



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

“Expresión del gen *sbh* de *Bifidobacterium longum* LBUX23 y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCLA3, que codifica para la enzima sal biliar hidrolasa y su correlación con la actividad enzimática”

Presenta:

Kevin Leonardo Rodríguez Arroyo

MATRÍCULA

2202032417

ASESORES:

Dra. María Angélica Gutiérrez Nava

Dra. Raquel González Vázquez

Lugar de realización: Laboratorio de Ecología Microbiana

Mayo 2025

RESUMEN

Las bifidobacterias son un grupo de bacterias beneficiosas que residen predominantemente en el intestino humano, especialmente en el colon. Se ha demostrado que *B. pseudocatenulatum* y *B. longum* poseen enzimas específicas, como las sal biliar hidrolasas (*SBH*), que permiten la fermentación de compuestos más complejos y que son clave para la tolerancia a las sales biliares, esenciales en su capacidad probiótica. Las sal biliar hidrolasas (*SBH*) descomponen los ácidos biliares, lo que permite que las bifidobacterias sobrevivan en el entorno hostil del tracto intestinal. Este estudio evaluó la expresión del gen que codifica para la sal biliar hidrolasa (*sbh*) en *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* tras la exposición a Oxgall, una mezcla de sales biliares. Con el objetivo de evaluar la expresión del gen *sbh*, se establecieron 2 condiciones de cultivo para cada cepa. Una consistió en medio MRS-C (condición estándar) y la segunda en medio MRS-C suplementado con 0.3% p/v de Oxgall. Las cepas fueron cultivadas en estos medios y posteriormente se extrajo el ADN y ARN de *B. longum* y *B. pseudocatenulatum*. Posteriormente se estudió la expresión del gen de la *sbh* de los microorganismos de estudio. Se observó una inducción significativa de la expresión génica. Estos resultados indican que las sales biliares actúan como estímulo para la activación del gen *sbh*, lo que sugiere un mecanismo adaptativo que facilita la supervivencia bacteriana en el tracto gastrointestinal. Los resultados muestran que la presencia de Oxgall afecta negativamente el crecimiento de ambas especies, aunque *B. longum* parece tolerarlo en mayor medida que *B. pseudocatenulatum*, lo que podría reflejar una mayor capacidad de adaptación al estrés biliar por parte de *B. longum*. Se utilizó PCR en tiempo real y el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cuantificar la expresión relativa del gen, utilizando el gen 16S rRNA como control endógeno. Los resultados mostraron que la presencia de Oxgall induce significativamente la expresión del gen SBH, con un aumento de 2.92 veces en *B. longum* y 2.38 veces en *B. pseudocatenulatum* en comparación con sus respectivos controles. Este trabajo contribuye al entendimiento de los mecanismos moleculares que sustentan la tolerancia biliar en bifidobacterias, con posibles aplicaciones en la selección de cepas probióticas con mayor funcionalidad.

ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCION	5
MARCO TEÓRICO.....	7
SAL BILIAR HIDROLASAS (<i>SBH</i>).....	7
<i>Especificidad de las SBH</i>	8
<i>Importancia Biológica</i>	8
PRESENCIA DEL GEN <i>SBH</i> EN BIFIDOBACTERIAS	8
MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>SBH</i>	9
IMPACTO DE LA ACTIVIDAD <i>SBH</i> EN LA MICROBIOTA INTESTINAL.....	10
RELEVANCIA DE <i>SBH</i> EN APLICACIONES PROBIÓTICAS Y CLÍNICAS	10
MÉTODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD <i>SBH</i>	10
COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD <i>SBH</i> ENTRE ESPECIES BACTERIANAS.....	11
IDENTIFICACIÓN DEL GEN <i>SBH</i> Y SU RELEVANCIA EN <i>BIFIDOBACTERIUM</i>	12
PCR PARA DETECCIÓN GENÉTICA	12
EXPRESIÓN GÉNICA DEL GEN <i>SBH</i> MEDIANTE RT-QPCR	12
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA SAL BILIAR HIDROLASA (<i>SBH</i>).....	13
MATERIALES Y MÉTODOS	15
MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	15
ACTIVACIÓN DE CEPAS.....	15
EXTRACCIÓN DE ADN DE <i>B. LONGUM</i> Y <i>B. PSEUDOCATENULATUM</i>	16
EXTRACCIÓN DE ARN.....	16
<i>Extracción por Trizol</i>	16
<i>Extracción por Kit QIAGEN</i>	17
<i>Cuantificación de ácidos nucleicos</i>	17
ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.....	17
PRIMERS Y SONDAS	18
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL GÉNERO <i>BIFIDOBACTERIUM</i> Y EL GEN <i>SBH</i> POR PCR EN PUNTO FINAL	19
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>SBH</i> POR PCR EN TIEMPO REAL	20
<i>Síntesis de cDNA con kit High-Capacity RNA-to-cDNA™</i>	20
<i>Condiciones de reacción de PCR en tiempo real</i>	20
CUANTIFICACIÓN RELATIVA POR EL MÉTODO $\Delta\Delta C_T$	21
RESULTADOS	22
CRECIMIENTO DE <i>BIFIDOBACTERIUM LONGUM LBUX 23</i> Y <i>BIFIDOBACTERIUM PSEUDOCATENULATUM JCLA3</i>	22
TINCIÓN DE GRAM.....	23
<i>Micrografías o descripciones de la morfología observada</i>	23
<i>Confirmación de la tinción Gram-positiva</i>	24
EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN.....	24
<i>Concentración y pureza del ADN</i>	24
<i>Integridad del ADN en gel de agarosa</i>	24
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>BIFIDOBACTERIUM</i>	25

<i>PCR en punto final con primers específicos para el género Bifidobacterium</i>	25
<i>Presencia o ausencia de bandas en gel</i>	25
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL GEN SBH POR PCR EN PUNTO FINAL	27
<i>Diseño de primers específicos para sbh en Bifidobacterium longum y Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	27
<i>Resultados de amplificación del gen de sal biliar hidrolasa (sbh)</i>	30
<i>Comparación entre las cepas analizadas</i>	31
CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DEL ARN EXTRAÍDO	32
<i>Optimización de gel de agarosa utilizando NaClO (hipoclorito de sodio)</i>	32
<i>Concentraciones y pureza medidas con espectrofotometría por Nanodrop</i>	33
<i>Integridad del ARN en gel de agarosa</i>	34
SÍNTESIS DE ADNC Y VALIDACIÓN	35
<i>Confirmación de la síntesis de cDNA</i>	35
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN SBH POR PCR EN TIEMPO REAL.	36
<i>Valores de Ct en los distintos tratamientos</i>	36
<i>Comparación de expresión relativa</i>	37
<i>Cálculo del $\Delta\Delta Ct$</i>	38
DISCUSIÓN	40
<i>Inducción de la expresión génica por sales biliares</i>	40
<i>Comparación entre cepas: B. longum y B. pseudocatenulatum</i>	41
<i>Implicaciones funcionales del aumento en la expresión de sbh</i>	42
CONCLUSION	43
REFERENCIAS	45

INTRODUCCION

Las bifidobacterias son un grupo de bacterias beneficiosas que residen predominantemente en el intestino humano, especialmente en el colon. Estas bacterias desempeñan un papel crucial en la digestión y absorción de nutrientes. Participan activamente en la fermentación de fibras dietéticas no digeribles, produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como el acetato, propionato y butirato los cuales son esenciales para la salud colónica y la energía del huésped, promoviendo una función intestinal óptima y proporcionando nutrientes para las células epiteliales del colon (Rivière *et al.*, 2016; Turróni *et al.*, 2012). Además, estos compuestos tienen efectos beneficiosos sobre la salud metabólica, como la regulación de los niveles de colesterol y la mejora de la sensibilidad a la insulina (Koh *et al.*, 2016).

Las bifidobacterias también juegan un papel fundamental en la modulación y maduración del sistema inmune, regulando las respuestas inmunológicas mediante la influencia sobre la producción de citocinas y la actividad de las células inmunitarias. Al fortalecer la barrera intestinal, contribuyen a prevenir infecciones y enfermedades inflamatorias intestinales, como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Lomax & Calder, 2009; O'Callaghan & van Sinderen, 2016). La modulación de la microbiota intestinal por parte de las bifidobacterias también se ha relacionado con la prevención de enfermedades metabólicas, cardiovasculares y otras afecciones relacionadas con la disbiosis (Ouwehand *et al.*, 2017).

Bifidobacterium es un género de bacterias grampositivas, anaerobias y no esporuladas. Se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal humano, especialmente en el intestino de lactantes y adultos, y es conocida por su capacidad para fermentar carbohidratos complejos, como oligosacáridos, presentes en la dieta humana. La fermentación de estos carbohidratos produce ácidos grasos de cadena corta como el ácido acético y el ácido láctico, que son beneficiosos para la salud intestinal y metabólica (Gueimonde *et al.*, 2007; Turróni *et al.*, 2012). Esta especie también juega un papel importante en la inhibición del crecimiento de patógenos intestinales, ya que produce ácidos orgánicos que disminuyen el pH del intestino, creando un ambiente desfavorable para bacterias dañinas (Gänzle, 2015).

B. pseudocatenulatum también tiene la capacidad de metabolizar oligosacáridos dietéticos específicos, como los galacto-oligosacáridos y fructo-oligosacáridos, y por ello se ha estudiado su presencia en la microbiota intestinal de lactantes alimentados con fórmula o leche materna (Turróni *et al.*, 2009; Sela & Mills, 2010). Además, algunos estudios han sugerido su posible papel en la modulación del sistema inmunológico y en la prevención de procesos inflamatorios intestinales. Por

otro lado, *B. longum* es una de las especies más representativas y abundantes en el intestino de los lactantes, reconocida por su capacidad para utilizar una amplia gama de carbohidratos, su producción de compuestos antimicrobianos como bacteriocinas, y su potencial para modular la respuesta inmune y mantener la integridad de la barrera intestinal (Arboleya *et al.*, 2016; O'Callaghan & van Sinderen, 2016).

Se ha demostrado que *B. pseudocatenulatum* posee enzimas específicas, como las sal biliar hidrolasas (*SBH*), que permiten la fermentación de compuestos más complejos y son clave para la tolerancia a las sales biliares, esenciales en su capacidad probiótica. Las sal biliar hidrolasas (*SBH*) descomponen los ácidos biliares, lo que permite que las bifidobacterias sobrevivan en el entorno hostil del tracto intestinal (Zhang *et al.*, 2017). Estas enzimas, además, se han asociado con la capacidad de mejorar la microbiota intestinal, promover la salud metabólica y regular el equilibrio lipídico (Bunesova *et al.*, 2015).

En este estudio se trabajó con las cepas *B. longum* LBUX23 y *B. pseudocatenulatum* JCLA3, las cuales fueron aisladas por nuestro grupo de investigación a partir de muestras fecales de recién nacidos sanos y se encuentran actualmente en proceso de caracterización, donde se evalúan distintos aspectos de su comportamiento fisiológico y potencial probiótico (González-Vázquez *et al.*, 2022; Reyes Castillo *et al.*, 2023).

El objetivo de este estudio fue analizar la expresión relativa del gen que codifica para la sal biliar hidrolasa (*sbh*) en las cepas *B. pseudocatenulatum* JCLA3 y *B. longum* LBUX23 mediante PCR en tiempo real (qPCR), comparando condiciones con y sin inducción por sales biliares (Oxgall), con el fin de explorar su posible capacidad para responder a ambientes gastrointestinales simulados.

MARCO TEÓRICO

Sal biliar hidrolasas (*SBH*)

Según la clasificación de la Enzyme Commission (EC) establecida por la IUPAC-IUBMB, las enzimas sal biliar hidrolasas se agrupan bajo el número EC 3.5.1.24, correspondiente a la colilglicina hidrolasa. Este número indica que pertenecen al grupo de las hidrolasas (EC 3), que actúan sobre enlaces carbono-nitrógeno no peptídicos (EC 3.5), específicamente sobre enlaces amida lineales (EC 3.5.1).

Tras su síntesis en el hígado, los ácidos biliares primarios (como el ácido cólico y el ácido quenodesoxicólico), se conjugan con glicina o taurina para producir sales biliares las cuales son almacenadas en la vesícula biliar. Las enzimas *SBH* actúan específicamente sobre las sales biliares conjugadas, catalizando la hidrólisis del enlace amida en las sales biliares conjugadas liberando ácidos biliares libres y aminoácidos (Fig. 1), un paso crucial para la producción de ácidos biliares secundarios por bacterias intestinales (Foley *et al.*, 2019). Esta conjugación aumenta la solubilidad de los ácidos biliares, facilitando su función en la emulsificación de grasas durante la digestión.

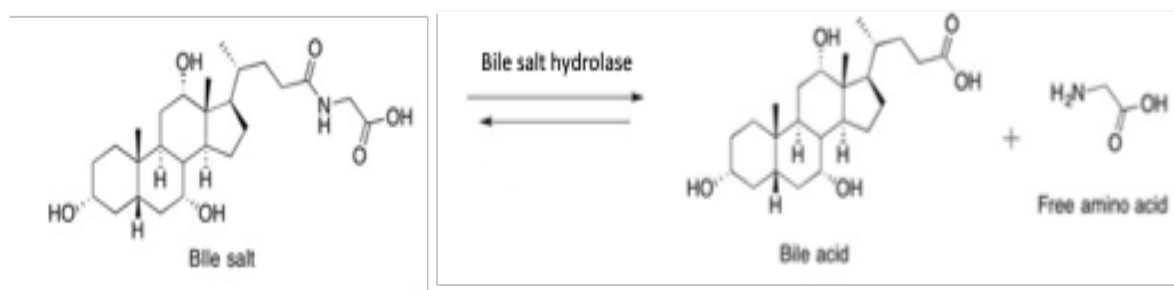


Figura 1. Reacción de hidrólisis de una sal biliar para liberar ácido biliar y su aminoácido (lisina o taurina). Fuente: Brandvold *et al.*, 2019.

Este tipo de actividad enzimática desempeña un papel crucial en el proceso de desconjugación de sales biliares primarias por la microbiota intestinal, facilitando su posterior transformación en ácidos biliares secundarios, los cuales participan en múltiples funciones digestivas y de señalización metabólica (Jones *et al.*, 2008; Manual MSD, 2023).

Especificidad de las *SBH*

La especificidad de las *SBH* varía entre diferentes especies bacterianas. Algunas *SBH* muestran una mayor afinidad por sales biliares conjugadas con glicina, mientras que otras prefieren aquellas conjugadas con taurina. Esta especificidad se debe a diferencias en la estructura del sitio activo de la enzima y en las interacciones con los grupos conjugados de las sales biliares (Song *et al.*, 2019).

Importancia Biológica

Debido a su papel en la preparación de los ácidos biliares para una mayor modificación microbiana, la *SBH* puede considerarse como el guardián de la formación de ácidos biliares secundarios. El resultado de la actividad de desconjugación de la *SBH* es un cambio neto en las propiedades fisicoquímicas del conjunto de ácidos biliares, que en última instancia lo hace más hidrófobo. La desconjugación de BSH también está fuertemente correlacionada con la excreción de ácidos biliares. Se ha sugerido que aumentar la actividad de *SBH* es una estrategia eficaz para tratar la obesidad y la hipercolesterolemia, ya que, si los ácidos biliares se excretan en exceso, las reservas de colesterol producidas endógenamente se agotan para compensar la producción de bilis fresca. Se ha propuesto que la actividad de *SBH* es responsable de los efectos beneficiosos para la salud de varios probióticos comunes (Brandvold *et al.*, 2019).

La actividad de la BSH tiene implicaciones significativas en la fisiología del huésped. Al modificar la composición del conjunto de ácidos biliares en el intestino, la BSH influye en la solubilización y absorción de lípidos dietéticos, así como en la regulación de rutas metabólicas claves relacionadas con el colesterol y la glucosa. Además, la actividad de la BSH puede afectar la señalización a través de receptores nucleares como el receptor FXR, que desempeña un papel en la homeostasis energética y metabólica. (Yao, L. *et al.*, 2022)

Presencia del gen *sbh* en bifidobacterias

En estudios genómicos recientes, se ha identificado la presencia del gen *sbh*, que codifica para la enzima sal biliar hidrolasa (EC 3.5.1.24), en diversas especies del género *Bifidobacterium*.

El gen *sbh* puede encontrarse en diferentes configuraciones dentro del genoma bacteriano, a menudo asociado con genes relacionados con el transporte de sales biliares o con mecanismos de resistencia a compuestos biliares. No obstante, la simple presencia del gen no garantiza necesariamente su expresión activa, ya que esta puede estar regulada por factores ambientales, condiciones de cultivo o mecanismos epigenéticos. Por ello, la evaluación funcional de la actividad *SBH* debe complementarse con análisis de expresión génica y ensayos enzimáticos.

En el caso de *B. longum* LBUX23 y *B. pseudocatenulatum* JCLA3, el análisis *in silico* ha revelado la presencia del gen *sbh*, lo cual sugiere un posible potencial para la desconjugación de sales biliares. Sin embargo, es necesario validar experimentalmente si dicho gen es efectivamente expresado y funcional bajo condiciones gastrointestinales simuladas. (González-Vázquez *et al.*, 2022; Reyes Castillo *et al.*, 2023).

Estudios previos también han descrito una diversidad de variantes del gen *sbh* dentro del género *Bifidobacterium*, lo cual podría explicar diferencias en la especificidad de sustrato (sales biliares conjugadas con glicina o taurina) o en la eficiencia de la actividad enzimática entre especies. Esta variabilidad genética puede representar un factor clave para comprender las diferencias en el comportamiento probiótico de cada cepa.

Mecanismos de regulación de la expresión de *SBH*

La expresión de las sal biliar hidrolasas (*SBH*) está estrictamente regulada por varios factores internos y ambientales. Uno de los mecanismos más importantes es la inducción por la presencia de sales biliares en el entorno intestinal. Estas moléculas actúan como inductores, activando la transcripción del gen *sbh* a través de un sistema de respuesta reguladora específico. En condiciones de altas concentraciones de sales biliares, las bacterias pueden aumentar la expresión de este gen para descomponer las sales biliares y adaptarse al ambiente hostil (Pope *et al.*, 1995).

Además, factores como el pH del intestino y la disponibilidad de nutrientes también modulan la expresión de las *SBH*. Las bacterias que colonizan el tracto gastrointestinal deben adaptarse a las fluctuaciones de pH, especialmente en la transición entre el estómago y el intestino, lo que podría influir en la actividad de las *SBH*. Igualmente, la disponibilidad de nutrientes como los carbohidratos o proteínas puede inducir la expresión de las hidrolasas de sales biliares, ya que estas bacterias dependen de la digestión de los productos de su metabolismo para sobrevivir y proliferar.

La regulación de proteínas de respuesta al estrés, como las proteínas chaperonas y los sistemas de defensa contra el daño por sales biliares, también desempeña un papel clave en la expresión de *sbh*. Estos mecanismos permiten a las bacterias resistir la toxicidad de las sales biliares y mantener su actividad metabólica en condiciones adversas (Perry *et al.*, 2017).

Por último, la interacción con otras bacterias en el microbioma intestinal podría influir en la expresión de las *SBH*. Se ha demostrado que el microbioma intestinal, en su totalidad, juega un papel importante en la modulación de la actividad enzimática de las bacterias intestinales, lo que sugiere que *Bifidobacterium* podría responder a señales provenientes de otras especies bacterianas para ajustar la expresión de sus enzimas, incluyendo las *SBH*.

Impacto de la actividad *SBH* en la microbiota intestinal

La actividad *SBH* modifica la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal. Al desconjugar sales biliares, estas enzimas promueven la formación de ácidos biliares secundarios, los cuales actúan como moléculas señalizadoras en diversas rutas metabólicas del huésped (Revista Nutrición Clínica y Metabolismo, 2020). Esto puede influir en la integridad de la mucosa intestinal y en la modulación del sistema inmunológico, lo que contribuye a la prevención de enfermedades metabólicas e inflamatorias (Jones *et al.*, 2008).

Relevancia de *SBH* en aplicaciones probióticas y clínicas

La actividad *SBH* en bacterias probióticas ha sido ampliamente estudiada por su implicación en la reducción de los niveles de colesterol sérico. La desconjugación de sales biliares impide su reabsorción intestinal, lo que induce al organismo a sintetizar nuevas sales a partir del colesterol, disminuyendo sus niveles en sangre (Rodríguez, 2017). Esta acción convierte a las *SBH* en un blanco prometedor para el diseño de probióticos con efectos hipocolesterolémicos. Además, el género *Bifidobacterium* presenta genes asociados a la resistencia frente a condiciones gastrointestinales adversas, lo que refuerza su potencial como probióticos clínicamente relevantes.

Métodos para evaluar la actividad *SBH*

Existen diversos métodos utilizados para evaluar la actividad de las sal biliar hidrolasas (*SBH*), los cuales permiten medir la capacidad de estas enzimas para desconjugar las sales biliares conjugadas, generando ácidos biliares libres. Cada técnica tiene sus propias ventajas, dependiendo de los objetivos experimentales y las características de la muestra.

Uno de los métodos más comunes son los ensayos enzimáticos fluorométricos, que aprovechan la liberación de productos fluorescentes generados durante la hidrólisis de las sales biliares conjugadas. Esta técnica permite realizar mediciones continuas y es altamente sensible, aunque requiere cuidado para evitar interferencias de compuestos fluorescentes en las muestras.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es otra técnica ampliamente utilizada. Permite la separación precisa de los productos generados por la actividad de las *SBH*, y la medición de estos productos a través de su tiempo de retención. Esta técnica es conocida por su alta resolución y precisión, aunque puede requerir equipos especializados y un tiempo de análisis más largo en comparación con otras opciones.

Los ensayos con sustratos radiactivos también se han empleado para evaluar la actividad de las *SBH*. Aunque ofrecen una alta precisión y sensibilidad, requieren una manipulación cuidadosa de materiales radiactivos y el uso de equipos específicos para la detección de radiación, lo que implica consideraciones de seguridad.

El uso de métodos basados en la medición de cambios en el pH es otra opción común. La hidrólisis de las sales biliares genera ácidos biliares libres, lo que provoca una disminución en el pH de la muestra. Este tipo de ensayo es rápido, sencillo y económico, pero puede carecer de la sensibilidad y especificidad que ofrecen otras técnicas como la HPLC.

También se emplean métodos espectrofotométricos para evaluar la actividad *SBH*, especialmente cuando los productos de la hidrólisis de las sales biliares tienen características absorbentes en longitudes de onda específicas. Aunque son métodos relativamente sencillos y económicos, su especificidad puede ser menor en comparación con otros enfoques más avanzados. (González-Vázquez *et al.*, 2022).

Finalmente, las técnicas genéticas, como la PCR en tiempo real (qPCR), se utilizan para evaluar indirectamente la actividad de las *SBH* mediante la medición de la expresión de los genes relacionados. Aunque no proporcionan una medición directa de la actividad enzimática, estas técnicas permiten obtener información valiosa sobre la regulación de la expresión génica bajo diferentes condiciones experimentales.

Comparación de la actividad *SBH* entre especies bacterianas

Diferentes géneros bacterianos como *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Clostridium* y *Bifidobacterium* poseen genes que codifican *SBH*, aunque su número y especificidad varían entre especies. Por

ejemplo, algunas especies de lactobacilos y clostridios en el rumen pueden producir metabolitos como acetato y lipopolisacáridos derivados de la desconjugación de sales biliares (Axon Comunicación, 2020). Estas variaciones influyen tanto en la capacidad de colonización intestinal como en los beneficios probióticos que pueden ofrecer.

Identificación del gen *sbh* y su relevancia en *Bifidobacterium*

La sal biliar hidrolasa (*SBH*, por sus siglas en inglés) es una enzima que participa en la hidrólisis de las sales biliares conjugadas, escindiendo el enlace amida entre el ácido biliar y su aminoácido conjugado (glicina o taurina). Esta reacción libera ácidos biliares libres y, en consecuencia, puede modificar la composición del entorno intestinal. La actividad *SBH* ha sido ampliamente estudiada en bacterias intestinales como *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium*, debido a su potencial probiótico y sus implicaciones en la regulación del colesterol, tolerancia a las sales biliares y metabolismo hepático.

En *Bifidobacterium*, el gen que codifica para esta enzima suele identificarse como *cbh* (choloylglycine hydrolase). La presencia y secuencia del gen pueden variar ligeramente entre cepas, pero su detección mediante PCR con cebadores específicos ha sido una herramienta clave para caracterizar su potencial funcional.

PCR para detección genética

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular que permite la amplificación específica de secuencias de ADN. Esta técnica se basa en ciclos repetitivos de desnaturalización del ADN, alineamiento de cebadores (primers) y extensión mediante una ADN polimerasa termoestable, como Taq pol. Su sensibilidad y especificidad la convierten en una herramienta ideal para detectar genes como *cbh* en mezclas complejas de ADN bacteriano.

La amplificación exitosa del gen *cbh* en una muestra indica la presencia del marco de lectura correspondiente a la enzima BSH. Sin embargo, esta detección por sí sola no garantiza su expresión funcional, por lo que es necesario complementar con análisis de expresión génica (RT-qPCR) y ensayos bioquímicos de actividad.

Expresión génica del gen *sbh* mediante RT-qPCR

La expresión génica se refiere al proceso por el cual la información contenida en un gen se transcribe a ARN mensajero (ARNm) y, eventualmente, se traduce en una proteína funcional. Para estudiar si

un gen como *sbh* se encuentra activo bajo ciertas condiciones, es necesario cuantificar sus niveles de transcripción. Una de las técnicas más precisas y sensibles para este propósito es la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real (RT-qPCR) (Kubista *et al.*, 2006).

La RT-qPCR combina dos etapas fundamentales: primero, la transcripción reversa (RT), en la que el ARN total extraído de las células se convierte en ADN complementario (cDNA) mediante una transcriptasa reversa; y segundo, la PCR en tiempo real (qPCR), que amplifica el cDNA mediante primers específicos y permite cuantificar el producto amplificado en tiempo real gracias a fluoróforos que emiten señales proporcionales a la concentración del ADN amplificado (Bustin *et al.*, 2009).

Este método permite comparar la cantidad de ARNm del gen de interés (en este caso *cbh*) en distintas condiciones experimentales, como en presencia o ausencia de sales biliares, las cuales pueden actuar como inductores. Para asegurar resultados confiables, los datos se normalizan con genes constitutivos o *housekeeping* genes que tienen una expresión estable, como *16S rRNA*, *gapdh* o *rpoB* (Vandesompele *et al.*, 2002).

La cuantificación relativa de expresión se realiza con el método $\Delta\Delta Ct$ (doble delta Ct), que compara el cambio de expresión entre las condiciones tratadas y no tratadas, utilizando como referencia el gen constitutivo. Esta estrategia permite calcular diferencias relativas en la expresión de un gen específico bajo distintos tratamientos, con alta sensibilidad y especificidad (Livak & Schmittgen, 2001).

Determinación de la actividad enzimática de la sal biliar hidrolasa (SBH)

La medición de la actividad enzimática de las *SBH* puede realizarse mediante ensayos colorimétricos o cromatográficos, dependiendo del tipo de muestra y la sensibilidad requerida. Una estrategia común es utilizar cultivos bacterianos inducidos con sales biliares como oxgall, y posteriormente analizar la actividad en el sobrenadante (extracelular) o en los lisados celulares (intracelular) mediante la detección de los productos de la reacción (Grill *et al.*, 2000). Para ello, suele usarse como sustrato ácido taurocólico o glicocólico y medir la liberación del aminoácido libre con métodos colorimétricos, como el de ninhidrina (Tanaka *et al.*, 1999).

Cuando se utilizan muestras celulares, como pellet bacteriano resuspendido, es esencial determinar previamente la concentración total de proteínas (por ejemplo, usando el método de Bradford) para expresar la actividad enzimática relativa como unidades por miligramo de proteína (Bradford, 1976). Esto permite comparar de forma estandarizada la actividad entre diferentes muestras o cepas bacterianas.

La actividad *SBH* puede medirse tanto en fracciones extracelulares como intracelulares. En el caso de *Bifidobacterium*, estudios han demostrado que la actividad *SBH* puede localizarse en la fracción intracelular, especialmente cuando las células han sido inducidas previamente con sales biliares (Ruiz *et al.*, 2013).

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones de cultivo

Las cepas *Bifidobacterium longum* LBUX23 y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCLA3 utilizadas en este estudio fueron proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-X. Estas cepas estaban conservadas a -70 °C en glicerol al 20%, lo que permitió su preservación durante largos periodos sin pérdida significativa de viabilidad. Ambas cepas se cultivaron en medio MRS suplementado con 0.05% de HCl-cisteína (MRS-C). El medio se preparó en condiciones anaerobias burbujeando CO₂ para desplazar el oxígeno y los frascos se sellaron herméticamente con tapones de hule y arillo de metal, posteriormente se esterilizaron a 15 lb/in² de presión por 15 min. Los cultivos se incubaron a 37 °C en condiciones anaerobias y con agitación a 180 rpm

Activación de cepas

Se tomó una alícuota de cada cepa conservada (1.5 mL). Las bacterias se lavaron 2X con agua estéril a 180 rpm por 5 min para eliminar el exceso de glicerol.

Las bacterias se suspendieron en 2 mL de medio MRS-C y se incubaron a 37 °C con agitación orbital de 180 rpm por 24 horas.

Inducción de la expresión del gen *sbh*

Con el objetivo de evaluar la expresión del gen *sbh*, se establecieron 2 condiciones de cultivo para cada cepa:

1. Medio MRS-C (condición estándar).
2. Medio MRS-C suplementado con 0.3% p/v de O₂gall.

Una vez activados los microorganismos, se inocularon viales de 80 mL de caldo MRS-C a una densidad óptica inicial (DO_i) de 0.5 en cada una de las condiciones de cultivo mencionadas y se incubaron hasta alcanzar la máxima densidad celular de microorganismos viables (27 horas).

Una vez pasado el tiempo, las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron 2 veces con solución salina estéril.

Posteriormente se resuspendieron en solución RNA Later y se homogenizó la solución, se formaron alícuotas de 1 mL cada una para su posterior refrigeración y preservación hasta el momento de trabajar con ellas

Extracción de ADN de *B. longum* y *B. pseudocatenulatum*

La extracción de ADN genómico de *B. longum* y *B. pseudocatenulatum* se realizó utilizando el Wizard Genomic DNA Purification Kit de Promega, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Para la lisis celular, las células fueron suspendidas en el amortiguador de lisis proporcionado y se trató con lisozima a una concentración adecuada. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora para permitir una lisis completa de las células. Posteriormente, se añadió una solución de proteínas para eliminar impurezas, y se realizó una extracción con cloroformo para separar las proteínas y otros contaminantes, dejando el ADN en la fase acuosa.

El ADN genómico se recuperó mediante precipitación con etanol al 100%, y finalmente se resuspendió con la solución de rehidratación para DNA incluido en el kit, el ADN extraído se cuantificó mediante espectrofotometría para verificar su calidad y concentración.

Extracción de ARN

Extracción por Trizol

La extracción de ARN de *B. longum* LBUX23 y *B. pseudocatenulatum* JCLA3 se realizó utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) mediante lisis mecánica con mortero y pistilo, como se describe a continuación:

Tras recuperar el paquete celular y retirar el RNALater, las células se colocaron en hielo seco y se resuspendieron en Trizol. Posteriormente, las muestras fueron transferidas a un mortero previamente enfriado y se procedió con la maceración utilizando el pistilo, cuidando que las muestras no se descongelaran durante el proceso para evitar la degradación del ARN.

Una vez completada la lisis, se continuó con el protocolo estándar de Trizol, que incluye la adición de cloroformo para separar las fases, seguido de la precipitación del ARN con isopropanol. Para maximizar la recuperación del ARN, el tiempo de precipitación se extendió a 24 horas a -20 °C, y luego se incubó por 20 minutos adicionales a -70 °C. Esto permitió una mayor precipitación del ARN. Después de la precipitación, el ARN fue centrifugado a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, el

sobrenadante fue eliminado y el ARN fue lavado con etanol al 70%. Finalmente, el ARN se resuspendió en agua libre de nucleasas y se cuantificó para evaluar su calidad y cantidad.

Extracción por Kit QIAGEN

Se realizó la extracción de ARN utilizando el kit RNeasy de QIAGEN, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Este procedimiento permitió obtener ARN de alta calidad y cantidad. Tras la extracción, se corrió un gel de agarosa al 1% para evaluar la integridad del ARN. En el gel, se observaron bandas nítidas, lo que indicó la calidad del ARN extraído.

Para eliminar cualquier posible contaminación de ADN genómico, el ARN fue resuspendido en agua libre de nucleasas y tratado con las columnas gDNA Eliminator del kit RNeasy Plus de QIAGEN, que permiten la eliminación eficiente de ADN contaminante sin comprometer la calidad del ARN. Finalmente, el ARN extraído fue cuantificado utilizando el equipo Nanodrop, lo que permitió determinar su concentración y pureza antes de ser utilizado para los análisis de expresión génica.

Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración y pureza de ADN y ARN fueron determinadas mediante espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop (Thermo Scientific). Se realizaron mediciones en un rango de longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm para evaluar tanto la concentración total como la calidad.

El valor de absorbancia a 260 nm fue utilizado para calcular la concentración, mientras que la relación A260/A280 proporcionó una indicación de la pureza de la muestra en cuanto a contaminantes, como proteínas y compuestos fenólicos. Se consideraron muestras con una relación A260/A280 entre 1.8 y 2.0 como adecuadas para análisis posteriores.

Además, la relación A260/A230 se utilizó para evaluar la presencia de contaminantes adicionales, tales como sales o compuestos orgánicos, con valores ideales cercanos a 2.0. Las mediciones se realizaron en triplicado para asegurar la consistencia de los resultados.

Electroforesis en geles de agarosa

La calidad e integridad del ADN y del ARN extraídos se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Se prepararon geles al 1 % en buffer TAE 1X. Las muestras fueron mezcladas con buffer de carga 5X (que contenía el agente intercalante GelRed) y depositadas en los pocillos del gel. Para observar los productos de PCR, los geles se prepararon al 2 y 2.5 %.

La corrida electroforética se realizó a 80 V durante aproximadamente 50 minutos. Posteriormente, las bandas se visualizaron en un sistema de transiluminación UV, lo que permitió observar el material genético en función de la presencia de bandas bien definidas y sin señales de degradación.

Variante para RNA: Para evaluar la calidad del ARN, se prepararon geles de agarosa al 1% con 0.1% de NaClO (cloralex), siguiendo el protocolo descrito por Aranda *et al.* (2012). Se realizaron varias preparaciones de geles con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio, ajustando la cantidad de NaClO hasta obtener la mejor visualización de las bandas, lo que permitió asegurar la integridad del ARN extraído.

En cada pozo del gel se cargaron 1000 ng de ARN resuspendido en buffer de carga 5X, que contenía el agente intercalante GelRed. La electroforesis se llevó a cabo a 80 V durante 50 minutos, lo que facilitó una separación adecuada de las moléculas de ARN. Posteriormente, las bandas de ARN se visualizaron utilizando un sistema de transiluminación UV, lo que permitió evaluar la calidad y la integridad del ARN en las muestras.

Primers y sondas

Se diseñó un par de primers específicos para el gen de sal biliar hidrolasa (*sbh*) basados en las secuencias de *sbh* de *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* obtenidas de (González-Vázquez *et al.*, 2022 y Reyes Castillo *et al.*, 2023). Los primers se diseñaron utilizando el software **Primer3** que considera factores como el contenido de GC, la temperatura de fusión (T_m), la longitud del amplicón, y la especificidad.

Para asegurar la adecuación de los primers, se analizaron sus propiedades utilizando la herramienta bioinformática **OligoCalc**, con el fin de verificar la ausencia de dimerización o formación de estructuras secundarias que pudieran interferir en la amplificación. Los primers fueron sintetizados en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología de la UNAM, y se prepararon soluciones madre a una concentración de 100 µM, las cuales fueron posteriormente diluidas a 10 µM para su uso en las reacciones de PCR.

En ensayos de PCR en tiempo real, se utilizaron primers y sonda TaqMan específicos del género *Bifidobacterium* (Furet *et al.*, 2009) y para la detección del gen *sbh* primers y sonda TaqMan sintetizados a partir de la secuencia del gen *sbh* de *B. pseudocatenulatum* (González-Vázquez *et al.*, 2022).

Los oligos de *sbh* fueron sintetizados por la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología celular de la UNAM, y se prepararon soluciones madre a una concentración de 100 μ M, que posteriormente fueron diluidas a 10 μ M para su uso experimental. En la **Tabla 1** se presenta un resumen de los primers y la sonda utilizados, incluyendo su tipo, organismo objetivo, Gen de interés, amplicón y temperatura de hibridación. Por razones de confidencialidad, no se incluye la secuencia de la sonda TaqMan.

Tabla 1. Primers y sonda utilizados en este estudio para la detección del gen *sbh* y del género *Bifidobacterium*.

Nombre del Oligo/Sonda	Tipo	Organismo objetivo	Gen de interés	Tamaño del amplicón	Tm (°C)	Referencia
SBH_ps1	Primer Forward	<i>B. pseudocatenulatum</i>	SBH	244 pb	60	<i>Este estudio</i>
SBH_ps2	Primer Reverse	<i>B. pseudocatenulatum</i>	SBH		60	<i>Este estudio</i>
SBH_lg1	Primer Forward	<i>B. longum</i>	SBH	198 pb	60	<i>Este estudio</i>
SBH_lg2	Primer Reverse	<i>B. longum</i>	SBH		60	<i>Este estudio</i>
TaqMan-SBH	Sonda	<i>B. pseudocatenulatum</i>	SBH	<100 pb	60	(González-Vázquez <i>et al.</i> , 2022).
TaqMan-16S Bif.	Sonda	Género <i>Bifidobacterium</i>	16S rRNA	139 pb	60	(Furet <i>et al.</i> , 2009)
Bif_F	Primer Forward	Género <i>Bifidobacterium</i>	16S rRNA		60	(Furet <i>et al.</i> , 2009)
Bif_R	Primer Reverse	Género <i>Bifidobacterium</i>	16S rRNA		60	(Furet <i>et al.</i> , 2009)

Identificación molecular del género *Bifidobacterium* y el gen *sbh* por PCR en punto final

Para la identificación molecular del género *Bifidobacterium* en las muestras, se utilizaron primers específicos tanto para el género como para amplificar el gen de sal biliar hidrolasa (*sbh*). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador (Biometra), utilizando ADN genómico extraído como molde. El objetivo principal fue confirmar la presencia de *Bifidobacterium* en las muestras y evaluar las condiciones óptimas para amplificar el gen de interés.

Las condiciones de PCR fueron optimizadas con temperaturas de alineamiento 60 °C, Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen total de 50 μ L, que contenía 1X de buffer de reacción DreamTaq (Thermo Fisher), 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 1 μ M de cada uno de los primers y 1 U de DreamTaq polymerase (Thermo Fisher). El protocolo de PCR consistió en una desnaturalización

inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 60 °C por 30 segundos, y extensión a 72 °C por 30 segundos. Finalmente, se realizó una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

Análisis de la expresión del gen *sbh* por PCR en tiempo real

Síntesis de cDNA con kit High-Capacity RNA-to-cDNA™.

Se utilizaron las muestras de ARN previamente extraídas de *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* a partir de las cuales se sintetizó ADN complementario (cDNA) utilizando 750 ng de ARN como plantilla, empleando el kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ (Applied Biosystems), de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El protocolo de síntesis de cDNA consistió en los siguientes pasos generales:

1. Desnaturalización del ARN: Incubación a 65 °C durante 5 minutos para desnaturalizar el ARN y facilitar su conversión en cDNA.
2. Síntesis de cDNA: Se añadieron 10 uL de 2X RT Buffer Mix y 1 uL de 20x enzyme mix (RT transcriptasa) por reacción, y se incubó a 37 °C durante 60 minutos para la conversión del ARN en cDNA.
3. Inactivación de la transcriptasa reversa: La reacción se inactivó mediante incubación a 85 °C durante 5 minutos.

Este cDNA generado se utilizó como plantilla para las reacciones de PCR en tiempo real, con el fin de evaluar la expresión del gen de sal biliar hidrolasa(*sbh*).

Condiciones de reacción de PCR en tiempo real

Para la cuantificación relativa de la expresión del gen de sal biliar hidrolasa (*sbh*), se utilizó el sistema StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems), con el StepOne Software para el análisis de los datos. La cuantificación relativa permite comparar la expresión del gen *sbh* entre las muestras, utilizando como control el cDNA de muestras provenientes de Medio MRS-C sin sales biliares, en las cuales no debería haber expresión génica.

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron en un volumen final de 15 µL por muestra, utilizando 0.75 µL de sonda TaqMan, 6.8 µL uL de cDNA y 7.3 µL de master mix en cada reacción.

Se utilizó un control negativo que consistió en 0.75 μL de sonda TaqMan, 6.8 μL uL de H_2O libre de nucleasas y 7.3 μL de master mix, como gen de referencia o housekeeping se utilizó el gen específico de género.

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

- Desnaturalización inicial: 94 °C durante 1 minuto.
- 40 ciclos de amplificación:
 1. Desnaturalización: 94 °C durante 15 segundos.
 2. Alineamiento: 60 °C durante 1 minuto.

Los primers y sondas fueron diseñados con base en secuencias obtenidas del NCBI. La sonda TaqMan utilizada para la amplificación del gen sal biliar hidrolasa (*sbh*) fue específica para las secuencias de *B. pseudocatenulatum*, con el número de acceso (PRJNA924960) para *B. Longum* en GenBank. Y (PRJNA795522) para *B. pseudocatenulatum*

Cuantificación relativa por el método $\Delta\Delta\text{Ct}$

La cuantificación relativa de la expresión génica se realizó mediante el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ (comparative Ct method). Para cada muestra se amplificó el gen blanco (sal biliar hidrolasa) y un gen de referencia endógeno, previamente validado como estable en las condiciones experimentales.

Cada reacción se realizó por triplicado y los valores de Ct obtenidos fueron promediados. Se calculó el ΔCt restando el Ct del gen de referencia al Ct del gen de interés. Posteriormente, el $\Delta\Delta\text{Ct}$ se obtuvo comparando los ΔCt de las muestras tratadas frente a las muestras control. Finalmente, la expresión relativa se estimó mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, que permite determinar los cambios relativos en la expresión génica en comparación con una condición basal o control.

RESULTADOS

Crecimiento de *Bifidobacterium longum* LBUX 23 y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCLA3.

El crecimiento de *B. longum* y *B. pseudocatenulatum* se evaluó en las siguientes condiciones experimentales: (1) medio MRS-C sin modificaciones (control), (2) medio MRS-C suplementado con 0.3% p/v de Oxgall.

Para evaluar el crecimiento de *B. longum* y *B. pseudocatenulatum* se midió la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) a las 24 y 48 horas en medio MRS-C con y sin la adición de Oxgall.

Los resultados mostraron diferencias en la capacidad de crecimiento de ambas especies en función del tratamiento. En *B. longum*, el crecimiento a las 24 h, la DO_{600} en MRS-C fue de **3.84**, mientras que en el medio con Oxgall fue de **0.942**. A las 48 h, los valores registrados fueron **5.47** en MRS-C y **1.218** en MRS-C - Oxgall.

Por otro lado, *B. pseudocatenulatum*, mostró un comportamiento similar, aunque con valores de crecimiento relativamente menores en el medio con Oxgall en comparación con *B. longum*. el crecimiento en MRS-C presentó valores de DO_{600} de **3.42** a las 24 h y **5.62** a las 48 h, mientras que en el medio suplementado con Oxgall, los valores fueron considerablemente menores, con **0.756** a las 24 h y **0.9** a las 48 h.

Estos resultados indican que la presencia de Oxgall afecta negativamente el crecimiento de ambas especies, aunque *B. longum* parece tolerarlo en mayor medida que *B. pseudocatenulatum*.

A continuación, se presentan las gráficas de barras en función del crecimiento de *B. longum* (A) y *B. pseudocatenulatum* (B) en condiciones con el medio MRS-C y MRS-C – Oxgall

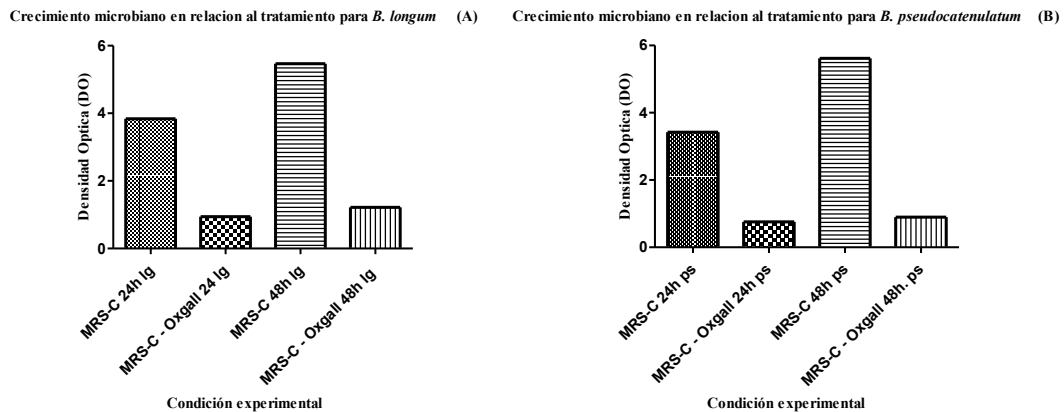


Figura 2. Crecimiento de (A) *B. longum* en medio MRS-C y MRS-C – Oxgall y B) *B. pseudocatenulatum* en medio MRS-C y MRS-C – Oxgall durante 24 y 48 horas

Tinción de Gram

Micrografías o descripciones de la morfología observada

Se realizaron tinciones de Gram en las cepas de *B. longum* y *B. pseudocatenulatum* a partir de un cultivo en MRS-C (Fig. 3A y 3B), para observar su morfología celular. Las micrografías obtenidas mostraron que ambas cepas presentaron una morfología característica de bacilos grampositivos, con forma de bastón, dispuestos principalmente en cadenas o en agrupaciones cortas. Esta observación es consistente con las características descritas para el género *Bifidobacterium*.

Adicionalmente, se realizaron tinciones en cultivos crecidos en medio MRS-C - Oxgall, donde no se observaron cambios morfológicos significativos en comparación con los cultivos en MRS-C (Fig. 3C y 3D). Sin embargo, se evidenció una menor densidad celular en las preparaciones teñidas provenientes de los cultivos con Oxgall, lo que concuerda con la reducción en la densidad óptica medida en estos tratamientos.

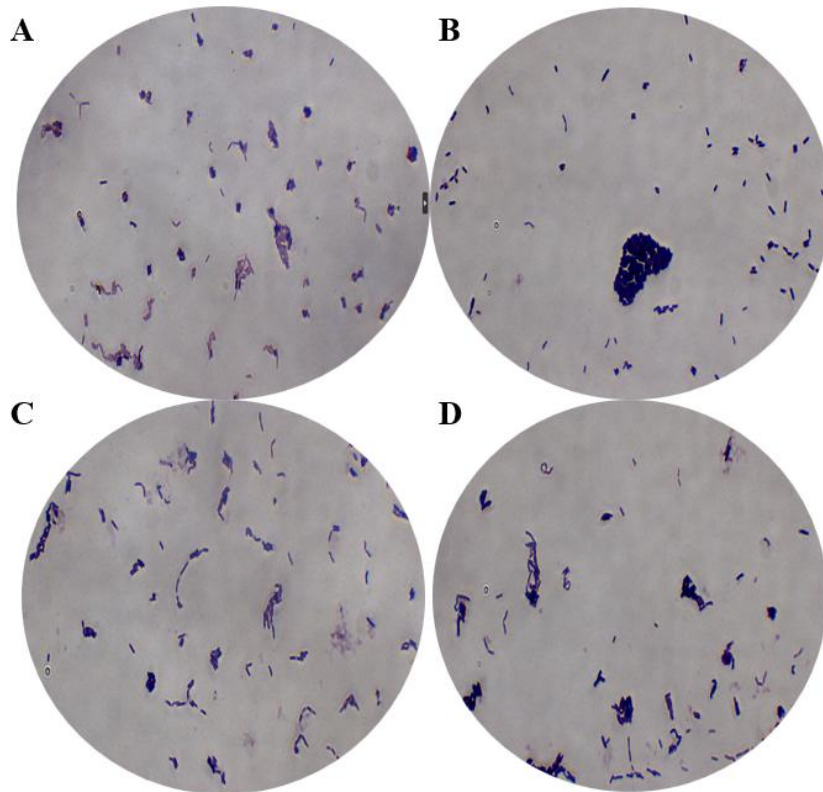


Figura 3. Tinción de Gram de A) *B. longum* y B) *B. pseudocatenulatum* al crecer en MRS-C, C y D) mismas cepas en medio MRS-C suplementado con O_xgall al 0.3%.

Confirmación de la tinción Gram-positiva

La tinción de Gram realizada en las cepas de *B. longum* y *B. pseudocatenulatum* mostró una coloración violeta característica, lo que indica que ambas cepas son Grampositivas. Este resultado fue consistente con las características morfológicas esperadas para el género *Bifidobacterium*, que se caracteriza por ser Grampositivo, con pared celular gruesa y sin formación de esporas. La coloración violeta observada tras la tinción confirmaría la presencia de peptidoglicano en la pared celular, que retiene el cristal violeta durante el procedimiento de tinción.

Extracción y cuantificación de ADN

Concentración y pureza del ADN

La cuantificación del ADN se realizó mediante espectrofotometría en un Nanodrop. Para *B. Pseudocatenulatum*, la concentración de ADN obtenida fue de **27.4 ng/μL**, con una relación 260/280 de 1.77, lo que sugiere una buena calidad en cuanto a contaminantes proteicos. Sin embargo, la relación 260/230 fue de 0.31, lo que indica la posible presencia de contaminantes orgánicos o sales. Para *B. longum*, la concentración de ADN fue de **32.9 ng/μL**, con una relación 260/280 de 1.76, indicando una calidad adecuada en cuanto a proteínas. La relación 260/230 fue de 0.37, lo que sugiere la presencia de algunos contaminantes, aunque en menor grado en comparación con *B. pseudocatenulatum*. Debido a las lecturas obtenidas, se realizó una corrida de gel de agarosa al 1% para verificar la calidad del ADN extraído, asegurando que no hubiera degradación significativa.

Posteriormente se realizó una preparación a 20 ng/uL de ADN de ambas cepas, las cuales fueron almacenadas a - 4°C para su futuro uso.

Integridad del ADN en gel de agarosa

Para evaluar la integridad del ADN extraído, se realizó una corrida en gel de agarosa al 1% y se visualizó bajo luz ultravioleta utilizando un transiluminador. Las bandas de ADN de *B. longum* y *B. pseudocatenulatum* se observaron claramente, con una morfología definida e intacta, lo que indica que el ADN extraído era de alta calidad y no presentaba fragmentación significativa. Las bandas

fueron evidentes y bien delimitadas, lo que sugiere que el ADN genómico estaba íntegro y adecuado para su uso en aplicaciones posteriores, como PCR.

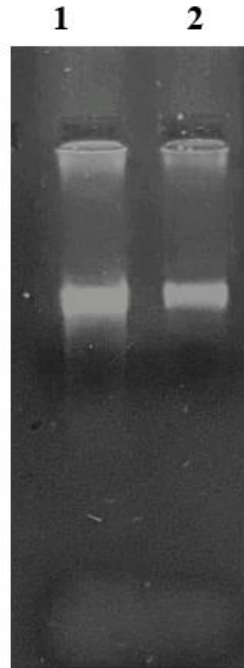


Figura 4. Análisis de integridad del ADN de *B. longum* y *B. pseudocatenulatum* por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed®. Carril 1: ADN extraído de *B. longum*; Carril 2: ADN extraído de *B. pseudocatenulatum*.

Identificación molecular de *Bifidobacterium*

PCR en punto final con primers específicos para el género *Bifidobacterium*

Presencia o ausencia de bandas en gel

Se preparó un gel de agarosa al 2.5% para la visualización de los productos amplificados por PCR. La electroforesis se realizó a 80 volts durante 50 minutos, lo que permitió obtener un resultado claro y esperado. En el gel se observaron bandas nítidas y bien definidas a 139 pb en las muestras de *B. longum* y *B. pseudocatenulatum*, correspondientes a la amplificación específica del gen del género *Bifidobacterium*. Las bandas fueron consistentes con la referencia del marcador de peso molecular, que cubría un rango de 100 pb a 1000 pb.

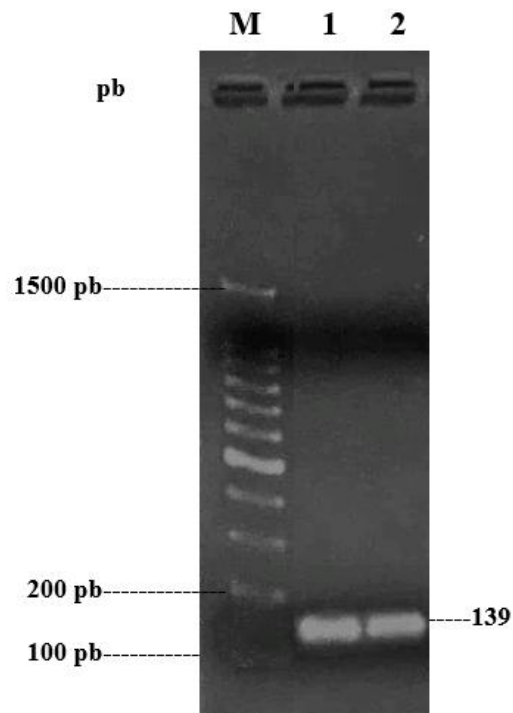


Figura 5. Resultado de la PCR en punto final para la identificación de *Bifidobacterium* en gel de agarosa al 2.5% teñido con GelRed®. Carril 1: marcador de peso molecular, con bandas desde 100 pb hasta 1500 pb; Carril 2: amplicón de *B. longum* (139 pb) con banda nítida; Carril 3: amplicón de *B. pseudocatenulatum* (139 pb) con banda nítida. Las bandas observadas en ambos carriles 2 y 3 corresponden a la amplificación esperada del gen del género *Bifidobacterium*, confirmando la presencia de los microorganismos.

Identificación molecular del gen *sbh* por PCR en punto final

Diseño de primers específicos para *sbh* en *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum*

Se diseñaron primers específicos para el gen de sal biliar hidrolasa en *B. longum* y *B. pseudocatenulatum* utilizando el software bioinformático NCBI, Oligocalc y Primer 3, optimizados para amplificaciones específicas del gen objetivo, mostrados en las tablas 2 y 3. Así mismo, se generaron secuencias de primers específicas para cada cepa, optimizadas para una amplificación efectiva y específica del gen objetivo.

Secuencia perteneciente al gen que codifica para la sal biliar hidrolasa en <i>B. longum</i>	
5'	ATGTGCACTGGTGTCCGTTTCTCCGATGATGAGGGCAACACCTATTTCCGGCCGTAATCTC GACTGGAGTTTCTCATATGGGGAGACCATCCTGGTTACTCCGCGGGCTACCACTATGAC ACGGTGTGGTGGGGCGGCAAGGCCAAGCCGAACGCGGTGATCGGCGTGGGTGTGGTC ATGGCCGATAGGCCGATGATTTTCGACTGCGCCAATGAACATGGTCTGGCCATCGCCGGC TTGAATTTCCCGGCTACGCCCTCGTTCGTCCACGAACCGGTGGAAGGCACGGAAAACGTC GCCACGTTCGAATTTCCGCTGTGGGTGGCGCGTAATTTTCGACTCCGTCGACGAGGTGCGAG GAGGCGCTCAGGAACGTGACGCTCGTCTCCAGATCGTGCCGGGACAGCAGGAGTCTCTG CTGCACTGGTTCATCGGCGACGGCAAGCGCAGCATCGTGTGAGCAGATGGCCGATGGC ATGCACGTGCATCATGATGACGTCGATGTGCTGACCAATCAGCCGACGTTCCGACTTCCAT ATGGAAAACCTGCGCAACTACATGTGCGTCAGCAACGAGATGGCCGAACCGACTTCATGG GGCAAGGCTCCTTGACCGCTGGGGTGGGGTGTGGGCATGCATGGCATCCCGGGCGAC GTGAGTTCCTCGCGCTTCGTTTCGTGTGGCTACACCAACGCGCATTACCCGCAGCAG AACGATGAAGCCGCCAATGTGTCGCGCCTGTTCCACACCCTCGGCTCCGTGCAGATGGTG GACGGCATGGCGAAGATGGCGCAGGCCAGTTCGAACGCACGCTGTTCCACGCGGATAT TCGTCCAAGACCAACCTATTACATGAACACCTATGATGACCCCGCCATCCGTTCTCTAC GCCATGGCCGATTACGATATGGATTCTCGGAGCTCATCAGCGTCGCCCCGATGA 3'

PRIMER PICKING RESULTS FOR Longum

PRIMER PICKING RESULTS FOR Longum

Template masking not selected
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions

OLIGO	start	len	tm	gc%	any_th	3'_th	hairpin	seq
LEFT PRIMER	239	20	59.26	55.00	0.00	0.00	0.00	GCTTGAATTTCCCGGCTAC
RIGHT PRIMER	435	20	58.91	55.00	0.00	0.00	0.00	GATGAACCAAGTGCAGCAGAG
PRODUCT SIZE: 197, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00								

Figura 6. Secuencia de sal biliar hidrolasa de *B. longum* LBUX23 y diseño de primers específicos. Numero de acceso en GenBank: (PRJNA924960.)



Figura 7. Secuencia de sal biliar hidrolasa de *B. pseudocatenulatum* JCLA3 y diseño de primers específicos. Numero de acceso en GenBank: (PRJNA795522.)

Se realizó un análisis de secuencias y alineamiento de genes, con la finalidad de observar regiones conservadas de múltiples secuencias de sal biliar hidrolasa en varios microorganismos. orientado a mejorar la comprensión sobre las similitudes y variabilidad del gen en diferentes especies de *Bifidobacterium*.



Figura 8. Alineamientos de 22 secuencias de múltiples microorganismos que poseen genes de sal biliar hidrolasa

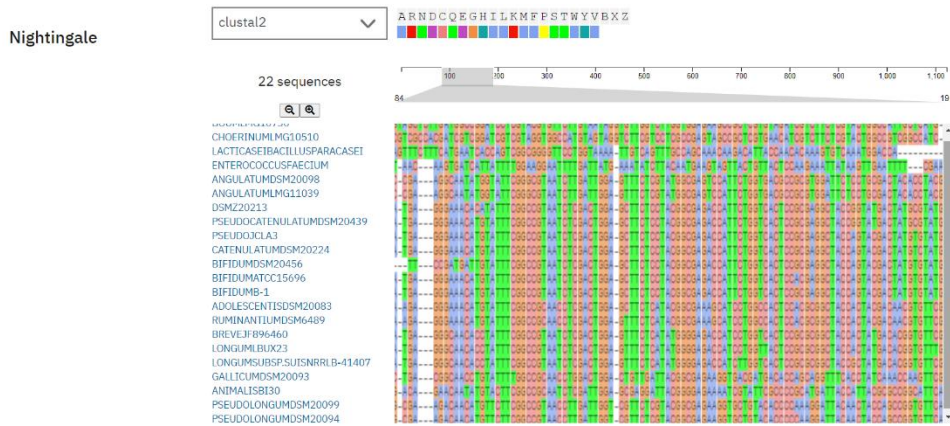


Figura 9. Análisis de alineamiento mediante Clustal Omega para la búsqueda de regiones conservadas en la secuencia del gen *sbh* de *B. pseudocatenulatum*. Se evaluaron posibles sitios para el diseño de primers, aunque no se identificaron regiones altamente conservadas entre las secuencias analizadas.

Así mismo se realizó una secuenciación de primers con base a las secuencias de los microorganismos LBUX23 y JCLA3, donde las soluciones stock se entregaron hidratadas a las siguientes concentraciones: SBH_pseudo1 (482.20 μM), SBH_pseudo2 (518.34 μM), SBH_longum1 (592.23 μM), y SBH_longum2 (447.34 μM). Se prepararon diluciones de trabajo a 10 μM para su uso en reacciones de PCR.

Así mismo se prepararon stock de primers diseñados para género *Bifidobacterium* al 100 μM y se prepararon soluciones de trabajo de 10 μM para futuros experimentos.

Las secuencias del gen objetivo se obtuvieron del software NCBI, y se realizaron alineamientos múltiples con Clustal Omega para identificar regiones conservadas en 22 especies de *Bifidobacterium*. Se seleccionaron secuencias que cumplieran con los siguientes criterios:

- Correspondencia con las secuencias específicas de los microorganismos en estudio.
- Contenido de GC adecuado, temperatura de melting (T_m), y longitud del amplicón.
- Ausencia de complementariedad entre primers (0% de probabilidad de dimerización).
- Inicio y fin de la secuencia definidos por el programa Primer3.

Consecutivamente se realizó un análisis de secuencias y alineamiento de genes, se hizo una búsqueda en NCBI de diversas especies de *Bifidobacterium* que contienen el gen de sal biliar hidrolasa, seleccionando un total de 22 microorganismos. Se utilizó el software Clustal Omega para realizar alineamientos múltiples de estas secuencias y analizar las regiones conservadas entre las distintas cepas para la observación de las similitudes y variabilidad del gen en diferentes especies de *Bifidobacterium*.

Resultados de amplificación del gen de sal biliar hidrolasa (*sbh*)

La amplificación del gen de sal biliar hidrolasa (*sbh*) se realizó mediante PCR en punto final en *B. longum* y *B. pseudocatenulatum*. En *B. pseudocatenulatum*, la primera amplificación no mostró una banda claramente detectable, por lo que se llevó a cabo una reamplificación bajo las mismas condiciones previamente establecidas. Tras este segundo ensayo, se obtuvo una banda nítida con el tamaño esperado, lo que confirma la presencia del gen *sbh* en esta cepa.

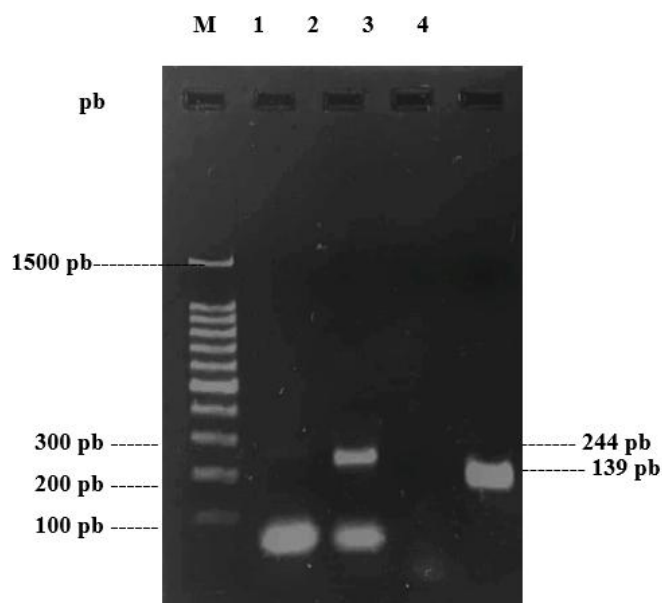


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con GelRed®. de la amplificación del gen de sal biliar hidrolasa (*sbh*) en *B. pseudocatenulatum*. Carril 1: marcador de peso molecular (100-1500 pb). Carril 2: reamplificación utilizando 1 μ L de la amplificación previa como molde (sin banda visible). Carril 3: reamplificación con 5 μ L de la amplificación previa como molde (banda nítida con el tamaño esperado de 244 pares de bases). Carril 4: control negativo (sin amplificación). Carril 5: control positivo con ADN de *B. pseudocatenulatum* y primers específicos para el género *Bifidobacterium* (banda esperada con el tamaño de 139 pares de bases).

Por otro lado, en *B. longum*, la amplificación con los primers específicos no arrojó un resultado concluyente, por lo que la identificación molecular de este gen en dicha cepa no pudo completarse con este enfoque.

Comparación entre las cepas analizadas

En la amplificación del gen de sal biliar hidrolasa(*sbh*), se observó una diferencia en los resultados obtenidos entre las cepas analizadas. Mientras que en *B. pseudocatenulatum* fue posible detectar una banda nítida tras la reamplificación de la PCR inicial, en *B. longum* la identificación molecular no pudo completarse debido a la ausencia de un resultado claro con los primers específicos empleados. Esto sugiere que la detección del gen *sbh* en *B. longum* podría requerir el uso de condiciones optimizadas o primers alternativos para su amplificación.

Cuantificación y calidad del ARN extraído

Inicialmente se empleó un protocolo basado en columnas para la extracción de ARN. Sin embargo, se detectó contaminación con ADN genómico en las muestras, por lo que se implementó un tratamiento con las columnas gDNA Eliminator del mismo kit. A pesar de este paso adicional, se observó degradación del ARN. Posteriormente, se revisó el protocolo y se identificó que la capacidad máxima de la columna era de aproximadamente 5×10^7 células, mientras que las muestras procesadas contenían alrededor de 3.83×10^9 células, lo que excedía su capacidad. Se realizó un ajuste en la cantidad de células mediante una cuenta viable, pero los resultados obtenidos no fueron satisfactorios. Debido a estas limitaciones, se optó por continuar con el protocolo de extracción con Trizol, el cual permitió obtener ARN de mejor calidad y sin restricciones en la cantidad de células procesadas.

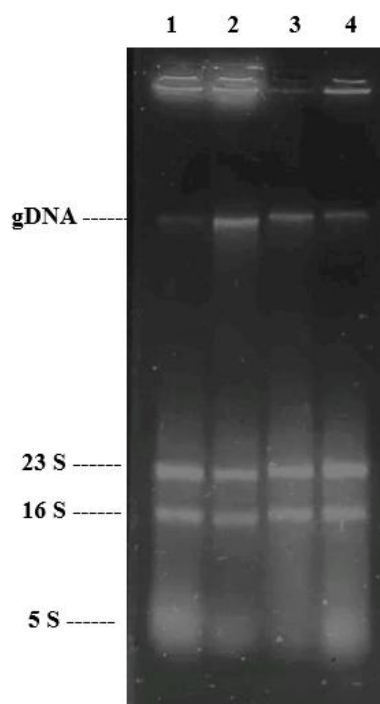


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed® mostrando ARN extraído con el kit RNeasy (ref. 74104). Se observan bandas de ARN con señal marcada en posiciones más altas, indicando la presencia de ADN genómico contaminante

Optimización de gel de agarosa utilizando NaClO (hipoclorito de sodio)

Para evaluar la calidad e integridad del ARN extraído, se empleó un gel de agarosa optimizado con hipoclorito de sodio (NaClO), siguiendo el método descrito por Aranda *et al.* (2012). Se prepararon “bleach gels” con concentraciones de NaClO al 1% y 0.1%, observándose una diferencia notable entre ambas condiciones. En el gel con 1% de cloro, la matriz se presentó opaca y no fue posible

visualizar bandas, mientras que en el gel con 0.1% de cloro se observaron bandas nítidas, lo que permitió una adecuada evaluación de la integridad del ARN. Además, al comparar un gel sin NaClO con uno que sí contenía el compuesto, se evidenció una mejora en la visibilidad de las bandas en el bleach gel, confirmando la utilidad de esta estrategia para la evaluación de ARN.

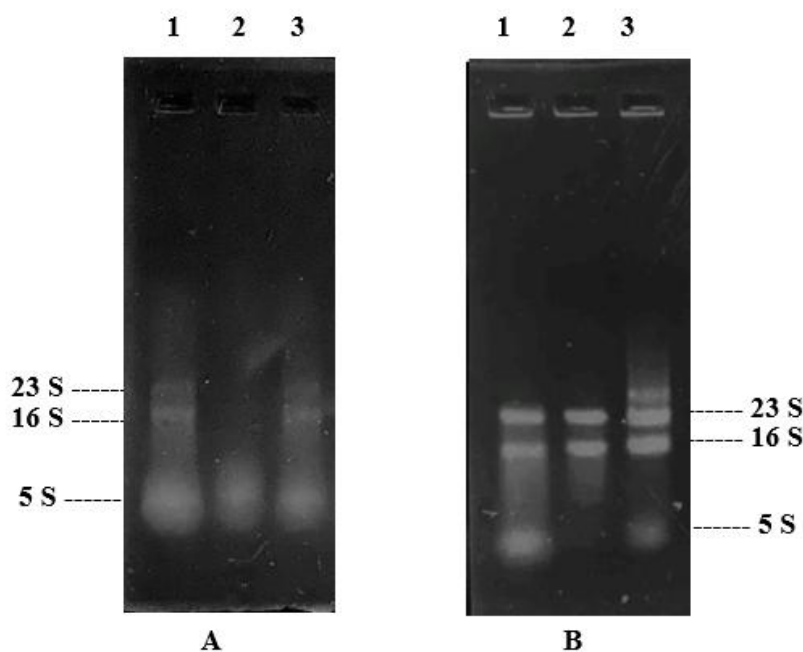


Figura12. Comparación de la visualización del ARN en geles de agarosa teñidos con GelRed®. Adicionando hipoclorito de sodio (NaClO). (A) Gel de agarosa sin NaClO, donde las bandas de ARN ribosómico 23S, 16S y 5S presentan menor nitidez. (B) Gel de agarosa con 0.1% de NaClO, en el que se observa una mejora en la definición de las bandas de ARN ribosómico, lo que facilita la evaluación de la integridad y calidad del ARN extraído.

Concentraciones y pureza medidas con espectrofotometría por Nanodrop

Las concentraciones de ARN extraído de *B. pseudocatenulatum* bajo diferentes condiciones de cultivo fueron variables. En el medio MRS-C sin oxgall, se obtuvieron concentraciones de 868.0 ng/ μ L y 2541.2 ng/ μ L a 24 y 48 horas de incubación, respectivamente. En presencia de oxgall, las concentraciones fueron menores, con 478.4 ng/ μ L a 24 horas y 1357.5 ng/ μ L a 48 horas. La pureza del ARN, evaluada mediante las relaciones 260/280 y 260/230, mostró valores aceptables en la mayoría de las muestras, con relaciones 260/280 cercanas a 2.0.

Integridad del ARN en gel de agarosa

El ARN extraído fue evaluado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% con 0.1% de NaClO, utilizando una corrida a 80 V durante 60 minutos. Se cargaron 1000 ng de ARN por pozo junto con buffer de carga teñido con GelRed. En la visualización en un transiluminador de luz UV, se observaron bandas nítidas correspondientes al ARN ribosómico, sin signos evidentes de degradación, lo que indica una buena integridad del ARN extraído.

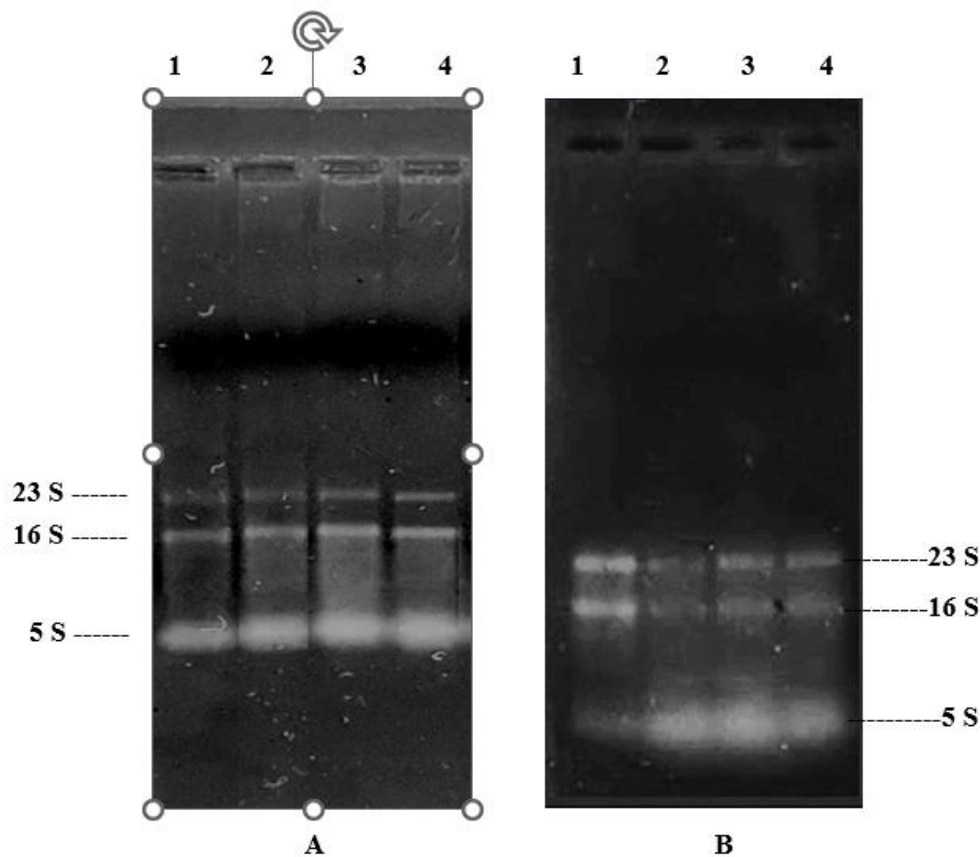


Figura 13. Geles de agarosa al 1% teñidos con agente intercalante GelRed®. Donde se evaluó la integridad del ARN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa de *B. longum* (A) y *B. pseudocatenulatum* (B). Se utilizó un gel de agarosa teñido con GelRed®, preparado al 1% con 0.1% de NaClO, corriéndose a 80 V durante 60 minutos. Se cargaron 1000 ng de ARN por pozo. Carril 1: ARN en MRS-C (24 h); Carril 2: ARN en MRS-C - Oxgall (24 h); Carril 3: ARN en MRS-C (48 h); Carril 4: ARN en MRS - Oxgall (48 h). Se observan bandas nítidas y bien definidas correspondientes al ARN ribosómico, sin signos evidentes de degradación.

Síntesis de ADNc y validación

Confirmación de la síntesis de cDNA

La síntesis de ADNc se realizó a partir del ARN extraído de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* en diferentes condiciones experimentales, el cDNA fue sintetizado mediante el kit “**Applied Biosystems™ Kit de RNA-to-cDNA™ de alta capacidad**”. Para evaluar la eficiencia de la retrotranscripción, se llevó a cabo una PCR en punto final utilizando primers específicos para el gen de sal biliar hidrolasa (sbh), con un gradiente de temperaturas. Los productos de amplificación fueron analizados en un gel de agarosa al 2.5%, donde se observaron señales de amplificación, aunque con la presencia de productos inespecíficos. Debido a estos resultados, se decidió optimizar el análisis mediante PCR en tiempo real para obtener una mejor evaluación de la expresión del gen de interés y minimizar la interferencia de amplificaciones inespecíficas.

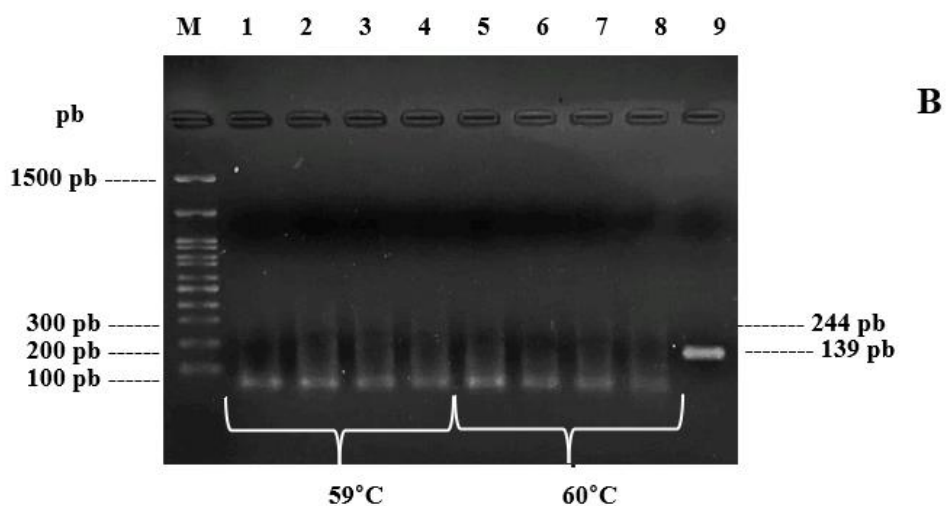
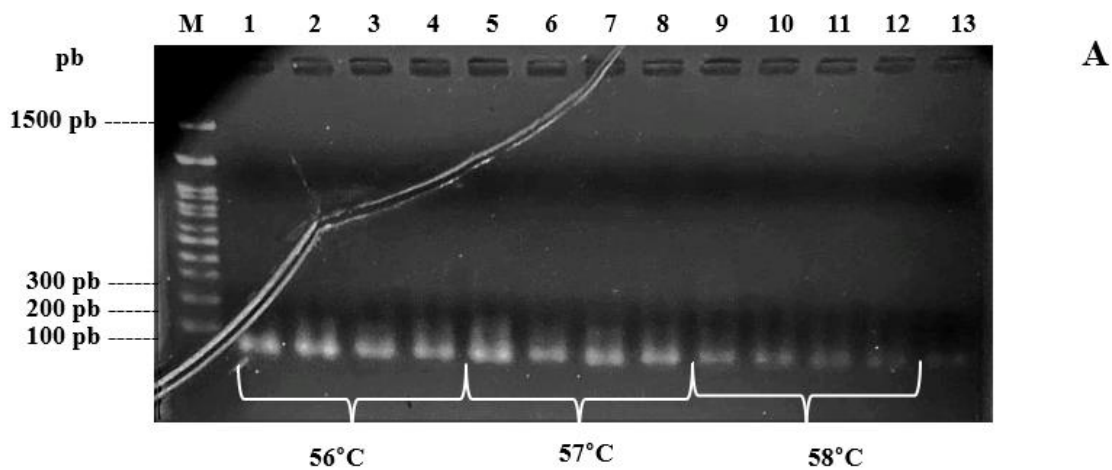


Figura 14. Evaluación de la amplificación del gen de sal biliar hidrolasa (*sbh*) en *Bifidobacterium pseudocatenulatum* mediante PCR en punto final con gradiente de temperatura. (A) Gradiente de 56 a 58 °C, donde se observan amplificaciones inespecíficas en forma de smearing. (B) Gradiente de 59 a 60 °C, mostrando menor presencia de amplificaciones inespecíficas, lo que sugiere que estas temperaturas son más adecuadas. Se observa una banda correspondiente al control positivo a 139 pb, mientras que el control negativo no presentó amplificación.

Análisis de la expresión del gen *sbh* por PCR en tiempo real.

Se realizó la PCR en tiempo real utilizando una sonda TaqMan diseñada específicamente para la secuencia del gen *sbh* en *B. pseudocatenulatum*, con el objetivo de evaluar su expresión en diferentes condiciones de cultivo. Se analizaron muestras obtenidas de cultivos en medio MRS-C y MRS-C - Oxgall a 48 horas de incubación.

Valores de Ct en los distintos tratamientos

Los valores de Ct obtenidos a partir de la PCR en tiempo real utilizando la sonda TaqMan específica para el gen *sbh* en *B. pseudocatenulatum* se presentan en la **Tabla 4**. Se observó que en las muestras cultivadas en medio MRS-C (48 h) no hubo detección de señal suficiente, indicando la ausencia o niveles indetectables de expresión del gen *sbh* bajo estas condiciones. En contraste, las muestras cultivadas con Oxgall a 48 horas presentaron valores de Ct más elevados, lo que sugiere una expresión significativamente mayor en presencia de sales biliares.

Los controles negativos (NTC) no mostraron amplificación, lo que confirma la ausencia de contaminación en la reacción. Los controles positivos, correspondiente a ADN genómico de *B. pseudocatenulatum*, mostró valores de Ct similares a los observados en las muestras con Oxgall, indicando que la detección del gen fue efectiva. Estos resultados sugieren que la expresión del gen *sbh* está inducida en presencia de sales biliares.

Tabla 4. Valores de Ct obtenidos en la PCR en tiempo real con sonda TaqMan específica para *B. pseudocatenulatum* y *B. longum* en diferentes condiciones de cultivo.

	<i>B. longum</i>								<i>B. pseudocatenulatum</i>							
	MRS-C				MRS-C Oxgall				MRS-C				MRS-C Oxgall			
	<i>sbh</i>		16S		<i>sbh</i>		16S		<i>sbh</i>		16S		<i>sbh</i>		16S	
Ct	40.0	40.0	16.9	17.4	28.5	28.3	17.1	17.3	40	40	16.0	16.02	28.2	29.3	15.9	16.1

Ctrl + = 29.6, 29.2

Ctrl - = Indeterminado, indeterminado

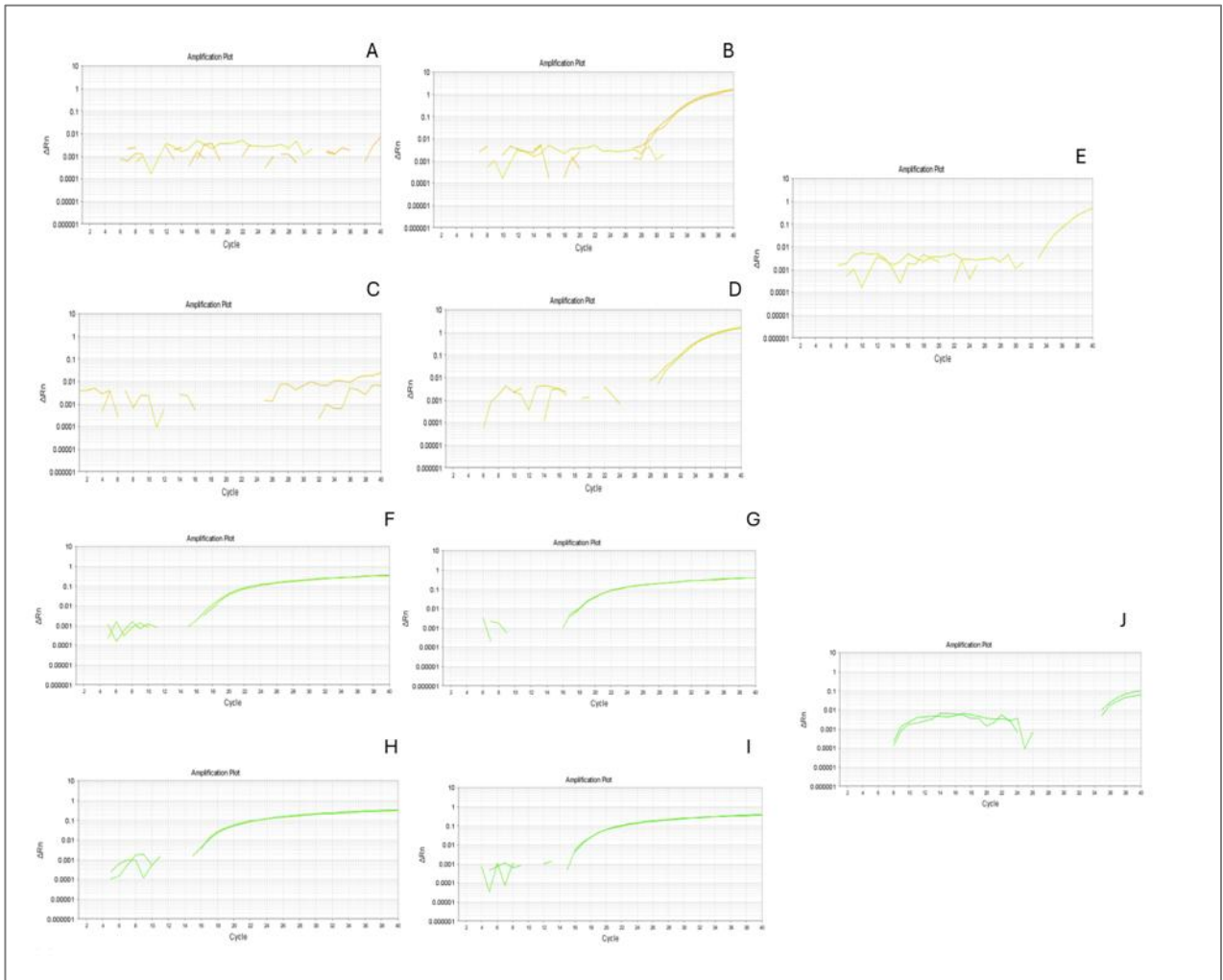


Figura 15. Curvas de fluorescencia obtenidas en la PCR en tiempo real con sonda TaqMan para *B. pseudocatenulatum* y *B. longum*. En el eje X se representa el número de ciclos de amplificación, mientras que en el eje Y se muestra la intensidad de fluorescencia acumulada. (A) Duplicado de cDNA de *B. longum* de la condición MRS-C para el gen de *sbh*. (B) Duplicado de cDNA de *B. longum* de la condición MRS-C - Oxgall Para el gen de *sbh*. (C) Duplicado de cDNA de *B. pseudocatenulatum* de la condición MRS-C para el gen *sbh* (D) Duplicado de cDNA de *B. pseudocatenulatum* de la condición MRS-C - Oxgall Para el gen *sbh*. (E) Controles negativos para la reacción de *sbh*, (F) Duplicado de cDNA de *B. longum* de la condición MRS-C para el gen de 16S, (G) Duplicado de cDNA de *B. longum* de la condición MRS-C - Oxgall para el gen de 16S, (H) Duplicado de cDNA de *B. pseudocatenulatum* de la condición MRS-C para el gen de 16S, (I) Duplicado de cDNA de *B. pseudocatenulatum* de la condición MRS-C - Oxgall para el gen de 16S y (J) Controles negativos para la reacción de 16S. Se observa un incremento en la fluorescencia en las muestras tratadas con Oxgall, indicando la amplificación del gen de interés, mientras que los controles negativos no presentan señal detectable.

Comparación de expresión relativa

Para evaluar la expresión del gen que codifica la sal biliar hidrolasa (*sbh*) en *B. longum* y *B. pseudocatenulatum*, se realizó un análisis de PCR en tiempo real. Se compararon dos condiciones

experimentales: cultivos sin tratamiento y cultivos expuestos a Oxfall, un suplemento de sales biliares utilizado para inducir la expresión del gen de interés.

Con el fin de normalizar la expresión génica, se utilizó el gen 16S rRNA como control endógeno. Este gen es ampliamente empleado en estudios de cuantificación relativa debido a su expresión estable en bacterias. Se incluyeron controles negativos para descartar la presencia de contaminación o amplificación inespecífica.

El análisis se realizó en duplicado para cada condición experimental, asegurando la reproducibilidad de los datos. Los valores de Ct obtenidos permitieron calcular la expresión relativa del gen *sbh*, comparando las muestras tratadas con Oxfall frente a las no tratadas.

Cálculo del $\Delta\Delta Ct$

Para determinar la expresión relativa del gen *sbh*, se utilizó el método de $\Delta\Delta Ct$ (Delta Delta Ct), que permite comparar los niveles de expresión entre las diferentes condiciones experimentales tras la normalización con un gen de referencia.

Para determinar la expresión relativa del gen *sbh*, se empleó el método $\Delta\Delta Ct$, normalizando con el gen constitutivo 16S rRNA. Se estableció como control basal la condición sin tratamiento en cada especie.

En *B. longum*, el gen constitutivo 16S rRNA presentó un valor de $\Delta Ct = 1$, mientras que el gen *sbh* mostró una expresión relativa de 2.92 veces en presencia de Oxfall. Por otro lado, en *B. pseudocatenulatum*, los valores obtenidos fueron de 0.987 para 16S rRNA y 2.377 veces para *sbh* bajo la misma condición.

Estos resultados que se muestran en la Tabla 5. sugieren que la adición de Oxfall induce significativamente la expresión del gen *sbh* en ambas especies, con un efecto más marcado en *B. longum*. Esto refuerza la hipótesis de que el estímulo con sales biliares promueve la activación de *sbh*.

Tabla 5. Valores de $\Delta\Delta Ct$ y expresión relativa del gen *sbh* ($2^{(-\Delta\Delta Ct)}$) en *B. longum* y *B. pseudocatenulatum* bajo condiciones con y sin Oxfall. Los valores fueron normalizados con respecto al gen constitutivo 16S rRNA. Las muestras sin tratamiento fueron utilizadas como control y

presentan valores cercanos a 1, indicando una expresión del gen *sbh* en exposición a sales biliarias en comparación a la ausencia de estos.

Cepa y condición	$\Delta\Delta Ct$	$2 \exp -\Delta\Delta Ct$
<i>B. longum</i> MRS-C	1.012669233	1
<i>B. pseudocatenulatum</i> MRS-C	1.000226556	0.98771299
<i>B. longum</i> MRS-C - Oxgall	2.960626693	2.92358709
<i>B. pseudocatenulatum</i> MRS-C - Oxgall	2.407267121	2.37715045

Los valores de expresión relativa del gen *sbh* se representaron mediante gráficas de columnas, donde se comparó la expresión en *B. longum* y *B. pseudocatenulatum* bajo condiciones con y sin Oxgall. Se observó un aumento significativo en la expresión del gen *sbh* en ambas especies al ser expuestas a Oxgall, con incrementos de **2.92 veces** en *B. longum* y **2.38 veces** en *B. pseudocatenulatum*, en comparación con sus respectivos controles sin tratamiento (*H2O*).

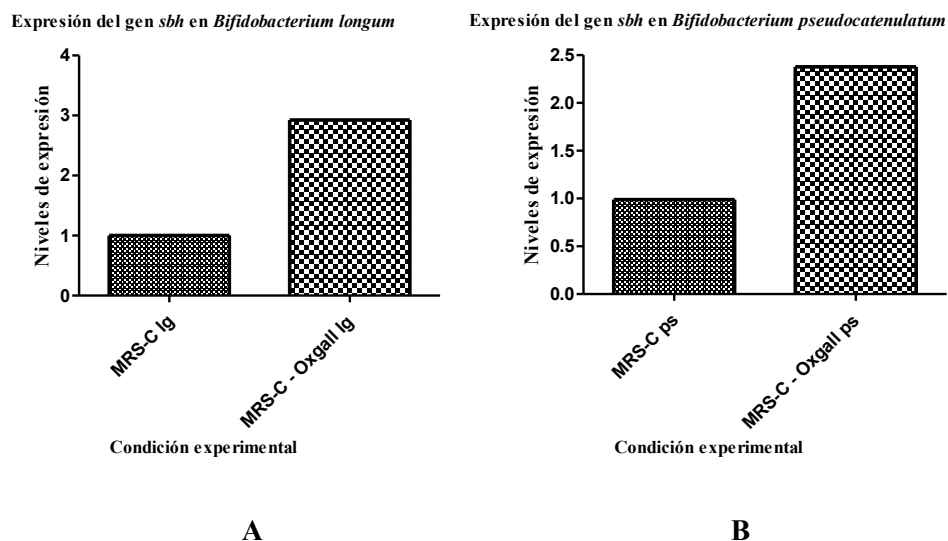


Figura 16. Expresión relativa del gen *sbh* en *B. longum* y *B. pseudocatenulatum* en presencia y ausencia de Oxgall. Los valores de expresión se calculan mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizados con el gen constitutivo 16S rRNA. Se observa que en presencia de Oxgall, la expresión del gen *sbh* aumenta **2.92 veces en *B. longum* (A)** y **2.38 veces en *B. pseudocatenulatum* (B)** en comparación con sus respectivos controles sin tratamiento.

DISCUSIÓN

Inducción de la expresión génica por sales biliares

La expresión inducida del gen *sbh* podría conferir una ventaja adaptativa a estas bifidobacterias, permitiéndoles sobrevivir y colonizar de forma más efectiva en entornos ricos en sales biliares, como el intestino delgado. Este tipo de expresión inducida es indicativa de una regulación transcripcional sensible a señales ambientales, posiblemente mediada por factores de transcripción activados por el estrés biliar o sistemas de dos componentes, como se ha propuesto en otros géneros bacterianos intestinales (Begley *et al.*, 2006).

La diferencia en los niveles de expresión entre ambas especies también podría estar relacionada con variaciones genéticas en los promotores del gen *sbh* o en otros elementos reguladores, lo que abre la posibilidad de realizar futuros estudios comparativos de regulación genética, por ejemplo, mediante análisis de secuencias promotoras, RNA-Seq o estudios funcionales..

En cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium animalis*, por ejemplo, se ha observado que la exposición a sales biliares incrementa tanto la actividad de la *SBH* como la expresión de los genes correspondientes, lo que está asociado con una mayor resistencia a condiciones gastrointestinales adversas (Fang *et al.*, 2009; Kim & Lee, 2005). Este comportamiento sugiere que mecanismos similares pueden estar presentes en *B. longum* y *B. pseudocatenulatum*.

En el presente estudio se evaluó la expresión relativa del gen *sbh* en *B. longum* y *B. pseudocatenulatum* tras exposición a Oxgall (una mezcla de sales biliares), observándose un aumento significativo de 2.92 veces y 2.38 veces, respectivamente. Estos hallazgos sugieren que la presencia de sales biliares actúa como inductor transcripcional del gen *sbh*, lo cual concuerda con el papel adaptativo descrito en bacterias intestinales.

Aunque el estudio de Hu *et al.* (2020) no aborda directamente la expresión génica, propone un método fenotípico para evaluar la tolerancia a sales biliares en lactobacilos como indicador de potencial probiótico. Esta tolerancia, medida a través de viabilidad celular tras exposición a sales biliares, refleja un mecanismo adaptativo que podría estar relacionado con la expresión de genes como *sbh*, que ayudan a detoxificar las sales biliares conjugadas. Por tanto, aunque metodológicamente distintos, ambos estudios coinciden en que la exposición a sales biliares genera una respuesta biológica específica en bacterias intestinales.

Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar la capacidad de inducir genes funcionales como *sbh* como un criterio adicional en la evaluación de cepas probióticas, más allá de la simple tolerancia fenotípica.

Comparación entre cepas: *B. longum* y *B. pseudocatenulatum*

Los resultados obtenidos en este estudio muestran un incremento significativo en la expresión del gen que codifica para la sal biliar hidrolasa (*SBH*) en *B. longum* y *B. pseudocatenulatum* tras la exposición a Oxgall, en comparación con las condiciones sin tratamiento. Específicamente, se observó una inducción de 2.92 veces en *B. longum* y de 2.38 veces en *B. pseudocatenulatum*, lo que sugiere que la presencia de sales biliares actúa como estímulo ambiental para la activación de este gen.

Estudios previos han demostrado que la respuesta a sales biliares varía considerablemente entre especies y cepas de bifidobacterias, influenciada por factores como la presencia de sistemas de transporte de ácidos biliares, tolerancia a pH ácido y expresión de *sbh* (Ruiz *et al.*, 2014). Por tanto, la mayor inducción observada en *B. longum* podría indicar una mayor capacidad adaptativa frente al

estrés biliar, lo cual le confería una ventaja competitiva en ambientes intestinales más hostiles, como el intestino delgado proximal, donde la concentración de sales biliares es mayor.

Si bien son escasos los estudios que analizan directamente la regulación del gen *sbh* en estas especies, investigaciones previas han demostrado que compuestos biliares como el Oxgall pueden modular la expresión de genes implicados en la tolerancia al estrés y el metabolismo de sales biliares (Ruiz *et al.*, 2013; Grill *et al.*, 2000). Esto sugiere que la expresión del gen *sbh* forma parte de una respuesta regulada y coordinada ante ambientes biliares, posiblemente junto con otras rutas como la biosíntesis de membranas, transporte activo y reparación de proteínas.

Es importante considerar que estas diferencias pueden deberse no solo a la regulación del gen *sbh*, sino también a variaciones en secuencias promotoras, presencia o ausencia de elementos reguladores específicos, o incluso diferencias epigenéticas entre especies. Asimismo, dentro de una misma especie, distintas cepas podrían mostrar respuestas divergentes, lo que resalta la necesidad de ampliar el estudio a más aislamientos clínicos o alimentarios.

Estos hallazgos fortalecen la hipótesis de que la expresión de *sbh* inducida por sales biliares es un mecanismo clave de adaptación bacteriana, y que su intensidad puede diferir incluso entre especies del mismo género. Desde una perspectiva funcional, esta propiedad podría utilizarse como criterio selectivo en el diseño de cepas probióticas personalizadas, según el nicho intestinal al que se desee dirigir.

Implicaciones funcionales del aumento en la expresión de *sbh*

La sal biliar hidrolasa (*sbh*) es una enzima clave en la adaptación de bacterias intestinales al ambiente del tracto gastrointestinal, donde predominan sales biliares conjugadas que pueden tener efectos detergentes y tóxicos sobre las membranas celulares. La actividad de la *sbh* permite la desconjugación de estas sales, disminuyendo su toxicidad y facilitando la colonización bacteriana (Begley *et al.*, 2006). Además, esta actividad ha sido vinculada con beneficios para la salud del huésped, como la reducción de colesterol sérico, a través de la interrupción del ciclo enterohepático de las sales biliares y el aumento en su excreción fecal (Jones *et al.*, 2004).

En el presente estudio, el aumento en la expresión del gen *sbh* tras la exposición a Oxgall indica una respuesta regulada frente al estrés biliar, lo que sugiere un mecanismo de adaptación intracelular. Esto coincide con observaciones previas donde se ha demostrado que la exposición a sales biliares puede inducir la expresión de genes asociados a la resistencia y metabolismo de estas sustancias (Lambert

et al., 2008). Así, la regulación positiva del gen *sbh* no solo refleja una estrategia de supervivencia bacteriana, sino que también puede tener repercusiones metabólicas relevantes en el huésped.

Aunque estudios como el de Hu *et al.* (2020) se centran en la tolerancia global a las sales biliares mediante métodos fenotípicos, los resultados del presente trabajo profundizan a nivel molecular, revelando que la respuesta incluye regulación de genes específicos como *sbh*. Esto fortalece el entendimiento de los mecanismos adaptativos en bifidobacterias y destaca el valor de los estudios de expresión génica como complemento a las pruebas de viabilidad celular.

No obstante, debe considerarse que la expresión de *sbh* podría tener un efecto dual: por un lado, beneficia la adaptación microbiana y contribuye a efectos saludables como la hipocolesterolemia; por otro lado, la acumulación de ácidos biliares no conjugados podría influir negativamente en el epitelio intestinal, dependiendo del contexto del huésped y de la microbiota circundante. Por tanto, la expresión de esta enzima debe entenderse como parte de un equilibrio dinámico entre la función bacteriana y el entorno intestinal.

Una posible limitación del estudio fue la escasa disponibilidad de información específica sobre la expresión del gen *sbh* en *B. longum* y *B. pseudocatenulatum*. Sin embargo, los resultados aquí presentados aportan evidencia relevante sobre la modulación de este gen por estímulos biliares, y sientan las bases para investigaciones futuras enfocadas en el control transcripcional de genes funcionales en bifidobacterias probióticas. Estudios posteriores podrían incorporar mediciones funcionales de la actividad enzimática, así como evaluar el efecto de cepas con alta expresión de *sbh* en modelos animales, con el fin de establecer correlaciones con parámetros fisiológicos como niveles de colesterol, composición de la microbiota y marcadores de inflamación intestinal.

CONCLUSION

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la exposición a sales biliares (Oxgall) induce un aumento en la expresión del gen que codifica para la sal biliar hidrolasa (*sbh*) tanto en *B. longum* como en *B. pseudocatenulatum*. En particular, se observó un incremento de 2.92 veces en *B. longum* y de 2.38 veces en *B. pseudocatenulatum* en comparación con las condiciones sin tratamiento. Estos hallazgos sugieren que las sales biliares no solo actúan como un factor de estrés para estas bacterias, sino también como un estímulo que puede modular la expresión génica asociada a mecanismos de adaptación intestinal.

El estudio contribuye al entendimiento de la regulación de genes funcionales en bifidobacterias y refuerza la hipótesis de que la presencia de sales biliares puede mejorar la capacidad probiótica de ciertas cepas al inducir la expresión de enzimas clave como la *SBH*. Además, los datos obtenidos podrían ser útiles en la selección y diseño de probióticos con propiedades funcionales mejoradas para aplicaciones clínicas o nutricionales.

Sin embargo, se requieren estudios complementarios para explorar en mayor profundidad los mecanismos moleculares implicados en esta regulación, así como para confirmar si el incremento en la expresión génica se traduce directamente en mayor actividad enzimática intracelular o extracelular.

REFERENCIAS

- Aranda PS, LaJoie DM, Jorcyk CL. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*. 2012 Jan;33(2):366-9. doi: 10.1002/elps.201100335. PMID: 22222980; PMCID: PMC3699176.
- Axon Comunicación. (2020). Investigación sobre la regulación de los rasgos de producción por microbiota gastrointestinal. Recuperado de <https://axoncomunicacion.net/investigacion-sobre-la-regulacion-de-los-rasgos-de-produccion-por-microbiota-gastrointestinal/>
- Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. M. (2005). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8725-8732. doi:10.1128/AEM.71.12.8725-8732.2005
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brandvold, K.R., Weaver, J.M., Whidbey, C. *et al.* A continuous fluorescence assay for simple quantification of bile salt hydrolase activity in the gut microbiome. *Sci Rep* 9, 1359 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37656-7>
- Bunesova, V., *et al.* (2015). *Bile salt hydrolases of bifidobacteria and their role in bile acid metabolism*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 187.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., ... & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- De Smet, I., Van Hoorde, L., Vande Woestyne, M., Christiaens, H., & Verstraete, W. (1995). Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(3), 292-301. doi:10.1111/j.1365-2672.1995.tb03136.x
- Fang, F., Flynn, S., Li, Y., Claesson, M. J., van Pijkeren, J. P., Collins, J. K., ... & O'Toole, P. W. (2009). Characterization of endogenous plasmids from *Lactobacillus salivarius* and their role in bile salt resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7061–7067. <https://doi.org/10.1128/AEM.01409-09>
- Foley, M. H., O'Flaherty, S., Barrangou, R., Theriot, C. M., & Faustoferri, R. C. (2019). Bile salt hydrolases: Gatekeepers of bile acid metabolism and host-

microbiome crosstalk in the gastrointestinal tract. *PLoS Pathogens*, 15(3), e1007581. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007581>

- Furet, J., Firmesse, O., Gourmelon, M., Bridonneau, C., Tap, J., Mondot, S., Doré, J., Corthier, G., 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiology Ecology* 68, 351–362
- Gänzle, M. G. (2015). *Lactic acid bacteria in food biotechnology*. In *Microbial Production of Food Ingredients* (pp. 139-178). Springer, Cham.
- González-Vázquez, R., Zúñiga-León, E., Torres-Maravilla, E., Leyte-Lugo, M., Mendoza-Pérez, F., Hernández-Delgado, N.C., Pérez-Pastén-Borja, R., Azaola-Espinosa, A., Mayorga-Reyes, L. (2022). Genomic and Biochemical Characterization of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCLA3 Isolated from Human Intestine. *Microorganisms*. 10, 2100.
- Grill, J. P., Manginot-Dürr, C., Schneider, F., & Ballongue, J. (2000). Bifidobacteria and probiotic effects: action of *Bifidobacterium species* on conjugated bile salts. *Current Microbiology*, 40(3), 179–183. <https://doi.org/10.1007/s002849910034>
- Gueimonde, M., Toivari, M., & Salminen, S. (2007). New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease*, 39(8), 734-739. doi:10.1016/j.dld.2007.05.015
- Hu PL, Yuan YH, Yue TL, Guo CF. A new method for the in vitro determination of the bile tolerance of potentially probiotic lactobacilli. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018 Feb;102(4):1903-1910. doi: 10.1007/s00253-018-8742-x. Epub 2018 Jan 12. PMID: 29330692.
- Jones, B. V., Begley, M., Hill, C., Gahan, C. G., & Marchesi, J. R. (2008). Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), 13580-13585.
- Jones, M. L., Tomaro-Duchesneau, C., Prakash, S., & Martoni, C. J. (2008). Cholesterol lowering with bile salt hydrolase-active probiotic bacteria. *The Journal of Clinical Gastroenterology*, 42(Suppl 3 Pt 2), S179-S185. doi:10.1097/MCG.0b013e31817f11eb
- Kim, G. B., & Lee, B. H. (2005). Biochemical and molecular insights into bile salt hydrolase in the gastrointestinal microflora—a review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(10), 1505–1512. <https://doi.org/10.5713/ajas.2005.1505>
- Koh, A., et al. (2016). *From dietary fiber to gut microbiota and back*. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 13(8), 422-431.

- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95-125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- Lambert, J. M., Bongers, R. S., & Kleerebezem, M. (2008). Transcriptional response of *Lactobacillus plantarum* to bile exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 1959–1967. <https://doi.org/10.1128/AEM.02147-07>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lomax, A. R., & Calder, P. C. (2009). Probiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence from studies conducted in humans. *Current Pharmaceutical Design*, 15(13), 1428-1518. <https://doi.org/10.2174/138161209788168155>
- Manual MSD. (2023). Generalidades sobre la función biliar. Recuperado de <https://www.merckmanuals.com/es-us/professional/trastornos-hep%C3%A1ticos-y-biliares/trastornos-de-la-ves%C3%ADcula-biliar-y-los-conductos-biliares/generalidades-sobre-la-funci%C3%B3n-biliar>
- O'Callaghan, A., & van Sinderen, D. (2016). *Bifidobacteria and the gut microbiota*. In Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health (pp. 1-23). Academic Press.
- Ouwehand, A., et al. (2017). *The role of gut microbiota in the prevention and treatment of metabolic disorders*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1230.
- Perry E. Aken, B. L., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M. R., Bernsdorff, F., Bhai, J., ... & Flicek, P. (2017). Ensembl 2017. *Nucleic acids research*, 45(D1), D635-D642.
- Pope, J. L., et al. (1995). Efecto de las sales biliares en la morfología, proliferación y... *Repositorio Cinvestav*. Recuperado de <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/1085/SSIT0014974.pdf>
- Revista Nutrición Clínica y Metabolismo. (2020). Relación entre los ácidos biliares y la microbiota intestinal: ¿es posible una comunicación bidireccional? Recuperado de <https://revistanutricionclinicametabolismo.org/index.php/nutricionclinicametabolismo/articulo/view/287/1000>
- Reyes-Castillo, P. A., González-Vázquez, R., Torres-Maravilla, E., Bautista-Hernández, J. I., Zúñiga-León, E., Leyte-Lugo, M., Mateos-Sánchez, L., Mendoza-Pérez, F., Gutiérrez-Nava, M. A., Reyes-Pavón, D., Azaola-Espinosa, A., & Mayorga-Reyes, L. (2023). *Bifidobacterium longum* LBUX23 Isolated from Feces of a Newborn; Potential Probiotic Properties and

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11071648>

- Ridlon, J. M., Kang, D. J., & Hylemon, P. B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research*, 47(2), 241-259. doi:10.1194/jlr.R500013-JLR200
- Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in Microbiology*, 7, 979. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>
- Rodríguez, M. (2017). Uso de probióticos para el control de la hipercolesterolemia. *Archivos de Medicina de Familia*. Recuperado de <https://www.archivosdemedicina.com/medicina-de-familia/uso-de-probioacuteticos-para-el-control-de-la-hipercolesterolemia.pdf> activity and probiotic potential. *Frontiers in Microbiology*, 13, 978654.
- Ruiz, L., Margolles, A., & Sánchez, B. (2013). Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in Microbiology*, 4, 396. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00396>
- Song, Z., Cai, Y., Lao, X., Wang, X., Lin, X., Cui, Y., ... & Li, J. (2019). Taxonomic profiling and populational patterns of bacterial bile salt hydrolase (BSH) genes based on worldwide human gut microbiome. *Microbiome*, 7(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0628-3>
- 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. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75403-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75403-1)
- Turrone, F., Peano, C., Pass, D. A., Abbott, D. W., & Giuffrè, A. M. (2012). Diversity of Bifidobacteria within the Infant Gut Microbiota. *PLOS ONE*, 7(5), e36957. doi:10.1371/journal.pone.0036957
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), research0034.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Yao, L., Seaton, S. C., Ndousse-Fetter, S., Adhikari, A. A., DiBenedetto, N., Mina, A. I., ... & Devlin, A. S. (2022). A metabolic pathway for bile acid dehydroxylation by the gut microbiome. *Nature*, 593(7858), 487–491. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03503-5>

- Zhang, Z., *et al.* (2017). *Bile salt hydrolase activity of bifidobacteria: a possible pathway for gut health.* *Frontiers in Microbiology*, 8, 1846.