CEPAS BACTERIANAS PRODUCTORAS DE HISTAMINA PARA TRATAMIENTO DEL CÁNCER

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona, en términos generales, con cepas bacterianas ácido lácticas y, particularmente, con cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina y su uso, por ejemplo, en cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Se ha colectado evidencia previa que indica que la histamina puede modular la proliferación de diferentes células normales y malignas. Se ha reportado una biosíntesis alta y un contenido alto de histamina junto con receptores de histamina en diferentes cánceres humanos que incluyen el melanoma, el cáncer de colon y de seno.

El cáncer colorrectal (CRC), también denominado cáncer de colon, cáncer rectal, o cáncer intestinal, es el tercer tipo de cáncer más común y es el tercer tipo de cáncer asociado con mortalidad. La carcinogénesis colorrectal ha sido asociada tanto con factores genéticos como ambientales. El cáncer colorrectal es el cáncer en el colon y/o en el recto.

Lactobacillus reuteri es una bacteria del filo Firmicute reconocida por ser comensal de los intestinos y probiótica, es prevalente en los tractos gastrointestinales de diversas especies de aves y mamíferos. Este microrganismo se caracteriza por ser reconocido como seguro (GRAS) y beneficioso, y ha sido globalmente usado como probiótico durante aproximadamente dos décadas. Se ha reportado que *L. reuteri* suprime las citoquinas pro-inflamatorias en las células epiteliales del intestino, los monocitos y la inflamación intestinal en diferentes modelos murinos.

La patente WO 2013/011137 divulga la selección de cepas bacterianas específicas ácido lácticas que producen histamina y el uso de dichas cepas para generar efectos benéficos en mamíferos. Las cepas bacterianas seleccionadas pueden ser usadas en la producción local de histamina en mamíferos; en particular, pueden ser usadas en el tratamiento o profilaxis de condiciones inflamatorias.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La invención del presente documento divulga cepas bacterianas productoras de histamina

para su uso en el tratamiento de cáncer, incluyendo cáncer colorrectal.

Los inventores han encontrado que las bacterias probióticas productoras de histamina con *Hdc*$^{-/-}$ son capaces de reducir la frecuencia y severidad de la inflamación asociada con el CRC en el cáncer colorrectal. *L. reuteri* ATCC PTA-6475 disminuyó significativamente el número y tamaño de tumores colorrectales o de tumores de colon. Sin embargo, un mutante isogénico *hdcA* de *L. reuteri* ATCC PTA-6475, el cual carece de la actividad productora de histamina, no mostró los mencionados efectos, indicando un rol significativo del gen bacteriano *hdcA* en el microbioma gastrointestinal y en la producción de histamina para la supresión de la tumorigénesis colorrectal.

En consecuencia, un aspecto de las realizaciones se relaciona con cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina para su uso en la profilaxis, inhibición, tratamiento o reducción del riesgo de recaídas en el cáncer colorrectal.

Otro aspecto de las realizaciones se relaciona con una cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina para su uso como adyuvante en el tratamiento de cáncer, el cual se selecciona de un grupo que consiste de radioterapia y quimioterapia.

Un aspecto adicional de las realizaciones se relaciona con una cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina para su uso en la profilaxis, inhibición o tratamiento de alteraciones gastrointestinales asociadas con tratamientos de cáncer, los cuales se seleccionan de un grupo consistente de radioterapia y quimioterapia.

Otro aspecto de las realizaciones se relaciona con un método para seleccionar cepas bacterianas ácido lácticas para ser usadas en la profilaxis, inhibición, tratamiento o reducción del riesgo de recaídas en el cáncer colorrectal. El método comprende la búsqueda de bacterias ácido lácticas con un operón activo de histidina. El método también comprende la selección de una cepa bacteriana ácido láctica para su uso en la profilaxis, inhibición, tratamiento o reducción del riesgo de recaídas del cáncer colorrectal; donde dicha bacteria es identificada como una cepa bacteriana ácido láctica con un operón de histidina activo capaz de producir histamina.

Un aspecto adicional de las realizaciones se relaciona con un método para seleccionar cepas bacterianas ácido lácticas para su uso en la profilaxis, inhibición, tratamiento o reducción del riesgo de recaídas de cáncer. El método comprende la selección de una cepa bacteriana ácido láctica con un operón activo de histidina y con la capacidad de producir una diacilglicerol quinasa (DagK). El método también comprende la selección de una cepa bacteriana ácido láctica

para su uso en la profilaxis, inhibición, tratamiento o reducción del riesgo de recaídas de cáncer; donde dicha bacteria es identificada como una cepa bacteriana ácido láctica con un operón de histidina activo capaz de producir histamina y DagK.

Un aspecto adicional de las realizaciones se relaciona con un método para seleccionar una cepa bacteriana ácido láctica para su uso en la profilaxis, inhibición o tratamiento de una condición inflamatoria. El método comprende la selección de bacterias ácidos lácticas con un operón activo de histidina y con la capacidad de producir DagK. El método también comprende la selección de una cepa bacteriana ácido láctica para su uso en la profilaxis, inhibición o tratamiento de una condición inflamatoria; donde dicha bacteria es identificada como una cepa bacteriana ácido láctica con un operón de histidina activo capaz de producir histamina y DagK.

Aspectos adicionales de las realizaciones se relacionan con una nueva cepa de *L. reuteri*, tal como la cepa *Lactobacillus reuteri* DSM 32273, el uso de la cepa *L. reuteri* DSM 32273 como medicamento, y en particular el uso en la profilaxis, inhibición, tratamiento o reducción del riesgo de recaídas de cáncer o el uso en la profilaxis, inhibición o tratamiento de una condición inflamatoria.

Un objeto adicional de la invención proporciona el uso de una cepa bacteriana productora de histamina para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer colorrectal en hombres.

Un objeto adicional de la invención proporciona una composición para el tratamiento del cáncer colorrectal en hombres que comprende una cantidad efectiva de la cepa bacteriana mencionada y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Cepa silvestre de *L. reuteri* ATCC PTA-6475, no mutante de *hdcA*, atenúa el Cáncer Colorrectal Inducido AOM/DSS *in vivo*. (A) Línea del tiempo de los experimentos en ratones. Ratones *Hdc*$^{-/-}$ BALB/c de once semanas fueron azarosamente divididos en cuatro grupos, incluyendo un grupo de control negativo, un grupo de control positivo, un grupo tratado con *L. reuteri* ATCC PTA-6475 y un grupo tratado con *L. reuteri hdcA* mutante. Los ratones del grupo tratado con *L. reuteri* ATCC PTA-6475- o los ratones del grupo tratado con *hdcA* mutante recibieron 5×10^9 CFU de la cepa silvestre *L. reuteri* ATCC PTA-6475 o de la cepa mutante isogénica *L. reuteri hdcA*, respectivamente, en 0.2 mL de MRS por sonda orogástrica una vez

por día durante siete días y una vez por tres días posteriormente. Los ratones en los grupos de control positivo y negativo recibieron únicamente agar MRS. A las doce semanas de edad, dichos ratones fueron enfrentados con una dosis de AOM (12.5 mg/kg) mediante una inyección intraperitoneal seguida por dos ciclos de tratamiento con DSS al 2% en agua potable durante 6 días con períodos de dos semanas de recuperación con únicamente agua potable entre las administraciones de DSS. Los ratones en el grupo del control negativo recibieron una dosis de PBS y agua potable únicamente, en vez de AOM y DSS. Los ratones fueron sacrificados a las 27 semanas de edad y la carcinogénesis en el colon fue evaluada en cada grupo. (B) Imágenes representativas del colon de los ratones del grupo de control negativo (MRS/PBS-H2O), del grupo de control positivo (MRS/AOM-DSS), del grupo tratado con *L. reuteri* ATCC PTA-6475 (*L. reuteri* 6475/AOM-DSS) y del grupo tratado con la cepa mutante isogénica *L. reuteri hdcA* (*hdcA* mutante/AOM-DSS). (C) Cantidades tanto de tumores de colon grandes (>3 mm) como pequeños (<3 mm) de los ratones de cada grupo mencionado anteriormente. Los datos son presentados como diagramas de caja y de bigotes mostrando la mediana y los percentiles décimo y noventavo (***P<0.01, ****p<0.001*, n=8~10 para cada grupo). (D) Imágenes microscópicas representativas (H&E teñidas) del colon de los ratones del grupo de control negativo (MRS/PBS-H_2O), del grupo de control positivo (MRS/AOM-DSS), del grupo tratado con la cepa silvestre *L. reuteri* ATCC PTA-6475 (*L. reuteri* 6475/AOM-DSS) y del grupo tratado con la cepa mutante isogénica *L. reuteri hdcA* (*hdcA* mutante/AOM-DSS).

Figura 2. Detección de la Atenuación de la Tumorigénesis en el Cólon por Imágenes PET (A) Procedimientos de obtención de imágenes por PET. (B) Imágenes representativas de ratones capturadas por escaneo PET/CT en cada grupo. El código de barras representa la intensidad de señal FDG. (C) La cuantificación de señales FDG en la totalidad del colon del ratón usando SUV en cada grupo mostró que la administración de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 redujo significativamente la intensidad de FDG en el colon del ratón al compararse con el grupo control que recibió MRS; sin embargo, la administración de la cepa mutante isogénica *L. reuteri hdcA* mutante no demostró tales efectos (analizado a ciegas). Los datos son presentados como diagramas de dispersión (**P < 0.05*, n=6 para cada grupo).

Figura 3. La administración de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 Afecta la Producción de Citoquinas en el Plasma Murino. La administración de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 disminuye significativamente la producción de citoquinas pro-inflamatorias KC (A), IL-22 (B) y IL-6 (C)

en el plasma de ratones machos *Hdc*$^{-/-}$ a un nivel de proteína determinado por el ensayo de Luminex; el mutante isogénico de *L. reuteri hdcA*, el cual carece de la capacidad de producir histamina, no mostró tales efectos. Los datos son presentados como diagramas de dispersión (*$P < 0.05$, **$P<0.01$, ***$p<0.001$, n=8~10 para cada grupo).

Figura 4. La adminsitración de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 afecta la Expresión de Genes para Citoquinas en el Colon. La administración de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 disminuyó significativamente la expresión de los genes de las citoquina pro-inflamatorias KC (A), IL-22 (B), IL-6 (C), TNF (D) y IL-1α (E) en la mucosa del colon de ratones machos *Hdc*$^{-/-}$ en niveles de RNAm determinados por RT-qPCR; el mutante isogénico *L. reuteri hdcA*, el cual carece de la capacidad de producir histamina, no mostró tales efectos. Los datos son presentados como diagramas de dispersión (*$P < 0.05$, **$P<0.01$, ***$p<0.001$, n=5~6 para cada grupo).

Figura 5. La Expresión de H2R fue Reducida al Suministrar AOM/DSS e Inducida por *L. reuteri.* (A) Estudios de inmunohistoquímica usando anticuerpos específicos H2R mostraron que el H2R fue expresado en el colon de ratones *Hdc*$^{-/-}$. El tratamiento de AOM y DSS redujo la intensidad de H2R al compararla con los controles saludables y la administración de *L. reuteri* indujo la expresión de H2R. (B) La expresión del gen de H2R en la mucosa del colon no fue significativamente modificada por la administración de AOM/DSS o de *L. reuteri* en ratones machos *Hdc*$^{-/-}$ (n=5~6 para cada grupo).

Figura 6. La CD11b^{+}Gr-1^{+} IMCs en el Bazo fue Reducida por la Administración de *L. reuteri* ATCC PTA-6475. Los análisis de citometría de flujo obtenidos de muestras de la médula ósea (A) y del bazo (B) de ratoes macho *Hdc*$^{-/-}$ mostraron que el tratamiento con AOM/DSS incrementó significativamente el porcentaje de CD11b^{+}Gr-1^{+} IMCs en el bazo al compararse con los controles saludables. La administración de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 en los ratones enfrentados con AOM/DSS disminuyó significativamente el porcentaje de CD11b^{+}Gr-1^{+} IMCs en el bazo al compararse con los ratones que no recibieron bacteria (***$p<0.001$, media ± d.e.; n=3~4 para cada grupo).

Figura 7. *L. reuteri* ATCC PTA-6475 Redujo los Tumores Grandes en el Colon de Ratones Hembra *Hdc*$^{-/-}$. (A) Imágenes representativas del colon de los ratones del grupo de control negativo (MRS/PBS-H2O), del grupo de control positivo (MRS/AOM-DSS), del grupo tratado con *L. reuteri* ATCC PTA-6475 (*L. reuteri* 6475/AOM-DSS) y del grupo tratado con la cepa mutante *hdcA* (*hdcA* mutante/AOM-DSS). (B) El número de tumores grandes de colon (>3

mm) en ratones hembra *Hdc*$^{-/-}$ disminuyó significativamente por la administración de *L. reuteri* ATCC PTA-6475; sin embargo, el número de tumores pequeños de colon (<3 mm) en ratones hembra *Hdc*$^{-/-}$ no cambió significativamente. Los datos son presentados como diagramas de caja y de bigotes mostrando los percentiles 10 y 90 (*$P<0.05$, ***$p<0.001$, n=8~10 para cada grupo).

Figura 8. Mecanismo de *L. reuteri* en un Modelo de Carcinogénesis asociado con Inflamación. La figura ilustra esquemáticamente un mecanismo potencial de probiosis de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 en el modelo murino de carcinogénesis asociada con inflamación.

Figura 9. *L. reuteri* silvestre y las mutantes *hdcA* ATCC PTA-6475 y ATCC PTA-4659 Producen Diacilglicerol Quinasa (DagK). Los niveles de expresión de RNAm del gen blanco normalizados con respecto al gen *housekeeping rpoB* son presentados a las 3, 6, 24 y 48 horas del cultivo de cada bacteria. El RNAm obtenido a las 3 horas del cultivo de cada bacteria fue fijado en 1.0 y usado como un calibrador para identificar la diferencia relativas en veces del RNAm.

Figura 10. Secuencia de Aminoácidos de *L. reuteri* DagK. La secuencia de aminoácidos de *L. reuteri* DagK es mostrada junto con los sitios de clivaje de tripsina (líneas verticales). Los aminoácidos en negrilla indican las secuencias de péptidos obtenidas tras el tratamiento con tripsina. Las barras negras indican las secuencias de péptidos encontradas en los experimentos de LC-MS/MS.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN Y SUS REALIZACIONES PREFERIDAS

La presente invención divulga cepas bacterianas productoras de histamina probiótica para su uso en cáncer, especialmente cánceres dependientes de la histamina, incluyendo pero no limitándose a cáncer colorrectal. La presente invención divulga la selección de cepas bacterianas productoras de histamina probiótica para su uso en cáncer. Las cepas bacterianas productoras de histamina seleccionadas pueden ser usadas para la entrega local de histamina, como antagonistas de los receptores de histamina.

Una realización de la invención es seleccionar ciertas bacterias probióticas capaces de producir histamina. Dichas bacterias seleccionadas pueden ser usadas en el tratamiento del cáncer, especialmente cánceres dependientes de histamina, como por ejemplo el cáncer colorrectal.

Otra realización de la presente invención es seleccionar ciertas bacterias probióticas capaces de producir histamina y también capaces de producir diacilglicerol quinasa (Dagk), como que producen y secretan DagK, o al menos liberan DagK para un efecto extracelular. Tales bacterias seleccionadas pueden ser usadas en la profilaxis, inhibición, tratamiento o en la reducción de un riesgo de reincidencia del cáncer, especialmente en los cánceres dependientes de histamina, como por ejemplo el cáncer colorrectal.

Otra forma de realización de la presente invención es seleccionar ciertas bacterias probióticas capaces de producir histamina y capaces de producir DagK. Tales bacterias pueden ser usadas en la profilaxis, inhibición o tratamiento de una condición inflamatoria, como por ejemplo colitis, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), síndrome del colon irritable (IBS), diverticulosis, gingivitis, mastitis o vaginitis.

En otra forma de realización de la invención, las cepas bacterianas seleccionadas son preferentemente usadas en pacientes de sexo masculino con cáncer, y en incluso otra forma de realización de la invención las cepas bacterianas son usadas en pacientes de sexo masculino con tumores grandes de colon o rectales.

Las cepas bacterianas seleccionadas pueden ser usadas como adyuvantes a la radioterapia o quimioterapia clásica.

Las cepas bacterianas seleccionadas pueden también ser usadas como un producto para minimizar la diarrea y otras molestias gastrointestinales relacionadas con radioterapias o quimioterapias de cáncer; al mismo tiempo, pueden servir como adyuvantes para mejorar dicho tratamiento de reducción del cáncer.

La histamina proveniente de microorganismos puede tener diferentes efectos en el hospedero, dependiendo de la activación de receptores específicos en tejidos que difieren en sus patrones de expresión. Particularmente, de acuerdo con el CRC, un incremento significativo en la actividad de la histidina descarboxilasa (HDC) fue encontrada en especímenes de tumores humanos extirpados en una serie de diez pacientes quirúrgicos con carcinoma colorrectal, indicando un rol significativo de la actividad de la enzima HDC en el desarrollo de las células tumorales colorrectales (Garcia-Caballero et al., 1988). Por otra parte, ha sido enseñado que la deficiencia de HDC promueve la inflamación asociada con CRC por la acumulación de $CD11b^{+}Gr\text{-}1^{+}$ IMCs (Yang et al., 2011). Con respecto a H2R, la inhibición de H2R mediante su

antagonista incrementó la supervivencia de pacientes con CRC (Adams and Morris, 1994; Kelly et al., 1999).

Los inventores han encontrado que bacterias productoras de histamina, como *L. reuteri* ATCC PTA-6475, protegieron a los ratones macho *Hdc*$^{-/-}$ de una inflamación inducida por dextrano/azoximetano sulfato de sodio (AOM/DSS) asociada con el modelo de cáncer colorrectal, tal como se evidencia en los números y tamaños disminuidos de los tumores de colon analizados por evaluaciones macro y microscópicas del colon y por el escaneo PET ^{18}F-FDG en los animales. Paralelamente, encontramos que la maquinaria enzimática, histidina descarboxilasa, debe estar presente en el microbioma intestinal con el fin de generar histamina como componente bioactivo, tal como se evidencia con la pérdida de efectos anti-tumorigénicos de los mutantes *hdcA*. Los estudios de citoquinas (cantidades de proteína en plasma y cantidades de RNAm en la mucosa del colon) demostraron una reducción en las citoquinas asociadas con inflamación y tumores a través de la administración de las cepas productoras de histamina; dicha reducción no se evidenció al administrar la cepa no productora de histamina, lo cual es consistente con las observaciones fenotípicas.

También fue observado un cambio potencial en la expresión de H2R en el colon de los ratones *Hdc*$^{-/-}$. El tratamiento con AOM y DSS redujo la intensidad de H2R al compararse con los controles saludables; la administración de *L. reuteri* indujo la expresión de H2R. Esta observación sugiere una asociación entre la expresión de H2R y la inflamación o CRC. Cuando los ratones fueron tratados con AOM/DSS para la inducción del cáncer de colon, la expresión de H2R disminuyó. Cuando *L. reuteri* es administrado, la expresión de H2R es inducida. Considerando que la administración del mutante *hdcA* también mostró una expresión incrementada de H2R (no tan alta como la del grupo de *L. reuteri* ATCC PTA-6475) al compararse con los ratones del control positivo que recibieron AOM/DSS pero no bacteria, *L. reuteri* podría producir algunas sustancias en adición a la histamina que pueden inducir H2R.

Un objeto de la presente invención son las bacterias que producen histamina para el tratamiento y prevención de los cánceres dependientes de la histamina, incluyendo el cáncer colorrectal (colon), melanoma, cáncer de seno, cáncer de páncreas y sus similares.

Otro objeto es usar ciertas bacterias para la entrega local de histamina como un antagonista del receptor de histamina, posiblemente entregada junto con una fuente específica de histidina.

En otra realización preferente, las cepas bacterianas seleccionadas son usadas

específicamente para pacientes de sexo masculino que sufren de cáncer, en particular cáncer colorrectal.

En incluso otra realización, las cepas bacterianas seleccionadas son usadas específicamente para pacientes de sexo masculino con tumores de colon o rectales grandes.

En otra forma de realización, las cepas productoras de histamina son usadas como un adyuvante a la radioterapia o quimioterapia clásica.

Otra forma de realización, es un producto que comprende las cepas productoras de histamina para minimizar la diarrea y otras molestias gastrointestinales asociadas con la radioterapia o quimioterapia del cáncer; al mismo tiempo, el producto funciona como un adyuvante para mejorar dicho tratamiento en la reducción de los cánceres dependientes de la histamina.

Otra característica del cáncer colorrectal inducido por AOM/DSS en ratones *Hdc*$^{-/-}$ es la acumulación de CD11b^{+}Gr-1^{+} IMCs en el hígado. Se ha descrito que los CD11b^{+}Gr-1^{+} IMCs tienden a acumularse en gran medida en el bazo de los ratones que tienen cáncer (Watanabe et al., 2008) y deficiencias en la expresión del gen *Hdc* (Yang et al., 2011). Los inventores han descubierto que la administración de bacterias productoras de histamina redujo los CD11b^{+}Gr-1^{+} IMCs, lo cual confirmó que la histamina exógena reguló la diferenciación de CD11b^{+}Gr-1^{+} IMCs.

Basado en dichas investigaciones, nosotros resumimos el mecanismo potencial de la probiosis de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 en el modelo murino de la carcinogénesis asociada a inflamación (Figure 8). La inyección intraperitoneal de AOM seguida por el tratamiento con DSS en agua potable indujo la inflamación asociada con el cáncer de colon tal como se evidenció con los tumores de colon visibles macroscópicamente, con las cantidades incrementadas en colon de KC, IL-22, IL-6, TNF e IL-1α mediante los datos de expresión génica y con las cantidades incrementadas en plasma de IL-6, IL-22 y KC. Cuando los ratones fueron alimentados con una dieta que contenía histidina, la *L. reuteri hdc*$^{+}$ administrada a los ratones por sonda orogástrica convirtió la L-histidina a histamina por medio de la histidina descarboxilasa (HdcA) y exportó la histamina al lumen por medio del anti-portador histidina/histamina (HdcP) (Thomas et al., 2012). La histamina proveniente de *L. reuteri* activó el receptor de histamina H2 (H2R) de las células epiteliales y activó las rutas anti-tumorigénicas; lo anterior fue evidenciado con la supresión de la expresión génica de KC, IL-22, IL-6, TNF e

IL-1α en el colon, y de la producción de IL-6, IL-22 en plasma. Por otra parte, la administración de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 redujo la abundancia relativa de $CD11b^{+}Gr\text{-}1^{+}$ IMCs en el hígado, y la reducción de $CD11b^{+}Gr\text{-}1^{+}$ IMCs también contribuyó a un efecto potencial anti-tumorigénico.

L. reuteri ATCC PTA-6475, y no el Mutante _hdcA_, Atenúa la Carcinogénesis del Colon _in vivo_

Para examinar si la colonización de *L. reuteri ATCC PTA-647* tiene un rol anti-tumorigénico, examinamos el tratamiento de AOM más DSS para inducir colitis asociada con cáncer de colon en ratones $Hdc^{-/-}$ BALB/c de 12 semanas de nacidos (Figura 1A). La severidad de la tumorigénesis en el colon fue evaluada 15 semanas después de la inyección de AOM por el número y tamaño de los tumores en el colon. Para los machos, los ratones del control negativo que recibieron *buffer* fosfato salino (PBS) y agua potable, en vez de AOM y DSS 2%, no desarrollaron tumores. Los ratones del control positivo que fueron enfrentados con AOM/DSS y sondeados con medio MR, pero no recibieron bacterias exógenas, desarrollaron tumores en el colon. La administración de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 en su fase exponencial redujo significativamente el número y tamaño de los tumores en el control al compararse con el grupo del control positivo. Sin embargo, la administración del mutante *hdcA* no mostró dichos efectos (Figura 1B~1C). Para las hembras, un patrón similar fue observado. Los ratones del control negativo no desarrollaron tumores en el colon y los ratones del control positivo produjeron tumores en el colon. La administración de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 redujo significativamente el número de tumores grandes de colon (>3 mm) al compararse con el grupo del control positivo; sin embargo, el número de tumores pequeños (<3 mm) no se redujo. La administración de una cepa mutante de *L. reuteri hdcA* no redujo la cantidad de tumores colorrectales grandes o pequeños (Figura 7).

Los análisis histológicos por coloración H&E de los colon de machos confirmaron el efecto anti-tumorigénico de la cepa silvestre que produce histamina *L. reuteri* ATCC PTA-6475. Los ratones del control negativo mostraron la histología del colon esperada, mientras que los ratones del control positivo mostraron evidencia de múltiples tumores de colon. Los ratones tratados con *L. reuteri* ATCC PTA-6475 produjeron tumores de colon reducidos en tamaño y

número al compararse con el grupo del control positivo; la cepa mutante isogénica *L. reuteri hdcA* no produjo efectos similares (Figura 1D).

El Escaneo por PET Sustenta los Efectos Anti-tumorigénicos de *L. reuteri* ATCC PTA-6475

Para además analizar los posibles efectos anti-tumorigénicos de *L. reuteri* en el modelo de cáncer de colon en ratón inducido por AOM/DSS, el escaneo por PET, una de las herramientas diagnósticas no invasivas más poderosas para trazar la funcionalidad de un órgano, fue aplicada a los ratones antes de ser sacrificados (Figura 2A). [^{18}F]FDG fue usado como marcador y su concentración dentro del cuerpo refleja la distribución de la glucosa y la fosforilación (Brewer et al., 2008). Durante la tumorigénesis del colon, la captura de FDG por parte de linfocitos activados en el colon puede ser detectada por la alta intensidad del marcador. En ratones del control negativo, la señal de FDG fue mayoritariamente detectada en la vejiga y la parte superior del tronco del ratón, áreas que fueron propuestas como sitios “normales” del cuerpo en donde una alta absorción de glucosa y movimiento metabólico ocurre (Galitovskiy et al., 2013). Las cantidades de la señal del marcador FDG fueron evidentes en la región del colon, indicando una baja absorción de glucosa en ratones saludables (Figura 2B~2C). En ratones del control positivo, varios puntos calientes en el colon fueron observados y la intensidad de FDG en el colon entero del ratón incrementó significativamente al compararse con el grupo del control negativo (Figura 2B~2C), indicando la detección de tumores en el colon y una absorción incrementada de glucosa en los colon de ratones que recibieron el tratamiento con AOM más DSS y fueron sondeados con el medio MRS. Los ratones tratados con *L. reuteri* ATCC PTA-6475 mostraron un número reducido de puntos calientes en el colon y las intensidades de FDG disminuyeron significativamente al compararlas con las del control positivo, demostrando los efectos anti-tumorigénicos de *L. reuteri* ATCC PTA-6475. Paralelamente, la cepa mutante isogénica *L. reuteri hdcA* no produjo efectos similares y mostró números aumentados de puntos calientes en el colon, además hubo un incremento significativo en las intensidades de FDG al ser comparadas con las de los ratones tratados con *L. reuteri* ATCC PTA-6475. Dichos resultados indican que la falta de un gen bacteriano intacto de histidina descarboxilasa en el microbioma intestinal resulta en la perdida de efectos anti-tumorigénicos, lo cual es consistente con los números y tamaños observados en el colon.

Las Concentraciones de Citoquinas Sistémicas en el Plasma de Ratón fueron Asociadas con los Efectos Anti-tumorigénicos de *L. reuteri*

Las citoquinas pro-inflamatorias específicas han sido reportadas por contribuir al desarrollo de la tumorigénesis del colon mediante la formación de un microambiente en pro del tumor (Landskron et al., 2014). Aprovechando el sistema Luminex (Millipore, Billerica, MA, USA), fuimos capaces de medir simultáneamente analitos en una única microplaca usando pequeños volúmenes de muestra (25 µl). Los niveles de proteína de dieciséis citoquinas (Tabla 1) en el plasma fueron medidos usando cuatro kits multiplex de citoquina. Interesantemente, encontramos que tres citoquinas que incluyen a KC, IL-22 e IL-6 mostraron un patrón similar (Figura 3): el tratamiento con AOM/DSS en ratones machos *Hdc*$^{-/-}$ incrementó significativamente la producción de dichas citoquinas en plasma al compararse con los ratones del control que recibieron PBS/H2O; la administración de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 disminuyó significativamente la producción de tales citoquinas, mientras que la cepa mutante isogénica *L. reuteri hdcA*, la cual carece de la capacidad de producir histamina, no disminuyó las mencionadas citoquinas en los ratones machos *Hdc*$^{-/-}$ tratados con AOM/DSS.

KC comparte muchas propiedades funcionales con la IL-8 (Oquendo et al., 1989), la cual ha sido reportada como promotora del crecimiento, progreso y metástasis del cáncer de colon (Lee et al., 2012). La IL-22 también ha sido reportada por promover la invasión de células cancerígenas gástricas (Fukui et al., 2014; Ji et al., 2014) y la diferenciación celular en el cáncer de colon (Kryczek et al., 2014). La IL-6 ha sido considerada como un regulador principal del desarrollo del cáncer colorrectal (Waldner et al., 2012), sus altos niveles en plasma se correlacionan con un pronóstico negativo en una variedad de cánceres, incluyendo el cáncer de colon (Nagasaki et al., 2014). Basados en las mencionadas evidencias, los cambios de dichas citoquinas en el plasma en diferentes grupos de ratones se asocian y son consistentes con el fenotipo de la enfermedad: el aumento de las citoquinas es asociado con la inducción del CRC por el enfrentamiento con AOM/DSS al compararse con los ratones saludables, la disminución de las citoquinas se asocia con la atenuación del CRC por la administración de la cepa productora de histamina *L. reuteri* ATCC PTA-6475, y el incremento de las citoquinas se asocia con la pérdida de los efectos anti-tumorigénicos del mutante *hdcA* no productor de histamina.

La Expresión Génica de Citoquinas en la Mucosa del Colon fue Regulada por la Administración de *L. reuteri*.

Para investigar la asociación entre las citoquinas y la severidad del CRC, analizamos la expresión génica de algunas citoquinas (Tabla 2) en muestras de la mucosa del colon por medio de RT-qPCR usando GAPDH como el estándar interno, en adición a las medidas de las cantidades de citoquina sistémica en el plasma. El enfrentamiento con AOM/DSS indujo significativamente la expresión génica de las citoquinas pro-inflamatorias KC, IL-22, IL-6, TNF, e IL-1α al compararse con ratones machos *Hdc*$^{-/-}$ saludables (Figura 4). El tratamiento con *L. reuteri* ATCC PTA-6475 de los ratones enfrentados con AOM/DSS redujo significativamente la expresión génica relativa de dichas citoquinas, mientras que la cepa isogénica mutante *L. reuteri hdcA* que carece de producción de histamina produjo una expresión génica relativa incrementada de tales citoquinas pro-inflamatorias al compararse con los ratones sondeados con la bacteria de tipo silvestre. La detección de otros RNAm de citoquinas por medio de qPCR arrojó o resultados indetectables (IL-17) o resultados sin diferencias significativas entre los grupos (IL-12, IL-23 and IFN-γ).

La Expresión de H2R fue Inducida por la Administración de *L. reuteri*

La administración de la cepa productora de histamina *L. reuteri* ATCC PTA-6475 atenuó el CRC inducido por el tratamiento con AOM/DSS en ratones macho *Hdc*$^{-/-}$ mientras que la cepa mutante no productora de histamina *hdcA* perdió dichos efectos, indicando así el importante rol de la histamina luminal en la atenuación del CRC. Sin embargo, la ruta de señalización por la cual la histamina puede emplear sus propiedades anti-inflamatorias y anti-cancerígenas no es clara. La histamina es una amina biogénica que ejerce varias funciones patofisiológicas a través de cuatro receptores de histamina (H1R, H2R, H3R y H4R) (O'Mahony et al., 2011), y la activación de H2R se ha asociado con propiedades anti-inflamatorias (Frei et al., 2013; Jutel et al., 2001; O'Mahony et al., 2011). Además, nuestros estudios previos mostraron que *L. reuteri* ATCC PTA-6475 atenúa la colitis inducida por TNBS mediante la activación del H2R. Así, en nuestro presente estudio, hemos investigado la expresión relativa de H2R en diferentes grupos de ratones macho *Hdc*$^{-/-}$ por inmunohistoquímica usando anticuerpos específicos contra H2R. La expresión de H2R fue detectada en los colon de ratones macho saludables con intensidades relativamente altas en las criptas (Figura 5A). Interesantemente, el enfrentamiento con

AOM/DSS redujo las intensidades relativas de H2R en el colon al comparar con los controles saludables. Cuando los ratones que fueron enfrentados con AOM/DSS recibieron o *L. reuteri* ATCC PTA-6475 o la cepa mutante isogénica *L. reuteri hdcA*, una expresión incrementada de H2R fue observada al comparar con el grupo control que no recibió ninguna bacteria. La administración de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 produjo la mayor intensidad de H2R, sugiriendo que la activación de H2R puede ser inducida por microorganismos específicos del intestino y que la histamina puede jugar un rol en la atenuación del CRC. La reducción de H2R es asociada con el desarrollo de CRC en los ratones que fueron enfrentados con AOM/DSS, y la inducción de H2R por la administración de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 se asocia con la atenuación del CRC. Debido a que la administración de la mutante *hdcA* también incrementó las intensidades de H2R (aunque no en tanta medida como ocurrió con la cepa silvestre), puede sugerirse que la cepa de *L. reuteri* administrada al ratón puede producir una señal, en adición a la histamina, que induce la expresión de H2R en el colon del ratón.

Sin embargo, cuando la expresión de H2R a nivel de RNAm fue investigada por RT-qPCR en la mucosa del colon, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Figura 5B). Esta observación indica que las diferentes cantidades de H2R en la superficie celular se deben a diferencias post-transcripcionales en la producción de la proteína y localización.

L. reuteri ATCC PTA-6475 Reguló Corriente Abajo la CD11b^{+}Gr-1^{+} IMCs en el Bazo

La ausencia de histamina endógena conllevó al incremento de CD11b^{+}Gr-1^{+} IMCs, la cual ha sido asociada con la progresión del cáncer en mamíferos (Yang et al., 2011). Con el fin de evaluar si la administración de la cepa productora de histamina *L. reuteri* ATCC PTA-6475 afectaba la diferenciación de IMCs, un análisis de citometría de flujo fue llevado a cabo sobre muestras de células provenientes de la médula ósea y bazo colectadas inmediatamente después de que los ratones macho *Hdc*$^{-/-}$ fueran sacrificados. El porcentaje de CD11b^{+}Gr-1^{+} IMCs en el bazo incrementó significativamente en los ratones enfrentados con AOM/DSS al comparar con los controles saludables (Figura 6). La administración de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 en los ratones que previamente fueron enfrentados con AOM/DSS disminuyó significativamente el nivel de CD11b^{+}Gr-1^{+} IMCs al comparar con los ratones de los grupos control que recibieron únicamente medio (MRS). Tales observaciones son consistentes con los resultados fenotípicos en los que *L. reuteri* ATCC PTA-6475 atenuó el CRC inducido por AOM/DSS. Asi, evidenciando

que la administración de la cepa productora de histamina *L. reuteri* ATCC PTA-6475 afecta la diferenciación de IMCs.

L. reuteri ATCC PTA-6475, ATCC PTA-4659 y DSM 32273 Expresan el Gen _dagK_

La cepa silvestre *L. reuteri* ATCC PTA-6475 y la mutante *hdcA* junto con las cepas *L. reuteri* DSM 32273 y *L. reuteri ATCC PTA-4659* fueron capaces de expresar el gen *dagK*. El gen *dagK* fue expresado en niveles muy altos durante la fase de elongación de la bacteria. Otras cepas bacterianas, incluyendo otras cepas de *L. reuteri*, que expresan el gen *dagK* pueden ser detectadas usando los métodos que se describen en el presente documento. El gen *dagK* no se encuentra presente en la cepa *L. reuteri* DSM 17938, la cual tampoco produce histamina.

L. reuteri ATCC PTA-6475 Secreta/Libera DagK

La proteína DagK expresada por el gen *dagK* en *L. reuteri* ATCC PTA-6475 fue encontrada en el sobrenadante del medio de cultivo tras la remoción de las células bacterianas intactas. De acuerdo con lo anterior, *L. reuteri* ATCC PTA-6475 es capaz de producir y secretar, o liberar por otras formas DagK para lograr un efecto extracelular.

DagK es una enzima que cataliza la conversión de diacilglicerol (DAG) a ácido fosfatídico (PA) utilizando adenosín trifosfato (ATP) como fuente de fosfato. En células no estimuladas, la actividad de DagK es baja permitiendo que el DAG sea usado para la biosíntesis de glicerofosfolípidos. Sin embargo, bajo la activación del receptor de la ruta del fosfoinosítido, la actividad de la DagK incrementa conduciendo la conversión del DAG a PA. La conversión de DAG a PA consume DAG, lo cual puede activar la proteína quinasa C (PKC).

La señalización corriente abajo de H1R es interrumpida por la síntesis de DagK en *L. reuteri* mediante la inhibición del lípido DAG envuelto en la señalización. De acuerdo con lo anterior, las cepas productoras de histamina y DagK, tal como se divulgan en la presente invención, suprimen los efectos pro-inflamatorios de la histamina. Lo anterior a su vez permite la activación únicamente de H2R mediante la histamina producida por las cepas bacterianas. La activación de H2R promueve los síntomas anti-inflamatorios.

Así, una cepa bacteriana ácido láctica capaz de producir tanto histamina como DagK causa una supresión de la señalización corriente abajo de H1R pero induce la activación de H2R. Lo anterior, a su vez, suprime los efectos pro-inflamatorios de la histamina y promueve los síntomas

anti-inflamatorios. Las cepas bacterianas con una expresión génica activa de *dagK* pueden producir y opcionalmente secretar, o en otros casos liberar, DagK.

Un aspecto de las realizaciones se relaciona con una cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina para su uso en la profilaxis, inhibición, tratamiento o reducción del riesgo de recaída del cáncer colorrectal.

Las cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina de las realizaciones de la presente divulgación tienen características beneficiosas que pueden ser aprovechadas en pacientes con cáncer, o en pacientes con riesgo a desarrollar cáncer. Lo anterior significa que las cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina de las realizaciones pueden ser usadas para tratar el cáncer en un paciente, y en particular para tratar el cáncer colorrectal en un paciente.

El tratamiento con cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina puede ser combinado con otros tratamientos para el cáncer que incluyen, pero no se limitan a, radioterapia, quimioterapia y cirugía. Las cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina pueden ser usadas como un adyuvante en el tratamiento del cáncer. En consecuencia, otro aspecto de las realizaciones se relaciona con el uso como adyuvante de una cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina en un tratamiento contra el cáncer que se selecciona del grupo que consiste de radioterapia y quimioterapia.

Las cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina de las realizaciones tienen también, en adición a las propiedades para el tratamiento contra el cáncer *per se*, propiedades benéficas para pacientes que se someten a tratamientos contra el cáncer, en particular pacientes sujetos a radioterapia y/o quimioterapia. En particular, las cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina son útiles para combatir o tratar molestias gastrointestinales asociadas con, o causadas por, el tratamiento contra el cáncer. Un aspecto adicional de las realizaciones se liga con una cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina que es usada en la profilaxis, inhibición o tratamiento de una molestia gastrointestinal asociada con un tratamiento de cáncer seleccionado entre un grupo consistente de radioterapia y quimioterapia.

En una realización, la cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina se usa en la profilaxis, inhibición o tratamiento de diarrea asociada con el tratamiento del cáncer. En una realización particular, el tratamiento de cáncer es un tratamiento de cáncer que trata el cáncer colorrectal; es decir, el paciente sujeto al tratamiento de cáncer es un paciente que sufre de cáncer colorrectal.

La administración de las cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina a los pacientes no necesariamente tiene que causar un tratamiento del 100% del cáncer colorrectal en el paciente; es decir, que el paciente resulte sin ningún tumor detectable. Así, las cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina pueden ser usadas para inhibir o reducir el cáncer colorrectal en el paciente. Por ejemplo, los datos experimentales tal como se presentan en el actual documento indican que las cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina son capaces de disminuir el número de tumores y el tamaño de los mismos. En consecuencia, la inhibición o reducción del cáncer colorrectal comprende, en realizaciones, la disminución en el número de tumores en el paciente, la disminución en el tamaño de los tumores de los pacientes o la disminución de los números y tamaños de los tumores. Así, en una forma de realización, la cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina es para ser usada en la reducción de los números y/o tamaños de tumores en pacientes que sufren de cáncer colorrectal.

Las cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina de las realizaciones pueden también, o alternativamente, ser usadas en profilaxis; es decir, para reducir el riesgo en un paciente de desarrollar cáncer colorrectal. El paciente puede, por ejemplo, ser un paciente con una predisposición al cáncer colorrectal, como una predisposición genética o hereditaria al cáncer colorrectal. Las cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina pueden ser administradas a dicho paciente para prevenir o al menos reducir el riesgo del paciente de sufrir de cáncer colorrectal.

Las cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina de las realizaciones también tienen características benéficas para los paciente que ha sufrido de cáncer colorrectal y que han sido tratados para dicho cáncer. Las cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina pueden, por consiguiente, ser usadas para reducir el riesgo de una recaída del cáncer colorrectal.

En una forma de realización, las cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina se usan en la profilaxis, inhibición, tratamiento o reducción del riesgo de recaída del cáncer colorrectal asociado con inflamación.

El paciente es preferentemente un paciente mamífero, y más preferentemente un paciente humano. En una realización particular, el paciente es un paciente humano de sexo masculino. Así, en esta realización, la cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina se usa en la profilaxis, inhibición, tratamiento o reducción del riesgo de recaída del cáncer colorrectal en un paciente de sexo masculino.

En una forma de realización, la cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina comprende un operón de histidina activo. En una realización particular, el operón de histidina comprende, o consiste de, un gen del antiportador histidina/histamina (*hdcP*), un gen de histidina descarboxilasa del tipo piruvoil A (*hdcA*) y un gen de histidina descarboxilasa del tipo piruvoil B (*hdcB*). Así, en una forma de realización la cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina comprende los genes *hdcP*, *hdcA* y *hdcB*.

En una forma de realización, la cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina es capaz de producir una diacilglicerol quinasa (DagK). Los datos experimentales tal como se presentan en el actual documento muestran que puede ser ventajoso el usar una cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina y de DagK en la profilaxis, inhibición o tratamiento del cáncer colorrectal o en la reducción del riesgo de recaída del cáncer colorrectal.

La producción de DagK tiene efectos benéficos en términos de la supresión de la señalización corriente abajo de H1R para suprimir los efectos inflamatorios que la histamina, de otro modo, puede causar. De acuerdo con lo anterior, la producción tanto de histamina como de DagK redirige la acción de activar H1R a activar H2R, el cual promueve los efectos anti-inflamatorios de la histamina.

En una forma de realización, la cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina es una cepa de *Lactobacillus reuteri* productora de histamina. En una realización particular, la cepa de *L. reuteri* productora de histamina es *L. reuteri* ATCC PTA-6475. En otra realización particular, la cepa de *L. reuteri* productora de histamina es *L. reuteri* ATCC PTA-4659. En otra realización particular, la cepa de *L. reuteri* productora de histamina es *L. reuteri* DSM 32273. En incluso otra realización, la cepa de *L. reuteri* productora de histamina es una mezcla de al menos dos cepas de *L. reuteri* capaces de producir histamina y opcionalmente capaces de producir DagK. Por ejemplo, una mezcla de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 y ATCC PTA-4659, una mezcla de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 y DSM 32273, una mezcla de *L. reuteri* ATCC PTA-4659 y DSM 32273 o una mezcla de *L. reuteri* ATCC PTA-6475, ATCC PTA-4659 y DSM 32273 puede ser usada.

En una forma de realización, la cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina es capaz de suprimir la producción de al menos una citoquina asociada con el cáncer, la cual se selecciona del grupo que consiste de quimiocina (motivo C-X-C) ligando 1 (CXCL1), interleucina 22 (IL-22) e interleucina 6 (IL-6). En el arte, el CXCL1 también es denominado el

oncogén GRO1, GROα, KC, la proteína de activación de neutrófilos 3 (NAP-3), la proteína de estimulación del crecimiento del melanoma y alfa (MSGA-α). Las tres citoquinas son conocidas por estar involucradas en el cáncer colorrectal. Por consiguiente, la supresión de la producción de dichas citoquinas tendrá efectos benéficos en términos de la supresión del crecimiento del cáncer de colon, su progreso y metástasis (debido a la supresión de CXCL1), la supresión de la invasión celular de cáncer gástrico, la diferenciación del cáncer de colon (debido a la supresión de la IL-22) y el pronóstico mejorado del cáncer de colon (debido a la supresión de la IL-6). La supresión de la producción de dichas quimiocinas puede ser inducida de varias maneras. Por ejemplo, la transcripción de los genes de las citoquinas puede ser suprimida o reducida mediante cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina. Alternativamente, o complementariamente, la traducción de las moléculas de RNAm de citoquinas puede ser suprimida o reducida mediante cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina. También, o adicionalmente, efectos post-transduccionales pueden estar envueltos en la supresión de la producción de dichas citoquinas. Los datos experimentales que se enseñan en el presente documento indican que cepas bacterianas ácido lácticas productoras de histamina de las realizaciones reducen los niveles de proteína de dichas citoquinas en plasma y reducen la expresión génica relativa de tales citoquinas.

En una forma de realización, la cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina es capaz de reducir la abundancia de células mieloides inmaduras (IMCs) $CD11b^{+}Gr\text{-}1^{+}$ en el bazo. Las $CD11b^{+}Gr\text{-}1^{+}$ IMCs se asocian con el progreso del cáncer en mamíferos. Por consiguiente, reducir la abundancia de dichas $CD11b^{+}Gr\text{-}1^{+}$ IMC, como se muestra en los datos experimentales, tendrá efectos benéficos sobre la supresión del progreso del cáncer.

Un aspecto adicional de las realizaciones se relaciona con un método para seleccionar una cepa bacteriana ácido láctica para ser usada en la profilaxis, inhibición, tratamiento, o reducción del riesgo de recaída del cáncer colorrectal. El método comprende la búsqueda de la bacteria ácido láctica por la presencia de un operón de histidina activo. El método también comprende la selección de una cepa bacteriana ácido láctica para ser usada en la profilaxis, inhibición, tratamiento, o reducción del riesgo de recaída del cáncer colorrectal, donde la cepa bacteriana se identifica como una cepa bacteriana ácido láctica con un operón activo de histidina capaz de producir histamina.

Así, este aspecto de las realizaciones se relaciona con un método que pueda ser usado para seleccionar e identificar cepas bacterianas ácido lácticas deseables para ser usadas en la profilaxis, inhibición, tratamiento, o reducción del riesgo de recaída del cáncer colorrectal. Dichas cepas bacterianas ácido lácticas se identifican como cepas bacterianas ácido lácticas con un operón activo de histidina capaz de producir histamina, tal como se describe en el presente documento.

La presencia de un operón activo de histidina puede ser decida basándose en la presencia de un gen anti-portador de histidina/histamina, un gen de histidina descarboxilasa del tipo piruvoil A (*hdcA*) o un gen de histidina descarboxilasa del tipo piruvoil B (*hdcB*), como por ejemplo la presencia de los genes *hdcP*, the *hdcA* y *hdcB.* Alternativamente, la presencia de un operón de histidina activo puede ser decidida basándose en la detección de la presencia de una proteína de un anti-portador de histidina/histamina, una proteína histidina descarboxilasa piruvoil tipo A y una proteína histidina descarboxilasa piruvoil tipo A, como por ejemplo la presencia de las proteínas HdcP, HdcA y HdcB.

En una forma de realización, la búsqueda de bacterias ácido lácticas comprende la búsqueda de bacterias ácido lácticas con la presencia de un operón de histidina activo y una capacidad adicional de producir una diacilglicerol quinasa (DagK). En esta realización, la selección de una cepa bacteriana ácido láctica comprende la selección de una cepa bacteriana ácido láctica para ser usada en la profilaxis, inhibición, tratamiento, o reducción del riesgo de recaída del cáncer colorrectal, donde dicha cepa bacteriana tiene un operón activo de histidina y es capaz de producir tanto histamina como DagK.

Por lo tanto, en una forma de realización, las bacterias ácido lácticas no solo comprenden el operón de histidina activo para producir histamina sino que también poseen la capacidad de producir DagK. La capacidad de producir DagK puede ser evaluada ya sea por la detección de la presencia de un gen que codifica una diacilglicerol quinasa, como el gen *dagK*, en la bacteria ácido láctica, o por la presencia en su genoma o en un casete de expresión, como un plásmido. Paralelamente, la capacidad de producir DagK puede ser determinada por la presencia de la proteína diacilglicerol quinasa en el citosol de la bacteria, o si la cepa bacteriana es adicionalmente capaz de secretar DagK, en el medio de cultivo en el cual la cepa bacteriana es cultivado

En una forma de realización, el método de la selección de una cepa bacteriana ácido láctica para ser usada en la profilaxis, inhibición, tratamiento, o reducción del riesgo de recaída del cáncer colorrectal, comprende la identificación y selección de una cepa bacteriana ácido láctica diferente de *L. reuteri* ATCC PTA-4659 y ATCC PTA-6475.

Un aspecto adicional de las realizaciones se relaciona con un método de selección de una cepa bacteriana ácido láctica para ser usada en la profilaxis, inhibición, tratamiento, o reducción del riesgo de recaída del cáncer. El método comprende la búsqueda de una bacteria ácido láctica con presencia de un operón activo de histidina y la capacidad de producir diacilglicerol quinasas (DagK). El método también comprende la selección de una cepa bacteriana ácido láctica para ser usada en la profilaxis, inhibición, tratamiento, o reducción del riesgo de recaída del cáncer; donde dicha cepa bacteriana ácido láctica tiene un operón de histidina activo y es capaz de producir histamina y producir DagK.

En este aspecto, la cepa bacteriana ácido láctica seleccionada no necesariamente tiene que ser usada para prevenir, inhibir, tratar o reducir únicamente el riesgo de recaída del cáncer colorrectal. En claro contraste, la capacidad de producir no solo histamina sino también diacilglicerol quinasa será benéfico en otros tipos de cánceres adicionales al cáncer colorrectal, incluyendo el melanoma, el cáncer de seno, el cáncer de páncreas y sus similares.

En una forma de realización, la selección de una cepa bacteriana ácido láctica comprende la selección de una cepa bacteriana ácido láctica para ser usada en la profilaxis, inhibición, tratamiento, o reducción del riesgo de recaída de un cáncer asociado con histamina que se selecciona de un grupo que consiste de cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de seno y cáncer de páncreas; donde dicha cepa bacteriana ácido láctica tiene un operón de histidina activo y es capaz de producir histamina y DagK.

En una forma de realización, el método de seleccionar una cepa bacteriana ácido láctica para ser usada en la profilaxis, inhibición, tratamiento, o reducción del riesgo de recaída de cáncer que comprende la identificación y selección de una cepa bacteriana ácido láctica diferente a *L. reuteri* ATCC PTA-4659 y ATCC PTA-6475.

Otros aspectos de las realizaciones se relacionan con un método de selección de una cepa bacteriana ácido láctica para ser usada en la profilaxis, inhibición o tratamiento de una condición inflamatoria. El método comprende la búsqueda de una bacteria ácido láctica con la presencia de un operón de histidina activo y capacidad de producir histamina y diacilglicerol quinasa DagK.

El método también comprende la selección de una cepa bacteriana ácido láctica para ser usada en la profilaxis, inhibición o tratamiento de una condición inflamatoria, donde dicha cepa bacteriana ácido láctica tiene un operón de histidina activo y es capaz de producir histamina y diacilglicerol quinasa DagK.

Una cepa bacteriana ácido láctica capaz de producir tanto histamina como diacilglicerol quinasa, al ser administrada a un paciente, tendrá efectos benéficos en términos de la prevención, reducción o tratamiento de varias condiciones inflamatorias. La DagK producida suprimirá las propiedades inflamatorias de la histamina mediante la supresión de la ruta de señalización corriente abajo de H1R. Por consiguiente, la histamina puede tener propiedades anti-inflamatorias debido a la activación de H2R.

Pacientes que sufren de cáncer colorrectal muestran una falta en la maduración de los IMC's debido a la deficiencia de histamina. Por consiguiente, puede ser benéfico suplementar a dichos pacientes con histamina EN sus niveles biológicos. Dichas pacientes también muestran una respuesta pro-inflamatoria incrementada, por lo cual darles a ellos la molécula de la histamina podría causarles efectos adversos. Por consiguiente, el mejor acercamiento terapéutico podría proveer una cepa bacteriana benéfica que tenga la habilidad de proveer histamina exógena y de suprimir las respuestas inflamatorias mediante la inhibición de la señalización pro-inflamatoria. Por consiguiente, una cepa bacteriana ácido láctica de las realizaciones capaz de producir tanto histamina como DagK es de gran interés para tratar desórdenes pro-inflamatorios con disfunciones mieloides.

En una forma de realización, la selección de una cepa bacteriana ácido láctica comprende la selección de una cepa bacteriana ácido láctica para ser usada en la profilaxis, inhibición o tratamiento de una condición inflamatoria que se selecciona de un grupo consistente de colitis, enfermedad inflamatoria de los intestinos, síndrome del colon irritable, diverticulosis, gingivitis, mastitis y vaginitis; donde dicha cepa bacteriana ácido láctica tiene un operón de histidina activo y es capaz de producir histamina y DagK.

Así, las anteriores condiciones inflamatorias divulgadas son ilustrativas; sin embargo, existen ejemplos preferentes de condiciones inflamatorias que pueden ser prevenidas, inhibidas o tratadas mediante cepas bacterianas ácido lácticas identificadas y seleccionadas tal como se describe en el presente documento.

En una forma de realización, el método de seleccionar una cepa bacteriana ácido láctica para su uso en la profilaxis, inhibición o tratamiento de una condición inflamatoria comprende la identificación y selección de una cepa bacteriana ácido láctica diferente a *L. reuteri* ATCC PTA-4659 y ATCC PTA-6475.

Otros aspectos de las realizaciones se relacionan con una cepa de *Lactobacillus reuteri* DSM 32273, la cual es una cepa de *L. reuteri* productora de histamina y DagK. La cepa *Lactobacillus reuteri* DSM 32273 fue depositada bajo el Tratado de Budapest en el DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstrasse 7B, D - 38124 Braunschweig) en Marzo 8 de 2016. Esta nueva cepa de *L. reuteri* DSM 32273 puede ser usada como un medicamento. Por ejemplo, *L. reuteri* DSM 32273 puede ser usada en la profilaxis, inhibición, tratamiento o reducción del riesgo de una recaída de cáncer. En una realización particular, el cáncer es un cáncer asociado con histamina que se selecciona del grupo consistente de cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de seno y cáncer de páncreas, preferiblemente cáncer colorrectal. *L. reuteri* DSM 32273 puede ser también usado en la profilaxis, inhibición o tratamiento de una condición inflamatoria. En una realización particular, la condición inflamatoria se selecciona entre un grupo consistente de colitis, enfermedad de los intestinos irritables, síndrome del colon irritable, diverticulosis, gingivitis, mastitis y vaginitis. Usos adicionales de *L. reuteri* DSM 32273 incluyen la mejora de cólicos infantiles, el alivio del eczema, la reducción de episodios de enfermedades laborales y la supresión de la infección de *Helicobacter pylori*.

Las realizaciones también incluyen el uso de una cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina para la manufactura de un medicamento para la profilaxis, inhibición, tratamiento o reducción del riesgo de una recaída de cáncer colorrectal, el uso de una cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina para la manufactura de un adyuvante en un tratamiento contra el cáncer que se selecciona de un grupo consistente de radioterapia y quimioterapia, y el uso de una cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina para la manufactura de un medicamento para la profilaxis, inhibición o tratamiento de una molestia gastrointestinal asociada con un tratamiento contra el cáncer que se selecciona del grupo consistente de radioterapia y quimioterapia. En tales realizaciones, la cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina también es capaz de producir y opcionalmente secretar una diacilglicerol quinasa.

Una realización adicional incluye un método para la profilaxis, inhibición, tratamiento o reducción del riesgo de una recaída de cáncer colorrectal en un sujeto. El método comprende la administración de una cantidad efectiva de una cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina a un paciente. Otra forma de realización se relaciona con un método para la profilaxis, inhibición o tratamiento de una molestia gastrointestinal asociada con un tratamiento de cáncer que se selecciona del grupo consistente de radioterapia y quimioterapia. El método comprende la administración de una cantidad efectiva de una cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina a un paciente sujeto o próximo a ser sujeto a un tratamiento contra el cáncer. La cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina es preferentemente capaz de producir, y opcionalmente secretar, una diacilglicerol quinasa. El paciente es preferentemente un paciente mamífero y más preferentemente un paciente humano, como por ejemplo un paciente humano de sexo masculino.

Un modo de administración y formulación apropiado de las cepas se elige dependiendo del sitio donde la producción local de histamina y, opcionalmente de, DagK sea deseada. Un modo de administración preferido es el oral; sin embargo, los tratamientos tópicos o que correspondan con una administración local en la piel, recto, vagina o intestinos también son apropiados, o los tratamientos con inyecciones intravenosas o intramusculares también serán apropiados.

Las mezclas dietarias que comprenden histidina pueden ser usadas para asegurar la presencia de histidina y, por consiguiente, incrementar la eficacia de la bacteria. La histidina puede ser administrada sola o junto con la bacteria.

Una posibilidad para asegurar el suministro de histidina a la bacteria es comer comida rica en histidina incluyendo, pero no limitándose a, proteína, queso, huevo, pollo y cerdo.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Cepas Bacterianas y Condiciones de Cultivo

L. reuteri ATCC PTA 6475 (depositada bajo el Tratado de Budapest en la ATCC-American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 USA) en Diciembre 21 de 2004) y su mutante *hdcA* fueron usadas para colonizar los ratones tal como se describe previamente (Thomas et al., 2012). Ambas cepas fueron cultivadas a 37°C en medio deMan, Rogosa, Sharpe (Difco, Franklin Lakes, NJ) en una estación anaeróbica (MACS MG-500,

Microbiology International, Frederick, MD) suplementada con una mezcla de 10% CO_2, 10% H_2 y 80% N_2.

Animales

Los ratones *Hdc*$^{-/-}$ BALB/c fueron originalmente provistos por Timothy C. Wang (Columbia University) y re-derivados en el Baylor College of Medicine. Los ratones *Hdc*$^{-/-}$ re-derivados fueron mantenidos bajo condiciones específicas libres de patógenos (SPF) en Texas Children' Hospital. Los ratones fueron mantenidos en jaulas con filtros superiores (5 ratones por jaula) y tenían libre acceso a agua destilada y una dieta PicoLab Rodent 50IF/6F. Todos los experimentos con ratones fueron llevados a cabo en locaciones con SPF y de acuerdo a un protocolo para el manejo de ratones aprobado por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) en Baylor College of Medicine, Houston, TX.

Preparación de la Bacteria y Administración a los Ratones

Las cepas de *L. reuteri* y sus condiciones de cultivo fueron descritas previamente. Las bacterias fueron recolectadas en su fase exponencial (5.5 horas en medio MRS con un OD inicial de OD_{600nm} = 0.03), centrifugadas a 2500 × *g* durante 4 min, y los *pellets* bacterianos fueron re-suspendidos en medio MRS estéril para la alimentación animal. Todas las cepas de *L. reuteri* fueron preparadas frescas antes de ser administradas a los ratones. Cada ratón recibió 5×10^9 UFC en 0.2 mL de MRS, o únicamente MRS como control, por sonda orogástrica. La frecuencia de la administración de bacteria fue una vez por día durante siete días antes de la inyección de AOM y una vez por día durante tres días después de 15 días de pausa tras el ratón haber recibido el DSS.

Inducción de Cáncer de Colon en Ratones Balb/c

A las doce semanas de edad, los ratones de los grupos del control positivo y los tratados con bacteria recibieron una única dosis del genotóxico y carcinógeno del colon AOM (12.5 mg por kg de peso corporal) por inyección intraperitoneal. Dichos ratones fueron enfrentados con dos ciclos de DSS 2% (w/v) en agua potable durante 6 días, con un ciclo inmediatamente después de la inyección con AOM, seguido por un período de recuperación con agua potable por dos semanas antes del segundo ciclo. Los ratones en el grupo del control negativo recibieron una dosis de *buffer* fosfato salino (PBS) y agua potable en vez de AOM.

Evaluación de los Tumores y Preparaciones de los Tejidos

Quince semanas tras la inyección de AOM, los ratones fueron sacrificados y las muestras colectadas tal como sigue. La sangre fue colectada a partir de ratones sedados vía punción cardíaca en tubos de recolección de sangre con K_2EDTA (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ), centrifugada a 17000 × *g* por 10 min a 4°C con el fin de aislar el plasma. El tracto gastrointestinal fue removido cuidadosamente y los contenidos luminales del íleon, ciego y colon fueron colectados y ultra congelados en nitrógeno líquido. Los colon de los ratones fueron escindidos y abiertos longitudinalmente, el número y tamaño de los tumores fue contado y medido ciegamente. La mucosa intestinal fue raspada con una hoja de cuchilla y almacenada en RNALater (Ambion, Austin, TX) para analizar los niveles de expresión de mRNA en el futuro. Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta que fueron analizadas.
Los intestinos de los ratones fueron fijados en 10% de formalina, embebidos con parafina, y seccionados en micrótomos de 5 μm. Los tejidos seccionados fueron usados para estudios de histología e inmunohistoquímica dirigidos a la expresión de H2R usando anticuerpos específicos (Alomone Labs, Jerusalem, Israel and Abcam plc, MA, US). Las muestras de los bazos de los ratones fueron colectadas inmediatamente después del sacrificio de los ratones. Tales muestras fueron empleadas para estudios de citometría de flujo.

Análisis Estadístico

El análisis bioestadístico fue realizado usando el software GraphPad Prism (versión 5) (GraphPad Inc., La Jolla, CA). Para variables numéricas que ajustan con una distribución normal (determinado usando el test Kolmogorov–Smirnov), los datos fueron presentados como medias aritméticas con desviaciones estándar, y diferentes grupos fueron comparados con la prueba *t* test (dos grupos) o ANOVA de una sola vía (más de dos grupos). En el otro caso, los datos fueron presentados como diagramas de caja y bigotes, mostrando los valores medios y los percentiles décimo y noventavo, o diagramas de dispersión mostrando los valores medios. Grupos diferentes fueron comparados con las pruebas no paramétricas Mann-Whitney U test (dos grupos) o Kruskal-Wallis. Las diferencias entre grupos fueron consideradas significativas cuando $*P < 0.05$, $**P<0.01$, $***p<0.001$.

EJEMPLO 2

Preparaciones tal como se describen en el Ejemplo 1.

Análisis de Citometría de Flujo

Células derivadas de la médula ósea a partir de fémures y tibia de los ratones de cada grupo fueron inmediatamente lavadas con agua con hielo DMEM (ATCC, cat. 30-2002) conteniendo 10% de FBS. Este procedimiento fue seguido por la adición de *buffer* de lisis de glóbulos rojos para reducirlos (BD Biosciences). Los bazos fueron removidos y almacenados en agua con hielo DMEM (ATCC, cat. 30-2002) con 10% de FBS. Este paso fue seguido por el aislamiento de las células del bazo usando láminas de vidrio estériles y la adición del *buffer* de lisis de glóbulos rojos a las células aisladas. Suspensiones de células únicas fueron hechas mediante la filtración de las células a través de filtros de 40-µm. Para el análisis de citometría de flujo, las suspensiones de células únicas fueron teñidas con anticuerpos [1 µl de APC-Cy7-conjugado anti-Gr-1 (BD Pharmingen, cat. 557661) y 5 µl de FITC-conjugado anti-CD11b (BD Pharmingen, cat. 557396)] durante 30 min en hielo y en oscuridad, y fueron evaluadas por citometría de flujo multicolor usando un analizador de células BD FACSCanto. Los datos fueron colectados con el software FACSDiva (BD Biosciences). Los datos acumulados fueron analizados con el software FlowJo V10 (FlowJo, LLC).

EJEMPLO 3

Preparaciones tal como se describen en el Ejemplo 1.

Medida de Citoquinas por Inmunoensayo Multiplex en Plasma de Ratón

Las concentraciones de IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, KC, TNF, IL-21, IL-22 y IL-23 murinas en plasma fueron medidas usando kits de citoquinas múltiples (Millipore, Billerica, MA, USA), ver Tabla 1. La cuantificación de las citoquinas fue realizada usando el sistema Luminex (Austin, TX, USA) de acuerdo a las instrucciones del manufacturero. En breve, 25 µl de las muestras de plasma colectadas previamente de cada ratón fueron descongeladas completamente y diluidas con la misma cantidad del Assay Buffer provisto en los kits. Los ensayos fueron realizados ciegamente por duplicado. Los reportes generados automáticamente por el software MILLIPLEX® Analyst 5.1 Software fueron revisados, y únicamente las citoquinas que estaban por encima del valor límite de detección y por debajo del valor de saturación fueron tenidas en cuenta.

Tabla 1. Citoquinas medidas en los Cuatro Kits Multiplex por el Ensayo Luminex.

Número de Catálogo	Citoquinas Medidas por el Kit
MCYTOMAG-70K-12	IFN-g, IL-1a, IL-1b, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 (P40), IL-12 (P70), IL-13, IL-17A, KC, TNF-a
MCYP2MAG-73K-02	IL-21, IL-22
MCYP3MAG-74K-01	IL-23
MAGPMAG-24K-01	EGF

EJEMPLO 4

Preparaciones tal como se describen en el Ejemplo 1.

Niveles de RNAm de Citoquinas y Receptores de Histamina en la Mucosa del Colon

Para cuantificar los niveles de expresión relativos de RNAm del interferon (IFN)-γ, del factor de necrosis tumoral (TNF), de las interleuquinas (IL)-6, IL-12, IL-23, IL-17, IL-18, Il-22, IL-4, KC y del receptor de histamina H2 (H2R), se extrajo ARN de las muestras de mucosa del colon usando el mini kit miRNeasy® (Qiagen, Hilden). Un µg de ARN fue reverso-transcrito a cADN de simple cadena usando el Kit RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher Scientific, USA). Una PCR Reverso-Transcrita en Tiempo Real (RT) fue realizada usando el Sistema de PCR en Tiempo Real (Stratagene). La mezcla de reacción de la RT-PCR (ajustada con agua a un volumen total de 25 µl) contenía1 µl de ADN templado, 12.5 µl del *máster mix* Power SYBR Green PCR (ABI, Life Tech) y 0.5 µl de los *primers* respectivos (10 µM cada uno). Los *primers forward* y *reverse* usados para la cuantificación de los IFN-γ, IL-12, IL-17, TNF-α, IL-6, IL-23, IL-18 y IL-4 fueron descritos previamente (Ganesh et al., 2012) y los *primers* para los otros genes son mostrados en la Tabla 2. Los niveles de expresión relativos del RNAm del gen de interés o target (Proporción = $[(E_{target})^{dCPtarget\ (Control-Muestra)}] / [(E_{ref.})^{dCPref.\ (Control-Muestra)}]$) fueron normalizados al gen *housekeeping*, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), y usados como una referencia. Posteriormente, los valores de expresión génica de las citoquinas de la mucosa intestinal y de H2R del grupo control fueron fijados a 1.0 y usados como calibradores para identificar la diferencia en veces del RNAm relativo entre el grupo del control negativo (MRS/PBS-H2O), el grupo del control positivo (MRS/AOM-DSS), el grupo tratado con

L. reuteri ATCC PTA-6475 (*L. reuteri* 6475/AOM-DSS) y el grupo tratado con la mutante isogénica *L. reuteri hdcA* (*hdcA* mutante/AOM-DSS).

Tabla 2. *Primers* and y Sondas Usadas Para los Estudios de Expresión Génica.

Gen del Ratón	*Primers (5'-3')*		SEQ ID NO:	
	Forward	*Reverse*	*Forward*	*Reverse*
IL-1α	cagagagggagtcaactcattg	gtttctggcaactccttcagc	1	2
KC	Gactccagccacactccaac	tgacagcgcagctcattg	3	4
IL-22	Tgacgaccagaacatccaga	aatcgccttgatctctccac	5	6
IL-10	Cagagccacatgctcctaga	tgtccagctggtcctttgtt	7	8
SPDEF	Cctcctggtccctgaggt	cagtgaatgtggccctgac	9	10
H2R	Taagcgacccggtacagc	tcgatggcttaaggtacaacac	11	12
GAPDH	gccaaaagggtcatcatctc	cacacccatcacaaacatgg	13	14

EJEMPLO 5

Preparaciones tal como se describen en el Ejemplo 1.

Escaneo por PET de los Ratones Vivos

El escaneo por PET/CT fue realizado 15 semanas después de la inyección de AOM, justo antes de sacrificar los ratones, tal como es descrito previamente (Brewer et al., 2008) con modificaciones menores. En resumen, los ratones fueron anestesiados con isoflurano y recibieron 200 µL de Ci ^{18}F-FDG por inyección intraperitoneal (IP). Una hora después, dichos ratones recibieron 200 µL de MD-Gastroview rectalmente mediante un catéter 3.5F inmediatamente previo a la iniciación del escaneo. Una tomografía computarizada (CT) fue realizada durante 10 min y posterior a ella se realizó un escaneo PET por 20 min usando el Sistema Inveon PET/CT Multimodality System (Siemens, Germany). Los ratones fueron mantenidos bajo sedación durante el proceso de escaneo mediante inhalación constante de isoflurano. Las imágenes fueron almacenadas y los valores estandarizados de absorción (SUVs) de FDG fueron analizados a ciegas usando el software Inveon Research Workplace (Siemens, Germany). Las imágenes 2D de los ratones fueron generadas a través del software OsiriX Imaging software (Pixmeo, Swiss).

EJEMPLO 6

Cuantificación de la Expresión Génica de *dagK* por qRT-PCR

La cepa silvestre L*actobacillus reuteri* ATCC PTA-6475, el mutante *hdcA L. reuteri* 6475, la cepa silvestre *L. reuteri* ATCC PTA-4659 (depositada bajo el tratado de Budapest en la ATCC-American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 USA) en Septiembre 11 de 2002) y la cepa silvestre *L. reuteri* DSM 17938 (depositada bajo el tratado de Budapest en el DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroeder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) en Enero 30 de 2006) fueron crecidas en medio MRS durante la noche a 37°C y fueron cultivadas bajo condiciones anóxicas estrictas N_2 / CO_2 (80/20; v/v) en la fase gaseosa. 100 µl de cultivo fresco fueron incubados en 10 mL de medio 4 definido para Lactobacillus (LDM4). Los cultivos fueron mantenidos en mini bioreactores a 37°C bajo condiciones anóxicas estrictas. Las muestras fueron colectadas a las 3, 6, 24 y 48 horas. El *pellet* bacteriano fue obtenido al tratar los cultivos con 6000 × *g* por 10 min a 4°C. El *pellet* fue tratado con RNasa. El RNAm de las células bacterianas fue extraído con el kit de separación con Trizol. 500 ng de RNAm de cada grupo fueron usados para convertirlos en a cADN. El ADNc tratado fue diluido 1:2 y fue usado para correr la qRT-PCR. La qRT-PCR Stratagene Mx3000p (Agilent Technologies GmbH, USA) fue usada para la amplificación y la recolección de datos fluorescentes. El *master mix* consistió en 12.5 µl de Power SYBR Green 2000 (ABI systems, USA), 0.5 µl de cada *primer* (10 µM) y 1 µl de muestra, ajustándolo con agua a un volumen final de 25 µl por pozo. Después de la amplificación por PCR, la especificidad de los *primers* fue revisada inspeccionando la curva de fusión (*melting curve*) y determinando el tamaño del amplicón por electroforesis en gel de agarosa (1%). Los niveles de expresión relativos del RNAm del gen target (Proporción = $[(E_{target})^{dCPtarget\ (control-muestra)}]$ / $[(E_{ref.})^{dCPref.\ (control-muestra)}]$) fueron normalizados al gen *housekeeping rpoB* y usados como una referencia. Posteriormente, el RNAm obtenido a las 3 horas del cultivo de cada bacteria fue fijado en 1.0 y usado como el calibrador para identificar la diferencia del RNAm relativo de la misma bacteria en diferentes puntos de tiempo, como a las 6, 24 y 48 horas de los cultivos de *L. reuteri* ATCC PTA-6475, ATCC PTA-4659 y DSM 17938.

La Figura 9 ilustra los resultados de los experimentos de expresión génica de *dagK*. La figura muestra una expresión incrementada de *dagK* tanto en la cepa silvestre como en la mutante *hdcA* de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 junto con *L. reuteri* ATCC PTA-4659. Sin embargo, *L. reuteri* DSM 17938, la cual no puede producir histamina también carece de la

capacidad de expresar *dagK*. Notablemente, la expresión de mRNA de *dagK* fue muy alta durante la fase de elongación de la bacteria. A partir de la repetición de los experimentos, el tiempo de incubación de 12 horas fue seleccionado al mostrar una expresión similar a la de las 6 horas.

EJEMPLO 7

Uso de LC-MS/MS para Detectar la Proteína DagK en los Sobrenadantes de los Cultivos Bacterianos

De acuerdo a la literatura, se presume que DagK tiene isoformas solubles en las bacterias gram positivas. Nosotros sugerimos que DagK al ser liberada por *L. reuteri* ATCC PTA-6475 interactúa en la señalización lipídica intestinal del huésped promoviendo un comportamiento anti-inflamatorio bajo circunstancias inflamatorias y la liberación de histamina. Cuando mutamos el gen *dagK* en *L. reuteri* ATCC PTA-6475 y colonizamos nuestros ratones libres de gérmenes (GF) con el mutante DAGK de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 no observamos una supresión de la IL-6 y IL-1α como sí se evidenció en los ratones libres de gérmenes colonizados con la cepa silvestre de *L. reuteri* ATCC PTA-6475. Los niveles basales de citoquinas pro-inflamatorias fueron significativamente suprimidos. Lo anterior nos llevó a la conclusión de que *L. reuteri* ATCC PTA-6475 necesita de histamina para la activación de H1R y H2R. Sin embargo, la señalización corriente abajo de H1R es interrumpida por la síntesis de DagK en *L. reuteri* al inhibir al lípido DAG involucrado en la señalización y por consiguiente suprimiendo el efecto pro-inflamatorio de la histamina. Lo anterior conlleva a que únicamente la activación de H2R por la histamina proveniente de *L. reuteri* se conozca por promover los síntomas anti-inflamatorios.

Para que dagK muestre cualquier efecto positivo sobre la respuesta inmune del huésped, el lípido DAG del huésped debe ser expresado. Para que DAG sea activado, la señalización de H1R debe ser activada. Esa es la razón por la cual cuando mutamos el *dagK* en *L. reuteri* y colonizamos los ratones no evidenciamos ninguna supresión de las citoquinas pro-inflamatorias. Lo anterior fue adicionalmente confirmado con la activación de PKC y PKA. En adición, no evidenciamos ninguna diferencia en la expresión de H1R y H2R en los tejidos (f-IHC) entre los grupos colonizados con la cepa silvestre de *L. reuteri* o con la mutante *hdcA* o con las cepas

mutantes *dagK*, debido a que los ratones libres de gérmenes también expresan histamina endógena.

Cuando los ratones *knock out* de HDC recibieron la cepa mutante de *L. reuteri hdcA*, ellos no se pudieron proteger de la inflamación y del cáncer porque a ellos les hacía falta tanto la histamina exógena como endógena. En los ratones libres de gérmenes colonizados con el mutante de *L. reuteri hdcA*, la histamina endógena al estar presente logró activar el receptor. Sin embargo, la DagK producida por el mutante de *L. reuteri hdcA* ayudó a suprimir la expresión de la activación de H1R. La anterior es la razón por la cual evidenciamos biomarcadores pro-inflamatorios suprimidos en los grupos colonizados por los mutantes *hdcA*. Cuando el gen *dagK* fue mutado (*knock out*) en *L. reuteri* (mutante *dagK*) hubo una activación de histamina endógena y exógena que activó tanto H1R y H2R pero no hubo DagK para suprimir el H1R. Por consiguiente, evidenciamos una señalización pro-inflamatoria incrementada similar a la de los ratones libres de gérmenes sin ninguna bacteria. En los ratones libres de gérmenes la histamina endógena activa tanto H1R como H2R.

Datos experimentales mostraron que los niveles basales inmunes fueron detenidos después de la colonización del ratón con la cepa silvestre *L. reuteri* ATCC PTA-6475, la cual por sí misma es un completo supresor inmune, en pacientes con una respuesta inmune agresiva esta bacteria puede ser un gran agente terapéutico.

Para además demostrar si las isoformas de DagK son secretadas o no por *L. reuteri* nosotros realizamos un experimento con un cultivo bacteriano. 100 µl de *L. reuteri* ATCC PTA-6475 crecidos en MRS durante toda la noche a 37°C bajo condiciones anóxicas fueron añadidos a 10 ml de medio LDM4 y dejados a 37°C por 12 horas bajo condiciones anóxicas. Las células bacterianas fueron removidas por centrifugación a 6000 × *g*, 10 min a 4°C. En una proporción de 1:1 proteinasa e inhibidor de la proteína quinasa fueron añadidas al sobrenadante. Los sobrenadantes fueron filtrados en filtros de 0.22 µm para remover trazas de la bacteria. Como DagK es una proteína de 10-13 kDa, es necesario reducir el ruido de la muestra. Por consiguiente, el sobrenadante fue procesado con un filtrado de 50 kDa. El flujo fue añadido al filtrado de 3 kDa y centrifugado a 5000 × g por 30 min. El concentrado de la fase superior fue usado para correr el LC-MS/MS después de la digestión con tripsina. La Figura 10 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína DagK de la cepa *L. reuteri* ATCC PTA-6475 junto con los sitios de digestión con tripsina o clivaje (Tryps).

Los resultados del experimento con el LC-MS/MS son presentados en la Tabla 3 y en la Figura 10. Las secuencias que corresponden con la proteína DagK de *L. reuteri* fueron encontradas en el sobrenadante. Por consiguiente, *L. reuteri* ATCC PTA-6475 es capaz de producir y secretar la proteína DagK.

Tabla 3. Resultados de la LC-MS/MS del Tratamiento con Tripsina del Sobrenadante de *L. reuteri* ATCC PTA-6475

Péptido	-10lgP	Masa	Longitud	ppm	m/z	RT	Escaneo	#Spec
A	18.31	833.3813	6	-6.4	417.6953	58.33	139	3
B	14.72	971.5287	11	-62.2	486.7414	63.33	432	1
C	9.09	884.4352	7	35	443.2404	72.68	1088	1
D	8.83	1487.774	13	-64.8	744.8461	52.15	42	1
E	7.94	996.4447	7	30.9	499.245	64.98	549	1
F	5.73	2710.64	27	-79.9	678.6131	86.5	1394	1

Péptidos A-F en la Tabla 3:

A	EERNMR	SEQ ID NO: 15
B	DVAAGGVLISA	SEQ ID NO: 16
C	DKHQTEK	SEQ ID NO: 17
D	NMRYHLLAACLAI	SEQ ID NO: 18
E	EERNMRY	SEQ ID NO: 19
F	KAKDVAAGGVLISAIFSVLVGLIIFIP	SEQ ID NO: 20

EJEMPLO 8

Identificación De Cepas Capaces de Producir DagK

La bacteria fue cultivada en placas de agar MRS por 16 h a 37°C en una atmósfera de anaerobiosis. Las colonias bacterianas fueron recolectadas con un anillo plástico estéril y suspendidas en 100 µl de agua estéril (calidad PCR). El ADN puede ser extraído de un cultivo bacteriano usando cualquier método apropiado, por ejemplo ver el Ejemplo 6.

La presencia del gen *dagK* fue examinada mediante PCR, por ejemplo, usando las perlas PuReTaq Ready To Go PCR (GE HealthCare) y el par de *primers* dagK_LrF

(TGGACTCACGCGATAAACATCA, SEQ ID NO: 21) y dagK_LrR (ACAATCAAATCTGTAACAGCTTCG, SEQ ID NO: 22), 0.4 mM de cada uno. La suspension bacteriana o la preparación de ADN (0.5 µl) fue añadida a la mezcla de PCR y la reacción de PCR fue accionada mediante el programa 95°C, 5 min; 30× (95°C, 30 s; 58°C, 30 s; 72°C, 30 s); 72°, 10 min. Los productos de PCR fueron separados y visualizados usando una electroforesis estándar con gel de agarosa y determinados usando secuenciación de Sanger usando el primer forward (dagK_LrF) empleado para la PCR.

EJEMPLO 9

Análisis de la Capacidad de *Lactobacillus reuteri* DSM 32273 para producir Histamina and DagK

La bacteria *Lactobacillus reuteri* DSM 32273 (depositada bajo el Tratado de Budapest en el DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstrasse 7B, D - 38124 Braunschweig) en Marzo 8 de 2016) fue crecida durante la noche en caldo MRS a 37°C. Las suspensiones bacterianas fueron centrifugadas a 3500 rpm por 5 min y 1 µl del *pellet* fue suspendido en 100 µl de PBS.

El análisis por PCR (histidina descarboxilasa (*hdc*)) fue realizado con los siguientes *primers*: hdcA425fde (CGTCAYTATCCWGCTCCWGG, SEQ ID NO: 23) y hdcA867rde (TCCATRTCAGTATCWGGKGT, SEQ ID NO: 24). El producto de PCR resultante tuvo un tamaño de 442 bp. Los *primers* de la PCR fueron diseñados a partir del alineamiento del gen *hdc* de *L. reuteri*, *L. hilgardii*, *L. buchneri* y *L. sakei*. El DreamTaq Green PCR Mastermix (2X Thermo Scientific, article number K1081) fue usado para las reacciones de PCR. Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo a lo siguiente:

Master mix con *primers*	Volumen por Reacción
Agua (Calidad PCR quality)	10.0 µl
Primer, forw. (10 pmol/µl)	1.0 µl
Primer, rev. (10 pmol/µl)	1.0 µl
DreamTaq	12.5 µl

24.5 µl del *master mix* fue mezclado con 0.5 µl de la suspensión bacteriana, el siguiente programa de PCR fue corrido: 95°C, 10 min; 30× (95°C, 30 s; 48°C, 30 s; 72°C, 30 s); 72°C, 5 min.

El análisis de la PCR del gen *dagK* en *L. reuteri* DSM 32273 fue hecho tal como se describe en el Ejemplo 8.

Los resultados mostraron que *L. reuteri* DSM 32273 fue positiva tanto para el gen que codifica la histidina descarboxilasa como para el gen *dagK*, ver Tabla 4. Las cepas bacterianas *L. reuteri* ATCC PTA-6475 y DSM 17938 fueron incluidas como controles.

Tabla 4. Resultados del Análisis de PCR mostrando las Especies, Cepas y Huésped Originario de las Bacterias Analizadas.

Especies	Cepa	Huésped originario	Presencia del gen *hdc*	Presencia del gen *dagK*
L. reuteri	ATCC PTA-6475	Human	+	+
	DSM 17938	Human	-	-
	DSM 32273	Human	+	+

Las realizaciones descritas anteriormente pretenden ser ejemplos ilustrativos de la presente invención. Es entendido por aquellos con experticia en la materia que varias modificaciones, combinaciones y cambios pueden ser hechos a las realizaciones sin que por esto se aparten del alcance de la presente invención. En particular, diferentes soluciones de diferentes realizaciones pueden ser combinadas en otras configuraciones, donde sea técnicamente posible. El alcance de la invención es, sin embargo, definido por las reivindicaciones anexas.

REFERENCIAS

Adams, W.J., and Morris, D.L. (1994). Short-course cimetidine and survival with colorectal cancer. Lancet *344*, 1768-1769.

Brewer, S., McPherson, M., Fujiwara, D., Turovskaya, O., Ziring, D., Chen, L., Takedatsu, H., Targan, S.R., Wei, B., and Braun, J. (2008). Molecular imaging of murine intestinal inflammation with 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose and positron emission tomography. Gastroenterology *135*, 744-755.

Frei, R., Ferstl, R., Konieczna, P., Ziegler, M., Simon, T., Rugeles, T.M., Mailand, S., Watanabe, T., Lauener, R., Akdis, C.A., *et al.* (2013). Histamine receptor 2 modifies dendritic

cell responses to microbial ligands. The Journal of allergy and clinical immunology *132*, 194-204.

Fukui, H., Zhang, X., Sun, C., Hara, K., Kikuchi, S., Yamasaki, T., Kondo, T., Tomita, T., Oshima, T., Watari, J., *et al.* (2014). IL-22 produced by cancer-associated fibroblasts promotes gastric cancer cell invasion via STAT3 and ERK signaling. British journal of cancer *111*, 763-771.

Galitovskiy, V., Kuruvilla, S., Sevriokov, E., Corches, A., Pan, M., Kalantari-Dehaghi, M., Chernyavsky, A., Mukherjee, J., and Grando, S. (2013). Development of novel approach to diagnostic imaging of lung cancer with 18F-Nifene PET/CT using A/J Mice treated with NNK. J Cancer Res Ther *1*, 128-137.

Ganesh, B.P., Richter, J.F., Blaut, M., and Loh, G. (2012). Enterococcus faecium NCIMB 10415 does not protect interleukin-10 knock-out mice from chronic gut inflammation. Beneficial microbes *3*, 43-50.

Garcia-Caballero, M., Neugebauer, E., Campos, R., Nunez de Castro, I., and Vara-Thorbeck, C. (1988). Increased histidine decarboxylase (HDC) activity in human colorectal cancer: results of a study on ten patients. Agents Actions *23*, 357-360.

Ji, Y., Yang, X., Li, J., Lu, Z., Li, X., Yu, J., and Li, N. (2014). IL-22 promotes the migration and invasion of gastric cancer cells via IL-22R1/AKT/MMP-9 signaling. International journal of clinical and experimental pathology *7*, 3694-3703.

Jutel, M., Watanabe, T., Klunker, S., Akdis, M., Thomet, O.A., Malolepszy, J., Zak-Nejmark, T., Koga, R., Kobayashi, T., Blaser, K., *et al.* (2001). Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. Nature *413*, 420-425.

Kelly, M.D., King, J., Cherian, M., Dwerryhouse, S.J., Finlay, I.G., Adams, W.J., King, D.W., Lubowski, D.Z., and Morris, D.L. (1999). Randomized trial of preoperative cimetidine in patients with colorectal carcinoma with quantitative assessment of tumor-associated lymphocytes. Cancer *85*, 1658-1663.

Kryczek, I., Lin, Y., Nagarsheth, N., Peng, D., Zhao, L., Zhao, E., Vatan, L., Szeliga, W., Dou, Y., Owens, S., *et al.* (2014). IL-22(+)CD4(+) T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L. Immunity *40*, 772-784.

Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., and Hermoso, M.A. (2014). Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. Journal of immunology research *2014*, 149185.

Lee, Y.S., Choi, I., Ning, Y., Kim, N.Y., Khatchadourian, V., Yang, D., Chung, H.K., Choi, D., LaBonte, M.J., Ladner, R.D., *et al.* (2012). Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in the tumour microenvironment promote colon cancer growth, progression and metastasis. British journal of cancer *106*, 1833-1841.

Nagasaki, T., Hara, M., Nakanishi, H., Takahashi, H., Sato, M., and Takeyama, H. (2014). Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. British journal of cancer *110*, 469-478.

O'Mahony, L., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2011). Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. The Journal of allergy and clinical immunology *128*, 1153-1162.

Oquendo, P., Alberta, J., Wen, D.Z., Graycar, J.L., Derynck, R., and Stiles, C.D. (1989). The platelet-derived growth factor-inducible KC gene encodes a secretory protein related to platelet alpha-granule proteins. The Journal of biological chemistry *264*, 4133-4137.

Thomas, C.M., Hong, T., van Pijkeren, J.P., Hemarajata, P., Trinh, D.V., Hu, W., Britton, R.A., Kalkum, M., and Versalovic, J. (2012). Histamine derived from probiotic Lactobacillus reuteri suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling. PLoS One *7*, e31951.

Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J.R., and Dutilh, B.E. (2012). A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. Nature reviews Microbiology *10*, 575-582.

Waldner, M.J., Foersch, S., and Neurath, M.F. (2012). Interleukin-6--a key regulator of colorectal cancer development. International journal of biological sciences *8*, 1248-1253.

Watanabe, S., Deguchi, K., Zheng, R., Tamai, H., Wang, L.X., Cohen, P.A., and Shu, S. (2008). Tumor-induced CD11b+Gr-1+ myeloid cells suppress T cell sensitization in tumor-draining lymph nodes. Journal of immunology *181*, 3291-3300.

Yang, X.D., Ai, W., Asfaha, S., Bhagat, G., Friedman, R.A., Jin, G., Park, H., Shykind, B., Diacovo, T.G., Falus, A., *et al.* (2011). Histamine deficiency promotes inflammation-associated

carcinogenesis through reduced myeloid maturation and accumulation of CD11b+Ly6G+ immature myeloid cells. Nature medicine *17*, 87-95.

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

La invención del presente documento divulga cepas bacterianas productoras de histamina para ser usadas en la profilaxis, inhibición, tratamiento o reducción del riesgo de recaída de cáncer, incluyendo el cáncer colorrectal. La presente invención también divulga el uso de cepas bacterianas productoras de histamina para la manufactura de un medicamento para el tratamiento del cáncer, incluyendo el cáncer colorrectal en hombres.