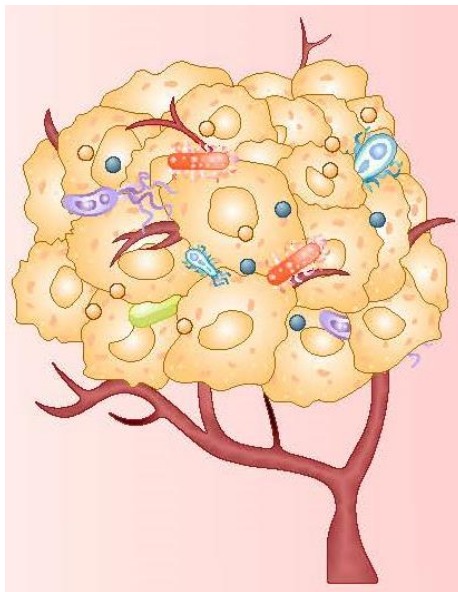


Optimización de la invasión de células HeLa por bacterias asociadas al microbioma humano.

Optimising the invasion of HeLa cells by bacteria from the human microbiome.



(Du et al., 2023)

Trabajo de Fin de Grado

PAOLA RUIZ PÉREZ

Tutorizado por Juan Ramón Hernández Fernaud y Javier Donate Correa

Grado en Biología. Julio 2024

Resumen.....	1
Abstract.....	1
1. Introducción.....	2
1.1. El cáncer.....	2
1.2. Líneas celulares.....	4
1.2.1. HeLa.....	4
1.3. Factores que influyen los cultivos celulares.....	5
1.3.1. Señalización celular y el suero fetal bovino (FBS).....	5
1.3.2. Matriz extracelular y la gelatina.....	5
1.3.3. Endocitosis y el fosfato cálcico.....	6
1.4. Microbiota y cáncer.....	6
1.4.1. Staphylococcus xylosus.....	8
1.4.2. Lactobacillus animalis.....	8
1.4.3. Enterococcus faecalis.....	9
2. Objetivos.....	9
3. Material y Métodos.....	10
3.1. Cultivos bacterianos.....	10
3.1.1. Staphylococcus xylosus.....	10
3.1.2. Lactobacillus animalis.....	11
3.1.3. Enterococcus faecalis.....	11
3.2. Cultivos eucariotas.....	11
3.3. Cuantificación de la concentración de bacterias por densidad óptica (OD).....	12
3.4. Co-cultivo de HeLa y bacterias, determinación de la concentración óptima de microorganismos.....	12
3.5. Test de sensibilidad a gentamicina y ampicilina.....	13
3.6. Modificación del protocolo para la evaluación de la internalización de S. xylosus, L. animalis y E. faecalis en células HeLa.....	13
3.7. Evaluación de la internalización de los microorganismos dependiente de diferentes factores.....	14
3.7.1. Efecto del suero fetal bovino (FBS).....	14
3.7.2. Efecto de la gelatina.....	14
3.7.3. Efecto del fosfato cálcico.....	14
3.8. Evaluación de la proliferación de L. animalis en el interior de la célula HeLa.....	14
3.9. Estadística.....	15

4.	Resultados y discusión.....	15
4.1.	Caracterización parcial de las bacterias objeto de estudio.....	15
4.2.	Determinación de la concentración óptima de microorganismos.....	16
4.3.	Efecto del suero fetal bovino (FBS) en la internalización de las bacterias.....	18
4.4.	Efecto de la gelatina, como modelo de ECM, en la internalización bacteriana.....	19
4.5.	Efecto del fosfato cálcico (CaPO ₄) en la internalización de los microorganismos.....	20
4.6.	Evaluación de la proliferación de <i>L. animalis</i> en el interior de las células HeLa.	21
5.	Conclusiones:.....	23
6.	Bibliografía.....	24

Gracias a mi familia y amigos por acompañarme durante el camino, a mi compañera de laboratorio Paula por compartir las alegrías y los fracasos en el laboratorio, gracias a Ángeles por tu energía y charlas que nos hacían los días más amenos y gracias a mis tutores Javier Donate y, en especial a Juan Ramón, hemos aprendido mucho gracias a tu paciencia y motivación.

Resumen.

El cáncer es la enfermedad a nivel mundial que causa más muertes, después de la enfermedad cardiovascular. Cada tumor posee un fenotipo diferente, por lo que se considera una enfermedad múltiple. Sin embargo, podemos definirlo empleando señas de identidad comunes, con impacto en su evolución y malignidad. Entre las señas de identidad recientes, podemos encontrar a los microorganismos, destacando aquellos que, provenientes de la microbiota, son capaces de invadir la célula tumoral. La invasión bacteriana, en el contexto tumoral, no ha sido estudiada en profundidad, sin embargo, existen múltiples factores en el microambiente tumoral que afectan al comportamiento de las células tumorales, normales y a las bacterias de la microbiota. En este trabajo estudiamos diversos aspectos del ambiente tumoral que alteran las capacidades de invasión, de las células HeLa, por las bacterias colonizadoras de tumores *Staphylococcus xylosum*, *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus animalis*. El principal factor que incrementó la invasión en *S. xylosum* y *L. animalis* fue la adición de suero fetal bovino, mientras que el uso de la gelatina como matriz extracelular y el fosfato cálcico como adyuvante de endocitosis no mostraron diferencias significativas. En conclusión, la diversidad de mecanismos en la invasión de las células tumorales observados, pone de manifiesto la diversidad existente en la enfermedad, haciendo imprescindible la investigación dirigida hacia la medicina personalizada del paciente oncológico.

Palabras clave: cáncer, HeLa, microbiota intratumoral, *Staphylococcus xylosum*, *Lactobacillus animalis*, *Enterococcus faecalis*.

Abstract.

Cancer is the second deadliest disease in the world after cardiovascular disease. Each tumour has a different phenotype and is therefore considered a multi-disease. However, it can be defined by common hallmarks that impact on its development and malignancy. Recent evidence suggests that microorganisms, particularly those from the microbiota, are able to invade the tumour cell. Bacterial tumour invasion has not been studied in depth, however, there are many factors in the tumour microenvironment that influence the behaviour of tumour cells, normal cells and microbiota bacteria. In this work, we investigated several aspects of the tumour environment that alter the invasion ability of HeLa cells by the tumour colonising bacteria *Staphylococcus xylosum*, *Enterococcus faecalis* and *Lactobacillus animalis*. The main factor that increased invasion in *S. xylosum* and *L. animalis* was the addition of fetal bovine serum, whereas the use of gelatin as an extracellular matrix and calcium phosphate as an endocytosis

adjuvant showed no significant differences. In conclusion, the diversity of mechanisms of tumour cell invasion observed highlights the diversity of the disease, making research into personalised medicine for cancer patients essential.

Key words: cancer, HeLa, intratumoral microbiota *Staphylococcus xylosus*, *Lactobacillus animalis*, *Enterococcus faecalis*.

1. Introducción.

1.1.El cáncer.

Se conoce como cáncer a un grupo de enfermedades que, en la actualidad, se diagnostica anualmente a más de 18 millones de personas en el mundo, de las cuales 9,6 millones fallece. Según la Organización Mundial de la Salud, se trata de la segunda causa de muerte, a nivel mundial, detrás de las enfermedades cardiovasculares. La prevalencia del cáncer a 5 años se estima en el 1,3% de la población mundial, esto representa que más de 100 millones de personas sufren la enfermedad y, por tanto, es de vital importancia su estudio. En particular, el cáncer de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado son los más comunes en hombres, mientras que el cáncer de mama, colorrectal, pulmón, cuello uterino y tiroides son los más comunes en mujeres (Didkowska & Koczkodaj, 2022).

En las últimas décadas, se ha producido un gran avance en la comprensión del cáncer reconociéndolo como un ecosistema complejo, pero altamente estructurado, involucrando células cancerosas, células epiteliales anormales, una variedad de células estromales (células mesenquimales y fibroblastos asociados al cáncer (CAF)), células inmunes (células linfoides y mieloides pro y antitumorales), células endoteliales y pericitos (componen los vasos sanguíneos tumorales), nervios y, recientemente, se han incluido a los microorganismos. Todas estas células se encuentran embebidas en una red de proteínas que conforman la matriz extracelular (ECM, del inglés “Extra Cellular Matrix”) y que, en su conjunto, constituyen el microambiente tumoral (TME, del inglés “Tumour Micro Environment”; De Visser & Joyce, 2023; Rojo De La Vega, 2023). Esta complejidad estructural y diversidad existente entre los diferentes tumores, se ha simplificado con la definición y actualización periódica de las características y factores tumorales básicos comunes que, además de ser las señas de identidad de cada tumor, son dianas donde centrar la investigación para encontrar soluciones terapéuticas (Figura 1; Lythgoe et al., 2022; Swanton et al., 2024).

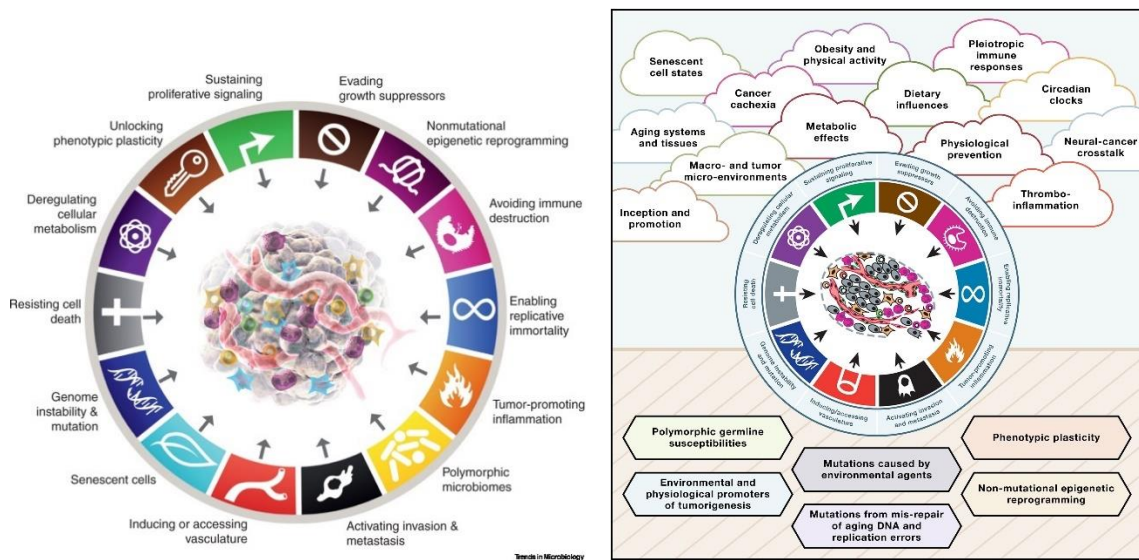


Figura 1. Señas de identidad del cáncer y factores que influyen en este grupo de enfermedades (Lythgoe et al., 2022; Swanton et al., 2024).

Una de las primeras señas de identidad descrita fue la autosuficiencia tumoral en las señales de proliferación, donde las células cancerosas producen y liberan sus propios factores de crecimiento, activan receptores en la superficie celular y expresan oncogenes que impulsan el desarrollo y la diferenciación del tumor (Sobti et al., 2024). Otras señas de identidad como la inestabilidad genómica, la reprogramación epigenética y las interacciones celulares dentro del TME facilitan la diversificación de las células tumorales (Figura 2; Ciriello et al., 2024). Una característica remarcable, debido a su impacto en la supervivencia del paciente, es la capacidad de invasión de tejidos sanos lejanos al tumor o metástasis, donde intervienen la secreción de proteasas, enzimas que descomponen la ECM, alterando su composición y rigidez (Sobti et al., 2024). Aunque las señas de identidad se tratan separadamente, existe una estrecha interacción entre ellas. Por ejemplo, la proliferación y crecimiento del tumor altera la señalización celular y la ECM, promoviendo la angiogénesis tumoral, regulando positivamente proteínas proangiogénicas como el factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (del inglés “Vascular Endothelial Growth Factor”) y regulando negativamente las antiangiogénicas como la angiostatina. La acción conjunta de todas estas actividades, permite que las células tumorales proliferen y escapen del tumor primario, invadan y se establezcan en tejidos sanos distantes (Hanahan & Weinberg, 2011). En conclusión, la tumorigénesis es un proceso complejo y dinámico que evade la supresión del crecimiento, resiste a la apoptosis, presenta multiplicación ilimitada, modula el metabolismo celular, escapa a la destrucción inmune e invade otros tejidos (Belli et al., 2018).

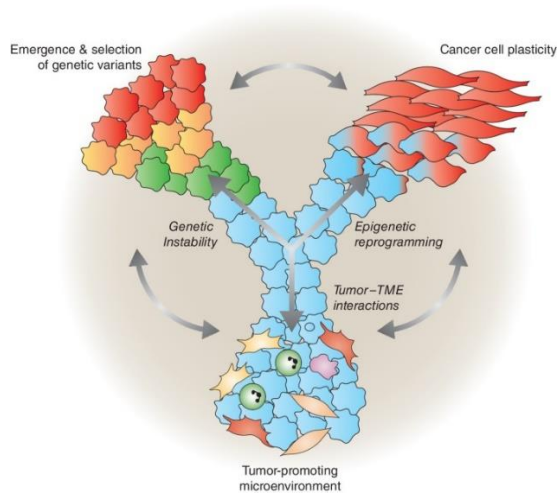


Figura 2. Evolución del cáncer. En este proceso participan factores como la inestabilidad genómica, la reprogramación epigenética e interacciones entre las células tumorales y el microambiente tumoral (TME) (Ciriello et al., 2024).

1.2. Líneas celulares.

Los tumores son sistemas complejos, difíciles de estudiar directamente, por ello, en el laboratorio se emplean modelos más sencillos de manipular e interpretar. En este sentido, los cultivos celulares, más sencillos y manipulables, representan una alternativa a los experimentos con animales, siendo modelos indispensables para la investigación biomédica, así como para ensayos en la industria farmacéutica (Bauer et al., 2021). Muchas de las líneas celulares actuales, derivan de tumores reales y contienen cientos o miles de aberraciones surgidas en el lugar de procedencia, alterando su estructura normal y convirtiéndolas en modelos específicos para la investigación del cáncer (Goodspeed et al., 2016). Es por ello que la selección correcta de las líneas celulares, durante el diseño experimental, es fundamental para alcanzar los objetivos del investigador (Ruiz-Moreno et al., 2018).

1.2.1. HeLa.

La línea celular HeLa, originada a partir de un tumor de cáncer de cuello uterino de la paciente Henrietta Lacks, fue el primer cultivo celular estable (Devor et al., 2020; Landry et al., 2013). Estas células presentan unas características que facilitan su manipulación en el laboratorio, siendo un modelo celular muy robusto, altamente resistente y que prolifera en diversas condiciones de laboratorio. Además, proliferan *in vitro* dos veces más rápido que las células de tejidos normales, facilitando su manipulación y reduciendo los tiempos de los experimentos (Lyapun et al., 2019). Como valor añadido, se pueden congelar, para su almacenamiento y conservación, durante décadas, siendo un buen ejemplo de la inmortalidad característica de las células cancerosas.

1.3. Factores que influyen en los cultivos celulares.

Las células eucariotas poseen múltiples estímulos en el organismo vivo que son imposibles de reproducir en el laboratorio de forma simple. Sin embargo, si es posible introducir variables en los cultivos celulares, que, individualmente, simulan algunas de las señales de identidad tumorales descritas anteriormente. En el presente trabajo ensayaremos algunas de estas propiedades del TME.

1.3.1. Señalización celular y el suero fetal bovino (FBS).

Los medios de cultivo y sus suplementos juegan un papel muy importante en los cultivos celulares, siendo el suero fetal bovino (FBS) uno de los principales componentes. El FBS contiene aproximadamente 1800 proteínas y más de 4000 metabolitos, entre los que podemos encontrar hormonas, factores de crecimiento, aminoácidos, proteínas, vitaminas, sales inorgánicas, oligoelementos, carbohidratos, lípidos, etc. Gracias al FBS se estimula el metabolismo celular y favorece la adhesión, unión, proliferación y mantenimiento de las células en cultivo. También ayuda a mejorar la capacidad amortiguadora del pH del medio y reducir el daño físico causado por la manipulación del cultivo (Subbiahanadar Chelladurai et al., 2021). En resumen, el FBS es fundamental para la supervivencia y proliferación de las líneas celulares en cultivo.

1.3.2. Matriz extracelular y la gelatina.

La ECM es una red de proteínas y otras biomoléculas que rodean, sostienen y dan estructura a las células y los tejidos del cuerpo. La ECM se caracteriza por su composición, principalmente constituida por proteínas como el colágeno, la elastina, la fibronectina y la laminina, y por otras características intrínsecas como su rigidez y elasticidad. En su conjunto, estas características desempeñan funciones en la migración, adhesión, proliferación y diferenciación celular (Mogha et al., 2023).

Existen múltiples tipos de ECM que se emplean en los cultivos celulares, entre las que encontramos la gelatina. Esta es un compuesto biodegradable y biocompatible, derivado del colágeno tipo I, con una amplia variedad de aplicaciones alimentarias, cosméticas y farmacéuticas. Es un biopolímero, no tumoral, que presenta una menor organización que el colágeno, pero una composición molecular muy similar. Debido a esto, la gelatina tiene la capacidad de reemplazar y realizar funciones similares a las del colágeno y, por tanto, se utiliza a menudo en cultivos celulares a modo de modelo de la ECM (Bello et al., 2020; Liu et al., 2015; Yang & Ou, 2005).

1.3.3. Endocitosis y el fosfato cálcico.

La transfección es un proceso por el cual se introducen ácidos nucleicos foráneos en células vivas, para producir células genéticamente modificadas. Existen muchos métodos de transfección, siendo los métodos químicos los primeros que se utilizaron en la manipulación de células de mamíferos. Entre las moléculas más empleadas encontramos polímeros, lípidos, aminoácidos catiónicos y el fosfato cálcico (CaPO_4), donde cada uno de ellos emplea mecanismos diferentes, pero con el mismo objetivo, introducir moléculas impermeables a la membrana plasmática en el interior celular. En general, los métodos químicos de transfección se basan en un mismo principio: en primer lugar, los productos químicos, cargados positivamente, forman complejos con el ácido nucleico, el cual está cargado negativamente. A continuación, estos complejos, cargados positivamente, son atraídos por la carga negativa de la membrana celular para, finalmente, pasar a través de la membrana, posiblemente por estimulación de la endocitosis y fagocitosis (Kim & Eberwine, 2010).

En más detalle, la transfección con CaPO_4 es un método versátil que permite introducir diferentes vectores en una misma célula con una alta eficiencia, además del bajo costo económico que supone el compuesto (Gaunitz et al., 1996). El método consiste en mezclar el ADN o ARN con cloruro cálcico (CaCl_2), en presencia de tampón fosfato, para formar cristales mixtos de ácidos nucleicos y CaPO_4 . Cuando estos cristales se depositan sobre las células cultivadas, estimulan su internalización por endocitosis (Smale, 2010). De igual forma, las bacterias cargadas negativamente podrían formar cristales mixtos con CaPO_4 y favorecer su internalización por endocitosis.

1.4. Microbiota y cáncer.

El cuerpo humano alberga una amplia variedad de microorganismos como bacterias, virus y hongos que, en su conjunto, forman la microbiota humana. La podemos encontrar en la piel, el tracto respiratorio, genital y gastrointestinal, siendo además característica de cada una de las áreas, tanto en las especies de microorganismos que la componen como en sus funciones. Por ejemplo, la flora intestinal juega un papel fundamental participando en la absorción de nutrientes, la regulación del sistema inmunológico del huésped y la defensa contra microorganismos patógenos (Gebreyel et al., 2022). Además, estas complejas interacciones entre el huésped y los microorganismos se han encontrado en otros contextos patológicos, como el cáncer. Sabemos que los microorganismos se encuentran implicados en el 20% de las neoplasias malignas humanas y existen evidencias de que su presencia afecta directamente a la tumorigénesis, progresión tumoral y sensibilidad a las terapias. Por ejemplo, las bacterias

asociadas a tumores pueden inducir el daño del ADN aumentando las mutaciones, activando oncogenes (regulando oncogenes o regulando positivamente vías de señalización oncogénica) y alterando el sistema inmunológico. En este punto, cabe resaltar que el tratamiento con antibióticos de enfermos oncológicos, de forma lógica, debería ser ventajosa. Sin embargo, este se asocia paralelamente con una reducción de la microbiota normal y, en consecuencia, de la respuesta inmunitaria. Favoreciendo, por tanto, la progresión tumoral y la metástasis, invalidando esta aproximación terapéutica (Wong-Rolle et al., 2021).

A pesar de la controversia que pueda existir al asumir la existencia de microorganismos en tejidos considerados estériles, los tumores parecen favorecer su presencia debido a la formación de áreas anaeróbicas y necróticas, consecuencia del rápido crecimiento y la presencia de una red vascular anormal. Por ello, el núcleo del tumor es un área hipóxica que evade al sistema inmune, lo que da lugar a un nicho óptimo para la colonización de microorganismos anaeróbicos obligados y facultativos (Du et al., 2023). La colonización de los tumores se cree que proviene de la microbiota de los tejidos normales adyacentes, el sistema circulatorio y las mucosas (Figura 3; Wang et al., 2023). Sin embargo, existen evidencias de la presencia de microorganismos en cánceres que no están en contacto íntimo con la microbiota como el cáncer de páncreas, donde se cree que las bacterias podrían acceder desde el intestino ascendiendo por el conducto pancreático (Fu et al., 2022). También se pueden encontrar microorganismos, provenientes de microbiotas distantes al tumor, como en el cáncer de pulmón y de cuello uterino donde se han identificado bacterias de la microbiota intestinal. En el caso del cáncer de cuello de útero (similar a nuestro modelo celular HeLa), predominan, en el tumor respecto al tejido sano, los microorganismos pertenecientes a las familias *Bacillaceae*, *Halobacteriaceae* y *Prevotellaceae* junto con el género *Lactobacillus* (Wang et al., 2023).

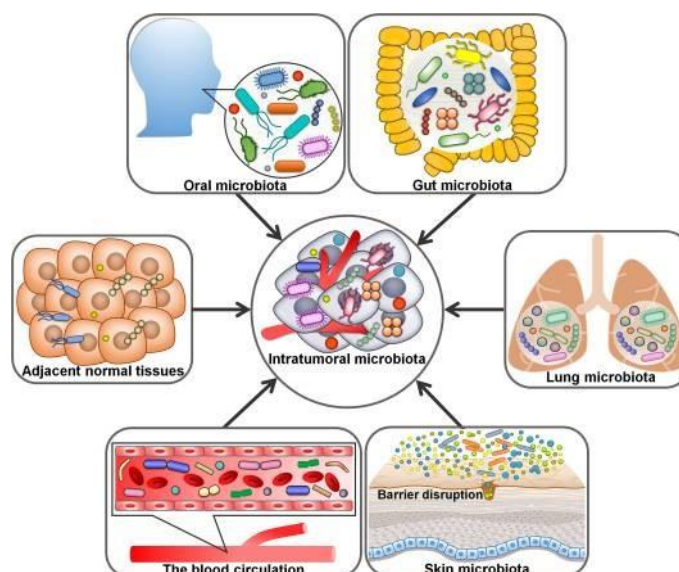


Figura 3. Orígenes potenciales de la microbiota intratumoral (Wang et al., 2023).

En los últimos años, se ha establecido una relación entre los microorganismos y las células tumorales aún más estrecha, al demostrar, además de su mayor presencia en el tumor, su localización intracelular. En experimentos realizados con un modelo de cáncer de mama murino espontáneo (cepa MMTV-PyMT) se detectó la presencia de $1,7 \times 10^4$ bacterias/g de tejido en la mama normal del ratón, frente a una carga bacteriana casi diez veces mayor en el tejido tumoral ($1,35 \times 10^5$ bacterias/g de tejido). Además, se encontró en el tejido tumoral de los ratones, bacterias intracelulares de los géneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*. En experimentos posteriores, los autores demostraron la presencia intracelular de las especies *Staphylococcus xylosus*, *Lactobacillus animalis* y *Enterococcus faecalis* las cuales incrementaron la metástasis del cáncer de mama, sin afectar al crecimiento del tumor primario (Fu et al., 2022). Por su relevancia, en el presente trabajo emplearemos estas mismas cepas bacterianas.

1.4.1. *Staphylococcus xylosus*.

El género de bacterias *Staphylococcus*, perteneciente al filo Firmicutes, contiene aproximadamente 60 especies y subespecies que colonizan una variedad de ecosistemas diferentes, siendo un componente significativo del microbioma de la piel en muchos animales. En este sentido, cabe resaltar su tolerancia a concentraciones de sal superiores al 10 %. El fenotipo de este género comprende bacterias no móviles, cocos Gram positivos agrupados en racimos, anaeróbicos facultativos, catalasa positivos y oxidasa negativos. En base a la prueba de la coagulasa, los estafilococos se clasifican en coagulasa positivos (ECP) y coagulasa negativos (ECN), siendo los ECP posibles patógenos como *Staphylococcus aureus*. Mientras que los ECN, generalmente, no son patógenos aunque pueden causar infecciones oportunistas como *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus xylosus* (Battaglia & Garrett-Sinha, 2023; Žugić-Petrović et al., 2024).

En particular, *S. xylosus* es un comensal común de la piel de humanos y otros mamíferos, presenta un crecimiento óptimo a 15°C y pH de 5,5 tolerando concentraciones de NaCl del 10-15%, es formador de biopelículas y es capaz de internalizarse en las células eucariotas (Battaglia & Garrett-Sinha, 2023; C. Schiffer et al., 2019).

1.4.2. *Lactobacillus animalis*.

Dentro del género *Lactobacillus* encontramos bacterias productoras de ácido láctico, conocidas por sus cualidades beneficiosas para el huésped, al crear ambientes ácidos que

impiden el crecimiento de patógenos. El género contiene más de 180 especies Gram positivas, con morfología de bastón y no productoras de esporas. Están presentes en las mucosas oral, del tracto gastrointestinal y genitourinario, siendo más prevalentes y numéricos en el tracto genital femenino, donde se cuentan 10^7 - 10^8 UFC/g de fluido vaginal en mujeres premenopáusicas sanas. Debido a sus cualidades beneficiosas, algunas especies son utilizadas como bacterias probióticas, en forma liofilizada o como producto alimenticio fermentado, siendo eficaces en diversas afecciones como la vaginitis candidiásica (Borges et al., 2014; Lee et al., 2023; Schulze et al., 2018; Toresano-López et al., 2017).

Lactobacillus animalis, es un bacilo microaerófilo, inmóvil, fermentador de glucosa, negativo para las reacciones de catalasa y oxidasa. Además, en estudios previos ha mostrado una actividad antagonista significativa contra bacterias patógenas, siendo una bacteria de interés para el humano (Martín et al., 2010; Park et al., 2023; Toresano-López et al., 2017).

1.4.3. *Enterococcus faecalis*.

El género *Enterococcus* son cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, representado por 58 especies y 2 subespecies. Se presentan de forma ubicua en la naturaleza y, por ejemplo, se encuentran en la microbiota de la cavidad bucal, el tracto genitourinario y el tracto gastrointestinal, donde sus concentraciones oscilan entre los 10^3 - 10^7 células/g. Normalmente son bacterias comensales, aunque pueden ser patógenos oportunistas, siendo la tercera causa más común de infecciones, principalmente de la sangre y del tracto urinario (Ferchichi et al., 2021; Moro et al., 2024; Zaheer et al., 2020).

Enterococcus faecalis es una bacteria láctica que presenta la capacidad de sobrevivir en condiciones adversas de pH y temperatura, entre los 10 y los 45°C, con crecimiento óptimo a 35°C. Esto sumado a su capacidad para formar biopelículas, contribuye a su éxito como patógeno oportunista (Suriyanarayanan et al., 2024).

2. Objetivos.

En base a lo anteriormente expuesto, se ha propuesto como objetivo general del presente trabajo:

Investigar como algunos de los factores del cultivo de las células HeLa influye en la invasión bacteriana de *Staphylococcus xylosus*, *Lactobacillus animalis* y *Enterococcus faecalis*.

Para la consecución del mismo, se abordarán como objetivos específicos los siguientes:

1. Determinar la concentración del inóculo inicial de bacterias que optimice la frecuencia de invasión de las células HeLa, para facilitar su posterior análisis.
2. Determinar el efecto del suplemento, del medio de cultivo, el suero bovino fetal (FBS), en la invasión bacteriana de las células HeLa.
3. Determinar el efecto de la gelatina, como modelo de matriz extracelular (ECM), en la invasión bacteriana de las células HeLa.
4. Determinar el efecto del fosfato cálcico (CaPO_4), como estimulador de la endocitosis, en la invasión bacteriana de las células HeLa.
5. Determinar la proliferación bacteriana en el interior de la célula HeLa, a lo largo del tiempo.

3. Material y Métodos.

3.1. Cultivos bacterianos.

Previo a la realización de los experimentos, las bacterias *S. xylosus*, *L. animalis* y *E. faecalis*, cedidas por Fu et al., 2022 (Fu et al., 2022) y aisladas de tumores provenientes de pacientes, se reactivaron y garantizó su pureza mediante siembras por agotamiento. Para ello se cultivaron en las condiciones de cultivo recomendadas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), como se describirá en sucesivos apartados, y se conservaron, a largo plazo, en criotubos junto con bolas porosas, en glicerol al 20% y a -80°C . También se realizó una caracterización parcial de las bacterias, sometiendo las colonias aisladas a la tinción de Gram, la prueba de la catalasa con peróxido de hidrógeno al 30%, la oxidasa con tiras reactivas (Microbact), la coagulasa con plasma de conejo (Biomeriux), la DNasa con el uso del medio sólido DNasa agar preparado al efecto, la fermentación del manitol con el agar salino manitol (MSA, Scharlab) y la fermentación de la lactosa con el agar Mac Conkey (Scharlab). Las bacterias identificadas parcialmente se mantuvieron, para su uso rutinario, en los correspondientes medios sólidos correspondientes, a 4°C , durante un máximo de 1 semana.

3.1.1. *Staphylococcus xylosus*.

S. xylosus se cultivó en medio sólido de agar nutritivo (28 g/L, Scharlab), el cual fue preparado siguiendo las indicaciones del fabricante (esterilizado por autoclavado (Selecta) a 121°C durante 30 minutos). *S. xylosus* forma colonias visibles tras incubación a 37°C durante 24 horas, tras lo cual se procedió con las pruebas fenotípicas descritas anteriormente. Antes de su uso en los experimentos, la bacteria se incubó en caldo nutritivo (13 g/L Scharlab) y se incubó a 37°C , 24 horas en agitación (90 rpm).

3.1.2. *Lactobacillus animalis*.

L. animalis se cultivó por siembra en doble capa en medio sólido de Man, Rogosa y Sharpe (MRS, 62 g/L, Scharlab), preparado acorde a las instrucciones del fabricante. Esta bacteria forma colonias visibles tras incubación a 37°C durante 48 horas. Antes de su uso experimental se cultivó en caldo MRS (52 g/L, Scharlab), 37°C, 24 horas en agitación (90 rpm).

3.1.3. *Enterococcus faecalis*.

E. faecalis se sembró en medio sólido Brain Heart Infusion (BHI, 52 g/L, Scharlab) y se incubó a 37°C durante 24 horas. Igualmente, antes de los experimentos se incubó en caldo de BHI (37g/L, Scharlab), 37°C, 24 horas en agitación (90 rpm).

3.2. Cultivos eucariotas.

Las células HeLa, cedidas por la Dra. Laila Moujir, se recuperaron de viales de criopreservación en nitrógeno líquido y se cultivaron en placas de Petri estériles, tratadas para cultivo celular, con un diámetro de 10 cm. El medio de cultivo empleado fue el Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, 10 mL por placa, Corning), el cual fue suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS, Corning) y un 1% de solución 100X de Penicilina/Estreptomicina (P/S, Corning), a este medio lo denominamos DMEM completo. En algunos experimentos se empleó medio DMEM sin suplementos o sólo conteniendo alguno de ellos (FBS y/o P/S), en cuyo caso se denominó DMEM más el complemento correspondiente (Ej: DMEM + FBS). Las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂, durante 24–48 horas, hasta que alcanzaron un 80% de confluencia, en cuyo momento se procedió a su expansión por dilución (1/3 a 1/5) en nuevas placas de cultivo, conteniendo medio fresco. Para disociar las células de la placa de Petri madre, se retiró el medio de cultivo, se lavó con 5 ml de tampón fosfato salino (PBS), esterilizado por autoclavado, y se incubó con una solución de tripsina (1 mL, tripsina al 0,025 % y ácido etildiaminotetraacético (EDTA) al 0,01 %, Corning). La suspensión celular obtenida se empleó para inocular nuevos cultivos. Por otra parte, aquellas placas de cultivo que mostraron una baja confluencia celular después de 48 h de incubación, se lavaron con PBS, añadió medio DMEM completo fresco y se volvieron a incubar. Cuando fue necesario, los antibióticos ampicilina y gentamicina (concentración final de 200 µg/ml y esterilizados por filtración) se añadieron directamente al medio de cultivo.

3.3. Cuantificación de la concentración de bacterias por densidad óptica (OD).

La concentración de las bacterias en solución se estimó empleando la densidad óptica a 600 nm. Las absorbancias para las tres especies bacterianas ensayadas fueron similares, ajustándose a la siguiente recta de correlación:

Tabla 1. Correlación entre OD a 600 nm y el número de bacterias por ml.

Células/ml	OD (600 nm)
8,00E+08	1,000
7,20E+08	0,900
6,40E+08	0,800
5,60E+08	0,700
4,80E+08	0,600
4,00E+08	0,500
3,20E+08	0,400
2,40E+08	0,300
1,60E+08	0,200
8,00E+07	0,100

3.4. Co-cultivo de HeLa y bacterias, determinación de la concentración óptima de microorganismos.

Los experimentos de co-cultivo se realizaron en placas de Petri de 3,5 cm de diámetro, donde se cultivó 10^6 células HeLa en 2 ml de medio DMEM + FBS. A las 24 h de incubación, se retiró el medio y las células se lavaron con PBS y se añadió 1 mL de DMEM. A continuación, se inocularon las bacterias a diferentes concentraciones (5×10^5 , 5×10^6 , 5×10^7 y 5×10^8 bacterias por placa) siguiendo el protocolo descrito por Chue-Gonçalves et al., 2018. En pocas palabras, las bacterias en crecimiento incubadas durante 24-48 h fueron centrifugadas (1500 rpm durante 5 minutos), decantadas y resuspendidas en DMEM, eliminando toxinas o metabolitos secundarios que pudieran interferir con las células eucariotas. Como controles negativos se incubaron las células HeLa o las bacterias independientemente y bajo las mismas condiciones. Todas las condiciones experimentales se incubaron durante 3 horas, a 37°C y 5% de CO₂, tras lo cual se añadieron los antibióticos ampicilina (concentración final de 200 µg/ml) y

gentamicina (concentración final de 200 µg/ml) durante 1 hora adicional bajo las mismas condiciones de incubación. Finalmente, las células HeLa se disociaron de la placa con 300 µl de tripsina y se sembraron en sus respectivos medios bacteriológicos sólidos para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

3.5. Test de sensibilidad a gentamicina y ampicilina.

El test de sensibilidad se dispuso en una placa de 96 pocillos conteniendo concentraciones crecientes de cada bacteria (desde 10^4 hasta 10^8 bacterias por pocillo). Cada pocillo fue tratado con una solución de ampicilina/gentamicina (concentración final de 200 µg/ml) por 20 y 40 horas. Finalmente, se procedió a confirmar la viabilidad bacteriana, en el correspondiente medio de cultivo bacteriológico sólido.

3.6. Modificación del protocolo para la evaluación de la internalización de *S. xylosum*, *L. animalis* y *E. faecalis* en células HeLa.

Para los siguientes experimentos, el protocolo descrito en el apartado 3.4 se modificó, de forma que, tras el co-cultivo de las células HeLa y las bacterias (3 h), se realizó un lavado con PBS, se añadió 2 ml de DMEM conteniendo ampicilina (200 µg/ml) y gentamicina (200 µg/ml) y se extendió la incubación por otras 20 h hasta la recolección de las células y el recuento de UFC/placa (Figura 4).

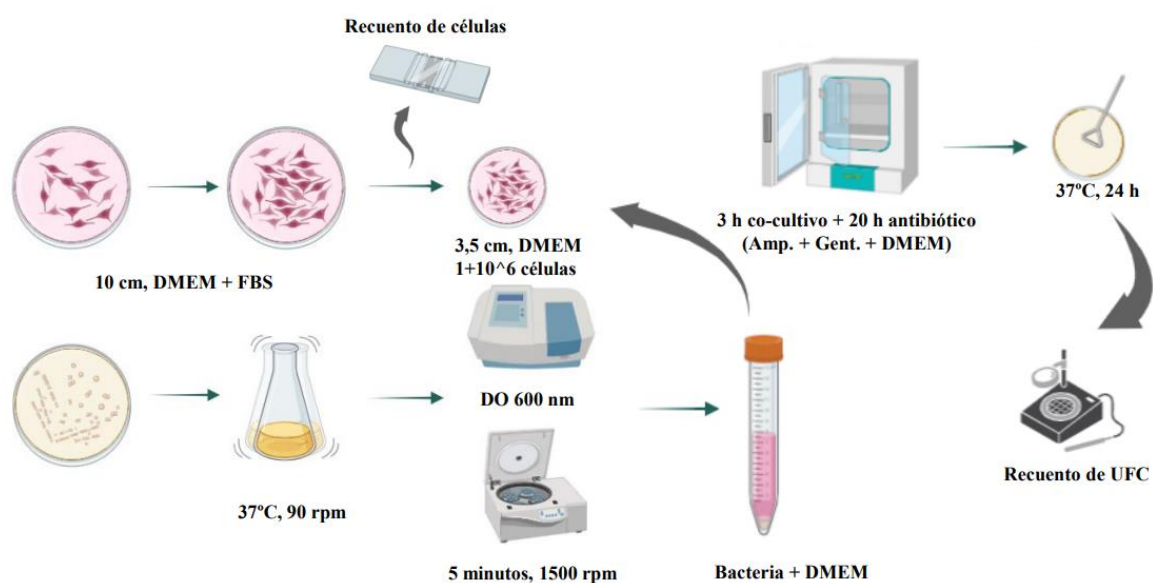


Figura 4. Esquema del protocolo básico para la evaluación de la internalización de bacterias en células HeLa. Imagen creada con BioRender.

3.7. Evaluación de la internalización de los microorganismos dependiente de diferentes factores.

3.7.1. Efecto del suero fetal bovino (FBS).

Con el fin de evaluar el efecto del FBS en la internalización bacteriana, se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.6. con la siguiente modificación. Después de la incubación con las bacterias (3h) y del lavado con PBS, a las placas de cultivo se les añadió 2 ml de DMEM con y sin FBS, junto con el tratamiento con ampicilina/gentamicina (20h).

3.7.2. Efecto de la gelatina.

Siguiendo el protocolo establecido en el apartado 3.6 y previo a la inoculación de las células HeLa en las placas Petri de 3,5 cm de diámetro, se trató la superficie de cultivo con gelatina al 0,2 % en PBS, a 37°C durante 30 min. La gelatina sobrante se aspiró y se procedió con la siembra de las células HeLa sobre la capa de gelatina. La solución stock de gelatina al 2% se esterilizó por autoclavado (20 min, a 121°C) y se almacenó a 4°C hasta su uso.

3.7.3. Efecto del fosfato cálcico.

Estos experimentos se basan en la capacidad de formación de cristales de fosfato cálcico en presencia de partículas cargadas negativamente. Para ello, inicialmente se preparó una solución de cloruro cálcico (CaCl_2) 2.5 M y una solución tampón de HEPES (HeBS) 0.05 M para ser esterilizadas por filtración (Kingston et al., 2003). A continuación, 1 ml de cultivo de la bacteria deseada se cuantificó por DO (600 nm) y se descartó el medio de cultivo por centrifugación (1500 rpm, 1 min). El precipitado se resuspendió en 450 μl de agua estéril y 50 μl de la solución de CaCl_2 2.5 M, a los que se les añadió, lentamente, 500 μl de HeBS 0.05M, agitando en vórtex durante 5 segundos entre adiciones. La suspensión se dejó reposar durante 30 minutos, para promover la formación de cristales de fosfato cálcico conteniendo las bacterias. Finalmente, las placas con las células HeLa fueron inoculadas con los cristales mixtos e incubadas durante 3h, para continuar con el protocolo básico (apartado 3.6.).

3.8. Evaluación de la proliferación de *L. animalis* en el interior de la célula HeLa.

La proliferación de las células HeLa y de *L. animalis* se evaluó a las 24, 48 y 72 h de incubación tras el co-cultivo. Todas las condiciones experimentales siguieron el protocolo descrito en el apartado 3.6 durante las primeras 24 horas. A partir de las 24 h, las placas de cultivo se lavaron con PBS y las condiciones restantes se dividieron en dos grupos: el primero

continuó con medio DMEM + FBS + antibiótico y el segundo solo con DMEM+FBS y sin antibiótico. A la finalización de los periodos de incubación se procedió al recuento de las células HeLa y, posteriormente, a los recuentos de UFC en MRS agar, como se describió anteriormente.

3.9. Estadística.

Para el análisis de los datos se empleó la prueba T de Student para muestras independientes, utilizando el software GraphPad Prism (versión 8.0.2). Se realizaron 2 o 3 réplicas biológicas, según se indique en los diferentes experimentos.

4. Resultados y discusión.

La metástasis es un proceso crucial en la progresión de la malignidad del cáncer, determinado por características intrínsecas de las células cancerosas y por factores extrínsecos ambientales. Recientemente, se ha incluido a la microbiota intracelular tumoral como un nuevo factor extrínseco, destacando su papel en la progresión tumoral y la metástasis (Fu et al., 2023). A pesar de la diversidad bacteriana presente en la microbiota normal, solo unas pocas especies se han encontrado localizadas intracelularmente en las células tumorales y, además, resultaron ser diferentes dependiendo del tipo tumoral (Gong et al., 2023), lo cual abre la cuestión de cuáles podrían ser los factores moleculares determinantes de tan alto grado de especificidad. En este trabajo nos centramos en tres bacterias (*S. xylosum*, *L. animalis* y *E. faecalis*) que han sido descritas como microorganismos intracelulares en el cáncer de mama, promotores de metástasis. Por otra parte, algunas de estas especies coinciden con especies predominantes de la microbiota del útero, siendo candidatas lógicas para evaluar la eficacia de invasión en el modelo de cultivo celular HeLa de cáncer uterino.

4.1. Caracterización parcial de las bacterias objeto de estudio.

Los datos obtenidos tras realizar las pruebas identificativas parciales coinciden con los fenotipos esperados para *S. xylosum*, *L. animalis* y *E. faecalis* (Tabla 2).

Tabla 2. Caracterización fenotípica parcial.

	<i>S. xylosum</i>	<i>L. animalis</i>	<i>E. faecalis</i>
Morfología	Cocos	Bacilos	Cocos
Agrupamiento	Racimos	-----	En parejas
Gram	+	+	+
Catalasa	+	-	-
Coagulasa	-	-----	-----
Oxidasa	-	-	-
DNAsa	-	-	-
Fermentación de manitol	+	-	+
Fermentación de lactosa	-	-	+

4.2. Determinación de la concentración óptima de microorganismos.

Con el fin de determinar una concentración óptima de microorganismos para inocular a las células HeLa y facilitar su posterior análisis, ensayamos diferentes concentraciones de bacterias, tomando como referencia la concentración de 1 célula HeLa por cada 50 bacterias (1/50) propuesta por Chue-Gonçalves et al., 2018. En las tres bacterias objeto de estudio, se observa que, a medida que se incrementa la concentración inicial de bacterias/ml inoculadas, aumentan las UFC/placa (Figura 5). Las tres especies se comportaron de manera similar, por ello, en lo sucesivo, emplearemos la concentración de 5×10^8 bacterias/ml como inóculo inicial por cada 10^6 células HeLa. Cabe destacar que, a pesar de partir de una metodología establecida en la bibliografía, en los controles negativos de bacterias sin células HeLa y con antibióticos (Amp./Gent.), registramos un número bajo de UFC/placa, poniendo de manifiesto la falta de eficacia de los antibióticos en 1 h de incubación. Esto indica que los recuentos realizados en el experimento no se corresponden totalmente a bacterias intracelulares, aunque el error cometido fue menor al 10%. Para los sucesivos experimentos, realizamos un ensayo para optimizar el tratamiento con antibióticos, aumentando el tiempo de exposición a 20h (Datos no mostrados).

Los mejores resultados se obtuvieron con *L. animalis*, posiblemente debido a sus cualidades como probiótico y su capacidad de adhesión a las células (Jia et al., 2021). La adhesión bacteriana al huésped es el paso inicial para su colonización que, posteriormente,

puede conducir al comensalismo o enfermedades infecciosas. Sin embargo, Sophatha et al., 2020 estudiaron la capacidad de diversas cepas de *Lactobacillus* usadas como probióticos para inhibir la adhesión de los patógenos a las células, donde demostraron el papel fundamental de su internalización encontrando una correlación positiva entre la internalización del probiótico en la célula y la inhibición de la adhesión del patógeno a la misma (Sophatha et al., 2020).

En el caso de *S. xyloso*, se ha descrito como productor de biopelículas, presentando mecanismos de virulencia similares a los descritos en *Staphylococcus aureus*, lo que además ayuda a su persistencia después de la colonización inicial (Battaglia & Garrett-Sinha, 2023; Fu et al., 2022; C. Schiffer et al., 2019). Curiosamente, para el caso de *E. faecalis* se han descrito proteínas de superficie de enterococos (ESP), una sustancia de agregación (AS) y la presencia de gelatinasa (GelE), entre otros factores que se encuentran asociados con la formación de biopelículas, y que favorecen su internalización (Suriyanarayanan et al., 2024). Sin embargo, en los resultados presentados por Fu et al., 2022, esta bacteria muestra una tasa de invasión bajo o nula, lo cual contrasta con nuestros resultados. Esto puede ser debido a que nuestro ensayo esta realizado *in vitro*, mientras que el de Fu y colaboradores se realizó en ratones donde entran en juego muchos otros factores como el sistema inmune.

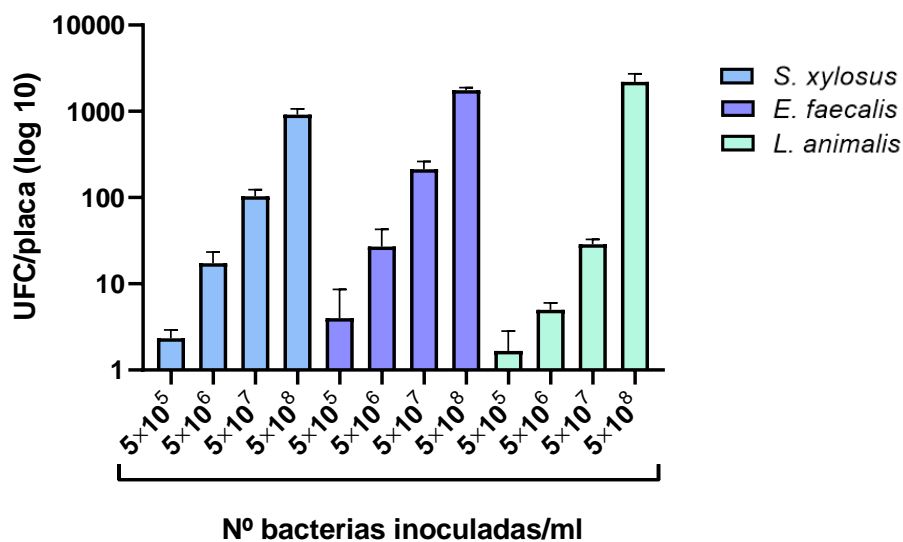


Figura 5. Determinación de la concentración de microorganismos inoculados en cultivos de células HeLa. Las columnas del histograma representan la media del número de bacterias obtenidas (UFC/placa, eje Y) para el nº de bacterias/ml inoculado por cada 10^6 células HeLa (eje X). Cada condición experimental fue realizada por triplicado (n=3) con cada uno de los microorganismos. Las barras de error representan la desviación estándar.

4.3.Efecto del suero fetal bovino (FBS) en la internalización de las bacterias.

La adición al medio de cultivo del FBS incrementó el número de bacterias internalizadas en las células HeLa en *L. animalis* que presentó la mayor diferencia, seguida por *S. xylosus*. En contraposición, *E. faecalis* mostró un pequeño aumento, no significativo, en las UFC/placa en presencia de FBS respecto al control (Figura 6).

En el caso de *L. animalis* observamos la mayor diferencia de internalización en presencia de FBS respecto del control, coincidiendo con los resultados obtenidos en estudios previos como es el caso de Sophatha et al., 2020. Igualmente, para la última de nuestras bacterias, *S. xylosus* observamos un incremento significativo en presencia de FBS, donde una proteína de superficie llamada SxsA podría estar implicada mediando en la adhesión celular, promoviendo la formación de biopelículas y favoreciendo la invasión (C. J. Schiffer et al., 2022).

Por su parte, *E. faecalis* presentó la mayor internalización basal, en comparación con las otras dos bacterias, posiblemente debido a la presencia de la proteína AS que actúa mediando la adhesión de los cocos a una variedad de células eucariotas *in vitro* (Kayaoglu & Ørstavik, 2004). Curiosamente la expresión de dicha proteína puede ser inducida por la presencia de FBS, el cual parece no ser nuestro caso, puesto que la invasión no es dependiente del FBS.

Para explicar los resultados observados, también podemos considerar una de las cualidades del FBS, reducir el daño físico causado por la manipulación del cultivo, aumentando la viabilidad de las células. El incremento de la viabilidad podría explicar el incremento de la eficacia de la internalización en aquellos casos en el que la presencia de las bacterias causen algún tipo de daño, aún por estudiar, en las células HeLa (Subbiahanadar Chelladurai et al., 2021).

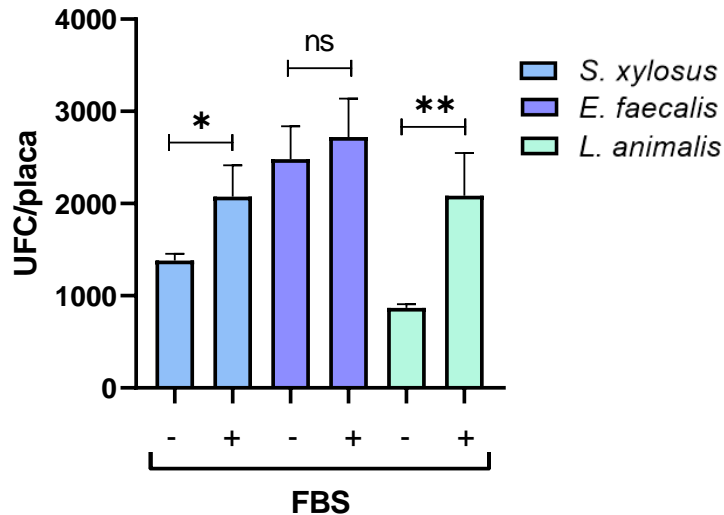


Figura 6. Internalización bacteriana en las células HeLa, con y sin FBS en el medio de cultivo. Las columnas del histograma representan la media del número de bacterias recuperadas (UFC/placa, eje Y), en el medio suplementado con y sin FBS (eje X). Las bacterias se inocularon a la concentración de 5×10^8 bacterias/ml sobre un cultivo de 10^6 células HeLa. Cada condición experimental fue realizada por triplicado ($n=3$) para cada uno de los microorganismos. Las barras de error representan la desviación estándar, ns = no significativo ($p \geq 0,05$), * corresponde a $p \leq 0,05$ y ** corresponde a $p \leq 0,01$.

4.4. Efecto de la gelatina, como modelo de ECM, en la internalización bacteriana.

En estos experimentos, tanto en *E. faecalis* como en *L. animalis* se aprecia una ligera tendencia a disminuir el número de bacterias internalizadas, pero sin presentar una diferencia estadísticamente significativa (Figura 7).

Centrándonos en *E. faecalis*, nuevamente podemos encontrar una explicación en la combinación de diferentes actividades: la presencia de la AS, que se une al colágeno tipo I, siendo la gelatina un derivado de este, y quizás afectando la internalización en las células HeLa (Bello et al., 2020; Kayaoglu & Ørstavik, 2004); y la proteína GelE, que es capaz de hidrolizar la gelatina, el colágeno y el fibrinógeno, entre otros componentes de la ECM (Kayaoglu & Ørstavik, 2004). La presencia de ambas actividades, que podrían ser contrapuestas, podrían explicar porque la gelatina no posee efecto en la internalización, a diferencia de lo observado con otras bacterias, como *Escherichia coli*, ensayadas simultáneamente en el laboratorio (TFG realizado por la alumna Paula González González). Igualmente, *L. animalis* tampoco mostró una diferencia significativa y no se han descrito mecanismos asociados a la matriz extracelular. Por tanto, es esperable que la invasión no este mediada por la gelatina. La diversidad de resultados, positivos y negativos, en la internalización, respecto al papel de la ECM obtenidos

en el laboratorio, considerando los TFG realizados conjuntamente, pone de manifiesto la gran diversidad de mecanismos existentes en las diferentes bacterias.

Debemos decir que los datos para *S. xylosus* no son mostrados pues, debido a un defecto no identificado en los experimentos, no obtuvimos datos cuantificables.

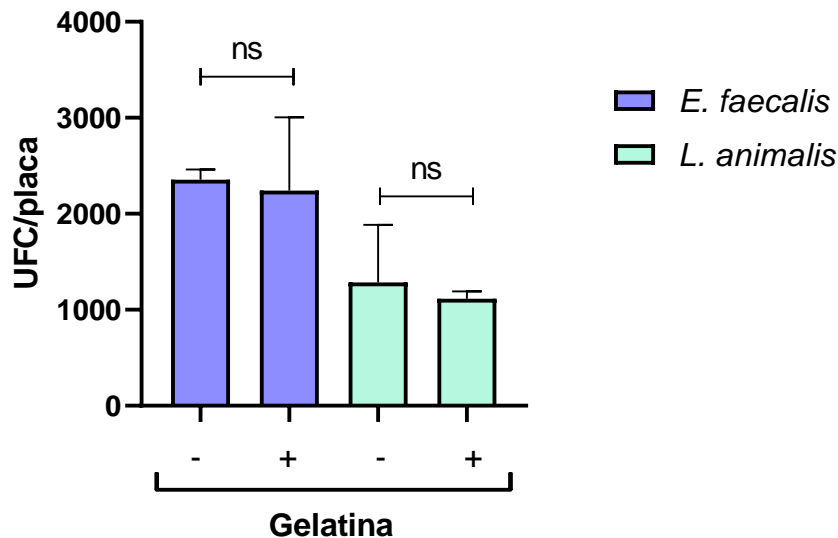


Figura 7. Efecto de la gelatina en la internalización bacteriana. Las columnas del histograma representan la media del número de bacterias recuperadas (UFC/placa, eje Y) en las placas de Petri tratadas con y sin gelatina (eje X). Las bacterias se inocularon a la concentración óptima de 5×10^8 bacterias/ml. Cada condición experimental fue realizada por duplicado ($n=2$) para cada uno de los microorganismos. Las barras de error representan la desviación estándar y ns = no significativo ($p \geq 0,05$).

4.5. Efecto del fosfato cálcico (CaPO_4) en la internalización de los microorganismos.

La invasión celular de *E. faecalis* y *L. animalis* no mostró diferencias significativas en el número de UFC/placa recuperadas con y sin CaPO_4 (Figura 8). Al igual que en el experimento anterior, sufrimos dificultades técnicas en el cultivo de *S. xylosus* y, por tanto, no podemos aportar datos.

Al comparar los resultados obtenidos en los TFG conjuntos, sólo en la bacteria *Staphylococcus aureus* se observó una diferencia significativa en la invasión de las células HeLa, cuando se empleó el CaPO_4 . En este sentido, nuestros resultados negativos en la mejora de la internalización, podría indicar que *E. faecalis* y *L. animalis* no emplean la endocitosis para invadir las células HeLa o presentan dificultad para formar cristales mixtos con el CaPO_4 . Estos resultados destacan la diversidad de los mecanismos de invasión empleados por las

bacterias y la importancia de realizar investigaciones específicas para cada bacteria individualmente.

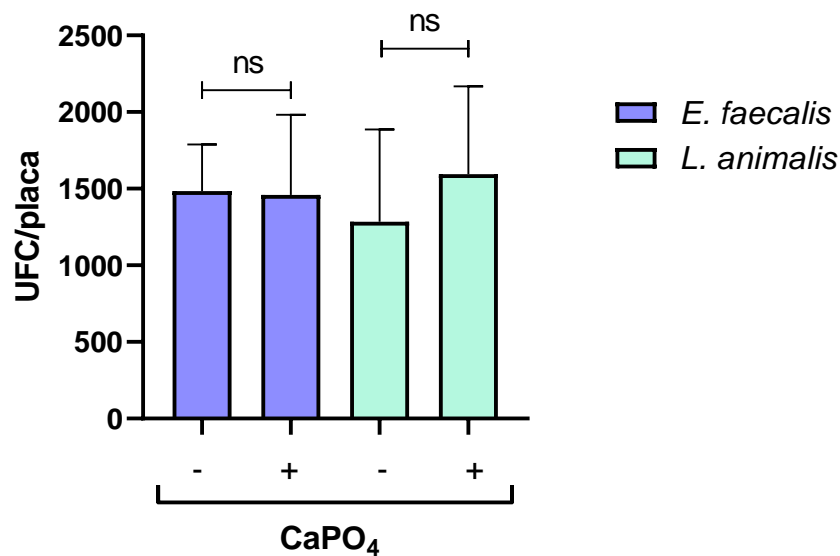


Figura 8. Efecto del fosfato cálcico en la internalización bacteriana en las células HeLa. Las columnas del histograma representan la media del número de bacterias recuperadas (UFC/placa) con y sin CaPO₄, como adyuvante de la endocitosis. Las bacterias se inocularon a la concentración óptima de 5×10^8 bacterias/ml en un cultivo de 10^6 células HeLa. Cada condición experimental fue realizada por duplicado (n=2), para cada uno de los microorganismos. Las barras de error representan la desviación estándar y ns = no significativo ($p \geq 0,05$).

4.6. Evaluación de la proliferación de *L. animalis* en el interior de las células HeLa.

A fin de investigar la proliferación de *L. animalis* en el interior de la célula HeLa, se establecieron 3 periodos de incubación (24, 48 y 72h). Recapitulando, este ensayo se llevó a cabo con y sin antibióticos (Amp./Gent.). En aquellas en las que se eliminó el antibiótico, las bacterias proliferaron haciendo imposible llevar a término el experimento. Esto puede ser debido a que algunas células HeLa infectadas sean inviables, mueran y liberen las bacterias al medio, que sin la presencia de antibióticos proliferan incontroladamente. Por tanto, en la Figura 9, se representan los resultados obtenidos con el tratamiento continuo de antibióticos donde observamos que el número de UFC/placa disminuye conforme avanza el tiempo. Al mismo tiempo, las células HeLa proliferaron de forma normal, indicando una pérdida progresiva de las bacterias (Tabla 3). Acorde a la hipótesis anterior, las células HeLa colonizadas por *L. animalis* podrían perder viabilidad tras 24h, exponer la bacteria a los antibióticos causando su muerte. Otra posible explicación sería la existencia de una señalización específica entre la célula HeLa y la bacteria que impida la proliferación bacteriana en el interior celular. En cualquier caso, que

la proliferación bacteriana se detenga, en las primeras 24h de invasión, resulta de gran interés para futuros estudios y tal vez podría concluir con el descubrimiento de un nuevo mecanismo de control de la proliferación bacteriana.

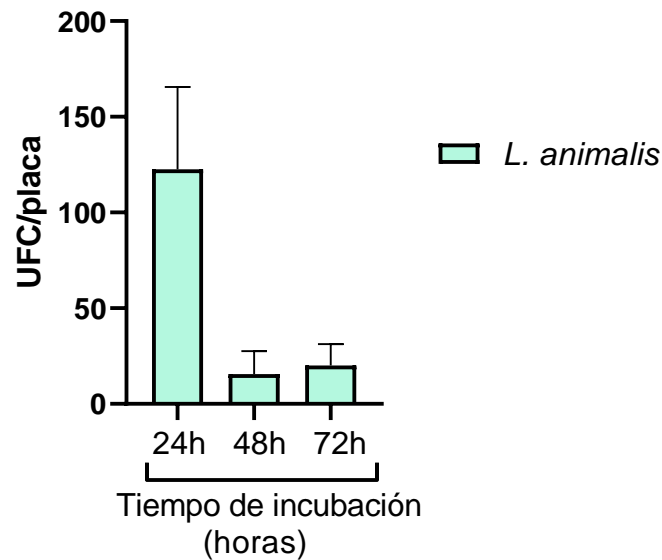


Figura 7. Evaluación de la proliferación de *L. animalis* en el interior de la célula eucariota en el tiempo. Las columnas del histograma representan la media del número de bacterias recuperadas (UFC/placa) tras 24, 48 y 72 horas de incubación. *L. animalis* se inoculó a la concentración óptima de 5×10^8 bacterias/ml. Cada condición experimental fue realizada por duplicado (n=2). Las barras de error representan la desviación estándar.

Tabla 3. Proliferación de las células HeLa tras 24, 48 y 72h de incubación con *L. animalis*. El inóculo inicial de células fue de 8×10^5 células/ml.

Tiempo de incubación (horas)	Células/ml
24	$1,20 \times 10^6$
48	$2,72 \times 10^6$
72	$5,04 \times 10^6$

Como conclusión, en este trabajo se refleja la diversidad de mecanismos que poseen las bacterias, destacando el papel del suero fetal bovino en la internalización de *S. xylosum* y *L. animalis*. Resaltan las diferencias encontradas en estudios *in vitro* donde, por ejemplo, *E. faecalis* se internalizó en las células HeLa con óptimos resultados e *in vivo* presentaba poca eficiencia de internalización (Fu et al., 2022). Por ello, sería interesante investigar más en profundidad, por ejemplo, cada bacteria por separado, así como su acción conjunta para evaluar si existe competencia o sinergia entre ellas en la invasión celular. Por otra parte, sería interesante ensayar la invasión bacteriana empleando otras ECM con características tumorales,

simulando un TME más próximo al observado *in vivo*. Finalmente, elucidar los mecanismos de invasión bacteriana de los tumores podría derivar en tratamientos personalizados e importantes avances en las terapias contra el cáncer.

5. Conclusiones:

1. La capacidad de internalización de bacterias en las células HeLa aumenta con la concentración bacteriana inoculada inicialmente y varía entre especies. *Lactobacillus animalis* fue la más eficaz, seguida de *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus xylosus*.
2. La adición de suero fetal bovino (FBS) incrementa la capacidad de internalización bacteriana, especialmente en el caso de *L. animalis* y *S. xylosus* en comparación con *E. faecalis*.
3. El uso de gelatina como matriz extracelular (ECM) no tuvo un impacto significativo en la eficacia de la internalización de las bacterias objeto de estudio.
4. El uso de fosfato cálcico (CaPO₄), como adyuvante de endocitosis, no mostró una diferencia significativa en la internalización bacteriana.
5. *L. animalis* no prolifera en el interior de las células HeLa durante las primeras 24h y su viabilidad disminuye a las 48-72h.

Conclusions:

1. Bacterial internalization capacity in HeLa cells increases with the bacterial concentration initially inoculated and varies among the different bacterial species tested. *Lactobacillus animalis* was the most effective, followed by *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus xylosus*.
2. The addition of fetal bovine serum (FBS) increases bacterial internalization capacity, especially in the case of *L. animalis* and *S. xylosus* compared to *E. faecalis*.
3. The use of gelatin as an extracellular matrix (ECM) did not have a significant impact on the internalization efficiency of the bacteria under study.
4. The use of calcium phosphate (CaPO₄) as an endocytosis adjuvant did not show a significant difference in bacterial internalization.
5. *L. animalis* does not proliferate inside HeLa cells during the first 48h and its viability decreases after 72h.

6. Bibliografía.

- Battaglia, M., & Garrett-Sinha, L. A. (2023). Staphylococcus xylosus and Staphylococcus aureus as commensals and pathogens on murine skin. *Laboratory Animal Research*, 39(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s42826-023-00169-0>
- Bauer, A. W., Hofheinz, R.-D., & Utikal, J. S. (Eds.). (2021). *Ethical Challenges in Cancer Diagnosis and Therapy* (Vol. 218). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-63749-1>
- Belli, C., Trapani, D., Viale, G., D'Amico, P., Duso, B. A., Della Vigna, P., Orsi, F., & Curigliano, G. (2018). Targeting the microenvironment in solid tumors. *Cancer Treatment Reviews*, 65, 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.02.004>
- Bello, A. B., Kim, D., Kim, D., Park, H., & Lee, S.-H. (2020). Engineering and Functionalization of Gelatin Biomaterials: From Cell Culture to Medical Applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 26(2), 164-180. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0256>
- Borges, S., Silva, J., & Teixeira, P. (2014). The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 289(3), 479-489. <https://doi.org/10.1007/s00404-013-3064-9>
- Chue-Gonçalves, M., Custódio, C. C., Pelayo, J. S., Nakazato, G., & Kobayashi, R. K. T. (2018). New approach for detection of Escherichia coli invasion to HeLa cells. *Journal of Microbiological Methods*, 152, 31-35. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.07.011>
- Ciriello, G., Magnani, L., Aitken, S. J., Akkari, L., Behjati, S., Hanahan, D., Landau, D. A., Lopez-Bigas, N., Lupiáñez, D. G., Marine, J.-C., Martin-Villalba, A., Natoli, G., Obenauf, A. C., Oricchio, E., Scaffidi, P., Sottoriva, A., Swarbrick, A., Tonon, G., Vanharanta, S., & Zuber, J. (2024). Cancer Evolution: A Multifaceted Affair. *Cancer Discovery*, 14(1), 36-48. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-23-0530>
- De Visser, K. E., & Joyce, J. A. (2023). The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*, 41(3), 374-403. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016>
- Devor, E., Gonzalez-Bosquet, J., Thiel, K., Leslie, K., Devor, E., Gonzalez-Bosquet, J., Thiel, K., & Leslie, K. (2020). Genomic characterization of five commonly used endometrial cancer cell lines. *International Journal of Oncology*, 57(6), 1348-1357. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5139>
- Didkowska, J., & Koczkodaj, P. (2022). Cancer Epidemiology and Prevention. En N. Rezaei (Ed.), *Handbook of Cancer and Immunology* (pp. 1-18). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-80962-1_320-1
- Du, Y., Liu, L., Ma, W., Yan, W., Mao, W., Du, Y., Cui, K., Yu, P., Li, Z., Sansonetti, P. J., Gao, Y.-Z., & Zhao, H. (2023). The role of extratumoral and intratumoral microorganisms in cancer immunotherapy. *The Innovation Life*, 1(2), 100016. <https://doi.org/10.59717/j.xinn-life.2023.100016>

- Ferchichi, M., Sebei, K., Boukerb, A. M., Karray-Bouraoui, N., Chevalier, S., Feuilleley, M. G. J., Connil, N., & Zommiti, M. (2021). Enterococcus spp.: Is It a Bad Choice for a Good Use—A Conundrum to Solve? *Microorganisms*, *9*(11), 2222. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112222>
- Fu, A., Yao, B., Dong, T., & Cai, S. (2023). Emerging roles of intratumor microbiota in cancer metastasis. *Trends in Cell Biology*, *33*(7), 583-593. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.11.007>
- Fu, A., Yao, B., Dong, T., Chen, Y., Yao, J., Liu, Y., Li, H., Bai, H., Liu, X., Zhang, Y., Wang, C., Guo, Y., Li, N., & Cai, S. (2022). Tumor-resident intracellular microbiota promotes metastatic colonization in breast cancer. *Cell*, *185*(8), 1356-1372.e26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.02.027>
- Gaunitz, F., Papke, M., & Gebhardt, R. (1996). Transient Transfection of Primary Cultured Hepatocytes Using CaPO₄/DNA Precipitation. *BioTechniques*, *20*(5), 826-832. <https://doi.org/10.2144/96205st01>
- Gebrayel, P., Nicco, C., Al Khodor, S., Bilinski, J., Caselli, E., Comelli, E. M., Egert, M., Giaroni, C., Karpinski, T. M., Loniewski, I., Mulak, A., Reygnier, J., Samczuk, P., Serino, M., Sikora, M., Terranegra, A., Ufnal, M., Villeger, R., Pichon, C., ... Edeas, M. (2022). Microbiota medicine: Towards clinical revolution. *Journal of Translational Medicine*, *20*(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03296-9>
- Gong, Y., Huang, X., Wang, M., & Liang, X. (2023). Intratumor microbiota: A novel tumor component. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *149*(9), 6675-6691. <https://doi.org/10.1007/s00432-023-04576-7>
- Goodspeed, A., Heiser, L. M., Gray, J. W., & Costello, J. C. (2016). Tumor-Derived Cell Lines as Molecular Models of Cancer Pharmacogenomics. *Molecular Cancer Research*, *14*(1), 3-13. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0189>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Jia, D., Wang, Y., Wang, J., Liu, J., Li, H., Liu, A., Wang, J., Guan, G., Luo, J., Yin, H., & Li, Y. (2021). Lactobacillus animalis pZL8a: A potential probiotic isolated from pig feces for further research. *3 Biotech*, *11*(3), 132. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02681-3>
- Kayaoglu, G., & Ørstavik, D. (2004). VIRULENCE FACTORS OF *ENTEROCOCCUS FAECALIS*: RELATIONSHIP TO ENDODONTIC DISEASE. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, *15*(5), 308-320. <https://doi.org/10.1177/154411130401500506>
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: The present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *397*(8), 3173-3178. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
- Kingston, R. E., Chen, C. A., & Rose, J. K. (2003). Calcium Phosphate Transfection. *Current Protocols in Molecular Biology*, *63*(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0901s63>

- Landry, J. J. M., Pyl, P. T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M. M., Stütz, A. M., Jauch, A., Aiyar, R. S., Pau, G., Delhomme, N., Gagneur, J., Korbel, J. O., Huber, W., & Steinmetz, L. M. (2013). The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, *3*(8), 1213-1224. <https://doi.org/10.1534/g3.113.005777>
- Lee, H.-J., Lee, J.-B., Park, S.-Y., Choi, I.-S., & Lee, S.-W. (2023). Antimicrobial Activity of *Ligilactobacillus animalis* SWLA-1 and Its Cell-Free Supernatant against Multidrug-Resistant Bacteria and Its Potential Use as an Alternative to Antimicrobial Agents. *Microorganisms*, *11*(1), 182. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010182>
- Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2015). Collagen and Gelatin. *Annual Review of Food Science and Technology*, *6*(1), 527-557. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-031414-111800>
- Lyapun, I. N., Andryukov, B. G., & Bynina, M. P. (2019). HeLa Cell Culture: Immortal Heritage of Henrietta Lacks. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, *34*(4), 195-200. <https://doi.org/10.3103/S0891416819040050>
- Lythgoe, M. P., Mullish, B. H., Frampton, A. E., & Krell, J. (2022). Polymorphic microbes: A new emerging hallmark of cancer. *Trends in Microbiology*, *30*(12), 1131-1134. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.08.004>
- Martín, R., Olivares, M., Pérez, M., Xaus, J., Torre, C., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2010). Identification and evaluation of the probiotic potential of lactobacilli isolated from canine milk. *The Veterinary Journal*, *185*(2), 193-198. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.04.014>
- Mogha, P., Iyer, S., & Majumder, A. (2023). Extracellular matrix protein gelatin provides higher expansion, reduces size heterogeneity, and maintains cell stiffness in a long-term culture of mesenchymal stem cells. *Tissue and Cell*, *80*, 101969. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101969>
- Moro, D., Shittu, H., Agubata, Z., Jakkari, A., & Oyefolu, A. (2024). Isolation, characterization, prevalence, and antibiotic susceptibility pattern of *Enterococcus* species in fast food outlets in Lagos metropolis. *European Journal of Microbiology and Infectious Diseases*, *1*(2), 37. <https://doi.org/10.5455/EJMID.20240417115311>
- Park, S.-Y., Lee, H.-J., Kim, H.-S., Kim, D.-H., Lee, S.-W., & Yoon, H.-Y. (2023). Anti-Staphylococcal Activity of *Ligilactobacillus animalis* SWLA-1 and Its Supernatant against Multidrug-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Novel Rat Model of Acute Osteomyelitis. *Antibiotics*, *12*(9), 1444. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091444>
- Rojo De La Vega, M. (2023). A holistic view of cancer. *Cancer Cell*, *41*(3), 373. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.011>
- Ruiz-Moreno, A. J., Torres-Barrera, P., Velázquez-Paniagua, M., Dömling, A., & Velasco-Velázquez, M. A. (2018). Guide for Selection of Relevant Cell Lines During the Evaluation of new Anti-Cancer

- Compounds. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 18(8), 1072-1081.
<https://doi.org/10.2174/1871520618666180220120544>
- Schiffer, C., Hilgarth, M., Ehrmann, M., & Vogel, R. F. (2019). Bap and Cell Surface Hydrophobicity Are Important Factors in *Staphylococcus xylosus* Biofilm Formation. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1387.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01387>
- Schiffer, C. J., Schaudinn, C., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2022). SxSA , a novel surface protein mediating cell aggregation and adhesive biofilm formation of *Staphylococcus xylosus*. *Molecular Microbiology*, 117(5), 986-1001. <https://doi.org/10.1111/mmi.14884>
- Schulze, M., Schäfer, J., Simmet, C., Jung, M., & Gabler, C. (2018). Detection and characterization of *Lactobacillus* spp. In the porcine seminal plasma and their influence on boar semen quality. *PLOS ONE*, 13(9), e0202699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202699>
- Smale, S. T. (2010). Calcium Phosphate Transfection of 3T3 Fibroblasts. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(2), pdb.prot5372. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5372>
- Sobti, R. C., Gosipatala, S. B., Sharma, M., Reddy, P., Khalko, R. K., Kaur, T., & Thakur, M. (2024). Types of Cancers, Epidemiology, and Molecular Insights. En R. C. Sobti, N. K. Ganguly, & R. Kumar (Eds.), *Handbook of Oncobiology: From Basic to Clinical Sciences* (pp. 1-36). Springer Nature Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-99-2196-6_1-1
- Sophatha, B., Piwat, S., & Teanpaisan, R. (2020). Adhesion, anti-adhesion and aggregation properties relating to surface charges of selected *Lactobacillus* strains: Study in Caco-2 and H357 cells. *Archives of Microbiology*, 202(6), 1349-1357. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01846-7>
- Subbiahanadar Chelladurai, K., Selvan Christyraj, J. D., Rajagopalan, K., Yesudhasan, B. V., Venkatachalam, S., Mohan, M., Chellathurai Vasantha, N., & Selvan Christyraj, J. R. S. (2021). Alternative to FBS in animal cell culture—An overview and future perspective. *Heliyon*, 7(8), e07686.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07686>
- Suriyanarayanan, T., Lee, L. S., Han, S. H. Y., Ching, J., & Seneviratne, C. J. (2024). Targeted metabolomics analysis approach to unravel the biofilm formation pathways of *Enterococcus faecalis* clinical isolates. *International Endodontic Journal*, iej.14110. <https://doi.org/10.1111/iej.14110>
- Swanton, C., Bernard, E., Abbosh, C., André, F., Auwerx, J., Balmain, A., Bar-Sagi, D., Bernards, R., Bullman, S., DeGregori, J., Elliott, C., Erez, A., Evan, G., Febbraio, M. A., Hidalgo, A., Jamal-Hanjani, M., Joyce, J. A., Kaiser, M., Lamia, K., ... Hanahan, D. (2024). Embracing cancer complexity: Hallmarks of systemic disease. *Cell*, 187(7), 1589-1616. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.02.009>
- Toresano-López, D., González-Pascual, A., González-Martínez, M., Ezcurra-Acedo, I., & Arnáiz-García, A. M. (2017). Bacteriemia por *Lactobacillus* spp. *Revista Española de Casos Clínicos en Medicina Interna*, 2(3), 113-115. <https://doi.org/10.32818/reccmi.a2n3a4>

- Wang, M., Yu, F., & Li, P. (2023). Intratumor microbiota in cancer pathogenesis and immunity: From mechanisms of action to therapeutic opportunities. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1269054. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1269054>
- Wong-Rolle, A., Wei, H. K., Zhao, C., & Jin, C. (2021). Unexpected guests in the tumor microenvironment: Microbiome in cancer. *Protein & Cell*, *12*(5), 426-435. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00813-8>
- Yang, L.-J., & Ou, Y.-C. (2005). The micro patterning of glutaraldehyde (GA)-crosslinked gelatin and its application to cell-culture. *Lab on a Chip*, *5*(9), 979. <https://doi.org/10.1039/b505193b>
- Zaheer, R., Cook, S. R., Barbieri, R., Goji, N., Cameron, A., Petkau, A., Polo, R. O., Tymensen, L., Stamm, C., Song, J., Hannon, S., Jones, T., Church, D., Booker, C. W., Amoako, K., Van Domselaar, G., Read, R. R., & McAllister, T. A. (2020). Surveillance of Enterococcus spp. Reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. *Scientific Reports*, *10*(1), 3937. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61002-5>
- Žugić-Petrović, T., Marković, K., & Grujović, M. (2024). Characterization and technological evaluation of coagulase-negative staphylococci isolated from Sjenica sheep's ham. *Kragujevac Journal of Science*, *00*, 7-7. <https://doi.org/10.5937/KgJSci2400006Z>