2,82E+09	2,82E+09	2,36E+09
	2894	2779	2468	2389	1000				

R, Réplica; DF, Factor de Dilución.

En el citómetro el haz de luz reflejado una vez ha incidido el láser en las células bacteriana es de diferente color dependiendo del colorante que haya predominado en la bacteria. En el caso de predominar la entrada de Syto9, la fluorescencia emitida es verde caracterizando a las células como probióticos. Mientras que con la entrada de PI la fluorescencia es de color rojo, indicando que la bacteria está dañada o muerta. Entonces el color rojo, sirve de verificación, es decir, es indicativo de que la inactivación bacteriana mediante la técnica del autoclave ha sido eficaz. ⁽¹⁴⁾

La Tabla 6 recoge esta verificación. Tras la tinción con Syto9 y PI se confirma que la técnica de inactivación celular mediante autoclave ha resultado positiva. En la tabla A) todos los caldos medidos tenían más de un 80% de promedio de bacterias vivas. Predominó el colorante Syto9 ya que las paredes celulares estaban intactas. En la tabla B) el desplazamiento de PI fue notable, los porcentajes son contrarios llegando en más de una cepa a casi un 100% de inactivación celular promedio.

Tabla 6. Viabilidad o porcentaje de dañadas de las células bacterianas tras una tinción con Syto9 y PI. A) cultivos frescos, B) tras técnica de inactivación.

Células vivas (%)			cel/mL		Células dañadas (%)		cel/mL	
R1	R2	R3	Prromedio	SD	R1	R2	Prromedio	SD
95,63	90,36	96,59	93,86	3,11	96,62	99,71	98,95	2,83
95,19	89,46	95,92			102,64	96,86		
88,29	85,98	77,54	83,07	5,51	97,98	99,03	99,46	2,46
86,00	85,85	74,76			97,79	103,06		
80,56	90,43	89,47	86,58	4,86	97,62	98,47	98,24	0,42
80,13	88,95	89,96			98,54	98,32		
92,43	77,87	82,54	84,14	5,91	96,13	97,39	96,85	1,03
88,03	77,53	86,46			95,84	98,03		
86,47	87,58	96,93	90,02	5,43	98,83	97,98	97,41	1,24
84,55	87,77	96,81			96,03	96,80		

R, Réplica; SD, Desviación Estándar.

5.3 Ensayo de inflamación en células HT29

Realizado el recuento celular mediante citometría de flujo tanto en las cepas vivas como en las inactivadas y calculada las dosis bacterianas para cada tratamiento, se procedió al ensayo de funcionalidad antiinflamatoria por parte de los probióticos o postbióticos, mediante la inhibición de la acción TNF α sobre las células del epitelio intestinal HT29.

Como se muestra en la Tabla 7 y la Figura 6 A), de las 5 cepas seleccionadas para este trabajo, solo 1 de ellas mostró una inhibición de la secreción de IL-8 entorno al 40 % en su forma viva. Este resultado fue inferior al probiótico control LGG que mostró niveles altos de inhibición (un mínimo de 75 %) de la inflamación producida por TNF α . En este ensayo LGG actuó como control positivo debido a sus capacidades funcionales descritas en la bibliografía. ⁽²²⁾ Respecto a los postbióticos, ninguna de las cepas tuvo efecto alguno (Figura 9) aunque de ellas se hablará más adelante.

Tabla 7. Inhibición de la producción de IL-8 con cepas probióticas y cepas postbióticas (ambas dosis) en células HT29.

	Inhibición (%)		
	Probióticos	Postbióticos	
	Dosis 10 ^{^08} cel/mL	Dosis 10 ^{^08} cel/mL	Dosis 10 ^{^09} cel/mL
TNF α	0,0	0,0	0,0
LGG	89,4	76,6	75,3
L1	0,0	0,0	0,0
L2	43,7	0,0	0,0
L3	5,0	0,0	0,0
B1	0,0	0,0	0,0
B2	0,9	0,0	0,0

Ninguna de las cepas probióticas presentó citotoxicidad sobre las células HT29 como se muestra en la Figura 6 B). Lo que quiere decir que a las dosis 10^{-8} cel/mL son seguras para el epitelio intestinal del hospedador.

A parte de tener resultados positivos como antinflamatorio, para ser probiótico ha de cumplir otros requisitos mencionados anteriormente: capaces de sobrevivir a los pH bajos del tracto gastrointestinal, capaz de resistir a antibióticos y otros organismos patógenos y a las condiciones de procesado, capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, que se encuentren en la microbiota sana habitual y tener un corto tiempo de producción. Para poder confirmar estas capacidades se tendrían que seguir desarrollando otros estudios de funcionalidad, para asegurarnos que cumplen con el mínimo de requisitos, poder llamarlo probiótico y comercializarlo para el desarrollo de terapias, alimentos funcionales, etc.

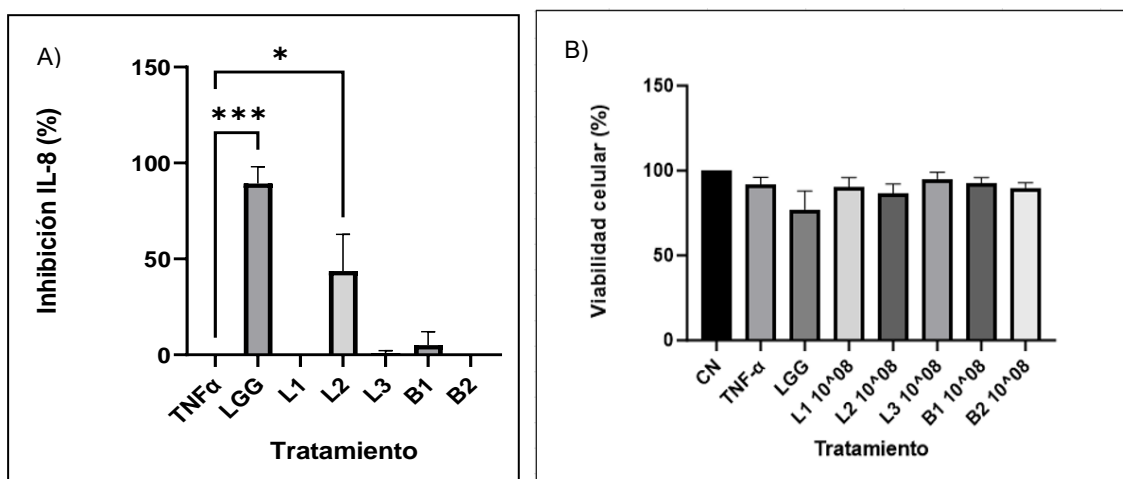


Figura 6. A) Inhibición de la producción de IL-8 con cepas probióticas en células HT29. Promedio de los 2 ensayos en las cepas vivas. Se ha realizado una prueba Anova. B) Nivel de viabilidad celular (citotoxicidad) del tratamiento con las bacterias vivas (probióticos) sobre las células HT29. Se ha realizado una prueba Anova.

*p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01; ***p-valor < 0,001

En cuanto a las cepas inactivadas (postbióticos) ninguna de ellas ha presentado un efecto antinflamatorio positivo por lo tanto no son funcionales en este ámbito, como se observa en la Figura 6 A). Además, 2 de las cepas, L1 a la dosis 10^{-9} cel/mL y L2 a la dosis 10 cel/mL (Figura 7 B)) presentan cierto nivel de citotoxicidad al haber disminuido la viabilidad de las células HT29

por debajo del 80 %. Quiere decir, que en el caso de continuar investigando con estas cepas no se podría utilizar esta dosis y habría que ensayar ajustando a una dosis más diluida.

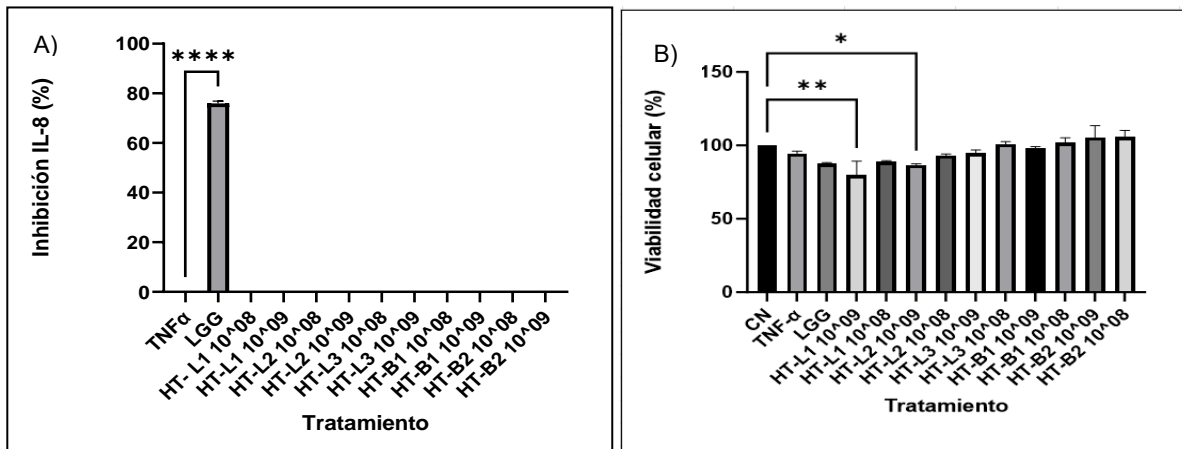


Figura 7. A) Inhibición de la producción de IL-8 con cepas HT (postbióticas) en células HT29. Promedio de los 2 ensayos en las cepas vivas. Se ha realizado una prueba Anova. **B)** Nivel de viabilidad celular (citotoxicidad) del tratamiento con las bacterias HT (postbióticos) sobre las células HT29. Se ha realizado una prueba Anova. *p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01; ***p-valor < 0,001

A nivel global, se han obtenido resultados donde la mayoría de las cepas activadas o inactivadas no presentaban funcionalidad antiinflamatoria, excepto L2 en su forma probiótica. Esto quiere decir, que esta capacidad de inhibición de la inflamación es cepa específico y que las demás cepas no son funcionales en presentar capacidad antiinflamatoria. Por lo tanto, el ensayo es discriminatorio, no todas las cepas son buenas candidatas en esta función. Este ensayo selectivo puede servir como un pequeño cribado antiinflamatorio.

6. CONCLUSIONES

- Las técnicas de recuento en placa y citometría son equivalentes para la enumeración de bacterias de una suspensión celular.
- La técnica de citometría es más rápida, permite obtener resultados en menos tiempo, lo que es necesario para realizar la enumeración de bacterias inactivadas mediante tinción con Syto9 y yoduro de propidio.
- Se ha identificado la cepa viva L2 con potencial antiinflamatorio mediante la inhibición de la secreción de IL-8 producida por la estimulación con TNF α un ensayo celular con enterocitos humanos sin verse afectada su viabilidad celular.

- Es necesario realizar en el futuro otros estudios de funcionalidad con la cepa L2 para poder caracterizarla como probiótico. Es importante para su comercialización y poder desarrollar terapias o alimentos funcionales para beneficiar la salud de las personas.

7. AGRADECIMIENTOS

A todo el personal de Biopolis SL. Ester Pardo, Guillermo García, Verónica Martínez, Verónica Navarro y el resto de compañeros que en algún momento me han prestado ayuda y algo de su tiempo con mucha motivación y empatía para trasmitirme todos sus conocimientos profesionales posibles con el tiempo disponible. A Íngrid Aguilo, coordinadora de prácticas (URV), por ayudarme a encontrar una buena empresa en Valencia donde poder desarrollar las prácticas. A Miquel Mulero, profesor (URV) y tutor académico de este TFM, el esfuerzo empleado en desarrollar una buena memoria. A mi familia y amigos, por entender los momentos más estresantes e intentar ayudarme. Y a toda persona que directa o indirectamente haya contribuido a que este TFM sea posible.

8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Isiaka, A. B., Anakwenze, V. N., Uzoka, U. H., Ilodinso, C. R., Oso, M. O., Ekwealor, C. C., Anaukwu, C. G., Isiaka, A. B., Anakwenze, V. N., Uzoka, U. H., Ilodinso, C. R., Oso, M. O., Ekwealor, C. C., & Anaukwu, C. G. (2024). Exploring the role of gut microbiota in human health. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 27(1), Article 1. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2024.27.1.0100>
- (2) Ji, J., Jin, W., Liu, S.-J., Jiao, Z., & Li, X. (2023). Probiotics, prebiotics, and postbiotics in health and disease. *MedComm*, 4(6), e420. <https://doi.org/10.1002/mco2.420>
- (3) Dani. (2023, enero 17). *Probióticos, qué son y qué tipos hay*. Marnys. <https://www.marnys.com/es/magazine/probioticos-que-son-tipos/>
- (4) Yan, R., Zeng, X., Shen, J., Wu, Z., Guo, Y., Du, Q., Tu, M., & Pan, D. (2024). New clues for postbiotics to improve host health: A review from the perspective of function and mechanisms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104(11), 6376-6387. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13444>

- (5) Alarcón Cavero T, D'Auria G, Delgado Palacio S, Del Campo Moreno, R, Ferrer Martínez, M. Microbiota. 59. Del Campo Moreno R (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*. 2016: 1-43
- (6) Odriozola, A., González, A., Odriozola, I., Álvarez-Herms, J., & Corbi, F. (2024). Microbiome-based precision nutrition: Prebiotics, probiotics and postbiotics. *Advances in Genetics*, 111, 237-310. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2024.04.001>
- (7) Marina A Senchukova; Yuan Y; Li X; Fan J-R. Microbiota of the gastrointestinal tract? Friend or foe. *World J Gastroenterol* 2023 January 7; 29(1): 1-222
- (8) Ding, R.-X., Goh, W.-R., Wu, R.-N., Yue, X.-Q., Luo, X., Khine, W. W. T., Wu, J.-R., & Lee, Y.-K. (2019). Revisit gut microbiota and its impact on human health and disease. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(3), 623-631. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.12.012>
- (9) *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (LGG) related health claims | EFSA. (2011, junio 30). <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2233>
- (10) Sánchez-Pellicer, P., Navarro-Moratalla, L., Núñez-Delegido, E., Ruzafa-Costas, B., Agüera-Santos, J., & Navarro-López, V. (2022). Acne, Microbiome, and Probiotics: The Gut-Skin Axis. *Microorganisms*, 10(7), 1303. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071303>
- (11) Milian, G., Pérez, M., & Bocourt, R. (2008). Empleo de probióticos basado en Bacillus sp y de sus endosporas en la producción avícola. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 42(2), Art. 2.
- (12) Abriouel, Hikmate, Omar, N. B., López, R. L., & Gálvez, Antonio (2008). La doble faceta del género Enterococcus y su importancia en alimentos. *Real Acad Ciencias Vet Andalucía Orient*, 21(1), 66-74.
- (13) *Spectroquant® Prove 600 UV/VIS Spectrophotometer* | Merck. (s. f.). Recuperado 26 de julio de 2024, de <https://www.merckmillipore.com/ES/es/analyticals-and-sample-preparation/spectroquant-prove/spectroquant-prove-600/XUeb.qB.niQAAAFQa.V2i3EE.nav>
- (14) Pérez-Lara JC, Santiago-Cruz W, Romero-Ramírez H, Rodríguez-Alba JC. Fundamentos de Citometría de flujo: Su aplicación diagnóstica en la

- investigación biomédica y clínica. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*. Vol.18, no. 2, julio-diciembre 2018: 1-12
- (15) *Fluorescence Microscopy Methods for Determining the Viability of Bacteria in Association with Mammalian Cells*. (s. f.). Recuperado 29 de julio de 2024, de <https://app.jove.com/t/50729/fluorescence-microscopy-methods-for-determining-viability-bacteria?language=Spanish>
- (16) *HT-29—HTB-38 | ATCC*. (s. f.). Recuperado 26 de julio de 2024, de <https://www.atcc.org/products/htb-38>
- (17) onscience.es. (2023, mayo 24). Inmortales: Las células HT29 contra el cáncer de colon. *On Science*. <https://onscience.es/inmortales-celulas-ht29-contra-el-cancer-de-colon/>
- (18) Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., & Recio, I. (2015). HT29 Cell Line. En K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, & H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: In vitro and ex vivo models*. Springer. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500137/>
- (19) Son, D. O., Satsu, H., & Shimizu, M. (2005). Histidine inhibits oxidative stress- and TNF- α -induced interleukin-8 secretion in intestinal epithelial cells. *FEBS Letters*, 579(21), 4671-4677. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.038>
- (20) *Protocolo del análisis de la viabilidad y la proliferación celulares con MTT*. (s. f.). Recuperado 26 de julio de 2024, de <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>
- (21) *Luminex Platform Technology—ES*. (s. f.). Recuperado 26 de julio de 2024, de <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/antibodies/immunoassays/procartaplex-assays-luminex/features.html>
- (22) Capurso L. (2019). Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: A Review. *Journal of clinical gastroenterology*, 53 Suppl 1, S1–S41. <https://doi.org.sabidi.urv.cat/10.1097/MCG.0000000000001170>