

Trabajo Fin de Grado

Establecimiento de un modelo de co-cultivo de esferoides de células tumorales de colon con bacterias características de la microbiota intestinal.

Establishment of a co-culture model of colon tumor cell spheroids with characteristic bacteria of the intestinal microbiota.

María del Puerto Artal Herbella

Directores

Estela Solanas Villacampa

Ignacio Ochoa Garrido

Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza

Grado de Biotecnología

Curso 2020-2021

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Cáncer de colon.....	2
1.2. Modelos para el estudio del cáncer de colon	3
1.3. Microbiota intestinal.....	6
2. OBJETIVOS	9
3. METODOLOGÍA.....	9
3.1. Mantenimiento de las líneas celulares	9
3.2. Congelación y descongelación de líneas celulares.....	10
3.3. Formación de esferoides	10
3.4. Estudio de viabilidad de los esferoides	12
3.5. Marcaje con Vybrant de las líneas celulares HCT116 y HT29	12
3.6. Inmunofluorescencia para Muc-2	12
3.7. Cepas bacterianas.....	13
3.8. Preparación de medios para el cultivo bacteriano.....	13
3.9. Determinación del crecimiento bacteriano y contaje de UFC.....	13
3.10. Co-cultivo de esferoides con cepa <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	14
3.11. Tinción con Hoechst del co-cultivo con esferoides marcados con Vybrant	15
3.12. Análisis estadístico.....	15
4. RESULTADOS	16
4.1. Caracterización de los esferoides	16
4.2. Co-cultivo esferoides con cepa <i>E.coli</i> ATCC 25922.....	18
4.3. Tinción de Hoechst de los esferoides marcados con Vybrant.....	19
4.4. Inmunofluorescencia para Muc-2	20
5. DISCUSIÓN	21
6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	23
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
ANEXO	i

RESUMEN

La microbiota intestinal juega un papel fundamental en la homeostasis y su alteración está relacionada con patologías como el cáncer colorrectal. Esta relación puede ser estudiada a través de modelos *in vitro* 3D, como los esferoides. Su fácil producción y las características propias (morfología, “core” necrótico...) los convierten en una herramienta experimental importante en el estudio del microambiente tumoral.

Con este trabajo se busca establecer un modelo sencillo para el estudio de la influencia de la flora intestinal sobre el cáncer colorrectal, a través de la formación de esferoides con líneas celulares propias de colon (esferoides con HCT-116 vs esferoides de HCT116 y HT29-MTX en proporción 3:1) y su co-cultivo con una cepa de *Escherichia coli*. Un modelo en el que aparecen tanto células tumorales del epitelio intestinal (HCT-116), como una línea productora de mucina que representa a las células caliciformes de la mucosa (HT29-MTX). Ambas líneas celulares son esenciales para reproducir el epitelio intestinal a nivel de colon, donde las células caliciformes se encuentran en mayor proporción y la mucina juega un papel importante en el establecimiento de la microbiota intestinal y por tanto para reproducir la relación microbiota-tumor. El modelo desarrollado servirá de base para futuros modelos más complejos, incluyendo otras cepas bacterianas o incluso muestras de microbiota del paciente.

Los resultados muestran que la adición de células HT29MTX no afecta ni el tamaño ni la viabilidad de los esferoides al compararlos con aquellos con únicamente células HCT116. Aunque no se pudo constatar la producción de moco en los esferoides con HT29MTX, se observó una menor adhesión de *E. coli* a estos. El co-cultivo de esferoides de HCT116-HT29-MTX (3:1) y bacterias propias de la microbiota intestinal (*E. coli*) representa un prometedor modelo de la relación microbiota-tumor, si bien se necesita de una mayor profundización en el estudio.

ABSTRACT

The intestinal microbiota plays a fundamental role in homeostasis, and its alteration is related to pathologies such as colorectal cancer. This relationship can be studied through 3D *in vitro* models, such as spheroids. Their easy production and characteristics (morphology, necrotic core...) make them an important experimental tool in the study of the tumor microenvironment.

The aim of this work is to establish a simple model for the study of the influence of intestinal flora on colorectal cancer, through the formation of spheroids with colon cell lines (spheroids with HCT-116 vs. spheroids of HCT116 and HT29-MTX in a 3:1 ratio) and their co-culture with a strain of *Escherichia coli*. A model in which both intestinal epithelial tumor cells (HCT-116) and a mucin-producing line representing mucosal goblet cells (HT-29-MTX) are present. Both cell lines are essential to reproduce the intestinal epithelium at the colon level, where goblet cells are found in higher proportion and mucin plays an important role in the establishment of the intestinal microbiota and therefore to reproduce the microbiota-tumor relationship. The developed model will serve as a basis for future more complex models, including other bacterial strains or even patient microbiota samples.

The results show that the addition of HT29MTX cells does not affect either the size or the viability of the spheroids when compared to those with only HCT116 cells. Although mucus production could not be observed in the spheroids with HT29MTX, a lower adhesion of *E. coli* to the spheroids was observed. The co-culture of HCT116-HT29-MTX spheroids (3:1) and gut microbiota bacteria (*E. coli*) represents a promising model of the microbiota-tumor relationship, although further study is required.

Palabras claves: modelo in vitro 3D, esferoides, cáncer colorrectal, epitelio, microbiota intestinal, *Escherichia coli*, adhesión, mucina.

Keywords: 3D in vitro models, spheroids, colorectal cancer, epithelium, intestinal microbiota, *Escherichia coli*, adhesion, mucin.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de colon

El cáncer colon es la tercera causa de muerte en el mundo por cáncer, siendo el tercer cáncer más diagnosticado en hombres y el segundo en mujeres, con una incidencia a nivel mundial en 2020 superior a 1,9 millones de nuevos casos y 935.000 muertes según datos del “Global Cancer Observatory” (GCO). ⁽¹⁾

El colon y el recto representan la porción final del sistema digestivo y se encargan principalmente de absorber líquido para formar las heces. El colon es un conducto muscular de aproximadamente un metro y medio de longitud que consta de 4 secciones: la primera sección es el colon ascendente (o también conocido como colon derecho) que comienza con el ciego donde se une el intestino delgado con el grueso. Esta es la porción donde se producen los cánceres más agresivos debido a que se acumulan mutaciones con más facilidad y es una zona “sucia” que alberga mucha microbiota. Por otra parte, están el colon transverso, el colon descendente (o izquierdo) y la última parte que se denomina sigmoide. La pared está compuesta por cuatro capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa. La mucosa es la capa más importante y está formada por enterocitos y una mayor proporción que en intestino delgado de células caliciformes. Estas células predominan en unas estructuras características de este órgano que son las criptas de Lieberkühn. Se trata de una zona muy vascularizada pero que no presenta vellosidades intestinales por lo que no se pueden reabsorber tantas sustancias. La principal función de las células caliciformes es la secreción de mucina que le permite a las bacterias de la microbiota adherirse al epitelio intestinal.

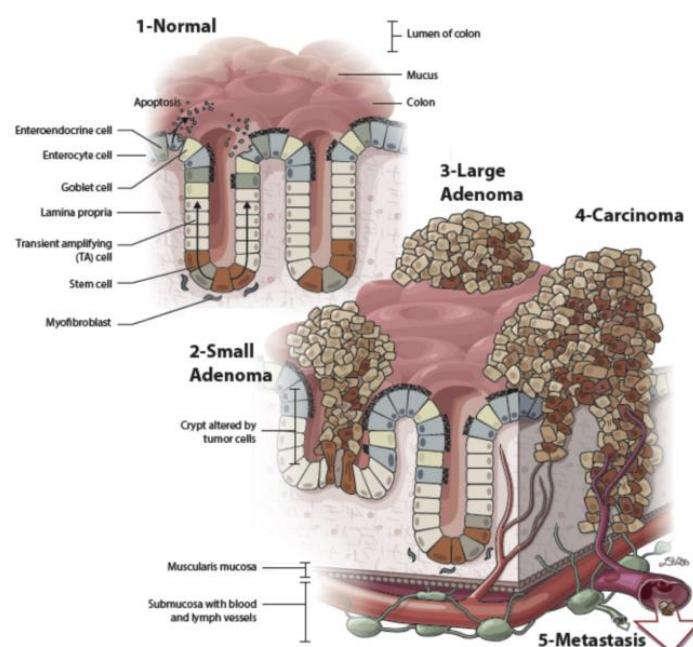


Figura 1. Representación del desarrollo desde una situación normal (epitelio sano, 1) a la formación en diferentes pasos del carcinoma (desde un pequeño adenoma hasta metástasis, 2). Formación en las criptas del colon de adenomas que podrán seguir desarrollándose y formar un carcinoma, que si se extravasa y penetra en la circulación dará lugar a metástasis.⁽²⁾

Existen numerosos factores que se asocian a un aumento del riesgo de padecer este tipo de cáncer. Algunos de ellos se consideran modificables, como la dieta, la obesidad o el estilo de vida (ejercicio, alcohol, tabaco). Otros factores, sin embargo, no serían modificables, como pueden ser la historia familiar de pólipos o cáncer de colon o condiciones hereditarias de inflamación intestinal. Atender a todos estos factores es importante como prevención e incluso para evitar el desarrollo de otro tipo de enfermedades. Sin embargo, no se debe olvidar la necesidad de realizar un seguimiento prematuro y extendido en el tiempo para poder detectar esta patología cuanto antes.⁽³⁾

El desarrollo del tumor suele ser lento y no produce síntomas, por lo que pasa desapercibido. Hasta que no alcanza un tamaño adecuado no se producen los síntomas típicos como: bloqueo del paso de las heces, dolor abdominal, calambres o incluso sangrado. La mayoría de los tumores son un proceso que se desarrolla en varios pasos, tal y como se puede observar en la Figura 1. En el mismo se producen cambios histológicos, morfológicos y genéticos que se acumulan a lo largo del tiempo.

El punto de inicio es la formación de pólipos precancerígenos benignos. Se trata de una agregación anormal de células localizadas dentro de la mucosa intestinal y que pueden llegar hasta el lumen. Las células en división de los pólipos pueden acumular suficientes cambios genéticos por los que adquieren la capacidad de invadir la pared del intestino. Si bien, solo un pequeño porcentaje de los pólipos adquieren rasgos malignos, y la progresión de pólipos a cáncer suele tardar varios años o incluso décadas. Los pólipos se pueden desarrollar a lo largo de toda la longitud del colon y el recto, aunque, aquellos que se desarrollan en la parte proximal (colon derecho) que incluye el ciego y el colon transverso y la flexión esplénica, suponen el 42% de todos los casos de cáncer de colon en EE.UU.⁽⁴⁾

La detección temprana y la resección de los pólipos precancerígenos son críticos para interrumpir el adenocarcinoma y prevenir el desarrollo y propagación del cáncer colorrectal.⁽³⁾ Los pólipos proliferan aumentando su tamaño, y van acumulando modificaciones genéticas que empiezan a acumularse, lo que se refleja en una displasia de las células del colon. Si estos pólipos no llegan a eliminarse, podrán invadir otros tejidos a medida que van creciendo en el interior de la pared del colon y recto. Con el paso del tiempo puede llegar a formarse nueva vasculatura que facilitaría la entrada del sistema circulatorio y linfático al tumor, promoviendo la propagación de las células tumorales a otros órganos, es decir, la metástasis.

1.2. Modelos para el estudio del cáncer de colon

Los modelos experimentales son herramientas esenciales en el campo de la investigación sobre el cáncer (Figura 2). Sin embargo, ante la complejidad y la heterogeneidad que presentan los tumores en humanos, no resumen la totalidad de los factores que influyen, siendo importante atender tanto a los factores genéticos como al microambiente que contribuyen a la progresión de la enfermedad.⁽⁵⁾

Los modelos *in vitro* mediante cultivos celulares tradicionales han sido durante muchos años la base de la investigación en la biología básica del tumor, y aún ahora continúan siendo utilizados debido a su disponibilidad, fácil manipulación, reproducibilidad y bajo coste. Sin embargo, los cultivos tradicionales presentan ciertas desventajas como son, la acumulación de

cambios genéticos impredecibles a nivel celular o la falta de semejanza con la morfología celular encontrada *in vivo*. Por lo que, las líneas de investigación han cambiado hacia una nueva perspectiva en la que son necesarios modelos que reproduzcan tanto la heterogeneidad como la estructura tumoral.⁽⁵⁾

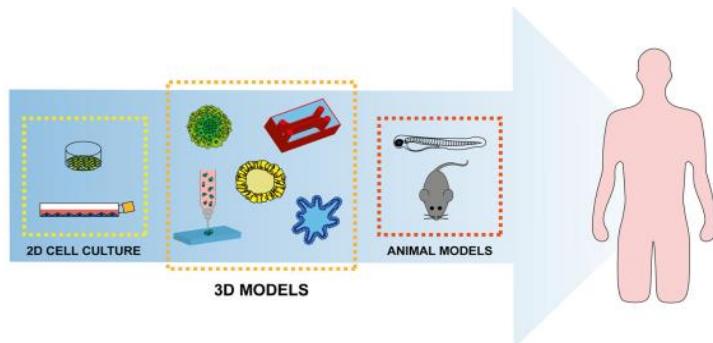


Figura 2. Esquema de las tres categorías de modelos que se utilizan actualmente: cultivos en 2D tradicionales; modelos 3D donde se incluyen esferoides, organoides y chips; modelos animales.⁽⁵⁾

Los otros tipos de modelos más utilizados en investigación en cáncer son los modelos animales, a pesar de los inconvenientes que presentan, como su mayor duración, el alto coste económico o la mayor complejidad de manejo. Así, estos modelos han sido ampliamente usados en investigación en cáncer, ya que permiten recrear el microambiente del tumor.⁽⁶⁾ *In vivo*, las células tumorales están rodeadas de diferentes tipos celulares (células inmunes, células endoteliales) y componentes extracelulares que componen el microambiente tumoral. El desarrollo del tumor está condicionado por el ambiente que le rodea y por la interacción entre componentes celulares y no celulares. El estudio de estas interacciones permite conocer mejor el comportamiento del tumor, y así los modelos animales ayudan a incorporar los elementos necesarios para simular el microambiente tumoral de manera que simule lo máximo posible lo que encontramos en el organismo. Para el estudio del cáncer, el modelo animal más utilizado es el modelo murino, en el que además se han introducido otras técnicas como los xenoinjertos derivados de pacientes (Patient Derived Xenografts, PDXs) que permiten una mayor similitud a lo que encontramos en humanos.⁽⁵⁾

Los PDXs consisten en inyectar células tumorales humanas en ratones inmunocomprometidos, con lo que se mantiene la proporción original de células estromales o tumorales. Lo que conseguimos con esta técnica es obtener una imagen más aproximada de la estructura real del tumor, con las características propias del paciente del que proviene. No obstante, es un método complejo y a largo plazo los componentes del estroma del tumor procedentes del paciente son reemplazados por los del animal, y el perfil genómico e inmune no coincide con el humano.

Además de los inconvenientes ya comentados, hoy el principal inconveniente de los modelos animales es que su uso está cada vez más limitado por los problemas éticos que suponen. Esto ha hecho que se estén buscando nuevas estrategias para el estudio del cáncer, que simulen al máximo el microambiente tumoral. Estas nuevas estrategias pasan en gran parte por el desarrollo de modelos *in vitro* 3D.

Tabla 1. Diferencias entre los cultivos en 2D y los cultivos en 3D.⁽⁷⁾

	2D	3D
Morfología	Cambios morfológicos Pérdida de polaridad	Mantienen morfología Conservan polaridad
Imitación <i>in vivo</i>	No mimetiza la estructura del tejido o masa tumoral	Organización 3D más aproximada a lo encontrado <i>in vivo</i>
Método de cultivo	Simple, reproducible a largo plazo, fácil de interpretar	Peor reproducibilidad, dificultad para interpretar resultados, más difícil
Acceso a compuestos esenciales	Acceso limitado a oxígeno, nutrientes y moléculas señalizadoras (a diferencia de lo que ocurre <i>in vivo</i>)	Acceso variable a oxígeno, nutrientes y moléculas señalizadoras (igual que ocurre <i>in vivo</i>)
Interacciones celulares	No existen interacciones célula-célula ni célula-matriz extracelular. No se tiene un microambiente parecido al <i>in vivo</i>	Se forman interacciones celulares adecuadas, y se consigue un microambiente adecuado para el estudio
Coste	Asequible	Más caro para ciertas técnicas
Tiempo de cultivo	Minutos-horas	Horas-días

Entre los cultivos celulares tradicionales y los modelos animales, se han interpuesto los modelos 3D. En la Tabla 1 se observan las diferencias que estos presentan con los cultivos 2D. Los modelos 3D permiten estudiar la composición específica del tejido del tumor y el microambiente donde se suele desarrollar, para que las células mantengan las características que suelen presentar *in vivo*. Dentro de los modelos 3D, aunque ponemos la atención sobre los esferoides, hay también otros modelos interesantes como: los “multicellular layers” que se basan en el cultivo de células tumorales sobre una membrana de colágeno; la “matrix embedding technique” que consiste en que las células se incrustan en un andamiaje de colágeno, alginato o Matrikel; o los cultivos *ex vivo* que son explantes de tejido cultivados *in vitro*.⁽⁸⁾

Los esferoides, se han utilizado para modelar gran variedad de tumores ya que reproducen el complejo escenario de un tumor, por estar compuestos de áreas especializadas y zonas donde las células tienen diferentes comportamientos fenotípicos, funcionales y metabólicos. Los esferoides son agregados celulares que pueden originarse a partir de diferentes métodos: basados en suspensiones celulares, métodos de superficies no adherentes, los métodos por gota colgante o los métodos microfluídicos.⁽⁹⁾

La técnica de la gota colgante (“hanging drop”) es un método sencillo de realizar y bien caracterizado, en el que los esferoides se forman por agregación por efecto de la gravedad al estar dentro de gotas colgantes. Este sistema nos permite controlar el tamaño del esferoide, ya sea

variando el volumen de la gota o la densidad de la suspensión celular⁽¹⁰⁾, y permite mantener los esferoides a largo plazo, siendo útil para realizar los ensayos posteriores que se deseen.

El volumen del esferoide aumenta exponencialmente en los primeros estadios, tras lo que sigue un periodo de estabilización donde llegan a un equilibrio, llegando a tener formas más redondas y regulares y disminuyendo su volumen. Las células interaccionan unas con otras, lo que se ve favorecido por la formación de uniones intercelulares gracias a la activación de receptores de adhesión como las e-caderinas o las proteínas de la matriz extracelular. Durante el crecimiento del esferoide, se establecen gradientes de oxígeno, metabolitos, nutrientes y pH (Figura 3). Las células cancerígenas bajo condiciones de hipoxia modifican su metabolismo, cambiando la fosforilación oxidativa por la glucólisis anaerobia, obteniendo energía de la conversión de piruvato a lactato. La liberación de lactato contribuye a la acidificación de las áreas internas del esferoide que afecta a la eficacia de ciertos anticancerígenos reduciendo la absorción intracelular y la penetración dentro del tejido. Además, junto con la falta de oxígeno y nutrientes, son responsables del estado quiescente/senescente de las células en las regiones más internas. Esas células continúan produciendo citoquinas y factores de transcripción, pero tienen un estado de proliferación más reducido, haciéndolas más resistentes a los fármacos que se emplean contra células con alto grado de proliferación.⁽⁵⁾

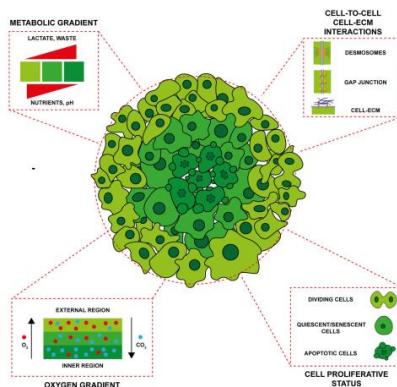


Figura 3. Esquema del modelo de esferoide. Se representan las principales características del esferoide: diferentes capas celulares, gradiente de oxígeno y pH, interacciones celulares.⁽⁵⁾

Los esferoides son una herramienta muy importante para el estudio de los tumores, ya que adquieren características que se parecen a aquellas que poseen las células del tumor *in vivo*. Permiten además realizar co-cultivos con otros tipos celulares como fibroblastos, células endoteliales o células inmunológicas, para poder estudiar las relaciones que establecen entre ellas y tener una imagen más acertada de lo que podría ocurrir en el organismo.

1.3. Microbiota intestinal

El número de microorganismos de un individuo es mayor que el número de células presentes en el cuerpo, en el colon la concentración de bacterias alcanza las 10^{11} bacterias/gramo de contenido. Esta microbiota varía en cantidad y composición a lo largo de todo el intestino, siendo menor en el intestino delgado, donde además el riesgo de desarrollar cáncer es mucho menor que en el caso del colon. Lo que permite entender el importante papel que juega la microbiota en la carcinogénesis del carcinoma colorectal.⁽¹¹⁾

En el cáncer colorrectal, existen factores de riesgo como son la dieta o el estilo de vida, que además tienen una influencia directa en la modulación de las especies microbianas en el intestino. La microbiota intestinal mantiene la homeostasis de la mucosa y la función de la barrera intestinal. Una perturbación en la función de barrera intestinal puede llevar a un incremento de la permeabilidad, que está asociado con una gran variedad de enfermedades intestinales. La disbiosis, es decir, la alteración en el equilibrio de la microbiota es la que conduce a crear un microambiente más favorable para el desarrollo del tumor. ⁽¹²⁾ Este desequilibrio da lugar a una respuesta inflamatoria, barrera epitelial afectada y daños en la mucosa (Figura 4).

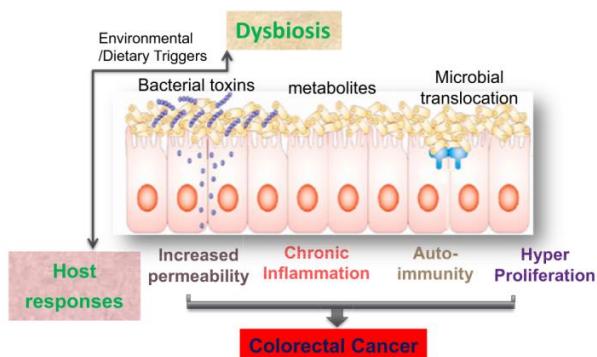


Figura 4. Relación entre la disbiosis y la respuesta del huésped. Las toxinas bacterianas, los metabolitos o incluso los mismos microorganismos dañan el epitelio incrementando la permeabilidad y llevando a un estado inflamatorio que determina el inicio del cáncer. ⁽¹³⁾

Hay diferentes hipótesis que intentan explicar la influencia de la microbiota en el desarrollo del tumor. Una de las hipótesis se basa en la presencia de las conocidas como bacterias “conductoras” que producen daños en el DNA de las células epiteliales, que van a contribuir a la iniciación del cáncer. El crecimiento tumoral favorece la proliferación de bacterias oportunistas. Esta teoría propone que la progresión del tumor causa cambios en el microambiente, y las bacterias típicas son reemplazadas por otros géneros que tienen una ventaja competitiva en estas condiciones, y nutren la progresión del tumor. ⁽¹⁴⁾ El conocimiento de la relación microbiota-cáncer permitirá no solo un mejor conocimiento de este tipo de patología, sino podrá servir además como posible vía de prevención o incluso tratamiento. Por otra parte, su conocimiento también puede resultar útil para el diagnóstico, el cual es especialmente importante que sea prematuro ya que se asocia con un mayor porcentaje de supervivencia.

La hipótesis de una microbiota asociada al cáncer se ha visto reforzada por estudios en los que se comparaba la microbiota de pacientes de cáncer de colon y de individuos sanos como control. ⁽¹⁵⁾ Mediante técnicas de secuenciación masiva se han identificado especies bacterianas con alta prevalencia en muestras fecales de pacientes con cáncer, entre las que destacan: *Streptococcus gallolyticus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis* y *Enterococcus faecalis*. Por contra, otras géneros como *Roseburia*, *Clostridium*, *Faecalibacterium* y *Bifidobacterium* no se encuentran en estos pacientes. Alteraciones en la composición de bacterias dañinas como en la de aquellas que se consideran protectoras pueden ser responsables de la iniciación y/o progresión del tumor (Figura 5). ⁽¹⁶⁾

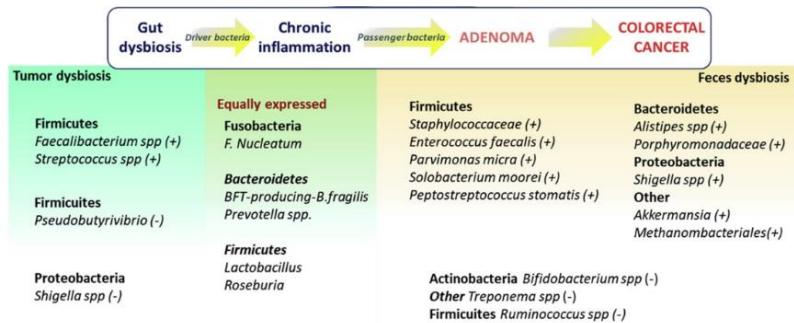


Figura 5. Desarrollo del carcinoma a partir de la disbiosis, con un resumen de las especies que se encuentran incrementadas (+) o reducidas (-) en cada una de las etapas del proceso que lleva al desarrollo del tumor. ⁽¹⁶⁾

Los mecanismos por los que estas especies bacterianas pueden promover el desarrollo del tumor son variados. En algunos casos se relaciona por la presencia de toxinas que alteran la estructura de las células epiteliales y pueden activar la expresión de protooncogenes y aumentar la proliferación celular, como la toxina BFT de *Bacteroides fragilis*. Otro ejemplo, es una cepa de *E. coli* del filotipo B2 que se encuentran en grandes cantidades en lesiones de cáncer. Esta cepa es un grupo de microorganismos virulentos, a diferencia de otras especies de *E. coli* que son comensales de nuestro intestino. ⁽¹⁷⁾ Dos cepas importantes que se han encontrado en biopsias de cáncer de colon son: *E. coli enteropatogénica* (EPEC) y *E. coli enteroinvasiva* (AIEC). En el caso de la primera cepa se ha visto que causa daños en el DNA, y en la segunda que tiene una alta capacidad para unirse e invadir el epitelio intestinal. ⁽¹⁸⁾

Fusobacterium nucleatum es un bacilo Gram negativo, anaerobio, que se encuentra en la cavidad oral y tracto gastrointestinal, principalmente. Se ha considerado un patógeno oportunista que se encuentra en muestras de infecciones orales o intestinales. Es una especie bacteriana muy abundante en los pacientes con cáncer colorrectal, cuya presencia está relacionada con una peor pronóstico y puede promover la resistencia a la quimioterapia. Tiene capacidad de interaccionar con las células a través de adhesinas y promover la organización de los microorganismos en biofilms. Esta facilidad de unirse a células y otros miembros de la microbiota es uno de los factores de virulencia que pueden intervenir en la progresión del tumor. Estos resultados y los profundos estudios que se siguen haciendo sobre esta bacteria pueden ser una oportunidad para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento del cáncer de colon. Se han estudiado diferentes estrategias que tienen como diana a *Fusobacterium nucleatum*. Por ejemplo, el uso de antibióticos cuyo principal inconveniente es su amplio espectro de acción, por lo que se requeriría obtener uno específico para esta especie. Otras estrategias están basadas en bloquear los factores que llevan a la carcinogénesis, o modular la composición de la microbiota a través de prebióticos y probióticos. ⁽¹⁹⁾

El estudio de la composición de la microbiota en diferentes patologías intestinales ha permitido desarrollar nuevas estrategias clínicas, tanto de diagnóstico como de medidas de prevención y tratamiento. Ante la importancia de un diagnóstico prematuro del cáncer de colon, la microbiota juega un papel esencial que permite detectar individuos con riesgo de padecer esta enfermedad, y por tanto reducir la mortalidad. La tasa de supervivencia a los 5 años de ser diagnosticados es de un 90% para pacientes con un CRC localizado, mientras que aquellos con metástasis es de un 14%. ⁽¹²⁾ Modular esta microbiota a través de la dieta, el uso de pre y probióticos, o estrategias más específicas como el trasplante de microbiota fecal (FMT) son herramientas muy prometedoras. Sin embargo, debido a la complejidad de la microbiota, a la

enorme variabilidad interindividual de este ecosistema, y su interrelación con el sistema inmune del paciente, se necesita de modelos que permitan el estudio de su papel en el microambiente tumoral en el cáncer de colon y por tanto en la iniciación y progresión del tumor, así como para el estudio de tratamientos efectivos frente al mismo.

Por todo lo anterior, el presente estudio pretende crear la base de un modelo 3D *in vitro* sencillo de cáncer de colon en presencia de microbiota intestinal, mediante el co-cultivo de una especie bacteriana característica de la misma, *Escherichia coli*, y esferoides formados con líneas celulares de colon (HCT-116 y HT29-MTX, productora de moco), que pueda servir de punto de partida para poder simular la relación entre la microbiota y el cáncer colorrectal.

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fue establecer un co-cultivo de esferoides de células tumorales de colon con una cepa no patogénica de *Escherichia coli* como modelo de estudio de la relación entre la microbiota intestinal y el cáncer colorrectal.

Para la consecución de este objetivo, se establecieron los siguientes objetivos parciales:

- Formación de esferoides en monocultivo de la línea celular de cáncer de colon HCT116 y en co-cultivo de la línea HCT116 con células caliciformes, HT29-MTX (productoras de moco), en una proporción similar a la encontrada en colon entre enterocitos:células caliciformes.
- Estudio comparativo de ambos modelos de esferoides (en mono y en co-cultivo), en cuanto a su viabilidad y tamaño de los esferoides a día 4 y día 8.
- Cultivo y estudio del crecimiento de la cepa bacteriana de *E. coli* (ATCC 25922) tanto en agar como en caldo de cultivo.
- Co-cultivo de la cepa bacteriana con los esferoides tumorales, tanto de HCT116 como de HCT116 y HT29-MTX y estudio del crecimiento y adhesión bacteriana.

3. METODOLOGÍA

3.1. Mantenimiento de las líneas celulares

Las líneas celulares usadas fueron las líneas de carcinoma colorrectal HCT116 (procedente de la ATCC) y HT29-MTX (productoras de moco, cedidas por el laboratorio de Estudios con modelos celulares del centro tecnológico AINIA). Las células HCT116 son células de tipo epitelial, adherentes que crecen en monocapa procedentes de carcinoma de colon humano. Las células HT29-MTX son también células epiteliales procedentes de colon humano, que crecen en monocapa. Esta línea se diferencia desde la línea HT29 a células caliciformes (“globet cells”) y por tanto productoras de moco, utilizando metotrexato.

Ambos tipos celulares se cultivaron en medio DMEM con alto contenido en glucosa (4,5 g/l) (Lonza), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (Gibco), 1% de antibiótico (100UI penicilina y 100µg estreptomicina /ml, Lonza), 1% de glutamina (Lonza) y 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA, Lonza). Para su mantenimiento las células se cultivaban en frascos de cultivo celular T25 (Corning) hasta alcanzar el 80% de confluencia, momento en el que se

subcultivaban a ratios 1:4 – 1:8, dependiendo de las necesidades. Para ello, las células se lavaban 2 veces con PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (200 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$, Lonza), se les añadía 2 mL (0,08 mL/ cm^2) de una solución de tripsina-EDTA 1X (Lonza), se incubaban 4 min y se neutralizaban con la adición de 6 mL (0,24 mL/ cm^2) de medio DMEM completo. Posteriormente, se centrifugaba la suspensión celular a 200 x g durante 5 minutos y el pellet se suspendía de nuevo en medio completo para hacer el subcultivo o para contar el número de células mediante cámara de Neubauer.

Los cultivos se mantuvieron en un incubador a 37°C y una atmósfera de aire con una concentración de CO_2 del 5%. Para la manipulación de los cultivos, todos los trabajos se realizaron en condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar de bioseguridad tipo II (Telstar).

Para los experimentos realizados, las líneas celulares se utilizaron entre los pases 25 y 29 para HCT116 y entre 12 y 15 para HT29MTX.

3.2. Congelación y descongelación de líneas celulares

Para conservar las células, estas fueron congeladas. Para ello, tras la tripsinización, el pellet celular se diluyó en una solución de medio DMEM completo con un 10% de DMSO (Sigma), a una concentración de 1×10^6 células/ml. El DMSO, actúa como crioprotector, evitando la formación de cristales de hielo en el interior celular y por tanto la ruptura de las membranas celulares. La suspensión celular se llevó a criotubos estériles, que se almacenaron en un contenedor de congelación con isopropanol (para asegurar un descenso de temperatura de 1°C por minuto) a -80°C. Transcurridas 24 horas, las células en los criotubos fueron transferidas a tanque de N_2 líquido hasta su descongelación.

Para la descongelación de las células, se llevaron los crioviales desde el contenedor de N_2 líquido a un baño de agua a 37°C, asegurando una descongelación rápida. Una vez descongelados, para evitar la toxicidad del DMSO, el contenido del criotubo se diluyó rápidamente en 5ml medio DMEM completo y se centrifugó a 200xg durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y el pellet obtenido se suspendió en medio DMEM completo para poder establecer de nuevo el cultivo.

3.3. Formación de esferoides

Para la formación de esferoides se llevó a cabo el método de la gota colgante. Para esta técnica, en primer lugar, se prepara una solución, de la cual el 80% será la suspensión de células (HCT116 o HCT116-HT29MTX) en medio DMEM completo y el 20% restante será una solución de Methocell (metilcelulosa, Sigma). El Methocell es una solución que ayuda a agregar las células y permite que las gotas queden adheridas a la superficie de la placa. Para obtener esta solución, se autoclavan 6 gramos de polvo puro de metilcelulosa que posteriormente se disuelven en 250 ml de medio precalentado a 60°C durante 20 minutos en un agitador magnético. Se añaden 250 ml de medio y la solución se mezcla durante 1-2 horas. Por último, la solución se lava por centrifugación (5000xg, 2 horas) y el sobrenadante viscoso se usa para la formación de esferoides.

Tras obtener la suspensión celular en Methocell, sobre la tapa de una placa de Petri, se colocan mediante micropipeta gotas de 25 μl de la suspensión, donde se formarán los esferoides por gravedad, como podemos ver en el esquema de la figura 6. Tras esto, la tapa con las gotas se coloca boca abajo sobre la base, de forma que las gotas pasan a estar colgantes (de

ahí el nombre de la técnica) y las células por gravedad se deslizan por la gota hasta su parte final, más estrecha, donde se agregan y forman el esferoide. Para evitar la deshidratación de las gotas se añaden 20 ml de agua destilada estéril en la base de la placa de Petri.

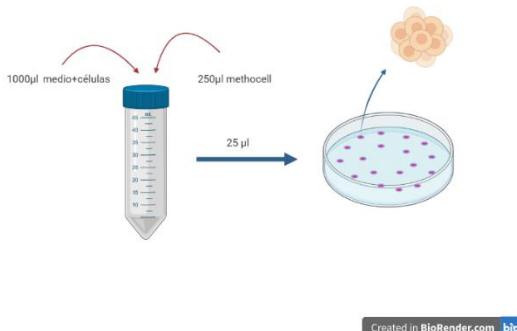


Figura 6. Esquema del proceso de formación de esferoides para una tanda de 50 esferoides donde el 80% de la solución corresponde a medio y células y el 20% restante a methocell. Se añaden 25 de esa solución a la tapa de una placa de Petri. Imagen creada con BioRender.

Tras 48 horas de en el incubador a 37°C y 5% de CO₂, los esferoides se han formado y se pueden observar a través del microscopio invertido. Para un manejo más sencillo de los esferoides, se pueden traspasar a una placa de cultivo celular de 96 pocillos con fondo redondo. Para ello, primero se utiliza una primera placa de lavado donde se realiza un lavado con PBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ y dos lavados en medio DMEM. Se añaden 200 µl de PBS a los pocillos necesarios según el número de esferoides que se hayan formado, y lo mismo para el medio DMEM, pero en este caso se hará por duplicado ya que se realizan dos lavados. Tras el tiempo de incubación se aspiran las gotas donde se han formado los esferoides con una micropipeta con puntas de boca ancha y añade al primer pocillo que contiene PBS. Así sucesivamente con todos los esferoides, y posteriormente se traspasan uno a uno de los pocillos de PBS a los pocillos con medio DMEM. Una vez lavados, en una placa de cultivo celular de 96 pocillos de fondo redondo (Corning) se añaden 200 µl de una solución antiadherente (Anti-Adherence Rinsing Solution, Stemcell) para evitar que los esferoides se adhieran al fondo del pocillo. Se trata de un surfactante que reduce la tensión superficial e impide la adhesión celular. Una vez aplicada esta solución no es necesario dejar tiempo de actuación, por lo que se retira y se lavan los pocillos de fondo redondo con PBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ y se añaden los esferoides que están en la placa de lavado. Se aspiran con la micropipeta asegurándose que hemos cogido el esferoide y se llevan a los pocillos con medio DMEM. Los esferoides en placa se mantienen en incubador a 37°C y 5% de CO₂, cambiando cada 3 días el medio, aspirando cuidadosamente 100 µl para no llevarnos o dañar el esferoide y añadiendo la misma cantidad de medio nuevo.

En cada tanda, se formaron esferoides con células HCT-116 únicamente y con el co-cultivo de células HCT116 y células HT29-MTX, en una proporción 3:1 (similar a la ratio enterocitos:células caliciformes encontrada en el epitelio de colon) con el fin de simular la presencia de moco en la superficie del tumor tal y como ocurre en *in vivo*.

Para la comparación de los esferoides en mono y co-cultivo se realizaron un total de 3 tandas de esferoides, correspondientes a 3 pases celulares distintos.

3.4. Estudio de viabilidad de los esferoides

Para estudiar la viabilidad de los esferoides formados se marcaron con calceína y yoduro de propidio, que son marcadores celulares de células vivas y muertas, respectivamente. Se realizó una suspensión celular en PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} con un volumen final de 1 ml en la que se añadieron 6 μl de yoduro de propidio (2mg/ml) y 4 μl de calceína (1 mg/ml). Los esferoides previamente lavados en PBS se pusieron en 200 μl de esta solución, trabajando en oscuridad. Tras un período de incubación de 30 minutos, se realizó el estudio de viabilidad por microscopía de fluorescencia (Leica Thunder Imager).

3.5. Marcaje con Vybrant de las líneas celulares HCT116 y HT29

Para la visualización del esferoide en co-cultivo con bacterias, se realizó previamente el marcaje de las líneas celulares con el marcador molecular Vybrant que penetra las membranas celulares y tiñe el de DNA mostrando una coloración verde de las células. Para realizar el marcaje se tripsinizaron ambas líneas celulares y se obtuvo una suspensión de 1×10^6 células/mL en un tubo falcon, tanto de HCT-116 como de HT29-MTX. A estas soluciones se le añadieron 5 μl de Vybrant y se dejó incubando durante 20 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Después se retiró el sobrenadante y se suspendió el pellet obtenido en 1 ml de medio. Este paso de lavado por centrifugación se repitió 2 veces.

Con estas suspensiones celulares se formaron esferoides tanto en mono como en co-cultivo.

3.6. Inmunofluorescencia para Muc-2

Para determinar la producción de mucina por las células HT29-MTX en los esferoides se determinó la presencia de mucina 2 (Muc-2) mediante inmunofluorescencia. Para ello se fijaron los esferoides en paraformaldehído al 4% en pocillos de fondo redondo. Una vez lavados los esferoides en PBS, se retiró y se añadieron 100 μl de paraformaldehído al 4%, dejándolo incubar durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados con 200 μl de PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} . Tras la fijación, se realizó la permeabilización con Tritón al 0,1%, dejándolo actuar durante 10 minutos a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados con Tween 0,05%. El siguiente paso fue el bloqueo de inespecificidades para prevenir la unión no específica de los anticuerpos. Para ello se cubrieron los pocillos con BSA 3% (Bovine Serum Albumin), dejándolo actuar durante 1 hora. Posteriormente, se retiró con cuidado y se añadió el anticuerpo primario Mucin2 (mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:100 en BSA 0,5%, dejándolo en incubación “overnight” a 4°C.

Tras la incubación overnight con el anticuerpo primario se realizaron 5 lavados con BSA 0,5% y se añadió el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Invitrogen) a una dilución 1:500 en BSA 0,5%. Se dejó incubar 3 horas y posteriormente se realizó un lavado con BSA 0,5% y 2 lavados con PBS. El último paso fue la tinción de los núcleos con Hoechst a una concentración de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, el cual se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez teñidos con Hoechst se observaron las muestras bajo microscopía de fluorescencia (Leica Thunder).

3.7. Cepas bacterianas

Para el co-cultivo con los esferoides se utilizó la cepa de *Escherichia coli* no patogénica, ATCC 25922. Para su cultivo y crecimiento, se crecía la bacteria en agar desde stocks congelados en glicerol a -20°C. Para ello, se descongelaba el vial bajo atmósfera del mechero Bunsen y con un asa de siembra estéril se sembraba por agotamiento (figura 7) en placas de Petri (Corning), dejándose crecer en estufa a 37°C durante 24 horas. Tras el tiempo de incubación se obtenían colonias aisladas de la cepa de interés.



Figura 7. Siembra por agotamiento de la cepa bacteriana *E. coli* ATCC25922 en Triptona Soja Agar donde se observan colonias aisladas.

3.8. Preparación de medios para el cultivo bacteriano

Para preparar las placas de agar se disolvía en agua destilada la cantidad de agar triptona soja (VWR chemicals) necesaria y se esterilizaban en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Es importante, que tras la esterilización se añada el agar líquido a las placas antes de que éste se enfrie por debajo de 50°C y no gelifique antes de tiempo. El llenado de placas se realizaba por decantación bajo atmósfera de llama de mechero Bunsen, cubriendo el fondo de las placas Petri de 100mm de diámetro. Una vez rellenas las placas, se dejaban enfriar y posteriormente se conservaban a 4°C hasta su uso.

Para preparar el caldo de cultivo se disolvía la cantidad necesaria de caldo de triptona soja (TSB, Oxoid) en agua destilada, tras lo cual, como en el agar sólido, se esterilizaba en el autoclave a 121°C durante 20 minutos y se conservaba a 4°C hasta su uso.

3.9. Determinación del crecimiento bacteriano y contaje de UFC

Para determinar las UFCs (unidades formadoras de colonias)/ml de suspensión bacteriana y así conocer los ml a co-cultivar con los esferoides para alcanzar una determinada tasa de bacterias/célula se realizó una prueba de crecimiento con la cepa elegida

Tras obtener colonias aisladas de la cepa en agar en placa, tal y como se ha explicado anteriormente, se tomó una de las mismas para realizar un cultivo “overnight” en 5 ml de caldo de cultivo TSB. Con un asa de siembra estéril y bajo mechero Bunsen, se tomó una colonia de la placa y se transfirió a un tubo de cristal de fondo redondo estéril (figura 8) conteniendo 5ml medio de caldo de cultivo TSB, que se incubó con agitación (140rpm) en orbital (Lan Technics) a 37°C “overnight”, durante 16-18 horas (para asegurar la fase estacionaria de crecimiento de la cepa bacteriana). Transcurrido el tiempo, en un nuevo tubo de cristal de fondo redondo estéril con 4 ml de caldo de cultivo, se diluyó 1 ml del cultivo “overnight”, dejándolo incubar durante 4 horas en orbital, con agitación a 140 rpm y 37°C.



Figura 8. Cultivo “overnight” por duplicado a partir de una colonia aislada tras 16-18 horas de incubación en agitación a 37°C.

A las 4 horas del cultivo, habiendo alcanzado la fase de crecimiento exponencial de la cepa, se realizaron diluciones seriadas del cultivo bacteriano en PBS estéril y se sembraron en placas de agar TSB, por triplicado. Se incubaron las placas durante 24 horas en estufa a 37°C, tras las cuales observamos y contamos las colonias formadas (en aquella dilución que nos permitió el contaje de colonias aisladas) a partir de una única colonia inicial (figura 9). Las unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) se calcularon al dividir la media del número de colonias por el volumen de cultivo sembrado y multiplicándolo por el factor de dilución.

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\bar{x}}{V} \cdot \text{factor de dilución}$$

\bar{x} = media del número de colonias

V= volumen de cultivo sembrado

Todos los cultivos en agar y caldo de cultivo se realizaron por duplicado, y las UFCs se determinaron en 3 tandas diferentes de cultivos



Figura 9. Diluciones seriadas a partir de un cultivo en medio líquido de la cepa de *E. coli* ATCC25922 en placas con Agar triptona soja (TSA). En la imagen de la izquierda se observan las diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-4} y en la imagen de la derecha se observan las diluciones desde 10^{-5} hasta 10^{-10} .

3.10. Co-cultivo de esferoides con cepa *E. coli* ATCC 25922

Para estudiar el co-cultivo de los esferoides con la bacteria *E. coli*, se establecía el cultivo bacteriano “overnight” durante 18 horas y transcurrido este tiempo se diluía 1 ml de este cultivo en 4 ml de medio de cultivo, que se deja incubar durante 4 horas en agitación. Se traspasaba el cultivo a un tubo falcon de 15 ml, que se centrifugaba a 2000 rpm durante 5 minutos. El pellet obtenido se lavaba con 5 ml de PBS y se volvía a centrifugar, tras lo cual se suspendía el pellet en 5 ml de medio de cultivo celular sin antibióticos.

A partir de esta solución, se calculaban las UFC necesarias para tener 5 veces más de bacterias que de células en cada pocillo. Teniendo en cuenta que teníamos aproximadamente 1000 células por pocillo (1 esferoide/pocillo), se necesitaban 5000 UFC por pocillo. Partiendo del dato obtenido en la determinación del crecimiento bacteriano se calculó el volumen necesario que se debía poner en cada pocillo. Se estableció el co-cultivo a 4 y 24 horas por triplicado para los esferoides de HCT116-HT29MTX y HCT116. Además, se mantuvieron 3 pocillos como control sin células para cada condición.

Tras 4 horas de incubación, se realizaron diluciones seriadas de los tres controles (bacterias sin esferoides) desde la dilución 1/10 hasta 1/10.000. Por otra parte, se determinó la adhesión bacteriana a los esferoides en el resto de los pocillos. Para ello cada pocillo se trató con 20 μ l de una solución de Tritón 1% tras haberlos lavado con PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} . Se dejaron 10 minutos con el detergente y se añadieron 180 μ l de PBS resuspendiendo bien para romper el esferoide. Con esta solución se realizaron diluciones seriadas desde 1/10 hasta 1/1000 para los esferoides en mono y co-cultivo.

Una vez se tuvieron todas las diluciones preparadas, en placas de agar se sembraron 10 μ l de cada dilución por triplicado. Las placas se dejaron incubando durante 24 horas en estufa a 37°C. Tras las 24 horas de incubación del co-cultivo con bacterias se realizó lo mismo que en el caso de 4 horas. Se prepararon diluciones seriadas desde 1/10 hasta 1/10.000 y se dejaron incubar 24 horas en estufa a 37°C.

Transcurrido el tiempo de incubación en estufa para ambos co-cultivos se realizó el conteo de las colonias crecidas en las placas para cada dilución y condición. Se calcularon las ufc/ml obtenidas que nos permitían conocer la adhesión bacteriana a los esferoides.

3.11. Tinción con Hoechst del co-cultivo con esferoides marcados con Vybrant

Los esferoides marcados con Vybrant se llevaron a co-cultivo con la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 de la misma manera que los esferoides sin marcar. Tras 24 horas de incubación se realizó la tinción con el colorante Hoechst (8 μ g/ml), añadiendo a cada pocillo 50 μ l. Tras 30 minutos de incubación se visualizó mediante microscopía de fluorescencia (Leica).

3.12. Análisis estadístico

El análisis estadístico a partir de los datos obtenidos se realizó mediante el paquete estadístico R. Se obtuvo la media y el error estándar y con estos datos se realizaron las gráficas comparativas de los diferentes ensayos presentadas en el apartado de Resultados. Para obtener la significación estadística de los grupos de datos obtenidos experimentalmente, se comprobó en primer lugar si los datos seguían una distribución normal con la prueba F de Fisher de comparación de varianzas. Si $p>0,05$ se consideran varianzas iguales, y por tanto se puede realizar la prueba T de Student para comparar las medias de ambas poblaciones y ver si se alcanzaba la significación estadística.

Para comprobar el aumento del tamaño de los esferoides de día 8 frente a día 5 se utilizó una prueba t de Student de valores pareados. En caso de obtener $p<0,05$ se podía confirmar que el tamaño aumentaba entre ambas medidas.

Para el co-cultivo de esferoides con *Escherichia coli* se realizó el análisis estadístico debido a la falta de datos para ambas condiciones, por lo que no se obtuvo significación para esta

parte experimental. Se compararon gráficamente las medias obtenidos con las datos. Sin embargo, para los controles se realizó el análisis estadístico con una prueba T de Student para comprobar el crecimiento a 24 horas frente a 4 horas del cultivo bacteriano.

Las órdenes utilizadas para realizar el análisis estadístico se recogen en el Anexo.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de los esferoides

Con el objetivo de estudiar si la incorporación de HT29MTX (células caliciformes) en la formación de los esferoides modificaba las características propias de los esferoides de HCT116, se realizaron dos tandas de esferoides de HCT116 y de HCT116 con HT29-MTX, que se caracterizaron en función de su tamaño y viabilidad. Para ello, se tomaron medidas del diámetro de los esferoides a día 5 y día 8 para cada condición.

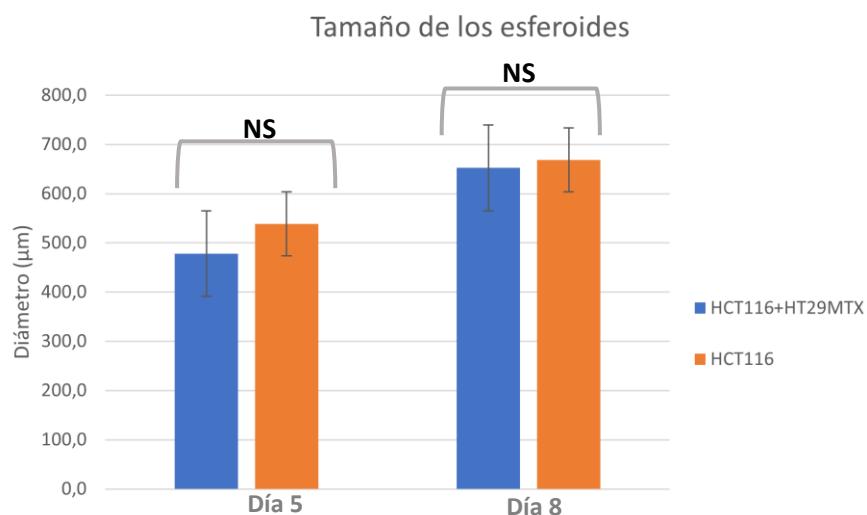


Figura 10. Comparación del diámetro (μm) de los esferoides para cada condición a día 5 y día 8.

Ya a día 5, los esferoides de ambas condiciones presentaban la morfología esférica esperada, que se mantuvo hasta el día 8, aumentando de tamaño de forma significativa ($p=0,017$). En la Figura 10 se representan las medias para cada condición. Aunque se observa que a día 5 los esferoides en co-cultivo son más pequeños que los de monocultivo, las diferencias no alcanzaron la significación. De hecho, estas diferencias a día 8 ya no se observan, mostrando un tamaño similar en ambas condiciones. Por tanto, la adición de la línea celular HT29MTX no afectó al tamaño de los esferoides, de forma que no se apreciaron diferencias significativas en el diámetro de estos ni al día 5 ni al día 8 de formación ($p>0.05$).

Se estudió también la viabilidad de los esferoides en los mismos días que se midió el tamaño mediante la tinción con calceína y yoduro de propidio y su visualización mediante microscopía de fluorescencia. Las imágenes de microscopía de fluorescencia (figuras 11 y 12) nos muestran la periferia del esferoide en fluorescencia verde que corresponde a las células vivas (teñidas con calceína) y las células muertas en el interior, fluorescencia en rojo, (teñidas con yoduro de propidio).

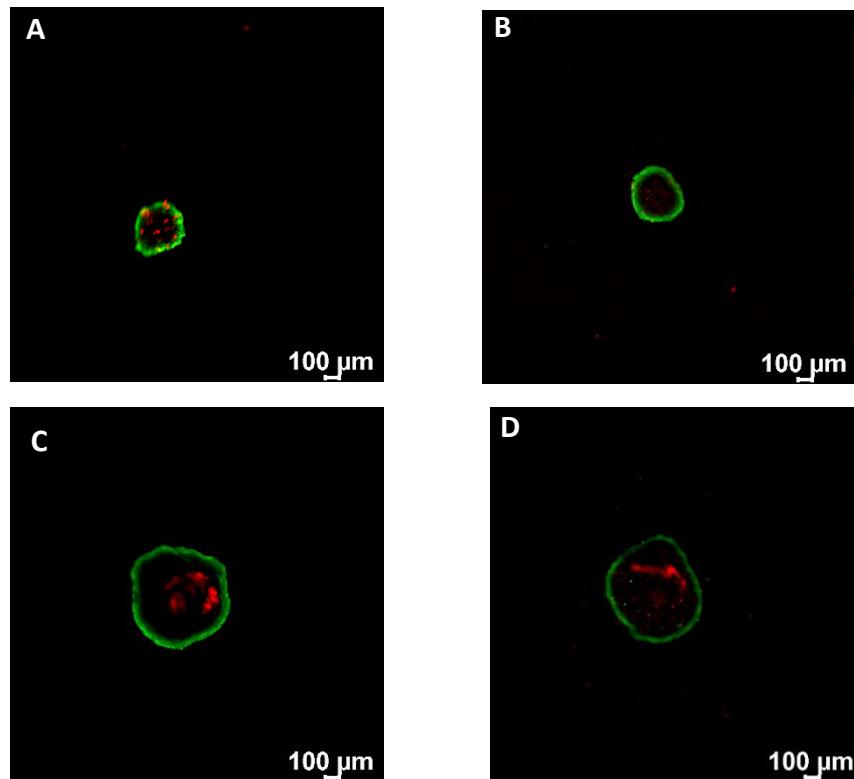


Figura 11. A: esferoide HCT116 a día 5. B: esferoide HCT116+HT29-MTX a día 5. C: esferoide HCT116 a día 8. D: esferoide HCT116+HT29-MTX a día 8.

Mientras que a día 5 (imágenes A y B de la figura 9) solo se observaron algunas células muertas aisladas en el interior del esferoide en ambos tipos de esferoides, (imágenes C y D de la figura 9) en la segunda medida (día 8), la cantidad de células muertas en el interior de los esferoides aumentó significativamente para ambas condiciones (HCT116 y HCT116+HT29MTX), formándose en ambas el “core necrótico” propio de estos esferoides tumorales.

En general, en las diferentes imágenes tomadas, se pudo observar una mayor muerte celular en el interior del esferoide y por tanto un mayor “core” necrótico en los esferoides en monocultivo. Sin embargo, como se observa en las imágenes de la figura 12 podemos observar la muerte celular en el interior del esferoide donde en ambos casos se llegó a formar “core” necrótico.

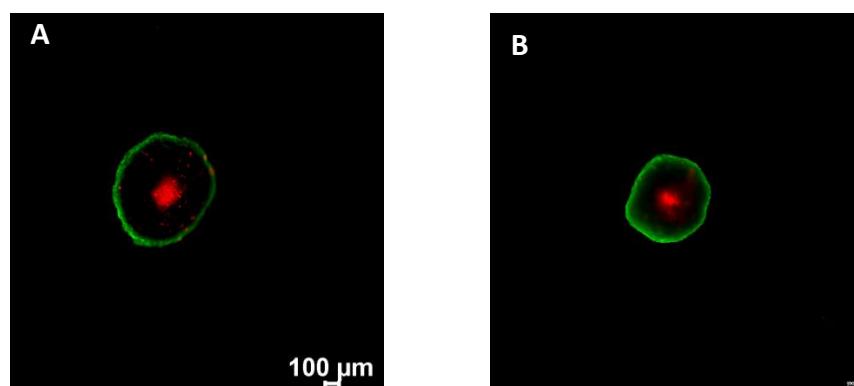


Figura 12. A: esferoide HCT116 a día 8. B: esferoide HCT116+HT29MTX a día 8.

4.2. Co-cultivo esferoides con cepa E.coli ATCC 25922

Se realizó el co-cultivo de los esferoides de HCT116 y de HCT116+HT29MTX con la cepa de *Escherichia coli* para observar la adhesión celular tras 4 y 24 horas. Se establecieron controles para determinar la población bacteriana sin células (figura 13) bajo las misma condiciones de incubación y poder determinar la adhesión producida a las 4 y a las 24 horas de co-cultivo.

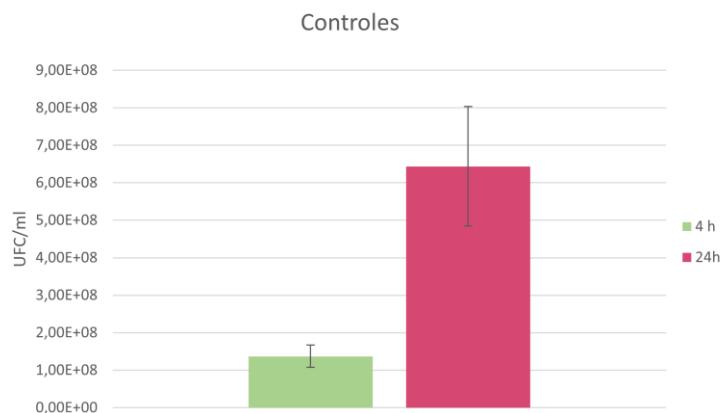


Figura 13. Población bacteriana (UFC/ml) en los pocillos control tanto a 4 como a 24 horas.

El crecimiento a 24 horas fue mayor que a las 4 horas de incubación como cabía esperar ($p=0,017$).

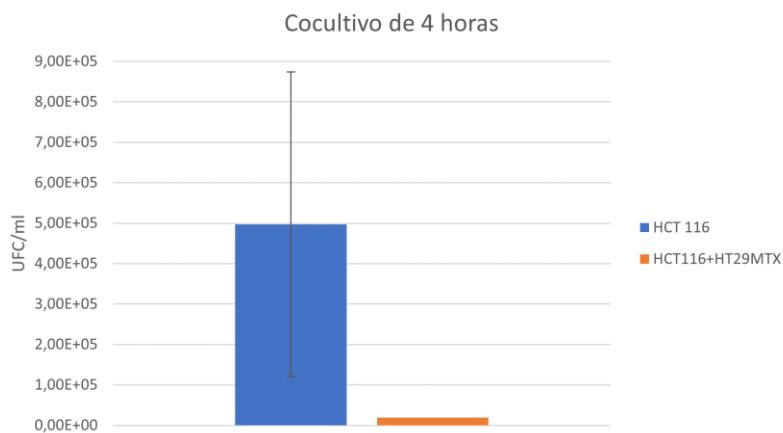


Figura 14. Comparación de la adhesión bacteriana en el co-cultivo de 4 horas para ambos tipos de esferoides.

Se comparan en las Figuras 14 y 15 los co-cultivos a 4 horas para cada condición y los co-cultivos a 24 horas. En el caso de 4 horas, observamos en la Figura 14 que la adhesión bacteriana en el caso de los esferoides de HCT116 es muy superior a lo que ocurre con los esferoides con HT29MTX. Lo mismo ocurre para el co-cultivo a 24 horas (Figura 15), aunque como cabía esperar debido al mayor tiempo de incubación, la población bacteriana es mayor. No se pudo realizar el análisis estadístico pertinente que nos permitiese saber si existen diferencias significativas entre ambos tipos de esferoides en el co-cultivo a 4 y 24 horas. Por ejemplo, en el caso del co-cultivo a 4 horas no se obtuvieron los suficientes datos debido a que no se obtuvo crecimiento en varias de las placas de adhesión del co-cultivo con esferoides con HCT116-HT29MTX.

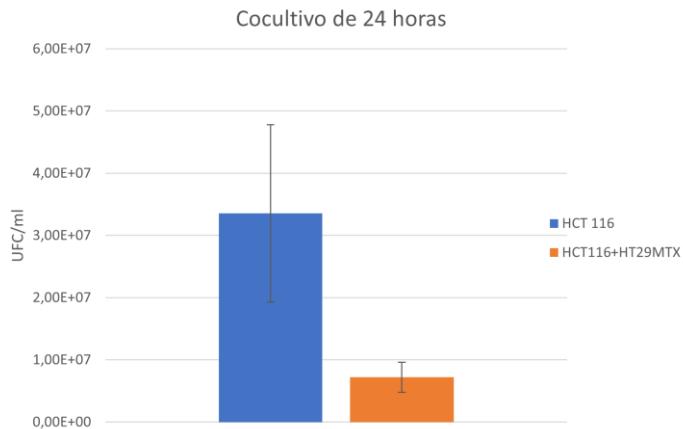


Figura 15. Comparación de la adhesión bacteriana en el co-cultivo de 4 horas para ambos tipos de esferoides.

Con las medias calculadas en la Tabla 2 se estableció el porcentaje de adhesión respecto a la población control que se recoge en la Tabla 3. Aunque los porcentajes de adhesión no son muy elevados se observa que aumenta en el cultivo de 24 horas respecto al cultivo de 4 horas. Además, se produce más adhesión en el caso del monocultivo que en el co-cultivo

Tabla 2. Porcentaje de adhesión respecto a la población control.

HCT116		HCT116-HT29MTX	
4 HORAS	24 HORAS	4 HORAS	24 HORAS
0,36%	5,21%	0,01%	1,12%

4.3. Tinción de Hoechst de los esferoides marcados con Vybrant

Por otra parte, se realizó de la misma manera el co-cultivo de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 con los esferoides marcados con Vybrant. Tras el co-cultivo únicamente de 24 horas, se realizó una tinción con el colorante Hoechst y se observó por microscopía de fluorescencia (Figura 16). Esto nos permitiría diferenciar los núcleos de las bacterias adheridas al esferoide, al diferenciar la fluorescencia esferoides con el marcaje con Vybrant.

Se realizaron imágenes de un esferoide sin bacterias de cada condición de manera que se pudiese comparar con el co-cultivo con la cepa bacteriana. Se observa la fluorescencia verde que corresponde a las células del esferoide teñidas con Vybrant, y por otro lado la fluorescencia azul que corresponde con la tinción de núcleos con Hoechst. Sin embargo, aunque se observa fluorescencia azul alrededor del esferoide no se pudo diferenciar las bacterias con claridad. Lo que nos interesaba era diferenciar las células (en verde y azul) de las bacterias (solo en azul), para observar la adhesión bacteriana sobre la superficie del esferoide. Sin embargo, debido a problemas técnicos con el microscopio de fluorescencia no se alcanzó la resolución suficiente para verlo.

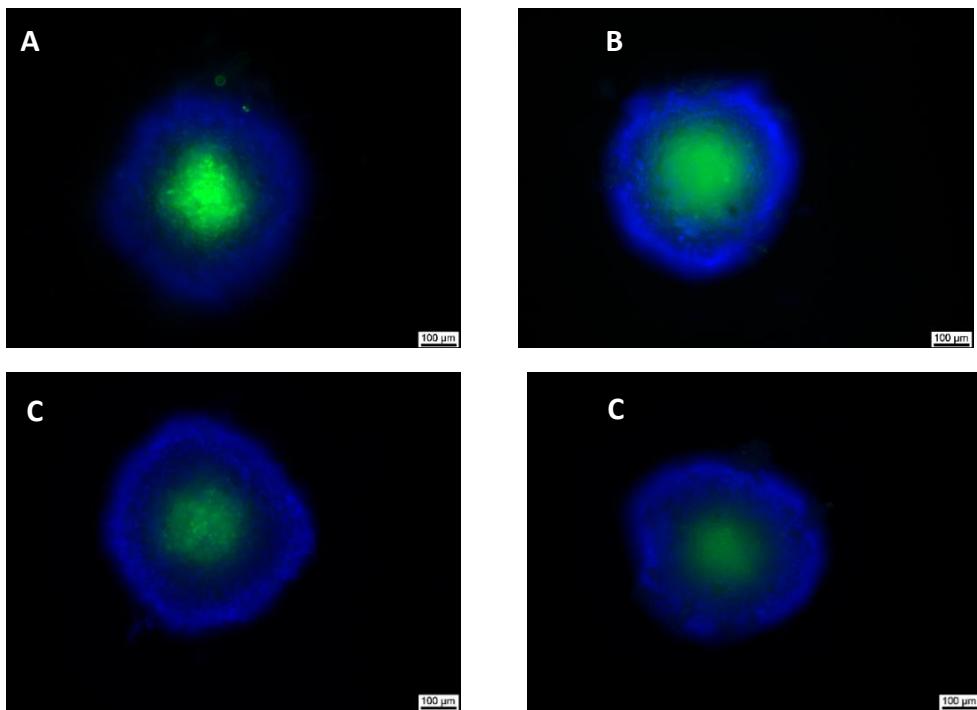


Figura 16. A: esferoide HCT116 sin bacterias. B: esferoide HCT116 con bacterias. C: esferoide HCT116+HT29MTX sin bacterias. D: esferoide HCT116+HT29MTX con bacterias.

En la Figura 16, se observa que la fluorescencia azul es más intensa en la imagen B que en la imagen A, lo que se debería a la presencia de bacterias adheridas. También se vieron ligeras diferencias también en intensidad de fluorescencia azul entre el co-cultivo con esferoides HCT116 y con esferoides HCT116-HTMTX29 (imagen B y C de la figura 16, respectivamente). Estos resultados encajan con lo obtenido a nivel cuantitativo en la adhesión de los esferoides de HCT116-HT29MTX.

4.4. Inmunofluorescencia para Muc-2

Las pruebas de detección de Muc-2 por las células HT29-MTX de los esferoides en co-cultivo fueron fallidas por lo que no pudieron obtenerse resultados. El protocolo requería lavados sucesivos en los pocillos que contenía el esferoide por lo que es posible que se perdiesen en alguno de los tratamientos previos a la detección por fluorescencia, ya que al final no se pudo visualizar ninguno.

Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular que contienen sitios de unión para bacterias patogénicas y comensales. Son producidas por las células caliciformes que se encuentran en una proporción 1:3 en el intestino. Hay diferentes mucinas producidas por las células caliciformes y entre ellas se utilizó MUC-2 para realizar la inmunohistoquímica. La detección por inmunofluorescencia de esta proteína nos hubiese dado una visión de la cantidad de mucina producida por las células HT29-MTX y la presencia de este tipo célula en el esferoide.

5. DISCUSIÓN

La caracterización de los esferoides en cuanto a tamaño y viabilidad nos mostró que a día 8 los esferoides aumentaban de tamaño y la presencia de “core” necrótico frente a día 5, donde apenas se aprecia muerte celular. Lo cual se correspondía con lo esperado y además se ha visto en otros estudios sobre esferoides de HCT116, tanto para el tamaño como para la viabilidad. ^(20,21) A nivel cuantitativo, las diferencias de tamaño entre ambas condiciones no resultaron significativas ($p>0,05$). En las imágenes tomadas, no se observan claras diferencias entre la morfología de ambos tipos celulares, aunque es cierto que en otro estudio se ha observado que los esferoides de HCT116 cuentan con un contorno más regular y continuo, así como tamaño superiores. En este estudio lo comparan con esferoides únicamente de HT29 pero no se especifica el número de células que utilizan, pero se observan tamaños más pequeños y más irregularidades en cuanto a forma.⁽²²⁾ En nuestro caso, queríamos comprobar si la adición de la línea celular HT29-MTX, para realizar un esferoide más parecido al epitelio intestinal a nivel de colon, modificaba el tamaño y la viabilidad de los esferoides. Es cierto que a día 5 los esferoides en co-cultivo crecieron menos que los esferoides en monocultivo (si bien las diferencias no llegaron a la significación estadística), pero a día 8 los tamaños se igualaban, por lo que podemos concluir que la incorporación de HT29-MTX en la formación de esferoides de HCT116, en la proporción 3:1, no afecta el tamaño de estos.

El “core” necrótico se forma en el interior del esferoide debido a que en estas zonas existe una diferente distribución de los nutrientes y el oxígeno. En el “core” necrótico se establecen unas condiciones de hipoxia debido a la proliferación de las capas celulares externas, lo que cambia el comportamiento metabólico y fenotípico de las células de esta zona.⁽⁵⁾ Esto sucede en las fases más tardías del crecimiento del esferoide, cuando el diámetro es $>500\mu\text{m}$, lo que corresponde con lo que se observa en nuestros resultados. La presencia de muerte en el interior aumentaba claramente de día 5 a día 8. La mayor proliferación por parte de las células HCT116 podría indicar una aparición más intensa y temprana de este “core”. Sin embargo, para ambos tipos de esferoides no se observaron muchas diferencias en cuanto a viabilidad y se formó el “core” necrótico. Las ratios de crecimiento entre ambas líneas en cultivo celular no eran los mismos y quizás esto influya en la formación de los esferoides. Se ha utilizado la proporción que se encuentra *in vivo* de células epiteliales (enterocitos) y células caliciformes (3:1) en intestino grueso, para representar el epitelio de colon, por lo que quizás necesiten más tiempo para crecer de manera correcta ya que como hemos observado a día 8 presentaban un tamaño similar a los esferoides de HCT116. Hemos observado que la adición de esta línea celular no afecta al tamaño y en cuanto a la viabilidad, no tenemos datos cuantitativos que nos indiquen si las diferencias entre ambos modelos son significativas.

Con la caracterización de los esferoides de líneas celulares de cáncer de colon se buscaba establecer diferencias entre los esferoides de HCT116-HT29MTX y los esferoides en monocultivo de HCT116 en cuanto a tamaño y viabilidad. Se buscaba añadir una característica fundamental del epitelio intestinal que presenta células caliciformes cuya función es la producción de esta sustancia como barrera protectora del epitelio y que puede influir en la adhesión de la flora bacteriana. Sin lugar a duda, la realización de más tandas de esferoides para poder obtener unos datos más normalizados podría ayudar a extraer más conclusiones en la caracterización de ambos modelos.

Escherichia coli es una bacteria comensal de la flora intestinal que colonizan el intestino desde el nacimiento. Sin embargo, estas bacterias pueden adquirir factores de virulencia y ser patogénicas. Se han descubierto varios patógenos de esta especie bacteriana cuyas toxinas y

factores de virulencia permiten invadir las células del epitelio intestinal.⁽²³⁾ Tanto las bacterias patogénicas como las comensales presentan fimbrias que les permiten adherirse a las células del intestino, aunque en el caso de las bacterias comensales tienen una menor proporción de fimbrias. Las fimbrias actúan como factores de virulencia ya que su unión a los enterocitos es el primer paso para la internalización de los patógenos.⁽²⁴⁾ Sin embargo, hay que tener en cuenta la presencia de las barreras que tiene el tracto gastrointestinal. La mucosa intestinal está separada por una capa de moco que se secreta por las células del epitelio cuyos componentes mayoritarios son las mucinas. Se conocen hasta 20 de estas glicoproteínas de alto peso molecular y la más importante es MUC-2, proteína secretora producida por las células caliciformes. La secreción de MUC-2 genera una capa protectora contra la colonización de patógenos ya que no se pueden adherir a los enterocitos.⁽²⁵⁾

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 para realizar el estudio de adhesión a los esferoides tanto de HCT116 como de HCT116+HT29MTX. En un principio, se esperaba que la bacteria se adhiriese a la mucina producida por la línea celular HT29-MTX, además de a los enterocitos, por la presencia de algún tipo de adhesina.⁽²⁶⁾ Sin embargo, para ambos tiempos destaca la escasa adhesión producida en estos esferoides, siendo más abundante en el caso de HCT116. Como hemos comentado, *Escherichia coli* es capaz de unirse a los enterocitos por las fimbrias y la presencia de mucina impediría esta unión. No se pudo comprobar la producción de mucina por inmunofluorescencia, si bien en los resultados obtenidos en el co-cultivo con la cepa de *Escherichia coli* comprobamos que hubo mayor adhesión en los esferoides sin la línea HT29-MTX. Además, en las imágenes de la tinción con Hoechst se observa mayor fluorescencia azul en los esferoides de HCT116, en comparación con los esferoides en cocultivo, lo que indica la adhesión bacteriana producida en el primer caso. En la bibliografía se ha observado adhesión de esta cepa a la línea HT29-MTX, pero el estudio se realizó en monocapa únicamente con estas células. Esto contrasta con nuestros resultados, donde la adhesión ha sido escasa, pero hay que tener en cuenta que se ha usado un modelo diferente con dos líneas celulares y en vez de monocapa, hay un esferoide. Además, se compara la adhesión a la mucina con diferentes especies bacterianas, resultando nuestra cepa, muy usada como referencia, en una baja adhesión a esta barrera producida por las células HT29-MTX.⁽²⁷⁾ También se ha comprobado que ante la presencia de mucina, la adhesión de esta cepa al epitelio intestinal es menor. Las diferencias de adhesión al epitelio intestinal de esta cepa ante la presencia de mucina. Esto mismo sucede en nuestros resultados, la adhesión a los esferoides de HCT116 es mayor que a los esferoides HCT116+HT29MTX.⁽²⁸⁾

Con lo visto en nuestros resultados y contrastado con la bibliografía es muy importante la presencia de una capa mucina que proteja al epitelio de la invasión por especies patógenas. La pérdida de esta barrera puede llevar a una mayor adhesión e internalización de bacterias en el tejido y en muchas ocasiones la pérdida de estas propiedades está estrechamente relacionada con los tumores. Por ello es esencial la presencia de este tipo celular en modelos que como el presente simulan el epitelio intestinal y su relación con la microbiota y más en zonas donde su proporción es mayor como es el caso del colon.⁽²⁷⁾

A pesar de que hubiese sido importante realizar más tandas experimentales para alguno de los ensayos, se ha conseguido estudiar a escala pequeña la interacción de una cepa bacteriana presente en la flora intestinal con un modelo celular de cáncer de colon. Los esferoides tanto en co-cultivo como en monocultivo han permitido una mayor similitud con lo que se encuentra *in vivo*, y por primera vez se ha conseguido estudiar la adhesión bacteriana a esferoides de colon. La presencia de la línea celular productora de mucina (HT29-MTX) en la pro-

porción adecuada ha permitido enriquecer el ensayo y obtener una representación más biomimética de lo que se encuentra en este tramo intestinal. El estudio del microambiente tumoral de cáncer de colon en el que se incluye la flora intestinal presenta muchos enfoques y permite obtener modelos que se asemejen a lo que ocurre en la patología.

Este modelo experimental representa un punto de partida para el desarrollo de un modelo de cáncer de colon 3D con la presencia de la microbiota intestinal. Con esto, se busca estudiar el microambiente tumoral del cáncer de colon donde la flora intestinal es un factor muy importante en el desarrollo del tumor.

6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

- A día 8, los esferoides aumentaron de tamaño frente a día 5, y además se observó más muerte celular y la presencia de un “core” necrótico evidente tanto en los esferoides en monocultivo como en co-cultivo.
- La adición de la línea celular HT29-MTX no afectó al tamaño de los esferoides, ni tampoco ni a la viabilidad de ambos modelos.
- La cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 se adhirió más a los esferoides en monocultivo, aunque se necesitarían más tandas experimentales para comprobar los datos obtenidos. Como cabía esperar la adhesión bacteriana aumentó a 24 horas frente a 4 horas de co-cultivo.
- La producción de mucina podría evitar la adhesión de la cepa de *Escherichia coli* debido a su función protectora de la barrera intestinal donde esta bacteria es capaz de unirse a los enterocitos mediante fimbrias.
- Este modelo es una buena aproximación experimental para el estudio del microambiente tumoral en el colon donde la flora intestinal juega un papel fundamental en la homeostasis del tejido.

- At day 8, spheroids increased in size compared to day 5. Besides, more cell death and the presence of an evident necrotic core were observed in both monocultured and cocultured spheroids.
- The addition of the HT29-MTX cell line did not affect spheroid size or viability in either model.
- The *Escherichia coli* strain ATCC 25922 adhered more to the spheroids in monoculture, although more experimental runs would be needed to verify the obtained data. As expected, bacterial adhesion increased at 24 h versus 4 h of co-culture.
- The production of mucin could prevent the adhesion of the *Escherichia coli* strain due to its protective function of the intestinal barrier where this bacterium is able to bind to enterocytes by means of fimbriae.
- This model is a good experimental approach for the study of the tumor microenvironment in the colon where the intestinal flora plays a fundamental role in tissue homeostasis.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 Feb 4;caac.21660.
2. Irrazábal T, Belcheva A, Girardin SE, Martin A, Philpott DJ. The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer. Vol. 54, *Molecular Cell.* Cell Press; 2014. p. 309–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.039>
3. Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. Vol. 11, *Clinical Interventions in Aging.* Dove Medical Press Ltd.; 2016. p. 967–76.
4. Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Trends in colorectal cancer incidence rates in the United States by tumor location and stage, 1992–2008. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012 Mar;21(3):411–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22219318/>
5. Zanoni M, Cortesi M, Zamagni A, Arienti C, Pignatta S, Tesei A. Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):1–15.
6. Mendes N, Dias Carvalho P, Martins F, Mendonça S, Malheiro AR, Ribeiro A, et al. Animal Models to Study Cancer and Its Microenvironment. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer; 2020. p. 389–401. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-34025-4_20
7. Hoarau-Véchot J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. Halfway between 2D and animal models: Are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions?. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2018. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29346265/>
8. Benien P, Swami A. 3D tumor models: History, advances and future perspectives. *Futur Oncol.* 2014;10(7):1311–27.
9. Katt ME, Placone AL, Wong AD, Xu ZS, Searson PC. In vitro tumor models: Advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. Vol. 4, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 2016.
10. Ryu NE, Lee SH, Park H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells.* 2019;8(12):1–13.
11. Raskov H, Burcharth J, Pommergaard H-C. Linking Gut Microbiota to Colorectal Cancer. *J Cancer.* 2017;8(17):3378–95. Available from: <http://www.jcancer.org>
12. Tilg H, Adolph TE, Gerner RR, Moschen AR. The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer. Vol. 33, *Cancer Cell.* Cell Press; 2018. p. 954–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.03.004>
13. Sun J, Kato I. Gut microbiota, inflammation and colorectal cancer. Vol. 3, *Genes and Diseases.* Chongqing yi ke da xue, di 2 lin chuang xue yuan Bing du xing gan yan yan jiu suo; 2016. p. 130–43.
14. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver–passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. 2012. Available from: www.nature.com/reviews/micro
15. Gao Z, Guo B, Gao R, Zhu Q, Qin H, Fortini Grenfell Queiroz RE, et al. Microbiota dysbiosis is associated with colorectal cancer. 2015;
16. Saus E, Iraola-Guzmán S, Willis JR, Brunet-Vega A, Gabaldón T. Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential. Vol. 69, *Molecular*

Aspects of Medicine. 2019. p. 93–106.

17. Wassenaar TM. *E. coli* and colorectal cancer: a complex relationship that deserves a critical mindset. Vol. 44, *Critical Reviews in Microbiology*. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 619–32.
18. Antonio Hernández-Luna M, Lagunes-Servin HE, Lopez-Briones S. The Role of *Escherichia coli* in the Development and Progression of Cancer. *ARC J Cancer Sci.* 2016;3(1):2455–6009. Available from: <http://dx.doi.org/10.20431/2455-6009.0301001>
19. Sun C-H, Li B-B, Wang B, Zhao J, Zhang X-Y, Li T-T, et al. The role of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer: from carcinogenesis to clinical management. *Chronic Dis Transl Med.* 2019 Sep;5(3):178–87.
20. Hari N, Patel P, Ross J, Hicks K, Vanholsbeeck F. optical coherence tomography complements confocal microscopy for investigation of multicellular tumour spheroids. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47000-2>
21. Däster S, Amatruda N, Calabrese D, Ivanek R, Turrini E, Drosler RA, et al. Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. *Oncotarget.* 2017;8(1):1725.
22. Olejniczak A, Szaryńska M, Kmiec Z. In vitro characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines. *Int J Oncol.* 2018 Feb 1;52(2):599–612. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2017.4206/abstract>
23. Govindarajan DK, Viswalingam N, Meganathan Y, Kandaswamy K. Adherence patterns of *Escherichia coli* in the intestine and its role in pathogenesis. *Med Microecol.* 2020 Sep 1;5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.medmic.2020.100025>
24. Avalos Vizcarra I, Hosseini V, Kollmannsberger P, Meier S, Weber SS, Arnoldini M, et al. How type 1 fimbriae help *Escherichia coli* to evade extracellular antibiotics OPEN. *Nat Publ Gr.* 2015; Available from: www.nature.com/scientificreports/
25. Xue Y, Zhang H, Wang H, Hu J, Du M, Zhu M-J. Host Inflammatory Response Inhibits *Escherichia coli* O157:H7 Adhesion to Gut Epithelium through Augmentation of Mucin Expression. 2014; Available from: <https://journals.asm.org/journal/iai>
26. Al-Saedi F, Pereira Vaz D, Stones DH, Krachler AM. Mucin desulfation changes retention of commensal *E. coli* by mucin A commensal adhesin enhances *E. coli* retention by mucin, while mucin desulfation by mucin-foraging bacteria enhances its transmigration through the mucus barrier. Available from: <https://doi.org/10.1101/126672>
27. Rodriguez-Lazaro D, Anderson R, Wright A Von, Golí N, Popoví N, Diní M, et al. New Insight into Biofilm Formation Ability, the Presence of Virulence Genes and Probiotic Potential of *Enterococcus* sp. Dairy Isolates. *Front Microbiol* | www.frontiersin.org. 2018;1:78.
28. Gomez-Zavaglia A, Gänzle M, Golí N, Živkoví M, Miljkoví MS, Ruas-Madiedo P, et al. EPS-SJ Exopolysaccharide Produced by the Strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 Is Involved in Adhesion to Epithelial Intestinal Cells and Decrease on *E. coli* Association to Caco-2 Cells. *Front Microbiol* | 2016;1:286.

ANEXO

1. Órdenes de R para la realización del análisis estadístico, y resultados.

```
> library(readxl)  
> EsfComp <- read_excel("C:/Users/puert/Downloads/EsfComp.xlsx")  
> EsfComp  
# A tibble: 7 x 4  
  `D5-29` `D8-29` `D5-116` `D8-116`  
  1 605.  734.  599.  831.  
  2 544.  753.  579.  692.  
  3 528.  703.  724.  552.  
  4 418.  724.  794.  684.  
  5 376.  564.  357.  585.  
  6 399.  486.  368.  NA  
  7 NA     602.  351.  NA  
  
> mean(EsfComp$"D5-29", na.rm=TRUE)  
[1] 478.3783  
  
> mean(EsfComp$"D5-116", na.rm=TRUE)  
[1] 538.8657  
  
> mean(EsfComp$"D8-29", na.rm=TRUE)  
[1] 652.27  
  
> mean(EsfComp$"D8-116", na.rm=TRUE)  
[1] 668.684  
  
> library(sciplot)  
  
> se(EsfComp$"D5-29", na.rm=TRUE)  
[1] 37.97683  
  
> se(EsfComp$"D5-116", na.rm=TRUE)  
[1] 69.42817  
  
> se(EsfComp$"D8-29", na.rm=TRUE)  
[1] 38.48832  
  
> se(EsfComp$"D8-116", na.rm=TRUE)
```

[1] 48.82697

> var.test(EsfComp\$"D5-29",EsfComp\$"D5-116")

F test to compare two variances

data: EsfComp\$"D5-29" and EsfComp\$"D5-116"

F = 0.25646, num df = 5, denom df = 6, **p-value =0.1569**

alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1

95 percent confidence interval: 0.04283206 1.78949983

sample estimates: ratio of variances

0.2564598

> t.test(EsfComp\$"D5-29",EsfComp\$"D5-116",var.equal=T, alternative = "less")

Two Sample t-test

data: EsfComp\$"D5-29" and EsfComp\$"D5-116"

t = -0.72744, df = 11, **p-value = 0.2411**

alternative hypothesis: true difference in means is less than 0

95 percent confidence interval: -Inf 88.84299

sample estimates: mean of x mean of y

478.3783 538.8657

> var.test(EsfComp\$"D8-29",EsfComp\$"D8-116")

F test to compare two variances

data: EsfComp\$"D8-29" and EsfComp\$"D8-116"

F = 0.86989, num df = 6, denom df = 4, **p-value =0.8352**

alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1

95 percent confidence interval: 0.09458136 5.41697153

sample estimates: ratio of variances

0.8698942

> t.test(EsfComp\$"D8-29",EsfComp\$"D8-116",var.equal=T, alternative = "less")

Two Sample t-test

data: EsfComp\$"D8-29" and EsfComp\$"D8-116"

t = -0.2674, df = 10, **p-value = 0.3973**

alternative hypothesis: true difference in means is less than 0

95 percent confidence interval: -Inf 94.84127

sample estimates: mean of x mean of y

652.270 668.684

```
> Tamanyo <- read_excel("C:/Users/puert/Downloads/Tamanyo.xlsx")
```

```
> t.test(x = Tamanyo$'D5', y = Tamanyo$'D8', alternative = "two.sided", paired = TRUE, conf.level = 0.95)
```

Paired t-test

data: Tamanyo\$D5 and Tamanyo\$D8 t = -2.8548, df = 10, **p-value = 0.01711**

alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0

95 percent confidence interval: -223.97959 -27.61314

sample estimates: mean of the differences

-125.7964

```
> control <- read_excel("C:/Users/puert/Downloads/control.xlsx")
```

```
> t.test(control$`4 h`, control$`24h`, var.equal = T, alternative = "less")
```

Two Sample t-test

data: control\$`4 h` and control\$`24h`

t = -3.1272, df = 4, **p-value = 0.01764**

alternative hypothesis: true difference in means is less than 0

95 percent confidence interval:

-Inf -161367503

sample estimates: mean of x mean of y

136666667 643666667