



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Xochimilco
Departamento de sistemas biológicos-laboratorio de biotecnología

Protocolo de investigación para acreditación de servicio social
Determinación de la actividad antioxidante y sal biliar
hidrolasa de *Lactobacillus* aislados del tracto gastrointestinal

Presenta

César Gabriel Moreno Castro

Matricula: 2182028031

Asesor interno: Ana Laura Esquivel Campos

No. económico: 33148

Asesor externo: Raquel González Vázquez

No. de cédula: 09165459

ABRIL 2024

Índice

Resumen.....	3
Introducción.....	4
Marco teórico	5
Interacción microbiota-huésped	5
Alteraciones de la Microbiota y sus Consecuencias.....	5
Disbiosis y Enfermedades Asociadas	6
Generalidades de los <i>Lactobacillus</i>	6
Casos clínicos y antecedentes.....	7
Bilis, sales y ácidos biliares.....	8
Objetivo general	10
Objetivos específicos.....	10
Metodología	10
Preparación del stock	10
Cuenta en placa.....	11
Cuantificación de la actividad BSH	11
Ensayo de actividad antioxidante DPPH	12
Radical hidroxilo	12
Superóxido	12
Resultados	13
Cuantificación de la actividad SBH	13
Ensayo de actividad antioxidante DPPH.....	14
Inhibición de radical hidroxilo	16
Superóxido	17
Discusión.....	18
Conclusión	20
Referencias.....	21

Resumen

Bacterias del género *Lactobacillus* han sido ampliamente investigadas debido a su interacción beneficiosa microorganismo-huésped con el ser humano, son parte de la microbiota natural del ser humano con amplios beneficios a la salud. (Moreno del Castillo y cols., 2018). El presente modelo experimental tiene como objetivo determinar la actividad sal biliar hidrolasa (SBH), así como la actividad antioxidante en las cepas problema *L. ramnosus* LBUX2301 y *L. ramnosus* LBUX02 teniendo como control del modelo el *Lactobacillus casei* JC57. Se observó que todas las cepas probióticas demostraron un crecimiento viable en presencia de sales biliares, siendo *L. ramnosus* LBUX02 el que mostró un mejor desempeño en condiciones con sales biliares primarias. Estos hallazgos sugieren que la toxicidad de las sales biliares, especialmente las secundarias, y su distribución a lo largo del tracto gastrointestinal influyen en la capacidad de colonización de las cepas probióticas. Además, todas las cepas mostraron actividad antioxidante, destacando la eficacia de *L. ramnosus* LBUX2301 en la inhibición de radicales hidroxilos y superóxidos. Estos resultados subrayan la importancia de seleccionar cepas con diversas capacidades probióticas para el desarrollo de productos efectivos en la promoción de la salud intestinal.

Introducción

La microbiota intestinal, compuesta por una vasta comunidad de microorganismos, juega un papel crucial en la salud y enfermedad del ser humano. Esta compleja red de interacciones entre bacterias y el huésped humano no solo contribuye a la digestión y metabolismo de nutrientes, sino que también desempeña un papel fundamental en la modulación del sistema inmunológico, la protección contra patógenos invasivos y la producción de metabolitos bioactivos. Sin embargo, diversos factores como la dieta, el uso de antibióticos, el estrés y las enfermedades pueden alterar el equilibrio dinámico del microbiota, dando lugar a estados de disbiosis que pueden tener consecuencias significativas para la salud humana (Icaza-Chávez, 2013).

La disbiosis intestinal se ha relacionado con una amplia variedad de enfermedades y trastornos, incluyendo enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias intestinales, cáncer colorrectal, obesidad, síndrome metabólico y riesgo cardiovascular. En este contexto, los *Lactobacillus*, como uno de los géneros bacterianos más prominentes del ecosistema gastrointestinal, han emergido como microorganismos de gran importancia debido a sus potenciales aplicaciones terapéuticas en la restauración del equilibrio de la microbiota intestinal y la prevención o tratamiento de diversas afecciones gastrointestinales (Chang, 2023).

Además, las sales biliares, compuestas principalmente por ácidos biliares, desempeñan un papel crucial en la digestión, absorción y transporte de lípidos en el sistema gastrointestinal. Su interacción con la microbiota intestinal y su capacidad para influir en el crecimiento y la actividad de ciertas bacterias, como los *Lactobacillus*, pueden tener implicaciones importantes para la salud humana, incluida la regulación del colesterol plasmático. (Álvarez y cols., 2021)

El presente estudio tiene como objetivo caracterizar el potencial probiótico de *Lactobacillus* aislados del tracto gastrointestinal, evaluando su capacidad antioxidante y su actividad sal biliar hidrolasa. Se busca contribuir al entendimiento de la importancia fundamental de los *Lactobacillus* en la salud humana y explorar su potencial terapéutico en el manejo de diversas afecciones gastrointestinales.

Marco teórico

Interacción microbiota-huésped

La interacción que ocurre entre las bacterias y el humano es compleja y multifactorial. En el cuerpo humano hay aproximadamente diez veces más células bacterianas respecto a células humanas, con una gran cantidad de bacterias en la piel y en el tracto digestivo. Aunque algunas pueden ser patógenas para el hombre, el efecto protector del sistema inmune hace que la gran mayoría de ellas sea inofensiva o beneficiosa. Muchas otras se encuentran como simbioses en seres humanos y en otros mamíferos. Por ejemplo, en el tracto digestivo proliferan unas mil especies bacterianas que ayudan a la síntesis de vitaminas tales como ácido fólico, vitamina K y biotina. También fermentan carbohidratos complejos indigeribles y convierten las proteínas de la leche en ácido láctico, tal es el caso de las bacterias del género *Lactobacillus*, de importancia médica. Además, la presencia de esta microbiota inhibe el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas generalmente por exclusión competitiva, desempeña un papel fundamental en la modulación del sistema inmunológico del huésped, influyendo en la respuesta inflamatoria, la tolerancia oral y la protección contra patógenos invasivos (Marcano, 2008).

Alteraciones de la Microbiota y sus Consecuencias

El equilibrio dinámico de la microbiota intestinal puede ser perturbado por diversos factores, incluyendo la dieta, el uso de antibióticos, el estrés y las enfermedades. Estas alteraciones, conocidas como disbiosis, pueden tener consecuencias significativas para la salud humana (Icaza-Chávez, 2013).

Los estados de disbiosis generalmente se caracterizan por la pérdida o la representación insuficiente de especies beneficiosas que habitualmente son dominantes y a un aumento de la abundancia de especies minoritarias que, a menudo, incluyen patógenos oportunistas. Los cambios pueden ser específicos de cada nicho y de cada enfermedad, y pueden conllevar a la alteración global de la estructura de la microbiota, pérdida o adquisición de especies concretas. Por ejemplo, en las enfermedades inflamatorias intestinales suele observarse pérdida de bacterias productoras de butirato (*Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Eubacterium*), en el caso de

diarreas asociadas al uso de antibióticos coincide con sobrecrecimiento de especies oportunistas, por ejemplo, *Clostridioides difficile*. En el cáncer colorrectal es frecuente el aumento de abundancia relativa de *Fusobacterium* en las heces, un género propio de la microbiota bucal (Álvarez, 2021).

Múltiples factores como el uso de antibióticos y otros medicamentos, estrés, factores genéticos, dieta, estilo de vida, etc., se han implicado en el origen de la disbiosis. Si el factor desencadenante es intenso o persistente en el tiempo, el proceso puede conducir a enfermedad, generalmente de tipo crónico o recurrente y de patrón inflamatorio (Álvarez, 2021).

Disbiosis y Enfermedades Asociadas

La disbiosis intestinal se ha relacionado con una variedad de enfermedades y trastornos, incluyendo: La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y el lupus eritematoso sistémico, enfermedades autoinflamatorias, como la artritis reumatoide y el síndrome de Sjögren, cáncer colorrectal, obesidad y síndrome metabólico, así como con riesgo cardiovascular (Cano, 2022). Las alteraciones en la microbiota influyen en la salud a través de diversos mecanismos, cómo son la modulación del sistema inmunológico, afectando la respuesta inflamatoria y la tolerancia oral, producción de metabolitos bioactivos, como ácidos grasos de cadena corta y neurotransmisores, que pueden tener efectos sistémicos, interferencia con la barrera epitelial intestinal, aumentando la permeabilidad y facilitando la translocación de bacterias y toxinas al torrente sanguíneo (Venegas, 2016).

Generalidades de los *Lactobacillus*

Los *Lactobacillus* son microorganismos Gram-positivos que exhiben una gran distribución principalmente en el tracto gastrointestinal y genitourinario de los seres humanos, con ocurrencia minoritaria en la piel y la leche materna. Son microorganismos microaerófilos y crecen mejor en anaerobiosis. Forman parte del grupo denominado bacterias ácido lácticas, ya que fermentan azúcares para producir ácido láctico. Se caracterizan por ser un género bacteriano de bacilos largos, rectos o curvados, Gram-positivos, no formadores de endosporas, catalasa negativos e inmóviles. *Lactobacillus* es un género de microorganismos de importancia por sus

aplicaciones en la industria médica para la preparación de productos farmacéuticos para restablecer el microbiota intestinal después de tratamientos antibióticos, así como en la industria alimenticia para la preparación de diversidad de productos fermentados (Parra, 2010).

En el contexto de la microbiota, los *Lactobacillus* sobresalen como uno de los géneros más prominentes y numéricamente preponderantes del ecosistema gastrointestinal. Las densidades poblacionales varían en el rango de 10^9 a 10^{10} unidades formadoras de colonias por gramo de contenido fecal, presentando una marcada discrepancia en comparación con otros géneros como los coliformes y *Streptococos*, diferenciados por un factor de 100 o más (Wiel-Korstanje, 1970).

El estudio del microbioma humano ha crecido de manera exponencial en la última década, y su importancia en el proceso de salud - enfermedad del ser humano se hace cada vez más evidente, este ecosistema microbiano intestinal consiste en interacciones huésped-microbiota principalmente bacterias y *Lactobacillus*, un desequilibrio en estas interacciones se ha relacionado a multitud de enfermedades y padecimientos (Moreno del Castillo, 2018).

Casos clínicos y antecedentes

Lactobacillus se ha convertido en uno de los géneros bacterianos más prometedores con aplicaciones en salud y enfermedades intestinales, cómo lo indico Huang Y, en su investigación “*Three-Combination Probiotics Therapy in Children With Salmonella and Rotavirus Gastroenteritis*” donde la administración por siete días de *Lactobacillus*, *S. thermophilus* cómo probiótico a niños de los 7 a los 12 años con gastroenteritis aguda ocasionada por *Salmonella* y Rotavirus fue un tratamiento eficaz para disminuir los síntomas y severidad del cuadro (Huang, 2014).

Esto debido a multitud de mecanismos huésped-microbiota, cómo son la competencia por adherencia a la mucosa intestinal, al colonizar la mucosa del tracto gastrointestinal se evita la proliferación de microorganismos patogénicos reduciendo la carga bacteriana y viral, así mismo este género de microorganismos, al ser fermentador de azúcares en ácidos orgánicos fomentan un ambiente ácido en el intestino que desfavorece el crecimiento y proliferación de cepas patógenas (Shortt, 1999).

Dadas las propiedades inmunomoduladoras de este género de microorganismos, actualmente se evalúa su utilidad como probiótico en el manejo preventivo o terapéutico de enfermedades inflamatorias en el intestino, estimulando la producción de citocinas que mejoran la función de células. Incluso cepas de *Lactobacillus* y bifidobacterias tienen la capacidad de inducir una mayor actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión transferasa, reductasa, peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa. Estas enzimas pueden regular el estrés oxidativo circulatorio protegiendo a las células de daños inducidos por carcinógenos (Nowak y cols, 2019).

La conversión de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) aumenta el nivel de radicales hidroxilos, lo que produce lesiones letales en las bacterias. El H_2O_2 puede ingresar a las células del epitelio intestinal a través de las acuaporinas lo que facilita la respuesta del huésped a través de vías sensibles a redox. Este proceso es por la oxidación del tiol para alterar la señalización epitelial del huésped, lo que antagoniza la inflamación, limita y repara el daño tisular, ajusta la división celular y limita la vitalidad de los patógenos intracelulares (Huang y cols, 2022).

Bilis, sales y ácidos biliares

Una de las funciones vitales del hígado en el organismo humano consiste en la formación y secreción de bilis. La bilis es un líquido isotónico que contiene básicamente: agua (82%), sales biliares (12%), fosfolípidos (4%), colesterol (1%) y pequeñas cantidades de otras sustancias, como: bilirrubina, inmunoglobulina A, metabolitos de hormonas, electrolitos, pro-farmacos y sus metabolitos. La secreción basal diaria de bilis es de aproximadamente 500 a 600 mL. La bilis es decisiva para la digestión y absorción de grasas, ya que facilita la emulsificación de las grasas provenientes de la dieta (García, 2006). Uno de los constituyentes más importantes de la bilis son los ácidos biliares (AB), precursores de los ácidos biliares. Estos se sintetizan en el hígado a partir del colesterol y se conjugan con aminoácidos, generalmente glicina o taurina, para formar sales biliares primarias. Los AB transitan por el tracto gastrointestinal y están sujetos a una variedad de transformaciones químicas por bacterias autóctonas que dan lugar a sales biliares secundarias (Fahy y cols., 2005). Las sales biliares desempeñan funciones críticas en la digestión, absorción y transporte de lípidos en el sistema gastrointestinal. Su función principal es facilitar la emulsión de las grasas provenientes de la dieta y la formación de micelas

para reducir la tensión superficial entre las grasas y el medio acuoso. Esto facilita su división en partículas más pequeñas y aumenta la superficie de contacto de enzimas lipolíticas. Además, facilitan la absorción y el transporte de lípidos y vitaminas liposolubles (A, D, E, K) al incorporarlas a las micelas, aumentando su solubilidad y disponibilidad para ser absorbidas por las células epiteliales. También actúan como agentes antimicrobianos, contribuyendo a mantener un equilibrio saludable de la microbiota intestinal (García y López, 2007).

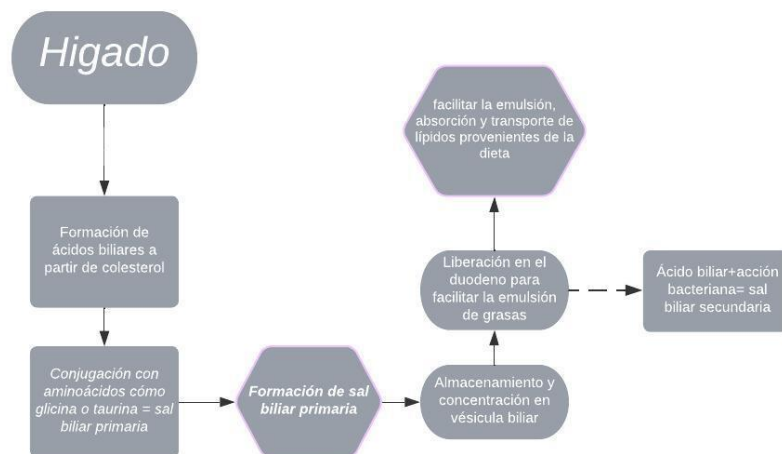


Figura 1. Proceso de formación de sales biliares a partir de ácidos biliares.

Se sabe que las sales biliares conjugadas (sal biliar unida a un aminoácido) tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Enterococcus*) y Gram-positivas (Huang y cols., 2022; Shokryazdan y cols., 2017).

Para sobrevivir a la presencia de estas sales, algunas cepas producen la enzima sal biliar hidrolasa (SBH) que puede hidrolizar a los AB, haciéndolos insolubles y evitando que puedan actuar sobre su membrana. En el cuerpo humano, la insolubilidad de los AB hace que sean excretados. Al disminuir su concentración en la circulación enterohepática, se activa la síntesis a expensas de colesterol, lo que puede reducir la concentración de colesterol en plasma. Por lo tanto, las bacterias capaces de producir SBH pueden participar en la reducción del colesterol plasmático del huésped. La sal biliar hidrolasa (SBH) bacterianas escinden la glicina o la taurina conjugada de los AB, un paso previo esencial para la producción de AB desconjugados y secundarios. Los

Lactobacillus probióticos albergan una cantidad y diversidad considerables de SBH (Huang y cols., 2022).

El presente proyecto propone evaluar la importancia fundamental de los *Lactobacillus* en la salud humana. Se enfoca en su papel esencial como constituyentes de la microbiota intestinal y su posible potencial terapéutico en diversas afecciones gastrointestinales.

Objetivo general

Caracterizar el potencial probiótico de *Lactobacillus* aislados del tracto gastrointestinal así como su capacidad antioxidante y capacidad de producir sal biliar hidrolasa.

Objetivos específicos

- Caracterizar el potencial probiótico de cepas *Lactobacillus*.
- Determinar la actividad sal biliar hidrolasa.
- Determinar la capacidad antioxidante en las células íntegras, desintegradas y del extracto celular.

Metodología

Las cepas de *Lactobacillus* fueron obtenidas del laboratorio de Biotecnología de la UAM-Xochimilco, mismas que fueron aisladas a partir de heces de neonatos clínicamente sanos.

Preparación del stock

Cada una de las cepas fue sembrada en 10 mL de caldo MRS (Man, Rogosa, y Sharpe), e incubada a 37 °C por 24 h, posteriormente fueron centrifugadas por 10 min a 9000 rpm. El paquete celular ser suspendió en 10 mL de MRS con glicerol al 5% y

fueron alicuotadas en volumen de 0.5 mL en tubos Eppendorf, para ser conservadas a 20 °C hasta su uso.

Cuenta en placa

Para la determinación de la concentración bacteriana se utilizó el método de conteo en placa descrito por Wendel U. 2022. Se tomó una alícuota de 100 μ L y se depositó en 900 μ L de agua peptonada al 5%. Se homogenizó con ayuda de un vortex y se tomó una alícuota de 100 μ L y se volvió a depositar en otro tubo con 900 μ L de agua peptonada al 5% y así sucesivamente hasta que se llegó a la sexta dilución. Una vez finalizadas las diluciones, de cada una se sembraron 3 μ L por triplicado en agar MRS el cual fue incubado a 37 °C por 24 h. Después del tiempo de incubación se contaron las colonias de la dilución y se realizaron los cálculos correspondientes para determinar el número de UFC/mL (Wendel U. 2022).

Cuantificación de la actividad BSH

Esta cuantificación se determinó en extractos celulares libres de células y restos celulares intracelulares. El método descrito por González y cols. (2014) con algunas modificaciones. Se utilizó para cuantificar la actividad de la BSH. Primero, *Lactobacillus ramnosus* LBUX2301 fue inoculado a una concentración de 1×10^9 UFC/mL en un tampón de fosfato sódico (PBS) suplementado con un 0.5% p/v de ácido glicólico, ácido glicodeoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, bilis oxgall o cualquier sal biliar como control y se incubó durante 48 h. Después de la incubación, una porción de 1 mL del cultivo se sometió a centrifugación a 29,286 g durante 5 min a 4 °C. Posteriormente, se combinaron 50 μ L del sobrenadante resultante con 50 μ L de PBS sódico (0.1 M, pH 6.0), 100 μ L de una solución que contendrá cada sal biliar o glicina (usada como grupo de control) a una concentración de 0.5 % p/v, y 10 μ L de ditioneitol (DTT). La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min para detener la actividad enzimática, y se añadieron 100 μ L de ácido tricloroacético (15% p/v). Luego, la mezcla se sometió a centrifugación durante 5 min a 29.286 g y 4 °C. Después, se combinaron 50 μ L del sobrenadante resultante con 50 μ L de agua destilada y 1.9 mL de reactivo de ninhidrina. El reactivo de ninhidrina

consistió en 0.5 mL de ninhidrina al 1% p/v en un tampón de citrato (0.5 M, pH 5.5), 1.2 mL de glicerol y 0.2 mL de solución tampón (citrato 0.5 M, pH5.5). La mezcla se hirvió durante 14 min, seguido de enfriamiento durante 3 min en un baño de hielo. Se midió la absorbancia a 570 nm. Antes de cada ensayo, se preparó una curva estándar utilizando glicina y 10 μ L de DTT para determinar la concentración de glicina liberada.

Ensayo de actividad antioxidante DPPH

La actividad de eliminación del radical 2,2-difenil-1 picrilhidrazil (DPPH) se evaluó utilizando el procedimiento descrito por Su y cols. (2015). Se preparó una mezcla combinando 1 mL de solución recién preparada de DPPH (0.2 mmol/L en etanol) con 1 mL de la muestra, que incluía células intactas, extractos celulares libres de células o restos celulares. Posteriormente, la mezcla se incubó en la oscuridad durante 30 min. La absorbancia de la solución se determinó a una longitud de onda de 517 nm (Su y cols, 2015).

Radical hidroxilo

La capacidad de eliminación del radical hidroxilo se analizó según el método de Yan y cols. (2020). Células intactas, extractos celulares intracelulares sin células o restos celulares (1 mL por muestra) se mezcló con 1 mL de solución de 1,10-fenantrolina (2.5 mM), 1 mL de PBS (pH 7.4) y 1 mL de FeSO_4 (2.5 mM). Para inhibir la reacción, se añadieron 1 mL de H_2O_2 a 20 mM, y la reacción se incubó a 37 °C durante 90 min. La absorbancia de la solución se midió a 517 nm.

Superóxido

La capacidad de eliminación del radical anión superóxido se evaluó siguiendo el método de Yan y cols. (2020), con algunas modificaciones. Células intactas, extractos celulares intracelulares sin células o restos celulares (1 mL por muestra) se añadirán a 3 mL de solución Tris-HCl (pH 8.2) y se incubaron a 25 °C durante 20 min. Luego, se añadieron 0.4 mL de pirogalol (25 mM) a temperatura ambiente durante 4 min. Las reacciones se detuvieron añadiendo 0.5 mL de HCl, y la absorbancia se midió a 325 nm.

Resultados

Cuantificación de la actividad SBH

La sal biliar hidrolasa es una enzima clave en el proceso de descomposición de las sales biliares en el intestino delgado, lo que facilita la digestión y absorción de grasas y nutrientes, la actividad de esta enzima por parte de los microorganismos intestinales, como *Lactobacillus*, despierta un gran interés debido a sus posibles implicaciones para la salud gastrointestinal y el desarrollo de terapias probióticas relacionadas al perfil lipídico.

Los resultados mostrados en la figura 2 demuestran los dos microorganismos problema (*L. ramnosus* LBUX2301 y *L. ramnosus* LBUX02) presentan capacidad hidrolítica. Sin embargo, en sales primarias (AGC, ATC, AGDC), *L. ramnosus* LBUX02 es la cepa que presenta una mayor capacidad hidrolítica respecto a *L. ramnosus* LBUX2301. En la sal biliar secundaria ATDC *L. ramnosus* LBUX2301 presenta mayor crecimiento respecto a *L. ramnosus* LBUX02. En la mezcla de todas las sales biliares (Oxgall) el crecimiento de las cepas no indica diferencia significativa entre si lo que indica la capacidad de tolerar y adaptarse al entorno gastrointestinal.

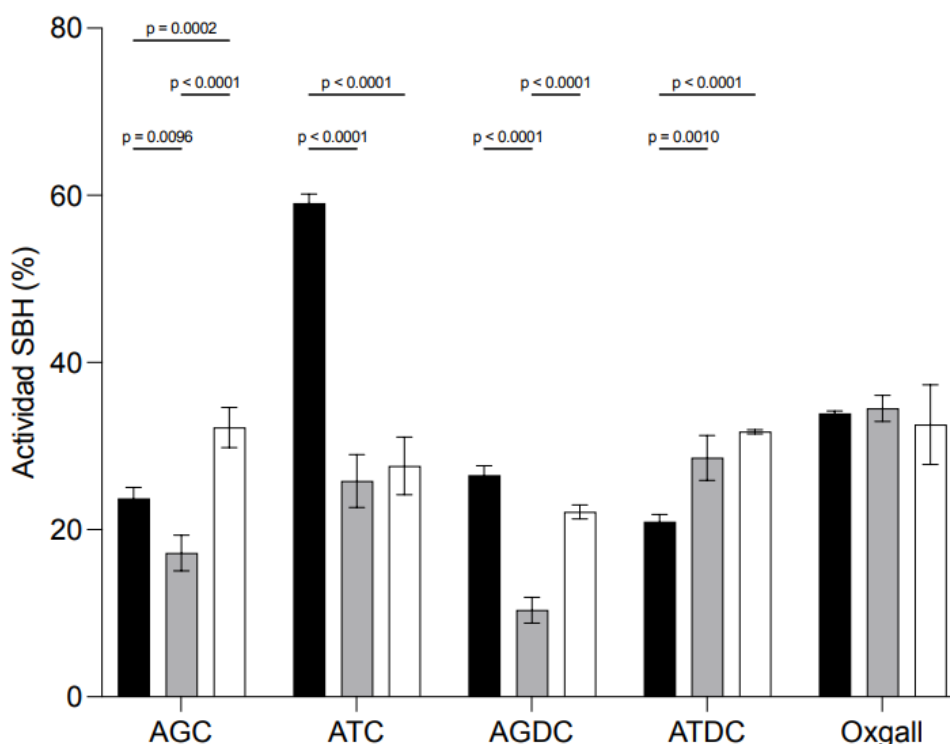


Figura 2. Actividad SBH, de las cepas evaluadas utilizando sales primarias, secundarias y una mezcla de sales. ■ *L. casei* JC57 (control), ■ *L. ramnosus* LBUX2301, □ *L. ramnosus* LBUX02.

Con base en los resultados obtenidos, es posible apreciar que tanto el control, cómo muestras problema (*L. ramnosus* LBUX2301 y *L. ramnosus* LBUX02) crecen en todas las sales biliares: AGC (ácido glicólico), ATC (ácido taurocolico), AGDC (ácido glicodioxicolico), ATDC (ácido taurodeoxicolico), Oxgall (mezcla de todas las sales biliares), sin embargo, es importante destacar que para la sal biliar AGC, *L. ramnosus* LBUX02 presenta una mayor capacidad hidrolítica respecto a *L. ramnosus* LBUX2301, pese a que ambas cepas presentan actividad, existe diferencia significativa entre todas ellas, en la sal ATC. La cepa *L. casei* JC57 tiene una mayor actividad hidrolítica respecto a las cepas analizadas sin embargo las cepas problema no poseen diferencia significativa entre sí. En la sal AGDC, la cepa *L. ramnosus* LBUX2301 tiene menor actividad que el control ($p < 0.0001$) y que la cepa *L. ramnosus* LBUX02 ($p = 0.0001$). No obstante, esta última no es estadísticamente diferente al control, para la sal ATDC, *L. ramnosus* LBUX2301 y *L. ramnosus* LBUX02 presentaron mayor capacidad de hidrolizar la sal de ATDC, en comparación al control ($p = 0.001$, $p < 0.0001$, respectivamente). Sin embargo, las cepas problema no presentaron diferencias significativas entre sí.

Ensayo de actividad antioxidante DPPH

La evidencia acumulada sugiere que algunas cepas de *Lactobacillus* poseen una actividad antioxidante que beneficia la salud del huésped después de colonizar y propagarse en el tracto gastrointestinal. En este estudio, ambas cepas analizadas (*L. ramnosus* LBUX02 y *L. ramnosus* LBUX2301) exhibieron actividad antioxidante DPPH como se muestra en la figura 2. En célula intacta, la muestra LBUX02 tiene una actividad ligeramente superior a *L. ramnosus* LBUX2301. En célula lisada, ambas muestras problema muestran una gran actividad, sin embargo, *L. ramnosus* LBUX2301 muestra una actividad superior que es posible apreciar en la figura 3.

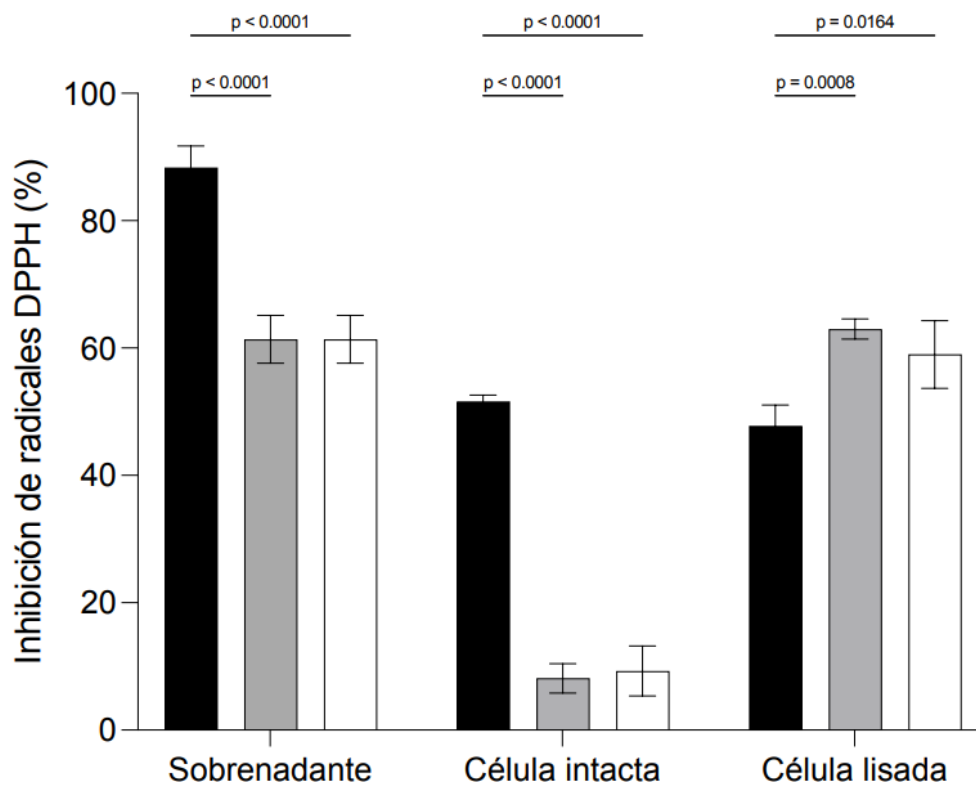


Figura 3. Inhibición de radicales DPPH en sobrenadante de crecimiento celular, célula intacta y célula lisada. ■ *L. casei* JC57 (control), ■ *L. ramnosus* LBUX2301 □ *L. ramnosus* LBUX02.

Los resultados indican, que la actividad de ambas cepas problema no fue significativamente diferente en el sobrenadante. Sin embargo, dicha actividad es menor que la actividad del control quien presenta una diferencia significativa con respecto a ambas muestras problema ($p < 0.0001$).

En célula intacta el control presenta una buena actividad en comparación a las dos muestras problema. Sin embargo, es importante destacar que la muestra *L. ramnosus* LBUX02 presenta una ligera actividad superior a *L. ramnosus* LBUX2301, la diferencia entre el control y las muestras problema es estadísticamente significativa ($p < 0.0001$).

En célula lisada se puede notar una gran actividad por parte de ambas muestras problema respecto al control. Sin embargo, la actividad de *L. ramnosus* LBUX2301 es superior, solo existe diferencia significativa entre el control y ambas muestras problema.

Inhibición de radical hidroxilo

El radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) representa una amenaza significativa para la integridad celular y está implicado en procesos inflamatorios asociados con el estrés oxidativo. En este estudio, se analizó la actividad de inhibición del radical hidroxilo en tres condiciones diferentes por parte de las cepas *L. ramnosus* LBUX2301 y *L. ramnosus* LBUX02.

Los resultados indican que *L. ramnosus* LBUX2301 es la cepa más efectiva en la evaluación de célula intacta, mientras que *L. ramnosus* LBUX02 parece ser la más efectiva en la evaluación de célula lisada.

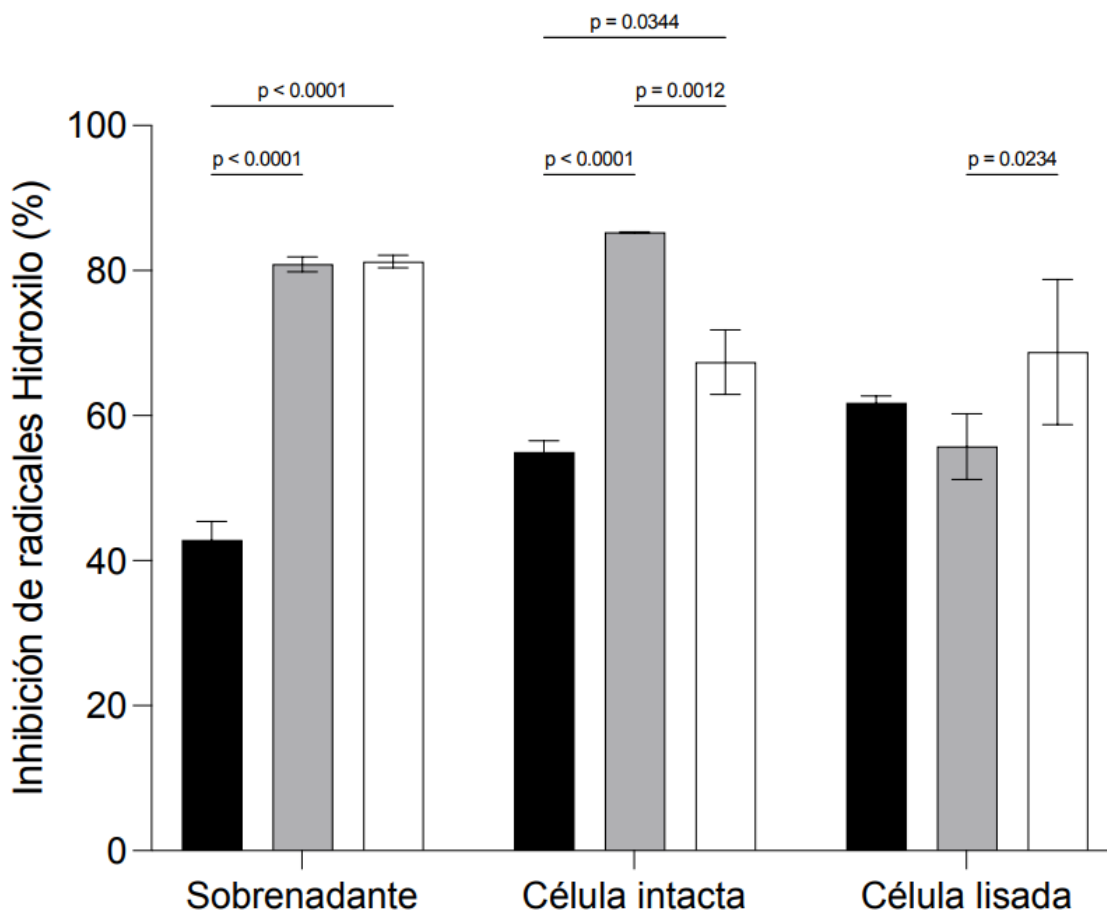


Figura 4. Inhibición de radicales hidroxilos sobrenadantes celulares, células intactas.

■ *L. casei* JC57 (control), ■ *L. ramnosus* LBUX2301 □ *L. ramnosus* LBUX02.

Para el caso del sobrenadante, los resultados correspondientes a la inhibición de radicales hidroxilos denotan una actividad superior de las cepas problema respecto al control sin diferencia significativa entre las mismas, sin embargo, existe diferencia

estadísticamente significativa entre el control y ambas cepas problema, en la evaluación de célula intacta, ambas muestras presentan actividad de inhibición, sin embargo, *L. ramnosus* LBUX2301 presenta la mayor actividad de inhibición respecto al control *L. casei* JC57 con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) y *L. ramnosus* LBUX02, En lo respectivo a célula lisada *L. ramnosus* LBUX02 presenta mayor actividad respecto a control y a *L. ramnosus* LBUX2301 con una diferencia significativa entre este último ($p = 0.0234$).

Superóxido

En el contexto de la defensa celular contra el estrés oxidativo, enzimas como las catalasas, superóxido dismutasas desempeñan un papel crucial, en multitud de mecanismos, incluido la eliminación del anión superóxido. En este estudio, se evaluó la actividad de inhibición de radicales de anión superóxido en tres condiciones diferentes. Los resultados muestran que *L. ramnosus* LBUX2301 fue el principal contribuyente a esta actividad en todas las condiciones evaluadas. La figura 4 presenta de manera visual esta observación, destacando el efecto predominante de *L. ramnosus* LBUX2301 en la eliminación de radicales de anión superóxido.

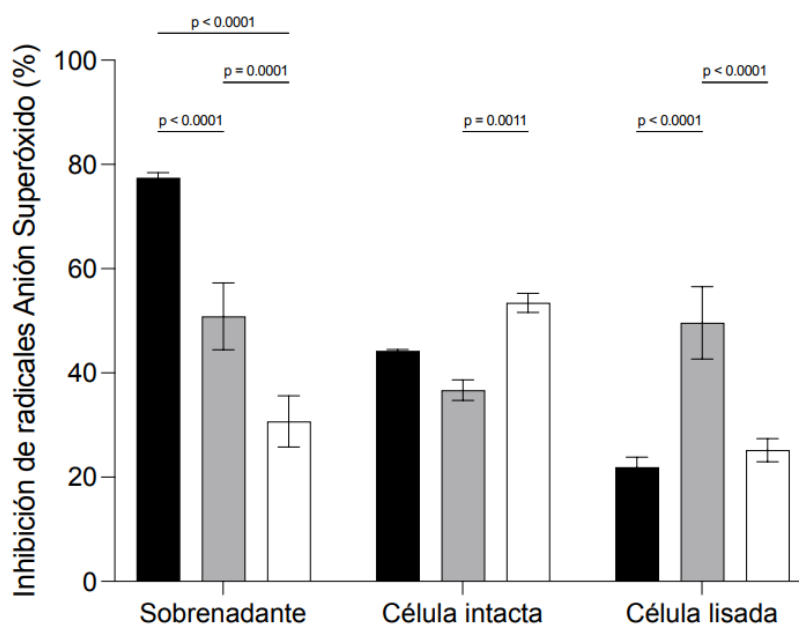


Figura 5. Inhibición de radicales superóxidos, en sobrenadante celular, célula intacta y célula lisada. ■ *L. casei* JC57 (control), ■ *L. ramnosus* LBUX2301 □ *L. ramnosus* LBUX02.

Para el caso de sobrenadante, los resultados obtenidos en la prueba de eliminación de radical superóxido indican una actividad superior por parte del control *L. casei* JC57, ambas muestras problema presentan actividad de inhibición, sin embargo, es importante destacar que *L. ramnosus* LBUX2301 es superior, existe diferencia significativa entre control y *L. ramnosus* LBUX2301 ($p < 0.0001$) así entre el control y *L. ramnosus* LBUX02 ($p < 0.0001$).

En el caso de célula intacta, ambas muestras presentan actividad, sin embargo, *L. ramnosus* LBUX02 es la cepa que presenta mayor actividad respecto al control, existe diferencia significativa entre *L. ramnosus* LBUX2301 y *L. ramnosus* LBUX02 ($p = 0.0011$), los resultados correspondientes a célula lisada nos indican que ambas cepas tienen actividad, sin embargo, *L. ramnosus* LBUX2301 es quien presenta mayor actividad de inhibición respecto al control, existe diferencia significativa entre control y *L. ramnosus* LBUX2301 ($p < 0.0001$) y también entre *L. ramnosus* LBUX2301 y *L. ramnosus* LBUX02 ($p < 0.0001$).

Discusión

En este estudio, se evaluó la actividad de cepas con potencial probiótico de *L. ramnosus* en diversas condiciones experimentales, centrándonos en la cuantificación de la actividad SBH y en ensayos de actividad antioxidante, incluyendo la inhibición de los radicales DPPH, OH y superóxidos.

Todas las cepas probióticas evaluadas muestran un crecimiento en presencia de sales biliares, sin embargo, un factor crucial que influye en la supervivencia y capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal de las cepas probióticas es la toxicidad ejercida por las sales biliares. Se ha observado que las sales biliares secundarias (ácido glicodioxicolico; ácido taurodeoxicolicico) son potencialmente más tóxicas que las primarias (ácido glicólico; ácido taurocolico) debido a su mayor hidrofobicidad que les confiere una mayor capacidad de interaccionar con la bicapa lipídica. Esta mayor

toxicidad puede afectar la viabilidad y capacidad de colonización de las cepas probióticas en el tracto gastrointestinal (Tanaka y col., 1999).

Asimismo, la asociación de las sales biliares con aminoácidos como glicina o taurina también influye en su comportamiento. Las sales biliares conjugadas con taurina tienden a ser más hidrosolubles debido a la carga negativa propia de la taurina, lo que puede aumentar su capacidad de interacción con las membranas celulares en comparación con aquellas conjugadas con glicina. Esta diferencia en la asociación con aminoácidos puede influir en la capacidad de las cepas probióticas para resistir la toxicidad de las sales biliares y colonizar el tracto gastrointestinal de manera efectiva (Ridlon y cols., 2016).

La distribución de las sales biliares a lo largo del tracto gastrointestinal también es un factor relevante a considerar. Las sales biliares conjugadas con glicina son más comunes en el intestino delgado, donde su principal función es facilitar la emulsificación y digestión de grasas, es por tal que se espera una menor toxicidad en presencia de estas mismas, por ende, una mayor proliferación bacteriana en la porción del intestino delgado, cómo puede observarse en la figura 2, donde *L. casei* JC57 presenta mayor actividad en comparación a las cepas *L. ramnosus* LBUX02 y *L. ramnosus* LBUX2301. Por otro lado, las sales biliares conjugadas con taurina, más abundantes en el intestino grueso, donde pueden interactuar con la microbiota intestinal y las células epiteliales para modular la función intestinal y proteger contra patógenos, es por tal que se esperaría una menor proliferación bacteriana (Johnson, 2012).

Los resultados indican que todas las cepas probióticas evaluadas mostraron un crecimiento viable en presencia de sales biliares, siendo *L. ramnosus* LBUX02 el que mostró un mejor desempeño en crecimiento con sales biliares conjugadas con glicina. Esto sugiere su capacidad para sobrevivir y colonizar el intestino delgado donde predominan estas sales biliares primarias. Estos hallazgos son consistentes con los resultados obtenidos por Farhangfar y cols. (2021), quienes observaron un crecimiento constante de *Lactobacillus* frente a sales biliares al 1%. Además, estudios anteriores han demostrado el impacto de las sales biliares en el crecimiento y las propiedades de la membrana de ciertas cepas de *Lactobacillus* (Gómez-Zavaglia y cols., 2018).

En cuanto a la actividad antioxidante, encontramos que todas las cepas probióticas demostraron capacidad para neutralizar los radicales libres. Destaca especialmente

la actividad de *L. ramnosus* LBUX2301 en las condiciones experimentales evaluadas, mostrando eficacia tanto en la inhibición de radicales hidroxilos en células intactas como en la eliminación de radicales de anión superóxido en todas las condiciones estudiadas. Esta capacidad antioxidante en células intactas refleja la habilidad de las bacterias probióticas vivas para neutralizar los radicales libres y prevenir el daño oxidativo mientras están presentes en su forma completa, utilizando enzimas y metabolitos antioxidantes. En el caso de células lisadas, los componentes celulares liberados también muestran capacidad para neutralizar los radicales libres, sugiriendo que enzimas y metabolitos antioxidantes intracelulares contribuyen a la protección contra el daño oxidativo. Además, el efecto antioxidante del sobrenadante indica la capacidad de los microorganismos para producir compuestos antioxidantes secretados al medio extracelular.

Estos resultados están en línea con el estudio de Mu - Gao y cols. (2018), donde se destacó la actividad antioxidante de 14 de 15 cepas de *Lactobacillus* evaluadas por el método de eliminación de radical DPPH y OH. Además, nuestros resultados son consistentes con los reportados por Lepecka y cols. (2023). quienes reportaron una notable eliminación de radicales DPPH por parte de *Lactobacillus*.

Es importante destacar que observamos variabilidad en la eficacia antioxidante de las cepas probióticas según el contexto experimental. Por ejemplo, la cepa *L. ramnosus* LBUX2301 demostró una mayor eficacia en la inhibición de radicales hidroxilos y superóxidos en comparación con otras cepas probióticas evaluadas. Este hallazgo subraya la importancia de considerar el contexto experimental al evaluar las propiedades antioxidantes de las cepas probióticas.

Conclusión

Las cepas probióticas de *Lactobacillus ramnosus* evaluadas en este modelo experimental demostraron un posible potencial probiótico, destacándose por su capacidad para resistir las condiciones adversas in vitro, así como por su efectiva resistencia a la presencia de sales biliares propias del tracto gastrointestinal. Además, se observó que estas cepas exhiben propiedades antioxidantes, siendo la cepa

Lactobacillus ramosus LBUX2301 la más notable en la inhibición de radicales hidroxilos y superóxidos.

La cuantificación de la actividad de la sal biliar hidrolasa reveló que estas cepas probióticas son capaces de hidrolizar las sales biliares, lo que sugiere su habilidad para adaptarse y sobrevivir en el ambiente intestinal. En particular, la comparación entre las cepas mostró que *Lactobacillus ramosus* LBUX02 tiene una mayor capacidad hidrolítica, especialmente en la descomposición de la sal biliar primaria AGC.

Estos resultados enfatizan la importancia de seleccionar cuidadosamente cepas con capacidades probióticas diversas, que incluyan, entre otros, propiedades antioxidantes y actividad de sal biliar hidrolasa. Esta información es crucial para el desarrollo de productos probióticos efectivos, los cuales pueden tener un papel importante en la promoción de la salud intestinal.

Referencias

1. Álvarez, J., Real, J. M. F., Guarner, F., Gueimonde, M., Rodríguez, J. M., de Pitaon, M. S., & Sanz, Y. (2021). Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterología y Hepatología*, 44(7), 519-535.
2. Cano Ortiz, A. (2022). Caracterización de la microbiota fecal en pacientes con síndrome de Sjögren primario y su relación con la permeabilidad intestinal e inflamación.
3. Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., ... & Dennis, E. A. (2005). A comprehensive classification system for lipids¹. *Journal of lipid research*, 46(5), 839-861.
4. Farhangfar, A., Gandomi, H., Basti, A. A., Misaghi, A., & Noori, N. (2021). Study of growth kinetic and gastrointestinal stability of acid-bile resistant *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Siahmazgi traditional cheese. In *Veterinary Research Forum* (Vol. 12, No. 2, p. 235). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
5. García Luna, P. P., & López Gallardo, G. (2007). Evaluación de la absorción y metabolismo intestinal. *Nutrición hospitalaria*, 22, 05-13.

6. García, C. G. (2006). Physiopathology of cholestasis. *Medicina Interna de México*, 22(5), 411-421.
7. González-Vázquez, R., Gutiérrez-López, G. F., Arellano-Cárdenas, S., López-Villegas, E. O., Téllez-Medina, D. I., & Rivera-Espinoza, Y. (2014). Morphometric parameters, zeta potential and growth rate of *Lactobacillus casei* Shirota by effect of different bile salts. *Revista mexicana de ingeniería química*, 13(1), 189-199.
8. Gómez-Zavaglia, A., Silva, C. C., & Pérez, P. F. (2018). Impact of bile salts on the growth and membrane properties of *Lactobacillus reuteri*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(4), 913-922.
9. Huang, R., Wu, F., Zhou, Q., Wei, W., Yue, J., Xiao, B., & Luo, Z. (2022). *Lactobacillus* and intestinal diseases: Mechanisms of action and clinical applications. *Microbiological Research*, 260, 127019. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127019>
10. Huang, Y. F., Liu, P. Y., Chen, Y. Y., Nong, B. R., Huang, I. F., Hsieh, K. S., & Chen, K. T. (2014). Three-combination probiotics therapy in children with salmonella and rotavirus gastroenteritis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 48(1), 37-42.
11. Icaza-Chávez, M. E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de gastroenterología de México*, 78(4), 240-248.
12. Johnson, L. R. (2012). *Physiology of the Gastrointestinal Tract, Volume 1* (5th ed.). Elsevier/AP.
13. Lepecka, A., Szymański, P., Okoń, A., & Zielińska, D. (2023). Antioxidant activity of environmental lactic acid bacteria strains isolated from organic raw fermented meat products. *LWT*, 174, 114440.
14. Marcano, D. (2008). El lado positivo de las bacterias. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 39(2), 63-65.
15. Moreno del Castillo, M. C., Valladares-García, J., & Halabe-Cherem, J. (2018). Microbioma humano. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 61(6), 7-19. <https://doi.org/10.22201.fm.24484865e.2018.61.6.02>
16. Mu, G., Gao, Y., Tuo, Y., Li, H., Zhang, Y., Qian, F., & Jiang, S. (2018). Assessing and comparing antioxidant activities of lactobacilli strains by using different chemical and cellular antioxidant methods. *Journal of dairy science*, 101(12), 10792-10806.

17. Nowak, A., Paliwoda, A., & Błasiak, J. (2019). Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-oxidative activity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains: A review of mechanisms and therapeutic perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(21), 3456–3467.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1494539>
18. Parra Huertas, R. A. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 8(1), 93-105.
19. Ridlon, J. M., Harris, S. C., Bhowmik, S., Kang, D. J., & Hylemon, P. B. (2016). Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut microbes*, 7(1), 22-39.
20. Rossini, K., Noreña, C. P. Z., Olivera, F. C., & Brandelli, A. (2009). Casein Peptides with Inhibitory Activity on Lipid Oxidation in Beef Homogenates and Mechanically Deboned Poultry Meat. *LWT Food Science and Technology*.
21. Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Liang, J. B., & Ho, Y. W. (2017). Probiotics: From Isolation to Application. *Journal of the American College of Nutrition*, 36(8), 666–676.
22. Shortt, C. (1999). Host–Microflora Interface in Health & Disease. *Trends in Food Science & Technology*.
23. Su, J., Wang, T., Li, Y. Y., Li, J., Zhang, Y., Wang, Y., Wang, H., & Li, H. (2015). Antioxidant properties of wine lactic acid bacteria: *Oenococcus oeni*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 5189–5202.
24. Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T., & Mierau, I. (1999). Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *Journal of dairy science*, 82(12), 2530-2535.
25. Venegas, P., & García, A. (2016). Influencia de la microbiota en la regulación del Sistema Inmune. *Diabetes*, 1(22), 2.
26. Wendel, U. (2022). Assessing viability and stress tolerance of probiotics—a review. *Frontiers in Microbiology*, 12, 818468.
27. Wiel-Korstanje, D. E. R. (1970). Medium for differential count of the anaerobic flora in human feces. *Applied Microbiology*, 20(1), 168-169.
28. Yan, F., Li, N., Yue, Y., Wang, C., Zhao, L., Evvie, S. E., Li, B., & Huo, G. (2020). Screening for Potential Novel Probiotics With Dipeptidyl Peptidase IV-

Inhibiting Activity for Type 2 Diabetes Attenuation in vitro and in vivo. *Frontiers in Microbiology*.