

TESIS DOCTORAL

**Alimentos Funcionales:
Leches fermentadas con bacterias ácido
lácticas productoras de exopolisacárido con
propiedades antiinflamatorias en el tracto
gastrointestinal**

Lic. Ana Agustina Bengoa

Directora: Dra Graciela L. Garrote



Universidad Nacional de La Plata | Facultad de Cs. Exactas | Departamento de Cs. Biológicas

2020



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**Alimentos Funcionales: Leches fermentadas con bacterias
ácido lácticas productoras de exopolisacárido con
propiedades antiinflamatorias en el tracto
gastrointestinal**

Tesista: Lic. Ana Agustina Bengoa

Director/a: Dra. Graciela Liliana Garrote

Año: 2020



El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), UNLP-CIC-CONICET; bajo la dirección de la Dra. Graciela L. Garrote.

Los resultados del presente trabajo han sido publicados parcialmente en las siguientes instancias:

Publicaciones periódicas

- Bengoa, A. A.; Llamas, M. G.; Iraporda, C.; Dueñas, M. T.; Abraham, A. G.; Garrote, G. L. (2018) Impact of growth temperature on exopolysaccharide characteristics and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains. Food Microbiology. 69 212-218. DOI: 10.1016/j.fm.2017.08.012
- Bengoa, A. A.; Zavala, L.; Carasi, P.; Trejo, S. A.; Bronsoms, S; Serradell, M. A.; Garrote, G. L., Abraham, A. G. (2018) Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. Food Research International. 103 462-467. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.09.093
- Bengoa A.A.; Iraporda C.; Garrote G.L.; Abraham A.G. (2019) Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. Journal of Applied Microbiology 126(3), 686-700.DOI:10.1111/jam.14107
- Bengoa, A. A.; Iraporda, C.; Acurcio, L. B.; de Cicco Sandes, S. H.; Costa, K.; Moreira Guimarães, G.; Esteves Arantes, R. M.; Neumann, E.; Cantini Nunes, A.; Nicoli, J. R.; Garrote, G.L.; Abraham A. G. (2019) Physicochemical, immunomodulatory and safety aspects of milks fermented with *Lactobacillus paracasei* isolated from kefir. Food Research International, 123, 48-55. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.04.041

Trabajos completos en libro de Actas de Congresos

- Bengoa, A. A. y Garrote, G. L. (2015). Leches fermentadas con lactobacilos y levaduras con capacidad moduladora de la respuesta inflamatoria en células de epitelio intestinal en cultivo. Libro de actas del XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XV CYTAL), 3 al 5 de Noviembre. Buenos Aires, Argentina. ISBN 978-987-22165-7-3
- Bengoa, A. A.; Llamas, M. G.; Iraporda, C.; Dueñas, M. T.; Abraham, A. G.; Garrote, G. L. (2017). Estudio de las características de exopolisacáridos producidos por cepas de *Lactobacillus paracasei* crecidas a diferentes temperaturas y el efecto sobre sus propiedades probióticas. Libro de Actas del XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XVI CYTAL), 18 al 20 de Septiembre. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Bengoa A. A.; Errea A.J.; Rumbo M.; Abraham A. G.; Garrote G. L. (2019) Capacidad antiinflamatoria y gastroprotectora de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 y su leche fermentada. XV Congreso Argentino de Microbiología (XV CAM) y V Congreso Argentino

de Microbiología de Alimentos (V CAMA), 25 al 27 de Septiembre. Buenos Aires, Argentina.

Resúmenes publicados en libros de Congresos

- Bengoa, A. A. y Garrote, G. L. (2015). Leches fermentadas con lactobacilos y levaduras con capacidad moduladora de la respuesta inflamatoria en células de epitelio intestinal en cultivo. Presentación Oral. XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XV CYTAL), 3 al 5 de Noviembre. Buenos Aires, Argentina
- Bengoa, A. A. y Garrote G. L. (2016). Efecto de la temperatura de crecimiento en las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus paracasei*. Poster. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología ALAM-CAM. 26 al 30 de Septiembre. Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Bengoa, A. A.; Hamet, M. F; Llamas, G.; Dueñas, M.T; Garrote, G.L; Abraham, A.G. (2016). Influence of fermentation temperature on the exopolysaccharides characteristics and the rheological properties of fermented milks obtained with *Lactobacillus paracasei*. Poster.V Simposio Internacional de Bacterias Lácticas (V SIBAL). 19 al 21 de Octubre. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.
- Bengoa, A. A.; Llamas, M. G.; Iraporda, C.; Dueñas, M. T.; Abraham, A. G.; Garrote, G. L. (2017). Estudio de las características de exopolisacáridos producidos por cepas de *Lactobacillus paracasei* crecidas a diferentes temperaturas y el efecto sobre sus propiedades probióticas. Poster. XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XVI CYTAL), 18 al 20 de Septiembre. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Bengoa, A. A.; Pendón, M. D., Garrote, G. L. (2017). Caracterización de productos fermentados con bacterias lácticas y levaduras potencialmente probióticas con capacidad de modular *in vitro* la respuesta inflamatoria intestinal. Poster. Primera Jornada Nacional de Bio-Nanotecnología, 10 y 11 de Noviembre. Universidad Nacional de Quilmes.
- Bengoa, A. A.; Errea, A. J.; Iraporda, C; Rumbo, Martín; Abraham, A. G.; Garrote, G.L. (2018). *Lactobacillus paracasei* fermented milks: immunomodulatory properties of the nonbacterial fraction on gastric and intestinal epithelial cells. Poster. XII Congress of the Latin American Association of Immunology & XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology, 14 al 18 de Mayo. Cancún, México.
- Bengoa, A.A; Iraporda, C.; Garrote.G.L.; Abraham, A.G. (2018). Estudio de la seguridad de la cepa potencialmente probiótica *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 para el desarrollo de leches fermentadas funcionales. Poster. VII Congreso Internacional de Ciencia y

Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2018), 1 al 3 de Octubre. Córdoba, Córdoba, Argentina.

- Gagliarini N.; Bengoa A.A.; Garrote G.L.; Diosma G.; Piermaria J.; Abraham A.G. (2018) Películas de proteínas de suero-kefir como vehículo de probióticos. Presentación oral. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2018), 1 al 3 de Octubre. Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Romanin D. E.; Bengoa A.A.; Pendón M.D.; Rumbo M.; Garrote G.L. (2018) Study of the probiotic properties of yeasts isolated from Kefir. International Specialized Symposium on yeasts (ISSY34). 1 al 4 de Octubre. Bariloche, Río Negro, Argentina.
- Bengoa A.A.; Errea J.A.; Rumbo M.; Abraham, A. G.; Garrote, G. L. (2019) Capacidad antiinflamatoria y gastroprotectora de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 y su leche fermentada. XV Congreso Argentino de Microbiología y V Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos a realizarse del 25 a 27 de septiembre de 2019. Buenos Aires, Argentina. Aceptado
- Bengoa A. A.; Errea A.J.; Rumbo M.; Abraham A. G.; Garrote G. L. (2019) Capacidad antiinflamatoria y gastroprotectora de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 y su leche fermentada. XV Congreso Argentino de Microbiología (XV CAM) y V Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos (V CAMA), 25 al 27 de Septiembre. Buenos Aires, Argentina

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, por la formación que me brindó y por darme la posibilidad de acceder al grado de Doctor.

Al CONICET por otorgarme la beca que me permitió llevar a cabo este trabajo.

A las autoridades del CIDCA por abrirme las puertas y permitirme desarrollar mi trabajo de tesis en este Centro de Investigación.

A mi directora, Grace, por su dedicación, paciencia y compromiso. Por haberme guiado durante el desarrollo de este trabajo y especialmente por la confianza y motivación que supo transmitirme desde el primer día. Por enseñarme a ver el vaso medio lleno, a ser perseverante, y a no bajar los brazos!

Martín, David y Agus por el aporte fundamental que hicieron a este trabajo, por todo lo que me enseñaron, por la paciencia que me tuvieron y por toda la ayuda que me brindaron en muchos experimentos, en especial en los ensayos in vivo.

A las doctoras Elizabeth Neumann, María Teresa Dueñas y Alicia Pietro por su valiosa colaboración en el desarrollo de este trabajo.

Al todo el grupo de microbiología del CIDCA, por su solidaridad, siempre dispuestos a compartir sus conocimientos y a darme una mano. Por su amistad, por aguantarme y levantarme el ánimo en esos días que nada sale bien. Por los lindos momentos compartidos, dentro y fuera del laboratorio, haciendo que el día a día en el trabajo sea mucho más placentero.

A los chicos del Zoobox, por esos recreítos entre experimento y experimento con charlas, mates y tortas, fundamentales para poder seguir el resto del día con más energía!

A Ale y Caro por su ayuda desinteresada con los geles de DGGE.

A Claudio y Silvina por guiarme en el desarrollo de las técnicas de cromatografía. A Fabricio y Pía por su ayuda en el trabajo diario en el laboratorio. A todos los integrantes del CIDCA por su buena predisposición.

A la cátedra de Micro General, que me acompaña desde mis primeros pasos en la docencia, porque me ayudaron a crecer como docente, como profesional y como persona.

A mis amigas, las de toda la vida y las que me dió la facu, que me aguantaron en todo momentos, siempre acompañándome y alentándome a crecer con cada nuevo desafío.

A mi familia, por darme la posibilidad de recibir una educación, por enseñarme que con esfuerzo uno puede alcanzar todas las metas que se proponga, por creer en mí. Por el apoyo y el cariño de siempre.

A mis abuelas, que comparten conmigo la alegría de cada paso que doy. A mis abuelos, que están presentes en cada consejo que me dejaron.

A todos los que de una u otra forma me acompañaron en este camino,

¡Muchas gracias!

*Piensa en los obstáculos como oportunidades; piensa en
los obstáculos como inspiraciones.*

*“La luz que no puedes ver”
Anthony Doerr*

ABREVIATURAS

| | |
|---|--|
| AGCC: Ácidos grasos de cadena corta | HRE: Hypoxia-response element (secuencias reconocidas por el factor HIF) |
| ATB: Antibiótico | HSV-Tk: Timidina quinasa de Herpesvirus |
| BAL: Bacterias ácido lácticas | IFM: Intensidad de fluorescencia media |
| CAA: Código Alimentario Argentino | IKK: IκB kinasa |
| CIM: Concentración inhibitoria mínima | IL: Interleuquina |
| DGGE: Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante | LAA: Leche acidificada artificialmente |
| DMOG: Dimetiloxalilglicina | LAR: Luciferasa Assay Reagent |
| DO: Densidad óptica | LDH: Lactato deshidrogenasa |
| DSS: Dextran sulfato de sodio | LF: Leche fermentada |
| EFSA: European Food Safety Authority | LPS: Lipopolisacárido |
| EII: Enfermedades inflamatorias intestinales | MB: Medio Base |
| EPS: Exopolisacárido | MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio |
| FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations | NAC: N-acetilcisteína |
| FIH: Factor inhibidor de HIF (asparagin hidroxilasa) | NFκB: Factor Nuclear kappa-B |
| FliC: Flagelina | NFκB-luc: gen reportero luciferasa de luciérnaga bajo el dominio del promotor 3kB con sitios de unión a NF-κB |
| FNM: Fracción no microbiana de la leche fermentada | PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos |
| GLP-1: Glucagon like peptide 1 | PHD: Prolilhidroxilasas |
| GRAS: Generally Recognized as Safe | PM: Peso molecular |
| GSH: Glutation | pVHL: von Hippel–Lindau disease tumour suppressor (E· ubiquitin ligasa) |
| HePS: Heteropolisacáridos | PYY: péptido YY |
| HIF: Hipoxia inducible factor | QPS: Qualified Presumption of Safety |
| HIF-luc: Gen reportero luciferasa de luciérnaga bajo el dominio de un promotor con secuencias HREs inducibles por HIF 1α | ROS: Especies reactivas de oxígeno |
| HoPS: Homopolisacárido | SPF: Libre de patógenos específicos |
| HPLC-SEC: Cromatografía líquida de alta eficacia con columna de exclusión molecular | TEM: Microscopia electrónica de transmisión |
| | TFF: Trefoil factor |

TK-Renilla: Gen reportero luciferasa de *Renilla* spp. bajo el dominio del promotor constitutivo HSV-Tk.

TLC: Cromatografía en capa fina

TLR: Toll like receptors

TNBS: Ácido 2,4,6-

Trinitrobenzenosulfónico

UFC: Unidades formadoras de colonias

INTRODUCCIÓN GENERAL

| | | |
|----|---|-----------|
| 1. | Alimentos funcionales | 1 |
| 2. | Probióticos y prebióticos para el desarrollo de alimentos funcionales | 2 |
| 3. | Leches fermentadas | 5 |
| 4. | Kefir como fuente de microorganismos probióticos | 8 |
| | Objetivos | 13 |

CAPÍTULO 1. Influencia de las condiciones de cultivo en el crecimiento de *Lactobacillus paracasei* y la producción de metabolitos bioactivos

| | | |
|------|---|-----------|
| | Introducción | 15 |
| | Objetivos | 19 |
| | Materiales y métodos | |
| 1. | Microorganismos y condiciones de cultivo | 21 |
| 2. | Obtención del sobrenadante de cultivo de levaduras | 21 |
| 3. | Obtención de leches fermentadas | 21 |
| 4. | Obtención de la fracción no microbiana de las leches fermentadas | 22 |
| 5. | Caracterización de las leches fermentadas | 22 |
| 5.1. | Cinética de crecimiento y acidificación en leche | 22 |
| 5.2. | Determinación de pH | 22 |
| 5.3. | Evaluación de la producción de ácidos orgánicos | 22 |
| 5.4. | Caracterización del comportamiento reológico y viscosidad aparente | 23 |
| 6. | Efecto del cultivo con levaduras sobre el aspecto macroscópico de las colonias | 23 |
| 7. | Análisis estadístico | 23 |
| | Resultados y discusión | |
| 1. | Influencia del co-cultivo con levaduras o sobrenadante de cultivo de levaduras sobre el crecimiento de <i>L. paracasei</i> y la producción de metabolitos | 25 |
| 1.1. | Aspecto macroscópico de los coágulos | 25 |
| 1.2. | Efecto sobre la cinética de crecimiento de los lactobacilos | 26 |
| 1.3. | Efecto sobre el pH final de las leches fermentadas y la concentración de ácidos orgánicos | 27 |
| 1.4. | Efecto en la producción de exopolisacárido | 32 |
| 2. | Influencia de la temperatura de incubación sobre el crecimiento de <i>L. paracasei</i> y la producción de metabolitos | 35 |

| | |
|---------------------|----|
| Conclusiones | 41 |
|---------------------|----|

CAPÍTULO 2. Caracterización de los exopolisacáridos sintetizados por *Lactobacillus paracasei*

| | |
|---|----|
| Introducción | 43 |
| Objetivos | 47 |
| Materiales y métodos | |
| 1. Obtención del exopolisacárido producido en medio MRS | 49 |
| 2. Extracción del exopolisacárido producido en leche | 49 |
| 3. Evaluación de la pureza del EPS obtenido | 50 |
| 3.1. Cromatografía en capa fina | 50 |
| 3.2. Método de Bradford | 50 |
| 4. Cuantificación de EPS: Método de antrona | 50 |
| 5. Distribución de pesos moleculares de los EPS | 50 |
| 6. Composición de azúcares | 51 |
| 7. Modelo de fermentación de EPS <i>in vitro</i> por microbiota fecal humana | 52 |
| 8. Determinación de AGCC por cromatografía gaseosa | 53 |
| 9. Evaluación de las poblaciones microbianas | 53 |
| 9.1. Extracción de ADN | 53 |
| 9.2. Estudio de la diversidad microbiana por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) | 53 |
| 9.3. Análisis de secuenciación masiva mediante Ion Torrent PGM | 56 |
| Resultados y discusión | |
| 1. Caracterización del exopolisacárido sintetizado por <i>L. paracasei</i> a diferentes temperaturas | 59 |
| 1.1. Distribución de pesos moleculares de los EPS producidos en medio de cultivo y en leche por <i>L. paracasei</i> a diferentes temperaturas | 60 |
| 1.2. Composición de azúcares de los EPS producidos en leche por <i>L. paracasei</i> a diferentes temperaturas | 65 |
| 2. Evaluación <i>in vitro</i> de la potencialidad prebiótica de los exopolisacáridos producidos en leche | 67 |
| Conclusiones | 79 |

CAPÍTULO 3. Evaluación de la potencialidad probiótica de *Lactobacillus paracasei*

| | |
|---------------------|----|
| Introducción | 81 |
|---------------------|----|

| | |
|--|-----|
| Objetivos | 85 |
| Materiales y métodos | |
| 1. Tolerancia a las condiciones gastrointestinales <i>in vitro</i> | 87 |
| 2. Evaluación del exopolisacárido en la superficie bacteriana mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión (TEM) | 87 |
| 3. Células de epitelio gástrico AGS e intestinal Caco-2/TC-7 | 88 |
| 4. Ensayo de adhesión de lactobacilos a células AGS y Caco-2/TC-7 | 89 |
| 5. Sobrevida en la leche fermentada durante el almacenamiento a 4 °C | 89 |
| 6. Determinación de la capacidad hemolítica | 90 |
| 7. Determinación de la actividad DNAasa | 90 |
| 8. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) | 90 |
| 9. Evaluación de la inocuidad <i>in vivo</i> | 91 |
| 10. Evaluación de translocación bacteriana | 92 |
| 11. Análisis histológico de hígado e íleon | 93 |
| 12. Cuantificación de la expresión génica de citoquinas en íleon | 93 |
| 12.1. Extracción de ARN total (TRIzol™) | 93 |
| 12.2. Obtención de cDNA mediante transcripción reversa | 93 |
| 12.3. Cuantificación mediante qPCR en tiempo real | 94 |
| 13. Determinación de los niveles de IgA total en contenido intestinal | 95 |
| 14. Análisis estadístico | 96 |
| Resultados y discusión | |
| 1. Estudio <i>in vitro</i> de las propiedades probióticas de cepas de <i>L. paracasei</i> | 97 |
| 1.1. Tolerancia a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal | 97 |
| 1.2. Capacidad de adhesión a células epiteliales gástricas e intestinales | 100 |
| 2. Sobrevida de <i>L. paracasei</i> en la leche fermentada durante el almacenamiento | 102 |
| 3. Estudio <i>in vitro</i> de la seguridad de las cepas <i>L. paracasei</i> para su uso en alimentos | 103 |
| 4. Evaluación <i>in vivo</i> de la inocuidad del consumo de la leche fermentada con <i>L. paracasei</i> CIDCA 8339 y su fracción no microbiana | 106 |
| Conclusiones | 113 |

CAPÍTULO 4. Leches fermentadas con *Lactobacillus paracasei*: estudio de la capacidad moduladora de la respuesta inflamatoria en el tracto gastrointestinal

| | |
|---------------------|-----|
| Introducción | 115 |
| Objetivos | 125 |

Materiales y métodos

| | | |
|--------|--|-----|
| 1. | Células eucariotas | 127 |
| 2. | Sistema reportero Caco-2 ccl20:luc | 127 |
| 3. | Ensayos de modulación de la respuesta inmune innata en células AGS y Caco-2:luc ccl20 | 127 |
| 4. | Estudio de la integridad y viabilidad celular | 130 |
| 4.1. | Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) | 130 |
| 4.2. | Determinación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial | 131 |
| 5. | Mecanismo de acción del lactato en células AGS | 132 |
| 5.1. | Modificación del estado redox | 132 |
| 5.1.1. | Alteración en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) | 132 |
| 5.1.2. | Cambios en la expresión de IL-8 por modificaciones en el estado redox celular | 133 |
| 5.2. | Transfección de células de epitelio gástrico con lipofectamina LTX plus | 133 |
| 5.2.1. | Vía de señalización mediada por NF- κ B | 134 |
| 5.2.2. | Activación de HIF-1 α | 135 |
| 5.2.3. | Medida de la luminiscencia | 135 |
| 6. | Modelo murino de gastritis | 136 |
| 6.1. | Animales utilizados y condiciones de alojamiento | 136 |
| 6.2. | Puesta a punto de un modelo murino para la evaluación de gastritis | 136 |
| 6.3. | Evaluación de la capacidad gastroprotectora de <i>L. paracasei</i> CIDCA 8339 y de lactato | 137 |
| 6.3.1. | Preparación de la suspensión de <i>L. paracasei</i> CIDCA 8339 | 137 |
| 6.3.2. | Preparación de la solución de lactato | 137 |
| 6.3.3. | Ensayo de gastritis | 138 |
| 6.3.4. | Eutanasia y toma de muestras | 138 |
| 6.3.5. | Análisis histológico de estómago | 138 |
| 7. | Análisis estadístico | 140 |

Resultados y discusión

| | | |
|------|---|-----|
| 1. | Capacidad moduladora de la respuesta inmune innata en células de epitelio gástrico e intestinal | 141 |
| 1.1. | Efecto modulador de las cepas de <i>L. paracasei</i> | 141 |
| 1.2. | Efecto modulador de la fracción no microbiana de leches fermentadas | 145 |
| 1.3. | Caracterización de la capacidad inmunomoduladora de los ácidos orgánicos presentes en la FNM | 149 |
| 1.4. | Estudio de los mecanismos celulares involucrados en el efecto biológico de | 153 |

| | |
|--|-----|
| la FNM de las leches fermentadas y el lactato en células AGS | |
| 1.4.1. Efecto en la activación del factor nuclear kappa-B (NF-κB) | 153 |
| 1.4.2. Modificación del estado redox celular | 155 |
| 1.4.3. Efecto del lactato sobre el Factor Inducible por Hipoxia 1 (HIF) | 156 |
| 2. Evaluación de la capacidad gastroprotectora <i>in vivo</i> | 160 |
| 2.1. Puesta a punto de un modelo murino para la evaluación de gastritis | 160 |
| 2.2. Evaluación de la capacidad gastroprotectora de <i>L. paracasei</i> CIDCA 8339 | 161 |
| Conclusiones | 167 |

CONCLUSIONES GENERALES 169

APENDICE

| | |
|---|-----|
| 1. Medios de cultivo bacteriano | 173 |
| 2. Medios de cultivo de células eucariotas | 176 |
| 3. Soluciones buffer y reactivos | 176 |
| 4. Detección de IL-8 en sobrenadantes de cultivo celular mediante ELISA | 178 |
| 5. Preparación y tinción de cortes histológicos con Hematoxilina y Eosina | 179 |

BIBLIOGRAFIA 181

A row of test tubes containing a white liquid, with a pipette dispensing more of the liquid into the tubes. The background is a soft-focus laboratory setting.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Alimentos funcionales

Antiguamente se consideraba que el rol de la dieta era simplemente aportar los nutrientes necesarios para suplir los requerimientos metabólicos y garantizar el mantenimiento de las funciones vitales del individuo. Sin embargo, en las últimas décadas el concepto de la dieta y la alimentación ha ido evolucionando y ha tomado relevancia la idea de una dieta saludable donde los alimentos tienen también como objetivo mejorar el estado de salud y bienestar del individuo. Este concepto surge por primera vez en Japón en la década de los 80 donde se propone el desarrollo de alimentos con algún beneficio definido sobre la salud (FOSHU, Food for Specified Health Use) como una alternativa frente al aumento en la expectativa de vida de la población acompañado por el incremento en los costos de la atención médica (Hasler, 2002). Actualmente, los consumidores están tomando mayor responsabilidad por su propia salud, y recurriendo cada vez más a su dieta como alternativa para mejorar su bienestar. Como consecuencia de esta creciente demanda de alimentos saludables en el mercado, los llamados **alimentos funcionales** se han convertido en una de las áreas de investigación e innovación de mayor interés para la industria alimentaria (Bigliardi y Galati, 2013). Si bien no existe una definición única consensuada de alimento funcional, según la Definición Operativa de la FUFOSSE (*Functional Food Science in Europe*) establecida en 1999 “un alimento puede ser considerado funcional si logra demostrar científicamente que posee efectos beneficiosos para la salud sobre una o más funciones del organismo, más allá de sus propiedades nutricionales habituales, de modo tal que mejore el estado general de salud y/o reduzca el riesgo de alguna enfermedad” (Diplock et al, 1999). Los alimentos funcionales deben seguir siendo alimentos (no píldoras ni cápsulas) y su efecto beneficioso debe evidenciarse en cantidades que normalmente son ingeridas con la dieta. A su vez, un alimento funcional puede ser funcional para todos los miembros de la población o sólo para un grupo en particular definido, por ejemplo, por la edad o por algún factor genético. Es importante destacar que cualquier beneficio para la salud atribuido a los alimentos funcionales, ya sea que mejore el estado general de salud o reduzca el riesgo de alguna enfermedad crónica, debe basarse en criterios científicos sólidos y precisos junto con rigurosos estudios de seguridad y eficacia (Hasler, 2002). Dentro del concepto de alimento funcional se incluyen alimentos naturales, alimentos a los que se les ha adicionado un componente con propiedades benéficas, se les ha removido algún componente que genera efectos adversos o se les ha mejorado la biodisponibilidad de algún componente.

Existen diversas clasificaciones definidas para los alimentos funcionales. Mäkinen-Aakula, (2006) los clasificó en base al beneficio que se le atribuye:

- Alimentos funcionales que "mejoran su vida", por ejemplo al mejorar las funciones regulares del estómago y colon (pre y probióticos) o "mejoran la vida de los niños" contribuyendo a sus capacidades de aprendizaje y comportamiento.
- Alimentos funcionales que reducen el riesgo de un problema de salud existente, como altos niveles de colesterol o presión arterial elevada.
- Alimentos funcionales que "hacen su vida más fácil" (por ejemplo, sin lactosa, sin gluten).

Como respuesta al interés de los consumidores, han aparecido también organismos regulatorios que buscan establecer normas y directrices que regulen el desarrollo y la publicidad de los alimentos funcionales. En la Unión Europea la FUFOSSE, coordinada por el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI, *International Life Sciences Institute*) se encarga de desarrollar y consensuar estrategias para la identificación y desarrollo de alimentos funcionales y la fundamentación científica de sus efectos. En nuestro país, un grupo de trabajo *ad-hoc* creado en el año 2009 por la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) se encuentra trabajando en la definición de alimentos funcionales (Moreno, 2012). Además, se ha implementado desde el año 2011 una "*Guía para la Presentación y Evaluación Científica de Declaraciones de Propiedades Saludables en Alimentos*" junto con una Comisión Evaluadora para la autorización de Declaraciones de Propiedades Saludables en Alimentos (Disposición ANMAT 7730/2011).

2. Probióticos y prebióticos para el desarrollo de alimentos funcionales

Como se mencionó previamente, dentro de los alimentos funcionales se encuentran los alimentos con probióticos y/o prebióticos. En el año 2001, la FAO/WHO definió a los **probióticos** como "microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades suficientes confieren un efecto beneficioso sobre la salud". A pesar de que existen diversas definiciones para este término en la literatura, la definición de la FAO/WHO, reevaluada y respaldada en el año 2014 (Hill et al., 2014), ha sido la más aceptada y ampliamente utilizada a nivel mundial. Si bien inicialmente el uso de probióticos estaba asociado principalmente a los alimentos, hoy en día existen varias formas de administración de los mismos, tales como vía oral (alimentos, suplementos dietarios o cápsulas), o tópica (cutánea o vaginal) (Sanders et al., 2018). En este sentido, la definición de probióticos utiliza la palabra "administrado" en lugar de "consumido" o "ingerido" de forma tal de incluir a todas las posibles vías existentes para suministrar al microorganismo. Por otro lado, deja en claro que el probiótico es un microorganismo que debe ser administrado vivo. Cualquier microorganismo muerto que ejerza un efecto beneficioso sobre la salud deberá ser definido con un término diferente (Reid, 2016). Por otro lado, el Código

Alimentario Argentino en el Capítulo XVII, Artículo 1389 (Resolución Conjunta SPReI N° 261/2011 y SAGyP N° 22/2011), define a los probióticos como “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del consumidor”. Los alimentos probióticos son aquellos que contienen estos microorganismos en cantidad suficiente, en una matriz adecuada, de manera tal que después de su ingesta cumplan con el efecto postulado.

Si bien los microorganismos más comúnmente utilizados como probióticos son bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, otros géneros bacterianos e incluso levaduras también han demostrado tener un efecto probiótico (Pandey et al., 2015; Romanin et al., 2016). Una gran variedad de beneficios sobre la salud han sido atribuidos a estos microorganismos, entre los que se destacan la prevención de diarrea y constipación por regulación de la microbiota intestinal, la modulación de la respuesta inmune y la protección contra microorganismos patógenos. Por otro lado, también pueden ejercer un efecto antioxidante y contribuir al aporte de nutrientes tales como vitaminas o mejorar su biodisponibilidad. Cabe destacar que en algunos casos las cepas probióticas pueden llegar a ejercer un efecto beneficioso en un órgano blanco distante al sitio de administración. Se han evidenciado cepas de probióticos que pueden ejercer efectos a nivel del tracto respiratorio y genito-urinario, a nivel de la piel e incluso a nivel neurológico (Hill et al., 2014; Pandey et al., 2015). Estos efectos a distancia pueden deberse a la modulación del sistema inmune por parte de probiótico, modulación de la microbiota intestinal, así como también a la producción de metabolitos que pueden ser absorbidos y ejercer un efecto sistémico (Reid, 2016).

Durante años se consideró que todos los efectos probióticos eran cepa-específica y debían ser demostrados científicamente para cada microorganismo en estudio. Sin embargo, recientemente se ha planteado el concepto de que existen mecanismos compartidos entre grupos taxonómicos. Tal es el caso de la producción de ácidos orgánicos como producto final de una vía metabólica (*Bif shunt pathway*) presente en el género *Bifidobacterium* (Sanders et al., 2018) y la producción de ácido láctico por parte de bacterias del género *Lactobacillus* (Garrote et al., 2015). Estos ácidos orgánicos producidos durante la fermentación ejercen efectos positivos a nivel del tracto gastrointestinal, ya sea directamente o por conversión a ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por acción de la microbiota intestinal. Es importante destacar que si bien algunos de estos mecanismos son compartidos por la mayoría de las especies de un género determinado, otros son más acotados y están presentes sólo en algunas especies. Finalmente, no se debe dejar de lado la existencia de efectos beneficiosos que son cepa específicos (Hill et al., 2014). *Lactobacillus salivarius* UCC118, por ejemplo, confiere resistencia a la infección por

Listeria monocytogenes al producir una bacteriocina que no se ha encontrado en otras cepas de *L. salivarius* (Sanders et al., 2018). En la Tabla 1 se muestran los posibles mecanismos de acción de probióticos propuesta por el panel de consenso en el año 2014.

Tabla 1. Mecanismos de acción de probióticos propuesta por el panel de consenso en el año 2014. Adaptada de Hill et al. (2014).

| Mecanismos de acción de probióticos | | |
|---|---|--|
| Ampliamente distribuidos | Compartidos a nivel especie | Cepa específicos |
| <ul style="list-style-type: none"> •Producción de ácidos y AGCC •Regulación del tránsito intestinal •Modulación de la microbiota intestinal •Aumento del recambio de enterocitos •Exclusión competitiva de patógenos | <ul style="list-style-type: none"> •Síntesis de vitaminas •Antagonismo directo contra patógenos •Refuerzo de la barrera intestinal •Metabolismo de sales biliares •Actividad enzimática •Neutralización de carcinógenos | <ul style="list-style-type: none"> •Efectos neurológicos •Efectos inmunológicos •Efectos endocrinológicos •Producción de compuestos bioactivos específicos |

En cuanto a los **prebióticos**, la FAO/WHO los definió en 2008 como “un ingrediente alimentario no vivo que confiere un efecto beneficioso mediante la modulación de la microbiota” (Pineiro et al., 2008). Sin embargo, esta definición no destaca el hecho de que debe ser utilizado selectivamente por un grupo limitado de microorganismos. Además, refiere exclusivamente al uso alimentario de los mismos, que si bien en su mayoría se administran por vía oral, no se debe dejar de lado aquellos que son administrados directamente a otros sitios del cuerpo colonizados por microorganismos, como el tracto vaginal y la piel. Por tales motivos la definición fue reevaluada y modificada recientemente definiendo con el término prebiótico a “todo sustrato que al ser utilizado selectivamente por la microbiota del individuo le confiere un efecto beneficioso sobre la salud” (Gibson et al., 2017). Actualmente, se considera que esta utilización selectiva del prebiótico refiere no solamente a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* sino también a otros grupos de microorganismos beneficiosos que incluyen (pero no se limitan a) *Roseburia*, *Eubacterium* o *Faecalibacterium* spp. (Gibson et al., 2017).

El Código Alimentario Argentino (CAA) define el término prebiótico como “un ingrediente alimentario o parte de él (no digerible) que posee un efecto benéfico para el organismo receptor, estimulando el crecimiento selectivo y/o actividad de una o de un número limitado de bacterias en el colon y que confiere beneficios para su salud”. Además,

establece los requisitos que debe cumplir un ingrediente prebiótico (Art.1390, Cap XVII, CAA).

Finalmente, los **simbióticos** son productos que contienen ingredientes probióticos y prebióticos en los que el prebiótico contribuiría a mejorar la supervivencia del probiótico durante el pasaje a través del tracto gastrointestinal, favoreciendo no sólo la colonización a nivel intestinal por parte del probiótico sino también el crecimiento y/o activación del metabolismo tanto del probiótico como de otras bacterias benéficas propias del hospedador (Gibson y Roberfroid, 1995; Martín y Langella, 2019).

3. Leches fermentadas

La fermentación con microorganismos se ha empleado durante miles de años como un proceso para garantizar una mayor vida útil del producto. Los alimentos producidos de esta manera tienen un bajo riesgo de contaminación con otros microorganismos debido a la producción de compuestos con propiedades antimicrobianas (ácidos orgánicos, etanol y bacteriocinas). Además, la fermentación también da lugar a una mejora de las propiedades organolépticas, aportando sabores y texturas que son completamente diferentes a los presentes en los materiales de partida (Hill et al., 2017).

Los microorganismos mayormente empleados en la obtención de leches fermentadas son las bacterias ácido lácticas (BAL). Estas son un grupo heterogéneo formado por cocos y bacilos no esporulados, Gram positivos, catalasa negativos, con bajo contenido de G+C (menor a 54%), carentes de citocromos, exigentes nutricionalmente, ácido-tolerantes y productores de ácido láctico como producto final mayoritario de la fermentación de carbohidratos. Filogenéticamente son un grupo diverso que incluye los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* entre otros (Axelsson y Ahrné, 2000). El género *Lactobacillus* incluye más de 200 especies, a muchas de las cuales se les ha reconocido propiedades probióticas (Hill et al., 2018).

Una de las principales tendencias de innovación en la industria de los alimentos funcionales es el desarrollo de alimentos fermentados novedosos (Leroy y De Vuyst, 2014). Los alimentos fermentados con probióticos han sido desarrollado en diversos tipos de matrices, tales como cereales, vegetales, jugos de fruta y leche (Furtado Martins et al., 2013). Debido a su amplio consumo y composición nutricional, los productos lácteos, incluyendo leches fermentadas, quesos y yogures son ampliamente utilizados como vehículos para probióticos y constituyen la alternativa comercial más popular hasta el momento (Amund, 2016). Una de las principales ventajas del uso de productos lácteos como vehículo de probióticos es que el proceso de elaboración de estos alimentos se

adapta muy bien al agregado de bacterias probióticas. Las **leches fermentadas** se definen según el CAA como “productos, adicionados o no de otras sustancias alimenticias, obtenidos por coagulación y disminución del pH de la leche o leche reconstituida, adicionada o no de otros productos lácteos, por fermentación láctica mediante la acción de cultivos de microorganismos específicos” (Artículo 576, Capítulo VIII, CAA). Antiguamente, la fermentación de los alimentos se daba como un proceso espontáneo por acción de la población microbiana presente en la matriz. Sin embargo, hoy en día, se buscan cultivos iniciadores específicos que le otorguen al alimento las características deseadas. En este sentido, las bacterias ácido lácticas se han convertido en los principales candidatos para el desarrollo de leches fermentadas funcionales a nivel mundial, llevando a la búsqueda de nuevas cepas que puedan ser utilizadas como *starter*. En los productos comerciales se utilizan especies de BAL bien caracterizadas en cuanto a su potencialidad probiótica y a sus propiedades tecnológicas incluyendo uso seguro para consumo humano, alta velocidad de acidificación de la leche y capacidad de producir exopolisacáridos (EPS) u otros metabolitos que mejoren las propiedades organolépticas (Hill et al., 2017). Los microorganismos que se encuentran naturalmente en leches fermentadas artesanales como el Kefir, el Kurut y el Koumiss presentan la ventaja de estar adaptados a la matriz alimentaria y constituyen una fuente alternativa de nuevas cepas probióticas (Fontana et al., 2013; Ispirli y Dertli, 2018).

El consumo de alimentos fermentados con bacterias ácido lácticas se ha asociado con una serie de beneficios para la salud que pueden atribuirse a la presencia del microorganismo utilizado como iniciador y/o probiótico o a la producción de diversos metabolitos durante el proceso de fermentación (Marco et al., 2017). Los alimentos fermentados podrían ejercer el efecto beneficioso debido a diferentes factores entre los que se pueden mencionar:

- **Delivery de microorganismos probióticos al tracto gastrointestinal:** Algunos alimentos fermentados son procesados de manera tal que no contienen microorganismos viables en el producto final. Por el contrario, en el caso de las leches fermentadas el producto final presenta microorganismos viables en concentraciones que varían entre 10^6 y 10^9 UFC/ml. Asimismo, la matriz alimentaria puede conferir una mayor protección y sobrevivencia a lo largo del tracto gastrointestinal favoreciendo la llegada del microorganismo viable al colon, donde ejercerá su acción (Marco et al., 2017).
- **Modificación de componentes de la leche:** Durante la fermentación, la actividad metabólica de la bacteria láctica puede producir cambios en los componentes de la

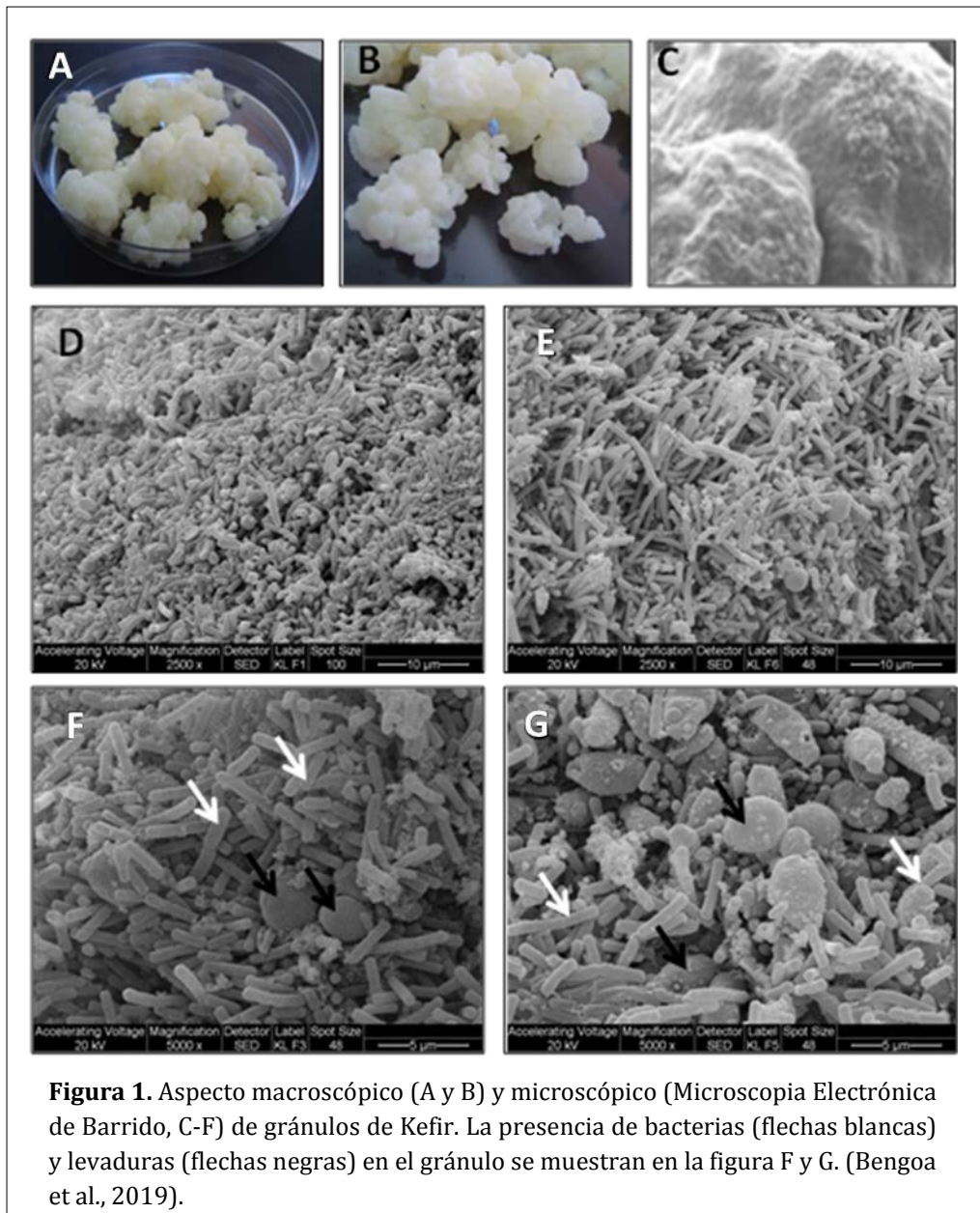
matriz beneficiosos para la salud del consumidor. Existen, por ejemplo, algunas BAL que poseen lineolato isomerasas que convierten el ácido linoleico de la leche en ácido linoleico conjugado, un ácido graso asociado a propiedades antiaterogénicas, anticarcinogénicas y antiinflamatorias (Yang et al., 2014). Asimismo, la degradación proteolítica de las proteínas de la leche puede generar péptidos bioactivos con propiedades promotoras de la salud, como efectos antimicrobianos, hipocolesterolémicos, opioides y antagonistas de opioides, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antitrombóticos, inmunomoduladores, citomoduladores y antioxidantes (Pessione y Cirrincione, 2016).

- **Producción de nuevos metabolitos:** La fermentación también puede dar lugar a la generación de nuevos metabolitos bioactivos. El ácido láctico, por ejemplo, es uno de los principales productos finales producidos por BAL en las leches fermentadas y se ha demostrado que presenta no sólo propiedades inhibitorias frente a microorganismos patógenos (Iraporda et al., 2017)), sino también propiedades inmunomodulatorias a nivel intestinal (Iraporda et al., 2014, 2016). Por otro lado, algunas cepas son capaces de producir vitaminas del grupo B (folato, rivotravina, vitamina B12) durante la fermentación dando lugar a un producto enriquecido en estos nutrientes (Rossi et al., 2011; Thakur et al., 2016). Más aún, el EPS producido por ciertas BAL puede mejorar las propiedades tecnológicas del producto y en muchos casos ejercer algún efecto beneficioso sobre la salud (Marco et al., 2017).
- **Modulación de la microbiota:** Los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal desempeñan una función relevante como moduladores de las respuestas metabólica e inmune. Las leches fermentadas debido a su aporte de macro y micronutrientes, así como probióticos y prebióticos pueden contribuir a la modulación de la microbiota mejorando el estado de salud del consumidor (Danneskiold-Samsøe et al., 2019).

4. Kefir como fuente de microorganismos probióticos

El kefir es una bebida artesanal, viscosa, de sabor ácido, levemente efervescente producida a partir de la fermentación de la leche con gránulos de kefir (Garrote et al., 2001). Históricamente, el kefir ha sido asociado con un estado saludable de quienes lo consumen (St-Onge et al., 2002; Farnworth y Mainville, 2008). De hecho, el nombre kefir deriva de la palabra eslava “*Keif*” que significa “Bienestar” o “Vivir bien”. Es originario de las montañas del Cáucaso, donde los gránulos han sido transmitidos de generación en generación desde hace más de 4000 años (Farnworth, 2006; Ötles y Cagindi, 2003). Si bien el origen de los gránulos de kefir no está del todo claro, se cree que los primeros gránulos se originaron como consecuencia del almacenamiento de la leche en bolsas de piel o estómago de animales para su preservación y hoy en día se encuentran distribuido en todo el mundo (Nielsen et al., 2014).

Los gránulos de kefir son masas gelatinosas, irregulares de tamaño variable (0,3 a 3,5 cm de diámetro), color blanco o ligeramente amarillento y consistencia elástica (Bengoa et al., 2019). Están formados por una matriz de polisacárido (kefirán) y proteínas, en donde se encuentran inmersas bacterias ácido lácticas (10^8 - 10^9 UFC/g de gránulo), levaduras (10^7 - 10^8 UFC/g de gránulo) y bacterias ácido acéticas (10^5 - 10^6 UFC/g de gránulo) formando una comunidad simbiótica donde los productos generados por algunos microorganismos durante la fermentación pueden ser utilizados como fuente de energía o factores de crecimiento por otros microorganismos presentes en la matriz (Garrote et al., 2010; Nielsen et al. 2014; Plessas et al. 2016; Tamang et al. 2016). En la Figura 1 se muestra el aspecto macroscópico y microscópico de los gránulos de kefir.



La compleja microbiota del kefir incluye mayoritariamente bacterias ácido lácticas, ácido acéticas y levaduras pertenecientes a distintas especies e inclusive cada especie está representada por variedad de cepas con propiedades probióticas y tecnológicas propias (Bengoa et al., 2019). Es importante destacar que la composición microbiana del gránulo difiere de la encontrada en la leche fermentada (Dobson et al., 2011; Londero et al., 2012; Marsh et al., 2013; Kotova et al., 2016). El género *Lactobacillus* es el más abundante en gránulos de distintos orígenes (Marsh et al., 2013; Nalbantoglu et al., 2014; Garofalo et al., 2015; Korsak et al., 2015,) siendo *Lactobacillus kefiranofaciens*, *L. kefiri* y *L. parakefiri* las especies más representativas. Otras especies de lactobacilos encontradas normalmente en los gránulos incluyen *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. plantarum* (Hamet et al., 2013; Bengoa et al., 2019). Por otro lado, en la leche fermentada

se observa una predominancia de la familia *Streptococcaceae* y los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Acetobacter* (Marsh et al. 2013; Garofalo et al. 2015). En cuanto a las levaduras, más de 23 especies han sido identificadas formando parte de la microbiota del gránulo o de la leche fermentada; siendo *Saccharomyces cerevisiae*, *S. unisporus*, *Candida kefir*, y *Kluyveromyces marxianus* las especies predominantes (Witthuhn et al., 2004; Diosma et al., 2014; Zanirati et al., 2015). Otras especies encontradas incluyen *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia fermentans*, *Kazachastania aerobia*, *Lachanceae meyersii*, *Yarrowia lipolytica* y *Kazachstania unispora* (Rosa et al., 2017).

El kefir presenta propiedades benéficas para la salud que se atribuyen a la presencia de una microbiota compleja así como a sus productos metabólicos (Bengoa et al., 2019), dentro de los cuales se pueden mencionar los ácidos orgánicos con su efecto antimicrobiano y modulador de la inflamación (Iraporda et al., 2016) y el kefiran que protege el epitelio de la acción de *B. cereus in vitro* y presenta un efecto bifidogénico e inmunomodulador *in vivo* (Medrano et al., 2008, 2011; Hamet et al., 2016).

Se ha evidenciado que lactobacilos aislados de kefir son resistentes al pasaje por el tracto gastrointestinal, se adhieren a enterocitos en cultivo, poseen la capacidad de autoagregar y coagregar con microorganismos patógenos protegiendo de la infección e inhiben la acción de toxinas en un efecto cepa dependiente (Golowczyc et al., 2007, 2008; Carasi et al., 2014; Zavala et al., 2016). Dentro de las propiedades probióticas atribuidas a cepas específicas se puede mencionar la capacidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 de antagonizar el efecto biológico de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) *in vitro* (Hugo et al., 2008; Kakisu et al., 2013) y proteger a células epiteliales de la invasión de *Shigella flexneri* (Bolla et al., 2016). Por su parte, cepas de *L. kefir* son capaces de inhibir la adhesión e invasión de *Salmonella enterica* serovar. Typhimurium a células Caco-2/TC-7, a través de la liberación al medio de cultivo de proteínas de capa-S (Golowczyc et al., 2007). Por otro lado, cepas de *L. paracasei* productoras de polisacárido, reducen la internalización de *Salmonella* a células epiteliales Caco-2/TC-7 manteniendo la integridad del citoesqueleto (Hamet et al., 2013; Zavala et al., 2016). En relación a las levaduras, cepas pertenecientes a especies *S. cerevisiae*, *S. unisporus*, *I. occidentalis* y *K. marxianus* resisten a las condiciones gastrointestinales tanto *in vitro* como *in vivo* y adhieren a células Caco-2 (Diosma et al., 2014) y son capaces de modular la respuesta inflamatoria inducida por flagelina (Romanin et al., 2010). Asimismo, *K. marxianus* CIDCA 8154 protege de la inflamación en un modelo murino de colitis inducida por TNBS (Romanin et al., 2016).

De este modo, el kefir constituye un reservorio natural de BAL y levaduras seguras y potencialmente beneficiosas para la salud que pueden ser aisladas y estudiadas para su aplicación en productos fermentados comerciales (Bengoa et al., 2019). En este sentido,

Lactobacillus paracasei CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124, aisladas de gránulos de kefir, se presentan como buenas candidatas resultando interesante profundizar el estudio en cuanto a su potencialidad para ser utilizadas como *starters* en productos lácteos probióticos.

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los beneficios para la salud asociados al consumo de leches fermentadas, que podrían ser ejercidos por la presencia de los microorganismos probióticos y/u otros componentes bioactivos productos de la fermentación de la leche, se planteó como **objetivo general** del presente trabajo analizar la potencialidad probiótica de bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacárido aisladas de kefir para la obtención de leches fermentadas funcionales con propiedades antiinflamatorias a nivel del tracto gastrointestinal.

Para ello, se propusieron los **objetivos específicos** que se indican a continuación:

- Caracterizar tres cepas de *L. paracasei* aisladas de kefir CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 en cuanto a su capacidad de desarrollar en leche produciendo ácidos orgánicos y exopolisacárido al crecer en diferentes condiciones de cultivo.
- Caracterizar los exopolisacáridos sintetizados por *L. paracasei* en cuanto a su estructura y potencialidad prebiótica.
- Evaluar la potencialidad probiótica y la seguridad de las cepas de *L. paracasei* para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales.
- Estudiar la capacidad antiinflamatoria de las leches fermentadas con *L. paracasei* a nivel del tracto gastrointestinal.



**Influencia de las condiciones de cultivo
en el crecimiento de *Lactobacillus
paracasei* y la producción de
metabolitos bioactivos**

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

A la hora de desarrollar un alimento fermentado con una bacteria iniciadora o probiótica es fundamental que el microorganismo sea capaz de crecer en la matriz alimentaria alcanzando concentraciones elevadas de al menos de 10^6 UFC/g (Kurmman y Rasic, 1991) produciendo *in situ* metabolitos como los ácidos orgánicos y los exopolisacáridos que son relevantes desde el aspecto tecnológico y por su contribución a los caracteres organolépticos del producto. Además, los efectos beneficiosos asociados al consumo de alimentos lácteos fermentados con bacterias ácido lácticas (BAL) se atribuyen a la presencia del microorganismo viable en el tracto gastrointestinal, pero también a la síntesis o liberación de compuestos bioactivos a partir de la matriz del alimento como consecuencia de la actividad metabólica de la bacteria durante la fermentación.

Existen varios metabolitos producidos por las BAL que resultan de interés debido al impacto que pueden tener sobre la salud del consumidor. Entre ellos se destacan el ácido linoleico conjugado, vitaminas, el ácido gamma-aminobutírico (GABA), péptidos bioactivos, bacteriocinas, oligosacáridos, exopolisacáridos y ácidos orgánicos (Champagne et al., 2018). Durante la fermentación de la leche con BAL, la lactosa es metabolizada generándose ácido láctico como producto final mayoritario. En el yogurt, por ejemplo, el 20% de la lactosa presente en la leche es metabolizada a ácido láctico alcanzando niveles del 0,9% (100 mM) en el producto final (Cheng, 2010). Por otro lado, el kefir es una de las leches fermentadas con mayores niveles de ácido láctico alcanzándose valores de hasta el 2% (222 mM). Esto probablemente sea consecuencia de la fermentación conjunta por parte de los microorganismos que conforman el gránulo (Garrote et al., 2010; Londero et al., 2012). La producción de ácido láctico, junto con otros ácidos minoritarios como el ácido acético, da lugar a un descenso de pH que produce la desnaturalización de las proteínas de la leche y lleva a la formación del coágulo de caseína (gel ácido). El bajo pH permite garantizar una mayor vida útil del producto ya que impide el desarrollo de microorganismos contaminantes que llevarían a la descomposición del alimento. Además, el ácido láctico constituye un metabolito bioactivo al que se le atribuyen diversos efectos beneficiosos. Es capaz de ejercer un efecto inhibitorio frente a distintos patógenos intestinales, tales como *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Bacillus cereus*, siendo la forma no disociada del ácido responsable de este efecto (Iraporda et al., 2017). Si bien durante años el ácido láctico fue considerado simplemente como un metabolito con propiedades organolépticas y antimicrobianas específicas; nuevas propiedades bioactivas han sido descritas recientemente. Importantes propiedades antiinflamatorias han sido demostradas tanto *in vitro* como *in vivo* (Dietl et al., 2010; Gottfried et al., 2006; Iraporda et al., 2016, 2015;

Watanabe et al., 2009). Además de la acción antiinflamatoria, se le atribuye la capacidad de estimular la proliferación de enterocitos lo que contribuye al mantenimiento de la barrera intestinal (Okada et al., 2013). De esa manera, el ácido láctico producido durante la fermentación puede contribuir significativamente al bienestar y la salud del tracto gastrointestinal.

Algunas BAL son capaces de producir polisacáridos extracelulares que pueden estar estrechamente asociados a la superficie celular formando una cápsula o estar débilmente asociado a las estructuras celulares externas y ser liberadas al medio circundante (Ruas-Madiedo et al., 2008). Los EPS producidos por las BAL juegan un rol importante en la reología, textura y la palatabilidad (mouthfeel) de los productos lácteos fermentados, por lo que son ampliamente utilizados como agentes espesantes (Badel et al., 2011; Vijayendra y Shamala, 2014). La textura cremosa en los yogures, uno de los aspectos de calidad deseados y buscados por los consumidores, suele estar relacionado con la producción de EPS por la bacteria utilizada para la fermentación (De Vuyst et al., 1998; Torino et al., 2015). El uso de EPS producidos por BAL ya sea como aditivo o mediante producción *in situ* ha constituido también una alternativa para mejorar la textura de productos reducidos en grasa (Ryan et al., 2015). En la mayoría de los casos, se busca que mediante la presencia del EPS se logre un efecto espesante, aumentando la viscosidad del producto. La viscosidad intrínseca es directamente proporcional al volumen específico del polisacárido en solución que depende del peso molecular del polímero y del radio de giro (R_g), una medida relacionada con el tamaño del polímero en solución. En este sentido el efecto del EPS dependerá de su estructura, lográndose una mayor viscosidad para polímeros con cadenas más largas y de mayor peso molecular (Ruas-Madiedo et al., 2008). Sin embargo, la contribución del EPS a las propiedades reológicas del producto no dependen únicamente de la estructura del mismo, sino también de cómo es la interacción con los distintos componentes de la matriz alimentaria (Ruas-Madiedo et al., 2008). Por otro lado, se ha demostrado que la producción de EPS durante la fermentación de la leche no sólo da lugar a un aumento de la viscosidad aparente del producto sino que también reduce el grado de sinéresis, que corresponde a la separación del suero y el gel ácido de caseínas y constituye una de las característica no deseada en yogures y leches fermentadas (Badel et al., 2011; Cerning, 1990). Este efecto se debe también a la interacción del EPS con las proteínas, lo que favorece la retención de agua en el gel ácido (Badel et al., 2011; Lynch et al., 2018). Además, cabe destacar que el EPS puede mejorar al producto en cuanto a sus propiedades tecnológicas y también las propiedades funcionales del alimento ya que se

le han atribuido una gran variedad de efectos benéficos sobre la salud (Ryan et al., 2015).

Teniendo en cuenta estos aspectos, resulta de interés para la industria el desarrollo de estrategias para optimizar las condiciones de fermentación de forma tal de lograr un buen desarrollo del microorganismo potencialmente probiótico en la matriz alimentaria acompañado de la producción de los diferentes metabolitos de interés.

Una estrategia posible consiste en optimizar las condiciones de fermentación, tales como fuente de carbono, temperatura, pH, concentración de sales. Las condiciones de fermentación pueden afectar la velocidad de crecimiento y de acidificación, así como también el pH final alcanzado y los metabolitos producidos durante el crecimiento. En particular, el EPS sintetizado por BAL puede ser fuertemente influenciado por las condiciones de fermentación (Zannini et al., 2016). Dentro de los EPS, los homopolisacáridos (HoPS) son sintetizados en grandes cantidades (1-10g/L), en cambio los heteropolisacáridos (HePS), son producidos en niveles que varían entre 25 a 600 mg/l, lo cual representa un inconveniente para su uso comercial como aditivo alimentario (Ruas-Madiedo et al., 2008; Zeidan et al., 2017). Hasta el momento, no se ha reportado ninguna BAL productora de HePS que haya alcanzado un rendimiento lo suficientemente alto para que resulte económicamente apropiado para su uso como aditivo (Ryan et al., 2015). Por este motivo, el empleo de HePS como agentes espesantes queda limitado a la producción *in situ* cuando la bacteria es utilizada como *starter* para la obtención del producto fermentado (Dertli et al., 2016). Una alternativa para mejorar la producción de HePS involucra modificaciones genéticas en la bacteria para sobreexpresar enzimas involucradas en la síntesis del polímero (UDP glucosa pirofosforilasa y fosfoglucomutasa) lográndose aumentos en el rendimiento de EPS (Levander et al., 2002; Svensson et al., 2005). Sin embargo, los requisitos establecidos por las agencias reguladoras y la percepción negativa de los consumidores frente a los alimentos genéticamente modificados excluyen el uso de estas tecnologías de ADN recombinante para mejorar el rendimiento de EPS en bacterias utilizadas en la fabricación de alimentos (Zeidan et al., 2017). Por este motivo, optimizar la producción de EPS modificando las condiciones de fermentación resulta una estrategia atractiva para aplicar en el desarrollo de nuevos alimentos.

Las levaduras son uno de los microorganismos más ampliamente utilizados en la industria alimenticia, tanto para el consumo humano como para el consumo animal (Diosma et al., 2014a) por lo que el co-cultivo con levaduras constituye una posible alternativa para mejorar el crecimiento y la producción de metabolitos bioactivos por

parte de la bacteria. La levadura a través de su metabolismo le aporta nutrientes a la bacteria, incluyendo aminoácidos y vitaminas que favorecen su crecimiento (Menezes et al., 2018). El efecto benéfico de la presencia de levaduras sobre el cultivo de BAL en leche ya ha sido reportado previamente en la literatura (Liu y Tsao, 2009; Suharja et al., 2014). El co-cultivo de bacterias lácticas con levaduras potencialmente probióticas en productos fermentados ha sido empleado para mejorar las propiedades del alimento por su contribución a las características organolépticas del producto o a los efectos benéficos del alimento (Narvhus y Gadaga, 2003; Viljoen, 2001). El uso de levaduras como probióticos en los alimentos, en particular de los géneros *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, está tomando cada vez más relevancia (Fleet, 2007). Varios autores han reportado que el consumo de *S. cerevisiae* y *S. boulardii* está asociado a una modulación de la microbiota intestinal por lo que es empleada para el tratamiento de diversos desórdenes del tracto gastrointestinal (Azad et al., 2018). Romanin et al. (2010) demostraron que varias cepas de levaduras aisladas de kefir pertenecientes al género *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Issatchenkia* tienen la capacidad de modular la respuesta inmune innata en células de epitelio intestinal. Además de sus propiedades probióticas, las levaduras pueden generar mediante su actividad proteolítica diferentes compuestos que contribuyan al aroma, sabor y textura de los productos lácteos (Zhang et al., 2017). De esta manera el co-cultivo bacteria-levadura no solo se utilizaría para favorecer el crecimiento y la actividad metabólica de la bacteria sino que también aportaría un efecto potencialmente probiótico ya sea por el efecto adicional que puede ejercer la levadura en sí misma o por su capacidad de potenciar el efecto probiótico de la bacteria.

OBJETIVOS

Las leches fermentadas con BAL probióticas ejercen efectos beneficiosos sobre la salud debido a la presencia de los microorganismos y/o a la presencia de componentes bioactivos producidos durante la fermentación. Considerando que el desarrollo de las bacterias lácticas y la producción de metabolitos pueden ser influenciadas por las condiciones de cultivo, el objetivo del presente capítulo fue evaluar el efecto de la temperatura y el co-cultivo con levaduras sobre la capacidad de desarrollar en leche de tres cepas de *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 aisladas de kefir produciendo ácidos orgánicos y exopolisacárido.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del cultivo con levaduras o con sobrenadantes de cultivo de levaduras sobre el crecimiento de las cepas *L. paracasei* en leche.
- Estudiar la influencia de la temperatura de crecimiento sobre el desarrollo de *L. paracasei* en leche.
- Caracterizar las leches fermentadas obtenidas en distintas condiciones de cultivo en cuanto a su aspecto macroscópico, pH final, concentración de ácidos orgánicos y propiedades reológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Se trabajó con 3 cepas de *L. paracasei* productoras de exopolisacárido y 4 cepas de levaduras, 2 fermentadoras de lactosa pertenecientes a la especie *K. marxianus* y 2 no fermentadoras de lactosa de la especie *S. cerevisiae*. Todas las cepas utilizadas pertenecen a la colección CIDCA y fueron aisladas de gránulos de kefir.

L. paracasei

- CIDCA 8339
- CIDCA 83123
- CIDCA 83124

K. marxianus

- CIDCA 8154
- CIDCA 81104

S. cerevisiae

- CIDCA 8112
- CIDCA 81106

Las cepas de *Lactobacillus* conservadas a -80 °C en leche descremada estéril al 50 % v/v fueron reactivadas en caldo MRS (Difco Laboratories, USA) e incubadas en aerobiosis a 20 °C (48 h), 30 °C (24 h) o 37 °C (24 h). Las cepas de levaduras, conservadas a 4 °C en agar YGC (Biokar Diagnostics, Francia) fueron reactivadas y crecidas en caldo YPD a 30 °C durante 24 h en condiciones de aerobiosis.

2. Obtención del sobrenadante de cultivo de levaduras

Se centrifugó un cultivo de levaduras de 24 h en YPD (aproximadamente 1×10^7 UFC/ml) durante 10 min a 4200 *xg*. El sobrenadante obtenido se filtró en esterilidad a través de una membrana de 0,45 μm de diámetro de poro (Millipore Corporation, USA) para asegurar la remoción completa de las células y obtener el sobrenadante de cultivo.

3. Obtención de leches fermentadas

Se obtuvieron leches fermentadas con cada cepa de lactobacilo y se evaluó el efecto de la temperatura y el co-cultivo con levaduras en el crecimiento del lactobacilo y la producción de metabolitos. Para evaluar el efecto de la temperatura de incubación, 10 ml de leche parcialmente descremada UHT (La Serenísima, Mastellone Hnos S.A, Argentina) fueron inoculados con 500 μl de un cultivo de lactobacilo crecido previamente a 20 °C, 30 °C o 37 °C en caldo MRS conteniendo aproximadamente $1-3 \times 10^9$ UFC/ml y luego incubados a la temperatura correspondiente hasta alcanzar un pH inferior a 4,5.

Por otro lado, se obtuvieron leches fermentadas en co-cultivo con las levaduras o en presencia del sobrenadante de cultivo de levaduras, ensayando todas las combinaciones posibles. Para ello, se inoculó la leche parcialmente descremada UHT (SanCor Cooperativas Unidas Limitada, Argentina) con el lactobacilo crecido a 37 °C (5 % v/v) y la levadura (5 % v/v) o su sobrenadante de cultivo (10 % v/v). Las muestras fueron incubadas a 37 °C hasta alcanzar un pH inferior a 4,5.

4. Obtención de la fracción no microbiana de las leches fermentadas

La fracción no microbiana (FNM) de las leches fermentadas se obtuvo mediante centrifugación durante 5 min a 4200 *xg*. Para determinados experimentos, el sobrenadante obtenido fue neutralizado con NaOH 5M y centrifugado nuevamente. Finalmente, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,45 μm (Millipore Corporation, USA) en condiciones de esterilidad.

5. Caracterización de las leches fermentadas

5.1. Cinética de crecimiento y acidificación en leche

Se estudió el crecimiento en leche de las tres cepas de *L. paracasei* y el efecto de la temperatura o de la presencia de levaduras/sobrenadantes en función del tiempo. Para ello, se inocularon 10ml de leche para cada condición de acuerdo a lo descrito en la **sección 3** y se tomaron alícuotas a distintos tiempos para realizar el recuento de bacterias lácticas y la determinación de pH. Se realizaron diluciones seriadas 1/10 en triptona al 0,1% p/v y se determinó la concentración de bacterias viables en placas de agar MRS empleando el método de la gota (Silva et al., 2004).

5.2. Determinación de pH

El pH de las leches fermentadas se determinó utilizando un pHmetro con electrodo combinado de vidrio calomel (EZDO-PC, Altronix, Argentina).

5.3. Evaluación de la producción de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos se determinaron cualitativa y cuantitativamente sobre la fracción no microbiana de las leches fermentadas mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Para la preparación de la muestra 1 ml de producto fermentado se centrifugó durante 10 min a 10000 *xg*. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de 0,45 μm (Millipore Corporation, USA) y 20 μl del filtrado se inyectaron en el cromatógrafo. Los ácidos fueron separados en una columna de intercambio iónico AMINEX HPX-87H (BioRad Labs, USA) y se detectaron a 214 nm (Waters TM 996, USA) en un tiempo de corrida de 30min. La determinación se llevó a cabo a una velocidad de flujo

de 0,7 ml/min a 60 °C utilizando H₂SO₄ 0,009 N como fase móvil. La identificación de los ácidos se basó en la comparación de los tiempos de retención con soluciones estándar de los ácidos preparados con reactivos de grado HPLC (Sigma Chemical Co, USA). Por otro lado, se construyeron curvas de calibración con patrones de ácido láctico y ácido acético para determinar la concentración de dichos ácidos en las muestras de leche fermentada.

5.4. Caracterización del comportamiento reológico y viscosidad aparente

Se utilizó un reómetro Rheostress 600 (Haake, Alemania) en su modo rotacional, empleando la geometría compuesta de plato-plato rugoso. Se tomó una alícuota de 1,7 ml del producto fermentado y, procurando no alterar su estructura, se colocó en el plato inferior del reómetro descendiendo luego el superior hasta alcanzar la separación preestablecida de 1 mm. La muestra se termostató a 25 °C utilizando un baño anexo (Termohaake DC50). Cada una de las muestras fue sometida a un ciclo que consistió en aplicar una aceleración de 167 s⁻¹ para alcanzar en 2 min un gradiente de velocidad de deformación de 500 s⁻¹. Una vez alcanzado, se mantuvo el mismo durante 1 min y finalmente se descendió hasta 0 s⁻¹ utilizando una aceleración igual a la antes mencionada, pero de signo negativo. Se registró el esfuerzo de corte en función del gradiente de velocidad de deformación. A partir de las gráficas correspondientes al comportamiento de flujo se determinó la viscosidad aparente (η_{ap}) a un gradiente de velocidad de 300 s⁻¹. De igual modo se analizó como control la leche sin fermentar.

6. Efecto del cultivo con levaduras sobre el aspecto macroscópico de las colonias

A partir de un cultivo de *L. paracasei* en caldo MRS (24 h a 37 °C) se realizaron diluciones seriadas 1/10 en triptona 0,1% p/v. Se seleccionó la dilución adecuada de manera tal de obtener un número significativo de colonias bien individualizadas y se sembraron 100 µl en una placa de agar MRS que fueron esparcidos en toda la superficie utilizando perlas de vidrio estériles. Finalmente, se sembraron 20 µl de un cultivo fresco de levadura o 100 µl de sobrenadante de cultivo de levadura en el centro de la placa. Las placas se incubaron 48 h a 37 °C y luego se mantuvieron 10 días a temperatura ambiente. El aspecto macroscópico de las colonias se evaluó periódicamente.

7. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar. Para la evaluación estadística se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido del Test de Tukey para comparaciones múltiples, con un nivel de significación $\alpha= 0,05$. Se utilizó el programa GraphPad Prism, versión 5.01 para Windows (GraphPad Software, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Considerando que las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124, son bacterias ácido lácticas aisladas de gránulos de kefir productoras de exopolisacárido y ácidos orgánicos, se estudiaron diferentes condiciones de cultivo que permitieran mejorar su crecimiento y la producción de metabolitos para lograr un producto fermentado con buenas propiedades funcionales y tecnológicas. Se analizaron la influencia del co-cultivo con levaduras o sus sobrenadantes así como la variación de la temperatura de fermentación sobre las características de las leches fermentadas obtenidas.

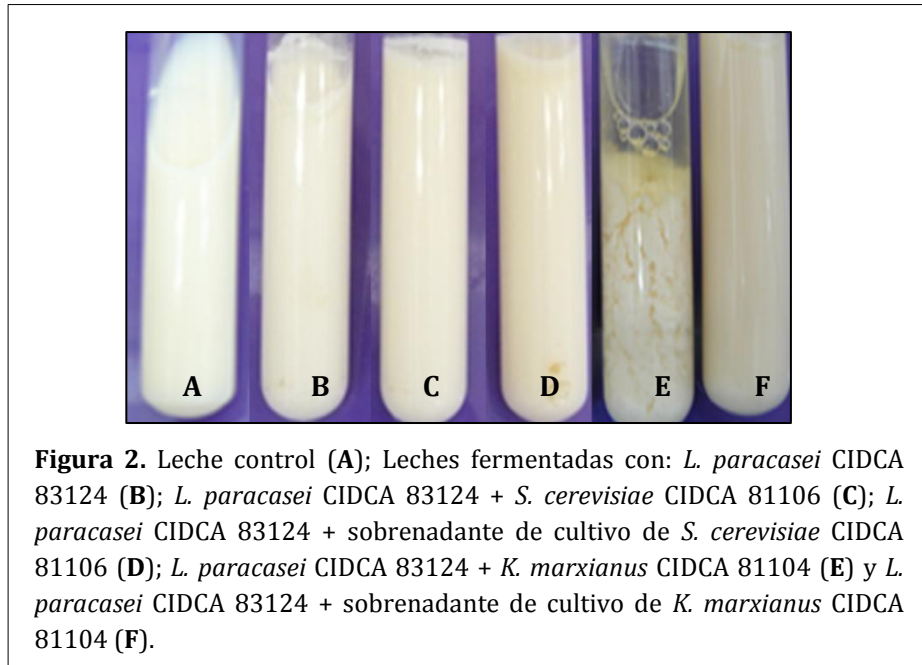
1. Influencia del co-cultivo con levaduras o sobrenadante de cultivo de levaduras sobre el crecimiento de *L. paracasei* y la producción de metabolitos

Se trabajó con 4 cepas de levaduras, *K. marxianus* CIDCA 8154 y CIDCA 81104 (fermentadoras de lactosa) y *S. cerevisiae* CIDCA 8112 y CIDCA 81106 (no fermentadoras de lactosa), que fueron seleccionadas debido a su potencialidad probiótica previamente evidenciada (Diosma et al., 2014; Londero et al., 2015). Se obtuvieron leches fermentadas con cada uno de los lactobacilos crecidos solos, en co-cultivo con las levaduras o en presencia del sobrenadante de cultivo de levadura y se procedió a su caracterización. Se evaluaron el aspecto macroscópico de los coágulos, el efecto sobre el crecimiento de los lactobacilos, el pH final, la concentración de ácidos orgánicos y la viscosidad aparente de las leches fermentadas.

1.1. Aspecto macroscópico de los coágulos

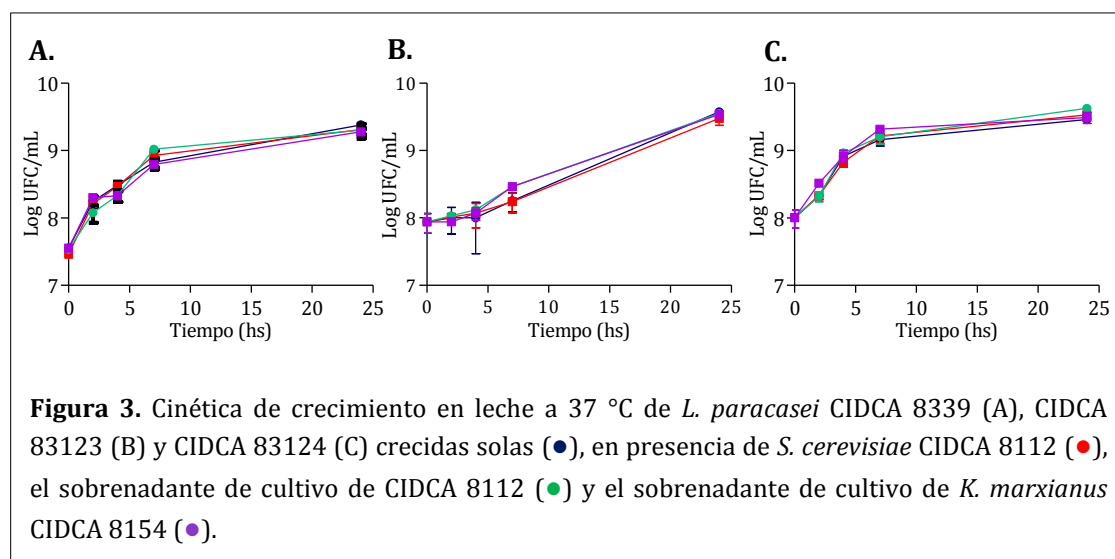
El aspecto macroscópico de las leches fermentadas es una de las principales limitaciones que existen para el uso de bacterias ácido lácticas y levaduras en el desarrollo de nuevos productos alimenticios. Éstas deben presentar un aspecto agradable para el consumidor; con buena firmeza y alta capacidad de retención de agua. Al evaluar el aspecto de las leches fermentadas, se observó que aquellas obtenidas con *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 tanto en cultivos puros como en cultivos mixtos con *S. cerevisiae* CIDCA 8112 y CIDCA 81106 presentaron un buen aspecto macroscópico: gel firme, sin gas y sin sinéresis. Coágulos de aspecto semejante se obtuvieron cuando la leche fue fermentada por los lactobacilos en presencia de sobrenadantes de levaduras de la especie *S. cerevisiae* o *K. marxianus*. Por el contrario, las leches obtenidas con cultivos mixtos de *L. paracasei* y *K. marxianus*, presentaron un aspecto poco agradable para el consumidor con abundante gas y sinéresis, debido probablemente a que son levaduras capaces de fermentar la lactosa produciendo alcohol y CO₂ que desestabilizan la

estructura del gel. A modo de ejemplo en la Figura 2 se muestra el aspecto de los coágulos obtenidos con la cepa CIDCA 83124 creciendo sola o en presencia de levaduras o sus sobrenadantes.



1.2. Efecto sobre la cinética de crecimiento de los lactobacilos

Se estudió, además, la cinética de crecimiento en leche de las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 a 37 °C en presencia de levaduras y/o sobrenadantes de levaduras. En la Figura 3 se muestran las curvas de crecimiento de las cepas *L. paracasei* observándose que la cinética de los lactobacilos no se ve modificada por la presencia de las levaduras o los sobrenadantes de cultivo ensayados. Por otro lado, si se comparan los lactobacilos, se observa que las cepas CIDCA 8339 y CIDCA 83124 tienen velocidades de crecimiento de 0,1727 h⁻¹ y 0,173 h⁻¹ respectivamente, alcanzándose la fase estacionaria luego de 7 h de fermentación. *L. paracasei* CIDCA 83123, en cambio, presenta una velocidad de crecimiento menor ($\mu=0,0734$ h⁻¹), llegando a una concentración de microorganismos viables de 10⁹-10¹⁰ UFC/ml luego de 24 h de fermentación.



1.3. Efecto sobre el pH final de las leches fermentadas y la concentración de ácidos orgánicos

Todas las leches fermentadas evaluadas presentaron valores de pH entre 3,7 - 4,1 (Tabla 2) luego de 24 h de fermentación. Los pHs de las leches obtenidas con las distintas cepas de *L. paracasei* no fueron significativamente diferentes. Asimismo, se pudo ver que la presencia de levaduras o sus sobrenadantes de cultivo no modificó significativamente el pH final alcanzado en ninguno de los cultivos.

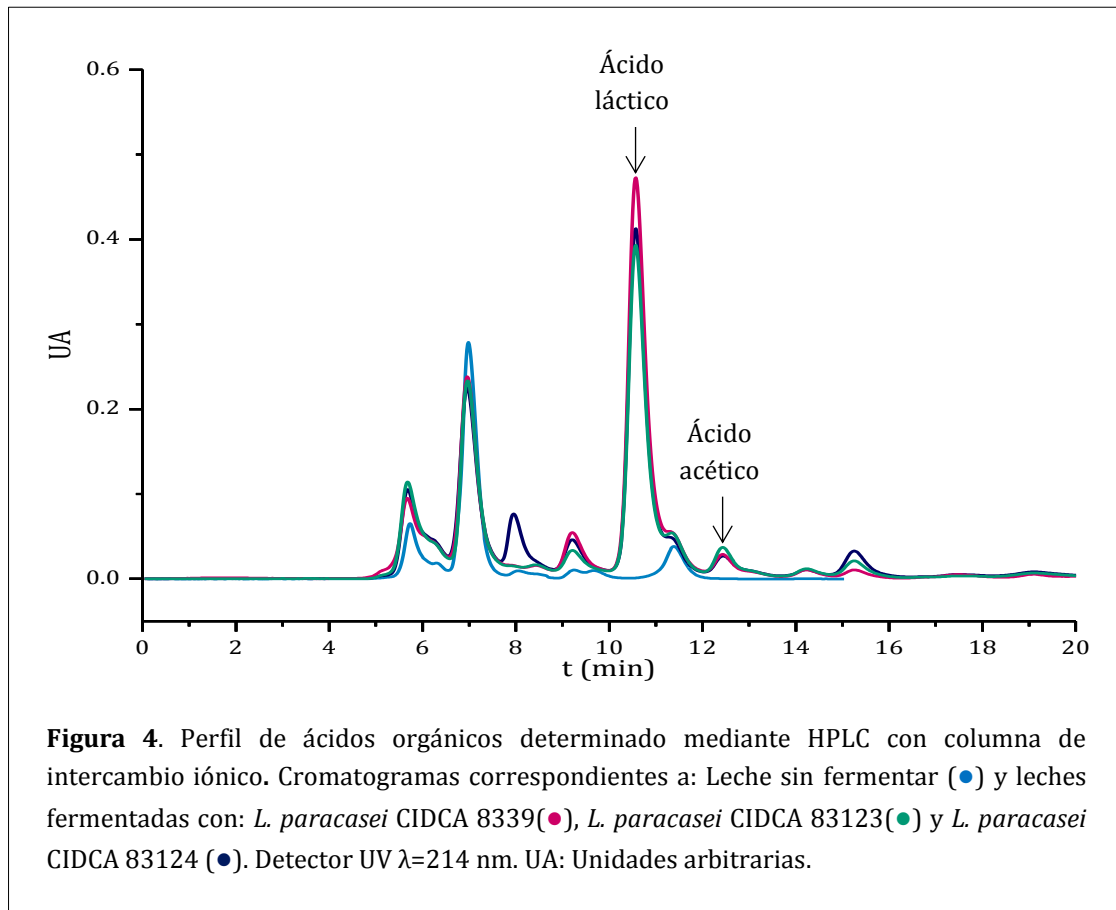
Tabla 2. pH de las leches fermentadas con *L. paracasei* CIDCA 8339, 83123 y 83124 durante 24 h a 37 °C en aerobiosis.

| Levadura o SN | <i>L. paracasei</i> | | |
|----------------------------------|---------------------|-------------|-------------|
| | CIDCA 8339 | CIDCA 83123 | CIDCA 83124 |
| | 4,11 ±0,29 | 3,97 ±0,22 | 3,89 ±0,20 |
| <i>S. cerevisiae</i> CIDCA 8112 | 3,95 ±0,26 | 3,97 ±0,22 | 3,80 ±0,13 |
| <i>S. cerevisiae</i> CIDCA 81106 | 3,93 ±0,22 | 3,96 ±0,22 | 3,82 ±0,1 |
| <i>K. marxianus</i> CIDCA 81104 | 3,91 ±0,19 | 4,16 ±0,16 | 3,89 ±0,13 |
| <i>K. marxianus</i> CIDCA 8154 | 3,91 ±0,20 | 4,12 ±0,19 | 3,85 ±0,11 |
| SN 8112 | 3,83 ±0,13 | 3,94 ±0,21 | 3,70 ±0,13 |
| SN 81106 | 3,85 ±0,14 | 3,93 ±0,18 | 3,70 ±0,12 |
| SN 81104 | 3,82 ±0,16 | 3,93 ±0,19 | 3,71 ±0,12 |
| SN 8154 | 3,79 ±0,14 | 3,89 ±0,17 | 3,75 ±0,11 |

Se expresa el valor promedio determinado en 3 experimentos independientes ± DS.
SN: sobrenadante de cultivo libre de células. DS: desviación standard

Tal como se mencionó anteriormente, uno de los metabolitos bioactivos de mayor interés producidos por las BAL durante la fermentación son los ácidos orgánicos. En la Figura 4 se muestran los cromatogramas correspondientes a las leches fermentadas con

cada una de las cepas de *L. paracasei* indicándose los picos correspondientes a ácido láctico y ácido acético. Asimismo, se observó la presencia de picos a 8,2; 9,3 y 15,4 min que corresponden a otros productos de fermentación que no pudieron ser identificados. En el cromatograma correspondiente a una la leche acidificada artificialmente con HCl, no se observan los picos de ácido láctico y acético, lo que nos permite asegurar que estos dos metabolitos son producidos en su totalidad durante la fermentación.



Los niveles de ácido láctico y ácido acético obtenidos para las distintas leches fermentadas se muestran en la Tabla 3. Como se puede observar, las tres cepas de *L. paracasei* son capaces de producir altas concentraciones de ácido láctico con valores entre 133 y 169 mM. Si bien se obtuvieron niveles levemente superiores con la cepa CIDCA 8339 estas diferencias no resultaron significativas. Con respecto al ácido acético, se observó que *L. paracasei* CIDCA 83123 produce una cantidad significativamente mayor en comparación con las otras dos cepas, alcanzando una concentración de 29,6 mM.

Tabla 3. Concentración de ácido láctico (mM) y ácido acético (mM) en leches fermentadas con *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 en combinación con levaduras y sus sobrenadantes

| ACIDO LACTICO (mM) | | | |
|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Levadura o SN | CIDCA 8339 | CIDCA 83123 | CIDCA 83124 |
| | 169,1 ±12,9 | 133,4 ±10,6 | 144,2 ±19,9 |
| <i>S. cerevisiae</i> CIDCA 8112 | 161,2 ±24,9 | 119,0 ±10,6 | 158,4 ±7,9 |
| <i>S. cerevisiae</i> CIDCA 81106 | 166,8 ±14,6 | 121,4 ±10,7 | 146,6 ±17,4 |
| <i>K. marxianus</i> CIDCA 81104 | 163,4 ±19,2 | 116,8 ±15,2 | 134,6 ±20,5 |
| <i>K. marxianus</i> CIDCA 8154 | 164,8 ±19,7 | 117,8 ±20,7 | 144,9 ±26,3 |
| SN 8112 | 164,6 ±18,0 | 128,5 ±14,1 | 165,8 ±2,0 |
| SN 81106 | 174,2 ±7,5 | 127,0 ±17,6 | 167,6 ±1,8 |
| SN 81104 | 173,0 ±18,0 | 127,3 ±23,9 | 165,5 ±8,6 |
| SN 8154 | 175,9 ±17,9 | 134,3 ±9,5 | 168,8 ±2,5 |
| ACIDO ACETICO (mM) | | | |
| Levadura o SN | CIDCA 8339 | CIDCA 83123 | CIDCA 83124 |
| | 18,81 ±2,86 ^a | 29,63 ±3,10 ^b | 17,69 ±5,23 ^a |
| <i>S. cerevisiae</i> CIDCA 8112 | 22,57 ±7,45 ^a | 25,25 ±3,35 ^b | 20,57 ±7,46 ^a |
| <i>S. cerevisiae</i> CIDCA 81106 | 20,54 ±7,69 ^a | 26,54 ±3,85 ^b | 19,29 ±8,09 ^a |
| <i>K. marxianus</i> CIDCA 81104 | 20,28 ±8,43 ^a | 29,14 ±0,56 ^b | 17,83 ±5,82 ^a |
| <i>K. marxianus</i> CIDCA 8154 | 21,84 ±8,9 ^a | 28,58 ±0,95 ^b | 18,78 ±7,51 ^a |
| SN 8112 | 21,66 ±8,83 ^a | 28,86 ±9,30 ^b | 19,84 ±4,18 ^a |
| SN 81106 | 23,02 ±7,07 ^a | 27,28 ±5,77 ^b | 21,16 ±6,47 ^a |
| SN 81104 | 19,73 ±2,36 ^a | 27,69 ±3,72 ^b | 19,45 ±5,64 ^a |
| SN 8154 | 20,27 ±3,73 ^a | 29,33 ±3,09 ^b | 19,83 ±7,95 ^a |

Se expresa el valor promedio determinado en 3 experimentos independientes ± desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)
SN: sobrenadante de cultivo.

Asimismo, la presencia de las levaduras o sus sobrenadantes de cultivo no inducen cambios significativos en la concentración de ácido láctico y acético producidos por *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124. En la Figura 5 se presentan a modo de ejemplo los cromatogramas de las leches fermentadas con la cepa CIDCA 8339 sola y en presencia de la levadura *K. marxianus* CIDCA 8154 o su sobrenadante de cultivo, sin observarse diferencias en el área de los picos correspondiente al ácido láctico y acético.

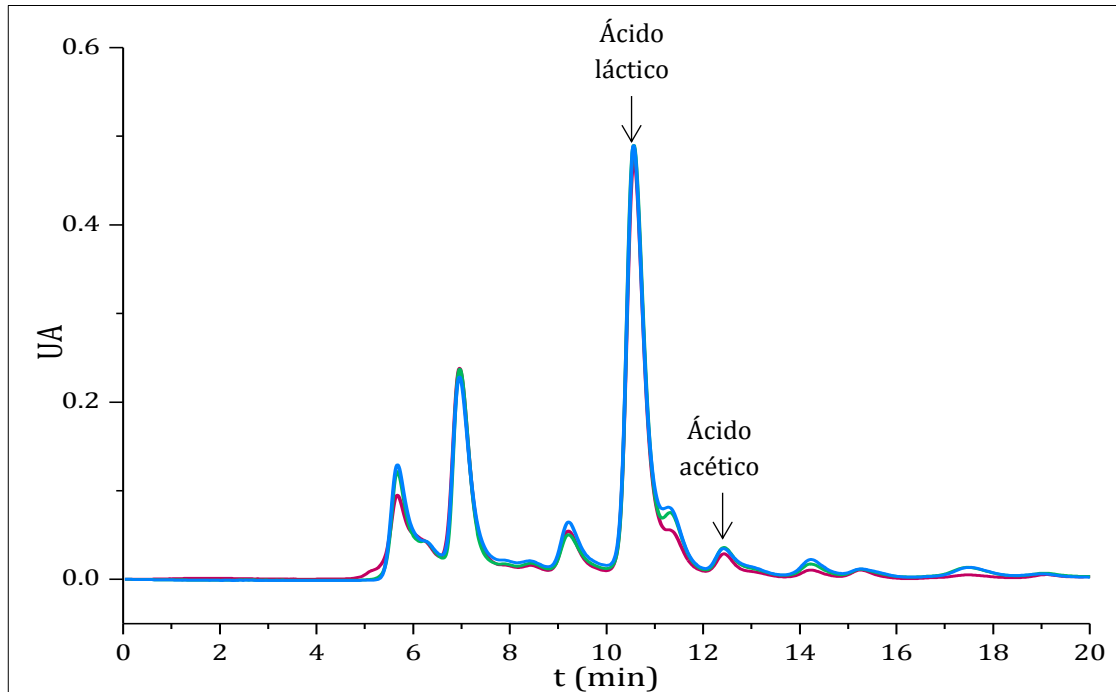


Figura 5. Perfil de ácidos orgánicos determinado mediante HPLC con columna de intercambio iónico. Cromatogramas correspondientes a: Leche fermentada con: *L. paracasei* CIDCA 8339 (●), *L. paracasei* CIDCA 8339 y *K. marxianus* CIDCA 8154 (●) y *L. paracasei* CIDCA 8339 en presencia del sobrenadante de cultivo de *K. marxianus* CIDCA 8154 (●) durante 24 h a 37 °C. Detector UV $\lambda=214$ nm. UA: Unidades arbitrarias.

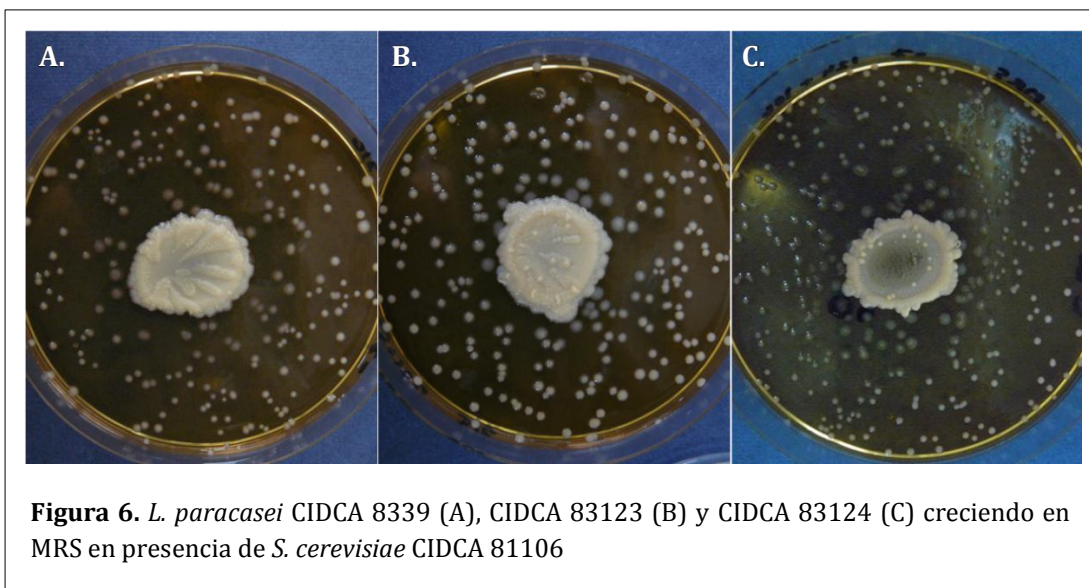
En base a los resultados obtenidos podemos concluir que la presencia de las levaduras o sus sobrenadantes de cultivo durante la fermentación de la leche no modifican la cinética de crecimiento de los lactobacilos ni tampoco conducen a cambios significativos en el pH final de la leche fermentada ni en la producción de ácido láctico o acético. En un estudio similar al realizado en este trabajo, se evidenció que el crecimiento y la concentración de ácido láctico producida por *Lactobacillus plantarum* CECT 220 y *Lactococcus lactis* ATCC 11454 en medio de cultivo aumentan significativamente en presencia del sobrenadante de *S. cerevisiae* JD47 13C (Zoumpourtikoudi et al., 2018). Sin embargo, se debe tener en cuenta que los autores adicionaron al lactobacilo el sobrenadante de levadura en una relación 5 veces mayor a la utilizada en el presente trabajo. Por otro lado, Bertsch et al. (2019), al evaluar el efecto de *S. cerevisiae* sobre tres cepas distintas de *L. rhamnosus* en medio de cultivo, determinaron que la levadura no influye en el crecimiento de los lactobacilos. Asimismo, si bien no observaron cambios en el pH o en la producción de ácido láctico, evidenciaron una reducción significativa en los niveles de ácido acético para dos de las tres cepas de *L. rhamnosus* que fue atribuida a su consumo por parte de la levadura. Otros autores han estudiado la interacción lactobacilo-levadura en diferentes

matrices alimentarias. Londero et al. (2015) evaluaron el desarrollo en co-cultivo de *K. marxianus* CIDCA 8154, *L. plantarum* CIDCA 8327 y *L. kefir* CIDCA 8348 en suero de leche observando que tanto la levadura como *L. plantarum* CIDCA 8327 alcanzaban concentraciones similares a las obtenidas para cultivos puros. Sin embargo, *L. kefir* CIDCA 8348 que presentaba escaso desarrollo al crecer sola en suero, se vió significativamente favorecida por la presencia de los otros microorganismos. Similarmente, Plessas et al. (2008) describieron un efecto sinérgico de *K. marxianus* con *L. helveticus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ya que la presencia de la levadura durante la fermentación del suero de quesería daba lugar a una mayor concentración de ácido láctico debido a que la levadura aporta factores de crecimiento tales como vitaminas que favorecerían el desarrollo de la bacteria y en consecuencia la producción de ácido láctico. En otro estudio, se evidenció que la presencia de *S. cerevisiae* CCMA 0732 o *S. cerevisiae* CCMA 0731 durante la fermentación de bebidas a base de maíz con *L. paracasei* LBC-81 no daba lugar a cambios en la concentración final del lactobacilo ni en los niveles de ácido láctico o acético, sin embargo, el co-cultivo con cualquiera de las dos levaduras permitió alcanzar valores de pH menor que los obtenidos por el lactobacilo en cultivo puro. En este estudio también se analizó la presencia de *Pichia kluyveri* CCMA 0615 que ejerció un efecto negativo sobre el desarrollo del lactobacilo con una reducción en el número de viables luego de 24 h de fermentación acompañada de una caída de casi el 50% en la producción de ácido láctico (Tavares Menezes et al., 2018). Se ha descrito que bacterias y levaduras aisladas de kefir de agua presentan una estrecha relación simbiótica cuyo efecto al crecer en co-cultivo depende de cada par en particular. Por ejemplo, en el co-cultivo de *Zygorhynchus (Z.) florentina* y *Lactobacillus nagelii* las levaduras proveyeron vitaminas, aminoácidos esenciales y factores de crecimiento para las bacterias mientras que los productos finales de las bacterias fueron utilizados por las levaduras como fuentes de energía (Stadie et al., 2013). Por otro lado, la combinación de *L. hilgardii* y *Z. florentina* resultaron en el beneficio de una sola de las especies (parasitismo (Leroi y Pidoux, 1993).

En este sentido, es importante resaltar que si bien la presencia de las levaduras ensayadas o sus sobrenadantes no favorece el crecimiento de *L. paracasei* CIDCA 8339, 83123 y 83124 ni conduce a un aumento de la producción de ácidos orgánicos, tampoco genera un efecto inhibitorio sobre los lactobacilos o la producción de metabolitos bioactivos.

1.4. Efecto en la producción de exopolisacárido

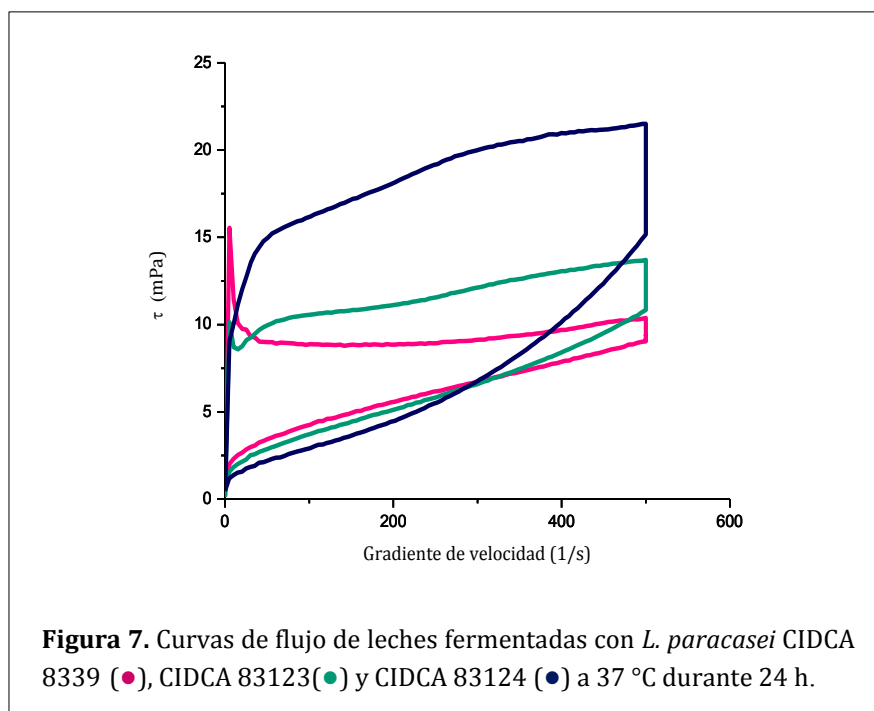
Para evaluar el efecto de las levaduras y de sus sobrenadantes de cultivo en la producción de EPS por parte de los lactobacilos, se realizó un ensayo cualitativo en el que se evaluaron cambios en el aspecto de las colonias de los lactobacilos cuando eran crecidos en agar MRS en presencia de cada levadura. Como se muestra en la Figura 6, la presencia de la levadura CIDCA 81106 estaría ejerciendo algún efecto en la producción de EPS por parte de las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 ya que se observa que las colonias que se encuentran cerca del botón de crecimiento de la levadura presentan un aspecto más mucoso en comparación con las colonias que se encuentran alejadas del mismo. Esto indica que algún metabolito producido por la levadura difunde al medio e induce un cambio en la producción de EPS ya sea en cuanto a la cantidad producida o en cuanto al tipo de EPS sintetizado. Sin embargo, cuando se realizó el mismo ensayo en presencia del sobrenadante de cultivo de la levadura, no se observaron colonias mucosas, indicando que el metabolito responsable de inducir cambios en el EPS es producido por la levadura cuando desarrolla en presencia del lactobacilo. Este comportamiento donde la presencia de las distintas levaduras origina colonias más mucosas y el sobrenadante no induce cambios en el aspecto de la colonia se evidenció con todas las cepas de levaduras estudiadas.



Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en medio de cultivo, se procedió a evaluar la viscosidad de las leches fermentadas con los lactobacilos en presencia de las levaduras o sus sobrenadantes de cultivo. Para la determinación de la viscosidad se descartaron

aquellas combinaciones con levaduras de la especie *K. marxianus* que daban lugar a la formación de coágulos de aspecto poco agradable.

En la Figura 7 se muestra el comportamiento de flujo de las leches fermentadas con *L. paracasei* CIDCA 8939, CIDCA 83123 y CIDCA 83124. Como se puede observar, las leches fermentadas presentaron un comportamiento pseudoplástico y tixotrópico. Sin embargo, la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 83124 presentó un área de histéresis mucho mayor. El área de histéresis, comprendida entre las curvas de esfuerzo de corte correspondientes al ascenso y descenso de gradiente de velocidad de deformación, es una medida del grado de ruptura estructural que se produce durante el ciclo de aplicación del esfuerzo de corte (Rimada y Abraham, 2006). Este resultado indica que las interacciones entre las macromoléculas EPS-proteína de esta leche fermentada difieren a la de las otras leches fermentadas probablemente debido a las características del EPS producido por esta cepa (Folkenberg et al., 2006).



Asimismo, dichas leches fermentadas presentaron distintos valores de viscosidad aparente a 300 s^{-1} . La leche obtenida con *L. paracasei* CIDCA 83124 presentó una viscosidad aparente de 62,6 mPa.s, significativamente mayor a la viscosidad de las leches fermentadas con la cepa CIDCA 83123 y CIDCA 8339 (Tabla 4).

Tabla 4. Viscosidad aparente a 300 s⁻¹ de las leches fermentadas 24h a 37 °C con las cepas de *L. paracasei* en combinación con levaduras y sus sobrenadantes.

| Levaduras o SN | <i>L. paracasei</i> | | |
|----------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | CIDCA 8339 | CIDCA 83123 | CIDCA 83124 |
| | 28,54 ±7,71 ^a | 37,90 ±6,16 ^b | 62,45 ±3,70 ^c |
| <i>S. cerevisiae</i> CIDCA 8112 | 27,31±9,04 ^a | 43,44 ±2,40 ^b | 54,92 ±2,79 ^c |
| <i>S. cerevisiae</i> CIDCA 81106 | 26,32±4,70 ^a | 41,06 ±0,54 ^b | 55,22 ±1,30 ^c |
| SN 8112 | 27,86 ±8,25 ^a | 42,69±7,11 ^b | 56,97±0,85 ^c |
| SN 81106 | 31,49 ±14,12 ^a | 38,24±0,76 ^b | 54,67±5,29 ^c |
| SN 81104 | 28,11 ±8,19 ^a | 39,25 ±1,29 ^b | 57,07 ±1,69 ^c |
| SN 8154 | 30,89 ±11,14 ^a | 38,31±2,76 ^b | 56,24±3,60 ^c |

Se expresa el valor promedio determinado en tres experimentos independientes ± desviación estándar. Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se pudo evidenciar que, a pesar del efecto observado en el aspecto de las colonias en presencia de las levaduras, no se evidenciaron cambios significativos en la viscosidad aparente cuando las leches fueron fermentadas en co-cultivo con levaduras. De la misma manera, la fermentación en presencia de sus sobrenadantes tampoco generó una modificación en el valor de viscosidad. Este resultado podría deberse a que el metabolito producido por la levadura que induciría cambios en el EPS es sintetizado en medio MRS, pero no en leche, o a que los cambios inducidos en el EPS (cantidad/calidad) no modifican significativamente la viscosidad ni el comportamiento reológico del producto fermentado.

El efecto del co-cultivo sobre la producción de exopolisacárido no ha sido ampliamente reportado en la literatura. Bertsch et al. (2019) estudiaron el efecto del co-cultivo de *S. cerevisiae* sobre la producción de EPS por parte de tres cepas *L. rhamnosus* ATCC 9595, R0011 y RW-9595M, evidenciando que la presencia de la levadura aumentaba significativamente la producción de EPS, efecto atribuido al incremento de la expresión de genes involucrados en la síntesis del polímero. Similarmente, *S. cerevisiae* IFO 0216 también induce un aumento en la expresión de los genes involucrados en la vía de síntesis de exopolisacárido de *L. paracasei* ATCC 334 (Yamasaki-Yashiki et al., 2017). Los autores determinaron que dicho efecto requiere del contacto célula-célula y en particular de la interacción de la bacteria con los mananos de la pared celular de la levadura.

Con respecto a combinaciones de bacterias y levaduras aisladas de kefir, Cheirsilp et al. demostraron un efecto positivo en el crecimiento y la producción de kefiran en MRS-lactosa por *L. kefiranofaciens* en un cultivo mixto con *S. cerevisiae* siendo el contacto bacteria levadura necesario para aumentar la producción de polisacárido capsular. Asimismo, demostraron que la cantidad de ácido láctico en el co-cultivo fue menor

posiblemente como consecuencia del consumo de la levadura (Cheirsilp et al., 2003a, 2003b).

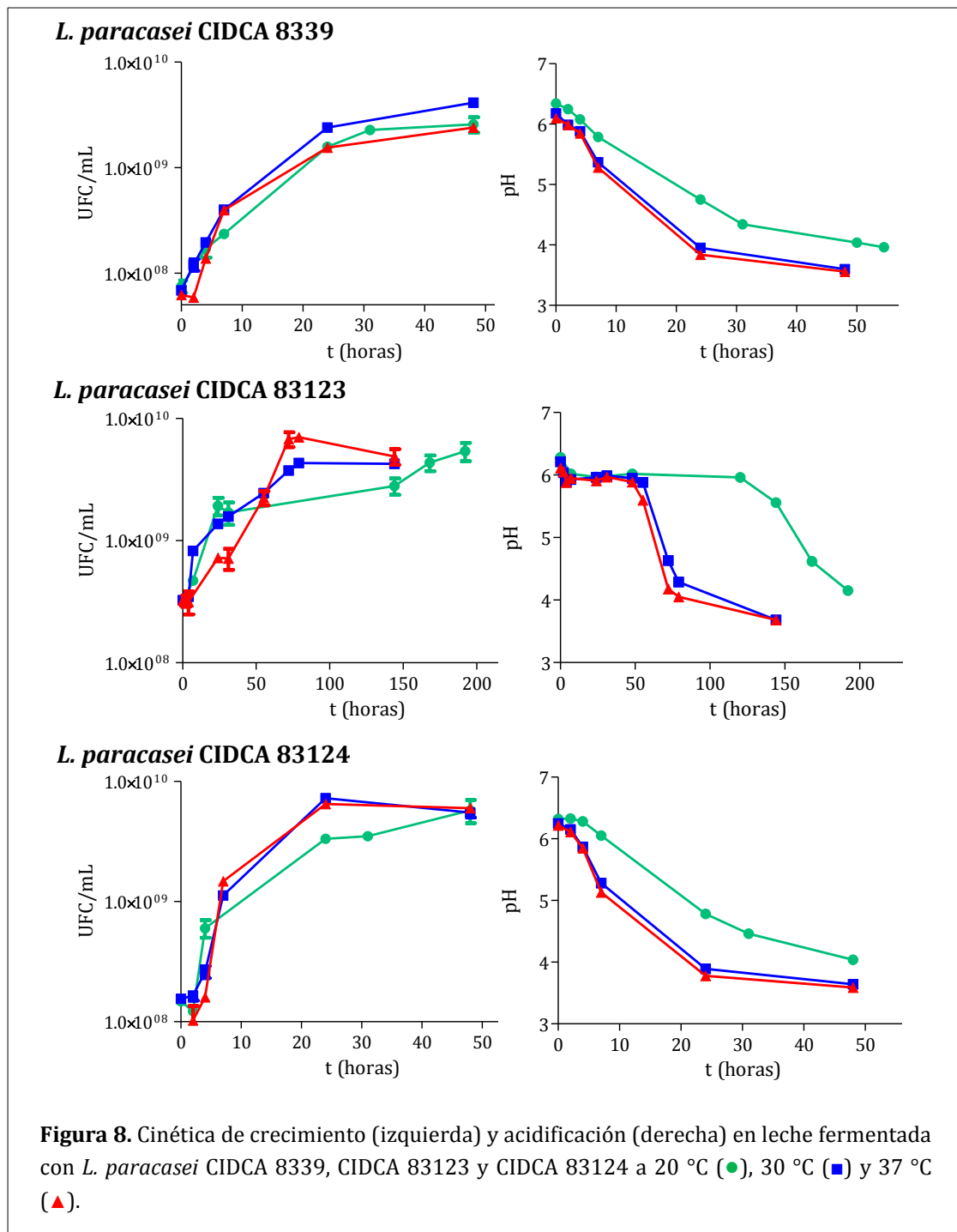
Estos resultados difieren de los obtenidos en el presente trabajo donde el efecto de la levadura no requiere del contacto bacteria-levadura sino que estaría dado por un metabolito sintetizado por la levadura en presencia del lactobacilo indicando nuevamente que la interacción bacteria-levadura en sistemas mixtos depende de cada par seleccionado.

2. Influencia de la temperatura de incubación sobre el crecimiento de *L. paracasei* y la producción de metabolitos

A fin de evaluar el efecto de la temperatura en el crecimiento y producción de ácidos orgánicos, se analizó la cinética de crecimiento y acidificación de las cepas de *L. paracasei* a 20 °C, 30 °C y 37 °C, y las leches fermentadas obtenidas fueron caracterizadas en cuanto a tiempo de fermentación necesario para formar un gel ácido, pH final, concentración de ácidos orgánicos y viscosidad aparente.

Las tres cepas independientemente de la temperatura dieron lugar a coágulos de aspecto agradable, firmes y sin sinéresis. Las leches fermentadas con las cepas CIDCA 8339 y CIDCA 83123 no presentaron filancia a ninguna temperatura. Sin embargo, en el caso de la cepa CIDCA 83124, los productos obtenidos a 20 y 30 °C presentaron una filancia muy marcada que no estaba presente cuando la leche era fermentada a 37 °C.

En la Figura 8 se muestran las cinéticas de crecimiento y acidificación a las tres temperaturas de las tres cepas de *L. paracasei*.

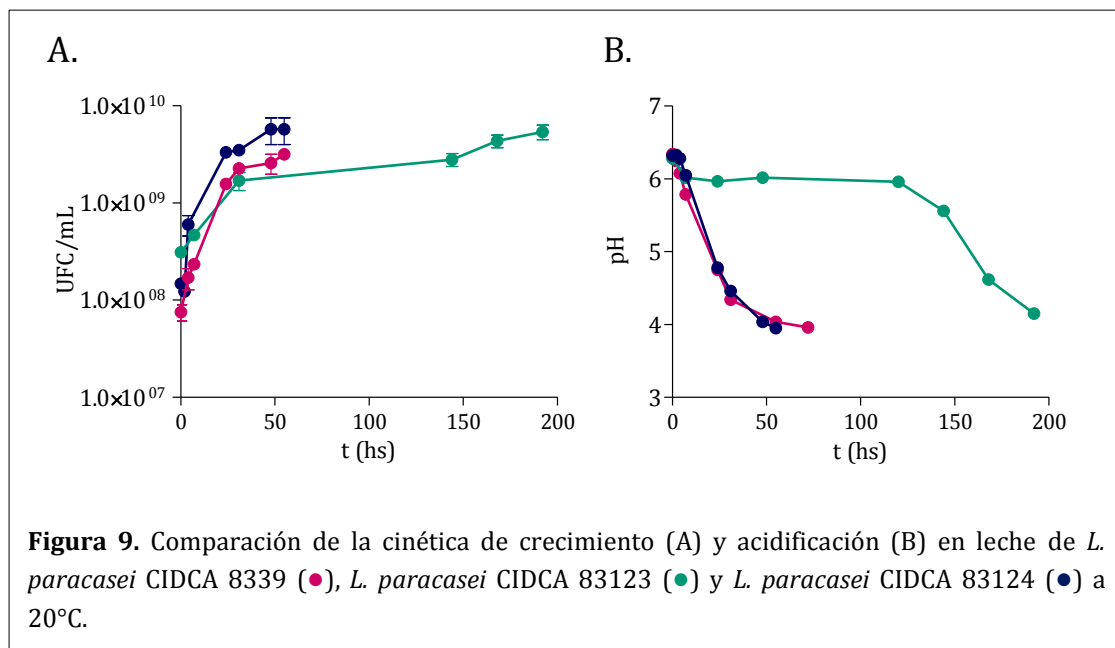


Para las tres cepas se evidenció que la velocidad de crecimiento del microorganismo es mayor al aumentar la temperatura, sin modificarse la cosecha máxima (Figura 8 y Tabla 5). En cuanto a la cinética de acidificación, se evidenció que a 30 y 37 °C el descenso de pH es similar mientras que cuando la temperatura de fermentación es 20 °C la velocidad de acidificación disminuye. La menor velocidad de crecimiento y acidificación evidenciada a 20 °C para las tres cepas permite explicar los tiempos más prolongados que se requieren para obtener los geles ácidos ($\text{pH} \leq 4,5$) a esta temperatura (Tabla 5).

Tabla 5. Caracterización de las leches fermentadas con *L. paracasei* a 20, 30 y 37°C.

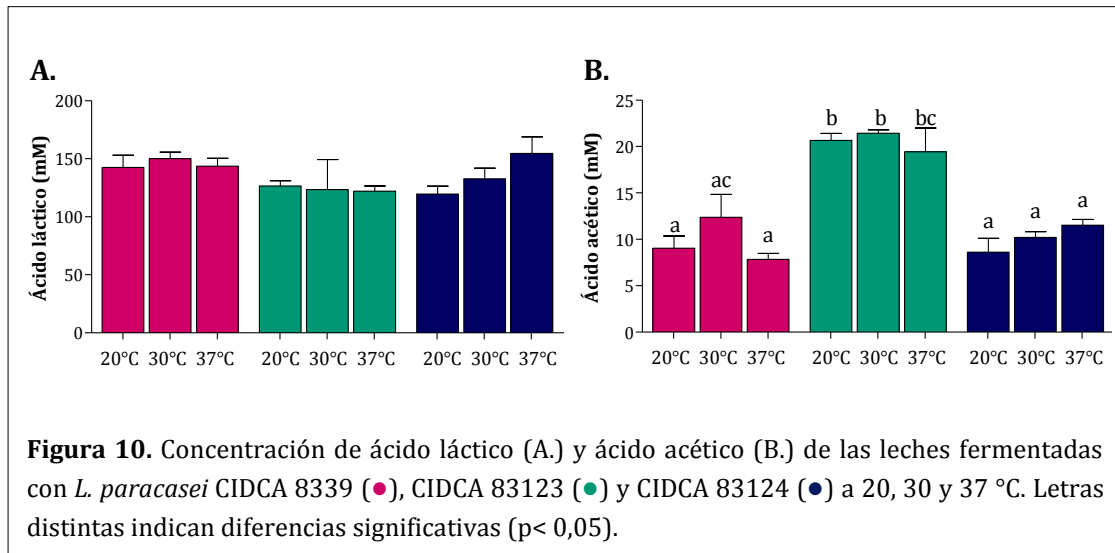
| Cepa | Temperatura de fermentación | μ (h ⁻¹) | Cosecha máxima (UFC/ml) | pH | Tiempo de coagulación |
|-------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------|------------|-----------------------|
| CIDCA 8339 | 20 °C | 0,0718 | 1,58 10 ⁹ | 3,88 ±0,07 | 48h |
| | 30 °C | 0,1088 | 2,40 10 ⁹ | 3,88 ±0,08 | 24h |
| | 37 °C | 0,1645 | 1,55 10 ⁹ | 3,87 ±0,09 | 24h |
| CIDCA 83123 | 20 °C | 0,0055 | 5,40 10 ⁹ | 3,86 ±0,10 | 6/7días |
| | 30 °C | 0,0138 | 4,25 10 ⁹ | 4,04 ±0,28 | 72h |
| | 37 °C | 0,0178 | 4,90 10 ⁹ | 3,9 ±0,09 | 48h |
| CIDCA 83124 | 20 °C | 0,0556 | 5,75 10 ⁹ | 4,03 ±0,16 | 48h |
| | 30 °C | 0,1703 | 5,50 10 ⁹ | 3,81 ±0,10 | 24h |
| | 37 °C | 0,2387 | 6,00 10 ⁹ | 3,79 ±0,07 | 24h |

Si se comparan las tres cepas a una misma temperatura, se evidencia nuevamente que la cepa CIDCA 83123 tiene una velocidad de crecimiento y de acidificación mucho más lenta en comparación con las otras dos cepas (Figura 9).



Las cepas CIDCA 8339 y CIDCA 83124 mostraron un rápido crecimiento en leche incluso a 20 °C, obteniéndose el coágulo ácido al cabo de 48 h de fermentación. Por el contrario, *L. paracasei* CIDCA 83123 requirió aproximadamente 7 días para obtener un gel ácido a esta temperatura. Esto constituye una desventaja tecnológica de *L. paracasei* CIDCA 83123 para ser utilizada a nivel industrial donde se prefiere el uso de microorganismos de rápido crecimiento y acidificación.

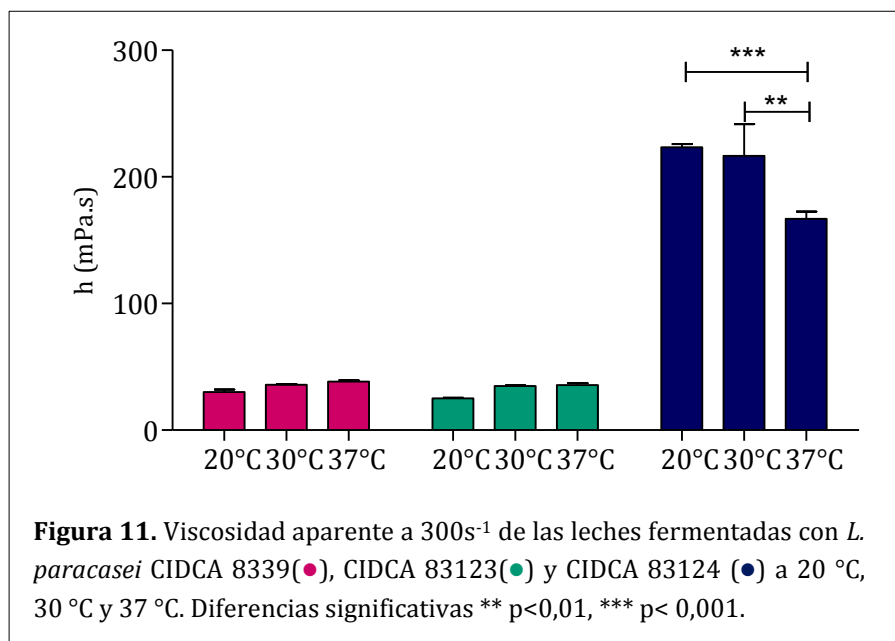
Cabe destacar que si bien a 20 °C las cepas de *L. paracasei* requirieron mayor tiempo para la formación del coágulo, las cantidades de ácido láctico y acético fueron similares a las producidas a temperaturas mayores, lo que da lugar a una acidificación equivalente al final del proceso (Figura 10).



En un estudio similar, Mozzi et al. (1995) observaron que luego de 24 h de fermentación el número de bacterias viables de *L. acidophilus* CRL 640 y *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CRL 870 a 37 °C era mayor que a 30 °C, resultados que coinciden con los obtenidos en el presente trabajo para *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83124. Al evaluar las características de las leches fermentadas obtenidas, los mismos autores observaron que la producción de ácido láctico por los lactobacilos era mayor al aumentar la temperatura y estaba directamente relacionado con el número de bacterias viables presente en la leche. Los máximos valores de ácido láctico alcanzados por estas cepas fueron de aproximadamente 144 mM, similares a los obtenidos para las cepas *L. paracasei*. Si bien, las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 no mostraron diferencias significativas en la producción de ácidos orgánicos, se debe tener en cuenta que la determinación de los mismos se llevó a cabo una vez formado el gel ácido a cada temperatura. En este punto, la concentración de microorganismos viables y el pH eran similares a las tres temperaturas por lo que no sorprende que la concentración de ácidos sea equivalente. Teniendo en cuenta la cinética de acidificación es muy probable que a las 24 h de fermentación la concentración de ácidos a 30 y 37 °C difiera significativamente de la obtenida a 20 °C ya que los valores pH a esta temperatura eran significativamente mayores. El efecto de la temperatura sobre el crecimiento de BAL

también ha sido estudiado en otras matrices alimentarias tales como jugo de frutas (Mustafa et al., 2019) o leche de coco (Saori Ishii Mauro y García, 2019). Al evaluar el desarrollo de distintas cepas de *Lactobacillus* en jugo de fruta a 30, 35 y 37 °C, se observó un efecto cepa dependiente donde algunas cepas tienen un crecimiento equivalente a las tres temperaturas mientras que otras presentan mayor crecimiento a 30 °C. Sin embargo, ninguna de las cepas mostró cambios marcados en la producción de ácido láctico con la temperatura (Mustafa et al., 2019).

Dado que la temperatura de crecimiento puede modificar la estructura, composición o concentración del EPS producido por la bacteria, se procedió a analizar las propiedades reológicas de las leches fermentadas a 20 °C, 30 °C y 37 °C para determinar su influencia sobre la viscosidad del producto (Figura 11).



Los coágulos obtenidos con la cepa CIDCA 83124, en comparación con *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83123, fueron significativamente más viscosos. En cuanto al efecto de la temperatura de fermentación, sólo se observaron cambios significativos en la viscosidad aparente de las leches fermentadas con la cepa *L. paracasei* CIDCA 83124 obteniéndose valores significativamente mayores a 20 °C y 30 °C. Esto indica que la temperatura de fermentación estaría modificando las características del EPS sintetizado por este lactobacilo.

Streptococcus thermophilus DGCC7785 y St-143 producen diferentes cantidades de polisacárido dependiendo de la temperatura de fermentación de la leche. Sin embargo, los geles ácidos no muestran correlación entre la firmeza del gel y la concentración de

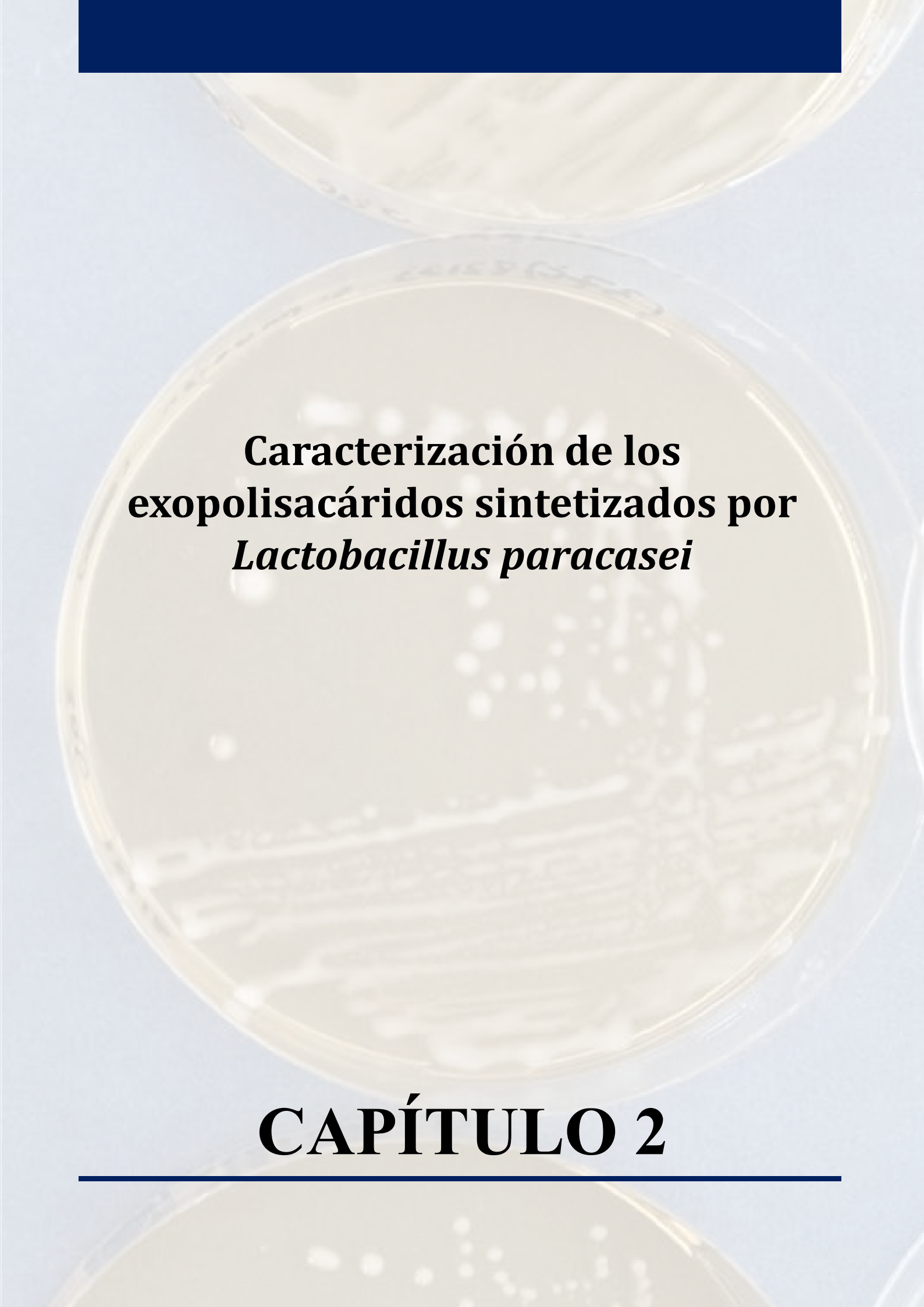
EPS. Los geles de la cepa St-143 a cualquier temperatura eran significativamente más débiles que los de DGCC7785, efecto atribuido a las diferencias estructurales del EPS (Khanal y Lucey, 2018). Mozzi et al. (1995) demostraron que la viscosidad de las leches fermentadas con *L. acidophilus* CRL 640 y *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CRL 870 aumenta con la temperatura y va acompañada de un incremento en la concentración del EPS. Por el contrario, en el caso de *S. salivarius* spp. *thermophilus* CRL 807 la producción de EPS se reduce drásticamente al aumentar la temperatura sin generar impacto sobre la viscosidad del producto. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que los cambios en la viscosidad con la temperatura observados para *L. paracasei* CIDCA 83124 podrían deberse a modificaciones en la estructura y/o en la concentración del EPS. Por otro lado, la ausencia de cambios en la viscosidad de las leches fermentadas obtenidas con *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83123, no descarta la posibilidad de que se generen cambios en el EPS.

Podemos concluir que la temperatura afecta la velocidad de crecimiento del microorganismo, pero si el tiempo de fermentación es suficiente, los tres lactobacilos estudiados logran alcanzar una concentración equivalente en el producto sin generarse modificaciones en los niveles de ácidos orgánicos. Dado que *L. paracasei* CIDCA 83123 presenta un crecimiento más lento, podría considerarse la cepa menos atractiva para su aplicación a nivel industrial. Por otro lado, la capacidad que tienen las cepas CIDCA 8339 y CIDCA 83124 de crecer bien en un amplio rango de temperaturas podría ser de relevancia para la industria ya que posibilita su aplicación en el desarrollo de una gran variedad de alimentos sin tener limitaciones en las condiciones de elaboración del producto. Asimismo, en el caso de *L. paracasei* CIDCA 83124 la fermentación a 20 o 30 °C constituiría una alternativa para mejorar las propiedades tecnológicas del producto.

Las dos estrategias empleadas en el presente trabajo para mejorar las propiedades funcionales de las leches fermentadas con *L. paracasei* no modificaron el crecimiento del lactobacilo ni la producción de ácidos orgánicos. Dado que la temperatura modificó las propiedades reológicas de las leches fermentadas de uno de los lactobacilos, se seleccionó esta variable para profundizar la caracterización de las cepas. Sin embargo, tanto el uso de co-cultivos con levaduras como las modificaciones en la temperatura de fermentación podrían estar generando cambios en el EPS producido, siendo ambas estrategias de interés para mejorar las propiedades tecnológicas y/o benéficas del producto.

CONCLUSIONES

- El co-cultivo de *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123, CIDCA 83124 con levaduras o la presencia del sobrenadante de cultivo de levaduras no modifica la capacidad de los lactobacilos de crecer en leche, así como tampoco afectan el pH final de las leches fermentadas ni la producción de ácidos orgánicos durante la fermentación.
- Las cepas de *K. marxianus*, a diferencia de *S. cerevisiae*, fermentan la lactosa de la leche y producen CO₂ y etanol, dando lugar a leches con aspecto poco agradable para el consumo.
- La presencia de las levaduras *S. cerevisiae* o *K. marxianus* da lugar a colonias de *L. paracasei* más mucosas en agar MRS sugiriendo que la levadura induce cambios en el EPS sintetizado por la bacteria. Sin embargo, la viscosidad aparente de las leches fermentadas no se vio modificada.
- La temperatura de incubación no afectó el recuento final alcanzado ni el valor final de pH y ácidos orgánicos al momento de formarse el coágulo. Sin embargo, los tiempos de fermentación requeridos para alcanzar un pH menor a 4 fueron mayores a 20 °C.
- *L. paracasei* CIDCA 83123 mostró una velocidad de acidificación y crecimiento significativamente menor en comparación con *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83124 por lo que requirió tiempos más prolongados para formar el gel ácido de caseína.
- Las leches fermentadas a 20 y 30 °C con *L. paracasei* CIDCA 83124, presentaron mayor viscosidad aparente respecto a la leche fermentada a 37 °C lo que podría deberse a cambios en el EPS sintetizado por esta bacteria. Para las leches fermentadas con *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83123 no se observaron cambios en la viscosidad con la temperatura.



**Caracterización de los
exopolisacáridos sintetizados por
*Lactobacillus paracasei***

CAPÍTULO 2

INTRODUCCIÓN

Existen una gran diversidad de polisacáridos producidos por BAL y su funcionalidad puede diferir de acuerdo a su estructura y composición de azúcares (Mozzi et al., 2006; Patten y Laws, 2015). Para la aplicación industrial como estabilizadores, emulsionantes o espesantes de alimentos resultan de interés los polisacáridos de alto peso molecular. La fuente de carbono, la temperatura, el pH y el tiempo de fermentación son factores que pueden afectar los niveles de producción *in situ* así como también sus características conformacionales, el tipo de unión entre azúcares, la composición y el peso molecular (Ibarburu et al., 2015). De esa manera, las condiciones de fermentación pueden ser modificadas para mejorar las características del polímero.

Los EPS pueden clasificarse en homopolisacáridos (HoPS) y heteropolisacáridos (HePS) de acuerdo a su composición. Los HoPS están formados por un único tipo de monosacárido y se dividen en 4 grupos: α -D-glucanos, β -D-glucanos, β -D-fructanos y poligalactanos (Ruas-Madiedo et al., 2008). Los HePS están formados por subunidades repetidas, ramificadas o no, que contienen de 3 a 8 monosacáridos, incluyendo normalmente L-ramnosa, D-glucosa o D-galactosa. Algunos también poseen fucosa, ribosa, amino azúcares acetilados (N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina), ácidos urónicos, fosfatos, acetato y glicerol (De Vuyst et al., 2001; De Vuyst y Degeest, 1999).

Los EPS sintetizados por BAL han demostrado tener una amplia variedad de efectos beneficiosos sobre la salud. Uno de los efectos que se les atribuye es su capacidad de modular la respuesta inmune del hospedador ya sea estimulándola, mejorando la protección frente a microorganismos patógenos (Balzaretto et al., 2017; Patten et al., 2014) o suprimiéndola, lo que sería favorable en individuos que sufren enfermedades inflamatorias crónicas (Bleau et al., 2010; Nikolic et al., 2012). Asimismo, otras propiedades beneficiosas atribuidas a estos biopolímeros incluyen efecto antitumoral, capacidad para reducir el colesterol, efecto antihipertensivo, protección del epitelio intestinal frente a patógenos y efecto prebiótico (Hamet et al., 2016; Patten y Laws, 2015; Ruas-Madiedo et al., 2008). Es importante resaltar que la funcionalidad tanto tecnológica como el efecto benéfico en la salud dependen de la estructura. Así, dada la variedad de EPS que producen, las bacterias lácticas se presentan como nuevas fuentes de componentes que contribuyen a la calidad organoléptica y funcional de los alimentos.

Exopolisacáridos de BAL como prebióticos

El conjunto de microorganismos (Dominio Bacteria, Arquea y Eukarya) que se encuentran colonizando el tracto gastrointestinal constituyen lo que se denomina la microbiota intestinal. Se ha estimado que la cantidad de microorganismos que habitan el tracto

gastrointestinal supera los 10^{14} , número que es 10 veces superior al número de células eucariotas presentes en el cuerpo humano (Bäckhed et al., 2005). Existe una relación simbiótica entre la microbiota y el hospedador; en la cual la primera ejerce efectos beneficiosos incluyendo refuerzo de la barrera intestinal, aporte de nutrientes como vitaminas, protección contra patógenos y regulación del sistema inmune (Thursby y Juge, 2017; Weiss y Hennet, 2017). La microbiota intestinal humana está compuesta por más de 2000 especies, de las cuales el 93,5% pertenece a los phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (Thursby y Juge, 2017). Sin embargo, distintos factores como la dieta y el uso de antibióticos pueden alterar la composición de la misma dando lugar a un desbalance conocido como **disbiosis** (Weiss y Hennet, 2017) que contribuye al desarrollo y severidad de un gran número de patologías. Dentro de las enfermedades asociadas a la disbiosis se incluyen no sólo trastornos gastrointestinales como las enfermedades inflamatorias intestinales (Colitis Ulcerosa y Síndrome de Crohn) (Wlodarska et al., 2015), sino también trastornos metabólicos (obesidad y diabetes tipo II) (Gérard, 2016), enfermedades autoinmunes (Knip y Siljander, 2016) y alteraciones neurológicas (Tremlett et al., 2017). Así, mantener un estado de **normobiosis** resulta importante para garantizar un buen estado de salud. En este sentido, la incorporación de probióticos y/o prebióticos a la dieta constituye una alternativa para reestablecer y/o mantener una microbiota intestinal “saludable” (Tsai et al., 2019).

Los prebióticos deben ser compuestos no digeribles a lo largo del tracto gastrointestinal de manera que lleguen intactos al colon donde serán metabolizados selectivamente por la microbiota confiriendo un efecto beneficioso sobre la salud de quien lo consuma. El efecto sobre la homeostasis intestinal puede estar dado por una modulación directa de la microbiota favoreciendo el desarrollo de microorganismos benéficos, pero también indirectamente por la producción de metabolitos bioactivos como consecuencia de su fermentación (Gibson et al., 2017).

Dentro de los metabolitos producidos durante la fermentación de prebióticos se destacan los **ácidos grasos de cadena corta** (AGCC) que incluyen acetato, propionato y butirato y son capaces de modular aspectos metabólicos generando diversos efectos beneficiosos a nivel intestinal y extraintestinal (Gibson et al., 2017; Roberfroid et al., 2010). Estos ácidos se encuentran normalmente en relación 3:1:1 (acetato:propionato:butirato) en el intestino donde pueden modular diferentes mecanismos celulares como expresión de genes, quimiotaxis, diferenciación y proliferación celular y apoptosis.

Los cambios en la microbiota y el perfil de AGCC estarán relacionados con la estructura de cada prebiótico. De esa manera, un prebiótico puede ser más o menos beneficioso para una determinada patología de acuerdo al efecto generado a nivel intestinal (Tsai et al.,

2019). Los prebióticos más ampliamente estudiados para su aplicación en alimentos son de naturaleza glucídica tales como inulina, fructooligosacáridos (FOS) y galactooligosacáridos (GOS) (Roberfroid et al., 2010). Sin embargo, está demostrado que algunos EPS producidos por BAL también pueden presentar propiedades prebióticas (Patten y Laws, 2015; Ruas-Madiedo et al., 2008; Ryan et al., 2015). En la Tabla 6 se resumen algunos resultados de EPS de BAL que estimulan el desarrollo de poblaciones benéficas, principalmente del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la estimulación de otras poblaciones que modulan la producción de AGCC también son efectos deseables a la hora de seleccionar un prebiótico (Gibson et al., 2017)(Tabla 7).

Tabla 6. Resumen de EPS producidos por diferentes especies de BAL con potencial prebiótico. Adaptada de Ryan et al. (2015).

| Especie | Cepa | Composicion EPS | Población bacteriana incrementada |
|--------------------------------|---------|---------------------|---|
| <i>L. sanfranciscensis</i> | LTH1729 | Fru : Glu 45 : 1 | Bifidobacteria |
| <i>L. sanfranciscensis</i> | LTH2590 | Fru : Glu 25 : 1 | Bifidobacteria |
| <i>L. plantarum</i> | 301102S | Glu : Man 1 : 2 | <i>Pediococcus</i> y <i>Lactobacillus</i> |
| <i>Weissella cibaria</i> | A2 | ND | Bifidobacteria y <i>Lactobacillus</i> , con ↓ <i>Clostridium</i> |
| <i>Weissella confusa</i> | A9 | ND | Bifidobacteria y <i>Lactobacillus</i> , con ↓ <i>Clostridium</i> |
| <i>L. plantarum</i> | A3 | ND | Bifidobacteria y <i>Lactobacillus</i> , con ↓ <i>Clostridium</i> |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | 5S4 | ND | <i>Lactobacillus</i> |
| <i>Pediococcus parvulus</i> | 2.6 | (1,3)-β-Glucan | <i>Lactobacillus</i> |

Tabla 7. Especies bacterianas dominantes detectadas en muestras de materia fecal humana y su capacidad para producir butirato y propionato (Louis y Flint, 2017)

| Phyla (Familia) | Especies | Butirato | Propionato |
|---------------------------------------|--|----------|------------|
| Bacteroidetes (Bacteroidaceae) | <i>Bacteroides uniformis</i> | - | + |
| | <i>Bacteroides vulgatus</i> | - | + |
| Bacteroidetes (Prevotellaceae) | <i>Prevotella copri</i> | - | + |
| Bacteroidetes (Rikenellaceae) | <i>Alistipes putredinis</i> | - | + |
| Firmicutes (Lachnospiraceae) | <i>Eubacterium rectale</i> | + | - |
| | <i>Roseburia inulinivorans</i> | + | + |
| | <i>Roseburia intestinalis</i> | + | - |
| | <i>Eubacterium hallii</i> | + | + |
| | <i>Anaerostipes hadrus</i> | + | - |
| | <i>Coprococcus eutactus</i> | + | - |
| | <i>Blautia obeum</i> | - | + |
| | <i>Coprococcus catus</i> | + | + |
| Firmicutes (Ruminococcaceae) | <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> | + | - |
| | <i>Subdoligranulum variabile</i> | + | - |
| Firmicutes (Veillonellaceae) | <i>Dialister invisus</i> | - | + |
| Firmicutes (Acidaminococcaceae) | <i>Phascolarctobacterium succinatutens</i> | - | + |
| Firmicutes (Erysipelotrichaceae) | <i>Eubacterium bifforme</i> | + | - |
| Actinobacteria (Bifidobacteriaceae) | <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | - | - |
| | <i>Bifidobacterium longum</i> | - | - |
| Verrucomicrobia (Verrucomicrobiaceae) | <i>Akkermansia muciniphila</i> | - | + |
| Actinobacteria (Coriobacteriaceae) | <i>Collinsella aerofaciens</i> | - | - |

Los EPS producidos por las distintas bacterias ácido lácticas presentan gran diversidad en cuanto a tamaño, estructura y composición. En este contexto, es importante destacar que tanto el efecto tecnológico como biológico atribuido a un EPS dependerá de sus características estructurales (Chen et al., 2019; Surayot et al., 2014), por lo tanto es de esperar que el efecto del mismo sea cepa específico siendo fundamental el estudio de cada EPS en particular.

OBJETIVOS

La composición y estructura de los exopolisacáridos sintetizados por las bacterias ácido lácticas pueden tener un importante impacto sobre las propiedades tecnológicas y biológicas del alimento fermentado. Por este motivo se propuso como objetivo del presente capítulo caracterizar los EPS sintetizados por *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 en cuanto a su estructura y su potencialidad prebiótica.

Objetivos específicos

- Analizar la composición y peso molecular de los exopolisacáridos producidos por *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 a distintas temperaturas.
- Evaluar los EPS aislados de leches fermentadas en cuanto a su capacidad de modular la microbiota fecal y la producción de metabolitos bioactivos por parte de la misma.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención del exopolisacárido producido en medio MRS

La extracción del EPS producido en agar MRS se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Ruas-Madiedo et al. (2010) después de crecer las bacterias en medio sólido. Se sembraron 150 μ l de un cultivo de 24 h crecido a 20, 30 o 37 °C en placas de agar MRS esparciendo la muestra con perlas de vidrio estériles de manera tal de obtener una pátina en toda la superficie. Las placas se incubaron durante 7 días a 20 °C, 30 °C o 37 °C. Para el aislamiento de EPS, se añadieron 2,5 ml de agua miliQ a cada una de las placas para recoger la biomasa celular. Luego, se adicionó 1 volumen de NaOH 2M (Cicarelli, Argentina) a la suspensión bacteriana y se dejó en agitación durante toda la noche a 25 °C. A continuación, la muestra se centrifugó (5200 xg , 30 min, a 20 °C) y al sobrenadante obtenido se le adicionaron 2 volúmenes de etanol 96° frío y se mantuvo 16 h a -20 °C para inducir la precipitación del EPS. Las muestras fueron centrifugadas a 10000 xg durante 20 min a 4 °C, el sobrenadante fue descartado y el EPS fue resuspendido en agua destilada caliente. Finalmente, las muestras fueron liofilizadas en un equipo Heto FD4 y almacenadas a temperatura ambiente. La extracción de polisacárido se realizó a partir de dos cultivos independientes.

2. Extracción del exopolisacárido producido en leche

Las tres cepas de *L. paracasei* se crecieron en leche a 20 °C, 30 °C y 37 °C como se detalló en la el Capítulo 1 (Sección 3., Materiales y métodos). Las leches fermentadas (500 ml) se calentaron durante 30 min a 100 °C con el objetivo de favorecer el desprendimiento y disolución del polisacárido unido a las células y desnaturalizar proteínas, lo que permite no sólo favorecer la precipitación de las mismas sino también inactivar enzimas que podrían hidrolizar el EPS. Se añadió ácido tricloroacético al 8% p/v (Cicarelli, Argentina) para precipitar las proteínas y a continuación las muestras se centrifugaron a 10000 xg durante 20 min a 20 °C en una centrífuga Avanti J25 (Beckman Coulter Inc., EE.UU.). El sobrenadante con el EPS en suspensión se sometió al proceso de precipitación con etanol descrito anteriormente (Sección 1 del presente capítulo). Finalmente, las muestras se dializaron contra agua bidestilada a través de una membrana de diálisis de 1 kDa de cut-off (Spectra/Por, Spectrum laboratorios, EE.UU.) con el objetivo de remover los restos de lactosa que pudieran haber quedado. La diálisis se llevó a cabo durante 48 h a 4 °C en agitación cambiando diariamente el agua bidestilada. Finalmente, las muestras fueron liofilizadas. La extracción de EPS se realizó de dos cultivos independientes.

3. Evaluación de la pureza del EPS obtenido

3.1. Cromatografía en capa fina

Se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) para determinar la ausencia de lactosa y otros azúcares simples en las muestras de EPS. Como referencia se utilizó una solución de lactosa (Sigma, EE.UU.) al 0,5 % p/v en etanol:agua 50:50. Se utilizaron placas de Silica gel G (Merck D-64271, Alemania) que fueron activadas en estufa a 100 °C durante 1 min. A continuación, se sembraron 3 µl de cada muestra con jeringa Hamilton con una separación de al menos 1 cm de distancia entre ellas y respecto al borde inferior. Una vez concluida la siembra, la placa fue introducida en una cuba saturada con solvente de corrida (ver Apéndice) permitiendo el avance de fase la móvil hasta una distancia de 2 cm de la parte superior de las placas. Finalizada la corrida, se retiró la placa de la cuba, se secó utilizando aire caliente y se procedió al revelado. Para ello, se sumergió la placa en solución de revelado (ver Apéndice), se secó por evaporación y se llevó a estufa a 100 °C durante 5 min para visualizar los *spots* correspondientes a los hidratos de carbono.

3.2. Método de Bradford

Como medida del grado de pureza de las muestras se procedió a determinar cualitativamente el contenido de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello, se mezclaron 50 µl de la muestra de EPS con 1 ml de reactivo de Bradford (Ver Apéndice). La mezcla de reacción se agitó por inversión y se midió la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro (Metrolab, Argentina), utilizando como blanco agua destilada.

4. Cuantificación de EPS: Método de antrona

Teniendo en cuenta la ausencia de otros azúcares en la muestra, la concentración de EPS se determinó mediante el método de Antrona (Southgate, 1976). En tubos de vidrio con tapa se mezclaron 100 µl de la muestra a analizar con 1 ml de reactivo de Antrona (ver Apéndice). A continuación, se colocaron las muestras en un baño de agua a 100 °C durante 15 min y se enfriaron a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, 200 µl de las muestras fueron transferidos a una placa de 96 fosas y se realizó la medida de la absorbancia a 620 nm en un lector de placas (Sinergy HT, BioTek Instruments, EE.UU.). Para determinar la concentración de azúcares totales se empleó una curva de calibración con soluciones de glucosa (50-500 µg/ml).

5. Distribución de pesos moleculares de los EPS

Los polisacáridos liofilizados fueron resuspendidos en NaNO₃ 0,1 M en una concentración de 0,5 mg/ml y luego filtrados a través de una membrana de polifluoruro de vinilideno de

0,45 μm de diámetro de poro (Millipore Corporation, EE.UU.). El peso molecular promedio (PM) de los polisacáridos fue determinado por cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento (HPLC-SEC, Agilent 1100 Series System, Hewlett-Packard, Alemania) asociado a un detector de índice de refracción (IR) (Ibarburu et al., 2015). La elución de las muestras se llevó a cabo a temperatura ambiente utilizando como eluyente NaNO_3 0,1M a flujo constante (0,95 ml/min, presión: 120:130 psi). El volumen de muestra inyectado fue de 50 μl . Como patrones se utilizaron dextranos (0,5 mg/ml) con peso molecular entre 10^3 y $2 \cdot 10^6$ Da (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

6. Composición de azúcares

Para determinar la composición de azúcares de los EPS, 1-2 mg de muestra fueron hidrolizados en 1 ml de ácido trifluoroacético 3 M durante 1 h a 120 °C. Luego de enfriar las muestras, se adicionaron a cada una de ellas 100 μg de mio-inositol, utilizado como estándar interno. Se secó la muestra por evaporación para eliminar el ácido y se procedió a derivatizar los monosacáridos obtenidos a alditol acetatos. Para ello, se adicionó 1ml de una solución acuosa de NaBH_4 y se incubó a temperatura ambiente durante 16 h para favorecer la reducción de los grupos aldehídos de los monosacáridos. A continuación, se agregó HCl concentrado hasta pH neutro o levemente ácido con el objetivo de eliminar el borhidruro de sodio en exceso. Las muestras se secaron por evaporación, se lavaron y secaron tres veces con 2 ml de metanol para la remoción completa de los boratos. La acetilación se llevó a cabo mediante la adición de 250 μl de piridina y 250 μl de anhídrido acético seguida de una incubación a 100 °C durante 1 h. Finalmente, las muestras se secaron por evaporación y se disolvieron en 200 μl de cloroformo para ser analizadas mediante cromatografía gaseosa en un equipo 7890A Agilent acoplado a un detector masa 5975C, utilizando una columna HP5-MS. Para cada corrida se inyectó 1 μl de muestra (con un Split 1:50) y se utilizó un programa de temperatura que consistió en calentar el horno a 175 °C durante 1 min; aumentar la temperatura hasta 215 °C a una velocidad de 2,5 °C/min y luego aumentar la temperatura hasta 225 °C a 10 °C/min, manteniéndolo constante a esta temperatura durante 1,5 min. Como fase móvil se utilizó Helio a una velocidad de flujo 1 ml/min. Los azúcares fueron identificados por comparación de los tiempos de retención con patrones de monosacáridos (arabinosa, xilosa, ramnosa, galactosa, glucosa, manosa, glucosamina y galactosamina) analizados en las mismas condiciones. Para la cuantificación se procesaron también curvas de calibración de los monosacáridos.

7. Modelo de fermentación de EPS *in vitro* por microbiota fecal humana

Se evaluó la capacidad de la microbiota fecal de utilizar los polisacáridos producidos por *L paracasei* CIDCA 8339 (EPS 8339 30 °C) y CIDCA 83124 (EPS 83124 30 °C) en leche a 30°C utilizando un modelo de homogenatos fecales (Salazar et al., 2008)

Se trabajó con 5 muestras de materia fecal proveniente de niños entre 8 meses y 3 años de edad que tuvieran una dieta omnívora y que no hubieran consumido antibióticos en los últimos 6 meses. Las muestras fueron recolectadas por los padres y remitidas al laboratorio junto con una nota firmada de consentimiento informado. Para la preparación del homogenato fecal se realizó un pool con las 5 muestras que fue resuspendido 1/10 en PBS estéril. La suspensión obtenida se homogeneizó y se diluyó 1/10 en un medio base sin azúcar agregado (MB) descrito por Al-Tamimi et al. (2006) (Ver Apéndice). El homogenato obtenido fue fraccionado y adicionado con el azúcar correspondiente al 3 % p/v (Glucosa, Inulina, EPS 8339 30 °C o EPS 83124 30 °C). Las muestras fueron incubadas durante 24, 48 o 72 h en anaerobiosis (AnaeroPack, Mitsubishi Gas Chemical Company, Japón) a 37 °C. Cada condición de fermentación se realizó por triplicado. Asimismo, se procesó un control sin azúcar agregado (Figura 12). Una vez finalizada la fermentación las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 10000 *xg*, el sobrenadante fue filtrado por una membrana 0,45 µm de poro y conservado a -20 °C para la cuantificación de AGCC mediante cromatografía gaseosa. Por otro lado, los pellets fueron conservados a -80 °C para la posterior caracterización de las poblaciones microbianas.

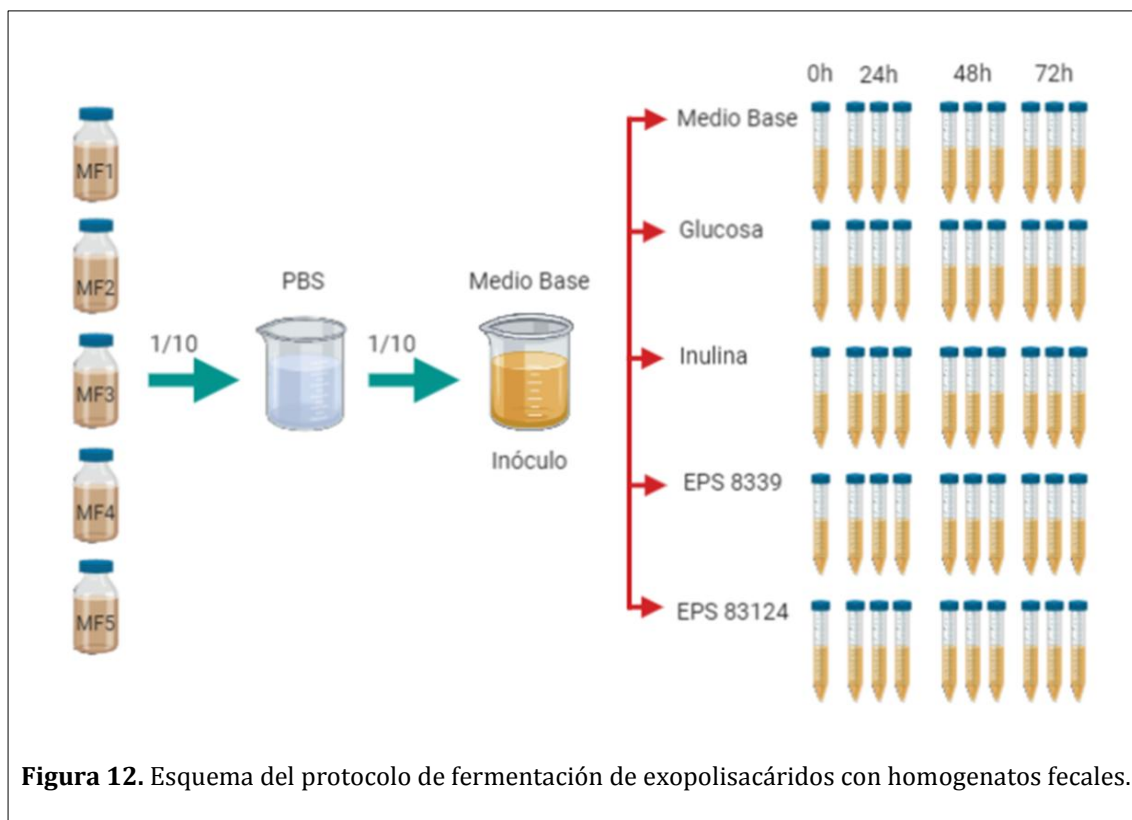


Figura 12. Esquema del protocolo de fermentación de exopolisacáridos con homogenatos fecales.

8. Determinación de AGCC por cromatografía gaseosa

Se utilizó un equipo GC Agilent 7890a con una columna DB23 (Agilent, EE.UU.) acoplada a un detector de llama (FID). La temperatura en el puerto de inyección y en el FID fue de 250 °C. Como gas portador se utilizó Helio a una velocidad de flujo de 1,6 ml/min. Para la corrida se inyectó 1µl de muestra con un *split* 1:25 y se trabajó con un programa de temperatura que consistió en una rampa de 100 °C a 200 °C a una velocidad de 8 °C/min, manteniendo constante a 200 °C durante 3 min. Para la identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos se prepararon curvas de calibración de patrones de ácido acético glacial (1-50 mM), propiónico (0,5-20 mM) y butírico (0,5-20 mM). Los ácidos orgánicos fueron identificados por comparación con los tiempos de retención de los patrones y cuantificados a partir del área del pico correspondiente.

9. Evaluación de las poblaciones microbianas

9.1. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN a partir de los pellets obtenidos se utilizó un kit comercial QIAamp PowerFecal DNA kit (Qiagen, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez obtenidas las muestras de ADN se determinó la concentración de las mismas utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher Scientific, EE.UU.). Las relaciones de A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} fueron determinadas para estimar la pureza de la muestra en cuanto a presencia de compuestos aromáticos (fenoles o proteínas) y solventes (sales, carbohidratos, fenoles) respectivamente. Se consideraron puras las muestras de ADN con un valor A_{260}/A_{280} entre 1.8-2.0 y valores de $A_{260}/A_{230} > 1,6$. Asimismo, se realizó la extracción de ADN de cultivos puros de cepas de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. kefir* y *Bifidobacterium adolescentis* para ser utilizadas como patrones en el DGGE.

9.2. Estudio de la diversidad microbiana por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

Inicialmente se realizó una amplificación mediante PCR, utilizando *primers* que reconocen regiones conservadas de la región V3 del gen que codifica para el ARNr 16S y permiten la amplificación de todas las Eubacterias presentes en la muestra (Tabla 8).

Tabla 8. Primers utilizados para amplificar la región V3 del 16S de Eubacterias para el posterior análisis por DGGE.

| Primer | Secuencia | Pares de base del amplicón | Referencia |
|---------|--|----------------------------|------------------------|
| 518R | 5'ATTACCGCGGCTGCTGG- 3' | | |
| 341F-GC | 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCG GGGGCACGGGGGCTACGGGAGGCAGCAG-3' | 193pb | Muyzer et al., 1993 |

Para la realización de la PCR, las muestras de ADN fueron diluidas de forma tal que todas tuvieran la misma concentración. Para cada muestra se mezclaron 39 μl de Master Mix (Taq polimerasa Pegasus, PB-L Productos Biológicos, Argentina) con 11 μl de ADN (Tabla 9), quedando el ADN a una concentración final de 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Junto con las muestras de homogenatos fecales, se procesaron también muestras de ADN de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* utilizados como control positivo de la reacción de amplificación y como patrones en la corrida de DGGE. Asimismo, se procesó un control negativo sin agregado de ADN.

Tabla 9. Composición de la Master Mix PCR.

| Reactivo | Vol/reacción(μl) |
|--------------------|-------------------------------|
| Buffer 10X | 5 |
| MgCl ₂ | 2,5 |
| dNTPs (2mM c/u) | 5 |
| Primer F (10mM) | 2,5 |
| Primer R (10mM) | 2,5 |
| Taq polimerasa | 0,5 |
| Agua miliQ | 21 |
| ADN | 11 |
| Total por reacción | 50 |

La reacción se llevó a cabo en un ciclador térmico T100 (Biorad, EE.UU.) con las condiciones indicadas en la Tabla 10. Una alícuota de los productos obtenidos se analizó en un gel de agarosa al 1% p/v conteniendo bromuro de etidio y se visualizó bajo luz UV. El resto de los productos amplificados se conservaron a -20 °C para luego ser analizados mediante DGGE.

Tabla 10. Condiciones de la reacción de PCR para amplificación de la región V3 del 16S de Eubacterias.

| Temperatura | Tiempo | N° Ciclos |
|-------------|--------|-----------|
| 94 °C | 5 min | 1 |
| 94 °C | 30 seg | 35 |
| 60 °C | 45 seg | |
| 72 °C | 20 seg | |
| 72 °C | 1 min | 1 |

Para el análisis de la diversidad microbiana mediante DGGE se utilizó un equipo DGGE-2401 (C.B.S. Scientific Co., EE.UU.) Los productos de PCR fueron sembrados en geles de poliacrilamida 8% p/v en buffer TAE 1X (Tris Acetato EDTA) de 15 x 20 x 0,075 cm. Para lograr la separación óptima de las bandas correspondientes a Eubacterias, se trabajó con

un gradiente desnaturante Urea Formamida 40-60% (100 % corresponde a Urea 7 M y Formamida 40 % v/v).

Para la preparación de los geles, se prepararon las soluciones desnaturantes 40 % y 60 % y se adicionaron 5 μ l de TEMED y 50 μ l de persulfato de amonio 10 % p/v a cada una mezclando inmediatamente. Rápido, las soluciones fueron colocadas en un sistema de vasos comunicantes ubicado sobre un agitador con el buzo magnético en el vaso que contenía la mayor concentración de agente desnaturante. El gradiente se generó mediante la utilización de una bomba peristáltica conectada tal como se muestra en la Figura 13. Se llenó hasta 1 cm del borde superior del vidrio, una vez gelificado se completó con solución *stacking* y se colocó el peine para la formación de las calles. Los vidrios conteniendo el gel se montaron sobre el soporte correspondiente y se colocaron en la cuba con buffer TAE 1X a 60 °C. Luego se sembraron en cada fosa 15 μ l de muestra mezclada con 3 μ l de buffer muestra. Junto con las muestras se evaluó un patrón correspondiente a una mezcla de los productos de PCR de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. kefir* y *Bifidobacterium adolescentis* (7 μ l de cada cepa patrón + 3 μ l de buffer). La corrida electroforética se llevó a cabo a 90 V durante 16 h a 60 °C. Una vez finalizada los geles fueron teñidos sumergiéndolos durante 30 min en una solución de Sybr-Gold 0,1 μ l/ml (Invitrogen, EE.UU.) en buffer TAE y finalmente observados bajo luz UV. Todas las soluciones utilizadas se detallan en el Apéndice.

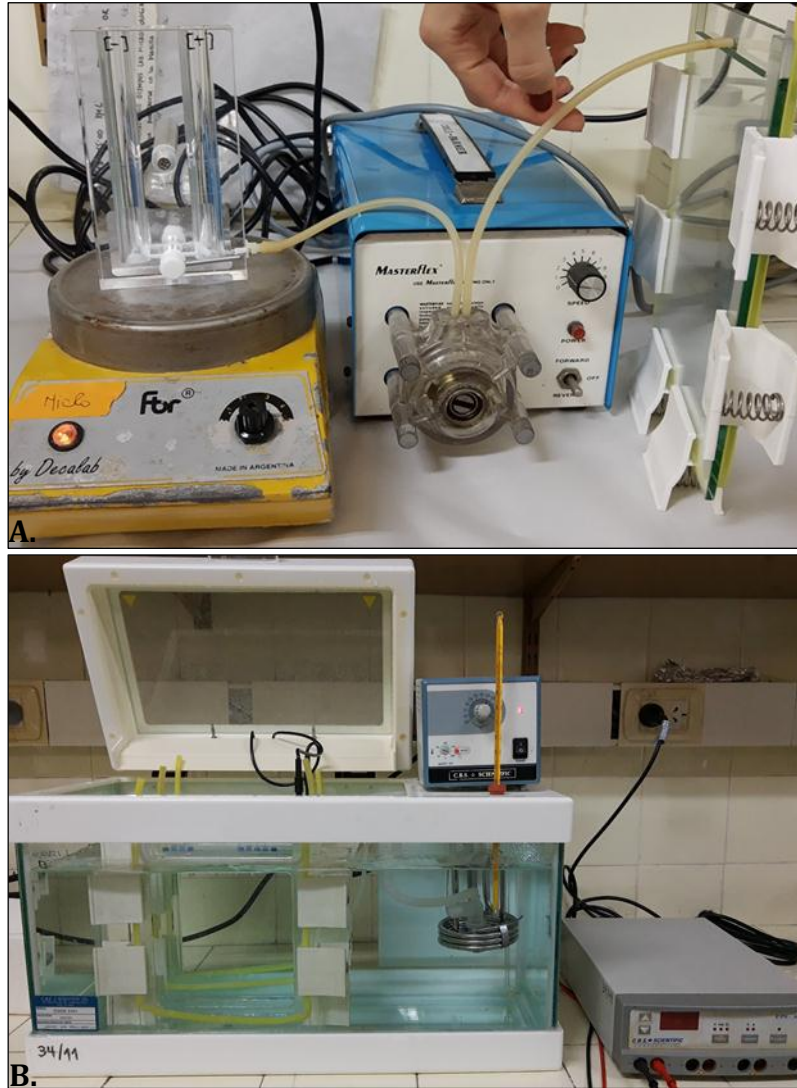


Figura 13. A. Preparación de los geles con el gradiente desnaturante Urea Formamida 40-60%. B. Cuba de DGGE conteniendo los geles para la corrida electroforética.

La comparación de los patrones de bandas obtenidos para cada muestra se realizó utilizando el programa Bionumerics 6 (Applied maths NV, Bélgica). Se calculó el porcentaje de similitud entre las muestras utilizando el Coeficiente de Similitud de Dice y se construyeron los dendrogramas correspondientes.

9.3. Análisis de secuenciación masiva mediante Ion Torrent PGM

Las muestras que presentaron mayores diferencias en el patrón de bandas respecto al control fueron secuenciadas para analizar los cambios en las cantidades relativas de las distintas poblaciones microbianas. El análisis se llevó a cabo en el laboratorio de investigación molecular MR DNA (EE.UU.), basado en protocolos establecidos y validados

(<http://www.mrdnalab.com/>). Se trabajó con los *primers* 515/806 para amplificar la región variable V4 del gen que codifica para el ARNr 16S. Para la PCR se utilizó el kit HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen, EE.UU.) y las condiciones indicadas en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones de reacción de PCR para amplificación de la región variable V4 del gen que codifica para el ARNr 16S para secuenciación masiva.

| Temperatura | Tiempo | N° Ciclos |
|-------------|--------|-----------|
| 94 °C | 3 min | 1 |
| 94 °C | 30 seg | |
| 53 °C | 40 seg | 30 |
| 72 °C | 1 seg | |
| 72 °C | 5 min | 1 |

Las muestras fueron secuenciadas utilizando el sistema Ion Torrent Personal Genome machine (PGM) (Thermo Fisher, EE.UU.) y los datos generados se analizaron utilizando un *pipeline* desarrollado en el laboratorio de investigación molecular MR DNA. Se eliminaron los códigos de barras y los *primers*, seguido de la remoción de secuencias cortas de <150 pb, secuencias ambiguas y homopolímeros de más de 6 pb. Asimismo, se eliminó el ruido de las secuencias y las quimeras. Los datos de secuenciación se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTU) con un 3% de divergencia y se clasificaron taxonómicamente utilizando el algoritmo BLASTn.NET con la base de datos derivada de RDPII (<http://rdp.cme.msu.edu>) y NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización del exopolisacárido sintetizado por *L. paracasei* a diferentes temperaturas

Las diferencias observadas en las curvas de flujo de las leches fermentadas con las tres cepas en el Capítulo 1 sugieren que los EPS sintetizados por las mismas pueden presentar diferente estructura y composición. Asimismo, el aumento en la viscosidad evidenciado para la leche fermentada con la cepa *L. paracasei* CIDCA 83124 a 20 y 30 °C indica que la temperatura de fermentación podría estar generando cambios en el EPS sintetizado por la bacteria. Por este motivo, se procedió a caracterizar la producción de este metabolito tanto en medio de cultivo MRS como en leche a diferentes temperaturas de crecimiento.

En una primera instancia, se evaluó el aspecto de las colonias crecidas en agar MRS a 20, 30 y 37 °C (Figura 14).

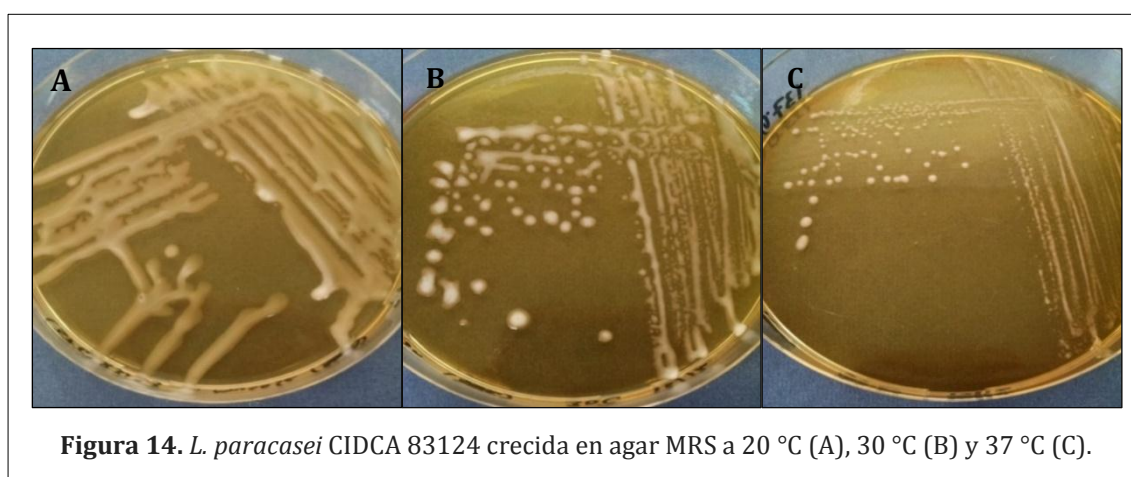


Figura 14. *L. paracasei* CIDCA 83124 crecida en agar MRS a 20 °C (A), 30 °C (B) y 37 °C (C).

Como puede observarse, *L. paracasei* CIDCA 83124 crecida a 20 y 30 °C presenta colonias de aspecto más mucoso que a 37 °C. Esto se corresponde con los resultados obtenidos en la leche fermentada, donde a 20 y 30 °C se evidenciaba una filancia muy marcada que no estaba presente a 37 °C (Capítulo 1). Asimismo, las colonias de *L. paracasei* CIDCA 83123 mostraron un comportamiento equivalente. Por otro lado, las colonias correspondientes a la cepa CIDCA 8339 presentaron un fenotipo poco mucoso sin observarse cambios evidentes con la temperatura. Morona et al. (2003) han demostrado previamente que cuando se producen cambios en el polisacárido sintetizado por la bacteria pueden generarse cambios en la morfología de la colonia, lo que sugiere que las diferencias observadas con la temperatura para el caso de las cepas CIDCA 83123 y CIDCA 83124 podrían deberse a modificaciones cuali o cuantitativas del EPS sintetizado.

1.1. Distribución de pesos moleculares de los EPS producidos en medio de cultivo y en leche por *L. paracasei* a diferentes temperaturas

Se realizó la extracción del EPS sintetizado por *L. paracasei* en agar MRS a las tres temperaturas para su posterior cuantificación y análisis. Luego de la extracción, las muestras fueron dializadas y se verificó la ausencia de azúcares simples mediante TLC y de proteínas por el método de Bradford.

Se evidenció que las tres cepas sintetizan mayores cantidades de EPS cuando la temperatura de crecimiento es menor. *L. paracasei* CIDCA 8339 produjo aproximadamente 1200 mg EPS / 10^8 UFC a 20 y 30 °C mientras que a 37 °C la cantidad de EPS producido fue de 630 mg / 10^8 UFC. En el caso de *L. paracasei* CIDCA 83124 la cantidad de EPS producida fue de 1170, 527 y 373 mg / 10^8 UFC a 20, 30 y 37 °C respectivamente. Asimismo, *L. paracasei* CIDCA 83123 mostró un comportamiento similar a la cepa CIDCA 83124 con la temperatura, pero con una menor producción de EPS (390, 309 y 270 mg / 10^8 UFC a 20, 30 y 37 °C respectivamente).

Por otro lado, se analizó el efecto de la temperatura sobre la estructura del EPS evaluándose la distribución de pesos moleculares mediante HPLC-SEC. Al evaluar los resultados obtenidos (Figura 15 y Tabla 12) se observó que las tres cepas de *L. paracasei* presentan un comportamiento similar, tendiendo a producir EPS de mayor peso molecular a menor temperatura de crecimiento. En general, a 37 °C los EPS producidos por las bacterias presentan una única fracción de entre $0.7-2 \cdot 10^4$ Da mientras que a 20 °C los EPS se componen por dos fracciones, una de mayor peso molecular ($5-7 \cdot 10^4$ Da, flecha negra) y otra menor ($2.6-3 \cdot 10^3$ Da, flecha azul) (Figura 15). Estos resultados sugieren que la polimerización del EPS se ve favorecida a 20 °C dando lugar a la síntesis de una fracción de mayor peso molecular a esta temperatura. *L. paracasei* CIDCA 8339, por su parte, es capaz de sintetizar las dos fracciones de EPS también cuando crece a 30 °C.

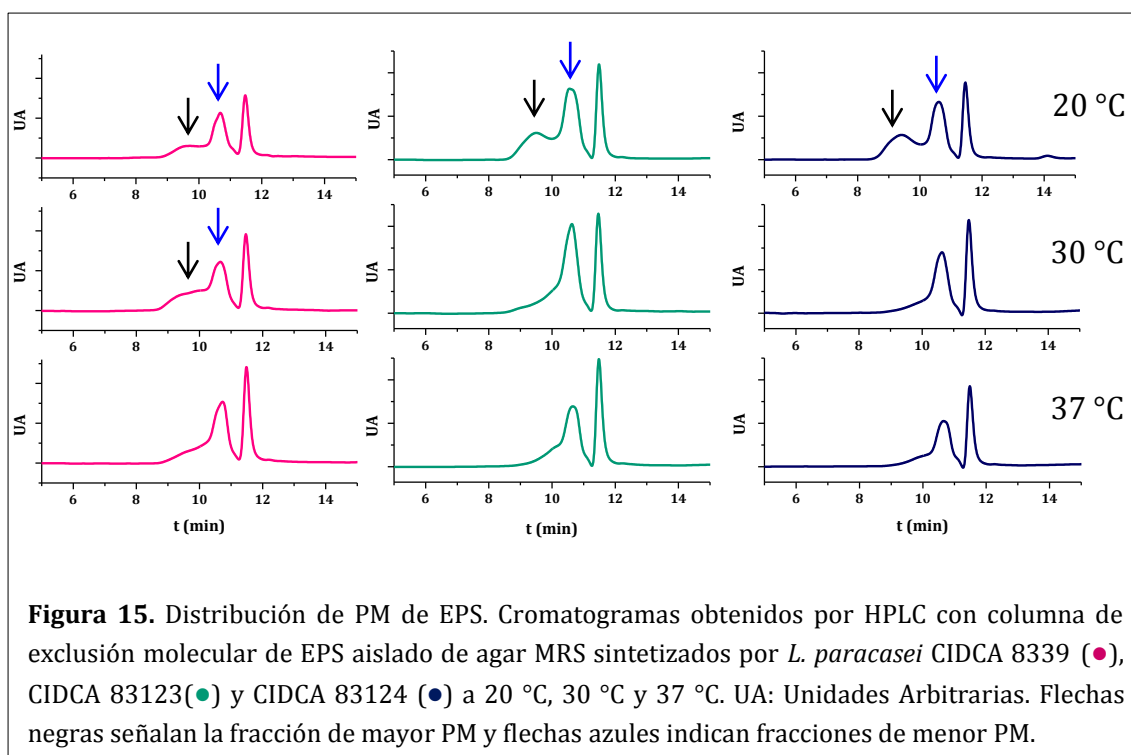


Figura 15. Distribución de PM de EPS. Cromatogramas obtenidos por HPLC con columna de exclusión molecular de EPS aislado de agar MRS sintetizados por *L. paracasei* CIDCA 8339 (●), CIDCA 83123(●) y CIDCA 83124 (●) a 20 °C, 30 °C y 37 °C. UA: Unidades Arbitrarias. Flechas negras señalan la fracción de mayor PM y flechas azules indican fracciones de menor PM.

Tabla 12. Área relativa porcentual de las fracciones que componen los EPS producidos en MRS a 20 °C, 30 °C y 37 °C por *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124.

| Cepa | Temperatura de fermentación | Área relativa porcentual | |
|--------------------|-----------------------------|--|------------------------------|
| | | PM intermedio ($3 \cdot 10^4 < PM < 1 \cdot 10^5$) | Bajo PM ($< 3 \cdot 10^4$) |
| CIDCA 8339 | 20 °C | 29 | 71 |
| | 30 °C | 30 | 70 |
| | 37 °C | - | 100 |
| CIDCA 83123 | 20 °C | 35 | 65 |
| | 30 °C | - | 100 |
| | 37 °C | - | 100 |
| CIDCA 83124 | 20 °C | 42 | 58 |
| | 30 °C | - | 100 |
| | 37 °C | - | 100 |

Los resultados obtenidos muestran que la temperatura de crecimiento no sólo afecta la cantidad de EPS que se produce en agar MRS sino también el tipo de EPS sintetizado por la bacteria. Estos cambios cuali y cuantitativos evidenciados para los EPS correlacionan bien con el aspecto mucoso de las colonias observado para *L. paracasei* CIDCA 83123 y CIDCA 83124 al disminuir la temperatura de crecimiento. Sin embargo, los cambios evidenciados en el EPS de la cepa CIDCA 8339 no eran esperados ya que el aspecto de las colonias de esta cepa fue similar a las tres temperaturas por lo que se debe tener en cuenta que las

modificaciones en el tipo y cantidad de EPS sintetizado no siempre se ven reflejados en el aspecto de la colonia.

Por otro lado, se estudió el exopolisacárido sintetizado por las cepas a 20, 30 y 37 °C en **leche**. Se realizó la extracción de los mismos y posteriormente se caracterizaron en cuanto a la distribución de peso moleculares. Al crecer en leche a 30 °C la cepa CIDCA 8339 produce 130-145 mg de EPS por litro de leche fermentada, la cepa CIDCA 83123 155-160 mg/l y la cepa CIDCA 83124 140-160 mg/l. Este rango de valores se encuentra dentro de los esperados, ya que la producción de EPS por BAL es normalmente muy baja (Ruas-Madiedo et al., 2008).

En la Figura 16 se muestran los cromatogramas obtenidos por HPLC-SEC de los EPS y en la Figura 17 el área relativa porcentual de las fracciones de distinto PM para cada uno.

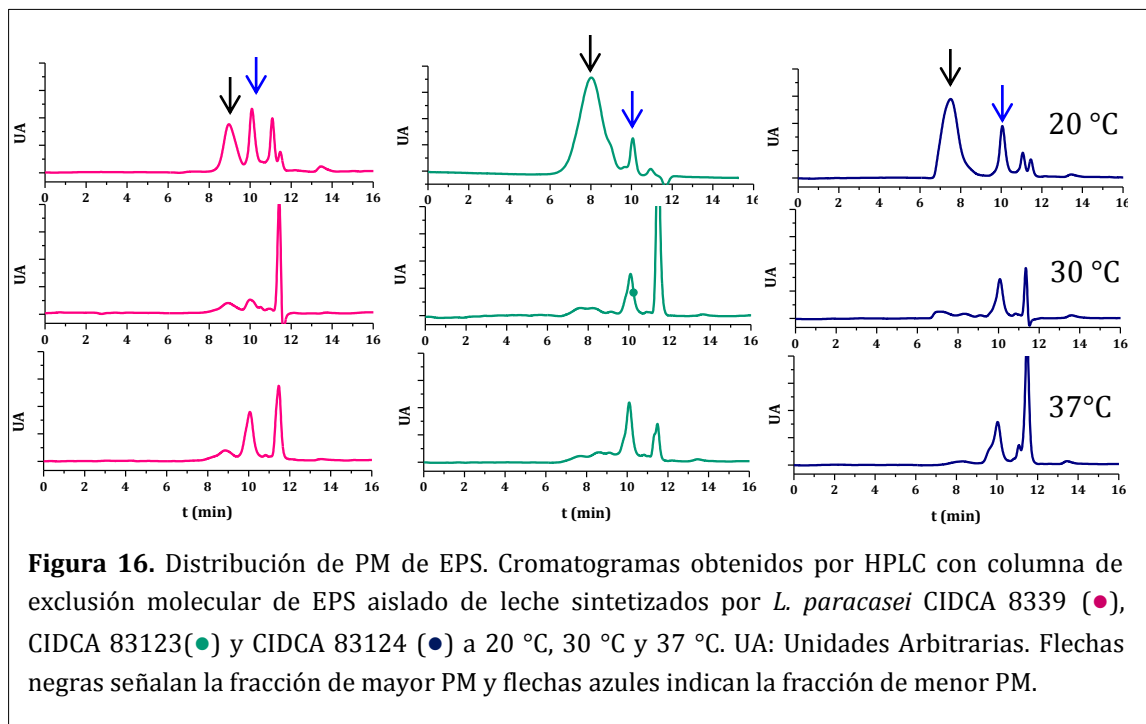
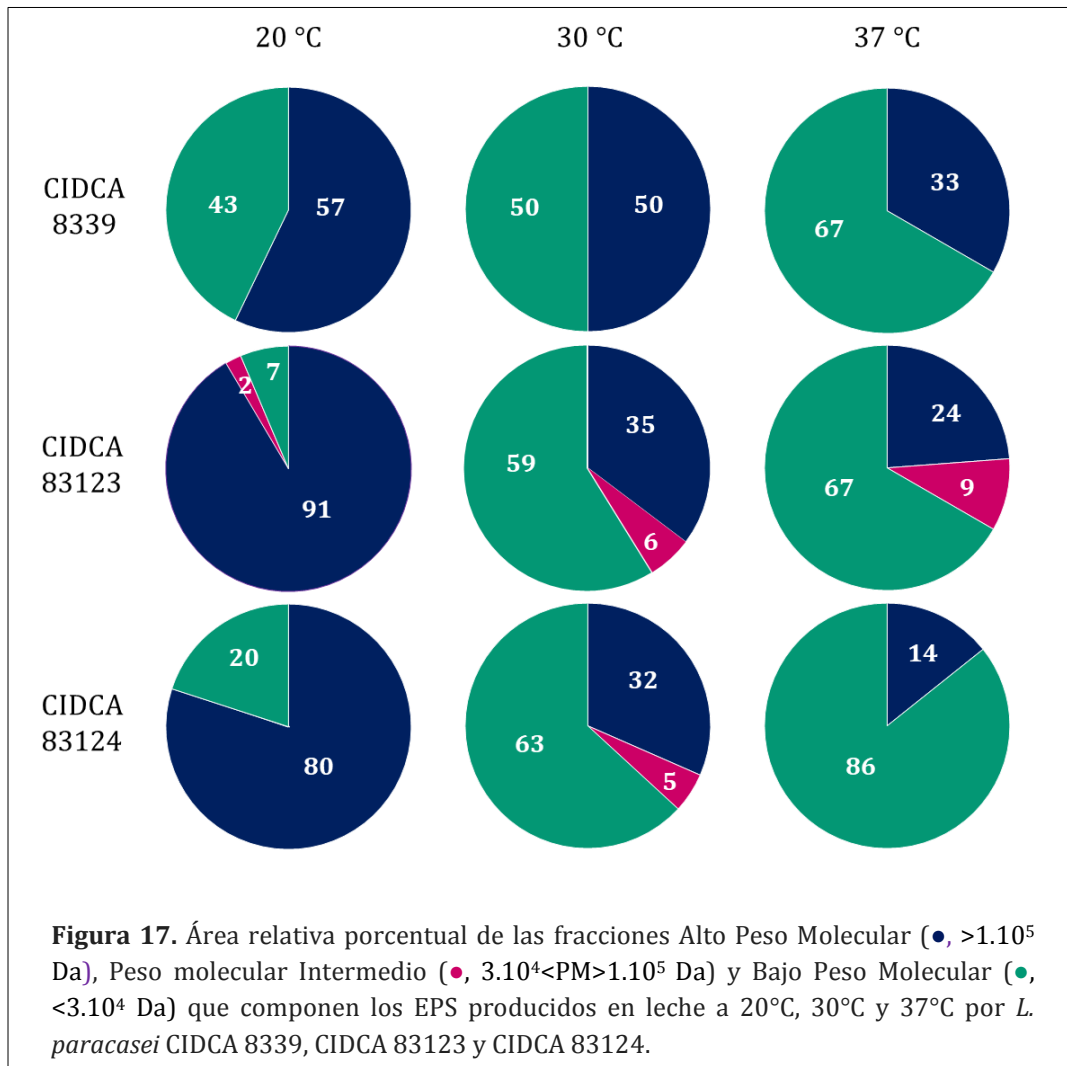


Tabla 13. Distribución de pesos moleculares de los EPS sintetizados por *L. paracasei* CIDCA 8339; CIDCA 83123 y CIDCA 83124 en leche a 20, 30 y 37 °C.

| Cepa | Temperatura de fermentación | Peso Molecular EPS (Da) | | |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------------|--|-------------------------------|
| | | Alto PM (>1 10 ⁵) | PM intermedio (3 10 ⁴ <PM>1 10 ⁵) | Bajo PM (<3 10 ⁴) |
| CIDCA 8339 | 20 °C | 1,4 10 ⁵ | - | 9,0 10 ³ |
| | 30 °C | 3,9 10 ⁵ | - | 1,0 10 ⁴ |
| | 37 °C | 5,4 10 ⁵ | - | 1,2 10 ⁴ |
| CIDCA 83123 | 20 °C | 3,4 10 ⁶ | 6,0 10 ⁵ | 1,0 10 ⁴ |
| | 30 °C | 3,3 10 ⁶ | 6,8 10 ⁵ | 1,1 10 ⁴ |
| | 37 °C | 3,5 10 ⁶ | 4,5 10 ⁵ | 1,2 10 ⁴ |
| CIDCA 83124 | 20 °C | 3,7 10 ⁶ | - | 1,1 10 ⁴ |
| | 30 °C | 5,7 10 ⁶ | 6,9 10 ⁵ | 1,1 10 ⁴ |
| | 37 °C | 1,1 10 ⁶ | - | 1,5 10 ⁴ |

L. paracasei CIDCA 8339 sintetiza un EPS que está conformado por dos fracciones, una de alto PM del orden de 10⁵ Da y una de bajo PM del orden de 10⁴. Estas dos fracciones están presentes a las tres temperaturas estudiadas observándose un cambio en las cantidades relativas de cada fracción dependiendo de la temperatura (Figura 17). A 37 °C la fracción mayoritaria es la de bajo PM, a 30 °C la proporción de las dos fracciones es equivalente mientras que a 20 °C la fracción de alto PM pasa a ser predominante. El polisacárido producido por la cepa CIDCA 83124 a 20 y 37 °C presenta dos fracciones, una de bajo PM del orden de 10⁴ Da y otra de alto PM del orden de 1-4 10⁶ Da. Esta fracción tiene un PM superior a la fracción de alto PM del EPS de la cepa CIDCA 8339. El EPS producido por *L. paracasei* CIDCA 83124 a 30 °C presenta además una fracción de PM intermedio de 7 10⁴ Da y una fracción de alto PM donde se pueden distinguir dos distribuciones de 7 10⁵ y 6 10⁶ Da (Tabla 13). Al analizar el EPS producido por *L. paracasei* CIDCA 83123 se evidencia que a las tres temperaturas hay cuatro distribuciones de diferentes PM (Tabla 13). En la Figura 17 se muestra el área relativa porcentual de las fracciones de alto, intermedio y bajo PM para cada EPS, donde se puede observar para las tres cepas el claro aumento en la cantidad relativa de las fracciones de mayor peso molecular a menor temperatura de fermentación.



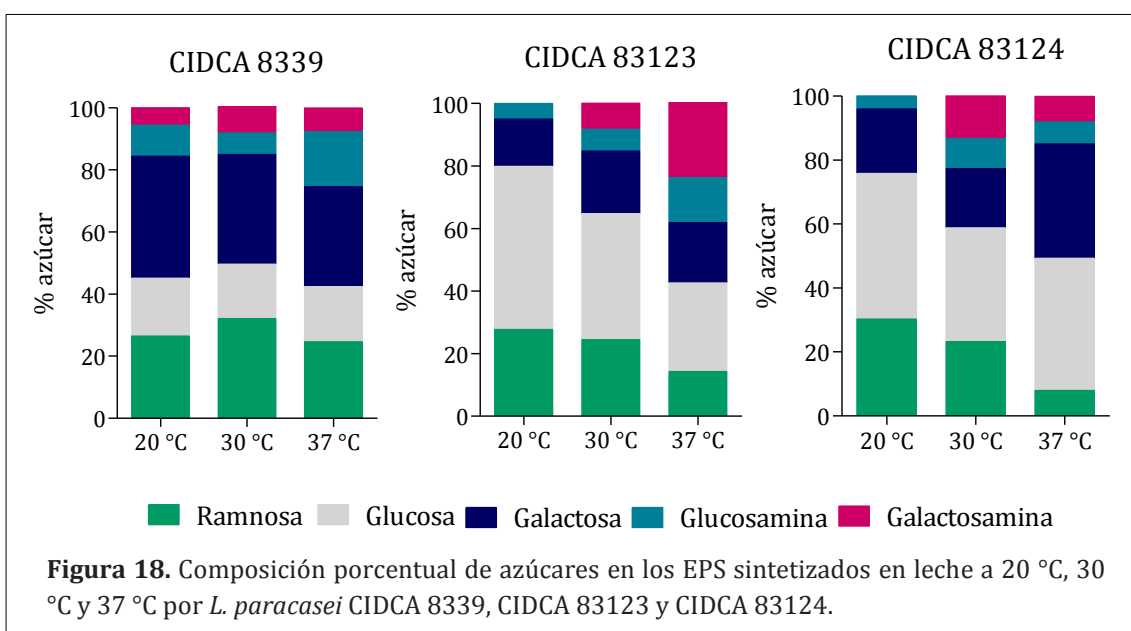
Los resultados obtenidos indican que el efecto de la temperatura sobre el grado de polimerización del EPS observado en leche es equivalente al obtenido para el EPS sintetizado en MRS. Sin embargo, los EPS difieren en cuanto a la distribución de PM, lo que muestra la influencia del medio de cultivo sobre la estructura del polímero.

Varios autores también han reportado un aumento en la producción de EPS bacteriano al disminuir la temperatura de crecimiento (Sánchez et al., 2006; Vera Pingitore et al., 2016; Xu et al., 2010). Sánchez et al. (2006) detectaron un aumento de la fracción de alto PM a 20 °C en comparación con los EPS producidos a 25 y 30 °C por *L. pentosus* LPS26. Del mismo modo, *L. paracasei* HTC produce a 27 °C una cantidad de EPS significativamente mayor que a 32, 37 y 42 °C (Xu et al., 2010). El aumento de la producción de EPS a bajas temperaturas es una característica compartida por varias BAL mesófilas productoras de EPS (Degeest et al., 2001). Según Sutherland (1972) este efecto podría deberse a que al estar creciendo en condiciones sub-óptimas, la síntesis de polímeros de pared celular es

más lenta y en consecuencia hay más moléculas de transportadores lipídicos de membrana (normalmente involucrados en la síntesis de peptidoglicano) disponibles para la síntesis de EPS. Por otro lado, el incremento en la síntesis de EPS también podría ser explicado por un aumento en la actividad de enzimas involucradas en la síntesis de precursores de EPS a bajas temperaturas (Kumar et al., 2007). A diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, Dupont et al. (2000) no evidenciaron diferencias significativas en la cantidad de EPS producido por cepas comerciales de *L. paracasei* y *L. rhamnosus* a 32 y 37 °C, indicando que el efecto de la temperatura es específico de cada cepa.

1.2. Composición de azúcares de los EPS producidos en leche por *L. paracasei* a diferentes temperaturas

Al evaluar la composición de azúcares de los EPS producidos en leche por las tres cepas *L. paracasei*, se evidenció que contienen como azúcares mayoritarios glucosa, galactosa y ramnosa, y en menor medida azúcares aminados tales como glucosamina y galactosamina. Todos los EPS analizados contienen los mismos azúcares, pero se observan diferencias en la proporción de cada uno dependiendo de la cepa y la temperatura de crecimiento (Figura 18).



En el caso de *L. paracasei* CIDCA 8339, los azúcares mayoritarios que conforman el EPS corresponden a galactosa y ramnosa y en menor medida glucosa, manteniéndose constante la proporción de azúcares a las tres temperaturas estudiadas. Por el contrario, en el caso de las cepas CIDCA 83123 y CIDCA 83124 los EPS contienen en mayor

proporción glucosa y se evidenciaron cambios en la proporción de azúcares con la temperatura. El EPS producido por la cepa CIDCA 83123 a 20 °C tiene glucosa como azúcar más abundante, seguido de galactosa y ramnosa, sin embargo, al aumentar la temperatura, la proporción de glucosa y ramnosa disminuye, mientras que aumentan glucosamina y galactosamina. Similarmente, el EPS de la cepa *L. paracasei* CIDCA 83124 también presentó una reducción de ramnosa frente al aumento de temperatura acompañado de un aumento de galactosa y de azúcares aminados. Puede decirse entonces que en los EPS producidos por las cepas CIDCA 83123 y CIDCA 83124 a 20 °C se favorece la incorporación de ramnosa, mientras que a mayores temperaturas aumentan la proporción de azúcares aminados.

Chen et al. (2019) estudiaron la composición de azúcares de EPS producidos por *L. reuteri* Mh-001, *L. fermentum* Mh-002 y *Enterococcus faecalis* Mh-003 en medio MRS a 37 °C observando que la composición de azúcares de los EPS sintetizados era cepa específica. Similarmente a los resultados obtenidos en el presente trabajo, estos EPS estaban formados por galactosa, glucosa, ramnosa, glucosamina, galactosamina con diferente porcentaje de cada azúcar dependiendo del polisacárido. Además, a diferencia de los EPS sintetizados por *L. paracasei*, estos biopolímeros presentaban manosa y en algunos casos también xilosa formando parte de su estructura. De todas maneras, se debe tener en cuenta que dichos EPS fueron obtenidos en medio de cultivo y no en leche. Al analizar la composición de azúcares de EPS producidos en leche, se puede observar en la mayoría de los polisacáridos la presencia de glucosa y galactosa y sus derivados aminados, lo que es esperable teniendo en cuenta que el principal azúcar presente en la leche es la lactosa. El kefirán, que corresponde al EPS presente en el kefir, contiene sólo glucosa y galactosa en relación 1:1. Por otro lado, Zhu et al. (2019) encontraron que el EPS sintetizado por *L. plantarum* RS20D en leche estaba conformado por glucosa, galactosa y glucosamina en relación 2:1,5:1. Sin embargo, el EPS sintetizado por *L. plantarum* CIDCA 8327 en leche fue caracterizado como un glucano (Gangoiti et al., 2017). En concordancia con nuestros resultados también se han reportado EPS producidos por BAL en leche que contienen ramnosa formando parte de su estructura (Ai et al., 2008; Vuyst et al., 2003). Esto resulta interesante desde el punto de vista funcional, ya que se ha propuesto que los EPS que contienen ramnosa en su estructura podrían ejercer un efecto sobre el sistema inmune a través de receptores de manosa presentes en los macrófagos (Chabot et al., 2001). Cabe destacar que no se encontraron en la literatura trabajos que reporten el efecto de la temperatura en la composición de azúcares de los EPS de BAL.

Con los resultados obtenidos es posible afirmar que los EPS sintetizados por las tres cepas son distintos presentando diferencias en la distribución de pesos moleculares y en la composición de azúcares. A su vez, fue posible determinar la influencia de la temperatura y el medio de cultivo sobre las características de los EPS. La temperatura de crecimiento afecta no sólo la cantidad de EPS sintetizado por *L. paracasei* sino también el tipo de EPS, evidenciándose que tanto en medio de cultivo MRS como en leche las bajas temperaturas favorecen la polimerización aumentando la proporción de las fracciones de mayor peso molecular. En particular, para la cepa CIDCA 8339 sólo se observan cambios en la distribución de PM mientras que para los EPS de las cepas CIDCA 83123 y CIDCA 83124 se evidenciaron cambios tanto en la estructura como en la composición de azúcares.

Tal como se mencionó previamente, la estructura y composición del EPS presente en la leche fermentada puede afectar las propiedades reológicas del producto. Sin embargo, si se analizan los valores de viscosidad obtenidos para las leches fermentadas a diferentes temperaturas (Capítulo 1) se pone en evidencia que los cambios inducidos en el EPS sintetizado por *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83123 con la temperatura no generaron un impacto significativo sobre la viscosidad del producto. Por otro lado, en el caso de las leches fermentadas con *L. paracasei* CIDCA 83124 se generó un aumento significativo en la viscosidad a 20 y 30 °C, temperaturas a las que empieza a predominar la fracción de alto PM. Esta característica puede ser aprovechada por la industria para obtener productos con mejores propiedades tecnológicas simplemente modificando la temperatura de fermentación.

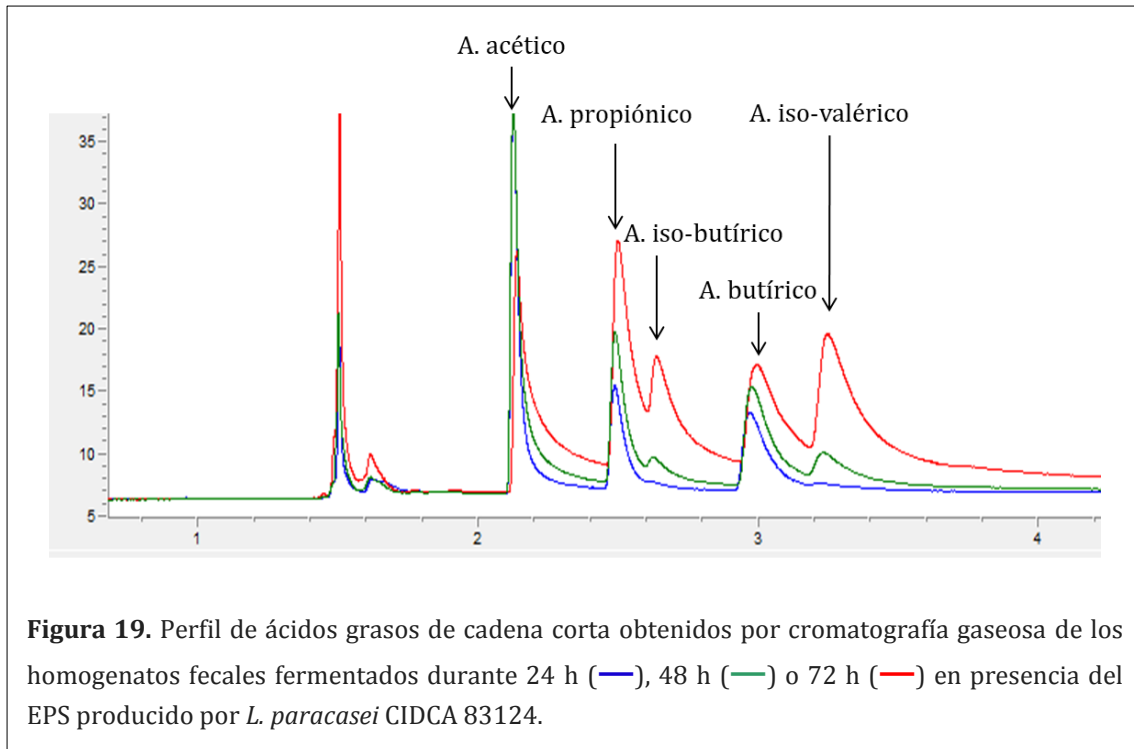
2. Evaluación *in vitro* de la potencialidad prebiótica de los exopolisacáridos producidos en leche

Varios efectos benéficos sobre la salud han sido atribuidos a los EPS producidos por BAL. Esta diversidad en el efecto biológico se debe probablemente a las diferencias estructurales que existen entre los distintos EPS. Teniendo en cuenta que los EPS sintetizados por las tres cepas *L. paracasei* presentan diferencias estructurales, es muy probable que difieran en los efectos que puedan ejercer sobre la salud. Asimismo, considerando las diferencias estructurales con la temperatura y el medio de cultivo, no se debe descartar que los EPS producidos por una misma cepa en distintas condiciones de cultivo también difieran.

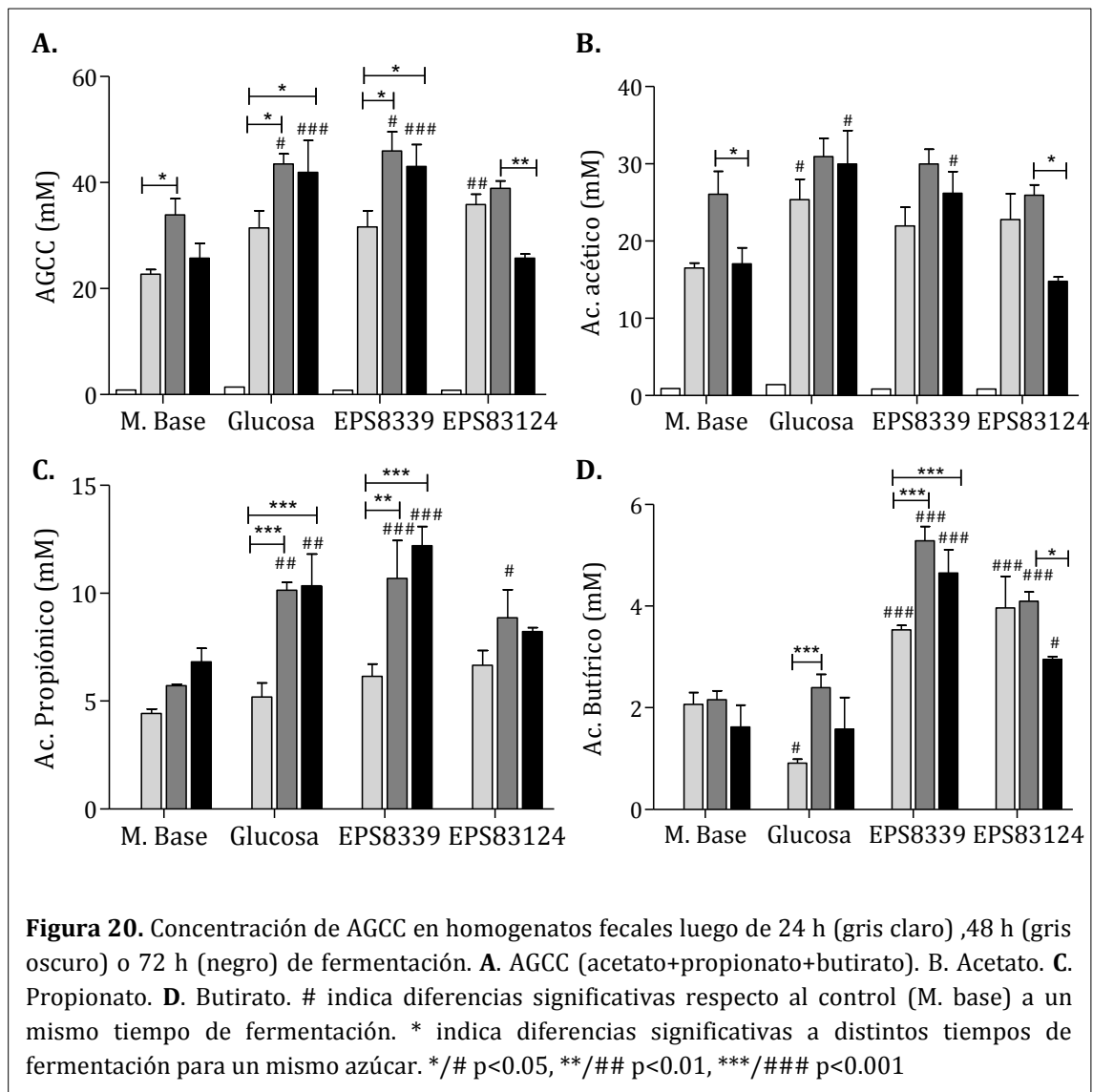
Uno de los efectos benéficos sobre la salud que puede ser atribuido a los EPS es su capacidad prebiótica. La cepa *L. paracasei* CIDCA 83123 crece muy lentamente en leche por lo que la producción de su EPS requeriría tiempos prolongados a nivel industrial. Por este motivo, se decidió evaluar la potencialidad prebiótica de los exopolisacáridos

producidos por las cepas CIDCA 8339 (EPS 8339) y CIDCA 83124 (EPS 83124) en leche. Se trabajó con los EPS producidos a 30 °C ya que se trata de una condición intermedia en la que ambas cepas crecen rápidamente y producen polisacáridos con mayor proporción de la fracción de alto peso molecular.

Una de las etapas para determinar la potencialidad prebiótica de un EPS es analizar si pueden ser utilizados por la microbiota intestinal produciendo AGCC. Como modelo de trabajo se utilizó materia fecal de niños sanos tal como se detalló en Materiales y métodos. Para el ensayo de fermentación en homogenatos fecales, se trabajó con un medio base al que se le adicionaron diferentes azúcares. La glucosa y la inulina se utilizaron como controles. En un sistema real, la glucosa ingerida en un alimento no llega a ser metabolizada por la microbiota intestinal ya que es absorbida antes de llegar al colon. Sin embargo, en este ensayo, se agregó como control positivo de fermentación ya que constituye un azúcar fácilmente fermentable por los microorganismos, por lo que es esperable que se observen cambios en el perfil microbiano y de AGCC garantizando la presencia de microorganismos viables en el inóculo de materia fecal. Por otro lado, la inulina es un polisacárido de reconocida capacidad prebiótica que se utilizó como control positivo. Además, se incluyó un control de medio base sin ningún azúcar agregado en el que las bacterias pueden crecer únicamente a expensas de los nutrientes propios del medio o de la materia fecal. Los medios conteniendo los EPS y los controles correspondientes se inocularon con los homogenatos fecales y se incubaron en anaerobiosis a 37 °C. Se analizó la producción de AGCC a 24, 48 y 72 h por cromatografía gaseosa. En la Figura 19, a modo de ejemplo, se muestran los cromatogramas obtenidos para los homogenatos fecales adicionados con EPS 83124. En la misma, se indican los picos correspondientes a ácido acético ($t_r=2,14$ min), ácido propiónico ($t_r=2,51$ min) y ácido butírico ($t_r=2,99$ min). Además, se evidenciaron dos picos que eluyen a 2,63 y 3,25 min con áreas que aumentan progresivamente con el tiempo de fermentación. Por comparación con patrones, dichos picos pudieron ser identificados como ácido iso-butírico e iso-valérico respectivamente.



A partir del área obtenida de los cromatogramas y con las curvas de calibración correspondientes se determinó la concentración de cada ácido en los sobrenadantes. Al evaluar el perfil de AGCC obtenido luego de 24, 48 o 72 h de fermentación se puede destacar que la presencia del EPS 8339 y el EPS 83124 da lugar a cambios significativos en la concentración de AGCC con actividad biológica reconocida (acetato, propionato y butirato) en comparación con el medio base (Figura 20.A), lo que indicaría que ambos polímeros pueden ser metabolizados por la microbiota fecal.



En el caso del EPS 8339, se observa un comportamiento similar a la glucosa, donde el mayor incremento de AGCC se evidencia a las 48 y 72 h. El EPS 83124, en cambio, dio lugar a un aumento significativo a las 24 h seguido de una caída en los AGCC a las 72 h de fermentación. Esto podría deberse a que los AGCC producidos inicialmente son luego consumidos por alguna población microbiana que se ve incrementada en presencia de este EPS. Se observó además que ninguno de los dos polisacáridos da lugar a cambios importantes en los niveles de acetato, aunque se observa un aumento significativo con el EPS 8339 luego de 72 h de fermentación respecto al medio base. En cuanto al propionato, se destaca el EPS 8339 que dio lugar a un aumento significativo a las 48 y 72 h, resultados similares a los obtenidos con glucosa, mientras que en el caso del EPS 83124, se observa un aumento significativo sólo a las 48 h. En comparación con la inulina, sin embargo, los niveles de propionato alcanzados en presencia de los EPS son bajos, ya que este prebiótico dio lugar a concentraciones del orden de 100 mM (Tabla 14), 10 veces mayor a los

obtenidos con los EPS o la glucosa. Finalmente, se debe destacar que ambos EPS dan lugar a un aumento significativo de butirato a los tres tiempos de fermentación, a diferencia de lo observado con la glucosa y la inulina que no aumentaron la producción de este ácido.

Tabla 14. Concentración de AGCC en homogenatos fecales con inulina luego de 24, 48 y 72 h de fermentación.

| | Tiempo de fermentación | | |
|-------------------------|------------------------|----------------|----------------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| AGCC | 131,90 ± 0,67 | 150,25 ± 34,20 | 135,00 ± 12,51 |
| Ácido acético | 27,25 ± 1,33 | 31,41 ± 6,52 | 31,63 ± 2,91 |
| Ácido propiónico | 102,29 ± 0,41 | 116,21 ± 27,17 | 101,78 ± 9,55 |
| Ácido butírico | 1,59 ± 0,21 | 2,63 ± 0,51 | 1,59 ± 0,17 |

Los resultados obtenidos en el perfil de AGCC permiten concluir que ambos polisacáridos producidos en leche por *L. paracasei* CIDCA 8339 y *L. paracasei* CIDCA 83124 pueden ser metabolizados por la microbiota fecal dando lugar a un aumento significativo de metabolitos bioactivos. En particular, la metabolización del EPS 8339 aumenta los niveles de propionato y butirato, mientras que el EPS 83124 aumenta principalmente los niveles de butirato. Se destaca también que estos EPS, generan un efecto distinto al de la inulina, que aumenta significativamente el propionato, pero no modifica el butirato. Asimismo, es posible concluir que, dado que ambos EPS dan lugar a un perfil de AGCC diferente, estarían siendo metabolizados de manera distinta, probablemente debido a las características estructurales de cada uno.

Para evaluar los cambios inducidos en las poblaciones microbianas a partir de la fermentación de los distintos azúcares, se realizó un análisis mediante DGGE que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño, pero con diferente secuencia de nucleótidos. Para ello, un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturizantes del ADN (urea y formamida) se incorpora a lo largo de un gel de poliacrilamida. Durante la electroforesis, se mantiene una temperatura constante de 60 °C y los fragmentos de ADN doble cadena migran por el gel hasta encontrar una determinada concentración de urea y formamida a la cual las cadenas se separan y el desplazamiento de las moléculas se interrumpe. La concentración desnaturizante a la cual las cadenas se separan depende de la secuencia de nucleótidos (Myers et al., 1987) y así, fragmentos de ADN con distinto contenido G-C ocuparán diferentes posiciones en el gel. Para el análisis de comunidades microbianas, comúnmente se utilizan las regiones variables del gen ribosomal de la subunidad 16S (ADNr 16S). Esto se debe a que dicho gen se encuentra distribuido universalmente en los microorganismos y a que contiene tanto regiones conservadas como otras altamente variables y exclusivas de una sola especie bacteriana.

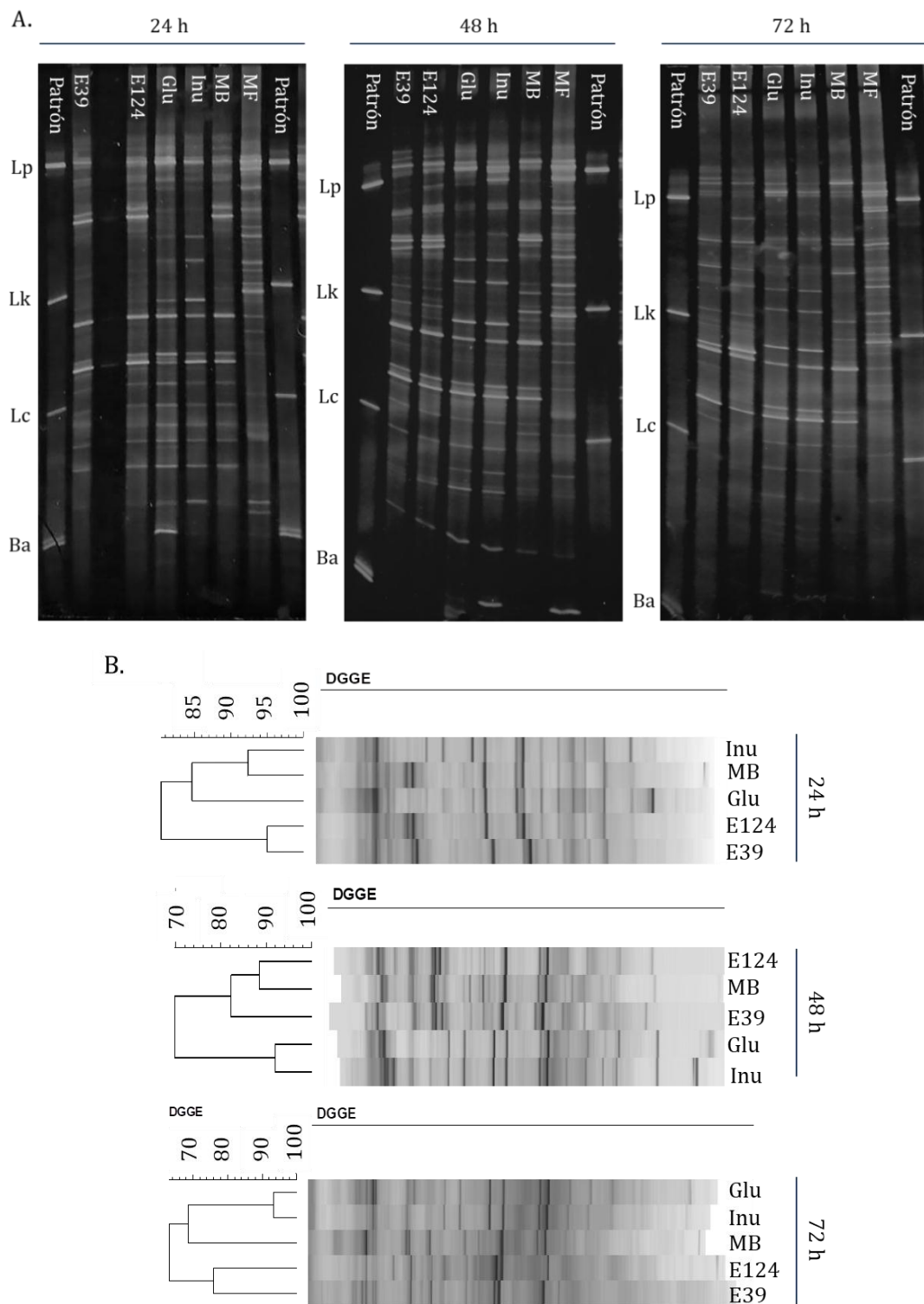
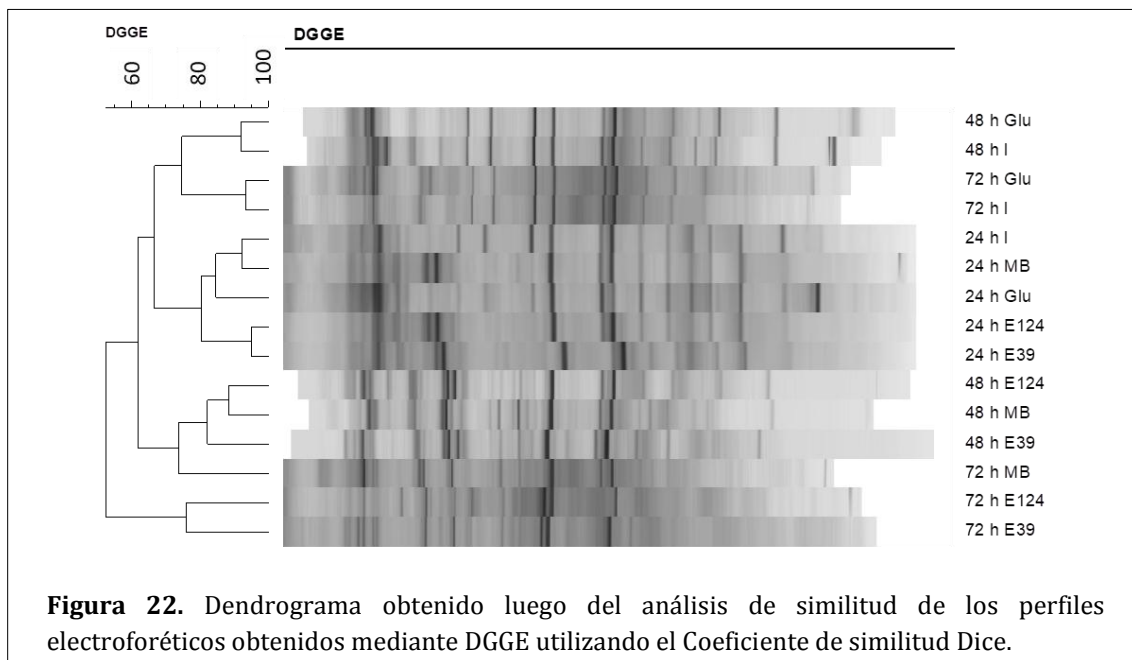


Figura 21. A. Perfiles DGGE de amplicones del gen que codifica para la región V3 del ARNr 16S obtenidos a partir de ADN aislado de homogenatos fecales fermentados durante 24, 48 y 72 h en presencia de EPS 8339 (E39), EPS 83124 (E124), Glucosa (Glu), Inulina (Inu) o en ausencia de azúcar agregado (MB). Se incluye también la materia fecal sin fermentar (MF). B. Dendrogramas obtenidos luego del análisis de similitud de los perfiles electroforéticos obtenidos mediante DGGE utilizando el Coeficiente de similitud Dice. Patrones: Lp: *L. plantarum*. Lk: *L. kefir*. Lc: *L. casei*. Ba: *B. adolescentis*.

Si se comparan los perfiles electroforéticos para cada tiempo de fermentación, se puede observar que a 24 y 48 h los homogenatos fermentados en presencia del EPS 8339 y el EPS 83124 tienen un porcentaje de similitud elevado (80-85 %) respecto al perfil obtenido para el medio base sin azúcar agregado (Figura 21). Sin embargo, a las 72 h de fermentación el perfil electroforético de los homogenatos fermentados en presencia de glucosa e inulina se asemejan más al perfil obtenido en el medio base, mientras que aquellos fermentados en presencia de EPS 8339 y EPS 83124 muestran un perfil de bandas diferente, ubicándose en otro *cluster* y mostrando sólo un 65 % de similitud en comparación con los controles. Más aún, si se observa el dendrograma en el que se comparan todos los perfiles obtenidos a los distintos tiempos de fermentación es posible apreciar que las muestras correspondientes a las 72 h de fermentación con los polisacáridos de *L. paracasei* se ubican en un *cluster* distinto al resto (Figura 22). Estos resultados confirman que los polisacáridos pueden ser fermentados por la microbiota fecal humana. A diferencia de la glucosa y la inulina, que a las 48 h de fermentación ya logran inducir un cambio apreciable en el perfil de bandas respecto al medio base (70 % de similitud), los EPS de *L. paracasei* requirieron 72 h para generar un cambio significativo en la población bacteriana. Esto podría estar indicando que la fermentación de estos metabolitos por la microbiota es más lenta.



Si bien la inulina fue incluida como control positivo de prebiótico, se obtuvieron mayores cambios en la población microbiana en presencia de los polisacáridos. Si se observan los perfiles electroforéticos obtenidos para la glucosa y la inulina, llama la atención el elevado

porcentaje de similitud que presentan ambos azúcares a 48 y 72 h de fermentación, observándose patrones de bandas prácticamente idénticos. Esto podría deberse a que los donantes de las muestras de material fecal consumían regularmente leche de fórmula con prebióticos (inulina, FOS, GOS), por lo que su microbiota podría estar ya adaptada a prebióticos tipo inulina. Esto destaca la relevancia de encontrar nuevos compuestos que puedan ejercer un efecto benéfico sobre la microbiota intestinal distinto a los observados con los prebióticos habitualmente utilizados en alimentos a fin de contribuir con la diversidad de la microbiota intestinal asociada al estado de salud (Durack y Lynch, 2019). En este contexto, los EPS producidos por *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83124 surgen como una alternativa ya que se pudo demostrar que pueden ser fermentados por la microbiota fecal *in vitro* dando lugar a modificaciones en el perfil microbiológico luego de 72 h y a un aumento en los niveles de butirato, un metabolito bioactivo con efectos beneficiosos a nivel intestinal. Se destaca además, que tanto el perfil microbiológico como el perfil de AGCC obtenidos con los EPS difiere de los obtenidos con la inulina, de manera tal que es posible atribuirles un efecto modulador de la microbiota que es distinto y en consecuencia podría ser complementario y contribuir a la salud del consumidor induciendo otros cambios favorables a nivel de la microbiota intestinal.

Para profundizar el estudio de los cambios inducidos sobre la microbiota fecal por la fermentación de los polisacáridos, se realizó la secuenciación masiva del ADN extraído de los homogenatos fecales fermentados en presencia del EPS 8339 y EPS 83124 durante 72 h. Asimismo, se procesó como control la muestra fermentada durante 72 h sin azúcar agregado. La Figura 23 muestra la distribución porcentual a nivel de phylum de las poblaciones presentes luego de la fermentación.

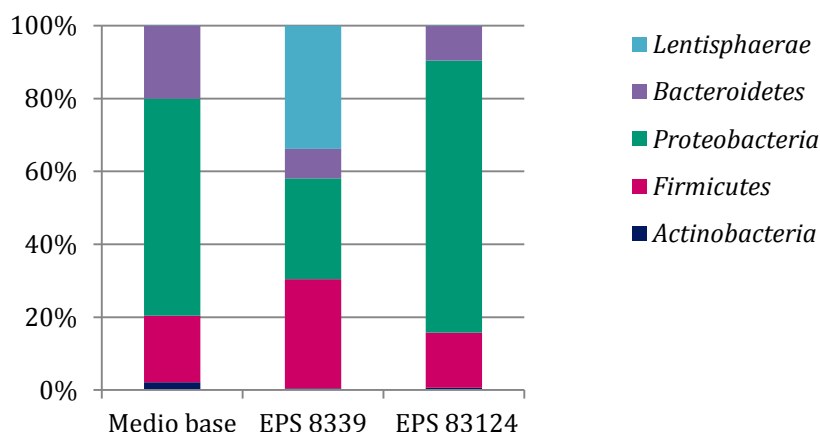
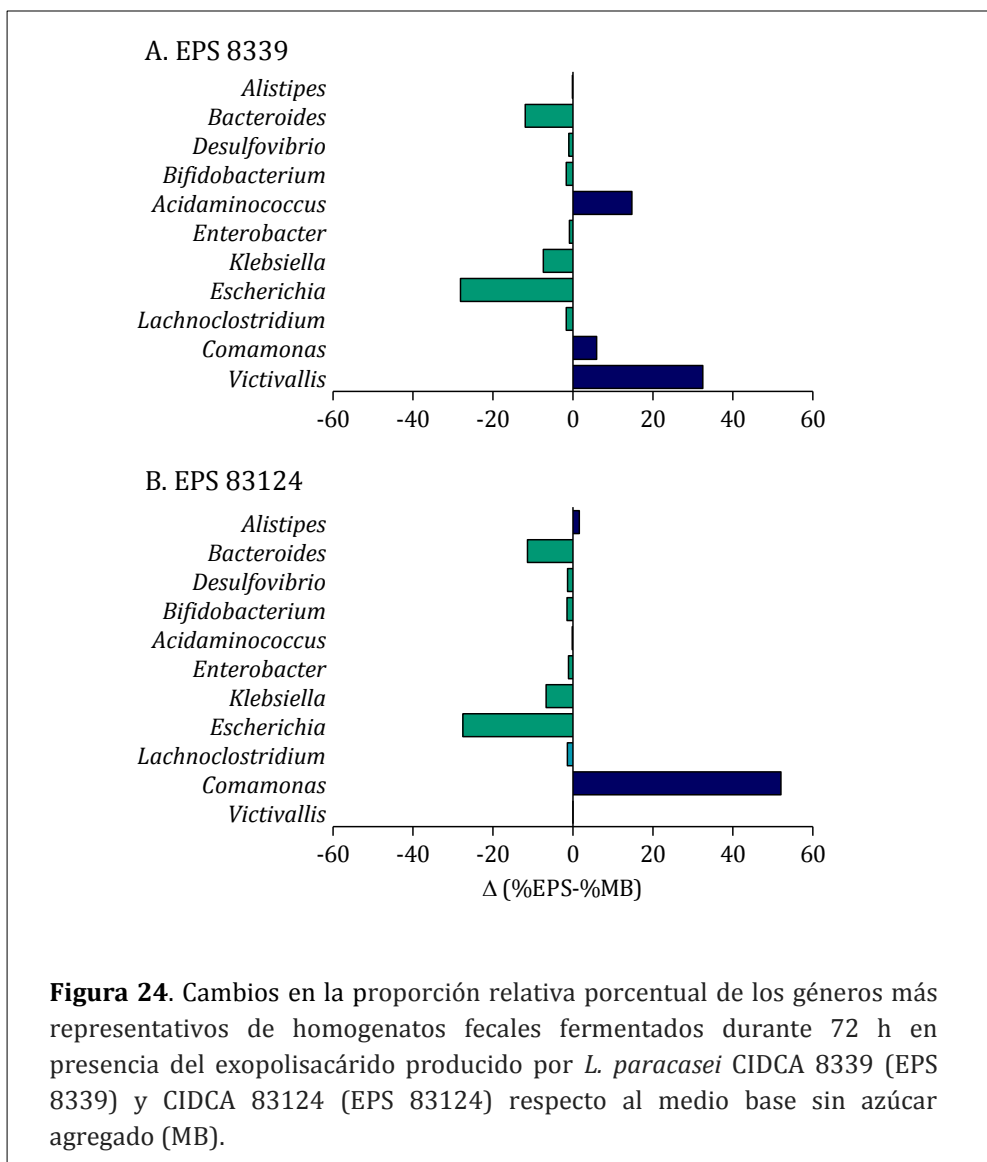


Figura 23. Proporción relativa porcentual de los phylum más representativos de homogenatos fecales fermentados 72 h con el EPS producido por *L. paracasei* CIDCA 8339 (EPS 8339) y CIDCA 83124 (EPS 83124) y en ausencia de azúcar agregado (Medio Base).

Puede observarse que la fermentación del EPS 8339 da lugar a un aumento en la proporción relativa de *Firmicutes* y *Lentisphaerae*, este último presente en muy baja proporción en el control de medio base, acompañado de la disminución de *Actinobacterias*, *Proteobacterias* y *Bacteroidetes*. En el caso del EPS 83124 también se evidencia la reducción de los phyla *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* pero con un incremento en la proporción de *Proteobacterias*.

Al analizar los cambios inducidos a nivel de género (Figura 24), se destaca que la fermentación del EPS 8339 da lugar a un aumento en la proporción de los géneros *Victivallis* (*Lentisphaerae*), *Acidaminococcus* (*Firmicutes*) y *Comamonas* (*Proteobacteria*) (Figura 24.A). Asimismo, se evidenció una importante caída en la proporción de enterobacterias pertenecientes a los géneros *Escherichia*, *Klebsiella* y *Enterobacter* (*Proteobacteria*) y en menor medida de *Bacteroides* (*Bacteroidetes*).



En el mismo sentido, la fermentación del polisacárido producido por *L. paracasei* CIDCA 83124 también da lugar a una reducción marcada de la población de enterobacterias con un importante aumento del género *Comamonas* (Figura 24.B). Finalmente se evidenció que ninguno de los exopolisacáridos dio lugar a un aumento en la población de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Si bien los géneros *Victivallis*, *Acidaminococcus* y *Comamonas* forman parte del tracto gastrointestinal humano, no han sido ampliamente estudiados y su rol en la microbiota intestinal no se conoce con exactitud. Sin embargo, aunque no corresponden a ninguno de los géneros comúnmente asociados a la producción de AGCC, está reportado en la literatura que especies de *Acidaminococcus* son capaces de producir acetato, propionato y butirato a partir de la fermentación de azúcares (Jumas-Bilak et al., 2007). Además, el género *Victivallis* contribuye a la producción de acetato (Zoetendal et al., 2003) y no se debe descartar la posible conversión de este metabolito a butirato mediante la vía butiril-CoA:acetato-CoA transferasa presente en algunos microorganismos de la microbiota intestinal (Louis y Flint, 2017). De esa manera, el aumento de estas poblaciones podría explicar el incremento significativo de butirato y propionato observado luego de 72 horas de fermentación con el EPS 8339. Dentro del género *Comamonas*, la fermentación de los EPS da lugar al incremento de especies no patógenas como *C. aquatica* y *C. kerstersii* (datos no mostrados) que no son capaces de producir AGCC pero sí de consumirlos (Wauters et al., 2003). Así, el aumento marcado en la proporción de *Comamonas* como consecuencia de la fermentación del EPS 83124 podría explicar la caída significativa de acetato y butirato a las 72 h. Del mismo modo, el consumo de leche conteniendo *L. casei* BL23 en ratones Balb/c también generó un aumento significativo de *Comamonas* (Yin et al., 2014), género que se ubica normalmente en las criptas de Lieberkühn donde juega un rol importante en la regeneración del epitelio (Pédron et al., 2012).

En el presente trabajo, se evidenció que la fermentación de los EPS estudiados da lugar al aumento en la producción de propionato y/o butirato, acompañado por la disminución en la población de enterobacterias. Dentro de los AGCC, se ha descrito que el butirato ejerce su efecto benéfico principalmente a nivel intestinal donde es utilizado como fuente de energía por parte de los enterocitos (van der Beek et al., 2015). Entre los efectos beneficiosos atribuidos a este ácido se destaca su capacidad de fortalecer la barrera del epitelio intestinal aumentando la expresión de las proteínas que conforman las uniones estrechas como Claudina 1 y ZO-1 y su redistribución en la membrana (Morrison y Preston, 2016). El aumento en la permeabilidad de la barrera intestinal está asociado a un aumento de la translocación bacteriana y/o de sus componentes de la pared lo que da

lugar a un leve estado inflamatorio crónico que ha sido asociado a patologías tales como obesidad, insulinoresistencia y diabetes tipo 2 (Cani et al., 2008; Qin et al., 2012). De esa manera, el uso de prebióticos que aumenten la producción de butirato a nivel intestinal resulta de interés en individuos con este tipo de alteraciones metabólicas. Por otro lado, el aumento de propionato también sería adecuado para individuos obesos ya que está comprobado que este ácido es capaz de regular el apetito mediante la expresión de leptina, PYY y GLP-1 (Chambers et al., 2015). Por otro lado, el propionato puede inhibir la síntesis de colesterol a nivel hepático y regular la lipogénesis en el tejido adiposo (Ríos-Covián et al., 2016; Tsai et al., 2019). Asimismo, el consumo de este tipo de prebióticos puede ejercer un efecto favorable en pacientes con cáncer de colon ya que el butirato induce apoptosis en células tumorales (Lupton, 2004). Más aún, los AGCC pueden regular la respuesta inmune a nivel intestinal contribuyendo al estado de salud en pacientes que sufren de enfermedades inflamatorias intestinales. El butirato ejerce el efecto antiinflamatorio al inhibir la activación del factor de transcripción NFκB en macrófagos y la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL-12) en células dendríticas. También, se ha demostrado que el butirato y el propionato son capaces de regular la producción y función de células T regulatorias mediante inhibición de histonas desacetilasas (Morrison y Preston, 2016). La disbiosis observada en enfermedades inflamatorias intestinales, que incluyen colitis ulcerosa y síndrome de Crohn, se asocia generalmente a una reducción en los niveles de AGCC (Alagón Fernández Del Campo et al., 2019). Por otro lado, se ha evidenciado que estos pacientes presentan también un aumento en especies de la familia *Enterobacteriaceae* y otros patógenos oportunistas (Gonçalves et al., 2018; Uchiyama et al., 2019). Así, es posible concluir que los EPS sintetizados por *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83124, que aumentan los niveles de AGCC y reducen las enterobacterias, podrían ser potencialmente utilizados como prebióticos para reestablecer la microbiota y reducir el estado inflamatorio en pacientes que sufren de colitis ulcerosa o síndrome de Crohn.

CONCLUSIONES

- La temperatura de crecimiento dio lugar a cambios en el exopolisacárido producido por las bacterias tanto medio MRS como en leche, observándose que a menor temperatura de crecimiento aumentan las fracciones de mayor peso molecular. Además, en medio MRS, la menor temperatura de crecimiento provocó un aumento significativo en la producción de EPS.
- La distribución de pesos moleculares de los EPS sintetizados en MRS y leche para una misma cepa fueron diferentes, indicando que el medio de cultivo influye en las características del EPS producido por la bacteria.
- Los EPS producidos por *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 en leche están compuestos por ramnosa, glucosa, galactosa y en menor medida glucosamina y galactosamina. En el caso de la cepa CIDCA 8339, la temperatura no afecta la proporción de los azúcares del EPS mientras que para las cepas CIDCA 83123 y CIDCA 83124 al aumentar la temperatura se reduce la proporción de ramnosa y aumenta la de los azúcares aminados.
- La fermentación de homogenatos fecales en presencia del EPS 8339 y EPS 83124 da lugar a un aumento de butirato, significativamente mayor al obtenido con glucosa e inulina. La fermentación del EPS 8339 también aumenta significativamente los niveles de propionato.
- Luego de 72 h de fermentación de los homogenatos fecales en presencia de los EPS se observan cambios en el perfil electroforético obtenido mediante DGGE respecto al medio base, la glucosa y la inulina. La fermentación del EPS 8339 aumenta principalmente los géneros *Acidaminococcus* y *Victivallis*, posibles responsables de la producción de AGCC. En el caso del EPS 83124 se genera un incremento marcado en la población de *Comamonas*. Ambos polímeros, además, reducen la proporción de enterobacterias.
- Los EPS 8339 y EPS 83124 provocaron cambios beneficiosos en el perfil de AGCC y la microbiota fecal poniendo en evidencia su potencialidad prebiótica. Además, los cambios inducidos por ambos polisacáridos difieren de los obtenidos con inulina, lo que indica que ejercerían un efecto beneficioso distinto al de los prebióticos comúnmente utilizados en alimentos.

A grayscale electron micrograph showing two rod-shaped bacteria, likely Lactobacillus paracasei, against a light, grainy background. The bacteria are oriented horizontally, with one in the upper half and one in the lower half of the frame. They have a slightly irregular, elongated shape with rounded ends.

**Evaluación de la potencialidad
probiótica de *Lactobacillus paracasei***

CAPÍTULO 3

INTRODUCCIÓN

Las cepas que desean utilizarse como microorganismos probióticos en alimentos, además de ejercer un efecto beneficioso demostrado mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, deben cumplir con ciertos requisitos mínimos que se resumen en la Figura 25 (Pandey et al., 2015). Los probióticos deben ser capaces de incluirse en la matriz del alimento manteniendo su funcionalidad, tolerando las condiciones industriales de producción y de almacenamiento para luego ser liberados y poder ejercer su acción (Sánchez et al., 2012). Un **alimento probiótico** debe tener una carga de probióticos viables comprendida entre 10^6 y 10^9 UFC/g que debe mantenerse durante toda la vida media del alimento en el que está incluido (Artículo 1389, Capítulo XVII, CAA). Además, una vez ingeridos deben ser capaces de resistir a las condiciones adversas que se presentan a lo largo del tracto gastrointestinal (pH ácido, bilis) para poder llegar viables al colon donde ejercerán su acción benéfica (Amund, 2016). Por otro lado, la capacidad de adherirse a la mucosa gástrica o intestinal se consideran características deseables para este tipo de microorganismos ya que garantizan un mayor tiempo de residencia en el tracto gastrointestinal, evitando su eliminación por movimientos peristálticos, lo que favorece no solo un efecto contra patógenos *in situ* por antagonismo competitivo sino también una mayor interacción del probiótico con el sistema inmune del hospedador.

Si bien el rol fisiológico del EPS en la bacteria no se conoce con exactitud (Badel et al., 2011), se cree que el EPS que rodea a la bacteria cumple un rol importante en la protección contra la penetración de metales tóxicos, factores inmunes innatos del hospedador, ataque de fagos y desecación (Ryan et al., 2015; Zannini et al., 2016). Además, el EPS también estaría involucrado en la protección contra las condiciones ambientales adversas del tracto gastrointestinal (Ryan et al., 2015), la agregación bacteriana y la adhesión a las células epiteliales intestinales (Dertli et al., 2015; Lebeer et al., 2008). En este sentido, la presencia de EPS alrededor de la bacteria podría implicar una ventaja importante para cepas potencialmente probióticas.

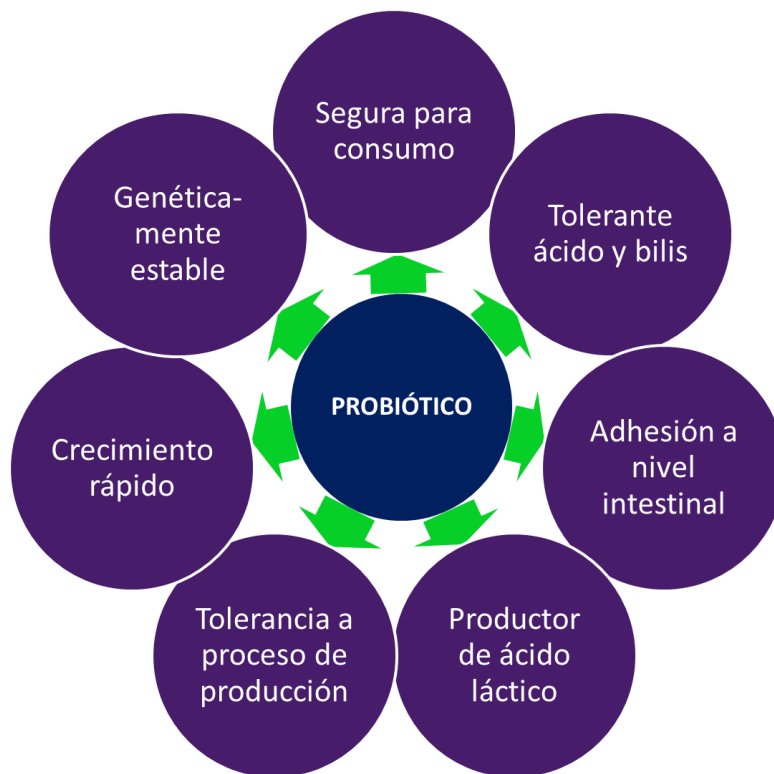


Figura 25. Pre-requisitos mínimos que debe cumplir una cepa potencialmente probiótica para ser aplicada en alimentos (Adaptada de Pandey et al., 2015).

La FAO (Food and Agriculture Organization) y la OMS (FAO/WHO, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Meeting, & World Health Organization, 2006) han presentado conjuntamente directrices para establecer un enfoque sistemático para una evaluación efectiva de probióticos en alimentos. Estas directrices incluyen: la identificación de la cepa, la caracterización en cuanto a su seguridad y sus atributos probióticos, la validación de los efectos beneficiosos en estudios humanos y el etiquetado no engañoso respecto al contenido y al alegato de salud del alimento (Pandey et al., 2015). Por otro lado, en nuestro país el CAA ha establecido los requisitos y evaluaciones para la inclusión de probióticos (Artículo 1389, Capítulo XVII, CAA) indicando que para que una cepa pueda ser utilizada como ingrediente probiótico en alimentos deberá cumplir con un protocolo de evaluación que incluye:

1. **Identificación de la cepa (Género/especie/subespecie).**
2. **Caracterización *in vitro* e *in vivo*** de resistencia gástrica, a bilis y opcionalmente a lisozima.
3. **Ensayos *in vivo* e *in vitro*** que demuestren el o los efectos probióticos adjudicados.
4. **Seguridad:** la cepa probiótica no debe ser riesgosa para la salud. La bacteria no deberá presentar o promover la translocación bacteriana en las concentraciones en que se

encuentra en el alimento y la ausencia de resistencia a antibióticos, actividad hemolítica y producción de toxinas deberán demostrarse *in vitro*.

Debido a su larga historia de uso aparentemente seguro en alimentos, la mayor parte de las especies del género *Lactobacillus* son “Generalmente Reconocidas como Seguras” (“Generally Recognized As Safe”, GRAS) por la Food and Drug Administration, FDA (Hill et al., 2018; Salvetti et al., 2012), y forman parte de la lista de microorganismos QPS (Qualified Presumption of Safety) definida por la European Food Safety Authority (EFSA Panel on Biological Hazards, 2016). A pesar de esto, cuando se pretende utilizar una nueva cepa de *Lactobacillus* en un alimento, es importante demostrar que es segura para el consumo humano (Bernardeau et al., 2008; Mayrhofer et al., 2008), evidenciando ausencia de resistencia a antimicrobianos y factores de virulencia de acuerdo a las recomendaciones establecidas el CAA y la FAO/WHO. Además de la caracterización *in vitro*, la seguridad de la cepa deberá ser demostrada mediante estudios de ingesta aguda en modelos murinos. Por otro lado, es importante demostrar que el microorganismo introducido en la matriz del alimento también cumple con los requisitos de seguridad establecidos, asegurando así que no solo la cepa sino el alimento probiótico como tal es adecuado para el consumo humano.

OBJETIVOS

L. paracasei CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 son cepas productoras de exopolisacáridos que demostraron ser prometedoras para su aplicación como starters en productos lácteos, por lo que resulta de interés investigar su potencial como microorganismo probiótico. Teniendo en cuenta esto, el objetivo del presente capítulo fue determinar el potencial uso de las cepas de *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 para el desarrollo de nuevos alimentos probióticos, evaluando los requisitos mínimos que deben cumplir de acuerdo a la normativa establecida por el CAA.

Objetivos específicos

- Estudiar la tolerancia de las cepas a las condiciones del tracto gastrointestinal *in vitro* y su capacidad de adhesión a células de epitelio gástrico e intestinal, y evaluar el efecto de los cambios en el EPS sintetizado a distintas temperaturas sobre estas propiedades probióticas.
- Evaluar la seguridad de las cepas *in vitro* mediante el estudio de la resistencia a antibióticos de importancia clínica y la presencia de factores de virulencia.
- Evaluar la inocuidad del consumo de leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 en un modelo murino de toxicidad aguda.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Tolerancia a las condiciones gastrointestinales *in vitro*

Se evaluó la tolerancia a las condiciones gastrointestinales *in vitro* de acuerdo al método de Grimoud et al. (2010). Las cepas de *L. paracasei* crecidas a 20 °C, 30 °C y 37 °C en caldo MRS fueron centrifugadas (5 min, 4200 *xg*) y resuspendidas a una DO_{590} 0,5 (~10⁸ UFC/ml) en una solución gástrica simulada (NaCl 125 mM; KCl 7 mM; NaHCO₃ 45 mM, pepsina 3 g/l (Sigma-Aldrich, EE.UU.), con pH final ajustado en 2,5. Las suspensiones bacterianas fueron incubadas a 37 °C durante 1,5 h; lavadas dos veces con buffer PBS y resuspendidas en solución intestinal simulada (NaCl 22 mM; KCl 3,2 mM; NaHCO₃ 7,6 mM; pancreatina 0.1% p/v (Sigma-Aldrich, EE.UU.); sales biliares 0,15 % p/v (Sigma-Aldrich, EE.UU.) ajustando el pH final a 8. Luego de 3 h de incubación a 37 °C, se realizaron diluciones seriadas 1/10 de las suspensiones bacterianas en triptona 0,1% p/v y se sembraron las diluciones correspondientes en agar MRS para determinar el número de viables luego del tratamiento gastrointestinal. Las placas fueron incubadas a 30 °C en aerobiosis durante 48 hs. Los resultados se presentaron como la concentración de microorganismos que resistieron el proceso.

Siguiendo el mismo protocolo se estudió la tolerancia a las condiciones gastrointestinales de las cepas lavadas con buffer PBS antes de iniciar el tratamiento.

2. Evaluación del exopolisacárido en la superficie bacteriana mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se trabajó con cultivos de 24 h crecidos a 30 °C en caldo MRS. Se estudió mediante microscopía óptica y TEM la presencia de EPS en la superficie bacteriana antes (sin lavar) y después de realizar 1 o 3 lavados sucesivos con PBS. Para la observación al microscopio óptico se realizó la tinción del EPS con Azul de Alcian de acuerdo a la técnica de Novelli (1953). Las muestras fueron extendidas secadas y fijadas con calor sobre portaobjetos y luego teñidas durante 2,5 min con una solución alcohólica de Azul de Alcian al 1% p/v diluida diez veces en agua. Se lavaron con agua y se dejaron secar y a continuación se cubrió el preparado con una solución diluida de safranina (0,1% p/v) durante 1 min.

El análisis mediante TEM se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por Lee et al. (2016). Se agregaron 5 µl de la muestra en una rejilla de cobre para microscopio electrónico (malla de 400) durante 5 min y se realizó una tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 2% durante 20 s. Luego las muestras fueron analizadas con un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL Ltd., Japón) que se estabilizó a 100 kV.

3. Células de epitelio gástrico AGS e intestinal Caco-2/TC-7

Las células AGS (ATCC® CRL 1739™) constituyen una línea de células tumorales humanas de epitelio gástrico provenientes de un adenocarcinoma de estómago, establecidas como línea celular por Barranco et al. en el año 1983. Estas células crecen adheridas a la superficie formando una monocapa y constituyen un modelo ampliamente utilizado para el estudio *in vitro* de diversas patologías gástricas.

La línea celular Caco-2 es un modelo ampliamente aceptado de epitelio intestinal de origen humano proveniente de un adenocarcinoma de colon (ATCC HTB-37). Al igual que las células AGS, son células adherentes. Estas células exhiben un patrón de diferenciación estructural y funcional característico de los enterocitos, como por ejemplo ribete en cepillo, uniones estrechas funcionales y alto nivel de enzimas asociadas al ribete en cepillo como fosfatasa alcalina, sacarasa isomaltasa y aminopeptidasa (Chantret et al., 1994; Pinto, 1983) que son adquiridas una vez alcanzada el crecimiento confluyente. Esta etapa también se caracteriza por la presencia de domos, distribuidos al azar en la monocapa celular, indicando un cambio funcional en la misma, ya que su formación se debe a la secreción de sustancias hacia el dominio basolateral. La línea Caco-2/TC-7 es un clon derivado de la línea Caco-2, cuya principal ventaja es que no forma domos logrando la formación de una monocapa homogénea y presenta un tiempo de duplicación de 24 h lo que le permite llegar a diferenciarse y estar en confluencia al cabo de 7 días.

Las células AGS y Caco-2/TC-7 se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido en viales conteniendo 1 ml de medio DMEM completo (ver Apéndice) con 10 % v/v de dimetilsulfóxido (Riedel-de Haën AG, Alemania) como crioprotector. Para reactivarlas se descongeló un vial a 37 °C y se centrifugó a 200 *xg* durante 10 min. Las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo fresco y se colocaron en una botella de 25 cm² (Corning Costar Co., Cambridge, MA, EE.UU.) con 4 ml de medio DMEM completo. El cultivo se mantuvo a 37 °C en estufa con atmósfera controlada con 5% CO₂ renovando el medio cada 2 días. Una vez alcanzado el crecimiento confluyente de la monocapa, las células fueron repicadas a una botella de 75 cm². Antes de cada repique se observó la monocapa en un microscopio invertido para verificar su uniformidad y continuidad. Para realizar los repiques se procedió a descartar el medio y se lavó la monocapa tres veces con PBS estéril. A continuación, se agregaron 1,5 ml de solución de tripsina 0,25 % (Trypsin-EDTA, GIBCO, Life Technologies, EE.UU.) y se llevó a la estufa a 37 °C durante 5 min. Cuando se observaron los primeros indicios de desprendimiento celular, se adicionaron 4 ml de DMEM con suero fetal bovino, para inactivar la enzima. Los 5 ml de suspensión de células se centrifugaron a 400 *xg* durante 5 min, se descartó el medio y se reemplazó por medio

DMEM completo. Se tomaron 50 µl de la suspensión de células y se mezclaron con igual volumen de una solución de Azul Tripán al 10 % p/v en PBS. Se realizó el recuento de células en una cámara de Neubauer contando sólo aquellas células brillantes que no hubieran incorporado el colorante (viables).

Se preparó una suspensión con la concentración adecuada de células según la línea celular ($7,5 \times 10^4$ células/ml para AGS y $1,5 \times 10^5$ células/ml para Caco 2/TC-7) y se sembraron 0,25 o 0,5 ml por fosa en placas de 48 o 24 fosas respectivamente (Greiner Bio-One, Austria). Las placas fueron incubadas a 37 °C en una estufa con atmósfera controlada (5% CO₂) cambiando el medio cada 2 días durante 5 (AGS) o 7 días (Caco-2/TC-7), tiempo necesario para alcanzar la confluencia en las fosas.

4. Ensayo de adhesión de lactobacilos a células AGS y Caco-2/TC-7

La capacidad de adhesión se estudió antes y después del pasaje por el tracto gastrointestinal. En el caso de la adhesión a células AGS, los lactobacilos solo fueron tratados con solución gástrica, mientras que para la adhesión a células intestinales los lactobacilos fueron sometidos al tratamiento completo como se describe en la Sección 1 de Materiales y Métodos del presente capítulo.

Luego del tratamiento, las bacterias fueron lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en DMEM base (Ver Apéndice) a una $DO_{590}=1$. Una vez preparadas las suspensiones bacterianas se agregaron 500 µl/fosa de una placa de células de 24 fosas y se incubaron durante 1 h a 37 °C con atmósfera controlada (5 % CO₂ y 95 % aire) para permitir la adhesión de los lactobacilos a la monocapa celular. A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS estéril para eliminar aquellas bacterias que no estuvieran adheridas y se lisaron agregando 500 µl de agua bidestilada estéril. Luego de incubar 1h a 37 °C con atmósfera controlada se procedió a determinar la cantidad de bacterias adheridas mediante recuento de colonias por el método de la gota en agar MRS. Para ello se tomó todo el volumen de la fosa y se realizaron diluciones seriadas 1/10 en triptona 0,1% p/v. Las diluciones correspondientes para tener un número adecuado de colonias se sembraron por duplicado (20µl). Los resultados que se muestran corresponden a la media de 2 ensayos independientes.

Para la evaluación de la capacidad adhesión sin tratamiento gastrointestinal se procedió de la misma manera trabajando con cultivos frescos.

5. Sobrevida en la leche fermentada durante el almacenamiento a 4 °C

Las leches fermentadas a 30 °C con *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 fueron almacenadas en heladera a 4 °C durante un periodo de 6 meses. Se determinó en agar MRS el número de bacterias viables iniciales y a distintos tiempos durante el periodo

de almacenamiento utilizando el método de la gota (Sección 5.1 Materiales y métodos. Capítulo 1).

6. Determinación de la capacidad hemolítica

Para determinar la capacidad hemolítica de las cepas en estudio, se realizó una estría de un cultivo fresco del lactobacilo (24 h a 30 °C) en agar sangre. Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C en aerobiosis y a continuación se evaluó la presencia de halos de hemólisis. La presencia de citolisinas se evidencia por la observación de zonas verdosas alrededor de la estría que sugieren una hemólisis parcial de los glóbulos rojos (α -hemólisis) o zonas translúcidas alrededor de la estría que indican hemólisis completa (β -hemólisis). La ausencia de halo de hemólisis (γ hemólisis) sugiere ausencia de citolisinas. Como control positivo se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

7. Determinación de la actividad DNAasa

A partir de cultivos frescos de 24 h se realizó una estría en agar DNAasa (Britania, Argentina) de cada una de las cepas. Se incubaron durante 48 h a 37 °C y a continuación se adicionó HCl 1N sobre la placa. En presencia de HCl el DNA intacto precipita generándose opacidad en el medio de cultivo. Dado que el DNA hidrolizado no precipita, la presencia de un halo translúcido alrededor de la estría indica actividad DNAasa. Se realizó también una estría de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 en el medio de cultivo a modo de control positivo.

8. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima de las tres cepas de *L. paracasei* frente a distintos antibióticos mediante la técnica de microdilución en caldo de acuerdo a la guía establecida por la EFSA para evaluar susceptibilidad a antimicrobianos en bacterias de uso alimentario. Se realizó el protocolo estandarizado establecido por la “International Organization for Standardization” (ISO) para Bifidobacterias y BAL no enterocócicas (ISO 10932/IDF 233 standard, 2010) (EFSA FEEDAP panel, 2012). Para cada uno de los antibióticos (Sigma-Aldrich, EE.UU.) evaluados se preparó una solución stock concentrada (10X) en el diluyente adecuado según lo recomendado. A continuación, las soluciones stock fueron diluidas 1/5 en medio LSM (Ver Apéndice) para obtener soluciones 2X. Los antibióticos fueron testeados en los rangos de concentraciones recomendados para cada uno de ellos (Tabla 15).

Tabla 15: Soluciones de antibióticos y rango de concentraciones recomendados según ISO 10932/IDF 233

| Antibiótico | Solvente para preparación de solución stock (10X) | Rango de concentración (mg/L) |
|-----------------------|---|-------------------------------|
| Ampicilina | Buffer fosfato 0,1M, pH 8,0 | 0,032-16 |
| Gentamicina | Agua miliQ | 0,5-256 |
| Kanamicina | Agua miliQ | 2-1024 |
| Estreptomicina | Etanol 95% v/v | 0,5-256 |
| Eritromicina | Agua miliQ | 0,016-8 |
| Clindamicina | Agua miliQ | 0,032-16 |
| Tetraciclina | Agua miliQ | 0,125-64 |
| Cloranfenicol | Etanol 95% v/v | 0,125-64 |

Para la preparación del inóculo se partió de un cultivo crecido en agar MRS durante 24 h a 37 °C. Las bacterias se resuspendieron en 5 ml de solución fisiológica de manera tal de obtener una $DO_{625}=0,16 - 0,22$. Posteriormente, el inóculo fue diluido 1:500 en medio LSM. El ensayo se realizó en una placa estéril de 96 fosas adicionándose 50 μ L del inóculo diluido a cada fosa que contenía 50 μ l de la dilución de ATB correspondiente. De esa manera se logra una concentración de inóculo final por fosa aproximada de 3×10^5 UFC/ml. Las placas fueron incubadas 24 h a 37 °C en anaerobiosis. La CIM para cada antibiótico se determinó como la mínima concentración de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento visible del microorganismo. Para determinar la susceptibilidad del microorganismo al antibiótico, los valores de CIM obtenidos se compararon con los puntos de corte establecidos por la EFSA para el grupo *L. casei* (FEEDAP-EFSA Panel, 2012). *L. plantarum* ATCC 14917 fue utilizado como control de calidad del ensayo.

9. Evaluación de la inocuidad *in vivo*

Para evaluar la inocuidad de la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 y su sobrenadante se realizó un ensayo *in vivo* con ratones Balb/c hembras libres de patógenos específicos (SPF) de entre 6-8 semanas de edad obtenidos de la Casa Central de los Animales de la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG, Brasil). Los ratones fueron mantenidos en microaisladores (Alesco, Brasil) a una temperatura de 22 ± 1 °C, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y humedad controlada (60-80%). Los ratones fueron alimentados *ad libitum* con una dieta comercial (Nuvital, Curitiba, Brasil) y agua previamente esterilizadas. El procedimiento experimental se llevó a cabo de acuerdo con la normativa descrita en la "Dirección de trabajo para el cuidado y la utilización de animales para fines científicos y didácticos" (CONCEA, 2013) y fue aprobado por el Comité de Ética en Uso Animal (CEUA / UFMG, número de protocolo 257/16).

Se realizaron dos experimentos independientes con un total de 30 animales. Durante el protocolo los ratones fueron divididos en tres grupos que consumieron:

- 1. Grupo LF:** leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 diluida 1/10 en agua durante 10 días.
- 2. Grupo FNM:** la fracción no microbiana de la LF diluida 1/10 en agua durante 10 días.
- 3. Grupo control:** agua estéril durante 10 días.

La leche fermentada y la fracción no microbiana fueron obtenidas como se describe en el Capítulo 1 (Materiales y Métodos Sección 3. y 4.) y se diluyeron en agua de manera tal de garantizar una dosis equivalente al consumo diario en un humano. Los tratamientos fueron administrados durante 10 días en el agua de bebida, renovando la botella diariamente. Se controló diariamente el peso de los animales y su comportamiento y el estado general, analizando signos asociados a malestar o dolor siguiendo los lineamientos establecidos por el Consejo Canadiense de Protección de los Animales (Olfert, 1998) y lo descrito por Langford et al. (2010).

Al final del tratamiento los ratones fueron anestesiados con ketamina/xilazina (100 mg/kg y 20 mg/kg, respectivamente) y sacrificados por dislocación cervical. Para la toma de muestras se trabajó en una Cabina de Seguridad Biológica tipo I utilizando material quirúrgico estéril. El hígado y bazo de cada ratón fueron colectados en condiciones asépticas para evaluar la translocación bacteriana y para realizar análisis histopatológico. Asimismo, se recolectó el íleon para análisis histopatológico y para la determinación de la expresión de ARNm de citoquinas pro y antiinflamatorias. El contenido intestinal del íleon se colocó en PBS con inhibidor de proteasas para la posterior cuantificación de los niveles de IgA total.

10. Evaluación de translocación bacteriana

El hígado y el bazo de cada ratón fueron recolectados en tubos estériles previamente tarados. Los órganos fueron pesados, resuspendidos al 10% p/v en PBS estéril y homogeneizados. A partir de los homogenatos de tejido se realizaron diluciones seriadas 1/10 en triptona 0,1% p/v y las diluciones correspondientes se sembraron en agar MRS, agar MacConckey (Acumedia, Neogen Corporation, EE.UU.) o agar nutritivo (Biokar Diagnostics, Francia) para la determinación del número de BAL, enterobacterias y bacterias heterótrofas totales respectivamente. Las placas fueron incubadas 48 h a 37 °C y los resultados se expresaron como número de bacterias viables por gramo de tejido.

Por otro lado, se procedió a inocular 1 ml del homogenato de hígado en 5 ml de caldo MRS y caldo nutritivo los cuales fueron incubados 24 h a 37 °C con el fin de enriquecer las muestras en los microorganismos que puedan estar presentes en baja concentración. A partir de estos se sembraron estrías en agar MRS o agar nutritivo para determinar la presencia o ausencia de bacterias translocadas al hígado.

11. Análisis histológico de hígado e íleon

El hígado e íleon fueron removidos de la cavidad abdominal y lavados con PBS. En el caso del íleon, se abrió longitudinalmente, se colocó sobre papel de filtro y se fijó durante 15 min en solución Bouin (70 ml de ácido pícrico, 25 ml Formaldehído 40% y 5 ml de ácido acético glacial). A continuación el íleon se enrolló en forma de espiral con la mucosa orientada hacia el interior (Arantes y Nogueira, 1997). Los tejidos se incluyeron en parafina obteniéndose los tacos que fueron cortados con micrótopo en secciones de 4 μm de espesor y luego teñidos con hematoxilina y eosina (ver Apéndice). Las muestras fueron analizadas al microscopio óptico evaluándose cambios en la estructura normal del tejido tales como edema, congestión vascular e infiltrado.

12. Cuantificación de la expresión génica de citoquinas en íleon

Se cuantificaron los niveles de ARNm de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e INF- γ) y antiinflamatorias (TGF- β , e IL-10) en íleon mediante RT PCR cuantitativa (qRT-PCR). Para ello, se tomaron 0,5 cm del íleon proximal y distal que se guardaron en RNA later (Ambion, EE.UU.) a -80 °C hasta el momento del procesamiento de la muestra. Para la determinación de los niveles de ARNm en el tejido se realizó la extracción de ARN total utilizando el reactivo TRIzol™ Invitrogen (Life Technologies Corp, EE.UU.) y luego se obtuvieron los cDNA utilizando un kit comercial de transcripción reversa de alta capacidad (Applied Biosystems, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenidos los cDNA, se realizó una PCR cuantitativa (qPCR) usando el kit QuantiTect SYBR green PCR (Qiagen, Alemania). Los protocolos empleados se describen en detalle a continuación.

12.1. Extracción de ARN total (TRIzol™)

La extracción de RNA se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Acurcio et al. (2017). Se utilizó el reactivo TRIzol™ Invitrogen (Life Technologies Corp, EE.UU.) y se siguió el protocolo de acuerdo a lo especificado por el fabricante. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con DNA Turbo I kit (Thermo-Fischer Scientific, EE.UU.) para eliminar restos de ADN que pudieran haber quedado. La concentración de RNA por muestra se cuantificó por espectrometría utilizando un equipo NanoDrop (Thermo Scientific, Inc., Alemania) y se evaluó la pureza de la muestra midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Sólo se trabajó con muestras de concentración de RNA >200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA y con una relación de A_{260}/A_{280} entre 1,7 y 2,1.

12.2. Obtención de cDNA mediante transcripción reversa

Para la obtención de cDNA se utilizó el kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, EE.UU.) siguiendo el protocolo especificado por el

fabricante. En esta técnica se utilizan *random primers*, secuencias cortas de ADN simple hebra (6 nucleótidos) que contienen todas las posibles combinaciones del orden de las bases nucleotídicas en el ADN ($4^6= 4096$ posibles combinaciones). Dado que están cubiertas todas las posibles combinaciones, estos *primers* se unirán con cualquier sección del ARN presente en la muestra.

Inicialmente se preparó la RT Master Mix 2X según lo indicado en la Tabla 16. A continuación, se agregaron 10 μ L/fosa de la RT master mix 2X y 10 μ L/fosa de la muestra de RNA en una placa de 96 fosas. Una vez cargada la placa con todas las muestras, se selló y se centrifugó brevemente para bajar el contenido de la fosa y eliminar burbujas de aire.

Tabla 16. Composición de la RT Master Mix 2X para la obtención de cDNA mediante transcripción reversa

| Reactivo | Vol/reacción(μ l) |
|-------------------------------|------------------------|
| 10 \times RT Buffer | 2 |
| 25 \times dNTP Mix (100 mM) | 0,8 |
| 10 \times RT Random Primers | 2 |
| MultiScribe™ | 1 |
| Transcriptasa reversa | 1 |
| Inhibidor de RNAsa | 1 |
| H2O libre de nucleasas | 3,2 |
| Total por reacción | 10 |

La reacción se llevó a cabo en un ciclador térmico con las condiciones indicadas en la Tabla 17. Los cDNA obtenidos se conservaron a -20°C para luego ser analizados mediante qPCR.

Tabla 17. Condiciones de la reacción para la obtención de cDNA mediante transcripción reversa

| | Paso 1 | Paso 2 | Paso 3 |
|--|--------|--------|--------|
| Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | 25 | 37 | 85 |
| Tiempo (min) | 10 | 120 | 5 |

12.3. Cuantificación mediante qPCR en tiempo real

Para cuantificar los niveles de citoquinas pro y anti inflamatorias se utilizó el kit QuantiTect SYBR green PCR (Qiagen, Germany). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l utilizando 10 μ l de SYBR GREEN master mix (concentración final de primer 0,3 μM) con 50 ng del cDNA correspondiente. El programa de temperaturas de ciclado se detalla en la Tabla 18.

Tabla 18. Condiciones de la reacción de qPCR para la cuantificación de la expresión de citoquinas en fíleon

| Temperatura | Tiempo | Nº Ciclos |
|-------------|--------|-----------|
| 95 °C | 10 min | 1 |
| 95 °C | 15 seg | 40 |
| 60 °C | 60 seg | |

La secuencia de los *primers* específicos utilizados para amplificar genes de citoquinas (TNF- α , INF- γ , TGF- β , e IL-10) y genes *housekeeping* de β -actina y GAPDH se muestran en la Tabla 19 (Giulietti et al., 2001). Para el análisis de expresión génica, se utilizó β -actina y Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) como gen normalizador. Los resultados se analizaron por el método de Ct comparativo descrito por Livak y Schmittgen (2001) donde los valores de Ct obtenidos se normalizan con un gen *housekeeping*, y se comparan con el valor de Ct de un calibrador que corresponde a un control no tratado. Brevemente, para cada muestra se normaliza el Ct del gen de interés respecto al gen referencia (Δ Ct). Luego, se comparan los Δ Ct de cada muestra experimental (Δ Ct M), con el Δ Ct de la muestra utilizada como control (Δ Ct C) para obtener el $\Delta\Delta$ Ct. La cantidad relativa en cada muestra, está definida por la siguiente fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

$$\Delta Ct = Ct \text{ citoquina} - Ct \text{ housekeeping}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Muestra} - \Delta Ct \text{ Control}$$

En todos los casos se chequearon los productos de amplificación analizando las curvas de fusión (T_m) y en todas las corridas se incluyeron los controles negativos: uno con la mezcla de reacción sin ácidos nucleicos y otro con la mezcla de reacción y ARN extraído.

Tabla 19. Secuencia de los *primers* utilizados para la amplificación de genes mediante qPCR.

| Gen | Secuencia (5'--3') | Pares de bases del amplicón | Nº de acceso |
|----------------|------------------------------|-----------------------------|--------------|
| IL-10 | FW GGTGCGCAAGCCTTATCGGA | 191 | M37897 |
| | RV ACCTGCTCCACTGCCTTGCT | | M84340 |
| TNF- α | FW CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA | 175 | M13049 |
| | RV TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC | | Y00467 |
| INF- γ | FW TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA | 92 | K0083 |
| | RV TGGCTCTGCAGGATTTTCATG | | M74466 |
| TGF- β | FW TGACGTCCTGGAGTTGTACGG | 170 | M13177 |
| | RV GGTTCATGTCATGGATGGTGC | | L42460 |
| β -Actin | FW AGAGGGAAATCGTGCCTGAC | 138 | X03672 |
| | RV CAATAGTGATGACCTGGCCGT | | V01217 |
| GAPDH | FW TCACCACCATGGAGAAGGC | 168 | M32599 |
| | RV GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA | | U09964 |

13. Determinación de los niveles de IgA total en contenido intestinal

Se determinó la concentración de IgA total en contenido intestinal siguiendo el protocolo descrito por Steinberg et al. (2014). De cada ratón se tomó una porción de intestino, se

recogió el contenido intestinal y se resuspendió en PBS de manera tal de obtener una relación de 500 mg de contenido cada 2 ml de PBS. Se suplementó luego con un *cocktail* de inhibidores de proteasas que contenía aprotinina, leupeptina, pepstatina A, bestatina, E-64 y 4-(2-aminoetil) fluoruro de bencenosulfonilo AEBSF (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.). A continuación, las muestras se centrifugaron a 2000 $\times g$ durante 30 min a 4 °C y se recolectaron los sobrenadantes para la posterior determinación de los niveles de IgA total. Los niveles de IgA se determinaron mediante ELISA de captura utilizando un anticuerpo anti IgA de ratón (M8769, Sigma-Aldrich Co, EE.UU.) y un anticuerpo anti-IgA de ratón conjugado con peroxidasa (A4789, Sigma-Aldrich Co, USA). El revelado se realizó con o-fenilendiamina (OPD, Sigma-Aldrich Co, EE.UU.) en buffer citrato pH 5.0 utilizando H₂SO₄ 3N para detener la reacción. La medida de absorbancia a 492 nm se realizó en un lector de placas de ELISA (Thermo Fisher Scientific Inc., EE.UU.). Los valores obtenidos se compararon con una curva de calibración de un estándar de IgA de ratón purificado (Southern Biotechnology Associates, EE.UU.) para cuantificar los niveles de la inmunoglobulina. Los resultados se expresaron como μg IgA/gr de contenido intestinal.

14. Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism versión 5.01 para Windows (GraphPad®, EE.UU.). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (DE). Para la comparación de medias, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) seguido del Test de Tukey. Se consideraron diferencias significativas aquellas con un valor de $p < 0,05$.

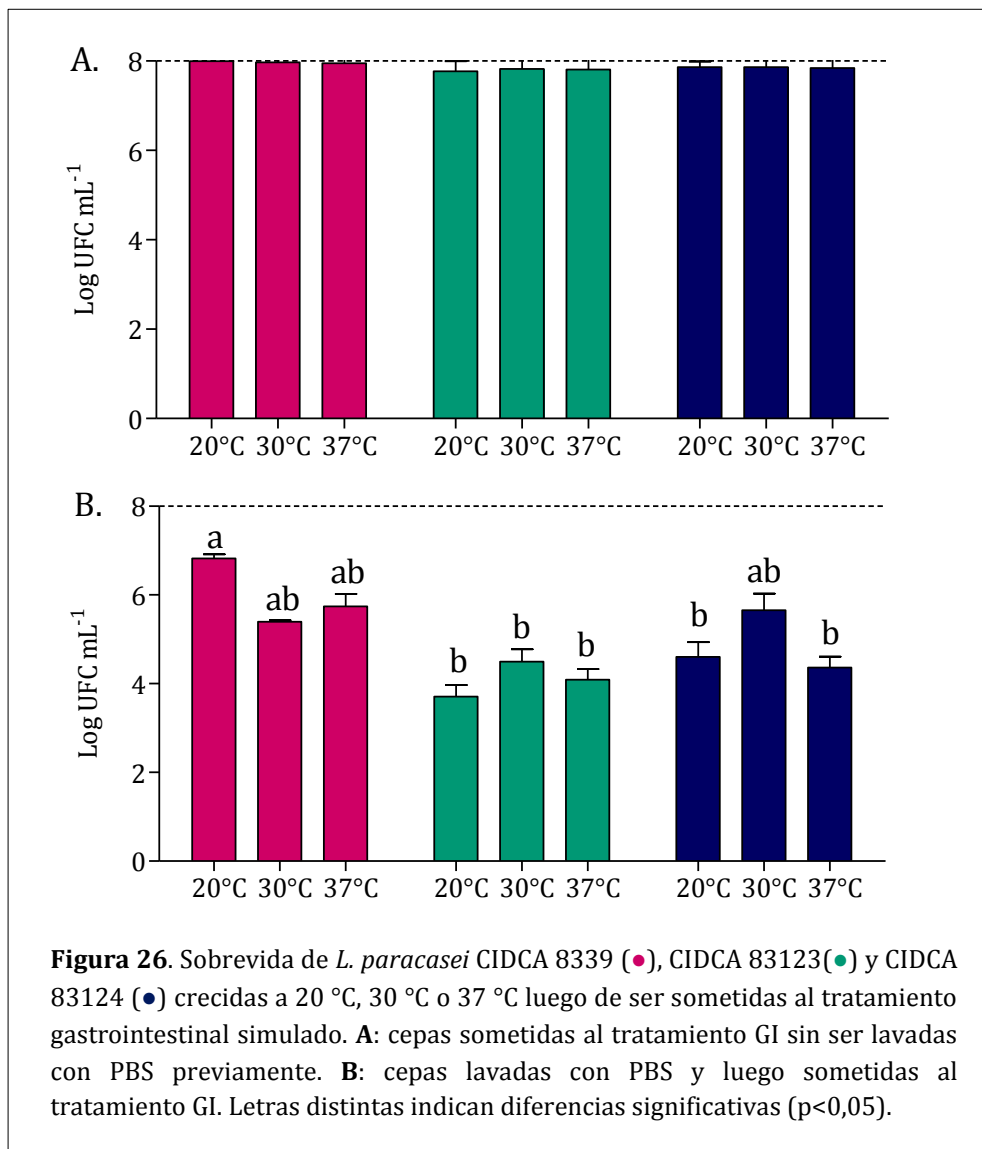
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudio *in vitro* de las propiedades probióticas de cepas de *L. paracasei*

1.1. Tolerancia a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal

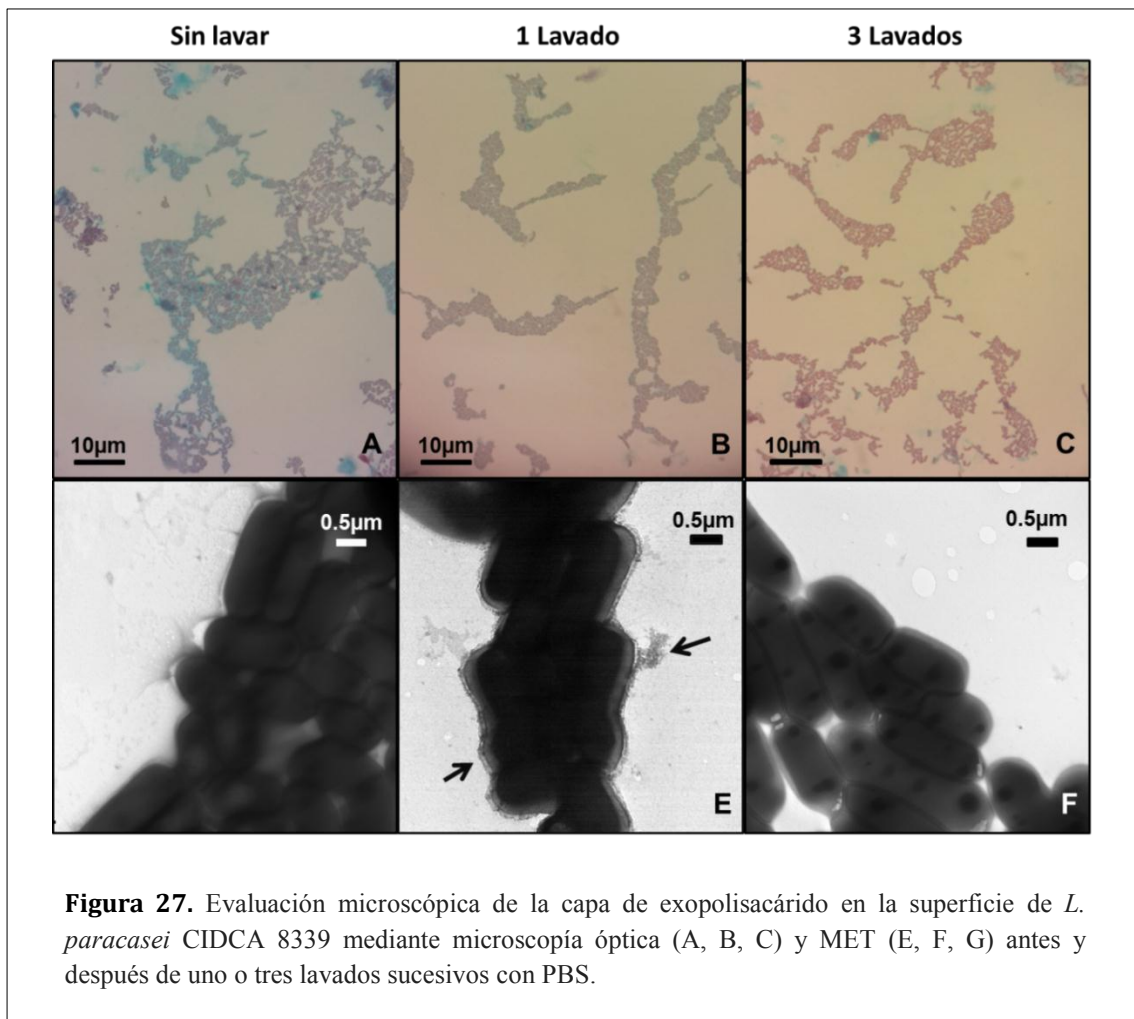
Considerando que una de las posibles funciones del exopolisacárido producido por la bacteria puede ser la de proteger al microorganismo frente a estas condiciones adversas, se estudió la tolerancia a las condiciones gástricas e intestinales de las cepas crecidas a 20 °C, 30 °C y 37 °C para evidenciar si los cambios en el exopolisacárido con la temperatura daban lugar a alguna modificación en la tolerancia.

Como se puede ver en la Figura 26, las tres cepas de *L. paracasei* presentaron una muy buena tolerancia a las condiciones gastrointestinales ya que no se observó una reducción significativa en el número de bacterias viables luego de ser sometidas al tratamiento.



Además, se puede observar que la tolerancia a las condiciones gastrointestinales no se ve modificada por la temperatura de crecimiento lo que nos indica que los cambios en el PM del EPS sintetizado por la bacteria no modifican su tolerancia frente a al ácido y la bilis. Sin embargo, cuando las bacterias son lavadas con PBS justo antes de ser sometidas al tratamiento se observa una mayor susceptibilidad de las cepas ya que se evidencia una reducción en el número de microorganismos viables de 3-4 órdenes logarítmicos. En estas condiciones la cepa *L. paracasei* CIDCA 8339 presentó mayor resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal simulado en comparación con las cepas CIDCA 83123 y CIDCA 83124.

El EPS que recubre la bacteria y que puede estar involucrado en la protección de la misma frente a las condiciones adversas, se encuentra débilmente asociado a la pared celular. De esa manera, las diferencias observadas en la tolerancia de las cepas previamente lavadas con PBS o sin lavar podrían deberse a que el lavado puede llevar a la pérdida parcial del EPS que recubre la bacteria. Para corroborarlo, bacterias sin lavar y sometidas a uno o tres lavados sucesivos con PBS fueron teñidas con azul de Alcian que colorea al EPS que rodea la bacteria.



En la Figura 27 se muestran los resultados obtenidos con la cepa CIDCA 8339 donde se puede ver a las bacterias sin lavar rodeadas por EPS (Figura 27.A). Sin embargo, cuando las mismas son sometidas a un lavado (B) se observa una pérdida parcial del EPS lo que indica que un lavado es suficiente para removerlo. Por otro lado, los tres lavados sucesivos con PBS dieron lugar a la pérdida completa de la capa de EPS (C). Estos resultados fueron confirmados mediante MET (Figura 27 D, E, F), observándose también la pérdida progresiva del EPS con los lavados sucesivos. Cabe destacar que las cepas *L. paracasei* CIDCA 83123 y CIDCA 83124 mostraron el mismo comportamiento indicando que la pérdida parcial del EPS podría ser responsable de las diferencias en la tolerancia a las condiciones gastrointestinales observadas entre los lactobacilos lavados y sin lavar.

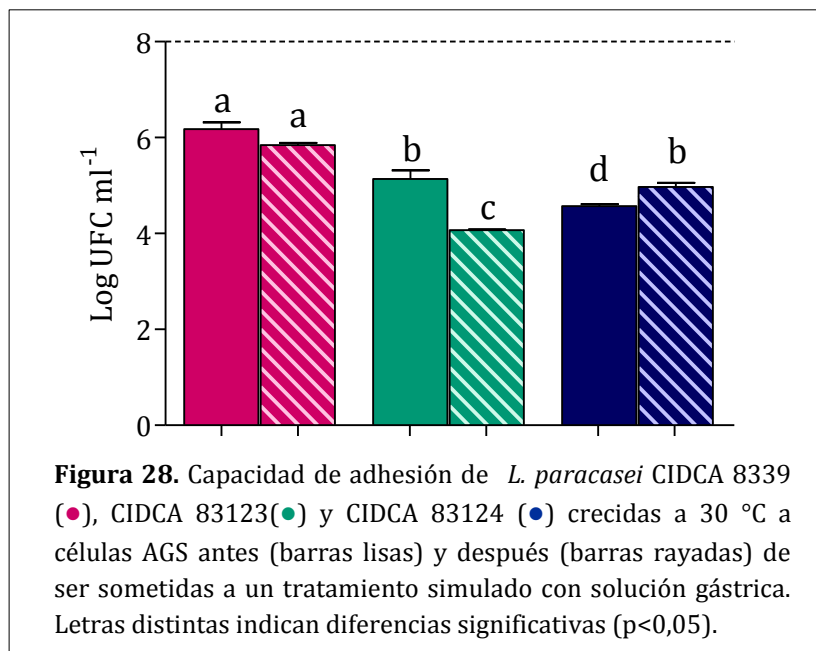
Está demostrado en la literatura que la tolerancia de las BAL a las condiciones gastrointestinales es cepa dependiente (Papadimitriou et al., 2015), por lo que es necesario evaluar esta característica en todas aquellas cepas que quieran ser utilizadas como probiótico en un alimento. *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 fueron capaces de sobrevivir al tratamiento con pepsina a pH=2,5 seguido de un tratamiento de 3 h con pancreatina y sales biliares, lo que nos indica que serían buenos candidatos para su uso como probióticos de administración oral. Otros autores han estudiado la tolerancia a las condiciones gástricas e intestinales de cepas de *L. casei* y *L. paracasei* obteniendo resultados similares. *L. casei* LC71 (Delgado et al., 2015) y *L. paracasei* LPC-S01 (Balzaretto et al., 2015) presentaron muy buena capacidad de resistir las condiciones adversas del tracto gastrointestinal, con una tolerancia incluso mayor a la que presenta *L. casei* Shirota, una cepa probiótica de uso comercial (Tuohy et al., 2007). Similarmente, Ren et al. (2014) demostraron que una cepa *L. casei* subsp. *casei* aislada de yogurt y productora de EPS mostraba una buena sobrevivencia luego de ser expuesta a condiciones de pH ácido o a la presencia de sales biliares 1% p/v. Sin embargo, este modelo de tolerancia a las condiciones gastrointestinales es muy simplificado ya que no evalúa la sobrevivencia luego de una exposición secuencial a las condiciones ácidas y a las sales biliares, ni la resistencia a las enzimas digestivas presentes en el tracto gastrointestinal.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la pérdida parcial del EPS lleva a un aumento en la susceptibilidad de las cepas poniendo en evidencia su relevancia en la protección a las condiciones gástricas e intestinales. Estos resultados fueron similares a las tres temperaturas ensayadas lo que indica que para estas cepas el efecto protector es independiente de la cantidad y estructura de EPS sintetizado, pero demuestra que es fundamental que el EPS se mantenga asociado a la pared celular bacteriana. De manera similar, la cepa *L. paracasei* NFBC 338 que fue manipulada genéticamente para producir

un β -glucano presentó una tolerancia al jugo gástrico y a las sales biliares significativamente mayor que la observada para la cepa parental no productora de polisacárido (Stack et al., 2010). Por el contrario, en el caso de *L. plantarum* SF2A35B; *L. plantarum* Lp90 (Lee et al., 2016) y *P. parvulus* 2.6 (Fernández De Palencia et al., 2009) no se observaron diferencias cuando se comparaba la tolerancia de las cepas nativas y las cepas modificadas genéticamente que producían menores cantidades de EPS. Nikolic et al. (2012) caracterizaron tres cepas de *L. paraplantarum* no productoras de EPS observando que el porcentaje de sobrevivencia luego del tratamiento gastrointestinal fue similar al obtenido para la cepa parental productora de EPS, lo que indica que el EPS no confiere una protección adicional. Estas diferencias indicarían que el rol protector del EPS es cepa específico y depende probablemente de la estructura y composición del polímero (Caggianiello et al., 2016).

1.2. Capacidad de adhesión a células epiteliales gástricas e intestinales

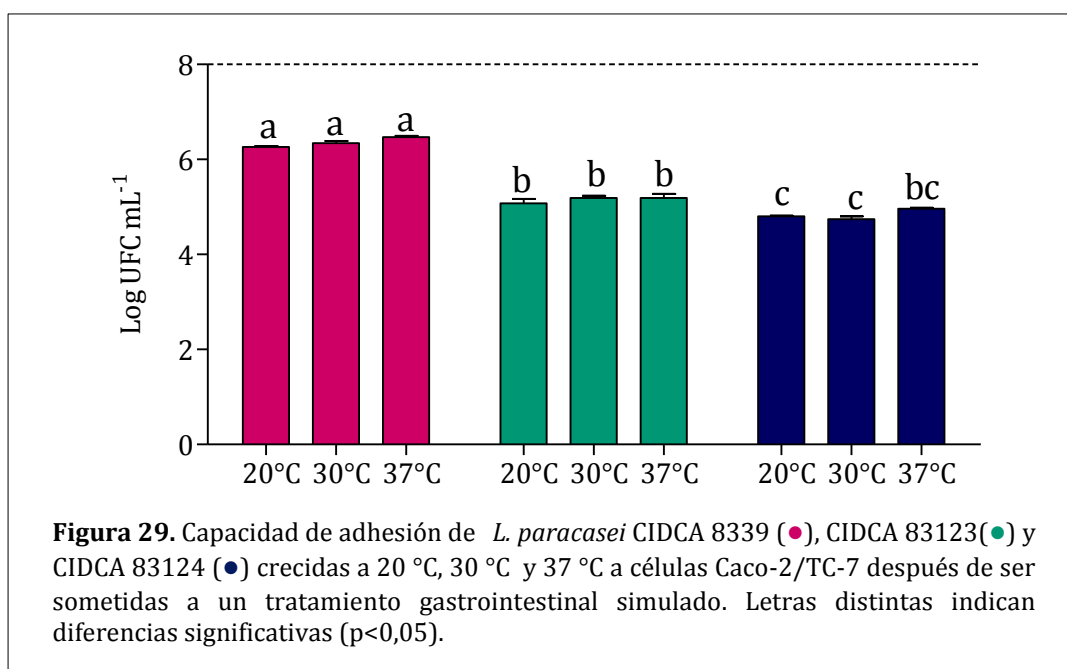
Otra de las características deseadas en bacterias probióticas es la capacidad de adherirse a células epiteliales tanto a nivel gástrico como intestinal. En la Figura 28 se muestra la adhesión de las cepas *L. paracasei* crecidas a 30 °C a células de epitelio gástrico AGS antes y después de ser sometidas a un tratamiento con solución gástrica.



La cepa CIDCA 8339 fue la que presentó mayor capacidad de adhesión, sin observarse diferencias significativas en la cantidad de bacterias adheridas antes y después del tratamiento. Sólo la cepa CIDCA 83123 presentó una caída significativa en la capacidad de

adhesión lo que podría estar indicando que el tratamiento gástrico da lugar a cambios en las estructuras de superficie de la bacteria involucradas en la interacción con la célula epitelial. Por el contrario, *L. paracasei* CIDCA 83124 presentó mayor capacidad de adhesión luego del tratamiento con la solución gástrica simulada.

Las tres cepas *L. paracasei* presentaron también una buena capacidad de adherirse a células de epitelio intestinal Caco-2/TC-7 incluso después de ser sometidas al tratamiento gastrointestinal *in vitro* (Figura 29). Al igual que en las células AGS, la cepa CIDCA 8339 presentó una adhesión significativamente mayor en comparación con las cepas CIDCA 83123 y CIDCA 83124. Partiendo de una concentración inicial de 10^8 UFC/ml, se logró una adhesión de 10^6 UFC/ml en el caso de *L. paracasei* CIDCA 8339 y de aproximadamente 10^5 UFC/ml para las otras dos cepas.



Teniendo en cuenta que la presencia de EPS y sus características, tales como estructura y composición, podría influir en la capacidad de adhesión de las bacterias al epitelio intestinal (Ruas-Madiedo et al., 2006) se comparó la adhesión de las cepas crecidas a 20 °C, 30 °C y 37 °C, observándose que esta propiedad no se ve afectada por la temperatura de crecimiento de la cepa. Esto indicaría que el EPS no estaría jugando un rol importante en la interacción con células epiteliales intestinales.

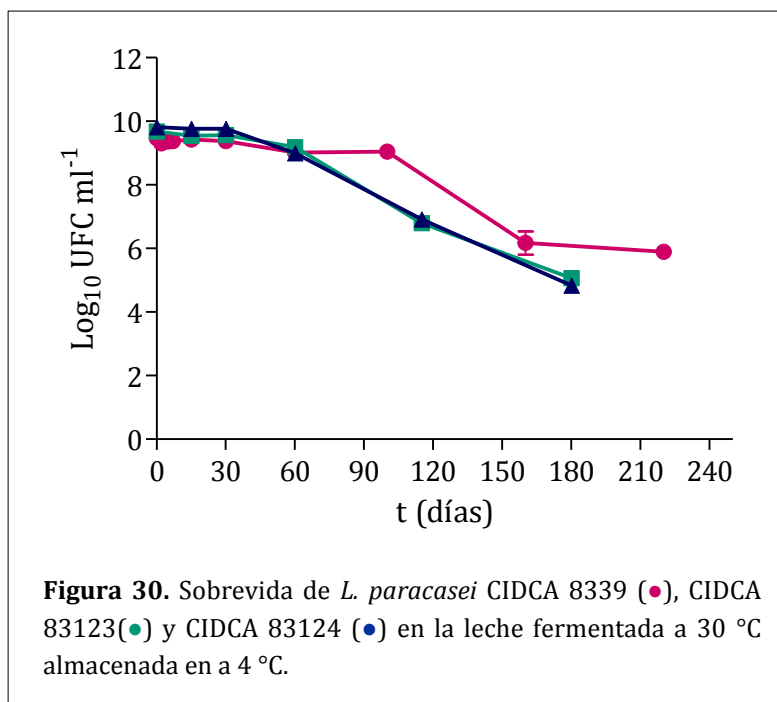
Los resultados encontrados en la literatura respecto a la capacidad de adhesión de bacterias productoras de polisacárido son variables. Muchos autores han demostrado que la presencia del EPS puede interferir en la interacción de las células epiteliales intestinales

(Mercan et al., 2015; Polak-Berecka et al., 2014; Ruas-Madiedo et al., 2006). Nikolic et al. (2012) comparó la adhesión de la cepa *L. paraplantarum* BGCG11 productora de EPS con la de su derivado no productor observando una adhesión significativamente mayor en el caso de la cepa no productora. Esto podría deberse a que el EPS puede estar recubriendo moléculas específicas de la superficie bacteriana o generando una interferencia electrostática lo que impediría la correcta interacción de las estructuras bacterianas con los receptores específicos de la célula epitelial. En ausencia de EPS las proteínas superficiales quedan más expuestas mejorando así la interacción con la célula eucariota (Dertli et al., 2015). Por el contrario, algunos estudios han demostrado que la presencia de EPS no interfiere sino que incluso puede mejorar la adhesión bacteriana (Fernández De Palencia et al., 2009; Ren et al., 2014; Ruas-Madiedo et al., 2006). Estas diferencias encontradas sugieren que el efecto del EPS en la interacción con la célula epitelial es variable y depende probablemente de las características fisicoquímicas y/o estructurales del polímero así como también de las características superficiales de la bacteria (Ruas-Madiedo et al., 2006).

En esta primera etapa se pudo demostrar que las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 son capaces de tolerar las condiciones gastrointestinales *in vitro* y de adherirse a células de epitelio gástrico e intestinal. Por otro lado, el hecho de que las propiedades probióticas estudiadas no se vean afectadas por la temperatura de crecimiento representa una ventaja para la industria alimenticia ya que permite la utilización de estas cepas productoras de EPS en una amplia gama de alimentos funcionales con distintas condiciones de manufactura.

2. Sobrevida de *L. paracasei* en la leche fermentada durante el almacenamiento a 4°C

Dado que el microorganismo probiótico debe ser capaz de mantener la viabilidad en el alimento durante el almacenamiento del producto, se procedió a evaluar la sobrevida de las cepas de *L. paracasei* en las leches fermentadas a 30 °C durante su almacenamiento en heladera a 4 °C. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 30. Como se puede observar, las tres cepas alcanzaron concentraciones de entre 10^9 – 10^{10} UFC/ml.



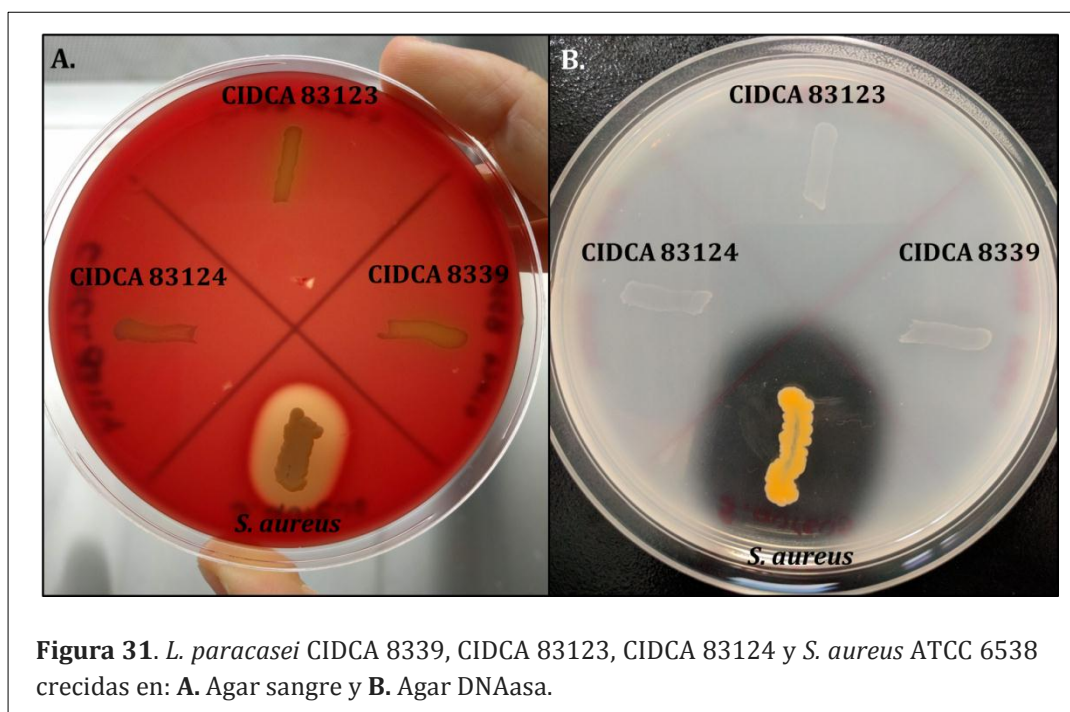
Si bien las tres cepas lograron sobrevivir el almacenamiento a 4 °C durante un tiempo prolongado, se destaca nuevamente una mayor tolerancia de la cepa CIDCA 8339, que mantiene constante el número de viables hasta los 3 meses y medio de almacenamiento. En el caso de *L. paracasei* CIDCA 83123 y CIDCA 83124 se observa una caída de 3 órdenes logarítmicos a los 4 meses de almacenamiento. Sin embargo, es importante resaltar que en las tres leches fermentadas el número de microorganismos viables se mantiene en valores cercanos 10^6 UFC/ml incluso después de 6-7 meses de almacenamiento, cumpliendo los requerimientos establecidos para los alimentos probióticos del CAA (10^6 – 10^9 UFC/gr).

3. Estudio *in vitro* de la seguridad de las cepas *L. paracasei* para su uso en alimentos

Las cepas CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 pertenecen al género *Lactobacillus* que, debido a su amplio uso aparentemente seguro como starters naturales o comerciales en alimentos ha adquirido el status GRAS. Además, estas cepas fueron aisladas de kefir cuyo consumo se remonta a miles de años atrás y se ha asociado con efectos beneficiosos para la salud humana. Sin embargo, dado que las propiedades beneficiosas y/o nocivas de un microorganismo son cepa dependiente, es fundamental evaluar la seguridad de cada cepa potencialmente probiótica que esté en estudio.

Al estudiar la actividad hemolítica de *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 mediante estrías en agar sangre (Figura 31.A), se observó que ninguna de las cepas presentaba halos de hemólisis (y hemólisis) lo que confirma la ausencia de citolisinas. En concordancia con nuestros resultados, la mayoría de las cepas del género *Lactobacillus*

reportadas en la literatura han demostrado tener ausencia de actividad hemolítica mientras que solo algunas cepas presentaron hemólisis parcial (α hemólisis) (Casarotti et al., 2017; Köll et al., 2010; Owusu-Kwarteng et al., 2015). La actividad DNAasa, otro factor de virulencia presente en algunos microorganismos, también fue evaluado en las cepas *L. paracasei*. Como se muestra en la Figura 31.B, ninguna de las cepas presentó halo translucido alrededor de la estría lo que indica ausencia de enzimas con actividad DNAasa. Similarmente, otros autores han reportado la ausencia de DNAasas en cepas de *L. plantarum* (Shekh et al., 2016) y *L. reuteri* (Singh et al., 2012). En general, se puede concluir que la ausencia de actividad hemolítica y DNAasa normalmente evidenciada dentro del género *Lactobacillus* es un primer indicio de la aplicación segura de este grupo de microorganismos en alimentos.



Por otro lado, la EFSA establece en su regulación que para cualquier nuevo microorganismo que quiera ser incorporado en un alimento se requiere demostrar previamente la ausencia de determinantes de resistencia adquirida frente a antibióticos de importancia clínica (EFSA FEEDAP Panel, 2012). Esto es de suma importancia ya que el consumo de microorganismos con resistencia adquirida a antibióticos podría implicar un riesgo potencial de transferencia de genes de resistencia a bacterias patógenas ya sea en la matriz alimentaria o a nivel del tracto gastrointestinal (Salveti y O'Toole, 2017). Si bien se han reportado en la literatura lactobacilos con resistencia a antibióticos (Gueimonde et al., 2013; Klare et al., 2007; Wong et al., 2015), el riesgo de transferencia se considera muy bajo para aquellos casos en que la resistencia es intrínseca o adquirida mediante una

mutación cromosómica (Gueimonde et al., 2013). Por este motivo la EFSA establece que en caso de encontrar resistencia frente a algún antibiótico se debe profundizar el estudio sobre la base genética para determinar si se trata de una resistencia adquirida con alto riesgo de transferencia. Si bien *L. paracasei* es una de las especies a las que se le ha otorgado el status GRAS por la FDA (*Food and Drug Administration*) y QPS por parte de la EFSA, muchos trabajos han reportado que cepas pertenecientes a una misma especie pueden presentar diferente respuesta frente a antimicrobianos (Owusu-Kwarteng et al., 2015; Rzepkowska et al., 2017).

L. paracasei CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 presentaron susceptibilidad a todos los antibióticos estudiados obteniéndose valores de CIM por debajo de los puntos de corte establecidos para el grupo *L. casei/L. paracasei* por la EFSA (Tabla 20).

Tabla 20. Concentración inhibitoria mínima de *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 frente a diferentes antibióticos. Valores de CIM menor o igual al punto de corte establecido para el grupo *L. casei/paracasei* indican susceptibilidad al antibiótico.

| Antibiótico | Puntos de corte de CIM <i>L. casei/paracasei</i> | Concentración inhibitoria mínima (mg/L) | | |
|----------------------|---|--|----------------|----------------|
| | | CIDCA 8339 | CIDCA 83123 | CIDCA 83124 |
| Ampicilina | 4 | 1 | 0,5 | 0,5 |
| Gentamicina | 32 | 8 | 0,5 | 0,5 |
| Kanamicina | 64 | 64 | 16 | 4 |
| Streptomicina | 64 | 32 | 16 | 4 |
| Eritromicina | 1 | 0,032 | 0,032 | 0,016 |
| Clindamicina | 1 | 0,063 | 0,032 | 0,032 |
| Tetraciclina | 4 | 0,5 | 0,125 | 0,25 |
| Cloranfenicol | 4 | 2 | 0,5 | 2 |

Resultados similares fueron obtenidos por Zhang et al. (2013) y Fei et al. (2018) que evidenciaron susceptibilidad de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LC-01 y *L. amylolyticus* L6 respectivamente frente a todos los antibióticos testeados. La cepa *L. paracasei* Lpc-37 que fue incluida en un starter comercial también mostró ausencia de resistencia a antibióticos de acuerdo al método estandarizado (Morovic et al., 2017).

Mediante estos estudios *in vitro* fue posible demostrar que las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 cumplen con los requisitos mínimos de seguridad establecidos por la EFSA y el CAA ya que no presentan actividad hemolítica ni actividad DNAasa y son susceptibles a todos los antibióticos estudiados. Estos resultados confirman el status GRAS de estas cepas pertenecientes a la especie *L. paracasei*.

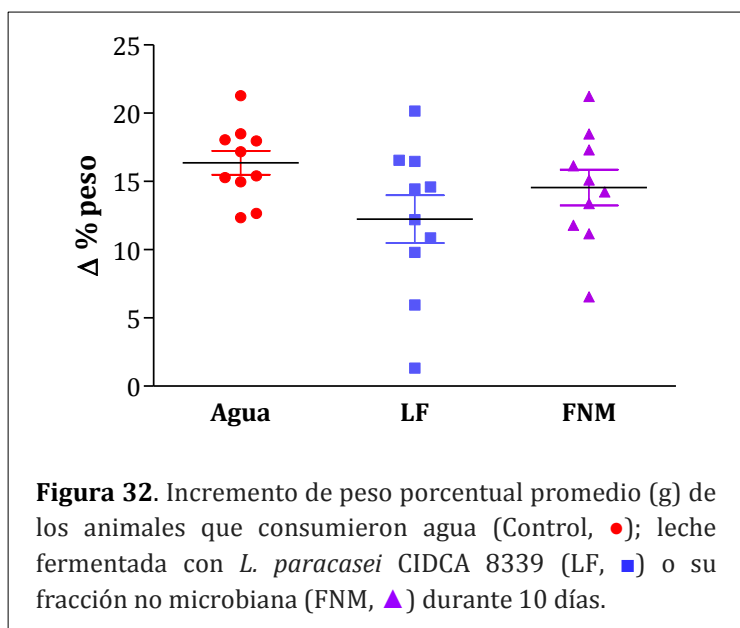
4. Evaluación *in vivo* de la inocuidad del consumo de la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 y su fracción no microbiana

Cuando se evalúa el potencial uso de una nueva cepa probiótica para el consumo humano, es importante no solo garantizar que la cepa es segura, tal como se demostró en la sección anterior, sino también determinar la inocuidad del alimento funcional en el que se incluye el microorganismo, el cual va a contener no solo al microorganismo en una matriz alimentaria sino también todos los metabolitos producidos por el mismo.

L. paracasei CIDCA 8339 presentó una mayor tolerancia a las condiciones gastrointestinales y mayor capacidad de adherirse a células epiteliales gástricas e intestinales que *L. paracasei* CIDCA 83123 y CIDCA 83124. Además, fue demostrado previamente que si bien las tres cepas tienen la capacidad de reducir la invasión de *Salmonella* a células intestinales en cultivo, *L. paracasei* CIDCA 8339 fue significativamente más eficiente en la protección contra el patógeno (Zavala et al., 2016). En cuanto a las ventajas desde el punto de vista tecnológico, esta cepa fue capaz de sobrevivir en la leche fermentada almacenada a 4°C durante más de 6 meses, lo que resulta atractivo para la industria ya que garantiza una adecuada cantidad de microorganismo probiótico viable durante el periodo de almacenamiento del producto. Por todo esto, se propone a *L. paracasei* CIDCA 8339 como la cepa con mejores características desde el punto de vista funcional y tecnológico y por ello se procedió a profundizar los estudios de seguridad de la misma evaluando la inocuidad de la leche fermentada obtenida con esta cepa.

De acuerdo con la EFSA y el CAA, es necesario que se realicen estudios de toxicidad por ingesta del microorganismo en un modelo murino para garantizar la inocuidad de la cepa (EFSA FEEDAP Panel, 2012; CAA, 2011) y por ello se evaluaron los posibles efectos nocivos producidos por el consumo de la leche fermentada (LF) con *L. paracasei* CIDCA 8339 o su fracción no microbiana (FNM). Los ratones consumieron *ad libitum* la LF o su FNM diluidas 1:10 en agua durante 10 días. El consumo diario de LF y FNM fue de 3-4 ml por ratón, semejante al consumo de agua registrado para el grupo control (3-6 ml por ratón). Considerando que la leche fermentada diluida 1:10 tiene una concentración de microorganismos viables de $\sim 3 \times 10^8$ UFC/ml se estimó que el consumo diario de *L. paracasei* CIDCA 8339 fue de 1×10^9 UFC/ratón.

El consumo de la LF con *L. paracasei* CIDCA 8339 o la FNM durante 10 días no dio lugar a cambios significativos en el incremento de peso promedio de los ratones en comparación con el grupo control (Figura 32). Tampoco se observaron cambios en el aspecto o el comportamiento de los ratones a lo largo del experimento, ni se evidenciaron signos de dolor o malestar. Además, el consumo de la LF o su FNM no generó cambios en la consistencia de la materia fecal.



Una vez transcurridos los 10 días se llevó a cabo el sacrificio de los ratones y la recolección de muestras. El hígado y el bazo fueron recolectados en condiciones de esterilidad para evaluar la translocación de *L. paracasei* CIDCA 8339 o de algún otro microorganismo proveniente del tracto gastrointestinal. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Translocación bacteriana a hígado y bazo en animales que consumieron agua (grupo control) y leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 (grupo LF).

| Evaluación de translocación | | | Agua | LF |
|-----------------------------|----------------|---------------------|------|------|
| Hígado | Agar Nutritivo | Directo | 0/12 | 0/12 |
| | | Con enriquecimiento | 1/5 | 1/5 |
| | MRS agar | Directo | Nd | 0/5 |
| | | Con enriquecimiento | Nd | 1/5 |
| Bazo | Agar Nutritivo | Directo | 0/7 | 0/7 |
| | MRS agar | Directo | 0/7 | 0/7 |

Nd: no determinado

Cuando se realizó la siembra directa de las muestras de hígado y bazo en MRS o agar nutritivo no se observó presencia de colonias en las placas. Sin embargo, luego del enriquecimiento se evidenció la presencia de colonias en dos muestras de hígado, una correspondiente al grupo Control y otra correspondiente al grupo que consumió la LF con *L. paracasei* CIDCA 8339 lo que indicaría que se trata de un resultado aleatorio y que podría tratarse de una contaminación durante la toma de muestra más que de una bacteria

que translocó a nivel intestinal. Además, es importante remarcar que las colonias no pertenecían a la cepa *L. paracasei* CIDCA 8339 ya que ninguna poseía el aspecto macroscópico ni microscópico de esta cepa. Además, tampoco se observó desarrollo en agar MacConkey lo que indica ausencia de enterobacterias en hígado y bazo. La ausencia de translocación de BAL, enterobacterias y en general bacterias heterótrofas totales a hígado y bazo indica que el consumo la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 no produjo daño en la mucosa intestinal ni generó un aumento en la permeabilidad del epitelio intestinal.

Por otro lado, se realizó el análisis histopatológico de hígado e íleon observándose que las características morfológicas de los tejidos de los ratones que consumieron LF o FNM eran similares a las del grupo control, es decir, que el consumo del microorganismo en la leche fermentada o de los metabolitos producidos durante la fermentación no dieron lugar a alteraciones histológicas (Figura 33 A-F). En el caso del íleon, no se vio afectada la integridad del epitelio de la mucosa y no se observó infiltrado de células inmunes (neutrófilos o monocitos/macrófagos), edema o congestión a nivel de la lámina propia para ninguno de los grupos de animales. Tampoco se evidenciaron cambios en el espesor de la mucosa que podrían estar indicado un efecto adverso de la LF o la FNM sobre la misma.

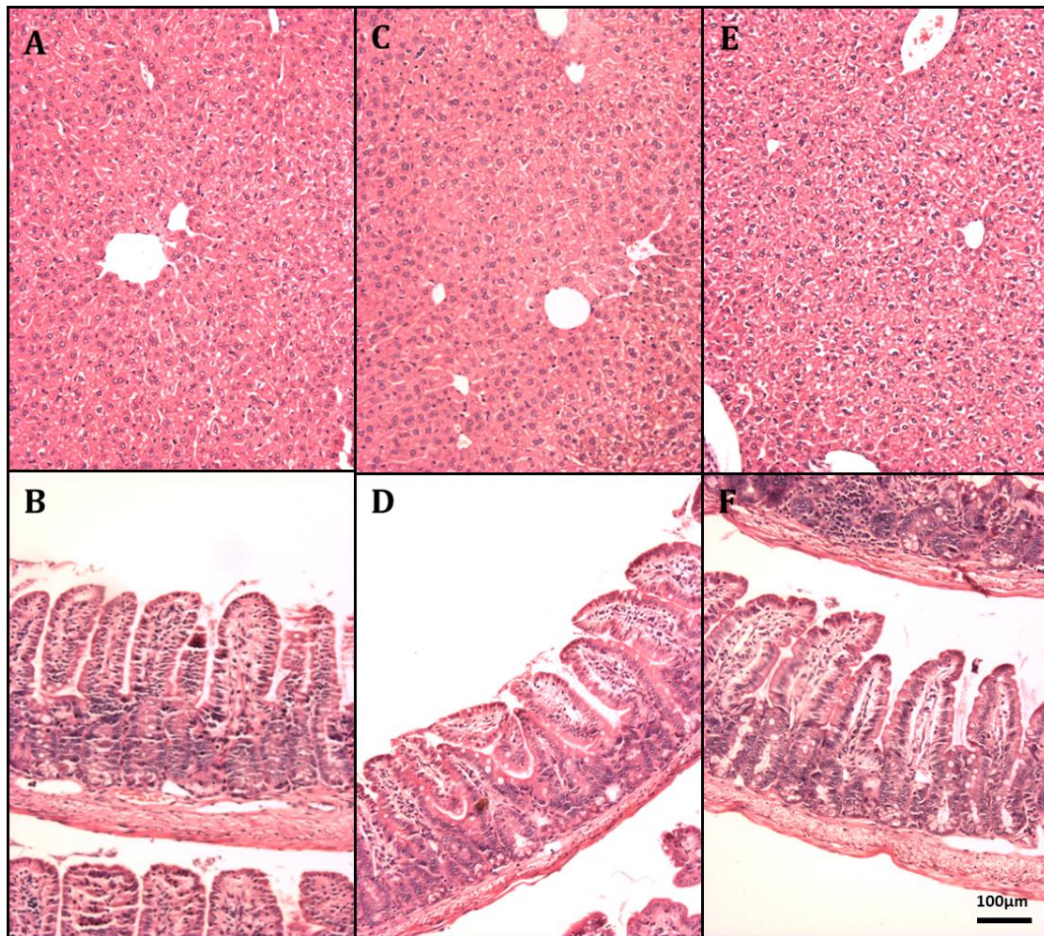
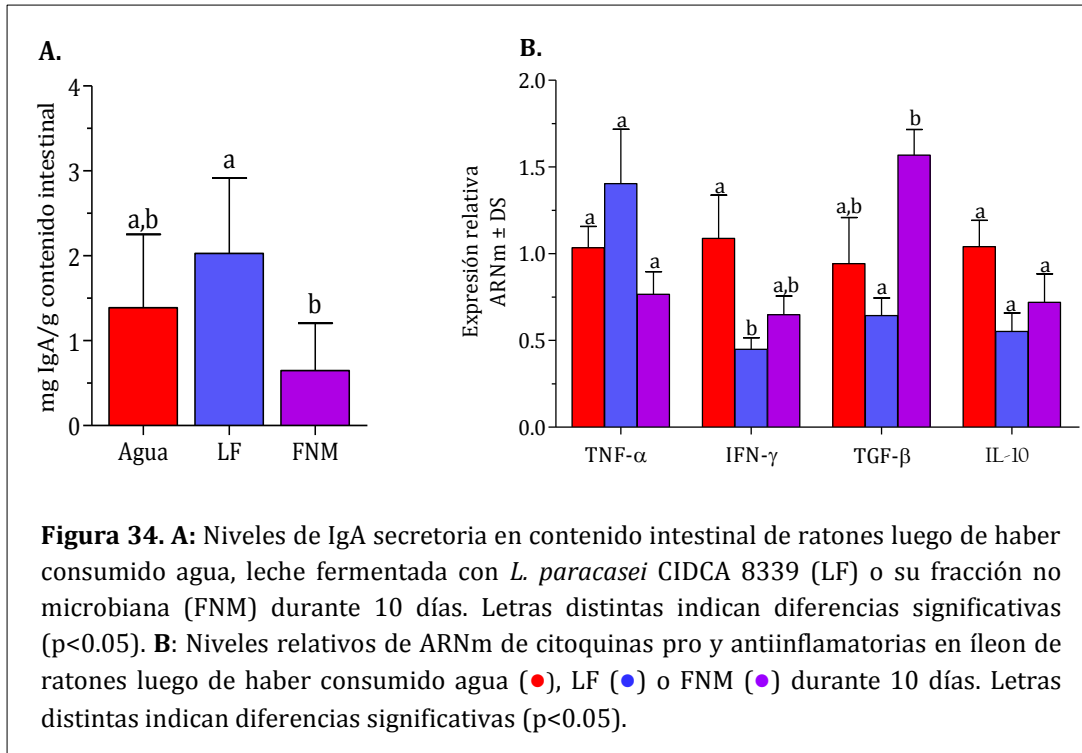


Figura 33. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina de **hígado** (arriba) e **íleon** (abajo) de los ratones luego de haber consumido agua (A y B: Control), leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 (C y D: LF) o fracción no microbiana de la leche fermentada (E y F: FNM) durante diez días. Aumento objetivo: 10X.

Uno de los efectos beneficiosos asociados al consumo de probióticos es su capacidad de modular la respuesta inmune del hospedador. Cuando se estudia la seguridad de una cepa es importante evaluar que no se produzcan cambios adversos sobre el sistema inmune (Mäkeläinen et al., 2003), tales como la activación exacerbada que podría generar un estado inflamatorio a nivel intestinal. Por este motivo, se determinó el efecto del consumo de la LF con *L. paracasei* CIDCA 8339 y su FNM sobre los niveles de citoquinas pro (TNF- α e INF- γ) y antiinflamatorias (TGF- β e IL-10) en íleon y los niveles IgA en contenido intestinal. En la Figura 34.A se observa que el consumo de la LF o su FNM durante 10 días no dio lugar a cambios en los niveles de IgA secretoria en contenido intestinal.



La IgA secretoria es la inmunoglobulina más abundante a nivel de la superficie de mucosas, cumpliendo un rol protector fundamental al actuar como anticuerpo neutralizante. Esta inmunoglobulina reconoce y se asocia a estructuras de la superficie de patógenos, previniendo así la adhesión bacteriana a células epiteliales y su translocación, y favoreciendo su eliminación mediante movimientos peristálticos (Mantis et al., 2011). Además, la IgA secretoria es capaz de neutralizar toxinas microbianas e inhibir la absorción de antígenos y alérgenos. También se ha demostrado que la IgA secretoria favorece el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Mathias et al., 2014). Por todo esto, el estímulo en la producción de IgA a nivel de la mucosa intestinal podría ser un efecto beneficioso para la salud del consumidor. Sin embargo, el efecto de bacterias probióticas sobre la IgA secretoria reportada en la literatura es variable. Por ejemplo, el consumo de *L. rhamnosus*, *L. paracasei* o la combinación *L. rhamnosus*/*B. breve* no modificó significativamente los niveles de IgA secretoria en humanos. Sin embargo, el consumo de *B. breve* CNCM I-4035 durante 30 días produjo un aumento significativo de la inmunoglobulina (Plaza-Díaz et al., 2013).


Las citoquinas comprenden un grupo heterogéneo de moléculas de bajo peso molecular que juegan un rol central en la señalización celular y regulación de la respuesta inmunitaria. Son secretadas no sólo por células leucocitarias sino también por células epiteliales, endoteliales y parenquimatosas pertenecientes a distintos órganos. Las funciones que cumplen las citoquinas suelen ser diversas, algunas son capaces de

favorecer el desarrollo de un proceso inflamatorio (proinflamatorias) mientras que otras limitan la respuesta inmune (antiinflamatorias), promueven la diferenciación celular (factores de crecimiento) o regulan el tránsito leucocitario (quimioquinas). Así, la comparación del perfil de citoquinas producidas en íleon en animales que recibieron la LF o su FNM con el grupo control constituye otro parámetro que permite determinar la influencia del microorganismo o sus metabolitos en el sistema inmune del consumidor. Los niveles relativos de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , INF- γ) y antiinflamatorias (IL-10 y TGF- β) en íleon luego de 10 días de consumo con LF o FNM se muestran en la Figura 34.B. El consumo de la leche fermentada, que contiene la cepa *L. paracasei* CIDCA 8339 y todos los metabolitos producidos durante la fermentación, no modificó significativamente los niveles de TNF- α , TGF- β e IL-10 en comparación con el grupo control. Sin embargo, sí se observó una disminución significativa en los niveles de INF- γ ($p < 0.05$). La reducción en la expresión de esta citoquina proinflamatoria podría ser beneficiosa en situaciones patológicas de inflamación crónica a nivel intestinal tales como la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn. Por otro lado, el consumo de la FNM no modificó los niveles de ninguna de las citoquinas analizadas. La diferencia observada en el efecto sobre INF- γ , podría estar indicando que la reducción en la expresión de esta citoquina está mediada por la bacteria y no por los metabolitos producidos durante la fermentación. Estos resultados obtenidos para el perfil de citoquinas en íleon, junto con los cortes histológicos de íleon e hígado indican que el consumo de la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 o su FNM no producen un daño a nivel de tracto gastrointestinal. Además, es importante destacar que el consumo del microorganismo y sus metabolitos de fermentación no generó a un efecto adverso en el sistema inmune del hospedador ya que no dio lugar a una respuesta inflamatoria exacerbada.

Los resultados obtenidos en este modelo de toxicidad *in vivo* confirman el status GRAS de *L. paracasei* CIDCA 8339, demostrando que es segura y adecuada para el consumo y que podría ser utilizada para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales.

CONCLUSIONES

- *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 presentaron buena tolerancia a las condiciones gastrointestinales. El EPS cumple un rol protector importante, sin embargo, los cambios en la estructura y la cantidad del mismo inducidos por la temperatura no afectan la resistencia a las condiciones adversas.
- Las tres cepas fueron capaces de adherirse a células de epitelio gástrico e intestinal lo que garantiza un mayor tiempo de residencia a lo largo del tracto digestivo aumentando la interacción de la BAL con el hospedador. Los cambios en el EPS con la temperatura tampoco modificaron la capacidad de adhesión de los microorganismos.
- Si bien las tres cepas estudiadas presentan buenas propiedades para ser utilizadas como probióticos, *L. paracasei* CIDCA 8339 tiene mejor tolerancia al pasaje gastrointestinal y mayor capacidad de adhesión a células epiteliales gástricas e intestinales.
- La concentración de *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 en las leches fermentadas a 30 °C alcanzó niveles entre 10^9 - 10^{10} UFC/ml y, durante 5 meses de almacenamiento a 4 °C, mantuvo una concentración por encima de 10^6 UFC/ml cumpliendo los requerimientos establecidos para la aplicación de probióticos en alimentos.
- Las tres cepas presentaron ausencia de factores de virulencia, incluyendo hemolisinas y DNAasa, y ausencia de resistencia a antibióticos de importancia clínica lo que indica que son seguras para la aplicación en alimentos para consumo humano.
- La ingesta de leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 y su FNM no generó efectos adversos en los ratones demostrando su inocuidad y alentando su utilización para la aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales.

A microscopic image of intestinal tissue, likely the colon, showing the mucosal lining and underlying muscle layers. The image is overlaid with a semi-transparent purple color. At the top, there is a solid purple rectangular bar.

Leches fermentadas con *Lactobacillus paracasei*: estudio de la capacidad moduladora de la respuesta inflamatoria en el tracto gastrointestinal

CAPÍTULO 4

INTRODUCCIÓN

El tracto gastrointestinal (TGI) constituye un órgano único que está habitado por una gran variedad de microorganismos comensales y que, al mismo tiempo, se expone diariamente a una gran cantidad de antígenos extraños provenientes de la dieta. Así, el TGI debe no sólo llevar a cabo la digestión de alimentos y la absorción de nutrientes, sino también cumplir la importante tarea de mantener la homeostasis intestinal. El sistema inmune del TGI debe ser capaz de mantener una tolerancia frente a antígenos no dañinos de los alimentos y frente a la microbiota comensal pero debe montar una respuesta inmune adecuada para la protección frente a patógenos (Ahluwalia et al., 2017). Este estado de tolerancia y equilibrio está mediado por componentes del sistema inmune que incluyen la barrera epitelial, células inmunes presentes en la lámina propia y los tejidos linfoides asociados al tracto gastrointestinal (GALT) tales como placas de Peyer, nódulos linfáticos mesentéricos y folículos linfoides aislados que en conjunto forman el órgano linfático más extenso de todo el organismo (Flach y Diefenbach, 2015; Mowat, 2003). Las células del epitelio cumplen dos roles primordiales para mantener una relación saludable entre la microbiota u otros factores luminales y el hospedador. Por un lado, se encargan de formar una barrera física y bioquímica que protege a la mucosa de agentes extraños y separa el contenido luminal de las células inmunes presentes en la lámina propia (Okumura y Takeda, 2017). El epitelio constituye una barrera física de permeabilidad selectiva que permite la absorción de nutrientes pero a la vez evita el pasaje de antígenos, toxinas y microorganismos. Esta función de barrera está dada principalmente por las uniones estrechas que cierran el espacio intercelular al unir células epiteliales adyacentes. La expresión de las proteínas que conforman estas uniones está altamente regulada y es fundamental para mantener la integridad del epitelio (Ahluwalia et al., 2017). Además, células epiteliales especializadas se encargan de la producción de mucus (células de Goblet) y péptidos antimicrobianos (células de Paneth,) que reducen la interacción directa de los antígenos y microorganismos con el hospedador (Peterson y Artis, 2014). Así, defectos de la integridad de la barrera y la producción de la capa de mucus pueden dar lugar a la translocación de componentes bacterianos hacia la lámina propia, generándose un estado de inflamación asociado a distintas patologías como las enfermedades inflamatorias intestinales, el síndrome de colon irritable y alergias frente a componentes alimentarios (Scaldaferri et al., 2012).

Más aún, las células epiteliales no cumplen simplemente un rol pasivo de barrera sino que también participan como mediadores activos de la respuesta inmune. Éstas reconocen mediante receptores específicos a los microorganismos y sus metabolitos y producen en consecuencia citoquinas y quimioquinas activando la respuesta T celular, contribuyendo a

la producción de IgA antígeno específica y a la tolerancia oral frente antígenos alimenticios (Okumura y Takeda, 2017). Así, el epitelio actúa como un nexo entre los microorganismos del tracto gastrointestinal y las células inmunes del hospedador cumpliendo un rol fundamental en la homeostasis intestinal.

La tolerancia involucra un sistema complejo mediado por la interacción de múltiples componentes tales como la dieta, la microbiota y los mediadores de la respuesta inmune. Por este motivo, en determinadas condiciones que involucran no sólo una predisposición genética sino también factores ambientales (dieta, estrés, medicamentos) pueden producirse desbalances en la microbiota y/o en la función de la barrera epitelial que dan lugar a una activación desregulada de la respuesta inflamatoria que se asocia al desarrollo de distintas patologías del TGI (Ahluwalia et al., 2017; Okumura y Takeda, 2017).

Enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal

Gastritis

La gastritis, definida como cualquier estado inflamatorio de la mucosa gástrica evidenciado mediante estudios histológicos (Hunt et al., 2015; Rugge et al., 2011), es un desorden gastrointestinal con una alta incidencia que constituye un importante problema de salud a nivel mundial. Si bien algunas de las inflamaciones de la mucosa gástrica son agudas y autolimitadas sin generar alteraciones anatómicas permanentes, existen muchos casos de gastritis crónica, que si no son tratados adecuadamente, pueden derivar en complicaciones mucho más severas como formación de úlceras que eventualmente pueden perforarse o progresar a cáncer de estómago. Las úlceras gástricas afectan anualmente a aproximadamente 4 millones de personas a nivel mundial (Thorsen et al., 2013). La sintomatología que se presenta es similar a la del reflujo gastroesofágico, caracterizándose por dolor en el epigastrio, acidez estomacal y dolor en la espalda o en el hombro izquierdo; además, los pacientes con úlceras gástricas suelen presentar dolor abdominal postprandial, náuseas, vómitos y pérdida de peso (Kempenich y Sirinek, 2018). Esta patología es una enfermedad heterogénea de etiología multifactorial que se origina como consecuencia de un desbalance entre factores protectores (flujo sanguíneo, integridad de la barrera epitelial y secreción de mucus) y factores agresivos (producción de especies reactivas de oxígeno, secreción de ácido clorhídrico y pepsina) a nivel de la mucosa gástrica (Hunt et al., 2015). Existen una gran variedad de agentes nocivos que pueden ser responsables de este desbalance dando lugar a la inflamación del tejido y/o daño en la mucosa. Entre ellos se destacan el consumo excesivo de alcohol y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), el tabaco, el estrés y la infección con *Helicobacter pylori* (Kempenich y Sirinek, 2018; Marcial et al., 2013; Santin et al., 2013). La

infección con *H. pylori* es, por mucho, la principal causa de gastritis en todo el mundo (Lin et al., 2011). En ella, se activa una respuesta inflamatoria que no logra erradicar al microorganismo y en consecuencia, si no es tratada adecuadamente, el microorganismo persiste de por vida generando un estado inflamatorio continuo que eventualmente termina produciendo úlceras gástricas y/o cáncer (Hunt et al., 2015).

Actualmente, la estrategia terapéutica que existe para el tratamiento de úlceras gástricas incluye el uso de inhibidores de la bomba de protones y drogas antisecretoras (antagonistas del receptor de histamina tipo 2) para reducir la producción de HCl a nivel gástrico y el uso de antibióticos en caso de infección con *Helicobacter pylori*. A pesar de ser efectiva, los largos tratamientos con estas drogas están asociados a diversos efectos adversos tales como diarrea, náuseas y distensión abdominal y a una alta recurrencia de las úlceras gástricas. Además, recientemente se ha evidenciado un incremento en la resistencia a antibióticos en cepas de *H. pylori* que dificulta aún más la erradicación del patógeno (Kempenich y Sirinek, 2018; Khoder et al., 2016; Patel et al., 2014). Como consecuencia, en los últimos años ha aumentado el interés en el desarrollo de estrategias alternativas o complementarias para la prevenir, aliviar los síntomas y/o reducir el daño de la mucosa asociado a la gastritis y las úlceras gástricas.

Enfermedades inflamatorias intestinales

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) incluyen un grupo de patologías diversas caracterizadas por la inflamación de la mucosa del intestino delgado y/o el colon. La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son las formas más frecuentes de EII y están caracterizadas por una inflamación crónica con cuadros clínicos severos (Alagón Fernández Del Campo et al., 2019; Celiberto et al., 2015). Si bien las EII afectan a personas de todas las edades, la mayor incidencia se presenta en individuos jóvenes de entre 15 y 30 años y en ancianos (Hanauer, 2006). En la colitis ulcerosa se produce una reacción inflamatoria que comienza desde el recto y se extiende hacia el colon, pero no afecta el intestino delgado. Está caracterizada por formación de abscesos en las criptas e infiltración de neutrófilos, eosinófilos y células plasmáticas. La enfermedad tiene períodos de remisión y recaídas que se producen en la misma región previamente afectada. Los síntomas más comunes incluyen diarrea, hemorragia rectal, tenesmo, secreción de mucus y dolor abdominal. A diferencia de la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn puede afectar cualquier segmento del intestino delgado o grueso observándose regiones inflamadas que se intercalan con regiones sanas (Figura 35). Las zonas más frecuentemente afectadas corresponden al íleon terminal y el colon. El cuadro clínico se

presenta con diarrea, fiebre, dolor abdominal recurrente y pérdida de peso (Celiberto et al., 2015; Uchiyama et al., 2019).

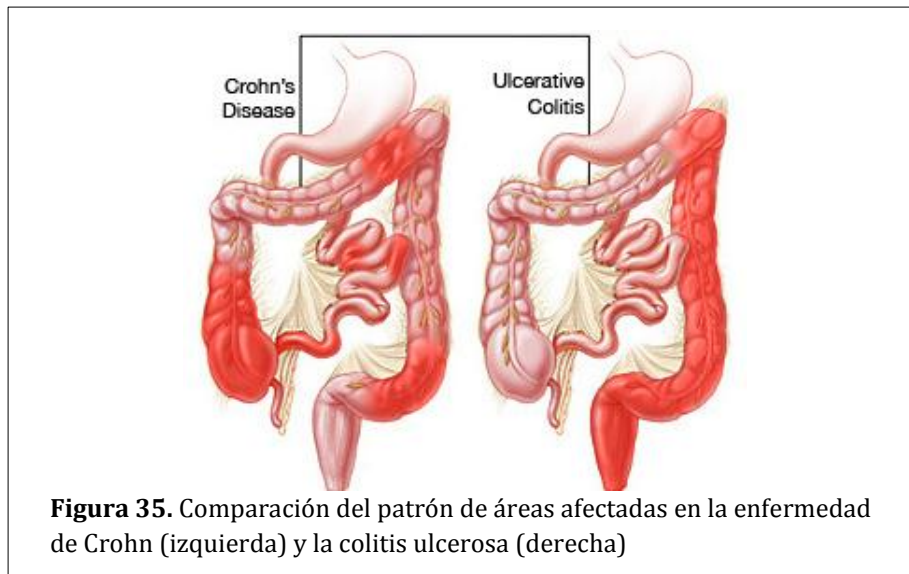


Figura 35. Comparación del patrón de áreas afectadas en la enfermedad de Crohn (izquierda) y la colitis ulcerosa (derecha)

Los mecanismos que conducen al desarrollo de las EII no se conocen con exactitud hasta el momento, sin embargo, se cree que la patogénesis de estas enfermedades podría ser multifactorial involucrando factores genéticos predisponentes del paciente con factores ambientales que conducen a una activación continua y desregulada de la respuesta inmune frente a la microbiota intestinal (Alagón Fernández Del Campo et al., 2019; Uchiyama et al., 2019). Varios estudios han demostrado una estrecha relación entre el desbalance en la población microbiana intestinal y el desarrollo de EII (Alagón Fernández Del Campo et al., 2019). El trasplante de microbiota de pacientes con EII a ratones germ-free dio lugar al aumento de citoquinas proinflamatorias en la mucosa intestinal sin observarse dicho efecto cuando fueron transplatados con microbiota de individuos sanos (Nagao-Kitamoto et al., 2016), confirmando de este modo la relación entre la disbiosis y esta patología. Para mantener la homeostasis intestinal, GALT debe ser capaz de reconocer y eliminar específicamente los microorganismos patógenos y mantener una tolerancia frente a la microbiota intestinal, ésta última mediada por la acción de células Treg. Sin embargo, un desbalance entre células Treg y células T efectoras puede conducir a la inflamación a nivel intestinal (De Oliveira Carvalho et al., 2017). Así, la pérdida de la tolerancia frente a la microbiota conduce a la activación de macrófagos y células T con producción de citoquinas y quimioquinas seguido del reclutamiento de neutrófilos, eosinófilos y monocitos. Estas células efectoras atraviesan la mucosa y forman abscesos en las criptas afectando la función normal de la barrera epitelial, favoreciendo el ingreso de microorganismos a la mucosa y perpetuando el proceso inflamatorio. Además, la

inflamación de la mucosa se ve potenciada por una reducción de las citoquinas antiinflamatorias IL-10 y TGF- β , contribuyendo a la pérdida de tolerancia frente a antígenos comunes (Celiberto et al., 2015).

Las EII son consideradas uno de los principales problemas de salud de la sociedad moderna. En este sentido, la elección de un tratamiento apropiado es fundamental para mejorar la calidad de vida de quienes la padecen (Celiberto et al., 2015). El tratamiento medicinal se elige de acuerdo a la severidad de la enfermedad y al riesgo del paciente con el objetivo de controlar la inflamación y la sintomatología asociada (Varma et al., 2019). El uso de antiinflamatorios como el ácido 5-aminosalicílico y los corticosteroides (prednisona, hidrocortisona, budenisonida) han demostrado ser efectivos para reducir la inflamación rápidamente aliviando la sintomatología asociada. Sin embargo, el uso prolongado de estas drogas puede derivar a otras enfermedades como hipertensión, diabetes y osteoporosis. Además, el 20% de los pacientes tratados con estas drogas no responde adecuadamente, haciendo necesario el uso de inmunosupresores como azatioprina, metotrexato y ciclosporina. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas para aliviar la inflamación y la sintomatología asociada a las EII, surgiendo la posibilidad del uso de microorganismos probióticos que sean capaces de modular la microbiota intestinal y/o modular la respuesta inflamatoria del hospedador (Celiberto et al., 2015).

Uso de probióticos en la prevención y/o reducción de la inflamación gastrointestinal

Existen numerosos estudios incluyendo ensayos *in vitro*, en modelos animales y en voluntarios sanos y enfermos que han demostrado que los microorganismos probióticos podrían ser utilizados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del TGI (Khoder et al., 2016). La actividad antiinflamatoria de varias cepas de *Lactobacillus* a nivel del epitelio gástrico ha sido evidenciada mediante ensayos *in vitro* (Takeda et al., 2017; Panpetch et al., 2016). Asimismo, numerosos estudios *in vivo* han demostrado que la administración de cepas probióticas a ratones con gastritis ya sea inducida por *Helicobacter* sp. o por agentes químicos da lugar a una modulación de la respuesta inflamatoria y a una reducción en la formación de lesiones y úlceras en la mucosa gástrica (Johnson-Henry et al., 2004; Marcial et al., 2012; Peña et al., 2005; Ushiyama et al., 2003). Similarmente, el efecto antiinflamatorio de varias cepas probióticas ha sido evidenciado tanto en modelos *in vitro* con células epiteliales intestinales como en modelos murinos de colitis inducida con DSS (Dextran sulfato de sodio) o TNBS (Acido 2,4,6-Trinitrobenzenosulfónico) (Plaza-Díaz et al., 2017).

Los mecanismos por los cuales un probiótico es capaz de aliviar la inflamación gástrica y/o intestinal son variados e incluyen inhibición de microorganismos patógenos por la liberación de sustancias antimicrobianas como bacteriocinas (Kim et al., 2003) o ácidos orgánicos (Lin et al., 2009), fortalecimiento de la barrera epitelial, modulación de la microbiota intestinal y la modulación de la respuesta inmune (Celiberto et al., 2015; De Oliveira Carvalho et al., 2017; Espinoza et al., 2018; Orel y Trop, 2014).

Los probióticos, ya sea por acción directa de la bacteria o sus metabolitos, son capaces de modular la respuesta inmune del hospedador tanto a nivel local como sistémico. El efecto sobre el sistema inmune puede ser diferente dependiendo de la cepa y puede involucrar múltiples mecanismos. Algunas cepas probióticas pueden favorecer la maduración y sobrevida de células dendríticas intestinales que juegan un rol fundamental en la presentación de antígenos y la regulación de la respuesta inmune (Prisciandaro et al., 2009). La interacción de la bacteria benéfica con las células dendríticas puede favorecer el desarrollo de células T regulatorias y células B productoras de IgA (De Oliveira Carvalho et al., 2017). Generalmente, el efecto del probiótico sobre el sistema inmune está dado por la regulación en el balance de citoquinas pro y antiinflamatorias (Blum et al., 2002), generándose normalmente una inhibición de la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-8, IL-12, TNF- α , INF- γ) o una inducción de la expresión de citoquinas antiinflamatorias (IL-1 β y TGF- β) y contribuyendo así a reducir el daño generado por la inflamación en la mucosa. Debe considerarse además que los efectos beneficiosos sobre la salud intestinal asociados al consumo de probióticos pueden ser ejercidos en forma directa por el probiótico pero también pueden deberse a los cambios en la microbiota inducidos por el mismo. Estos cambios pueden dar lugar a un aumento en la producción de AGCC que ejercen un rol fundamental en la protección de la mucosa intestinal (Wasilewski et al., 2015).

Mecanismos celulares involucrados en la modulación de la inflamación

Los mecanismos celulares por los cuales un probiótico o sus metabolitos pueden modular la respuesta inflamatoria son diversos y pueden involucrar distintas vías de señalización celular.

Una de las vías de mayor implicancia es la mediada por el **factor nuclear kappa-B** (NF- κ B), un factor de transcripción que se encuentra presente en casi todas las células de los mamíferos. La señalización mediada por NF κ B cumple un rol central en la coordinación de la respuesta inmune innata y adaptativa. Esta vía fue descrita hace más de 30 años y se ha evidenciado su relevancia no sólo en la activación de la respuesta inflamatoria sino también en la regulación de otros procesos celulares como crecimiento, apoptosis y carcinogénesis. La gran diversidad de mecanismos celulares regulados por la activación

de esta vía que puede ser inducida por distintos factores (estrés, humo de cigarrillo, virus, bacterias, estímulos inflamatorios, radicales libres, carcinógenos y endotoxinas) se debe probablemente a que regula la expresión de aproximadamente 400 genes diferentes (Serasanambati y Chilakapati, 2016).

El factor de transcripción NF- κ B está formado por una familia de 5 proteínas que incluyen Rel A (p65), Rel B, c-Rel, p50 y p52. Estas proteínas pueden formar diferentes homodímeros y heterodímeros que en condiciones basales se encuentran inactivos en el citoplasma debido a la unión de proteínas inhibitorias I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , p105 o p100. La activación de NF κ B es controlada por el complejo I κ B kinasa (IKK) que consiste en dos subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) y una subunidad reguladora NEMO. Cuando un estímulo es reconocido por su receptor específico en la célula, el complejo IKK es fosforilado, se activa y fosforila al inhibidor I κ B en residuos específicos de serina, lo que induce su poliubiquitinación y consecuente degradación en el proteosoma. De esa manera, el dímero NF κ B queda libre en el citoplasma y puede ingresar al núcleo donde activará la transcripción de genes específicos (Figura 36) (Jost y Ruland, 2007; Pasparakis, 2009).

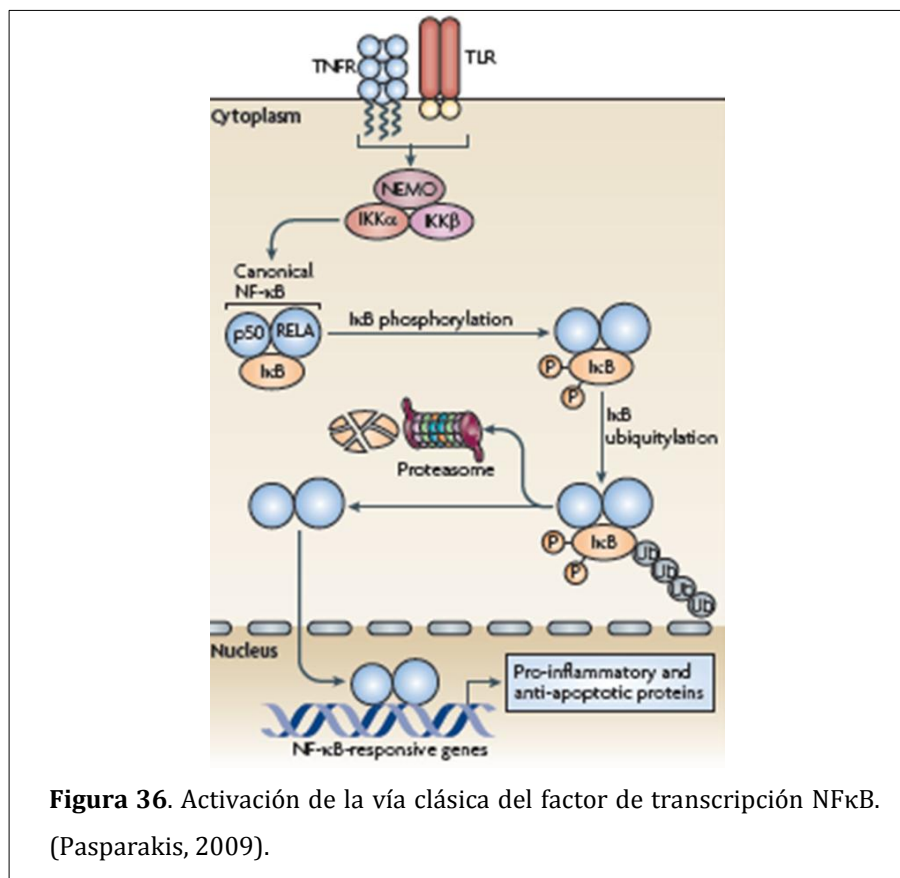


Figura 36. Activación de la vía clásica del factor de transcripción NF κ B. (Pasparakis, 2009).

La activación de la vía clásica de NF κ B puede estar dada por diferentes estímulos: citoquinas proinflamatorias (IL1 β , TNF- α), patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (LPS, flagelina) o la unión de ligandos a receptores y correceptores específicos en células T y B (Pasparakis, 2009). Como consecuencia de la activación de esta vía se induce la expresión de genes proinflamatorios como citoquinas, quimoquinas, moléculas de adhesión y enzimas o moléculas con actividad microbicida; todas fundamentales para montar la respuesta inmune apropiada (Jost y Ruland, 2007). De esa manera, el NF κ B es uno de los factores centrales que media las respuestas inflamatorias, siendo necesario para la activación transcripcional de muchos efectores pro-inflamatorios, incluyendo CCL20, IL-8, TNF- α , IL-6, Cox2, iNOS. Así, la modulación de esta vía constituye uno de los principales mecanismos evidenciados en la inhibición de la expresión de citoquinas proinflamatorias mediado por bacterias probióticas o sus metabolitos (Orel y Trop, 2014).

Otra vía que podría estar involucrada en el efecto modulador de los probióticos es la activación de **HIF** (Hypoxia-inducible factor), un factor de transcripción que normalmente se activa en condiciones de hipoxia favoreciendo la expresión de genes que regulan el metabolismo y permiten la adaptación de la célula frente a bajas concentraciones de oxígeno. HIF es un heterodímero conformado por una subunidad α , cuya estabilidad es dependiente de oxígeno, y una subunidad β que se expresan en forma constitutiva. Existen dos isoformas mayoritarias de HIF, HIF 1 y HIF 2, que contienen la subunidad HIF1 β asociada a la subunidad HIF1 α o HIF2 α respectivamente. En condiciones normales, cuando las concentraciones de oxígeno son suficientes (normoxia), las subunidades de HIF α son sintetizadas pero rápidamente son hidroxiladas por acción de las enzimas prolihidroxilasas (PHD) y una asparaginhidroxilasa conocida con el nombre de Factor inhibidor de HIF (FIH), las cuales son dependientes de O₂. La subunidad HIF α hidroxilada es ubiquitinada por la E₃ ubiquitin ligasa conocida como von Hippel–Lindau disease tumour suppressor (pVHL) y finalmente degradada en el proteosoma. En condiciones de hipoxia, las hidroxilasas están inhibidas ya que el poco oxígeno disponible está siendo utilizado a nivel mitocondrial. Esta inhibición lleva a la estabilización de HIF α , que ingresa al núcleo, forma el heterodímero activo con HIF β y se une a las secuencias consenso HRE (hypoxia-response element) del ADN activando la expresión de genes necesarios para la adaptación a la hipoxia (Figura 37). Las hidroxilasas son enzimas dependientes de O₂, Fe⁺² y α cetoglutarato. Es por ello que además de la hipoxia existen otros factores que pueden modificar la activación de HIF tales como algunos productos del metabolismo celular, incluyendo α -cetoglutarato, 2-hidroxiglutarato, succinato y especies reactivas de oxígeno (ROS). (Eltzschig et al., 2014; Taylor y Colgan, 2017). Si bien la principal función de HIF es la adaptación de la célula frente a condiciones de hipoxia, este factor ha sido identificado

como un elemento clave en la regulación de la inflamación y la respuesta inmune, pero debe tenerse en cuenta que el efecto del mismo *in vivo* puede llegar a ser pro o antiinflamatorio dependiendo del contexto. Sin embargo, ha sido ampliamente demostrado que la activación de HIF a nivel intestinal presenta un efecto antiinflamatorio. (Scholz y Taylor, 2013).

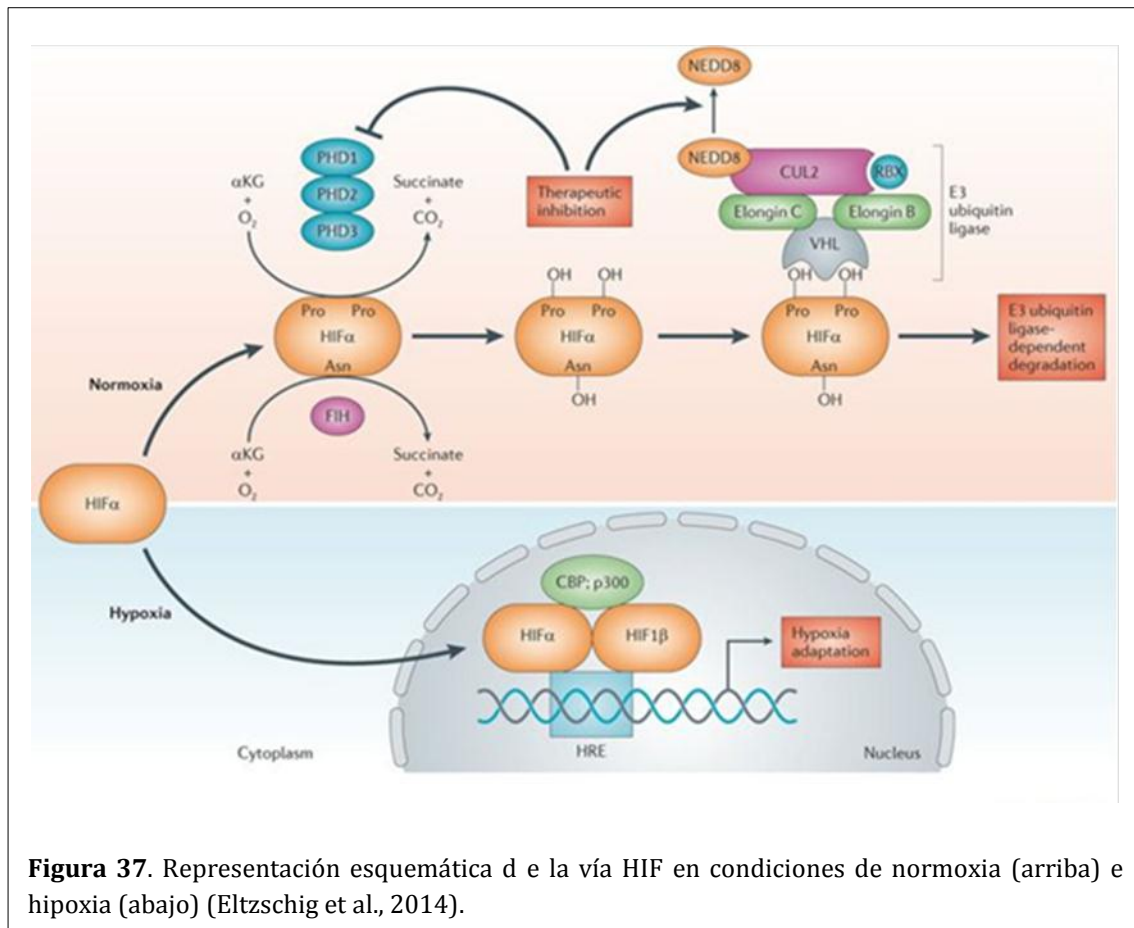


Figura 37. Representación esquemática de la vía HIF en condiciones de normoxia (arriba) e hipoxia (abajo) (Eltzschig et al., 2014).

La **producción de ROS**, por otro lado, constituye un evento clave en la evolución de muchas enfermedades inflamatorias gastrointestinales. En el TGI, la pérdida de la integridad de la barrera epitelial da lugar a una activación de la respuesta inmune innata con un infiltrado de neutrófilos acompañada de la producción de ROS y liberación de enzimas granulares, mediadores vasoactivos y proinflamatorios como respuesta protectora frente al daño o la infección (Mittal et al., 2014). Generalmente, se considera que la liberación de especies reactivas de oxígeno en el tejido favorece la inflamación y el daño tisular (Marcinkiewicz et al., 2007). Sin embargo, se debe tener en cuenta que esto es así cuando la producción es descontrolada y persistente (Aviello y Knaus, 2017). En este contexto se ha evidenciado un exceso ROS mitocondrial en pacientes con EII (Dashdorj et al., 2013), pero también se demostró que personas deficientes en NADPH oxidasa, que da

lugar a la formación de ROS, desarrollan enfermedad inflamatoria crónica a nivel intestinal (Hayes et al., 2015). Esto pone en evidencia que un balance adecuado en la producción de ROS es fundamental para controlar el estado inflamatorio gastrointestinal destacando que las especies reactivas de oxígeno no son sólo subproductos nocivos del metabolismo celular sino que cumplen un rol crucial en la homeostasis del TGI (Aviello y Knaus, 2017). Además, se ha evidenciado que cepas probióticas son capaces de modular la respuesta inflamatoria inducida en células epiteliales al inhibir la vía NFkB mediante la producción de ROS (Lin et al., 2009). De esa manera, la capacidad de los probióticos o sus metabolitos para lograr un balance adecuado de ROS constituye otro posible mecanismos de acción para modular la inflamación a nivel gastrointestinal.

OBJETIVOS

Considerando que las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 presentan buena potencialidad probiótica para el desarrollo de leches fermentadas funcionales, se procedió a evaluar el efecto benéfico de las mismas focalizando en la capacidad antiinflamatoria a nivel de tracto gastrointestinal para su aplicación en pacientes con gastritis o enfermedades inflamatorias intestinales.

Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de las leches fermentadas con *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 de modular la respuesta inmune innata en células de epitelio gástrico e intestinal y determinar la contribución de las bacterias y los metabolitos bioactivos sobre dicho efecto.
- Caracterizar el mecanismo molecular por el cual los ácidos orgánicos modulan la respuesta inflamatoria en células gástricas AGS.
- Estudiar las propiedades antiinflamatorias de *L. paracasei* CIDCA 8339 en un modelo murino de gastritis aguda inducido con etanol y HCl.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Células eucariotas

Para evaluar la capacidad moduladora de la respuesta inmune innata a nivel del tracto gastrointestinal se trabajó con la línea celular AGS como modelo de células de epitelio gástrico (Ver Capítulo 3) y el sistema reportero Caco-2 ccl20:luc como modelo de enterocitos. El cultivo y mantenimiento de células eucariotas se realizó de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 3.

2. Sistema reportero Caco-2 ccl20:luc

El sistema reportero Caco-2 ccl20:luc consiste en la línea celular Caco-2 que ha sido transfectada en estable con el gen de la luciferasa de luciérnaga (*Lampyris noctiluca*) bajo el control del promotor de la quimoquina CCL20 (Nempont et al., 2008). CCL20 es una quimoquina atrayente de células dendríticas y en menor medida de macrófagos y cumple un rol importante tanto en la respuesta inmune intestinal como en la formación de epitelio y tejidos linfoides asociados a mucosas. El promotor de CCL20 es altamente inducible mediante estímulos proinflamatorios como es el caso de los agonistas de receptores tipo Toll (Toll like receptors, TLR). De esa manera, la estimulación de las células con un agonista de TLR (flagelina, LPS, IL-1 β , TNF- α) activa el promotor de CCL20 lo que da lugar a un aumento en la expresión de la enzima luciferasa. Así, la actividad luciferasa medida en el sistema es proporcional a la expresión del gen de ccl20 y refleja la activación de la respuesta inmune innata en las células (Romanin et al., 2010). Para la determinación de actividad luciferasa se utilizó el kit comercial "Luciferase Assay System" (Promega Corporation, EE.UU.) el cual provee tanto el buffer de lisis celular como el reactivo conteniendo el sustrato de la enzima luciferasa.

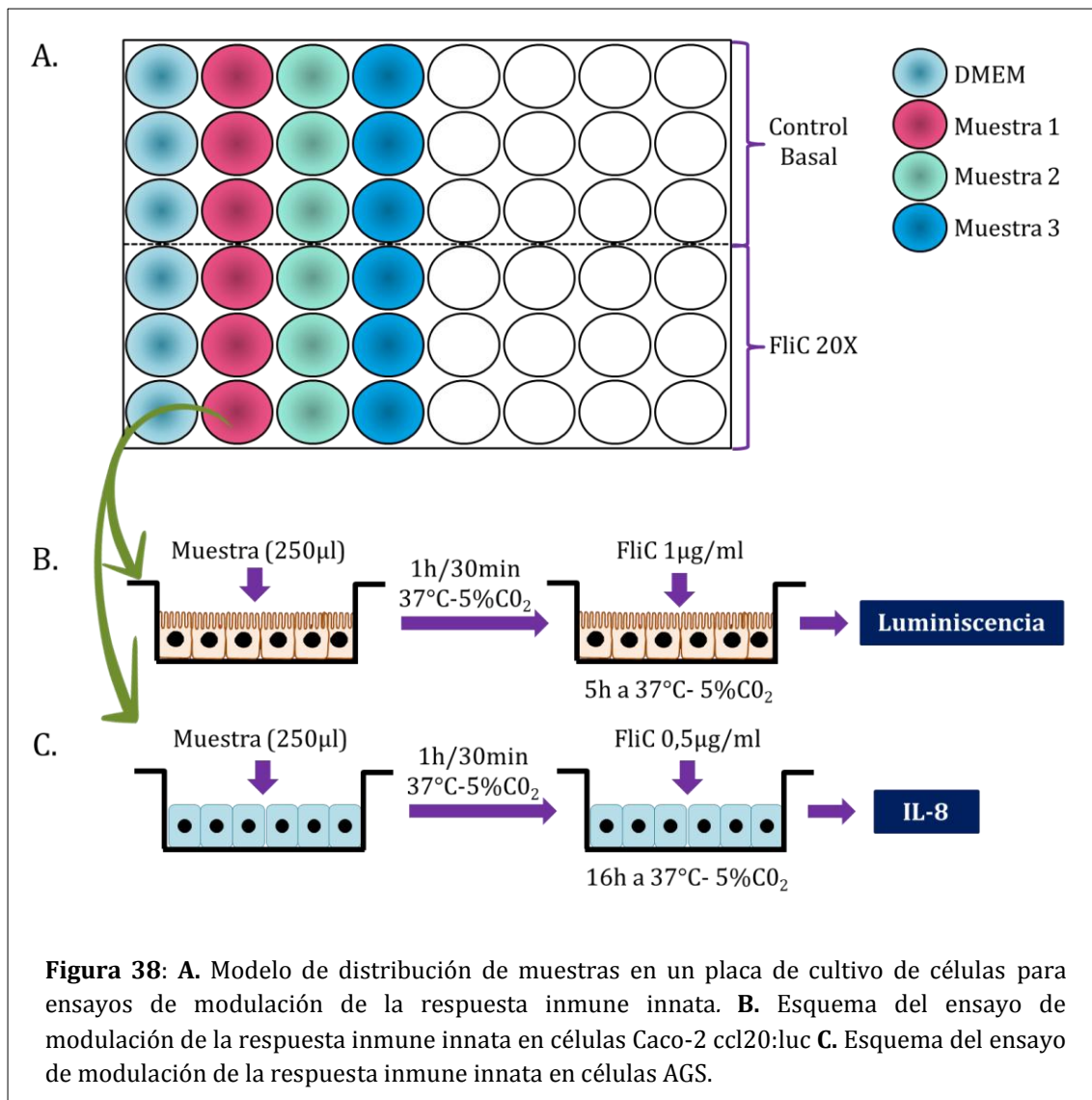
3. Ensayos de modulación de la respuesta inmune innata en células AGS y Caco-2:luc ccl20

En estos ensayos se evaluó la capacidad de modular la respuesta inmune innata de las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 sobre células epiteliales intestinales y gástricas. Para ello, se partió de cultivos crecidos en MRS a 30 °C durante 24 h. Las bacterias fueron lavadas dos veces con PBS estéril y luego resuspendidas en DMEM libre de suero de manera tal de obtener suspensiones con el valor de DO₅₉₀ deseada. Además se estudió el efecto modulador de la fracción no microbiana de las leches fermentadas (FNM) con estas cepas a 30 °C (neutralizadas y diluidas a la mitad en DMEM) y de los metabolitos producidos durante la fermentación sobre células epiteliales gástricas e intestinales. Entre los metabolitos evaluados se incluyeron soluciones de ácidos

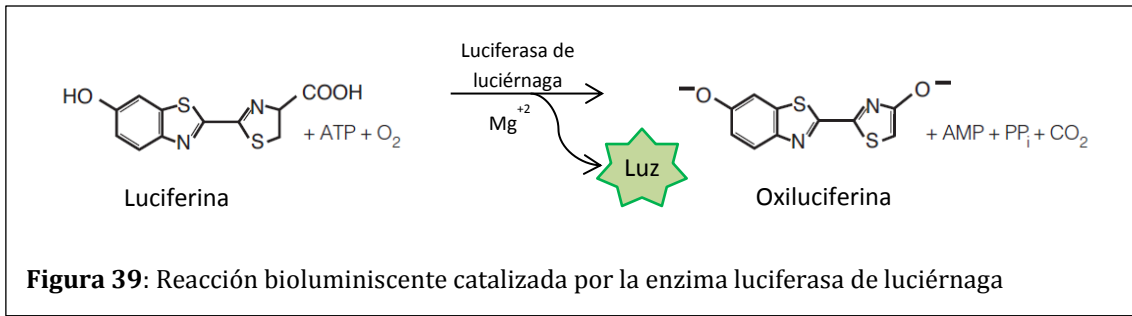
orgánicos (neutralizados con NaOH y esterilizados por filtración) y soluciones de EPS (esterilizadas en autoclave y luego diluidas en DMEM a una concentración final de 200 mg/l y 800 mg/l). Se incluyeron como control leches acidificadas artificialmente (LAA) con ácido láctico y acético en concentraciones similares a las leches fermentadas con los lactobacilos. La LAA1 contenía ácido láctico 100 mM y ácido acético 12 mM, similar a la FNM de la leche fermentada con la cepa CIDCA 8339 (FNM 8339) y CIDCA 83124 (FNM 83124), y la leche LAA2 contenía 65 mM de ácido láctico y 20 mM acético, comparable con los niveles presentes en la FNM de la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 83123 (FNM 83123). Las LAA fueron también neutralizadas y esterilizadas por filtración.

Todos los ensayos de modulación fueron realizados siguiendo un mismo esquema. La respuesta inmune innata fue inducida con Flagelina (FliC), la cual fue obtenida previamente a partir de *Salmonella entérica* serovar *Enteritidis* de acuerdo al protocolo establecido por Sierro et al. (2001).

Previo a cada ensayo se evaluó el aspecto de la monocapa de células en un microscopio invertido. Se trabajó en placas de 48 fosas según el esquema que se muestra en la Figura 38. Para cada muestra se incluyeron fosas sin estimular (Basal) y fosas estimuladas (FliC). Las células fueron preincubadas a 37 °C con 5% CO₂ durante 1 h (suspensiones bacterianas) o 30 min (fracción no microbiana, soluciones de ácidos orgánicos y soluciones de EPS) con la muestra a ensayar y a continuación estimuladas con FliC 0,5 µg/ml (AGS) o 1 µg/ml (Caco-2 ccl20:luc). Luego de la estimulación, las células fueron incubadas a 37 °C en atmósfera controlada con 5% CO₂ durante 16 h en el caso de células AGS y 5 h para las células intestinales. Para evaluar el efecto modulador de las bacterias sobre células AGS se realizó una incubación de 5 h ya que la incubación durante 16 h daría lugar a la acidificación del medio y muerte celular. En todos los ensayos se incluyó una condición basal sin ningún tratamiento (DMEM) como control sin estimulación y un control estimulado con FliC para definir una inducción del 100% de la respuesta proinflamatoria (DMEM+FliC).



La respuesta inmune innata en células AGS se definió mediante la determinación de los niveles de IL-8 en los sobrenadantes de las células utilizando un kit ELISA para IL-8 humano (BD-Bioscience OptEIA™, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante (ver Apéndice). En el caso de las células Caco-2-ccl20:luc, estas fueron lisadas con buffer de lisis (Promega, EE.UU.) y a continuación se procedió a medir la actividad de la luciferasa. Para ello se adicionaron 8 µl de lisado sobre 40 µl del LAR (Luciferasa Assay Reagent) (Promega, EE.UU.). El LAR contiene luciferina que es oxidada por la luciferasa para dar oxiluciferina (Figura 39).



Durante esta reacción se produce emisión de luz cuya intensidad será directamente proporcional a la cantidad de luciferasa expresada. La intensidad de luminiscencia emitida se midió con un luminómetro (Labsystems Luminoskan TL Plus luminometer, Thermo Scientific, EE.UU.). Los niveles de IL-8 y los valores de luminiscencia se normalizaron con el control de estimulación y se expresaron como un porcentaje del promedio normalizado \pm desviación estándar (DE).

4. Estudio de la integridad y viabilidad celular

Se evaluó el posible daño inducido por los diferentes tratamientos sobre las células AGS y Caco-2 ccl20:luc. Para ello luego del tratamiento con las muestras tal como se describió en la Sección 3. se procedió a determinar la actividad lactato deshidrogenasa y deshidrogenasa mitocondrial.

4.1. Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

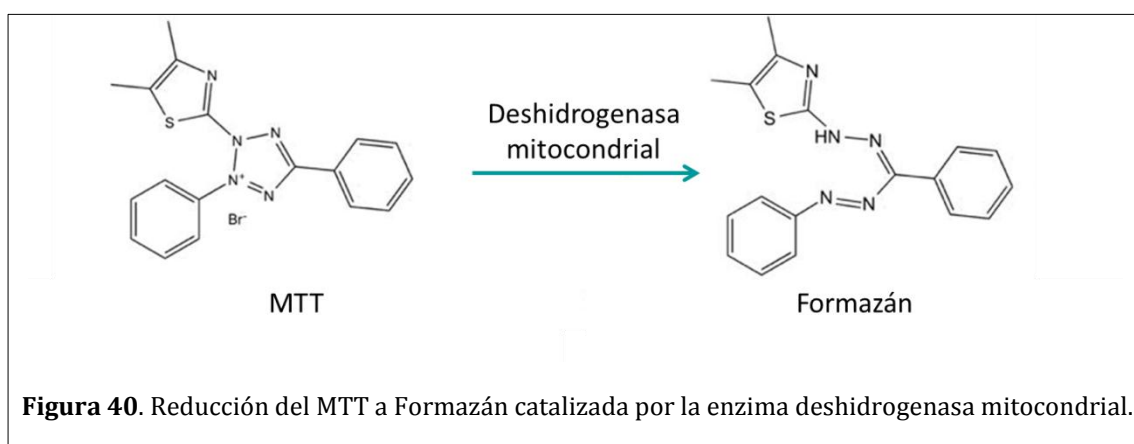
Dado que la enzima lactato deshidrogenasa es una enzima intracelular, un aumento en los niveles de la actividad LDH en el sobrenadante de cultivo estaría indicando una pérdida de la integridad de la membrana plasmática. La actividad LDH se midió en el sobrenadante antes y después de lisar las células con Triton X-100 al 3% v/v para determinar la actividad LDH *libre* en el sobrenadante y la actividad LDH *total* respectivamente. Para la determinación de la actividad LDH se utilizó un kit comercial (LDH-P unitest kit, Wiener Lab, Argentina) y se realizó el protocolo de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Luego de realizar los diferentes tratamientos, se mezclaron 3,3 μ l de sobrenadante de cultivo de cada muestra con 96,7 μ l del reactivo en una placa de 96 wells. A continuación se realizó la medida de Absorbancia a 340 nm a los 30 segundos de iniciada la reacción y luego a 1, 2 y 3 minutos después de la primer medida. Posteriormente, se retiró el sobrenadante de cultivo de las células y se agregó Triton X-100 al 3% v/v. Luego de una incubación durante 30 min a 37 °C se midió la actividad LDH *total* en los lisados celulares. Para cada condición se determinó la diferencia promedio de Absorbancia/min ($\Delta A/min$), restando a cada Abs el valor de la lectura de la anterior y promediando los valores. La actividad LDH se calculó como $(\Delta A/min) \times factor$ y los resultados se expresaron como:

$$\% \text{ Actividad LDH libre} = \left(\frac{\text{Actividad LDH sobrenadante}}{\text{Actividad LDH total}} \right) \times 100$$

El nivel de daño de la integridad celular se determinó por comparación del % Actividad LDH *libre* de células tratadas con las células control (DMEM).

4.2. Determinación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial

La actividad deshidrogenasa mitocondrial en las células tratadas fue determinada para estimar la viabilidad celular. Para ello se realizó una técnica colorimétrica en la cual el sustrato MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma, EE.UU.), una sal de tetrazolio soluble en agua y de color amarillo, es reducido por acción de la deshidrogenasa mitocondrial presente en las células activas para dar lugar a la formación de Formazán, un compuesto violeta e insoluble en agua (Figura 40).



Luego del tratamiento con las muestras, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y a continuación se procedió a determinar la actividad deshidrogenasa mitocondrial. Se adicionaron 300 μl /fosa de una solución MTT (0,5 mg/ml en DMEM sin color) y se incubaron durante 4 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ con 5% CO_2 y en oscuridad. A continuación se retiró el sobrenadante evitando arrastrar el precipitado color violeta del fondo de la fosa. Finalmente, el formazan insoluble se resuspendió en Di metil sulfóxido (Anedra SA, Argentina) y se midió la Absorbancia a 550 nm. Los resultados se expresan como:

$$\% \text{ Actividad mitocondrial} = \frac{A_{550} \text{ muestra}}{A_{550} \text{ control}} \times 100$$

5. Mecanismo de acción del lactato en células AGS

5.1. Modificación del estado redox

5.1.1. Alteración en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para evaluar el efecto del lactato en los niveles de ROS en células AGS, se utilizó la sonda 5-(-6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato acetyl éster (CM-H₂DCFDA) (Invitrogen, EE.UU.), un derivado de la sonda H₂DCFDA. Estas sondas tienen la capacidad de ingresar a la célula por difusión pasiva donde son clivadas por acetil esterasas lo que favorece su retención dentro de la célula. En presencia de ROS intracelular la sonda no fluorescente es oxidada a 2', 7'- diclorofluoresceína (DFC), un compuesto altamente fluorescente con un máximo de excitación y emisión a 495 nm y 529 nm respectivamente.

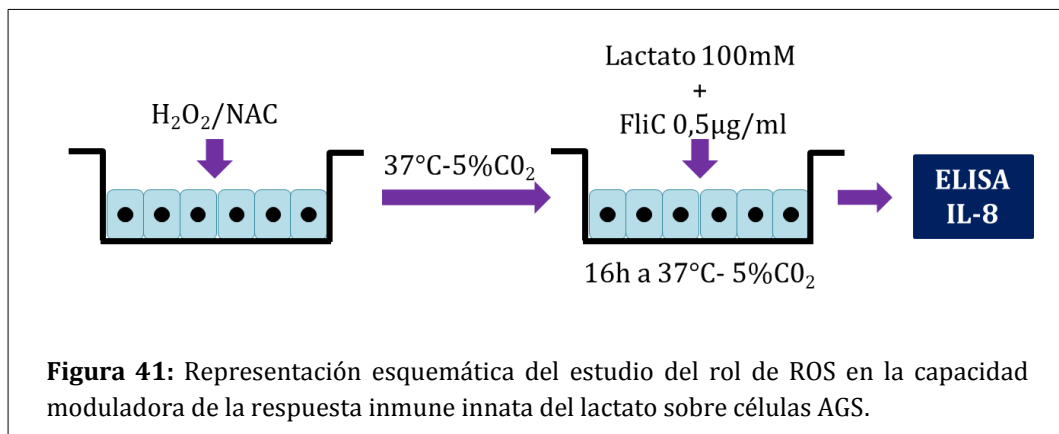
Las células AGS crecidas en confluencia en placas de 48 fosas fueron preincubadas con FliC 1 µg/ml y FliC 1µg/ml + Lactato 100 mM durante 1 h a 37 °C con 5% CO₂. Se procesó en simultáneo un control positivo que consistió en la preincubación de células con H₂O₂ 5 mM durante 30 min y un control sin tratamiento (DMEM) para definir el nivel basal de oxidación. Luego, las células fueron lavadas con PBS HEPES (10 mM) y marcadas con 85 µl/fosa de la sonda CM-H₂DCFDA 4 µM en PBS HEPES durante 20 min a 37 °C con 5% CO₂, trabajando en oscuridad para evitar la oxidación de la sonda por acción de la luz. Las células se lavaron 2 veces con PBS-HEPES y se incubaron a 37 °C con ese mismo buffer durante 15 min. Se agregaron 80 µl/fosa de TrypLE™ (GIBCO, EE.UU.) durante 5 min para levantar las células y luego 200 µl/fosa de Suero fetal bovino (SFB) al 2% v/v para inactivar el TrypLE™. Finalmente, se procedió a determinar la fluorescencia mediante citometría de flujo.

Para el análisis por citometría, las células fueron transferidas a tubos de citómetro, centrifugadas a 500 *xg* a 4 °C y resuspendidas en 200 µl SFB 2% v/v. Considerando que las células no viables o en proceso de muerte puede producir ROS, se realizó una tinción con ioduro de propidio 0,5 µg/ml que es capaz de penetrar en células muertas o dañadas e intercalarse en la doble hebra de los ácidos nucleicos. De esa manera es posible evaluar específicamente la producción de ROS en células viables (no teñidas con IP). El IP se excita a 488 nm y emite a 617 nm, lo que permite combinarlo con la sonda fluorescente CM-H₂DCFDA que presenta otras longitudes de onda de excitación/emisión. Todas las muestras fueron analizadas con un citómetro de flujo FACScalibur (Becton y Dickinson) utilizando el programa Cell Quest Pro (BD Biosciences) para la adquisición de los datos.

5.1.2. Cambios en la expresión de IL-8 por modificaciones en el estado redox celular

Se evaluó el efecto de los cambios en el estado redox sobre la respuesta inflamatoria inducida en células AGS. Para ello, las células fueron preincubadas con H_2O_2 (5 mM, 1 mM o 0,5 mM en DMEM) durante 30 min para potenciar la producción de ROS a nivel celular. Luego de la preincubación la solución de H_2O_2 fue retirada y se adicionó DMEM + FliC 0,5 μ g/ml o solución de lactato 100 mM + FliC 0,5 μ g/ml según corresponda. Las células se incubaron 16 h a 37 °C con atmósfera controlada con 5% CO_2 y finalmente se determinaron los niveles de IL-8 mediante ELISA.

Siguiendo el mismo esquema, las células fueron preincubadas con soluciones de N-acetilcisteína (NAC) (20 mM, 2 mM y 0,2 mM en DMEM, neutralizadas con NaOH) durante 1 h y luego estimuladas con FliC y FliC + Lactato 100 mM. Este compuesto es un aminotiol y constituye un precursor sintético de la cisteína y el glutatión reducido (GSH) intracelular. NAC actúa como *scavenger* de radicales libres, no solo por inducir un aumento en los niveles de GSH intracelular sino también por su acción antioxidante directa debido al grupo sulfhidrilo presente en su estructura (Sun, 2010). En la Figura 41 se muestra un esquema del ensayo realizado.



5.2. Transfección de células de epitelio gástrico con lipofectamina LTX plus

Con el fin de estudiar las posibles vías involucradas en la modulación de la expresión génica de IL-8 en presencia de lactato, las células AGS fueron transfectadas en forma transiente con liposomas utilizando diferentes construcciones reporteras.

Dado que para cada línea celular las condiciones óptimas de transfección son diferentes, fue necesario definir las condiciones ideales para la línea celular AGS. Para la realización de las transfecciones se trabajó en placas de 48 fosas, con las células en un 80% de confluencia ($3,25 \times 10^4$ células/fosa, 24 h) para evitar la muerte celular debido a la duración del ensayo. La relación óptima ADN/lipofectamina se definió para cada caso de

manera tal de lograr una buena eficiencia de transfección sin generar un daño excesivo a nivel celular.

5.2.1. Vía de señalización mediada por NF- κ B

Para evaluar si la modulación de la respuesta inmune innata inducida por el lactato esta mediada por una inhibición de la vía NF- κ B, se realizó una transfección transiente de las células AGS con el gen reportero luciferasa de luciérnaga bajo el dominio del promotor 3kB, un promotor artificial que posee tres sitios de unión a NF- κ B en tándem. Además, las células fueron transfectadas en simultáneo con una segunda construcción que consiste en el gen reportero luciferasa de *Renilla* spp. bajo el dominio del promotor constitutivo Timidina quinasa de Herpesvirus (HSV-Tk). De esa manera, la primer construcción permite evaluar la unión del factor de transcripción NF- κ B mientras que la segunda provee de una herramienta para normalizar las medidas de acuerdo al éxito de transfección en cada fosa de cultivo. Los dos tipos de luciferasa utilizan diferentes sustratos y emiten luminiscencia a diferente longitud de onda lo que permite cuantificarlas secuencialmente a partir de una misma muestra.

La transfección se realizó utilizando el protocolo comercial sugerido por el fabricante levemente modificado. Por fosa se adicionaron 0,5 μ l de lipofectamina con 300 ng de ADN. Para ello se prepararon por separado la solución A y B de acuerdo a lo indicado en la Tabla 22.

Tabla 22. Composición de la Solución A y B para la transfección de células AGS con el plásmido NF κ B-luc y TK-Renilla

| Solución A | Lipofectamina LTX plus | Opti-MEM | |
|-----------------|---|--------------|---------------------|
| 20 μ l/fosa | 0,5 μ l | 19,5 μ l | |
| Solución B | ADN* | Plus | Opti-MEM |
| 20 μ l/fosa | 300 ng (280ng 3kB-luc + 20 ng TK-Renilla) | 0,3 μ l | Llevar a 20 μ l |

*De acuerdo a la concentración de cada plásmido se adicionaron los volúmenes necesarios para alcanzar las cantidades de ADN deseadas.

A continuación se mezclaron la solución A y B y se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos lipídicos con el ADN. El medio de las células fue retirado y reemplazado por 200 μ l/fosa de DMEM completo. Se agregaron 40 μ l de la mezcla de transfección (solución A + solución B) en cada fosa. Luego de una incubación durante 16 h a 37 °C con 5% CO₂ se retiró el medio con la mezcla de transfección y se adicionó medio DMEM completo. El estado de las células fue evaluado mediante observación microscópica comparando la morfología con la de las células sin

transfectar. Las células transfectadas se mantuvieron durante 3 días, cambiando el medio diariamente para luego realizar sobre las mismas el ensayo de modulación de la respuesta inmune innata en células AGS descrito previamente (Sección 3. del presente Capítulo) evaluando el efecto de la FNM de la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 y distintas soluciones de lactato (10 mM, 50 mM y 100 mM). Luego del ensayo, las células fueron lisadas con 65 µl de buffer de lisis y se midió la luminiscencia según el protocolo del kit comercial Dual System Luciferase Assay (Promega, EE.UU.), como se describirá más adelante (Sección 5.2.3).

5.2.2. Activación de HIF-1 α

En este caso las células AGS fueron transfectadas con una construcción que presentaba el gen reportero luciferasa de luciérnaga bajo el dominio de un promotor con secuencias HREs (Hypoxia Response Elements) inducibles por HIF 1 α . El gen reportero luciferasa de *Renilla* spp. bajo el dominio del promotor constitutivo Timidina quinasa de herpesvirus (HSV-Tk) fue utilizado para normalizar las medidas de luminiscencia.

Se utilizó el protocolo de transfección descrito en la Sección 5.2.1 del presente capítulo pero utilizando por fosa 0,4 µl de lipofectamina con 200 ng de ADN total. En la Tabla 23 se muestra la composición de las soluciones A y B utilizadas en este ensayo. Luego de incubar 16 h con la mezcla de transfección, se renovó el medio de cultivo de las células y 8 h más tarde se realizó el ensayo de modulación de respuesta inmune innata sobre las células transfectadas.

Tabla 23. Composición de la Solución A y B para la transfección de células AGS con el plásmido HIF-luc y TK-Renilla

| Solución A | Lipofectamina LTX plus | Opti-MEM | |
|------------|---|----------|----------------|
| 20 µl/fosa | 0,4 µl | 19,6 µl | |
| Solución B | ADN* | Plus | Opti-MEM |
| 20µl/fosa | 200ng (180 ng HIF-luc + 20 ng TK-Renilla) | 0,2 µl | Llevar a 20 µl |

*De acuerdo a la concentración de cada plásmido se adicionaron los volúmenes necesarios para alcanzar las cantidades de ADN deseadas.

5.2.3. Medida de la luminiscencia

Para las medidas de luminiscencia se utilizó el kit comercial Dual System Luciferase Assay. Se tomaron 8 µl del lisado celular, se mezclaron con 40 µl del sustrato LAR II y se midió la luminiscencia, que es proporcional a la expresión de la luciferasa inducible de luciérnaga. Luego, sobre la misma mezcla se agregaron 40 µl del sustrato para la luciferasa de *Renilla*

en buffer Stop & Glo y se midió la luminiscencia no inducible, proporcional a los niveles de esta segunda enzima.

La luminiscencia inducible se relativizó con la luciferasa de expresión constitutiva en cada fosa y luego se normalizaron los datos con respecto al control estimulado con flagelina mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Luminiscencia relativa} = \frac{\text{Luminiscencia inducible}}{\text{Luminiscencia constitutiva}}$$

$$\text{Luminiscencia normalizada} = \frac{\text{Luminiscencia relativa promedio de la muestra}}{\text{Luminiscencia relativa promedio del control estimulado}}$$

6. Modelo murino de gastritis

6.1. Animales utilizados y condiciones de alojamiento

Se trabajó con ratones machos Balb/c pertenecientes a la categoría SPF (libre de patógenos específicos), de 7 semanas de edad, los cuales fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Los progenitores de esta cepa se obtuvieron del *National Institute of Health* (NIH), EE.UU. Los ratones fueron trasladados al bioterio del Instituto de estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP, CONICET-UNLP) en cajas de transporte 5 días antes de iniciar el protocolo de manera tal de permitir la aclimatación de los animales al nuevo ambiente. Esto permite reducir el estrés de los animales por el traslado y el cambio de las condiciones de alojamiento a la hora de realizar el ensayo. Los ratones fueron mantenidos en cajas de policarbonato con un lecho de viruta esterilizada en grupos de cinco animales por caja. Se mantuvieron a una temperatura de 22 ± 1 °C, con humedad controlada (60-80%) y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Los ratones fueron alimentados *ad libitum* con una dieta comercial y agua previamente esterilizadas.

6.2. Puesta a punto de un modelo murino para la evaluación de gastritis

En una primera etapa se procedió a poner a punto el modelo de gastritis tomando como base distintos protocolos publicados en la literatura. Se utilizaron diferentes agentes nocivos (Etanol 50% v/v, Etanol 60% v/v, LPS 100 µg/ml, LPS 100 µg/ml en Etanol 30% v/v, FliC 200 µg, FliC 200 µg + Etanol 50% v/v, Etanol 60% v/v + HCl 0,15 M, Etanol absoluto) y dosis (dosis única, dosis diaria durante 4 días) para inducir el daño a nivel de la mucosa gástrica. Para cada ensayo realizado se evaluó el daño inducido con el agente químico mediante observación microscópica de cortes de estómago teñidos con hematoxilina y eosina como se describe mas adelante.

6.3. Evaluación de la capacidad gastroprotectora de *L. paracasei* CIDCA 8339 y de lactato

El protocolo experimental utilizado en este trabajo fue evaluado y aprobado por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP (N° protocolo: 013-00-15).

Una vez puesto a punto el modelo murino de gastritis, se procedió a evaluar la capacidad de la cepa *L. paracasei* CIDCA 8339 de proteger la mucosa gástrica frente al daño inducido con Etanol 60% v/v + HCl 0,15 M. En el mismo modelo, se evaluó también el efecto de una solución de lactato.

6.3.1. Preparación de la suspensión de *L. paracasei* CIDCA 8339

A partir de un cultivo de 24 h de *L. paracasei* CIDCA 8339 crecido a 30 °C en MRS se tomó 1 ml, se inoculó en 100 ml de caldo MRS y se incubó a 30 °C durante 24 h. Para preparar la suspensión bacteriana, los 100 ml de cultivo fueron lavados 1 vez con PBS estéril para remover el medio de cultivo. Se volvió a centrifugar la muestra (5 min a 4200 $\times g$) y el pellet obtenido se resuspendió en 100 ml de agua corriente esterilizada en autoclave. Esta suspensión de *L. paracasei* CIDCA 8339 se administró a los ratones en el agua de bebida *ad libitum*. Las botellas fueron renovadas diariamente por suspensiones frescas preparadas en el día. Se determinó la concentración de microorganismos viables mediante recuento en placa de agar MRS por el método de la gota antes y después de administrar el microorganismo a los ratones. Asimismo, se determinó el volumen de suspensión bacteriana consumido por los ratones diariamente.

6.3.2. Preparación de la solución de lactato

Se preparó una solución 1,5 M de ácido L (+) láctico purísimo (Biopack, Argentina) en agua miliQ que fue neutralizada con NaOH 5 M y esterilizada por filtración (0,45 μ m). Para ser administrada a los ratones, la solución fue diluida 1 en 10 en agua corriente estéril obteniéndose la solución de lactato 150 mM. Las botellas fueron cambiadas diariamente. Luego de ser administrada, se terminó el volumen consumido por los ratones .

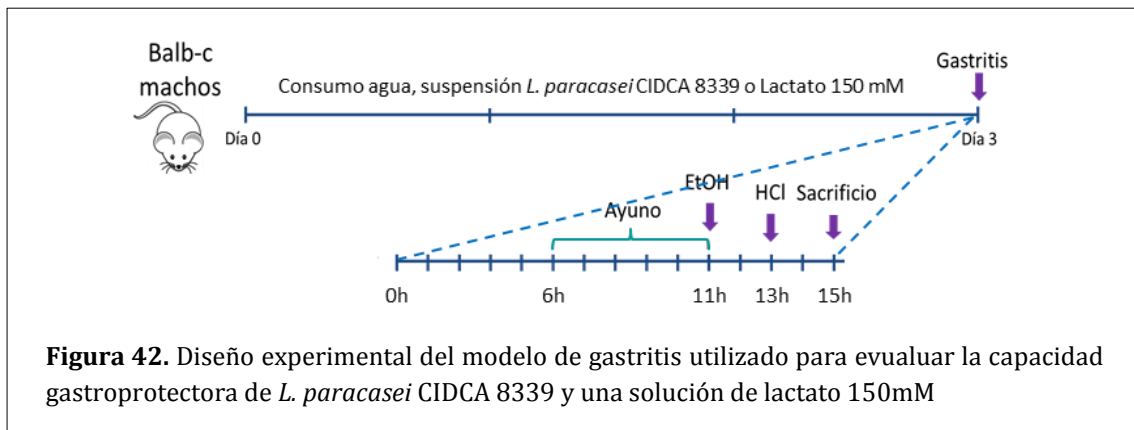
6.3.3. Ensayo de gastritis

Se realizaron 2 ensayos independientes con 5 animales por grupo. Los animales fueron divididos en 4 grupos de acuerdo a lo indicado en la Tabla 24.

Tabla 24. Protocolo experimental utilizado en el ensayo de gastritis

| Grupo | Agua de bebida | 1er Gavage | 2do Gavage |
|----------------|-----------------------|----------------|------------|
| Control | Agua | PBS | PBS |
| Gastritis | Agua | Etanol 60% v/v | HCl 0,15 M |
| CIDCA 8339 | Suspensión CIDCA 8339 | Etanol 60% v/v | HCl 0,15 M |
| Lactato 150 mM | Lactato 150 mM | Etanol 60% v/v | HCl 0,15 M |

La suspensión de *L. paracasei* CIDCA 8339 y la solución de lactato 150 mM fueron administradas *ad libitum* en el agua de bebida durante 3 días consecutivos. Al cuarto día, los ratones fueron ayunados durante 5 h previo a la inducción de la gastritis. Para inducir el daño en el estómago los ratones recibieron por inoculación intragástrica 200 μ l de etanol 60% v/v y 2 h más tarde recibieron un segundo gavage de 200 μ l de HCl 0,15 M. En la Figura 42 se muestra un esquema del protocolo realizado.



6.3.4. Eutanasia y toma de muestras

Dos horas después del segundo gavage se procedió a realizar el sacrificio de los ratones en cámara de CO₂ y se realizó la disección para remover el estómago. El estómago se abrió por la curvatura mayor, se lavó con PBS para eliminar restos de contenido gástrico y se fijó en formaldehído al 10% v/v.

6.3.5. Análisis histológico de estómago

Para el análisis de daño a nivel gástrico se obtuvieron cortes histológicos que fueron teñidos con hematoxilina y eosina (Ver Apéndice). Las muestras fueron evaluadas a doble ciego al microscopio óptico. Para cuantificar el daño, se diseñó un *score* teniendo en cuenta

las alteraciones a nivel de la mucosa y submucosa, basándonos en el *score* propuesto por Liu et al. (2016) (Tabla 25).

Tabla 25. Score histopatológico utilizado para evaluar el daño del tejido gástrico.

| Región del estómago | Característica evaluada | Score | |
|---------------------|--------------------------|---|--------------------------|
| Mucosa | Daño estructural | Ausencia | 0 |
| | | Descamación de epitelio | 1 |
| | | Descamación de la lámina propia superficial o reducción de 1/3 de las glándulas gástricas | 2 |
| | | Descamación de la lámina propia media o reducción de 2/3 de las glándulas gástricas | 3 |
| | | Descamación de la lámina propia baja o reducción de >2/3 de las glándulas gástricas | 4 |
| | Infiltrado de leucocitos | Ausencia | 0 |
| | | 2-10 por campo | 1 |
| | | 11-20 por campo | 2 |
| | | 21-30 por campo | 3 |
| | | >31 por campo | 4 |
| | Hemorragia | Ausencia | 0 |
| | | <10% del area total | 1 |
| | | 11-20% del area total | 2 |
| | | 21-30% del area total | 3 |
| | | >30% del area total | 4 |
| | Edema | Ausencia | 0 |
| | | Leve o focalizado | 1 |
| | | Moderado | 2 |
| | | Grave o extenso | 3 |
| | | Submucosa | Infiltrado de leucocitos |
| 2-10 por campo | 1 | | |
| 11-20 por campo | 2 | | |
| 21-30 por campo | 3 | | |
| >31 por campo | 4 | | |
| Edema | Ausencia | | 0 |
| | Leve o focalizado | | 1 |
| | Moderado | | 2 |
| | Grave o extenso | | 3 |

La hemorragia se evaluó con un aumento 100X y el infiltrado de leucocitos con 400X

7. Análisis estadístico

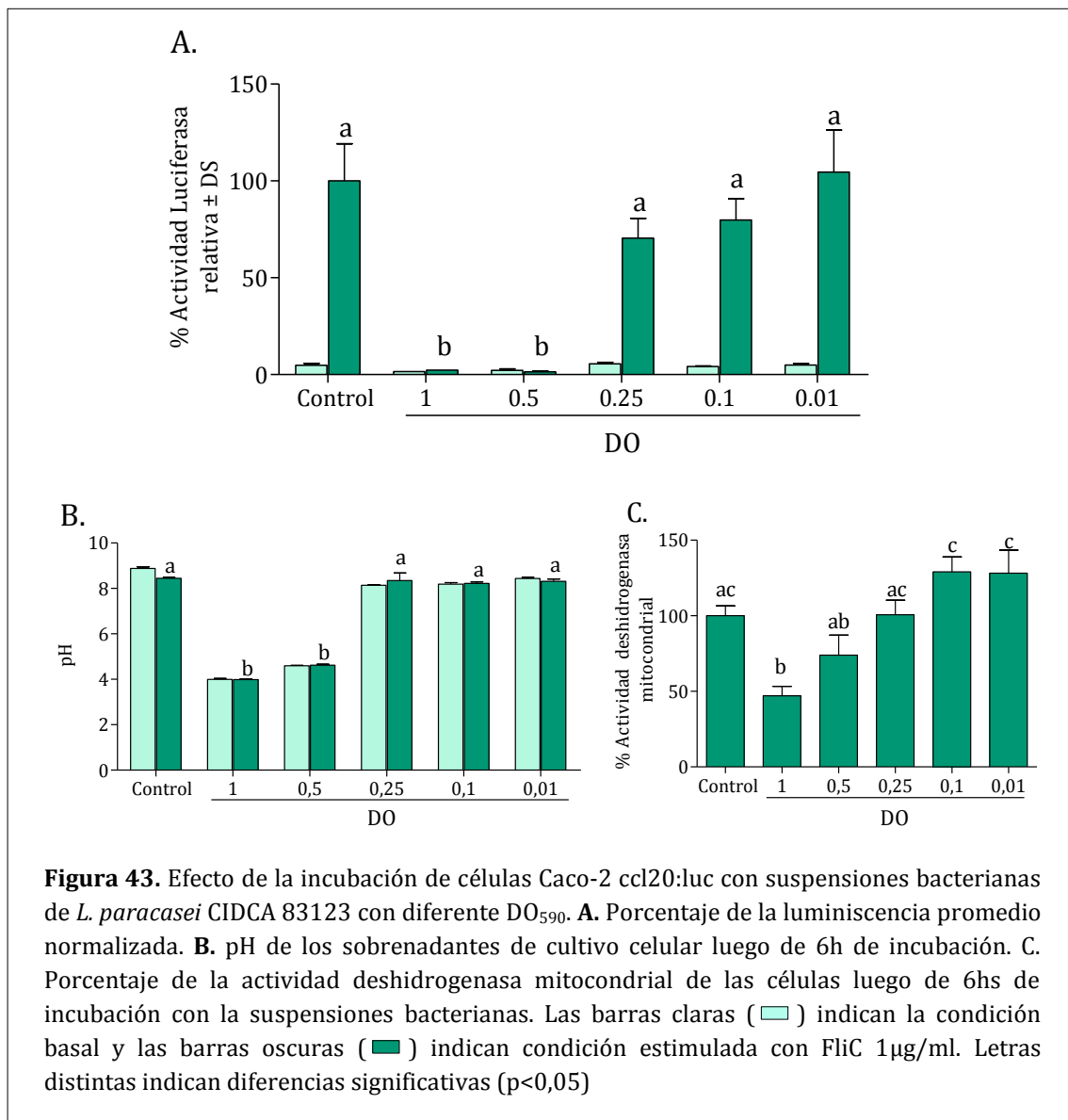
El análisis de datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism versión 5.01 para Windows (GraphPad®, EE.UU.). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (DE). Para la comparación de medias, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) seguido del Test de Tukey. Se consideraron diferencias significativas aquellas con un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Capacidad moduladora de la respuesta inmune innata en células de epitelio gástrico e intestinal

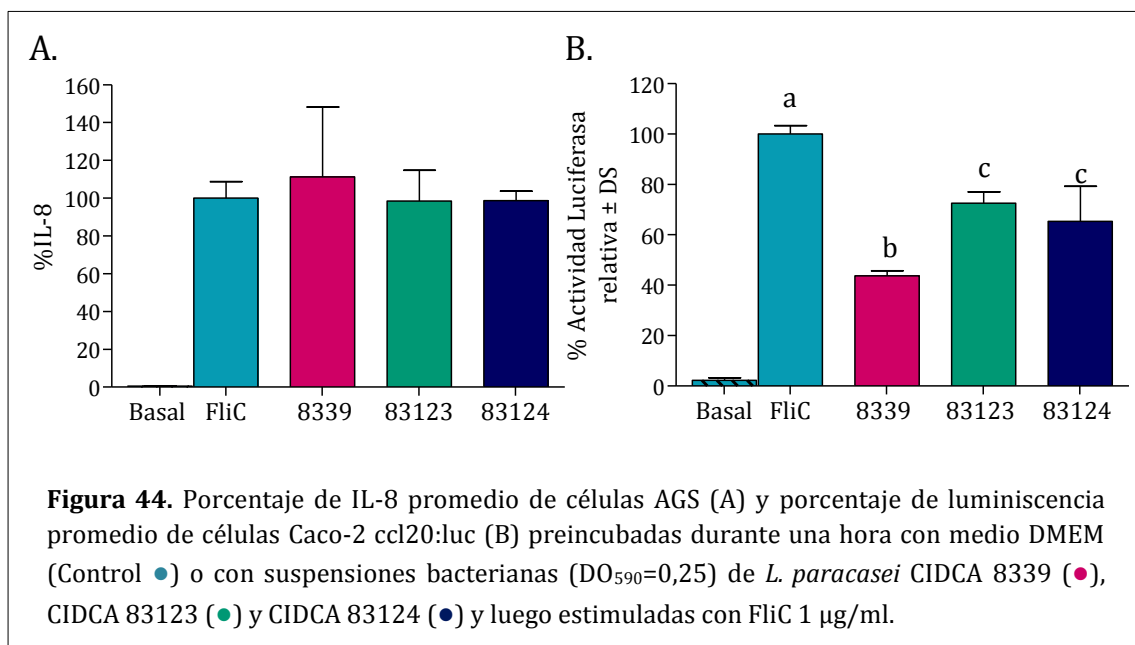
1.1. Efecto modulador de las cepas de *L. paracasei*

Para evaluar el efecto modulador de las cepas *L. paracasei*, se partió de cultivos en MRS de 24 h y se prepararon suspensiones de diferentes DO₅₉₀ con el objetivo de encontrar una concentración bacteriana adecuada, que no genere daño a nivel celular durante los periodos de incubación. En la Figura 43 se muestran los resultados obtenidos con las distintas suspensiones de *L. paracasei* CIDCA 83123 en células Caco-2 ccl20:luc luego de 6 h de incubación con el lactobacilo.



Se puede apreciar que la actividad luciferasa relativa de las células epiteliales estimuladas con FliC disminuye al aumentar la concentración de microorganismos ensayada (Figura 43.A). Sin embargo, las suspensiones de DO=1 y 0,5 acidifican el medio de cultivo hasta pH cercanos a 4 luego de las 6 h de incubación necesarias para dar tiempo a la expresión de la luciferasa (Figura 43.B) y esto produce daños en la célula epitelial evidenciados por la marcada reducción en la actividad deshidrogenasa mitocondrial que presentan respecto al control (Figura 43.C). Por otro lado, en el caso de las suspensiones de DO=0,25, 0,1 y 0,01 no se observa una reducción significativa del pH en el sobrenadante del medio ni una reducción de la actividad deshidrogenasa mitocondrial (Figura 43.B y C) indicando que estas concentraciones bacterianas serían más apropiadas para la evaluación de la capacidad moduladora. En base a esto, para los ensayos de modulación de la respuesta inmune innata en células Caco-2 ccl20:luc y AGS se seleccionó la condición de DO=0,25 que corresponde a la mayor concentración bacteriana en la que no se genera un daño significativo a nivel celular.

A continuación, se procedió a estudiar el efecto de las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 crecidas en MRS a 30 °C (DO₅₉₀=0,25) sobre la respuesta inmune en células gástricas e intestinales (Figura 44).



En células gástricas AGS, la preincubación con las cepas de *L. paracasei* no modificó significativamente la expresión de la citoquina IL-8 inducida por FliC. Por el contrario, todas las cepas estudiadas presentan la capacidad de modular la respuesta inmune innata en células de epitelio intestinal ya que lograron reducir la expresión de la luciferasa

significativamente respecto al control. La cepa *L. paracasei* CIDCA 8339 logró una reducción de la expresión de la luciferasa de un 55%, significativamente mayor a la obtenida con *L. paracasei* CIDCA 83123 (30%) y CIDCA 83124 (35%).

Uno de los principales efectos sobre la salud que se le atribuyen a los microorganismos probióticos es su capacidad de modular la respuesta inmune del hospedador ya sea estimulándola para mejorar las defensas frente a microorganismos patógenos o regulando la respuesta en condiciones patológicas de inflamación exacerbada. Por este motivo, el efecto de los probióticos sobre el sistema inmune ha sido ampliamente estudiado tanto en modelos simplificados con cultivos celulares como en modelos animales. Los probióticos que son administrados por vía oral, son capaces de resistir las condiciones adversas del tracto gastrointestinal y llegar viables al estómago y el colon. De esa manera, las células epiteliales de la mucosa gástrica e intestinal son capaces de reconocer el probiótico mediante receptores de la inmunidad innata jugando un rol primordial en la interacción del microorganismo con la respuesta inmune del hospedador (García-Castillo et al., 2019). Carasi et al. (2014) estudiaron el efecto de siete cepas *L. kefir* aisladas de kefir utilizando el sistema reportero Caco-2 ccl20:luc y evidenciaron que sólo dos cepas eran capaces de modular la respuesta inflamatoria inducida con flagelina en un 30-40%. Más aún, los autores lograron confirmar el efecto antiinflamatorio de la cepa *L. kefir* CIDCA 8348 mediante estudios *in vivo*, donde evidenciaron una disminución en la expresión de genes proinflamatorios en íleon y colon en ratones que consumieron la cepa. Utilizando el mismo sistema reportero, Romanin et al. (2010) compararon el efecto de varias cepas de *L. plantarum* y *L. kefir* aisladas de kefir evidenciando una respuesta cepa dependiente. De las 23 cepas ensayadas, sólo 8 lograron una modulación de la respuesta inmune entre un 45-70%, similar a los resultados obtenidos para las cepas *L. paracasei* del presente trabajo, mientras que el resto de las cepas presentó una capacidad moduladora leve o nula.

La citoquina IL-8, un potente quimioattractante y activador de neutrófilos, es secretada por las células epiteliales gástricas durante la infección con *H. pylori* (Suzuki et al., 1998). De hecho, la activación de la vía NFκB y el aumento de la expresión de IL-8 en células de epitelio gástrico es considerado uno de los mecanismos claves mediante el cual *H. pylori* induce una inflamación crónica y favorece el desarrollo de cáncer (Yamada et al., 2013). Los niveles de ARNm IL-8 en la mucosa gástrica de pacientes infectados con *H. pylori* están directamente asociados con la severidad de la gastritis (Xuan et al., 2005) y el riesgo de cáncer (Yamada et al., 2013). Por este motivo, la modulación de la expresión de esta citoquina es una de las estrategias más buscadas para reducir la inflamación crónica asociada a *H. pylori*. Del mismo modo, frente a situaciones de gastritis inducida por agentes nocivos resulta importante reducir el estado inflamatorio generado para

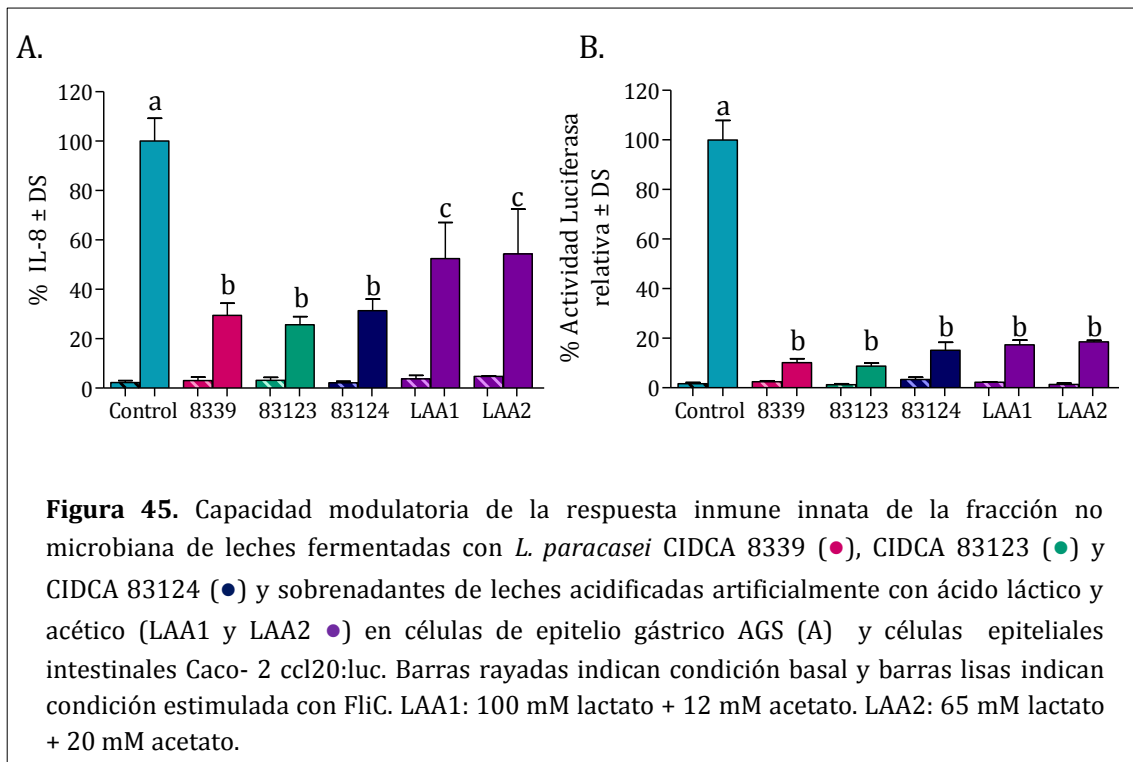
disminuir el daño y favorecer la reparación tisular. En este sentido, varios autores han demostrado mediante ensayos *in vitro* la capacidad de cepas de *Lactobacillus* de modular la expresión de IL-8 en células de epitelio gástrico teniendo potencial aplicación en pacientes con gastritis. *L. paracasei* 06TCa19 (Takeda et al., 2017) y *L. acidophilus* LA5® (Yang et al., 2012) modularon el aumento de los niveles de esta citoquina proinflamatoria inducido por *H. pylori* en células epiteliales gástricas MKN45. Similarmente, Garcia-Castillo et al. (2018) evidenciaron que la preincubación de las células AGS con la cepa *L. fermentum* UCO-979C daba lugar a una reducción significativa de los niveles de varias citoquinas proinflamatorias, entre ellas IL-8, acompañado de un aumento en los niveles de la citoquina regulatoria TGF- β . Rokka et al. (2008) evaluaron la capacidad inmunomoduladora de cepas de BAL en células AGS evidenciando que luego de 20 h de incubación se generaba una reducción de IL-8 cuando la concentración de BAL adicionada sobre el cultivo celular era superior a 10^8 - 10^9 UFC/ml. En el presente trabajo, las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 no modularon la expresión de IL-8 en células AGS. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las concentraciones bacterianas y los tiempos de incubación así como la línea celular empleada pueden influir en los resultados. *L. salivarius* UCC118 y UCC119 también presentaron capacidad moduladora en células AGS incubadas con *H. pylori* (Ryan et al., 2009). Se evidenció que la cepa UCC118 cuando era sometida a un tratamiento con UV conservaba la capacidad moduladora lo que indica que el efecto antiinflamatorio estaría mediado por la interacción de moléculas de superficie de la bacteria con la célula pero no por la producción de metabolitos. Por otro lado, la cepa UCC119 muerta por UV perdía parcialmente la capacidad moduladora debido a que el efecto ejercido por esta cepa dependía en parte de la producción de ácidos y la reducción de pH en el entorno celular (Ryan et al., 2009). Así, el efecto del probiótico sobre el sistema inmune será cepa específico y dependiente no sólo de las propiedades y componentes de la superficie celular sino también de los metabolitos bioactivos que se producen *in situ*.

Tal como se evidenció en el presente trabajo, el efecto ejercido por una cepa sobre el sistema inmune a nivel gástrico puede diferir del efecto generado a nivel intestinal. Similarmente, la cepa *L. fermentum* UCO-979C presentó un claro efecto inmunomodulador en células gástricas AGS inhibiendo la expresión de citoquinas proinflamatorias mientras que a nivel intestinal presentó un efecto combinado pro y antiinflamatorio (Garcia-Castillo et al., 2018,2019). Estos resultados ponen en evidencia la importancia de caracterizar las propiedades inmunomoduladoras de las cepas probióticas en distintos modelos celulares ya que los resultados observados en células provenientes de un tejido no son extrapolables a células que tienen un origen diferente.

1.2. Efecto modulador de la fracción no microbiana de leches fermentadas

Además de evaluar el efecto modulador de las cepas, se procedió a estudiar la capacidad inmunomoduladora de los metabolitos producidos por las bacterias durante la fermentación de la leche. Para ello, a partir de las leches fermentadas a 30 °C se obtuvieron las fracciones no microbianas (FNM) correspondientes mediante centrifugación y filtración. Las mismas fueron neutralizadas y su capacidad moduladora se estudió tanto en células de epitelio gástrico como intestinal.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 45. La FNM de las leches fermentadas con *L. paracasei* CIDCA 8339 (FNM 8339), CIDCA 83123 (FNM 83123) y CIDCA 83124 (FNM 83124) fueron capaces de modular significativamente la respuesta inmune innata inducida con FliC tanto en células de epitelio gástrico (Figura 45.A) como de epitelio intestinal (Figura 45.B), sin observarse diferencias significativas en la capacidad de modulación de las tres FNM.



La preincubación de las células con las FNM dio lugar a una reducción de la expresión de IL-8 en un 70-75% en células AGS y una disminución de la actividad luciferasa del 85-90% en células Caco-2 ccl20:luc. En células intestinales, las LAA con niveles de lactato y acetato similares a los presentes en las FNM de las leches fermentadas mostraron un comportamiento equivalente al de las FNM lo que indicaría que los ácidos orgánicos producidos durante la fermentación por los lactobacilos serían responsables del efecto antiinflamatorio de las mismas. Sin embargo, en células gástricas, las LAA dieron lugar a

una modulación de la expresión de IL-8 del 50%, significativamente menor a la obtenida con las FNM. Estos resultados sugieren que si bien los ácidos orgánicos son importantes metabolitos bioactivos, otros productos de la fermentación tales como EPS o péptidos podrían contribuir al efecto inmunomodulador de la FNM de las leches fermentadas en células gástricas.

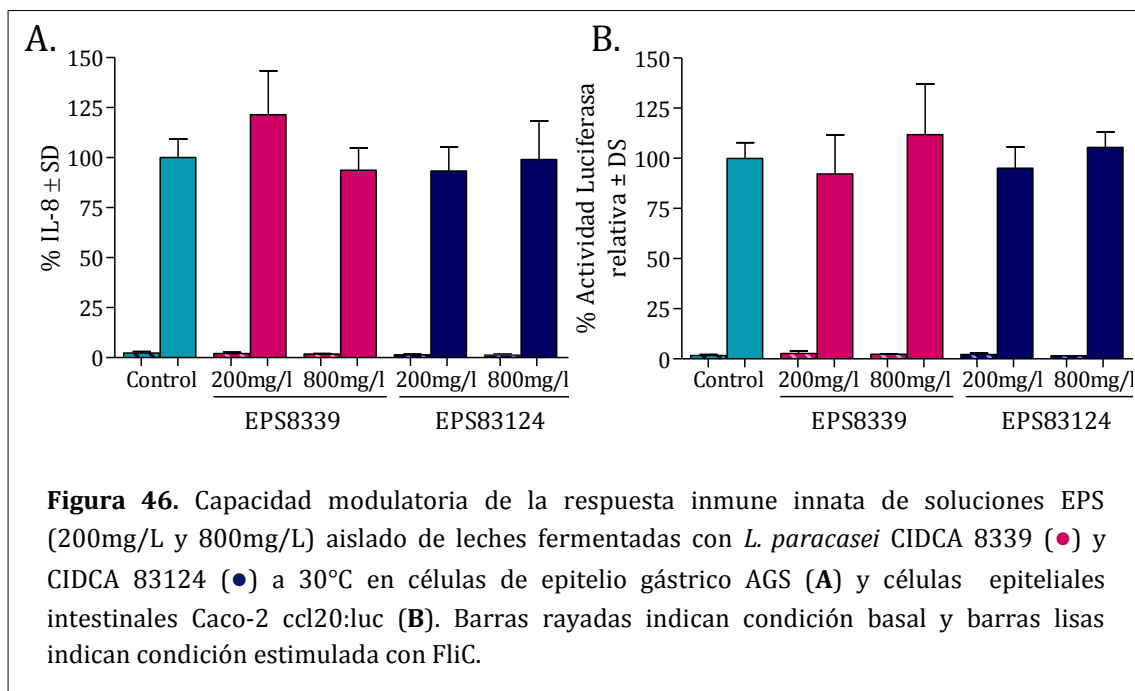
Para corroborar que la incubación de las células con la fracción no microbiana no altera la viabilidad celular se midió la actividad deshidrogenasa mitocondrial luego del ensayo. La tolerancia de las células Caco-2 ccl20:luc frente a FNM de leches fermentadas con concentraciones similares de ácidos orgánicos ya ha sido demostrada previamente (Iraporda et al., 2014). Con respecto a las células AGS, en la Tabla 26 se muestra el porcentaje de actividad deshidrogenasa mitocondrial obtenido en células incubadas con la FNM 8339 durante 16 h. Los resultados obtenidos indican que la FNM no afecta la viabilidad celular ya que los niveles de actividad deshidrogenasa mitocondrial son comparables con los del control.

Tabla 26. Porcentaje de actividad deshidrogenasa mitocondrial de células AGS luego de ser tratadas con la FNM8339 durante 16h.

| Muestra | % Actividad deshidrogenasa mitocondrial promedio \pm DS |
|---------|---|
| DMEM | 100 \pm 18,44 |
| FNM8339 | 107,36 \pm 16,71 |

En consecuencia, es posible afirmar que la reducción en los marcadores de la respuesta inmune innata tanto en células gástricas como intestinales se debe a un efecto mediado por los metabolitos presentes en la FNM y no a una pérdida de la viabilidad celular.

Los EPS producidos por las bacterias ácido lácticas pueden ejercer diferentes efectos sobre el sistema inmune ya sea estimulando o reduciendo la respuesta inflamatoria. Este efecto puede ser diferente para cada EPS ya que depende fundamentalmente de la estructura que presenta el biopolímero (Ryan et al., 2015). Así, parte del efecto modulador de la FNM de las leches fermentadas podría ser ejercido por estos metabolitos. Sin embargo, al evaluar la capacidad moduladora de los EPS aislados de las leches fermentadas con *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83124 a 30°C, se pudo observar que ninguno fue capaz de modular la respuesta inmune innata en células gástricas o intestinales. Normalmente la producción de HePS en leches fermentadas con lactobacilos no supera los 200 mg/l. En el presente trabajo se evaluó el efecto de una suspensión concentrada (800 mg/l) observándose que no se generan cambios en la respuesta inflamatoria incluso en concentraciones mucho más altas a las producidas por la bacteria en la leche fermentada (Figura 46).



Las bacterias ácido lácticas pueden producir diversos metabolitos a los que se les ha podido atribuir propiedades moduladoras de la respuesta inflamatoria. El efecto de los sobrenadantes de cultivo de cepas de bacterias lácticas ha sido estudiadas en sistemas de células epiteliales en cultivo. Panpetch et al. (2016) demostraron que los sobrenadantes de cultivo de las cepas *L. salivarius* B37 y B60, a diferencia del sobrenadante de *L. salivarius* B78, eran capaces de inhibir la producción de IL-8 inducida por *H. pylori* en células AGS. Los autores pudieron identificar que un polisacárido era responsable del efecto en el caso de la cepa B37 mientras que para la cepa B60 se trataba de múltiples componentes de naturaleza glucídica, lípidica y proteica (Panpetch et al., 2016). En el caso de *L. plantarum* ZDY2013, el sobrenadante de cultivo presentó una actividad antiinflamatoria sobre células gástricas mayor que la evidenciada con la cepa, lo que indica que el principal responsable del efecto es uno o varios metabolitos producidos por la bacteria durante su crecimiento (Zhao et al., 2018). Por otro lado, Hwang et al. (2012) evidenciaron que los sobrenadantes de cultivo de *L. acidophilus* HY2177 y *L. plantarum* KY1032 que contenían ácido linoleico conjugado ejercían un efecto modulador en la expresión de IL-8 en células gástricas, a diferencia de los sobrenadantes respectivos sin ácido linoleico conjugado pudiendo atribuir el efecto a dichos metabolitos.

Debe tenerse en cuenta que los metabolitos producidos por una bacteria en medio de cultivo pueden diferir de los sintetizados en leche. Así, a la hora caracterizar el efecto probiótico de un alimento es importante evaluar las propiedades de los metabolitos producidos en la matriz alimentaria. El efecto de las leches fermentadas con

microorganismos probióticos sobre el sistema inmune ha sido estudiado principalmente a nivel intestinal. Al igual que la FNM de las leches fermentadas con *L. paracasei*, la fracción no microbiana del kefir fue capaz de modular en un 80% la expresión de la luciferasa inducida con FliC en el sistema Caco-2 ccl20:luc, atribuyendo dicho efecto a los ácidos orgánicos producidos durante la fermentación, fundamentalmente el lactato (Iraporda et al., 2014). Dado que el ácido láctico es un metabolito producido por todas las cepas de *Lactobacillus* durante la fermentación de la leche, no debe sorprender que la FNM de cualquier leche fermentada con un lactobacilo ejerza en cierta medida algún efecto inmunomodulador, el cual será proporcional a la concentración del metabolito. Similarmente, Zhai et al. (2019) han demostrado recientemente que la leche fermentada con *L. casei* BL23, a diferencia de la leche sin fermentar, es capaz de modular significativamente la expresión de IL-8 inducida con TNF- α en células intestinales, lo que indica que el efecto está mediado probablemente por algún metabolito producido por la bacteria o por los cambios inducidos en los componentes de la matriz durante la fermentación. Más aún, el efecto antiinflamatorio de leches fermentadas con bacterias ácido lácticas ha sido evidenciado en modelos de colitis con TNBS (Foligné et al., 2016) o DSS (Yoda et al., 2014; Zagato et al., 2014) en animales, fomentando su uso para aliviar la sintomatología asociada a enfermedades inflamatorias intestinales.

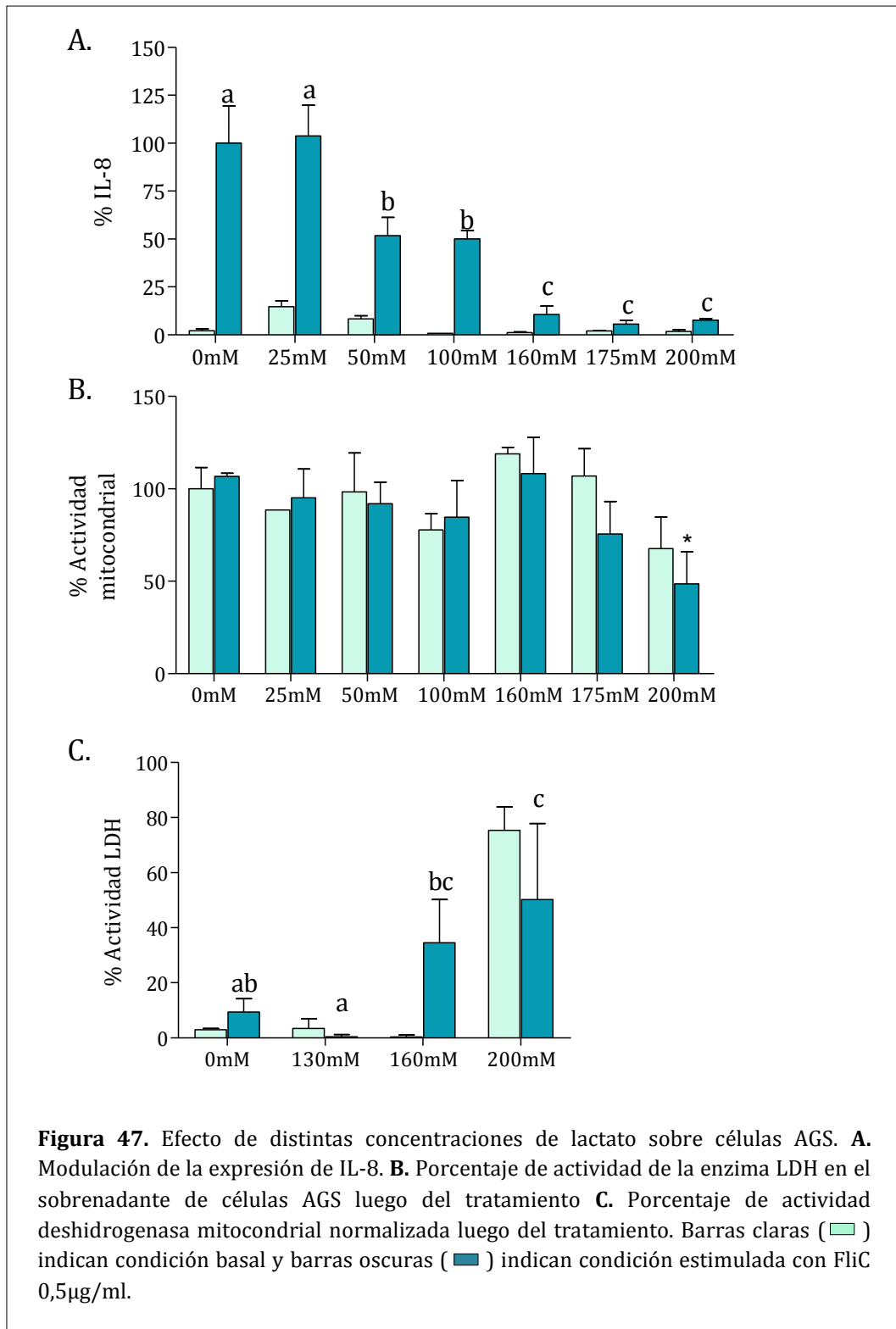
Pocos trabajos en la literatura han reportado el efecto de leches fermentadas con probióticos a nivel gástrico. El consumo de kefir demostró ser beneficioso en la protección del daño a nivel gástrico inducido por ácido acetilsalicílico (Acarturk et al., 2014) y etanol (Fahmy y Ismail, 2015) en ratas Wistar. En un ensayo clínico realizado en pacientes con una infección asintomática de *H. pylori* se evidenció la eficacia de la leche fermentada con *L. johnsonii* 1 de reducir el estado inflamatorio de la mucosa gástrica (Pantoflickova et al., 2003). En todos estos estudios se evaluó el efecto gastroprotector y antiinflamatorio de la leche fermentada completa sin llegar a definir cuál es el componente responsable del efecto.

Las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 son capaces de modular la respuesta inflamatoria en células epiteliales intestinales pero no en células gástricas. Sin embargo, los metabolitos producidos durante la fermentación de la leche, en particular los ácidos orgánicos, reducen la respuesta inmune inducida con FliC en ambos tipos celulares. En este sentido, los resultados de este trabajo constituyen un primer indicio acerca del potencial probiótico de estas cepas para la obtención de leches fermentadas funcionales destinadas a prevenir o aliviar la sintomatología en pacientes que sufren de enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal.

1.3. Caracterización de la capacidad inmunomoduladora de los ácidos orgánicos presentes en la FNM

Para profundizar el estudio de las propiedades antiinflamatorias del lactato y el acetato a nivel del epitelio gástrico, se evaluó el efecto dosis-respuesta de soluciones acuosas de ácido láctico y acético neutralizadas sobre células AGS. En simultáneo, se realizaron estudios de viabilidad celular midiendo la actividad deshidrogenasa mitocondrial y la alteración de la permeabilidad celular mediante determinación de la actividad LDH para evaluar el posible efecto tóxico de las soluciones sobre las células.

En cuanto al lactato, se probaron soluciones en el rango 0 a 200 mM observándose un efecto dosis respuesta (Figura 47). La solución de lactato 100 mM, similar a los niveles observados en la FNM de las leches fermentadas, logró una reducción de IL-8 del 50%. Para soluciones más concentradas, la expresión de IL-8 correspondía solo al 10% de los niveles medidos en el control (0 mM). Al evaluar el efecto tóxico de las soluciones de lactato sobre las células AGS, podemos observar que el rango de concentraciones entre 25-100 mM no induce daño celular, lo que garantiza que la reducción de los niveles de IL-8 se deben efectivamente a una modulación de la respuesta inmune innata. Por el contrario, en el rango de 160-200 mM, las altas concentraciones de lactato dan lugar a un aumento de la permeabilidad, evidenciado por un incremento significativo de la actividad LDH en el sobrenadante celular, y una reducción de la actividad deshidrogenasa mitocondrial lo que indica una pérdida de viabilidad celular en el caso de la solución 200 mM .



Dado que las concentraciones de acetato en la FNM de las leches fermentadas oscilan entre 10-25 mM, se trabajó con soluciones de acetato en un rango entre 10-100 mM, observándose que la forma neutralizada de este ácido también es capaz de modular la expresión de IL-8 en células AGS estimuladas con FliC de manera dosis dependiente

(Figura 48.A). Los resultados del ensayo MTT (Figura 48.B) y LDH (Tabla 27) demostraron que las soluciones de acetato no generan un daño significativo sobre las células, evidenciándose una pequeña pérdida de la viabilidad sólo con la solución 100 mM pero sin generarse alteración significativa de la permeabilidad celular.

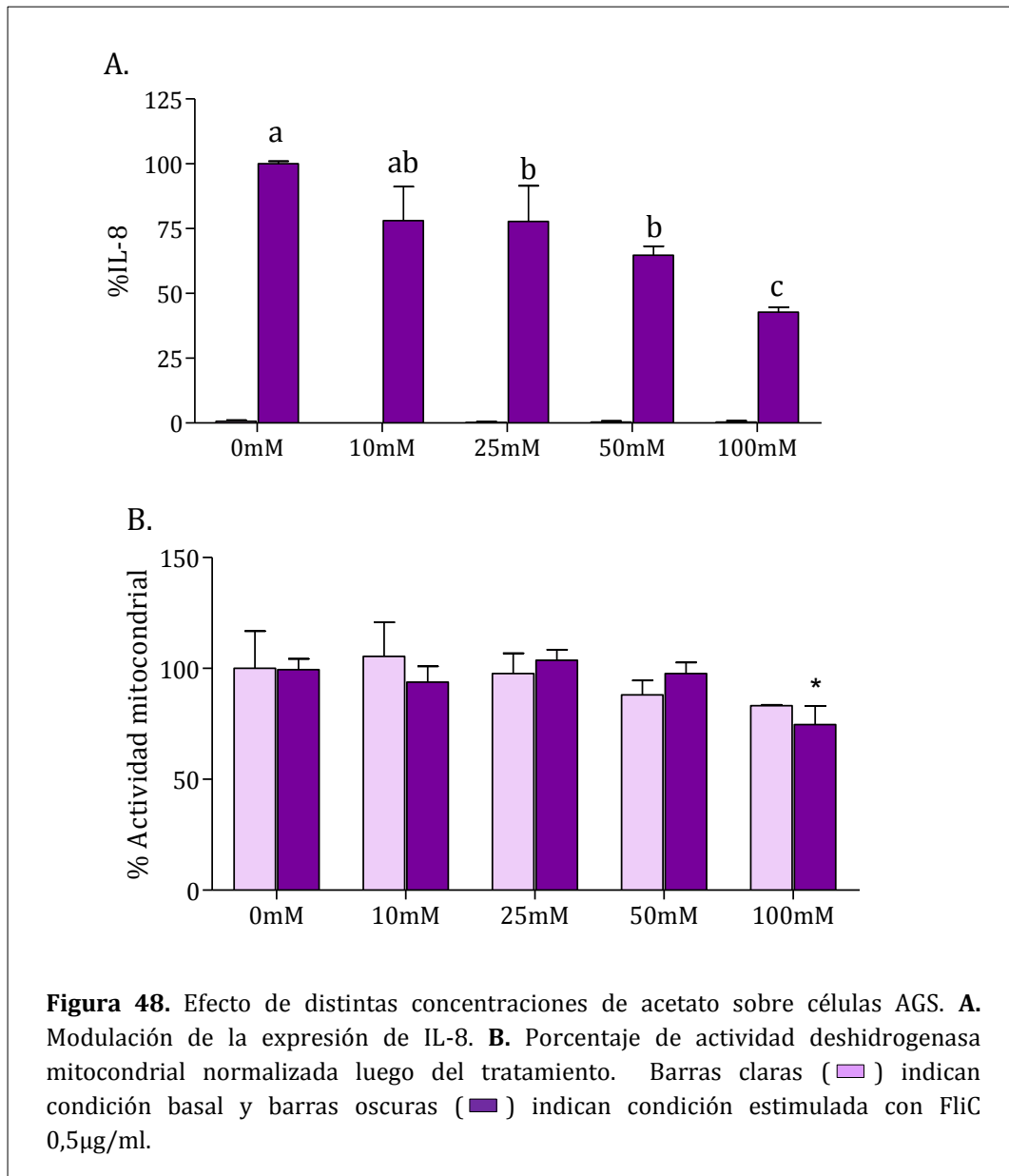


Tabla 27. Porcentaje de actividad de la enzima LDH libre en el sobrenadante de células AGS luego del tratamiento con soluciones de acetato y FliC 0,5µg/ml

| Condición | % Actividad LDH _{libre} |
|-----------------------|----------------------------------|
| Basal +FliC | 5,8±1,47 ^a |
| Acetato 100 mM + FliC | 8,68±1,19 ^a |

Letras distintas indican diferencias significativas

Estos resultados confirman la capacidad moduladora de la respuesta inmune innata del lactato y el acetato en células gástricas. Si se compara el efecto de una solución de lactato y acetato 100 mM en células estimuladas con FliC se puede observar que ambas reducen la expresión de IL-8 en un 50%, es decir, que son capaces de modular la respuesta inflamatoria de manera equivalente. Así, es posible atribuir el efecto modulador de la FNM de las leches fermentadas a la presencia de estos metabolitos. Sin embargo, dado que en la FNM la concentración de lactato es de 65-100 mM mientras que la de acetato es de 10-25 mM podría decirse que el lactato es el principal metabolito bioactivo responsable de dicho efecto. Similarmente, en nuestro grupo se pudo determinar previamente la capacidad moduladora de la FNM del Kefir en células Caco-2 ccl20:luc, siendo el lactato presente en la misma el principal metabolito responsable del efecto (Iraporda et al., 2015). Si se compara el efecto del lactato en células AGS y células Caco-2 ccl20:luc, se puede observar que para una misma concentración de lactato la capacidad moduladora es mayor en células intestinales. Una solución 100 mM de lactato es capaz de modular la respuesta inflamatoria en un 90% en células epiteliales intestinales (Iraporda et al., 2015), mientras que sólo logra modular un 50% en células gástricas. Estas diferencias observadas en el efecto de lactato, podrían explicar en parte el efecto antiinflamatorio más pronunciado observado para la FNM de las leches fermentadas con *L. paracasei* en Caco-2 ccl20:luc respecto a las células AGS (Figura 45 A y B, Sección 1.2, Capítulo 4).

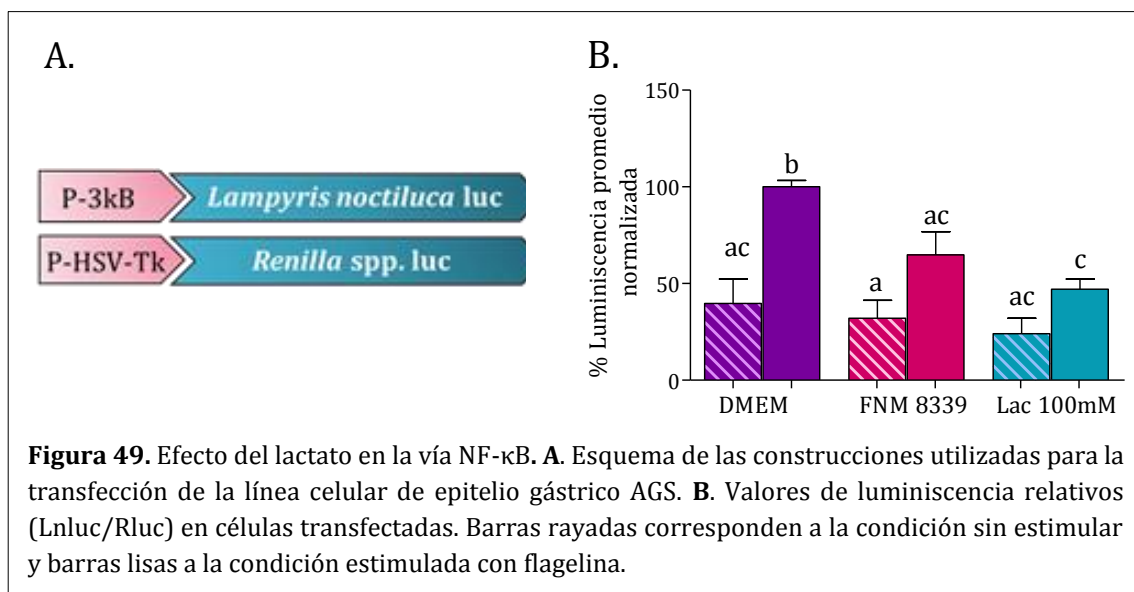
El ácido láctico es uno de los metabolitos mayoritarios producido por las bacterias ácido lácticas al que se le han atribuido diversos efectos beneficiosos sobre la salud. La producción de ácido láctico durante la fermentación es una característica común a todas las especies del género *Lactobacillus*. De esa manera, demostrar las diferentes propiedades bioactivas de este metabolito resulta de gran interés ya que, de acuerdo a lo propuesto recientemente por Sanders et al. (2018), podría constituir un beneficio probiótico general no dependiente de cepa atribuido a todos los lactobacilos. Entre los efectos beneficiosos del ácido láctico se incluyen sus propiedades inhibitorias frente a microorganismos patógenos (Iraporda et al., 2017) así como también sus propiedades inmunomoduladoras a nivel intestinal demostradas tanto *in vitro* (Iraporda et al., 2015) como *in vivo* (Iraporda et al., 2016). Watanabe et al. (2009), evidenciaron que el ácido láctico producido por un lactobacilo probiótico era crítico en la modulación de la inflamación en un modelo de daño a nivel de intestino delgado inducido con indometacina. Es importante destacar que la actividad antiinflamatoria del lactato no sólo se demostró a nivel de células intestinales sino también en células mieloides (monocitos, células dendríticas) (Dietl et al., 2010; Gottfried et al., 2006; Iraporda et al., 2015; Nasi et al., 2013). Del mismo modo el ácido acético también es producido durante la fermentación por varias especies de *Lactobacillus*,

aunque en menor concentración, y corresponde a un AGCC que ha demostrado tener relevancia en la homeostasis a nivel intestinal. Si bien existe evidencia reportada en la literatura del efecto del lactato y el acetato a nivel intestinal, pocos trabajos se han focalizado en el efecto de los mismos a nivel gástrico. El presente trabajo, demuestra que estos ácidos y fundamentalmente el lactato también contribuyen a la regulación de la respuesta inflamatoria en células epiteliales gástricas, atribuyéndole así un nuevo alegato de salud a este metabolito común que está presente en todos los productos lácteos fermentados con lactobacilos.

1.4. Estudio de los mecanismos celulares involucrados en el efecto biológico de la FNM de las leches fermentadas y el lactato en células AGS

1.4.1. Efecto en la activación del factor nuclear kappa-B (NF-κB)

Para evaluar si el mecanismo de acción del lactato en células gástricas está mediado por la inhibición de la vía NFκB, se realizó una transfección transiente de las células AGS con el gen reportero luciferasa de luciérnaga bajo el dominio del promotor 3kB, un promotor artificial que posee tres sitios de unión a NF-κB en tándem. La unión de un ligando PAMP como la flagelina a su TLR dará lugar al inicio de una cascada de señalización que termina activando factores de transcripción como el NF-κB y promoviendo consecuentemente la expresión de la luciferasa de luciérnaga. Además, las células fueron transfectadas en simultáneo con una segunda construcción con el gen reportero luciferasa de *Renilla* spp. bajo el dominio del promotor constitutivo Timidina quinasa de herpesvirus (HSV-Tk)(Figura 49.A). Esta segunda construcción fue utilizada para normalizar las medidas de acuerdo al éxito de transfección en cada fosa de cultivo.



En la Figura 49.B se puede observar que las células transfectadas estimuladas con flagelina aumentan significativamente la expresión de la luciferasa, lo que indica una activación de la vía NFκB. Por otro lado, la preincubación de las células transfectadas con la FNM 8339 conduce a una reducción de la expresión de la luciferasa hasta niveles comparables con la condición basal, es decir que la FNM 8339 es capaz de inhibir la activación de la vía del NFκB. Resultados similares se obtuvieron cuando las células fueron preincubadas con una solución de lactato 100 mM, indicando el rol protagónico de este metabolito en la capacidad moduladora de la FNM. La inhibición de este factor de transcripción conduce consecuentemente a la modulación de la expresión de diversas citoquinas proinflamatorias como IL-8.

Tabla 28. Porcentaje de luminiscencia promedio normalizada de células AGS transfectadas con el gen reportero luciferasa de luciérnaga bajo el dominio del promotor 3kB, preincubadas con soluciones de lactato y estimuladas con FliC 0,5 µg/ml

| FliC 0,5µg/ml | % Luminiscencia promedio normalizada |
|-----------------------|--------------------------------------|
| DMEM | 100,0±3,34 |
| Lactato 10 mM | 66,5±1,97 |
| Lactato 50 mM | 40,1±3,29* |
| Lactato 100 mM | 47,1±5,15* |

*Indica diferencias significativas respecto al control (DMEM)

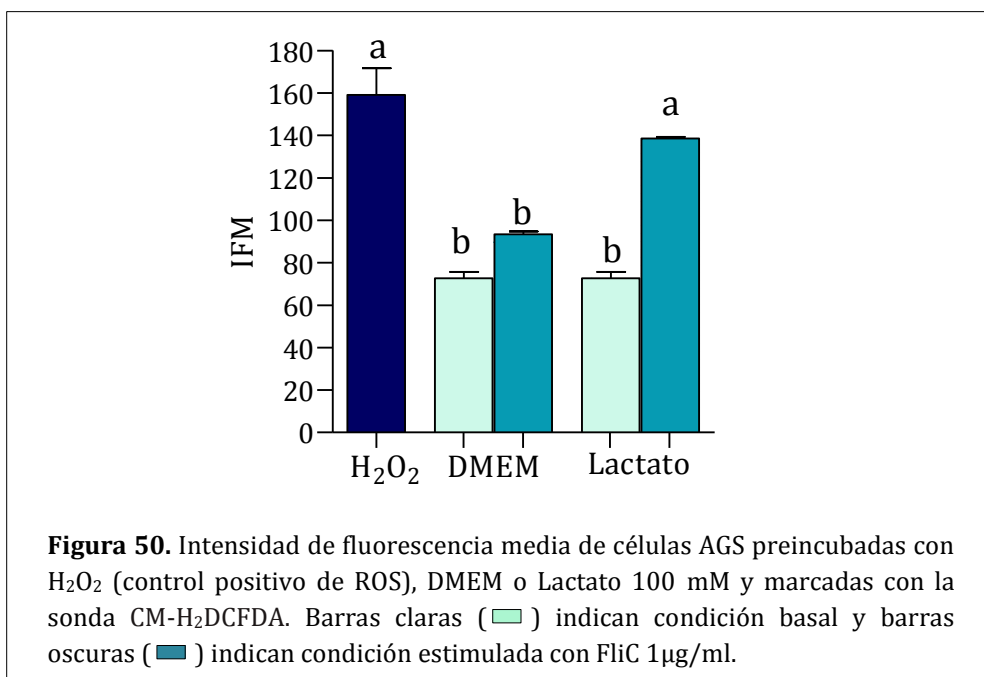
En la Tabla 28 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de lactato apreciándose que la solución de lactato 10 mM no es capaz de reducir significativamente la expresión de la luciferasa a diferencia de las soluciones de 50 y 100 mM. Estos resultados correlacionan bien con la capacidad moduladora evidenciada para el lactato donde se observó que las soluciones de concentración menor a 25 mM no logran reducir la expresión de IL-8, probablemente debido a que la concentración del metabolito no es lo suficientemente alta como para inhibir la vía NFκB.

Varios autores han logrado demostrar que el efecto inmunomodulador ejercido por los lactobacilos y/o sus metabolitos en células gástricas está mediado por una inhibición de la activación de la vía NFκB, lo que conduce a una reducción de la expresión de citoquinas proinflamatorias (Takeda et al., 2017; Yang et al., 2012; Zhou et al., 2008). Asimismo, la inhibición de la vía NFκB en células gástricas por parte de la FNM 8339 y del lactato resulta de interés no solo por el efecto antiinflamatorio que ejerce sino también porque podría tener un rol importante en la inhibición de la carcinogénesis debida a la infección con *H. pylori*. Chavarria Velázquez et al (2017) evidenciaron que la estimulación de células AGS con LPS de *H. pylori* daba lugar a la activación de vía NFκB por unión al TLR2. Como

consecuencia, se evidenciaba un incremento de la expresión TLR2 y de las claudinas 4, 6, 7 y 9 que están involucradas en la diferenciación de las células epiteliales a células malignas. De esa manera, el lactato presente en las leches fermentadas o producido *in situ* por los microorganismos probióticos podría inhibir la activación de la vía NFκB reduciendo el riesgo de desarrollar cáncer de estómago en pacientes infectados con *H. pylori*.

1.4.2. Modificación del estado redox celular

Se evaluó la capacidad del lactato de modificar el estado redox en células AGS. Para ello las células fueron preincubadas durante 1h con FliC y FliC + Lactato 100 mM y luego marcadas con una sonda la cual es capaz de ingresar a la célula y en presencia de ROS oxidarse dando un producto fluorescente. De esa manera, la intensidad de fluorescencia emitida será directamente proporcional a la concentración de ROS intracelular. Como se muestra en la Figura 50, la presencia de lactato 100 mM en ausencia de flagelina (condición basal) no dio lugar a cambios en la producción de ROS intracelular. Sin embargo, cuando las células fueron preincubadas con lactato 100 mM + FliC se produjo un aumento significativo de ROS respecto al control, alcanzándose niveles de intensidad de fluorescencia media (IFM) similares a los obtenidos con H₂O₂.



En células epiteliales intestinales se ha descrito que la producción de ROS inducida con *L. rhamnosus* GG (LGG) (Lin et al., 2009) y con butirato (Kumar et al., 2009) genera un efecto inhibitorio sobre la vía NFκB. Así, los cambios en la producción de ROS inducidos con lactato en células gástricas podrían llegar a ser uno de los mecanismos involucrados en la

inhibición de NFκB y la consecuente modulación de la respuesta inmune innata. Por este motivo, se procedió a evaluar si la presencia de H₂O₂ o de N-acetilcisteína (NAC) modificaban el efecto modulador del lactato sobre la producción de IL-8. Para ello, las células AGS fueron preincubadas con distintas concentraciones de H₂O₂ (30 min) o NAC (1 h) y luego tratadas con FliC o FliC + Lactato 100 mM (Tabla 29).

Tabla 29. Efecto del H₂O₂ y NAC sobre la capacidad moduladora del lactato en células AGS.

| Condición | Niveles IL-8 (pg/ml) | | Porcentaje de modulación |
|--------------------------------------|----------------------|------------------|--------------------------|
| | FliC | FliC +Lac 100 mM | |
| DMEM | 4289,94 | 841,19 | 80,4 |
| H ₂ O ₂ 0,5 mM | 3237,74 | 1137,42 | 64,8* |
| H ₂ O ₂ 1 mM | 9520,75* | 3169,06 | 66,7* |
| NAC 0,2 mM | 2896,86* | 486,79 | 79,8 |
| NAC 2 mM | 2755,97* | 662,26 | 76,0 |
| NAC 20 mM | 2896,86* | 486,79 | 72,4 |

$$\text{Porcentaje de modulación} = \frac{IL-8 (FliC+Lac100)}{IL-8 (FliC)} \times 100$$

* Indica diferencias significativas respecto al control

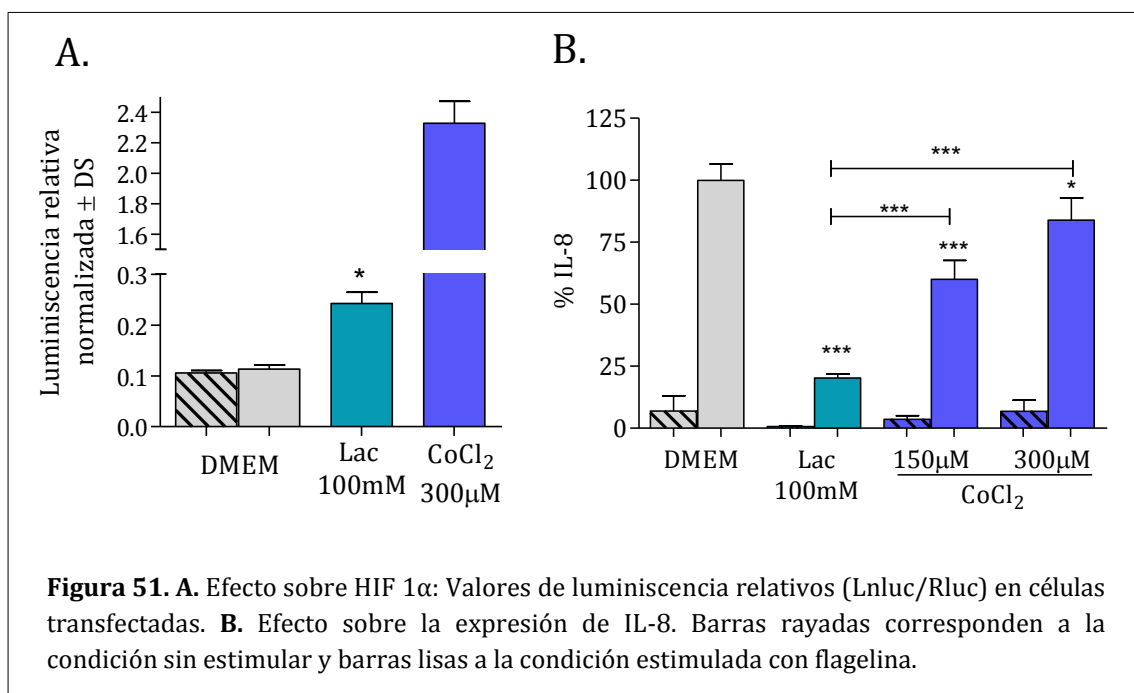
La preincubación de las células con H₂O₂ 1 mM dio lugar a un aumento significativo de IL-8 cuando las células fueron estimuladas con FliC, lo que indicaría que la producción de ROS intracelular inducido por H₂O₂ potencia la respuesta inflamatoria. Cuando se agrega FliC + Lactato 100 mM a las células tratadas con H₂O₂ 0,5 o 1 mM se observa una modulación significativa de la respuesta inflamatoria, aunque el porcentaje de modulación es levemente menor al obtenido en ausencia de H₂O₂. Por el contrario el tratamiento de las células con NAC y flagelina da lugar a un aumento de IL-8 significativamente menor respecto al control, es decir que la actividad antioxidante y *scavenger* del NAC sobre ROS reduce la respuesta inflamatoria inducida con FliC. La presencia de Lactato 100 mM reduce los niveles de IL-8, con porcentajes de modulación del 72-80%, similares a los obtenidos en ausencia de NAC. Estos resultados, indican que el aumento de ROS inducido por el lactato 100 mM evidenciado previamente no sería uno de los mecanismos responsables del efecto modulador de la expresión de IL-8, ya que la presencia de H₂O₂ que aumenta la formación de ROS aún más, no potencia el efecto del lactato sino que por el contrario lo reduce. Del mismo modo, la presencia de NAC, una molécula que actúa como *scavenger* de ROS no reduce el efecto del lactato, lo que confirma que la generación de especies reactivas de oxígeno no sería el mecanismo principal del efecto antiinflamatorio del lactato en células gástricas.

1.4.3. Efecto del lactato sobre el Factor Inducible por Hipoxia 1 (HIF)

Asimismo, se evaluó el efecto del lactato sobre el factor inducible por hipoxia a nivel de las células epiteliales gástricas. Como un control positivo se utilizó CoCl₂ ya que es capaz de

aumentar los niveles citoplasmáticos de HIF1 α simulando un estado de hipoxia (Li et al., 2017). En la Figura 51.A se muestran los resultados obtenidos. La estimulación con flagelina de las células transfectadas no aumenta la estabilización de HIF1 α ya que no se observa un incremento significativo de la luminiscencia relativa respecto a la condición basal. Por otro lado, cuando las células son preincubadas con lactato 100 mM y luego estimuladas con flagelina, si bien no se alcanzan los niveles del control positivo, se observa un aumento significativo de la luminiscencia indicando que el lactato favorece la activación del factor de transcripción HIF1.

Para evaluar si la activación de HIF podría ser responsable del efecto modulador del lactato, se estudió el efecto del CoCl₂ sobre la expresión de IL-8. Como se muestra en la Figura 51.B, la preincubación de las células con CoCl₂ antes del estímulo con FliC, da lugar a una menor expresión de la citoquina IL-8 respecto al control. Sin embargo, la modulación observada es significativamente menor a la inducida con lactato 100 mM, con lo cual es posible concluir que la capacidad de activación de HIF contribuye sólo en parte al efecto inmunomodulador del lactato.



Este factor de transcripción ha sido identificado como un regulador clave de la respuesta inmune y la inflamación. Si bien no se ha evidenciado un efecto directo de HIF sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias, existe una relación entre la condición de hipoxia y la activación de la vía NF κ B debido a que esta vía también es regulada por las prolil y asparagin hidroxilasas. Así, en condiciones de hipoxia, las enzimas hidroxilasas se inhiben, lo que daría lugar a la activación de NF κ B y la expresión de citoquinas proinflamatorias

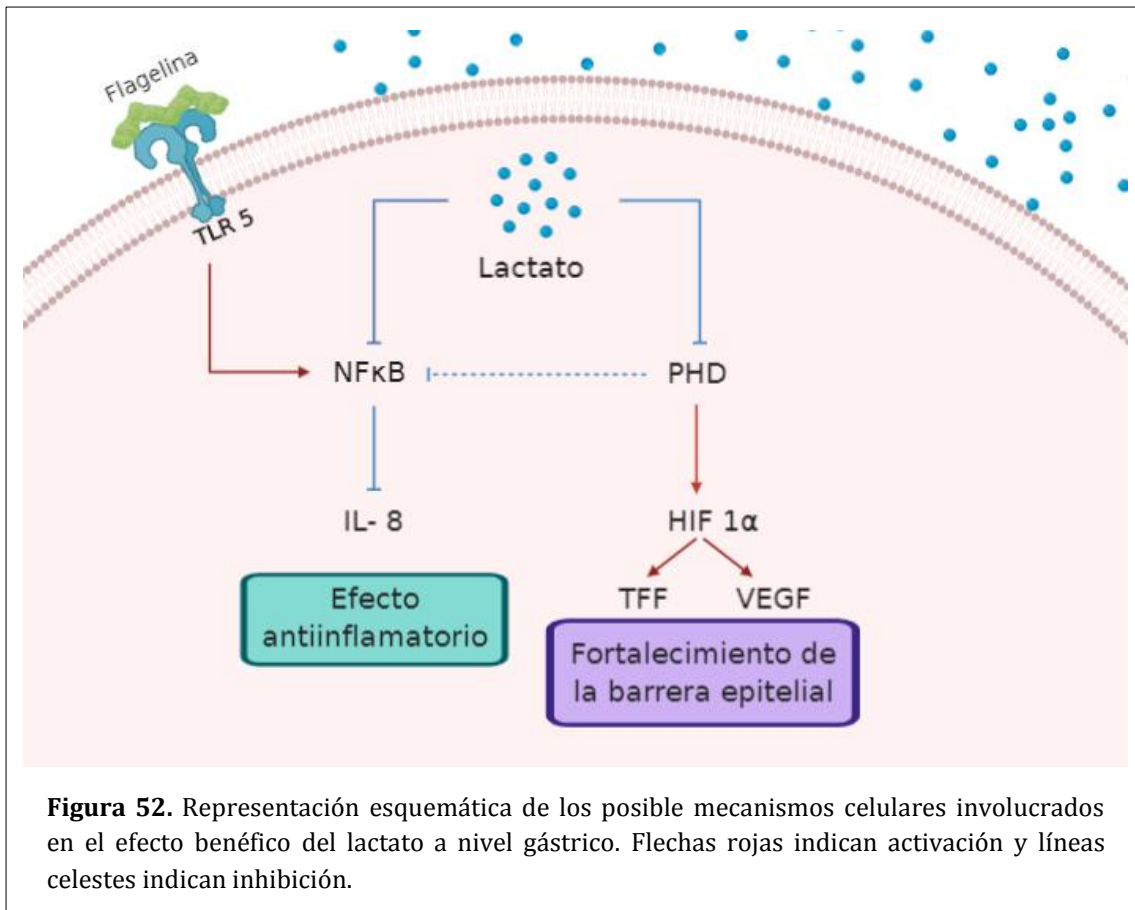
(Cummins et al., 2016). Sin embargo, si bien la hipoxia puede dar lugar a la activación de la vía, se ha evidenciado que el efecto neto de la inhibición de las prolihidroxilasas en un contexto de inflamación inducido con LPS o IL-1 β reduce la señal de la vía NF κ B (Hams et al., 2011; Scholz y Taylor, 2013; Takeda et al., 2009). Similarmente, el lactato dio lugar a un aumento de la activación de HIF y una inhibición de la vía NF κ B en un estado inflamatorio inducido con flagelina por lo que podría pensarse que uno de los mecanismos de acción del lactato involucra la inhibición de las prolihidroxilasas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que esta inhibición de PHD no constituye el mecanismo principal de modulación de la vía NF κ B ya que la inhibición de PHD con CoCl₂, un compuesto que mimetiza la hipoxia celular, genera una leve modulación de IL-8 en comparación con el lactato. Es decir que la modulación del lactato de la vía NF κ B y de IL-8 está dada en parte por la inhibición de las PHD pero involucra también otros mecanismos celulares. Además de los niveles de O₂, las enzimas PHD son dependientes de Fe⁺² y 2 o-xoglutarato (Berra, 2003). Así en condiciones de normoxia, la inhibición de estas enzimas puede estar dada por la producción de ROS y NOS (que alteran el estado redox del Fe) o la acumulación de compuestos metabólicos que compiten con el 2 oxoglutarato (De Saedeleer et al., 2012). La inhibición sobre las PHD y la activación de HIF por acción del lactato en condiciones de normoxia ya ha sido evidenciado previamente (De Saedeleer et al., 2012; Sonveaux et al., 2012). Los autores propusieron que este efecto se debía a la conversión de lactato en piruvato por acción de la enzima lactato deshidrogenasa. De esa manera, el piruvato acumulado compite con el 2-oxoglutarato por el sitio de unión en las PHD inhibiéndolas (Sonveaux et al., 2012).

El rol de HIF en la inflamación ha sido estudiado ampliamente en células inmunes y de epitelio intestinal. En condiciones de inflamación crónica, como en las EII, se genera un estado de hipoxia pronunciado a nivel de la mucosa intestinal como consecuencia del infiltrado de neutrófilos que consumen grandes cantidades de O₂ (Cummins et al., 2016). Karhausen et al. (2004) fueron los primeros en poner en evidenciar el rol de HIF 1 α a nivel del epitelio intestinal. Los autores demostraron que los ratones deficientes en HIF1 α en epitelio intestinal eran más susceptibles al desarrollo de colitis inducida con TNBS. Mas aún, el deficit en VHL involucrado en la ubiquitinación de HIF1 α protegió a los ratones frente al desarrollo de colitis concluyendo que la activación de HIF a nivel del epitelio en condiciones de inflamación intestinal ejerce un efecto protector. Del mismo modo, el uso de inhibidores de prolihidroxilasas que conduce a la activación de HIF ha demostrado tener un claro efecto antiinflamatorio a nivel del tractogastrointestinal en modelos *in vivo* e incluso se ha propuesto la aplicación de estos inhibidores para el tratamiento en enfermedades inflamatorias crónicas (Eltzschig et al., 2014; Manresa y Taylor, 2017). El efecto protector de la activación de HIF ha sido explicado fundamentalmente por el

fortalecimiento de la barrera epitelial (Glover et al., 2016; Manresa y Taylor, 2017) que se genera en parte por la regulación de uniones estrechas. El gen que codifica para Claudina 1 tiene en su promotor secuencias HRE de manera tal que su expresión es inducible por HIF (Saeedi et al., 2015). Además, la activación de HIF logra fortalecer la barrera intestinal al inducir la expresión de componentes protectores de la capa de mucus como mucina, intestinal trefoil factor (Louis et al., 2006) y defensinas (Kelly et al., 2013).

En cuanto al rol de HIF a nivel del epitelio gástrico, se evidencian discrepancias respecto a si su activación es beneficiosa o perjudicial frente a una situación de inflamación de la mucosa. Esta discrepancia puede tener que ver con el origen de la inflamación. En la infección con *H. pylori* se produce una activación de HIF como consecuencia de la producción de ROS, la cual ha sido asociada al desarrollo de cáncer (Griffiths et al., 2005; Park et al., 2003). De hecho, en pacientes con cáncer gástrico la activación de HIF se ha correlacionado con el desarrollo de tumores más invasivos y un pronóstico más desfavorable (Kitajima y Miyazaki, 2013). Por otro lado, en un modelo de gastritis inducida con aspirina, se observó que las zonas dañadas de la mucosa presentaban hipoxia y un aumento en la expresión de trefoil factor (TFF) inducido por HIF (Hernández et al., 2009). Resultados similares fueron obtenidos por Ortiz-Masiá et al., (2010). TFF es un péptido que mejora la formación y estabilización de la capa de mucus y promueve el proceso de restitución de la integridad de la barrera epitelial (Hoffmann, 2005). En ratas tratadas con indometacina la administración oral y subcutánea de Dimetiloxalilglicina (DMOG), un inhibidor de las prolil hidroxilasas, redujo el daño de la mucosa gástrica. Este proceso era dependiente de la activación de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) inducida por HIF que favorece la migración y proliferación de células epiteliales gástricas (Marchbank et al., 2011). Así, la activación de HIF sería desfavorable en situaciones de infecciones con *H. pylori* y cáncer gástrico pero beneficioso en condiciones de gastritis y úlceras gástricas generadas por agentes nocivos acelerando el proceso de recuperación de tejido dañado.

En la Figura 52 se muestra una representación esquemática de los posible mecanismos celulares estudiados en el presente trabajo que estarían involucrados en el efecto benéfico del lactato a nivel gástrico.



El lactato modula la respuesta inmune a nivel de células epiteliales gástricas inducida con flagelina al inhibir la vía NFκB con la consecuente inhibición de la expresión de IL-8. Además, el lactato podría estar generando una inhibición de las prolilhidroxilasas que da lugar a la activación de HIF y también modularía la vía NFκB. Mas aún, la activación de HIF puede favorecer la regeneración y el fortalecimiento de la barrera epitelial mediante la inducción de la expresión de TFF y VEGF en condiciones de gastritis inducidas por agentes tóxicos. Así, el lactato, uno de los metabolitos mayoritarios presentes en las leches fermentadas, sería capaz de reducir la inflamación y favorecer la recuperación del tejido dañado en personas con gastritis.

2. Evaluación de la capacidad gastroprotectora *in vivo*

2.1. Puesta a punto de un modelo murino para la evaluación de gastritis

Para poner a punto el modelo murino de gastritis se trabajó con ratones Balb/c machos de 6-7 semanas de edad. Se utilizaron diferentes agentes y dosis de manera tal de encontrar una combinación adecuada en la que se logre generar un daño reproducible a nivel de la mucosa gástrica, pero evitando que sea demasiado agresivo. Para ello se tomaron como base distintos modelos publicados en la literatura y en caso necesario se modificaron o adaptaron de acuerdo a nuestro criterio. Los modelos ensayados se muestran resumidos

en la Tabla 30. Como criterio para seleccionar el modelo más apropiado se tuvo en cuenta el estado general de los ratones a lo largo del ensayo y fundamentalmente el *score* de daño histológico observado en cortes de estómago teñidos con hematoxilina y eosina.

Tabla 30. Resumen de los modelos murinos de gastritis ensayados

| Agente agresivo | Dosis* | Sacrificio | Resultado | Referencia |
|---|--|--------------------------|---|---|
| Etanol 50% v/v | 1 por día (durante 4 días) | 5to día | No se observa daño | Andrade et al., 2006 |
| Etanol 60% v/v | 1 por día (durante 4 días) | 4to día, 2 h post gavage | Tratamiento muy agresivo | Andrade et al., 2006 con modificaciones |
| LPS de <i>E.coli</i> 100 µg/ml | 1 dosis | 24 h post gavage | Mucha dispersión dentro del grupo. No hay daño significativo | Slomiany et al., 2000 |
| LPS de <i>E.coli</i> 100 µg/ml en Etanol 30% v/v | 1 dosis | 24 h post gavage | Mucha dispersión dentro del grupo. No hay daño significativo | Slomiany et al., 2000 |
| FliC 200 µg | 1 dosis | 16 h post gavage | No se observa daño | |
| Etanol 50% v/v + FliC 200 µg | 1 dosis Etanol 1 dosis FliC (2h post Etanol) | 16 h post gavage | Dispersión dentro del grupo | |
| Etanol 60% v/v + FliC 200 µg | 1 dosis Etanol. 1 dosis FliC (2h post Etanol) | 16 h post gavage | Daño en un ensayo y ausencia de daño en otro. No reproducible | |
| Etanol 96% v/v | 1 dosis | 2 h post gavage | Tratamiento muy agresivo | Etani et al., 2017 |
| Etanol 60% v/v + HCl 0,15M | 1 dosis | 2 h post gavage | Daño significativo con poca dispersión | Amirshahrokhi y Khalili, 2015 |

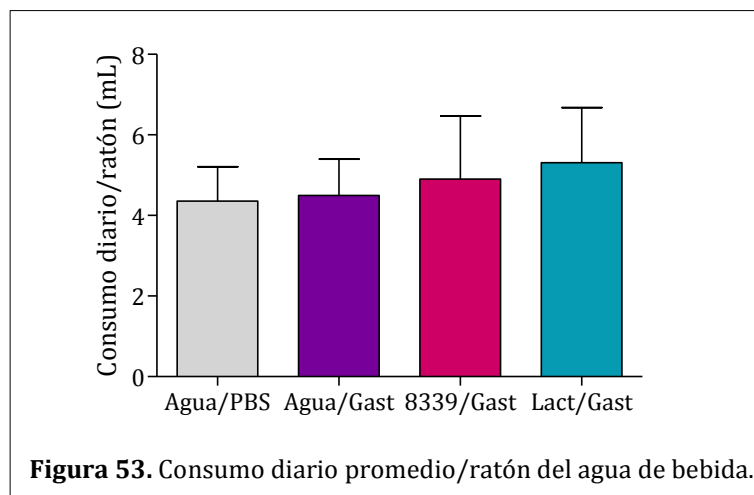
*Cada dosis corresponde a 200µl/ratón

En base a los resultados obtenidos se seleccionó como modelo de gastritis el propuesto por Amirshahrokhi y Khalili (2015) utilizando Etanol 60 % v/v + HCl 0,15 M como agente de daño ya que permitió obtener estómagos con un daño significativo y reproducible, observándose poca dispersión dentro del grupo.

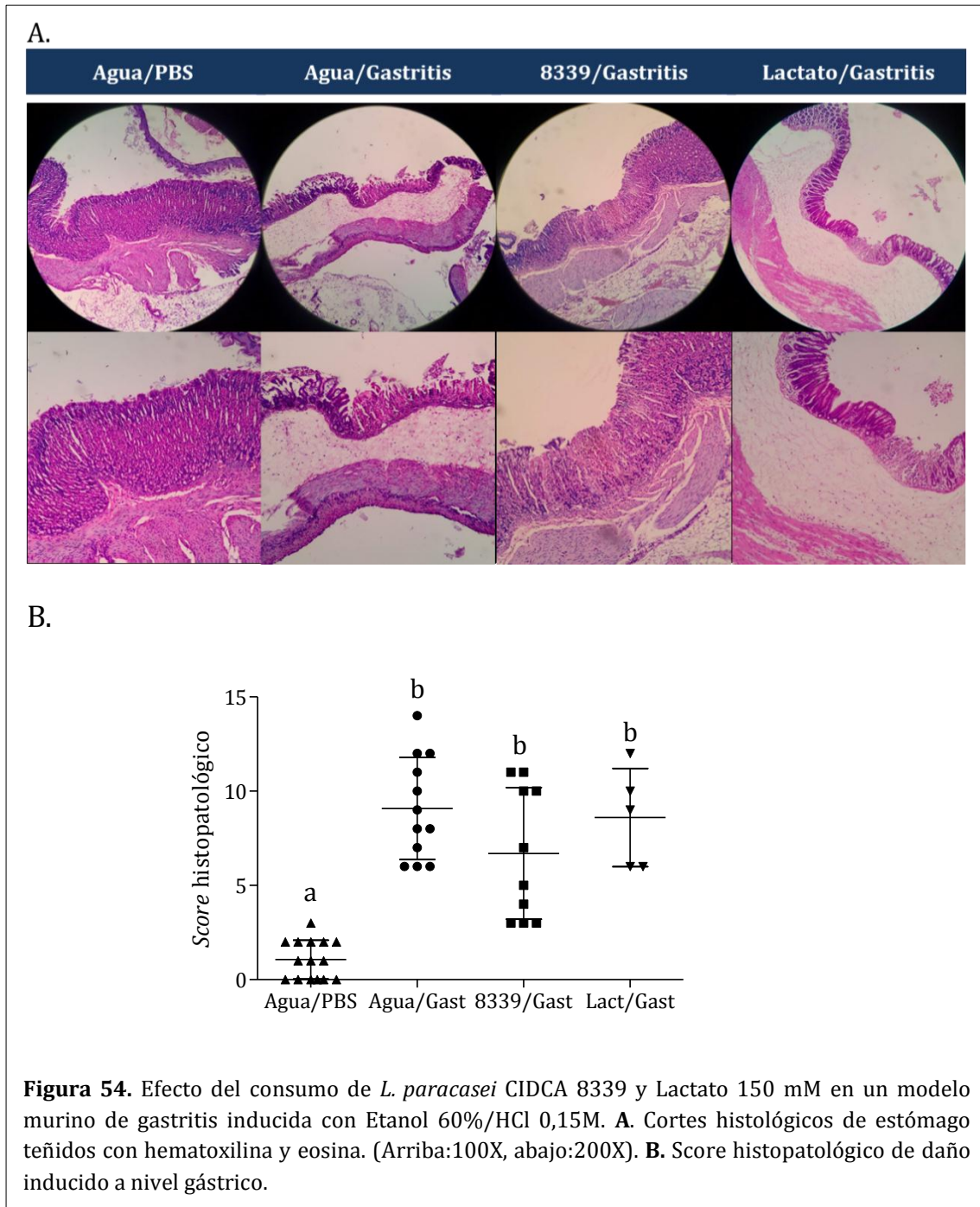
2.2. Evaluación de la capacidad gastroprotectora de *L. paracasei* CIDCA 8339

Una vez puesto a punto el modelo de gastritis se evaluó la capacidad gastroprotectora de una suspensión de *L. paracasei* CIDCA 8339 y de una solución de lactato 150 mM las cuales fueron administradas *ad libitum* en el agua de bebida durante 3 días consecutivos previo a la inducción de la gastritis.

La suspensión de *L. paracasei* CIDCA 8339 y la solución de lactato fueron renovadas diariamente. El volumen de consumo diario/ratón de la suspensión de *L. paracasei* CIDCA 8339 y de lactato 150 mM fueron de aproximadamente 5 ml, equivalente al consumo de agua de los grupos Gastritis y Control PBS (Figura 53). Se determinó la concentración de microorganismos viables antes y después de ser administrados observándose que no había diferencias significativas, lo que indica que la bacteria mantiene la viabilidad en PBS a temperatura ambiente durante el periodo de administración (datos no mostrados). La concentración de *L. paracasei* en la suspensión fue de aproximadamente $2,2 \cdot 10^9$ UFC/ml lo que significaría una dosis diaria de microorganismo probiótico de aproximadamente $1 \cdot 10^{10}$ UFC/ratón.



Luego de tres días consecutivos de consumo, se procedió a inducir el daño a nivel gástrico con Etanol 60% v/v y HCl 0,15 M. Transcurridas 2 h luego del segundo gavage se realizó el sacrificio y se recolectó el estómago para el análisis histopatológico. En la Figura 54 se muestran fotos representativas de cada grupo y el *score* histopatológico asignado a cada grupo experimental.



Como se puede observar, el tratamiento con Etanol 60% v/v + HCl 0,15M dio lugar a un *score* de daño de $9,08 \pm 2,712$ significativamente mayor al obtenido en el grupo Control que recibió 2 gavage de PBS ($1,07 \pm 1,033$). El daño inducido por el etanol y HCl estaba caracterizado fundamentalmente por una alteración o pérdida completa de la estructura de las glándulas acompañado de leve edema y hemorragia en algunas zonas de la mucosa. Asimismo, se evidenciaba edema y leve infiltrado a nivel de la submucosa (Figura 54.A). El consumo de *L. paracasei* CIDCA 8339 ($6,70 \pm 3,50$) o Lactato 150 mM ($8,60 \pm 2,61$) previo a la inducción de gastritis no dio lugar a una reducción significativa en el *score*

histopatológico del grupo. Sin embargo, si se observan los valores de *score* individuales para cada ratón es posible apreciar que el 50% de los ratones que consumieron *L. paracasei* CIDCA 8339 presentaron alteraciones histopatológicas muy leves con *scores* de daño menores a la media del grupo Gastritis y cercanos al *score* del grupo Control. Por lo que, a pesar de la dispersión obtenida para los individuos dentro del grupo debido a la variabilidad biológica existente y de respuesta frente al tratamiento, podría atribuirse a *L. paracasei* CIDCA 8339 un efecto protector evidenciado en el 50% de la población. Las diferencias en la respuesta frente al consumo de la bacteria entre los distintos individuos puede deberse a que la bacteria se administró en el agua de bebida y eso puede dar lugar a dosis de probiótico diferentes dependiendo del consumo de cada ratón. En la mayoría de los estudios reportados en la literatura donde se observa un efecto gastroprotector, el probiótico es administrado por gavage de manera tal de lograr una dosis equivalente en todos los ratones (Oliveira et al., 2019; Senol et al., 2011; Suo et al., 2016). Sin embargo en el presente trabajo, se prefirió la administración en el agua de bebida porque consideramos que simula mejor el consumo habitual de un alimento con probióticos.

El consumo excesivo de alcohol constituye un importante problema de salud pública a nivel mundial y está relacionado con el riesgo de desarrollo de varias enfermedades (World Health Organization, 2004). El abuso de las bebidas con alta graduación alcohólica generan un daño directo sobre la mucosa del tubo digestivo, lo que resulta en un daño e inflamación agudo o crónico, dando lugar a patologías como la gastritis hemorrágica erosiva y la formación de úlceras. El etanol puede causar un desequilibrio entre algunos factores agresivos y citoprotectores endógenos tales como la reducción de la capa de mucus protectora, la inducción de la formación de ROS y la peroxidación lipídica (Li et al., 2018; Oliveira et al., 2019; Suo et al., 2016). De esa forma, resulta de interés encontrar cepas probióticas que contrarresten el efecto nocivo de este compuesto.

El efecto de bacterias probióticas en modelos de gastritis *in vivo* inducidos con agentes tóxicos ha sido previamente estudiado y diversos mecanismos de acción han sido atribuidos a cada cepa. En un ensayo de gastritis con Etanol/HCl se evidenció que la administración oral de la cepa *B. longum* BF1 reducía el daño producido en la mucosa al favorecer la producción de mucus (Gomi et al., 2013). Similarmente, *L. rhamnosus* GG inhibió la reducción de secreción mucus asociada al consumo de etanol, fortaleció la barrera epitelial y redujo la apoptosis celular en la mucosa gástrica, efecto atribuido al aumento de la actividad de PGE2 (Lam et al., 2007). *L. fermentum* Suo (Suo et al., 2016), *L. reuteri* DSM 17938 (Oliveira et al., 2019) y *L. reuteri* F-9-35 (Sun et al., 2018), por su parte, fueron capaces de aliviar el daño gástrico inducido con etanol al reducir el estrés

oxidativo. Además, *L. fermentum* Suo y *L. reuteri* F-9-35 ejercieron un efecto antiinflamatorio al disminuir la expresión de citoquinas proinflamatorias. En base a esto se concluye que si bien el efecto gastroprotector de los probióticos es cepa específico, en general puede ser atribuido su efecto antioxidante y antiinflamatorio o a la capacidad de reforzar la barrera intestinal favoreciendo la producción de mucus. Sin embargo, ninguno de estos estudios ha logrado dilucidar si el efecto gastroprotector es ejercido por alguna molécula de superficie bacteriana que interacciona a nivel de la mucosa o por algún metabolito producido por la bacteria *in situ* o en el alimento. En el caso de la leche fermentada con la cepa *Streptococcus thermophilus* CRL 1190, en cambio, el efecto protector en un modelo de gastritis inducido con ácido acetil salicílico pudo ser atribuido al EPS, ya que el EPS aislado presentó un efecto gastroprotector equivalente al de la leche fermentada. Además, los autores descartaron al ácido láctico como metabolito responsable del efecto (Rodríguez et al., 2010). En el presente trabajo, se pudo demostrar mediante ensayos *in vitro* que el ácido láctico sintetizado por la bacteria podría tener un efecto gastroprotector al ejercer un efecto antiinflamatorio y al inducir la activación de HIF lo que podría fortalecer la barrera epitelial. Sin embargo, los resultados del ensayo *in vivo* no correlacionaron bien ya que el consumo de una solución de lactato 150 mM no fue capaz de proteger la mucosa frente a la acción del etanol y HCl. Esto indica que el efecto gastroprotector *in vivo* ejercido por *L. paracasei* CIDCA 8339 involucra la interacción directa del microorganismo probiótico con la mucosa gástrica o la producción de otros metabolitos *in situ* que favorecen ya sea la modulación de la respuesta inflamatoria, la reducción del estrés oxidativo o la recuperación y el fortalecimiento de la mucosa intestinal.

CONCLUSIONES

- Las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 no presentaron la capacidad de modular la respuesta inmune innata en células de epitelio gástrico pero sí a nivel intestinal, siendo el efecto de la cepa CIDCA 8339 significativamente mayor.
- La fracción no microbiana de las leches fermentadas con las tres cepas modularon la expresión de citoquinas pro-inflamatorias IL-8 y CCL20 inducida por FliC en células epiteliales gástricas e intestinales respectivamente. Dicho efecto pudo ser atribuido a los ácidos orgánicos presentes en la FNM producidos por la bacteria durante la fermentación.
- Si bien tanto el lactato como el acetato modularon la respuesta inflamatoria en células AGS de forma dosis dependiente, se puede concluir que el efecto de la FNM es ejercido por el lactato ya que el acetato se encuentra en concentraciones bajas con las que no se observó efecto modulador.
- Se evidenció un aumento significativo de la producción ROS en células gástricas tratadas con Lactato 100 mM y FliC. Sin embargo, la inhibición de la expresión de IL-8 ejercida por el lactato no estaría mediada por el cambio en el estado redox celular.
- El efecto del lactato en células gástricas está mediado principalmente por la inhibición de la vía NFκB y en menor medida por la activación de HIF 1α. Si bien la activación de HIF1α no constituye el principal mecanismo de modulación de la expresión de citoquinas proinflamatorias, sería favorable en situaciones de gastritis al favorecer el fortalecimiento de la barrera epitelial.
- El uso de Etanol 60% v/v y HCl 0,1M permitió generar un daño significativo y reproducible a nivel de la mucosa gástrica en ratones Balb/c machos de 6-7 semanas de edad.
- En un modelo murino de gastritis, el consumo de una solución de Lactato 150 mM no fue capaz de proteger la mucosa frente al daño ejercido por el etanol y HCl. Por el contrario, *L. paracasei* CIDCA 8339 presentó un efecto gastroprotector en el 50% de los individuos ensayados.

A row of test tubes containing a white liquid, with a pipette dispensing more of the liquid into the tubes. The background is a blurred laboratory setting.

CONCLUSIONES GENERALES

El desarrollo de nuevos alimentos funcionales se ha convertido en una de las áreas de investigación e innovación de mayor interés para la industria alimentaria. Dentro de los alimentos funcionales, se destacan las leches fermentadas con microorganismos probióticos cuyo consumo ha sido asociado con diversos efectos beneficiosos sobre la salud, que podrían ser ejercidos por la presencia de los microorganismos probióticos y/o los metabolitos bioactivos presentes, producto de la fermentación de la leche. Las bacterias ácido lácticas se han convertido en los principales candidatos para el desarrollo de leches fermentadas funcionales a nivel mundial. En este sentido, la demanda constante por parte de la industria, lleva a la búsqueda de nuevas cepas que puedan ser utilizadas como *starter* para la obtención de nuevos productos con buenas propiedades probióticas y tecnológicas. Teniendo en cuenta esto, en el presente trabajo se analizó la potencialidad probiótica de tres cepas de *L. paracasei* productoras de exopolisacárido aisladas de kefir para la obtención de leches fermentadas funcionales con propiedades antiinflamatorias a nivel del tracto gastrointestinal.

Se trabajó con las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 y se evaluó su capacidad de crecer en leche en distintas condiciones de cultivo con el objetivo de encontrar la condición más favorable para la bacteria, en la que se logre un rápido crecimiento del microorganismo acompañado de una buena producción de metabolitos bioactivos, en particular ácidos orgánicos y exopolisacáridos. Las tres cepas fueron capaces de crecer en leche obteniéndose coágulos ácidos al cabo de 24 h de fermentación a 37 °C, dando lugar a leches fermentadas firmes y sin sinéresis. No se observaron diferencias significativas en el pH final alcanzado ni en la producción de ácido láctico; sin embargo, la cepa CIDCA 83123 produjo concentraciones significativamente mayores de ácido acético. Por otro lado, la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 83124 fue la que presentó mayor viscosidad.

El cultivo de los lactobacilos junto con levaduras o sus sobrenadantes no modificó la capacidad de las cepas de *L. paracasei* de crecer en leche y al cabo de 24 h se obtuvieron leches fermentadas de pH, concentraciones de ácidos orgánicos y viscosidades semejantes a los de los cultivos puros. A diferencia de *S. cerevisiae*, las cepas de *K. marxianus* ensayadas fermentan la lactosa de la leche y producen CO₂ y etanol que alteran las características organolépticas del producto.

Al evaluar el efecto de la temperatura de crecimiento se observó que, si bien para las tres cepas se logra alcanzar valores de pH y niveles de ácido láctico y acético similares en todas las condiciones, los tiempos de fermentación requeridos son más prolongados a medida que disminuye la temperatura de crecimiento. *L. paracasei* CIDCA 83123 presentó una velocidad de crecimiento y acidificación significativamente menor en comparación con *L.*

paracasei CIDCA 8339 y CIDCA 83124 requiriendo tiempos muy prolongados para formar el coágulo ácido de caseína. Esto constituye una desventaja tecnológica de *L. paracasei* CIDCA 83123 para ser utilizada a nivel industrial, donde se buscan cepas de rápido crecimiento.

Cuando se estudiaron los EPS sintetizados por *L. paracasei* se evidenció que las tres cepas producen EPS con distinta distribución de pesos moleculares y que su estructura es influenciada por el medio de cultivo y la temperatura. El efecto de la temperatura sobre el EPS se evidenció tanto en medio MRS como en leche observándose un aumento de las fracciones de mayor peso molecular al disminuir la temperatura. Al estudiar la composición de azúcares de los EPS producidos en leche se pudo determinar que todos están compuestos por glucosa, galactosa, ramnosa, glucosamina y galactosamina pero en distinta proporción. La composición de los EPS se mantiene constante con la temperatura en el caso de *L. paracasei* CIDCA 8339 mientras que para *L. paracasei* CIDCA 83123 y CIDCA 83124 se evidencian cambios en la proporción de azúcares. Así, los EPS sintetizados por las cepas en diferentes condiciones de cultivo presentan estructuras distintas y probablemente difieran en cuanto a sus propiedades benéficas sobre la salud y en cuanto al efecto ejercido sobre las propiedades tecnológicas del producto. Los cambios en la estructura del EPS dieron lugar a un aumento en la viscosidad de las leches fermentadas con *L. paracasei* CIDCA 83124 a 20 y 30 °C en comparación con la leche fermentada a 37 °C, lo que indica que para esta cepa en particular la temperatura de fermentación podría ser utilizada como una estrategia para mejorar las propiedades tecnológicas del producto. Uno de los efectos beneficiosos atribuidos a los EPS es su capacidad prebiótica. En el presente trabajo se estudiaron los EPS producidos por *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83124 a 30 °C en leche mediante un ensayo de fermentación *in vitro* con homogenatos fecales, donde se evidenció un aumento significativo de AGCC (butirato y propionato) y una reducción de la población de enterobacterias. Así, el uso de estas cepas productoras de EPS no sólo podría mejorar las propiedades tecnológicas de las leches fermentadas, sino también las propiedades biológicas debido al efecto prebiótico del polímero.

Dado que las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 demostraron ser prometedoras para su aplicación como *starters* en productos lácteos se procedió a estudiar su potencialidad probiótica de acuerdo a la normativa establecida por el CAA y la EFSA. Las tres cepas presentaron buena tolerancia a las condiciones gastrointestinales evidenciándose que el EPS que rodea a la bacteria cumple un rol protector importante frente a estas condiciones adversas. Además, las tres cepas fueron capaces de adherirse a células de epitelio gástrico e intestinal. Esto permitiría que los microorganismos lleguen viables al tracto gastrointestinal y tengan un mayor tiempo de residencia garantizando

una mayor interacción con el hospedador. Si bien las tres cepas presentaron buenas propiedades probióticas, la cepa CIDCA 8339 se destaca por presentar mayor tolerancia a las condiciones gastrointestinales y adhesión a células epiteliales. Se demostró también que los cambios en la estructura y la cantidad del EPS inducidos por la temperatura no afectan estas propiedades probióticas de las cepas lo que representa una ventaja para la industria alimenticia ya que permite la utilización de las mismas en alimentos funcionales con distintas condiciones de manufactura. Se demostró que las cepas son seguras para su aplicación en alimentos para consumo humano ya que presentaron ausencia de factores de virulencia, incluyendo hemolisinas y DNAasa, y ausencia de resistencia a antibióticos de importancia clínica. Asimismo, en un modelo murino se corroboró la inocuidad de la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 y su sobrenadante ya que su consumo no dio lugar a ningún efecto adverso en los ratones que lo ingirieron. Todos estos resultados demuestran que las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 cumplen con todos los requerimientos establecidos por la normativa alentando su utilización segura.

Una vez comprobado que las cepas *L. paracasei* presentan buena potencialidad probiótica para el desarrollo de leches fermentadas funcionales, se procedió a evaluar el efecto benéfico de las mismas focalizando en la capacidad antiinflamatoria a nivel de tracto gastrointestinal. Las cepas de *L. paracasei* modularon la respuesta inmune innata inducida por flagelina en células de epitelio intestinal y la fracción no microbiana de las mismas fue capaz de inhibir la respuesta inflamatoria en células epiteliales gástricas e intestinales. Dicho efecto se pudo atribuir al ácido láctico y acético presentes en la fracción no microbiana. Sin embargo, si bien tanto el lactato como el acetato modularon la respuesta inflamatoria en células AGS, se pudo concluir que el efecto de la FNM es ejercido por el lactato ya que las concentraciones de acetato no son lo suficientemente altas. Además, fue posible determinar que dicho efecto está mediado por la inhibición de la vía NFκB y la activación del factor de transcripción HIF1α, que podría ser explicada en parte por una inhibición de las prolihidroxilasas. Sin embargo, se requiere un estudio más exhaustivo para poder definir el mecanismo complejo por el cual el lactato modula la respuesta inflamatoria en células epiteliales gástricas. Finalmente, en un modelo murino de gastritis inducido con etanol y ácido se evidenció que si bien el consumo de una solución de lactato no ejerce un efecto protector, *L. paracasei* CIDCA 8339 reduce el daño de la mucosa gástrica frente al agente agresivo en el 50% de los individuos estudiados. Esto indica que el efecto gastroprotector *in vivo* ejercido por este lactobacilo involucra la interacción directa del microorganismo probiótico con la mucosa o la producción de otros metabolitos *in situ*.

Las enfermedades inflamatorias a nivel del tracto gastrointestinal constituyen un importante problema de salud a nivel mundial y dado que las terapias existentes hasta el momento traen asociados diversos efectos adversos, el uso de alimentos probióticos con propiedades antiinflamatorias surge como una posibilidad para complementar los tratamientos normalmente empleados en pacientes que sufren estas enfermedades. En este contexto, las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 productoras de EPS han demostrado ser potencialmente probióticas al cumplir con todos los requerimientos establecidos por la normativa y pueden ser utilizadas para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales. En particular, las cepas CIDCA 8339 y CIDCA 83124 poseen además buenas propiedades desde el punto de vista tecnológico, ya que presentan capacidad de alcanzar concentraciones 10^9 - 10^{10} UFC/ml en 24 h a 30 °C cumpliendo con los requisitos establecidos por el CAA para un alimento probiótico durante 5 meses de almacenamiento a 4 °C. Por otro lado, estas cepas producen buena cantidad de ácido láctico con propiedades antiinflamatorias y polisacáridos que mejoran la textura del producto. Más aún, el EPS producido por estas cepas ejerce un efecto prebiótico al modular la microbiota y favorecer la producción de AGCC *in situ*, contribuyendo a reducir el estado inflamatorio intestinal. Las leches fermentadas con *L. paracasei* presentaron propiedades antiinflamatorias en células epiteliales y el consumo de la cepa CIDCA 8339 demostró tener efecto gastroprotector *in vivo*. De esta manera, en los productos obtenidos con *L. paracasei* CIDCA 8339 o CIDCA 83124 coexisten una bacteria probiótica y un polisacárido potencialmente prebiótico, por lo que podrían considerarse como simbióticos de acuerdo a la definición actual.

Los resultados obtenidos permiten concluir que estas cepas probióticas son buenos candidatos para la obtención de leches fermentadas funcionales que podrían ser consumidas por pacientes con gastritis o enfermedades inflamatorias intestinales para reducir y aliviar la sintomatología asociada a estas patologías.

A row of six clear plastic test tubes is shown on a white surface. The first five tubes contain a white, opaque liquid. The sixth tube on the right is being filled with the same liquid from a white plastic bottle. The background is a blurred laboratory setting. A solid blue horizontal bar is at the top of the page, and a thin blue horizontal line is at the bottom.

APÉNDICE

1. Medios de cultivo bacteriano**Caldo MRS (Difco, USA)**

| Componente | Concentración (g/l) |
|---------------------------------|----------------------------|
| Peptona | 10 |
| Extracto de carne | 10 |
| Extracto de levadura | 5 |
| D(+) glucosa | 20 |
| K ₂ HPO ₄ | 2 |
| Tween 80 | 1 |
| Citrato ácido de amonio | 2 |
| Acetato de sodio | 5 |
| MgSO ₄ | 0,1 |
| MnSO ₄ | 0,05 |
| pH 6,5 ± 0,2 | |

Agar MRS (Difco, USA)

Caldo MRS adicionado con agar-agar en concentración 15 g/l.

Caldo YPD

| Componente | Concentración (g/l) |
|----------------------|----------------------------|
| Extracto de levadura | 10 |
| Peptona | 20 |
| Glucosa | 20 |

Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC) (Merck, Alemania)

| Componente | Concentración (g/l) |
|----------------------|----------------------------|
| Extracto de levadura | 5 |
| Glucosa | 20 |
| Cloranfenicol | 0,1 |
| Agar | 15 |
| pH 6,5 | |

Medio base para fermentación de homogenatos fecales

| Componente | Concentración (g/l) |
|---------------------------------|----------------------------|
| Agua peptonada | 2 |
| Extracto de levadura | 2 |
| NaCl | 0,1 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,04 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,04 |
| MgSO ₄ | 0,01 |

| | |
|--------------------------------------|--------|
| CaCl ₂ 6 H ₂ O | 0,01 |
| NaHCO ₃ | 2 |
| Cisteína HCl | 2,5 |
| Sales biliares | 0,5 |
| Tween 80 | 2 |
| Solución Hemina (50mg/ml)* | 1ml/l |
| Vitamina K* | 10µl/l |

*La solución de hemina y la vitamina K fueron esterilizadas por filtración y luego adicionadas al medio previamente esterilizado en autoclave.

Agar sangre (agar LAPTg adicionado con 5% de sangre ovina)

| Componente | Concentración (g/l) |
|----------------------|----------------------------|
| Peptona | 15 |
| Triptona | 10 |
| Dextrosa | 10 |
| Extracto de levadura | 10 |
| Tween 80 | 1 |
| Sangre ovina | 0,5 |
| Agar | 15 |

Agar DNAasa (Britania, Argentina)

| Componente | Concentración (g/l) |
|-------------------|----------------------------|
| Tripteína | 20 |
| ADN | 2 |
| NaCl | 5 |
| Agar | 15 |

Medio IST

| Componentes | Concentración (g/l) |
|----------------------------------|----------------------------|
| Hidrolizado de caseína | 11 |
| Peptona | 3 |
| Glucosa | 2 |
| NaCl | 3 |
| Almidón Soluble | 1 |
| Na ₂ HPO ₄ | 2 |
| Acetato de Sodio | 1 |
| Glicerofosfato de Mg | 0,2 |
| Gluconato de Calcio | 0,1 |
| CoSO ₄ | 0,001 |
| CuSO ₄ | 0,001 |
| ZnSO ₄ | 0,001 |
| FeSO ₄ | 0,001 |
| MnCl ₂ | 0,002 |

| | |
|---------------------------|---------|
| Menadiona (Vit K3) | 0,001 |
| Cianocobalamina (vit B12) | 0,001 |
| L-Cisteína | 0,02 |
| L-triptofano | 0,02 |
| Piridoxina (Vit B6) | 0,003 |
| Pantotenato (Vit B5) | 0,003 |
| Nicotinamida | 0,003 |
| Biotina | 0,0003 |
| Tiamina | 0,00004 |
| Adenina | 0,01 |
| Guanina | 0,01 |
| Xantina | 0,01 |
| Uracilo | 0,01 |

Caldo LSM

IST 90%

Caldo MRS 10%

Agar MacConckey (Acumedia, USA)

| Componente | Concentración (g/l) |
|---------------------|---------------------|
| Peptona de gelatina | 17 |
| Peptona de caseína | 1,5 |
| Peptona de carne | 1,5 |
| Lactosa | 10 |
| Sales biliares | 1,5 |
| NaCl | 5 |
| Rojo neutro | 0,03 |
| Cristal Violeta | 0,001 |
| Agar | 13,5 |
| pH 7,1 ±0,2 | |

Caldo Nutritivo (Biokar Diagnostics, Francia)

| Componente | Concentración (g/l) |
|-------------------|---------------------|
| Peptona | 5 |
| Extracto de carne | 3 |
| pH 7 ±0,2 | |

Agar nutritivo (Biokar Diagnostics, Francia)

Caldo nutritivo adicionado con agar en concentración 15 g/l.

2. Medios de cultivo de células eucariotas

Medio Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM base) (Gibco BRL Life Technologies, USA)

| | |
|--------------------|---------------|
| DMEM | 1000 ml final |
| NaHCO ₃ | 2 g |
| pH | 7,0 ±0,2 |

Una vez preparado, el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0,22µm.

DMEM completo (Gibco BRL Life Technologies, USA)

| | |
|---|---------------|
| DMEM | 1000 ml final |
| Suero fetal bovino Inactivado | 180 ml |
| Aminoácidos no esenciales (GIBCO Life Technologies, USA) | 13 ml |
| Penicilina/ Streptomycin (1000 IU/ml, 1000 µg/ml) | 13ml |
| Gentamicina (50 mg/ml) (Parafarm, aporiti SACIFIA, Argentina) | 10 |
| NaHCO ₃ | 2 g |
| pH | 7,0 ±0,2 |

El suero fetal bovino se inactiva 30 min a 60 °C. Una vez preparado, el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0,22 µm.

OMEM (Opti-MEM) (Gibco BRL Life technologies, USA)

| | |
|--------------------|----------|
| Opti-MEM® | 1000 ml |
| NaHCO ₃ | 2,4 g |
| pH | 7,0 ±0,2 |

3. Soluciones buffer y reactivos

Buffer PBS

| Componente | Concentración (g/l) |
|----------------------------------|---------------------|
| KH ₂ PO ₄ | 0,14 |
| Na ₂ HPO ₄ | 0,79 |
| NaCl | 9 |
| pH 7,4 | |

Solución fisiológica

NaCl 0,85%

Reactivo de Bradford

| Componente | Concentración (mg/l) |
|--------------------------------|-----------------------------|
| Coomassie Brilliant Blue G-250 | 100 |
| Ácido fosfórico 85% | 100 |
| Etanol 95% | 50 |
| NaOH 1M | 50 |
| Agua destilada | c.s.p. 1 l |

Reactivo Antrona

| Componente | Concentración (g/l) |
|--|----------------------------|
| Antrona | 0,5 |
| H ₂ SO ₄ 66% (v/v) | c.s.p 1 l |

Para el reactivo de Antrona (9,10 dihidro-9-oxoantraceno, Mallinckrodt, Argentina) se preparó una mezcla 66 % v/v de H₂SO₄ en agua trabajando en baño de agua-hielo debido a que se trata de una reacción fuertemente exotérmica. Para facilitar su disolución, el 9,10 dihidro-9-oxoantraceno se añadió cuando la solución alcanzó una temperatura de aproximadamente 70 °C. El reactivo se almacenó a 4 °C durante no más de dos semanas.

Reactivos TLC**Fase móvil**

| Componentes | Volumen (ml) |
|--------------------|---------------------|
| n-propanol | 70 |
| Ácido acético | 20 |
| Agua destilada | 10 |

Solución de revelado

| Componentes | Concentración (g/l) |
|------------------------|----------------------------|
| Ácido p-amino benzoico | 7 |
| Ácido o-fosfórico | 30 |
| Metanol | c.s.p. 1 l |

Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante**Solución de Acril-Bis 40%**

| Componentes | Cantidad |
|--------------------|-----------------|
| Acrilamida | 38,93 g |
| Bisacrilamida | 1,07 g |
| Agua miliQ | c.s.p 100 ml |

Una vez preparada filtrar (0,45µm) y conservar a 4°C.

Buffer TAE 50X

| Componente | Cantidad | Concentración final |
|-------------------|-----------------|----------------------------|
| Tris base | 242 g | 2M |
| AcH glacial | 57.1 ml | 1M |
| EDTA 0.5M pH 8.0 | 100 ml | 50 mM |
| Agua destilada | c.s.p 1000 ml | |

Soluciones desnaturalizantes para gel de acrilamida 8%

| Componentes | 0% desnaturalizante | 80% desnaturalizante |
|----------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Acrilamida-Bis 40% | 20 ml | 20 ml |
| Buffer TAE 50X | 2 ml | 2 ml |
| Urea | - | 33,6 g |
| Formamida deionizada | - | 32 ml |
| Agua destilada | c.s.p 100 ml | c.s.p 100 ml |

| Concentración desnaturalizante | Solución 0% desnaturalizante* | Solución 80% desnaturalizante* |
|---|--|---|
| 40 % | 5,75 ml | 5,75 ml |
| 60 % | 2,87 | 8,63 ml |

*Para cada gel se prepararon 11,5 ml de cada solución desnaturalizante

Solución *stacking*

| Componente | Volumen |
|------------------------------|----------------|
| Solución desnaturalizante 0% | 5 ml |
| Temed | 5 µl |
| Persulfato de amonio 10 % | 5 µl |

Buffer muestra

| Componente | Volumen (ml) |
|------------------------|---------------------|
| Azul de bromofenol 2 % | 0,25 |
| Xileno cianol 2 % | 0,25 |
| Glicerol | 7 |
| Agua destilada | 2,5 |

4. Detección de IL-8 en sobrenadantes de cultivo celular mediante método de ELISA

Se siguió el protocolo del kit Human IL-8 ELISA Set (BD OptEIATM) (BD Bioscience, USA).

Soluciones y buffers

- *Buffer de revestimiento*: Carbonato de sodio 0,1 M, pH=9,5. Almacenar a 2-8 °C.
- *Diluyente*: PBS con 10 % v/v de suero fetal bovino (Natocore). pH=7,0. Preparar en el momento.
- *Solución de lavado*: PBS adicionado de Tween 20, 0,05 %v/v. Preparar en el momento.
- *Buffer citrato*: Na₂HPO₄ anhidro 7,10 g + Ácido cítrico anhidro 5,19 g (c.s.p 1). Ajustar pH= 5,0. Almacenar a -20 °C.
- *Solución con sustrato*: Ortofenilendiamina (OPD) 1mg/ml y H₂O₂ 1 µl/ml, en buffer citrato. Preparar en el momento.
- *Solución de detención*: H₂SO₄ 2 N.

Protocolo

Se utilizaron placas de ELISA de 96 pocillos (Nunc, Thermo Scientific, USA)

1- Sensibilización: Cubrir la placa con 100 µl del anticuerpo de captura (dilución 1/250 en buffer de revestimiento). Incubar *overnight*, 4 °C.

2- Bloqueo: Retirar el anticuerpo de captura y llenar las fosas con 200 µl de diluyente. Incubar 1 h a 37 °C.

3- Lavar las fosas 5 veces, con solución de lavado, utilizando un agitador orbital durante 1 min cada vez. Secar muy bien.

4- Muestras: colocar 100 µl fosa de muestra/standard suspendida en el diluyente. Incubar 2h a 37 °C.

5- Lavar las fosas 5 veces, con solución de lavado, utilizando un agitador orbital durante 1 min cada vez. Secar muy bien.

6- Detección: Agregar 100 µl por fosa de solución de anticuerpo de captura y enzima SAV-HRP (dilución 1/250 de cada uno en diluyente). Incubar 1 h a 37 °C.

7- Lavar las fosas 8 veces, con solución de lavado, utilizando un agitador orbital durante 1 min cada vez. Secar muy bien.

8- Revelado: Agregar 50 µl por fosa de solución con sustrato. Incubar durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad.

9- Detención: agregar la solución de detención, 25 µl por fosa.

10- Lectura: Medir Absorbancia a 492 nm dentro de los 30 min posteriores.

5. Preparación y tinción de cortes histológicos con Hematoxilina y Eosina

Los tejidos de los animales se fijaron en paraformaldehído al 10% y se deshidrataron en un tren de deshidratación que incluyó 3 incubaciones de 10 min en etanol (50%, 70% y 100%) y dos incubaciones en Xilol al 100%. El tejido se incluyó luego en parafina fundida a

60 °C, se tomaron secciones de 7-10 μm de espesor utilizando un micrótopo, se fijaron en un portaobjetos con calor y se eliminaron los restos de parafina lavando con xilol. Se rehidrataron los preparados utilizando el tren de deshidratación en sentido inverso. Los preparados, lavados con agua destilada para eliminar los restos de etanol, se sumergieron durante 10 min en una preparación de hematoxilina, se lavaron con etanol y luego con agua destilada hasta eliminar los restos del colorante. Luego se sumergieron los preparados en eosina durante 30 seg y se enjuagaron con agua destilada. Se deshidrataron nuevamente los preparados y se dejaron 10 min en xilol. Finalmente, se secaron y se montaron los cubreobjetos con resina de montaje.



BIBLIOGRAFÍA

- Acarturk, G., Senol, A., Akin, M., Sutçu, R., Sahin, O., Isler, M., 2014. The protective effects of kefir in aspirin-induced gastric mucosal damage: An experimental study. *Acta Medica Mediterr.* 30, 875–879.
- Acurcio, L.B., Bastos, R.W., Sandes, S.H. de C., Guimarães, A.C. de C., Alves, C.G., Reis, D.C. dos, Wuyts, S., Nunes, Á.C., Cassali, G.D., Lebeer, S., Souza, M.R. de, Nicoli, J.R., 2017. Protective effects of milk fermented by *Lactobacillus plantarum* B7 from Brazilian artisanal cheese on a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in BALB/c mice. *J. Funct. Foods* 33, 436–445.
- Ahluwalia, B., Magnusson, M.K., Öhman, L., 2017. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scand. J. Gastroenterol.* 52, 1185–1193.
- Ai, L., Zhang, H., Guo, B., Chen, W., Wu, Z., Wu, Y., 2008. Preparation, partial characterization and bioactivity of exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* LC2W. *Carbohydr. Polym.* 74, 353–357.
- Alagón Fernández Del Campo, P., De Orta Pando, A., Straface, J.I., Ricardo López Vega, J., Toledo Plata, D., Felipe, S., Lugo, N., Alvarez Hernández, D., Barrientos Fortes, T., Gutiérrez-Kobeh, L., Solano-Gálvez, S.G., Vázquez-López, R., 2019. The use of probiotic therapy to modulate the gut microbiota and dendritic cell responses in inflammatory bowel diseases. *Med. Sci.* 7, 1–17.
- Al-Tamimi, M.A.H.M., Palframan, R.J., Cooper, J.M., Gibson, G.R., Rastall, R.A., 2006. *In vitro* fermentation of sugar beet arabinan and arabino-oligosaccharides by the human gut microflora. *J. Appl. Microbiol.* 100, 407–414.
- Amirshahrokhi, K., Khalili, A.R., 2015. The effect of thalidomide on ethanol-induced gastric mucosal damage in mice: Involvement of inflammatory cytokines and nitric oxide. *Chem. Biol. Interact.* 225, 63–69.
- Amund, O.D., 2016. Exploring the relationship between exposure to technological and gastrointestinal stress and probiotic functional properties of lactobacilli and bifidobacteria. *Can. J. Microbiol.* 62, 715–725.
- Andrade, M.C., Menezes, J.S., Cassali, G.D., Martins-Filho, O.A., Cara, D.C., Faria, A.M.C., 2006. Alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 146, 312–322.
- Arantes, R.M.E., Nogueira, A.M.M.F., 1997. Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. *Cell Tissue Res.* 290, 61–69.
- Aviello, G., Knaus, U.G., 2017. ROS in gastrointestinal inflammation: Rescue Or Sabotage? *Br. J. Pharmacol.* 174, 1704–1718

- Axelsson, L., Ahrné, S., 2000. Lactic acid bacteria, in: Applied Microbial Systematics. Springer, Dordrecht, pp. 367–388.
- Azad, M.A.K., Sarker, M., Li, T., Yin, J., 2018. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *Biomed Res. Int.* 2018, 9478630.
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., Gordon, J. I., 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307(5717), 1915-1920.
- Badel, S., Bernardi, T., Michaud, P., 2011. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 29, 54–66.
- Balzaretti, S., Taverniti, V., Guglielmetti, S., Fiore, W., Minuzzo, M., Ngo, H.N., Ngere, J.B., Sadiq, S., Humphreys, P.N., Laws, A.P., 2017. A novel rhamnose-rich heteroexopolysaccharide isolated from *Lactobacillus paracasei* DG activates THP-1 human monocytic cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, 2702–2718.
- Balzaretti, S., Taverniti, V., Rondini, G., Marcollegio, G., Minuzzo, M., Remagni, M.C., Fiore, W., Arioli, S., Guglielmetti, S., 2015. The vaginal isolate *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 (DSM 26760) is suitable for oral administration. *Front. Microbiol.* 6, 1–13.
- Barranco, S.C., Townsend, C.M., Casartelli, C., Macik, B.G., Burger, N.L., Boerwinkle, W.R., Gourley, W.K., 1983. Establishment and characterization of an *in vitro* model system for human adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 43, 1703–9.
- Bengoa, A.A., Iraporda, C., Garrote, G.L., Abraham, A.G., 2019. Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *J. Appl. Microbiol.* 126, 686–700.
- Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S., Guéguen, M., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 278–285.
- Berra, E., 2003. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 in normoxia. *EMBO J.* 22, 4082–4090.
- Bertsch, A., Roy, D., LaPointe, G., 2019. Enhanced exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Sci.* 9, 4026.
- Bigliardi, B., Galati, F., 2013. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends Food Sci. Technol.* 31, 118–129.
- Bleau, C., Monges, A., Rashidan, K., Laverdure, J.P., Lacroix, M., Van Calsteren, M.R., Millette, M., Savard, R., Lamontagne, L., 2010. Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages. *J. Appl. Microbiol.* 108, 666–675.
- Blum, S., Haller, D., Pfeifer, A., Schiffrin, E.J., 2002. Probiotics and immune response. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 22, 287–309.

- Bolla, P.A.; Abraham, A.G.; Perez, P.F.; de Los Angeles Serradell, M. 2016. Kefir-isolated bacteria and yeasts inhibit *Shigella flexneri* invasion and modulate pro-inflammatory response on intestinal epithelial cells. *Benef. Microbes*. 7, 103–110.
- Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*. 72, 248–254.
- CAA Código Alimentario Argentino, 2006. Capítulo VIII Artículo 576 - Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N° 563/2006
- CAA Código Alimentario Argentino, 2011. Capítulo XVII, Art 1389, Res SPReI N° 261/2011 SAGyP N° 22/2011
- CAA Código Alimentario Argentino, 2011. Capítulo XVII, Art 1390, Resolución Conjunta SPReI N° 229/2011 SAGyP N° 731/2011
- Caggianiello, G., Kleerebezem, M., Spano, G., 2016. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 100, 3877–3886.
- Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., 2008. Changes in gut microbiota control metabolic diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57, 1470–81.
- Carasi, P., Racedo, S.M., Jacquot, C., Romanin, D.E., Serradell, M.A., Urdaci, M.C., 2014. Impact of kefir derived *Lactobacillus kefiri* on the mucosal immune response and gut microbiota. *J. Immunol. Res*. 2015.
- Casarotti, S.N., Carneiro, B.M., Todorov, S.D., Nero, L.A., Rahal, P., Penna, A.L.B., 2017. *In vitro* assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. *Ann. Microbiol*. 67, 289–301.
- Celiberto, L.S., Bedani, R., Rossi, E.A., Cavallini, D.C.U., 2015. Probiotics: the scientific evidence in the context of inflammatory bowel disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 57, 1759–1768.
- Cerning, J., 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*. 7(1-2), 113-130.
- Chabot, S., Yu, H.-L., De Léséleuc, L., Cloutier, D., Van Calsteren, M.-R., Lessard, M., Roy, D., Lacroix, M., Oth, D., 2001. Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in mouse splenocytes. *Lait* 81, 683–697.
- Chambers, E.S., Viardot, A., Psichas, A., Morrison, D.J., Murphy, K.G., Zac-Varghese, S.E.K., MacDougall, K., Preston, T., Tedford, C., Finlayson, G.S., Blundell, J.E., Bell, J.D., Thomas, E.L., Mt-Isa, S., Ashby, D., Gibson, G.R., Kolida, S., Dhillon, W.S., Bloom, S.R., Morley, W., Clegg, S., Frost, G., 2015. Effects of targeted delivery of propionate to the

human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* 64, 1744–1754.

Champagne, C.P., Gomes da Cruz, A., Daga, M., 2018. Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. *Curr. Opin. Food Sci.* 22, 160–166.

Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A., Rousset, M., 1994. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative. *J. Cell Sci.* 107, 213–225.

Chavarría-Velázquez, C. O., Torres-Martínez, A. C., Montaña, L. F., & Rendón-Huerta, E. P., 2018. TLR2 activation induced by *H. pylori* LPS promotes the differential expression of claudin-4,-6,-7 and-9 via either STAT3 and ERK1/2 in AGS cells. *Immunobiology.* 223, 38-48.

Cheirsilp, B., Shimizu, H., Shioya, S., 2003a. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 100, 43–53.

Cheirsilp, B., Shoji, H., Shimizu, H., Shioya, S., 2003b. Interactions between *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in Mixed Culture for Kefir Production. *J. Biosci. Bioeng.* 96, 279–284.

Chen, Y.C., Wu, Y.J., Hu, C.Y., 2019. Monosaccharide composition influence and immunomodulatory effects of probiotic exopolysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* 133, 575–582.

Cheng, H., 2010. Volatile flavor compounds in yogurt: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50, 938–950.

CONCEA, 2013. Diretriz Brasileira para o cuidado de Animais Para fins Científicos e Didáticos. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Available at: <https://www.clp.unesp.br/Home/AreaTecnicaAcademica/diretrizes-concea-2013.pdf>.

Cummins, E.P., Keogh, C.E., Crean, D., Taylor, C.T., 2016. The role of HIF in immunity and inflammation. *Mol. Aspects Med.* 47–48, 24–34.

Danneskiold-Samsøe, N.B., Dias de Freitas Queiroz Barros, H., Santos, R., Bicas, J.L., Cazarin, C.B.B., Madsen, L., Kristiansen, K., Pastore, G.M., Brix, S., Maróstica Júnior, M.R., 2019. Interplay between food and gut microbiota in health and disease. *Food Res. Int.* 115, 23–31

Dashdorj, A., Kr, J., Lim, S., Jo, A., Nguyen, M.N., Ha, J., Yoon, K.-S., Kim, H.J., Park, J.-H., Murphy, M.P., Kim, S.S., 2013. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorates experimental mouse colitis by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines. *BMC Med.* 11, 178.

- De Oliveira Carvalho, R.D., do Carmo, F.L.R., de Oliveira Junior, Alberto Langella, P., Chatel, J.M., Bermúdez-Humarán, L.G., Azevedo, V., de Azevedo, M.S., 2017. Use of wild type or recombinant lactic acid bacteria as an alternative treatment for gastrointestinal inflammatory diseases: A focus on inflammatory bowel diseases and mucositis. *Front. Microbiol.* 8, 1–13.
- De Saedeleer, C.J., Copetti, T., Porporato, P.E., Verrax, J., Feron, O., Sonveaux, P., 2012. Lactate Activates HIF-1 in Oxidative but Not in Warburg-Phenotype Human Tumor Cells. *PLoS One.* 7, e46571.
- De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F., Degeest, B., 2001. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11, 687–707.
- De Vuyst, L., Degeest, B., 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 153–177.
- De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van De Ven, S., Degeest, B., 1998. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.* 84, 1059–1068.
- De Vuyst, L., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Marshall, V., 2003. Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. *Int. Dairy J.* 13, 707–717
- Degeest, B., Vaningelgem, F., De Vuyst, L., 2001. Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11, 747–757.
- Delgado, S., Leite, A.M.O., Ruas-Madiedo, P., Mayo, B., 2015. Probiotic and technological properties of *Lactobacillus* spp. strains from the human stomach in the search for potential candidates against gastric microbial dysbiosis. *Front. Microbiol.* 5, 1–8.
- Dertli, E., Mayer, M.J., Narbad, A., 2015. Impact of the exopolysaccharide layer on biofilms, adhesion and resistance to stress in *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *BMC Microbiol.* 15, 1–9.
- Dietl, K., Renner, K., Dettmer, K., Timischl, B., Eberhart, K., Dorn, C., Hellerbrand, C., Kastenberger, M., Kunz-Schughart, L.A., Oefner, P.J., Andreesen, R., Gottfried, E., Kreutz, M.P., 2010. Lactic Acid and Acidification Inhibit TNF Secretion and Glycolysis of Human Monocytes. *J. Immunol.* 184, 1200–1209.
- Diosma, G., Romanin, D.E., Rey-Burusco, M.F., Londero, A., Garrote, G.L., 2014. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 43–53.
- Diplock, A., Aggett, P., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E., & Roberfroid, M. (1999). The European Commission concerted action on functional foods science in Europe

- (FUFOSE). Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. *Brit J Nutr*, 81, S1-27.
- Dobson, A., O'Sullivan, O., Cotter, P. D., Ross, P., Hill, C., 2011. High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. *FEMS Microbiol. Lett.*, 320, 56-62.
- Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., 2000. Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24, 251-255.
- Durack, J., Lynch, S. V., 2019. The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy. *J. Exp. Med.* 216, 20-40.
- EFSA FEEDAP Panel, 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal.*10(6), 2740.
- EFSA Panel on Biological Hazards, 2016. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 4: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2016. *EFSA Journal.* 14, e04522.
- Eltzschig, H.K., Bratton, D.L., Colgan, S.P., 2014. Targeting hypoxia signalling for the treatment of ischaemic and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 852-869.
- Etani, R., Kataoka, T., Kanzaki, N., Sakoda, A., Tanaka, H., Ishimori, Y., Mitsunobu, F., Taguchi, T., Yamaoka, K., 2017. Protective effects of hot spring water drinking and radon inhalation on ethanol-induced gastric mucosal injury in mice. *J. Radiat. Res.* 58, 614-625.
- Fahmy, H.A., Ismail, A.F.M., 2015. Gastroprotective effect of kefir on ulcer induced in irradiated rats. *J. Photoch. Photobio. B.* 144, 85-93.
- FAO/WHO, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Meeting & World Health Organization, 2006. Safety evaluation of certain food additives (no. 56). World Health Organization
- FAO/WHO.,2001. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Córdoba, Argentina. ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf
- Farnworth, E. R., 2006. Kefir: a complex probiotic. *Food. Sci. Technol. Bull.* 2, 1-17.
- Farnworth, E. R., Mainville, I., 2008. Kefir: A fermented milk product. In Handbook of fermented functional foods. pp. 89-127. CRC Press.

- Fei, Y., Li, L., Zheng, Y., Liu, D., Zhou, Q., Fu, L., 2018. Characterization of *Lactobacillus amylolyticus* L6 as potential probiotics based on genome sequence and corresponding phenotypes. *LWT* 90, 460–468.
- Fernández De Palencia, P., Werning, M.L., Sierra-Filardi, E., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Corbí, A.L., López, P., 2009. Probiotic properties of the 2-substituted (1,3)- β -D-glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4887–4891.
- Flach, M., Diefenbach, A., 2015. Development of Gut-Associated Lymphoid Tissues, in: *Mucosal Immunology: Fourth Edition*. Elsevier Inc., pp. 31–42.
- Fleet, G.H., 2007. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 170–175.
- Foligné, B., Parayre, S., Cheddani, R., Famelart, M.H., Madec, M.N., Plé, C., Breton, J., Dewulf, J., Jan, G., Deutsch, S.M., 2016. Immunomodulation properties of multi-species fermented milks. *Food Microbiol.* 53, 60–69.
- Folkenberg, D.M., Dejmek, P., Skriver, A., Skov Guldager, H., Ipsen, R., 2006. Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures. *Int. Dairy J.* 16, 111–118.
- Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gil, A., 2013. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br. J. Nutr.* 109, S35–S50.
- Furtado Martins, E.M., Ramos, A.M., Lago Vanzela, E.S., Stringheta, P.C., de Oliveira Pinto, C.L., Martins, J.M., 2013. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Res. Int.* 51, 764–770.
- Gangoiti, M. V., Puertas, A.I., Hamet, M.F., Peruzzo, P.J., Llamas, M.G., Medrano, M., Prieto, A., Dueñas, M.T., Abraham, A.G., 2017. *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327: An α -glucan producing-strain isolated from kefir grains. *Carbohydr. Polym.* 170, 52–59.
- Garcia-Castillo, V., Komatsu, R., Clua, P., Indo, Y., Takagi, M., Salva, S., Islam, M.A., Alvarez, S., Takahashi, H., Garcia-Cancino, A., Kitazawa, H., Villena, J., 2019. Evaluation of the Immunomodulatory Activities of the Probiotic Strain *Lactobacillus fermentum* UCO-979C. *Front. Immunol.* 10, 1376.
- Garcia-Castillo, V., Zelaya, H., Ilabaca, A., Espinoza-Monje, M., Komatsu, R., Albarracín, L., Kitazawa, H., Garcia-Cancino, A., Villena, J., 2018. *Lactobacillus fermentum* UCO-979C beneficially modulates the innate immune response triggered by *Helicobacter pylori* infection *in vitro*. *Benef. Microbes* 9, 829–841.
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Aquilanti, L., De Filippis, F., Stellato, G., Di Mauro S., Turchetti B., Buzzini P., Ercolini D., Clementi, F., 2015. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food microbiol.* 49, 123–133.

- Garrote, G.L., Abraham, A.G., de Antoni, G.I., 2001. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *J. Dairy Res.* 68, 639–652.
- Garrote, G.L., Abraham, A.G., DeAntoni, G., L., 2010. Microbial interactions in Kefir: a natural probiotic drink, in: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Wiley-Blackwell, pp. 327–340.
- Garrote, G.L., Abraham, A.G., Rumbo, M., 2015. Is lactate an undervalued functional component of fermented food products? *Front. Microbiol.* 6, 1–5.
- Gérard, P., 2016. Gut microbiota and obesity. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 147–162.
- Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K.S., Cani, P.D., Verbeke, K., Reid, G., 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 491–502.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401–12.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C., 2001. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods* 25, 386–401.
- Glover, L.E., Lee, J.S., Colgan, S.P., 2016. Oxygen metabolism and barrier regulation in the intestinal mucosa. *J. Clin. Invest.* 126, 3680–3688.
- Golowczyc, M.A., Gugliada, M.J., Hollmann, A., Delfederico, L., Garrote G.L., Abraham, A.G., Semorile, L., De Antoni, G., 2008. Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic. *J Dairy Res.* 75, 211–217.
- Golowczyc, M.A., Mobili, P., Garrote G.L., Abraham, A.G., and De Antoni, G.L., 2007. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Int J Food Microbiol* 118, 264–273.
- Gomi, A., Harima-Mizusawa, N., Shibahara-Sone, H., Kano, M., Miyazaki, K., Ishikawa, F., 2013. Effect of *Bifidobacterium bifidum* BF-1 on gastric protection and mucin production in an acute gastric injury rat model. *J. Dairy Sci.* 96, 832–837.
- Gonçalves, P., Araújo, J.R., Di Santo, J.P., 2018. A cross-talk between microbiota-derived Short-Chain Fatty Acids and the host mucosal immune system regulates intestinal homeostasis and inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 24, 558–572.
- Gottfried, E., Kunz-Schughart, L.A., Ebner, S., Mueller-Klieser, W., Hoves, S., Andreesen, R., Mackensen, A., Kreutz, M., 2006. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* 107, 2013–2021.

- Griffiths, E.A., Pritchard, S.A., Welch, I.M., Price, P.M., West, C.M., 2005. Is the hypoxia-inducible factor pathway important in gastric cancer? *Eur. J. Cancer* 41, 2792–2805.
- Grimoud, J., Durand, H., Courtin, C., Monsan, P., Ouarné, F., Theodorou, V., Roques, C., 2010. In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe* 16, 493–500.
- Gueimonde, M., Sánchez, B., G. de los Reyes-Gavilán, C., Margolles, A., 2013. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front. Microbiol.* 4, 202.
- Hamet, M.F., Medrano, M., Pérez, P.F., Abraham, A.G., 2016. Oral administration of kefiran exerts a bifidogenic effect on BALB/c mice intestinal microbiota. *Benef. Microbes* 7, 237–246.
- Hams, E., Saunders, S.P., Cummins, E.P., O’connor, A., Tambuwala, M.T., Gallagher, W.M., Byrne, A., Campos-Torres, A., Moynagh, P.M., Jobin, C., Taylor, C.T., Fallon, P.G., 2011. The hydroxylase inhibitor DMOG attenuates endotoxic shock via alternative activation of macrophages and IL-10 production by B-1 cells. *Shock* 36, 295–302.
- Hanauer, S.B., 2006. Inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm. Bowel Dis.* 12, S3–S9.
- Hasler, C.M., 2002. Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges—A Position Paper from the American Council on Science and Health. *J. Nutr.* 132, 3772–3781.
- Hayes, P., Dhillon, S., O’Neill, K., Thoeni, C., Hui, K.Y., Elkadri, A., Guo, C.H., Kovacic, L., Aviello, G., Alvarez, L.A., Griffiths, A.M., Snapper, S.B., Brant, S.R., Doroshov, J.H., Silverberg, M.S., Peter, I., McGovern, D.P.B., Cho, J., Brumell, J.H., Uhlig, H.H., Bourke, B., Muise, A.M., Knaus, U.G., 2015. Defects in Nicotinamide-adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Genes NOX1 and DUOX2 in Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *CMGH Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 1, 489–502.
- Hernández, C., Santamatilde, E., McCreath, K.J., Cervera, A.M., Díez, I., Ortiz-Masiá, D., Martínez, N., Calatayud, S., Esplugues, J. V, Barrachina, M.D., 2009. Induction of trefoil factor (TFF)1, TFF2 and TFF3 by hypoxia is mediated by hypoxia inducible factor-1: implications for gastric mucosal healing. *Br. J. Pharmacol.* 156, 262–272.
- Hoffmann, W., 2005. TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2932–2938.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2014. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 506–514.
- Hill, D., Sugrue, I., Arendt, E., Hill, C., Stanton, C., Ross, R.P., 2017. Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. *F1000Research* 6, 751.

- Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., Paul Ross, R., 2018. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Front. Microbiol.* 9.
- Hugo, A. A., Kakisu, E., De Antoni, G. L., Pérez, P. F., 2008. Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in vitro. *Lett. Appl. Microbiol.*, 46(6), 613-619
- Hunt, R H, Camilleri, M., Crowe, S.E., El-Omar, E.M., Fox, J.G., Kuipers, E.J., Malfertheiner, P., Mccoll, K.E.L., Pritchard, D.M., Ruge, M., Sonnenberg, A., Sugano, K., Tack, J., Hunt, Richard H, 2015. The stomach in health and disease. *Gut.* 64, 1650–1668.
- Hwang, S.W., Kim, N., Kim, J.M., Huh, C.S., Ahn, Y.T., Park, S.H., Shin, C.M., Park, J.H., Lee, M.K., Nam, R.H., Lee, H.S., Kim, J.S., Jung, H.C., Song, I.S., 2012. Probiotic suppression of the *H. pylori*-induced responses by conjugated linoleic acids in a gastric epithelial cell line. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* 86, 225–231.
- Ibarburu, I., Puertas, A.I., Berregi, I., Rodríguez-Carvajal, M.A., Prieto, A., Dueñas, M.T., 2015. Production and partial characterization of exopolysaccharides produced by two *Lactobacillus suebicus* strains isolated from cider. *Int. J. Food Microbiol.* 214, 54–62.
- Iraporda, C., Abatemarco Júnior, M., Neumann, E., Nunes, Á.C., Nicoli, J.R., Abraham, A.G., Garrote, G.L., 2017. Biological activity of the non-microbial fraction of kefir: antagonism against intestinal pathogens. *J. Dairy Res.* 84, 339–345.
- Iraporda, C., Errea, A., Romanin, D.E., Cayet, D., Pereyra, E., Pignataro, O., Sirard, J.C., Garrote, G.L., Abraham, A.G., Rumbo, M., 2015. Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. *Immunobiology* 220, 1161–1169.
- Iraporda, C., Romanin, D.E., Bengoa, A.A., Errea, A.J., Cayet, D., Foligné, B., Sirard, J.-C., Garrote, G.L., Abraham, A.G., Rumbo, M., 2016. Local treatment with lactate prevents intestinal inflammation in the TNBS-induced colitis model. *Front. Immunol.* 7, 651.
- Iraporda, C., Romanin, D.E., Rumbo, M., Garrote, G.L., Abraham, A.G., 2014. The role of lactate on the immunomodulatory properties of the nonbacterial fraction of kefir. *Food Res. Int.* 62, 247–253.
- Ispirli, H., Dertli, E., 2018. Isolation and characterisation of lactic acid bacteria from traditional koumiss and kurut. *Int. J. Food Prop.* 20, S2441–S2449.
- Johnson-Henry, K.C., Mitchell, D.J., Avitzur, Y., Galindo-Mata, E., Jones, N.L., Sherman, P.M., 2004. Probiotics reduce bacterial colonization and gastric inflammation in *H. pylori*-infected mice. *Dig. Dis. Sci.* 49, 1095–102.
- Jost, P.J., Ruland, J., 2007. Aberrant NF- κ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood* 109, 2700–2707.

- Jumas-Bilak, E., Carlier, J.P., Jean-Pierre, H., Mory, F., Teyssier, C., Gay, B., Campos, J., Marchandin, H., 2007. *Acidaminococcus intestini* sp. nov., isolated from human clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2314–2319.
- Kakisu, E., Abraham, A.G., Tironi Farinati, C., Ibarra, C., De Antoni, G.L., 2013. *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir protects vero cells from cytotoxicity by type-II shiga toxin from *Escherichia coli* O157: H7. *J. Dairy Res.* 80, 64–71.
- Karhausen, J., Furuta, G.T., Tomaszewski, J.E., Johnson, R.S., Colgan, S.P., Haase, V.H., 2004. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *J. Clin. Invest.* 114, 1098–1106.
- Kelly, C.J., Glover, L.E., Campbell, E.L., Kominsky, D.J., Ehrentraut, S.F., Bowers, B.E., Bayless, A.J., Saeedi, B.J., Colgan, S.P., 2013. Fundamental role for HIF-1 α in constitutive expression of human β defensin-1. *Mucosal Immunol.* 6, 1110–1118.
- Kempnich, J.W., Sirinek, K.R., 2018. Acid Peptic Disease. *Surg. Clin. North Am.* 98, 933–944.
- Khanal, S.N., Lucey, J.A., 2018. Effect of fermentation temperature on the properties of exopolysaccharides and the acid gelation behavior for milk fermented by *Streptococcus thermophilus* strains DGCC7785 and St-143. *J. Dairy Sci.* 101(5), 3799–3811.
- Khoder, G., Al-Menhali, A.A., Al-Yassir, F., Karam, S.M., 2016. Potential role of probiotics in the management of gastric ulcer. *Exp. Ther. Med.* 12, 3–17.
- Kim, T.-S., Hur, J.-W., Yu, M.-A., Cheigh, C.-I., Kim, K.-N., Hwang, J.-K., Pyun, Y.-R., 2003. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 66, 3–12.
- Kitajima, Y., Miyazaki, K., 2013. The critical impact of HIF-1 α on gastric cancer biology. *Cancers.* 5, 15–26.
- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Müller-Bertling, S., Witte, W., Goossens, H., 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 900–912.
- Knip, M., Siljander, H., 2016. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 154–167.
- Köll, P., Mändar, R., Smidt, I., Hütt, P., Truusalu, K., Mikelsaar, R.-H., Shchepetova, J., Krogh-Andersen, K., Marcotte, H., Hammarström, L., Mikelsaar, M., 2010. Screening and Evaluation of Human Intestinal Lactobacilli for the Development of Novel Gastrointestinal Probiotics. *Curr. Microbiol.* 61, 560–566.
- Korsak, N., Taminiau, B., Leclercq, M., Nezer, C., Crevecoeur, S., Ferauche, C., Detry E., Delcenserie V., Daube, G., 2015. Evaluation of the microbiota of kefir samples using

- metagenetic analysis targeting the 16S and 26S ribosomal DNA fragments. *J. dairy sci.*, 98(6), 3684-3689.
- Kotova, I. B., Cherdyntseva, T. A., Netrusov, A. I., 2016. Russian kefir grains microbial composition and its changes during production process. In: *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health*. pp. 93-121. Springer.
- Kumar, A., Wu, H., Collier-Hyams, L.S., Kwon, Y.-M., Hanson, J.M., Neish, A.S., 2009. Cullin-1 Neddylation Oxygen Species-Mediated Changes in Influences Epithelial Signaling via Reactive The Bacterial Fermentation Product Butyrate. *J. Immunol.* 182, 538–546.
- Kumar, A.S., Mody, K., Jha, B., 2007. Bacterial exopolysaccharides - A perception. *J. Basic Microbiol.* 47, 103–117.
- Kurmann, J. A., Rasic, J. L., 1991. The health potential of products containing bifidobacteria. In: *Therapeutic properties of fermented milk*, ed., RK Robinson.
- Lam, E.K.Y., Tai, E.K.K., Koo, M.W.L., Wong, H.P.S., Wu, W.K.K., Yu, L., So, W.H.L., Woo, P.C.Y., Cho, C.H., 2007. Enhancement of gastric mucosal integrity by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Life Sci.* 80, 2128–2136.
- Langford, D.J., Bailey, A.L., Chanda, M.L., Clarke, S.E., Drummond, T.E., Echols, S., Glick, S., Ingraio, J., Klassen-Ross, T., LaCroix-Fralish, M.L., Matsumiya, L., Sorge, R.E., Sotocinal, S.G., Tabaka, J.M., Wong, D., van den Maagdenberg, A.M.J.M., Ferrari, M.D., Craig, K.D., Mogil, J.S., 2010. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat. Methods* 7, 447–449.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J., 2008. Genes and molecules of Lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 728–764.
- Lee, I.C., Caggianiello, G., van Swam, I.I., Taverne, N., Meijerink, M., Bron, P.A., Spano, G., Kleerebezem, M., 2016. Strain-specific features of extracellular polysaccharides and their impact on *Lactobacillus plantarum*-host interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 3959–3970.
- Leroi, F., Pidoux, M., 1993. Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 54–60.
- Leroy, F., De Vuyst, L., 2014. Fermented food in the context of a healthy diet. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 17, 574–581.
- Levander, F., Svensson, M., Rådström, P., 2002. Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 784–90.
- Li, G., Zhu, L., Cao, Z., Wang, J., Zhou, F., Wang, X., Li, X., Nie, G., 2018. A new participant in the pathogenesis of alcoholic gastritis: pyroptosis. *Cell. Physiol. Biochem.* 49, 406–418.

- Li, Q., Ma, R., Zhang, M., 2017. CoCl₂ increases the expression of hypoxic markers HIF-1 α , VEGF and CXCR4 in breast cancer MCF-7 cells. *Oncol. Lett.* 15, 1119–1124.
- Lin, P.W., Myers, L.E.S., Ray, L., Song, S.C., Nasr, T.R., Berardinelli, A.J., Kundu, K., Murthy, N., Hansen, J.M., Neish, A.S., 2009. *Lactobacillus rhamnosus* blocks inflammatory signaling *in vivo* via reactive oxygen species generation. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1205–1211.
- Lin, W.H., Lin, C.K., Sheu, S.J., Hwang, C.F., Ye, W.T., Hwang, W.Z., Tsen, H.Y., 2009. Antagonistic activity of spent culture supernatants of lactic acid bacteria against *Helicobacter pylori* growth and infection in human gastric epithelial AGS cells. *J. Food Sci.* 74, 225–230.
- Lin, W.H., Wu, C.R., Fang, T.J., Guo, J.T., Huang, S.Y., Lee, M.S., Yang, H.L., 2011. Anti-*Helicobacter pylori* activity of fermented milk with lactic acid bacteria. *J. Sci. Food Agric.* 91, 1424–1431.
- Liu, J., Wang, F., Luo, H., Liu, A., Li, K., Li, C., Jiang, Y., 2016. Protective effect of butyrate against ethanol-induced gastric ulcers in mice by promoting the anti-inflammatory, anti-oxidant and mucosal defense mechanisms. *Int. Immunopharmacol.* 30, 179–187.
- Liu, S.Q., Tsao, M., 2009. Enhancement of survival of probiotic and non-probiotic lactic acid bacteria by yeasts in fermented milk under non-refrigerated conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 34–38.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} Method. *Methods* 25, 402–408.
- Londero, A., Hamet, M.F., De Antoni, G.L., Garrote, G.L., Abraham, A.G., 2012. Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterisation. *J. Dairy Res.* 79, 262–271.
- Londero, A., Iraporda, C., Garrote, G.L., Abraham, A.G., 2015. Cheese whey fermented with kefir micro-organisms: Antagonism against *Salmonella* and immunomodulatory capacity. *Int. J. Dairy Technol.* 68, 118–126.
- Louis, N.A., Hamilton, K.E., Canny, G., Shekels, L.L., Ho, S.B., Colgan, S.P., 2006. Selective induction of mucin-3 by hypoxia in intestinal epithelia. *J. Cell. Biochem.* 99, 1616–1627.
- Louis, P., Flint, H.J., 2017. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.* 19, 29–41.
- Lupton, J.R., 2004. Microbial Degradation Products Influence Colon Cancer Risk: the Butyrate Controversy. *J. Nutr.* 134, 479–482.
- Lynch K.M., Zannini E., Coffey A., Arendt E.K., 2018. Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: isolation, properties, characterization, and health benefits. *Annu Rev Food Sci Technol.* 25(9), 155–176.

- Mäkeläinen, H., Tahvonen, R., Salminen, S., Ouwehand, A.C., 2003. *In Vivo* safety assessment of two *Bifidobacterium longum* strains. *Microbiol. Immunol.* 47, 911–914.
- Mäkinen-Aakula, M., 2006. Trends in functional foods dairy market, in: Proceedings of the Third Functional Food Net Meeting.
- Manresa, M.C., Taylor, C.T., 2017. Hypoxia Inducible Factor (HIF) Hydroxylases as Regulators of Intestinal Epithelial Barrier Function. *CMGH Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 303–315.
- Mantis, N.J., Rol, N., Corthésy, B., 2011. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol.* 4, 603–611.
- Marchbank, T., Mahmood, A., Harten, S., Maxwell, P.H., Playford, R.J., 2011. Dimethyloxalyglycine stimulates the early stages of gastrointestinal repair processes through VEGF-dependent mechanisms. *Lab. Investig.* 91, 1684–1694.
- Marcial, G., Messing, J., Menchicchi, B., Goycoolea, F.M., Faller, G., Graciela, F. de V., Hensel, A., 2013. Effects of polysaccharide isolated from *Streptococcus thermophilus* CRL1190 on human gastric epithelial cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 62, 217–224.
- Marcial, G., Rodriguez, C., Medici, M., de Valdez, G.F., 2012. New Approaches in Gastritis Treatment, in: Gastritis and Gastric Cancer - New Insights in Gastroprotection, Diagnosis and Treatments. pp. 153–176.
- Marcinkiewicz, J., Ciszek, M., Bobek, M., Strus, M., Heczko, P.B., Kurnyta, M., Biedron, R., Biedron, B., Chmielarczyk, A., 2007. Differential inflammatory mediator response *in vitro* from murine macrophages to lactobacilli and pathogenic intestinal bacteria. *Int. J. Exp. Pathol.* 88, 155–164.
- Marco, M.L., Binda, S., Smid, E.J., Hutkins, R., Gänzle, M., Cifelli, C.J., Foligné, B., Pihlanto, A., Cotter, P.D., Kort, R., Heeney, D., Pasin, G., 2017. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr. Opin. Biotechnol.* 44, 94–102.
- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., Cotter, P. D., 2013. Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources. *PLoS one*, 8, e69371.
- Martín, R., Langella, P., 2019. Emerging health concepts in the probiotics field: Streamlining the definitions. *Front. Microbiol.* 10.
- Mathias, A., Pais, B., Favre, L., Benyacoub, J., Corthésy, B., 2014. Role of secretory IgA in the mucosal sensing of commensal bacteria. *Gut Microbes.* 5, 688–695.
- Mayrhofer, S., Domig, K.J., Mair, C., Zitz, U., Huys, G., Kneifel, W., 2008. Comparison of broth microdilution, Etest, and Agar disk diffusion methods for antimicrobial susceptibility testing of *Lactobacillus acidophilus* group members. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3745–3748.

- Medrano, M., Racedo, S.M., Rolny, I.S., Abraham, A.G., Pérez, P.F., 2011. Oral administration of kefiran induces changes in the balance of immune cells in a murine model. *J Agricult Food Chem* 59(10), 5299-5304
- Menezes, A.G.T., Ramos, C.L., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2018. Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. *Food Res. Int.* 111, 187–197.
- Mercan, E., İspirli, H., Sert, D., Yılmaz, M.T., Dertli, E., 2015. Impact of exopolysaccharide production on functional properties of some *Lactobacillus salivarius* strains. *Arch. Microbiol.* 197, 1041–1049.
- Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., Malik, A.B., 2014. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants Redox Signal.* 20, 1126–1167.
- Moreno, C., 2012. Un tema complejo. Normativa y Alimentos Funcionales. *Alimentos Argentinos.* 55, 60-63.
- Morona, J.K., Morona, R., Miller, D.C., Paton, J.C., 2003. Mutational analysis of the carboxy-terminal (YGX)₄ repeat domain of CpsD, an autophosphorylating tyrosine kinase required for capsule biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 185, 3009–3019.
- Morovic, W., Roper, J.M., Smith, A.B., Mukerji, P., Stahl, B., Rae, J.C., Ouwehand, A.C., 2017. Safety evaluation of HOWARU® Restore (*Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus paracasei* Lpc-37, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-04 and *B. lactis* Bi-07) for antibiotic resistance, genomic risk factors, and acute toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 110, 316–324.
- Morrison, D.J., Preston, T., 2016. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 7, 189–200.
- Mowat, A.M.I., 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 331–341.
- Mozzi, F., Oliver, G., Savoy De Giori, G., Font de Valdez, G., 1995. Influence of temperature on the production of exopolysaccharides by thermophilic lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft.* 50, 80–82.
- Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hébert, E.M., Van Der Meulen, R., Moreno, M.R.F., Font De Valdez, G., De Vuyst, L., 2006. Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4431–4435.
- Mustafa, S.M., Chua, L.S., Ali, H., Enshasy, E., Adibah, F., Majid, A., Zulaiha, S., Roslinda, H., Malik, A., 2019. Effect of temperature and pH on the probiotication of *Punica granatum* juice using *Lactobacillus* species. *J. Food Biochem.* 43, e12805.

- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Myers, R.M., Maniatis, T., Lerman, L.S., 1987. Detection and Localization of Single Base Changes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Methods Enzymol.* 155, 501–527.
- Nagao-Kitamoto, H., Shreiner, A.B., Gilliland, M.G., Kitamoto, S., Ishii, C., Hirayama, A., Kuffa, P., El-Zaatari, M., Grasberger, H., Seekatz, A.M., Higgins, P.D.R., Young, V.B., Fukuda, S., Kao, J.Y., Kamada, N., Kamada, N., 2016. Functional Characterization of Inflammatory Bowel Disease-Associated Gut Dysbiosis in Gnotobiotic Mice. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2, 468–481.
- Nalbantoglu, U., Cakar, A., Dogan, H., Abaci, N., Ustek, D., Sayood, K., Can, H., 2014. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. *Food microbiol.* 41, 42-51
- Narvhus, J., Gadaga, T., 2003. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 51–60.
- Nasi, A., Fekete, T., Krishnamurthy, A., Snowden, S., Rajnavölgyi, E., Catrina, A.I., Wheelock, C.E., Vivar, N., Rethi, B., 2013. Dendritic cell reprogramming by endogenously produced lactic acid. *J. Immunol.* 191, 3090–3099.
- Nempont, C., Cayet, D., Rumbo, M., Bompard, C., Villeret, V., Sirard, J.-C., 2008. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J. Immunol.* 181, 2036–43.
- Nielsen, B., Gürakan, G. C., Ünlü, G., 2014. Kefir: a multifaceted fermented dairy product. *Probiotics antimicro.* 6, 123-135.
- Nikolic, M., López, P., Strahinic, I., Suárez, A., Kojic, M., Fernández-García, M., Topisirovic, L., Golic, N., Ruas-Madiedo, P., 2012. Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 158, 155–162.
- Novelli, A., 1953. New method of staining of bacterial capsules in films and sections. *Experientia* 9, 34–35.
- Okada, T., Fukuda, S., Hase, K., Nishiumi, S., Izumi, Y., Yoshida, M., Hagiwara, T., Kawashima, R., Yamazaki, M., Oshio, T., Otsubo, T., Inagaki-Ohara, K., Kakimoto, K., Higuchi, K., Kawamura, Y.I., Ohno, H., Dohi, T., 2013. Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat. Commun.* 4.
- Okumura, R., Takeda, K., 2017. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp. Mol. Med.* 49, 338.

- Olfert, E., Cross, B., McWilliam, A. (1998). Consejo Canadiense de Protección de los animales. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación, 2.
- Oliveira, A.P., M Souza, L.K., L Araújo, T.S., de Araújo, S., Nogueira, K.M., Beatriz Sousa, F.M., Silva, R.O., Pacífico, D.M., Martins, C.S., Anne de Brito, G.C., HLP Souza, M., Venes Medeiros, J.R., 2019. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 Protects against Gastric Damage Induced by Ethanol Administration in Mice: Role of TRPV1/Substance P Axis. *Nutrients* 11, 208.
- Orel, R., Trop, T.K., 2014. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 20, 11505–11524.
- Ortiz-Masiá, D., Hernández, C., Quintana, E., Velázquez, M., Cebrián, S., Riaño, A., Calatayud, S., Esplugues, J. V., Barrachina, M.D., 2010. iNOS-derived nitric oxide mediates the increase in TFF2 expression associated with gastric damage: Role of HIF-1. *FASEB J.* 24, 136–145.
- Otles, S., Cagindi, O., 2003. Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pak. J. Nutr.* 2, 54-59.
- Owusu-Kwarteng, J., Tano-Debrah, K., Akabanda, F., Jespersen, L., 2015. Technological properties and probiotic potential of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from West African fermented millet dough. *BMC Microbiol.* 15, 1–10.
- Pandey, K.R., Naik, S.R., Vakil, B. V., 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *J. Food Sci. Technol.* 52, 7577–7587.
- Panpetch, W., Spinler, J.K., Versalovic, J., Tumwasorn, S., 2016. Characterization of *Lactobacillus salivarius* strains B37 and B60 capable of inhibiting IL-8 production in *Helicobacter pylori*-stimulated gastric epithelial cells. *BMC Microbiol.* 16, 1–10.
- Pantoflickova, D., Corthesy-Theulaz, I., Dorta, G., Stolte, M., Isler, P., Rochat, F., Enslin, M., Blum, A.L., 2003. Favourable effect of regular intake of fermented milk containing *Lactobacillus johnsonii* on *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1, 805–813.
- Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., Tsakalidou, E., 2015. Discovering probiotic microorganisms: *In vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Front. Microbiol.* 6, 1–28.
- Park, J.H., Kim, Tae You, Jong, H.S., Kim, Tai Young, Chun, Y.S., Park, J.W., Lee, C.T., Jung, H.C., Kim, N.K., Bang, Y.J., 2003. Gastric epithelial reactive oxygen species prevent normoxic degradation of Hypoxia-inducible Factor-1 α in gastric cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 9, 433–440.
- Pasparakis, M., 2009. Regulation of tissue homeostasis by NF- κ B signalling: implications for inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 778–788.

- Patel, A., Shah, N., Prajapati, J.B., 2014. Clinical application of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection--a brief review. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 47, 429–437.
- Patten, D.A., Laws, A.P., 2015. *Lactobacillus*-produced exopolysaccharides and their potential health benefits: A review. *Benef. Microbes* 6, 457–471.
- Patten, D.A., Leivers, S., Chadha, M.J., Maqsood, M., Humphreys, P.N., Laws, A.P., Collett, A., 2014. The structure and immunomodulatory activity on intestinal epithelial cells of the EPSs isolated from *Lactobacillus helveticus* sp. Rosyjski and *Lactobacillus acidophilus* sp. 5e2. *Carbohydr. Res.* 384, 119–127.
- Pédron, T., Mulet, C., Dauga, C., Frangeul, L., Chervaux, C., Grompone, G., Sansonettia, P.J., 2012. A crypt-specific core microbiota resides in the mouse colon. *MBio* 3, 1–7.
- Peña, J.A., Rogers, A.B., Ge, Z., Ng, V., Li, S.Y., Fox, J.G., Versalovic, J., 2005. Probiotic *Lactobacillus* spp. Diminish *Helicobacter hepaticus*-Induced Inflammatory Bowel Disease in Interleukin-10-Deficient Mice. *Infect. Immun.* 73, 912–920.
- Pessione, E., Cirrincione, S., 2016. Bioactive molecules released in food by lactic acid bacteria: Encrypted peptides and biogenic amines. *Front. Microbiol.* 7, 876.
- Peterson, L.W., Artis, D., 2014. Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 141–153.
- Pineiro, M., Asp, N.-G., Reid, G., Macfarlane, S., Morelli, L., Brunser, J.O., Tuohy, K., 2008. FAO Technical Meeting on Prebiotics. *J. Clinical Gastroenterol.* 42, 156–159.
- Pinto, M., 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* 47, 323–330.
- Plaza-Díaz, J., Gomez-Llorente, C., Campaña-Martin, L., Matencio, E., Ortuño, I., Martínez-Silla, R., Gomez-Gallego, C., Periago, M.J., Ros, G., Chenoll, E., Genovés, S., Casinos, B., Silva, Á., Corella, D., Portolés, O., Romero, F., Ramón, D., Perez de la Cruz, A., Gil, A., Fontana, L., 2013. Safety and Immunomodulatory Effects of Three Probiotic Strains Isolated from the Feces of Breast-Fed Infants in Healthy Adults: SETOPROB Study. *PLoS One.* 8 (10), e78111.
- Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F.J., Maria Vilchez-Padial, L., Gil, A., 2017. Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Synbiotics in Intestinal Chronic Diseases. *Nutrients* 9.
- Plessas, S., Bosnea, L., Psarianos, C., Koutinas, A.A., Marchant, R., Banat, I.M., 2008. Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Bioresour. Technol.* 99, 5951–5955.

- Plessas, S., Nouska, C., Mantzourani, I., Kourkoutas, Y., Alexopoulos, A., Bezirtzoglou, E., 2017. Microbiological exploration of different types of kefir grains. *Fermentation*, 3(1), 1
- Polak-Berecka, M., Waško, A., Paduch, R., Skrzypek, T., Sroka-Bartnicka, A., 2014. The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 106, 751–762.
- Prisciandaro, L., Geier, M., Butler, R., Cummins, A., Howarth, G., 2009. Probiotics and their derivatives as treatments for inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 1906–1914.
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, Shenghui, Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., Wu, P., Dai, Y., Sun, X., Li, Z., Tang, A., Zhong, S., Li, X., Chen, W., Xu, R., Wang, M., Feng, Q., Gong, M., Yu, J., Zhang, Y., Zhang, M., Hansen, T., Sanchez, G., Raes, J., Falony, G., Okuda, S., Almeida, M., LeChatelier, E., Renault, P., Pons, N., Batto, J.-M., Zhang, Z., Chen, H., Yang, R., Zheng, W., Li, Songgang, Yang, H., Wang, Jian, Ehrlich, S.D., Nielsen, R., Pedersen, O., Kristiansen, K., Wang, Jun, 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 490, 55–60.
- Reid, G., 2016. Probiotics: Definition, scope and mechanisms of action. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 30, 17–25.
- Ren, D., Li, C., Qin, Y., Yin, R., Du, S., Ye, F., Liu, C., Liu, H., Wang, M., Li, Y., Sun, Y., Li, X., Tian, M., Jin, N., 2014. In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe* 30, 1–10.
- Rimada, P.S., Abraham, A.G., 2006. Kefiran improves rheological properties of glucono- δ -lactone induced skim milk gels. *Int. Dairy J.* 16, 33–39.
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., De los Reyes-Gavilán, C.G., Salazar, N., 2016. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front. Microbiol.* 7, 1–9.
- Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Meheust, A., 2010. Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* 104, S1–S63.
- Rodríguez, C., Medici, M., Mozzi, F., de Valdez, G.F., 2010. Therapeutic effect of *Streptococcus thermophilus* CRL 1190-fermented milk on chronic gastritis. *World J. Gastroenterol.* 16, 1622–1630.
- Rokka, S., Myllykangas, S., Joutsjoki, V., 2008. Effect of specific colostral antibodies and selected lactobacilli on the adhesion of *Helicobacter pylori* on AGS cells and the *Helicobacter*-induced IL-8 production. *Scand. J. Immunol.* 68, 280–286.

- Romanin, D., Serradell, M., González Maciel, D., Lausada, N., Garrote, G.L., Rumbo, M., 2010. Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 102–108.
- Romanin, D.E., Llopis, S., Genovés, S., Martorell, P., Ramón, V.D., Garrote, G.L., Rumbo, M., 2016. Probiotic yeast *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 shows anti-inflammatory and anti-oxidative stress properties in *in vivo* models. *Benef. Microbes.* 7, 83–93.
- Rosa, D.D., Dias, M.M., Grześkowiak, Ł.M., Reis, S.A., Conceição, L.L., Maria do Carmo, G.P., 2017. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr Res Rev* 30(1), 82-96.
- Rossi, M., Amaretti, A., Raimondi, S., 2011. Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* 3, 118–134.
- Ruas-Madiedo, P., Abraham, A.G., Mozzi, F., de los Reyes-Gavilán, C.G., 2008. Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, in: *Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications*. pp. 137–166.
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C.G., Salminen, S., 2006. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J. Food Prot.* 69, 2011–5.
- Ruas-Madiedo, P., Medrano, M., Salazar, N., De Los Reyes-Gavilán, C.G., Pérez, P.F., Abraham, A.G., 2010. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate in vitro the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells. *J. Appl. Microbiol.* 109, 2079–2086.
- Rugge, M., Pennelli, G., Pilozi, E., Fassan, M., Ingravallo, G., Russo, V.M., Di Mario, F., 2011. Gastritis: The histology report. *Dig. Liver Dis.* 43, S373–S384.
- Ryan, K.A., O'Hara, A.M., van Pijkeren, J.-P., Douillard, F.P., O'Toole, P.W., 2009. *Lactobacillus salivarius* modulates cytokine induction and virulence factor gene expression in *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 58, 996–1005.
- Ryan, P.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Caplice, N.M., Stanton, C., 2015. Sugar-coated: Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food Funct.* 6, 679–693.
- Rzepakowska, A., Zielińska, D., Ołdak, A., Kołożyn-Krajewska, D., 2017. Safety assessment and antimicrobial properties of the lactic acid bacteria strains isolated from polish raw fermented meat products. *Int. J. Food Prop.* 20, 2736–2747.
- Saeedi, B J, Kao, D J, Saeedi, Bejan J, Kao, Daniel J, Kitzenberg, D.A., Dobrinskikh, E., Schwisow, K.D., Masterson, J.C., Kendrick, A.A., Kelly, C.J., Bayless, A.J., Kominsky, D.J., Campbell, E.L., Kuhn, K.A., Furuta, G.T., Colgan, S.P., Glover, L.E., 2015. HIF-dependent regulation of claudin-1 is central to intestinal epithelial tight junction integrity. *Mol. Biol. Cell* 26, 2252–2262.

- Salazar, N., Gueimonde, M., Hernández-Barranco, A.M., Ruas-Madiedo, P., De Los Reyes-Gavilán, C.G., 2008. Exopolysaccharides produced by intestinal Bifidobacterium strains act as fermentable substrates for human intestinal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4737–4745.
- Salvetti, E., O'Toole, P.W., 2017. When regulation challenges innovation: The case of the genus *Lactobacillus*. *Trends Food Sci. Technol.* 66, 187–194.
- Salvetti, E., Torriani, S., Felis, G.E., 2012. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 4, 217–226.
- Sánchez, B., Ruiz, L., Gueimonde, M., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., 2012. Toward improving technological and functional properties of probiotics in foods. *Trends Food Sci. Technol.* 26, 56–63.
- Sánchez, J.I., Martínez, B., Guillén, R., Jiménez-Díaz, R., Rodríguez, A., 2006. Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7495–7502.
- Sanders, M.E., Benson, A., Lebeer, S., Merenstein, D.J., Klaenhammer, T.R., 2018. Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 207–216.
- Santin, J.R., Daufenback Machado, I., Rodrigues, S.F.P., Teixeira, S., Muscará, M.N., Lins Galdino, S., da Rocha Pitta, I., Farsky, S.H.P., 2013. Role of an Indole-Thiazolidine Molecule PPAR Pan-Agonist and COX Inhibitor on Inflammation and Microcirculatory Damage in Acute Gastric Lesions. *PLoS One* 8, 1–13.
- Saori Ishii Mauro, C., García, S., 2019. Coconut milk beverage fermented by *Lactobacillus reuteri*: optimization process and stability during refrigerated storage. *J. Food Sci. Technol.* 56(2), 854–864.
- Scaldaferri, F., Pizzoferrato, M., Gerardi, V., Lopetuso, L., Gasbarrini, A., 2012. The gut barrier: New acquisitions and therapeutic approaches. *J. Clin. Gastroenterol.* 46, S12–S17.
- Scholz, C.C., Taylor, C.T., 2013. Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13, 646–653.
- Senol, A., Isler, M., Karahan, A.G., Kilic, G.B., Kuleasan, H., Kaya, S., Keskin, M., Goren, I., Saritas, U., Aridogan, B.C., Delibas, N., 2011. Preventive effect of probiotics and α -tocopherol on ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *J. Med. Food* 14, 173–179.
- Serasanambati, M., Chilakapati, S.R., 2016. Function of Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) in human diseases-A Review. *South Indian J. Biol. Sci.* 2(4), 368–387. <https://doi.org/10.22205/sijbs/2016/v2/i4/103443>

- Shekh, S.L., Dave, J.M., Vyas, B.R.M., 2016. Characterization of *Lactobacillus plantarum* strains for functionality, safety and γ -amino butyric acid production. *LWT*. 74, 234–241.
- Sierro, F., Dubois, B., Coste, A., Kaiserlian, D., Kraehenbuhl, J.P., Sirard, J.C., 2001. Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13722–7.
- Silva, J., Carvalho, A.S., Pereira, H., Teixeira, P., Gibbs, P.A., 2004. Induction of stress tolerance in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* by the addition of sucrose to the growth medium. *J. Dairy Res.* 71, 121–125.
- Singh, T.P., Kaur, G., Malik, R.K., Schillinger, U., Guigas, C., Kapila, S., 2012. Characterization of Intestinal *Lactobacillus reuteri* Strains as Potential Probiotics. *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 4, 47–58.
- Slomiany, B.L., Piotrowski, J., Slomiany, A., 2000. Up-regulation of endothelin-converting enzyme-1 in gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267, 801–805.
- Sonveaux, P., Copetti, T., Saedeleer, D., Végran, C.J., Verrax, F., 2012. Targeting the Lactate Transporter MCT1 in Endothelial Cells Inhibits Lactate-Induced HIF-1 Activation and Tumor Angiogenesis. *PLoS One* 7, 33418.
- Southgate, D.A.T., 1976. Selected methods, in: Determination of Food Carbohydrates. Applied Science Publishers, pp. 108–109.
- Stack, H.M., Kearney, N., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., 2010. Association of beta-glucan endogenous production with increased stress tolerance of intestinal lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 500–507.
- Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F., 2013. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiol.* 35, 92–98.
- Steinberg, R.S., Lima, M., Gomes de Oliveira, N.L., Miyoshi, A., Nicoli, J.R., Neumann, E., Nunes, A.C., 2014. Effect of intestinal colonisation by two *Lactobacillus* strains on the immune response of gnotobiotic mice. *Benef. Microbes*. 5, 409–419.
- St-Onge, M. P., Farnworth, E. R., Savard, T., Chabot, D., Mafu, A., Jones, P. J., 2002. Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial. *BMC complement. Altern. M.* 2, 1.
- Suharja, A.A.S., Henriksson, A., Liu, S.Q., 2014. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* on viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* in fermented milk under ambient conditions. *J. Food Process. Preserv.* 38, 326–337.

- Sun, M.-C., Hou, P.-P., Wang, X.-Y., Zhao, C.-H., Cheng, B.-J., Wang, Y.-L., Hao, H.-W., Zhang, T.-H., Ye, H.-Q., 2018. Pretreatment with *Lactobacillus reuteri* F-9-35 attenuates ethanol-induced gastric injury in rats. *Food Nutr. Res.* 62.
- Sun, S.Y., 2010. N-acetylcysteine, reactive oxygen species and beyond. *Cancer Biol. Ther.* 9, 109–110.
- Suo, H., Zhao, X., Qian, Y., Sun, P., Zhu, K., Li, J., Sun, B., 2016. *Lactobacillus fermentum* Suo attenuates HCl/Ethanol induced gastric injury in mice through its antioxidant effects. *Nutrients* 8, 155.
- Surayot, U., Wang, J., Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Mehdi, T., YongJin, L., Jin-Kyung, K., WooJung, P., You, S., 2014. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria : Structural analysis , molecular weight effect on immunomodulation. *Int. J. Biol. Macromol.* 68, 1–2.
- Sutherland, I.W., 1972. Bacterial Exopolysaccharides. *Adv. Microb. Physiol.* 8, 143–213.
- Suzuki, H., Mori, M., Sakaguchi, A.A., Suzuki, M., Miura, S., Ishii, H., 1998. Enhanced levels of C-X-C chemokine, human GRO α , in *Helicobacter pylori*-associated gastric disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 516–520.
- Svensson, M., Waak, E., Svensson, U., Rådström, P., 2005. Metabolically improved exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* and its influence on the rheological properties of fermented milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6398–400.
- Takeda, K., Ichiki, T., Narabayashi, E., Inanaga, K., Miyazaki, R., Hashimoto, T., Matsuura, H., Ikeda, J., Miyata, T., Sunagawa, K., 2009. Inhibition of prolyl hydroxylase domain-containing protein suppressed lipopolysaccharide-induced TNF- α expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 2132-2137.
- Takeda, S., Igoshi, K., Tsend-Ayush, C., Oyunsuren, T., Sakata, R., Koga, Y., Arima, Y., Takeshita, M., 2017. *Lactobacillus paracasei* strain 06TCa19 suppresses inflammatory chemokine induced by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells. *Hum. Cell* 30, 258–266.
- Tamang, J. P., Watanabe, K., Holzapfel, W. H., 2016. Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Front. Microbial.* 7, 377.
- Tavares Menezes, A.G., Ramos, C.L., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2018. Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. *Food Res. Int.* 111, 187–197.
- Taylor, C.T., Colgan, S.P., 2017. Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 774–785.
- Thakur, K., Tomar, S.K., De, S., 2016. Lactic acid bacteria as a cell factory for riboflavin production. *Microb. Biotechnol.* 9, 441–451.

- Thorsen, K., Søreide, J.A., Kvaløy, J.T., Glomsaker, T., Søreide, K., 2013. Epidemiology of perforated peptic ulcer: age- and gender-adjusted analysis of incidence and mortality. *World J. Gastroenterol.* 19, 347–54.
- Thursby, E., Juge, N., 2017. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* 474(11), 1823–1836.
- Tremlett, H., Bauer, K.C., Appel-Cresswell, S., Finlay, B.B., Waubant, E., 2017. The gut microbiome in human neurological disease: A review. *Ann. Neurol.* 81, 369–382.
- Tsai, Y.-L., Lin, T.-L., Chang, C.-J., Wu, T.-R., Lai, W.-F., Lu, C.-C., Lai, H.-C., 2019. Probiotics, prebiotics and amelioration of diseases. *J. Biomed. Sci.* 26 (1), 3.
- Tuohy, K.M., Pinart-Gilberga, M., Jones, M., Hoyles, L., McCartney, A.L., Gibson, G.R., 2007. Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1026–1032.
- Uchiyama, K., Naito, Y., Takagi, T., 2019. Intestinal microbiome as a novel therapeutic target for local and systemic inflammation. *Pharmacol. Ther.* 199, 164–172.
- Ushiyama, A., Tanaka, K., Aiba, Y., Shiba, T., Takagi, A., Mine, T., Koga, Y., 2003. *Lactobacillus gasseri* OLL2716 as a probiotic in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 986–991.
- van der Beek, C.M., Bloemen, J.G., van den Broek, M.A., Lenaerts, K., Venema, K., Buurman, W.A., Dejong, C.H., 2015. Hepatic Uptake of Rectally Administered Butyrate Prevents an Increase in Systemic Butyrate Concentrations in Humans. *J. Nutr.* 145, 2019–2024.
- Varma, S., Hu, J., Mehta, A., Song, Y., Park, A., Zhi, M., Hutfless, S., 2019. Initial medical and surgical management of inflammatory bowel disease in the biologic era: A comparison between the United States and China. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 234–241.
- Vera Pingitore, E., Pessione, A., Fontana, C., Mazzoli, R., Pessione, E., 2016. Comparative proteomic analyses for elucidating metabolic changes during EPS production under different fermentation temperatures by *Lactobacillus plantarum* Q823. *Int. J. Food Microbiol.* 238, 96–102.
- Vijayendra, S.V.N., Shamala, T.R., 2014. Film forming microbial biopolymers for commercial applications—A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 34, 338–357.
- Viljoen, B.C., 2001. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *Int. J. Food Microbiol.* 69(1-2), 37-44.
- Wasilewski, A., Zielińska, M., Storr, M., Fichna, J., 2015. Beneficial effects of probiotics, prebiotics, synbiotics, and psychobiotics in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 1674–1682.

- Watanabe, T., Nishio, H., Tanigawa, T., Yamagami, H., Okazaki, H., Watanabe, K., Tominaga, K., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Asahara, T., Nomoto, K., Higuchi, K., Takeuchi, K., Arakawa, T., 2009. Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: involvement of lactic acid. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 297, G506–G513.
- Wauters, G., De Baere, T., Willems, A., Falsen, E., Vaneechoutte, M., 2003. Description of *Comamonas aquatica* comb. nov. and *Comamonas kerstersii* sp. nov. for two subgroups of *Comamonas terrigena* and emended description of *Comamonas terrigena*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 859–862.
- Weiss, G.A., Hennet, T., 2017. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 2959–2977.
- Witthuhn, R. C., Schoeman, T., Britz, T. J., 2005. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *Int. Dairy J.*, 15, 383–389.
- Wlodarska, M., Kostic, A.D., Xavier, R.J., 2015. An integrative view of microbiome-host interactions in inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe* 17, 577–591.
- Wong, A., Ngu, D.Y. Saint, Dan, L.A., Ooi, A., Lim, R.L.H., 2015. Detection of antibiotic resistance in probiotics of dietary supplements. *Nutr. J.* 14 (1), 95.
- World Health Organization, 2004. Global Status Report on Alcohol.
- Xu, R., Ma, S., Wang, Y., Liu, L., Li, P., 2010. Screening, identification and statistic optimization of a novel exopolysaccharide producing *Lactobacillus paracasei* HCT. *African J. Microbiol. Res.* 4, 783–795.
- Xuan, J., Deguchi, R., Watanabe, S., Ozawa, H., Urano, T., Ogawa, Y., Fukuda, R., Kijima, H., Koga, Y., Takagi, A., 2005. Relationship between IL-1 β gene polymorphism and gastric mucosal IL-1 β levels in patients with *Helicobacter pylori* infection. *J. Gastroenterol.* 40, 796–801.
- Yamada, S., Kato, S., Matsuhisa, T., Makonkawkeyoon, L., Yoshida, M., Chakrabandhu, T., Lertprasertsuk, N., Suttharat, P., Chakrabandhu, B., Nishiumi, S., Chongraksut, W., Azuma, T., 2013. Predominant mucosal IL-8 mRNA expression in non-cagA Thais is risk for gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 19, 2941–9. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i19.2941>
- Yamasaki-Yashiki, S., Sawada, H., Kino-Oka, M., Katakura, Y., 2017. Analysis of gene expression profiles of *Lactobacillus paracasei* induced by direct contact with *Saccharomyces cerevisiae* through recognition of yeast mannan. *Biosci. Microbiota, Food Heal.* 36, 17–25.
- Yang, B., Chen, H., Gu, Z., Tian, F., Ross, R.P., Stanton, C., Chen, Y.Q., Chen, W., Zhang, H., 2014. Synthesis of conjugated linoleic acid by the linoleate isomerase complex in food-derived lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* 117, 430–439.

- Yang, Y.J., Chuang, C.C., Yang, H.B., Lu, C.C., Sheu, B.S., 2012. *Lactobacillus acidophilus* ameliorates *H. pylori*-induced gastric inflammation by inactivating the Smad7 and NFB pathways. *BMC Microbiol.* 12, 38.
- Yin, X., Yan, Y., Kim, E.B., Lee, B., Marco, M.L., 2014. Short communication: Effect of milk and milk containing *Lactobacillus casei* on the intestinal microbiota of mice. *J. Dairy Sci.* 97, 2049–2055.
- Yoda, K., Miyazawa, K., Masataka, Masaru, H., Fang, H., Fang He, Y., 2014. *Lactobacillus GG*-fermented milk prevents DSS-induced colitis and regulates intestinal epithelial homeostasis through activation of epidermal growth factor receptor. *Eur. J. Nutr.* 53, 105–115.
- Zagato, E., Mileti, E., Massimiliano, L., Fasano, F., Budelli, A., Penna, G., Rescigno, M., 2014. *Lactobacillus paracasei* CBA L74 metabolic products and fermented milk for infant formula have anti-inflammatory activity on dendritic cells *in vitro* and protective effects against colitis and an enteric pathogen *in vivo*. *PLoS One*, 9, e87615
- Zanirati, D. F., Abatemarco Jr, M., de Cicco Sandes, S. H., Nicoli, J. R., Nunes, Á. C., Neumann, E., 2015. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe.* 32, 70-76.
- Zannini, E., Waters, D.M., Coffey, A., Arendt, E.K., 2016. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 1121–1135.
- Zavala, L., Golowczyc, M.A., Van Hoorde, K., Medrano, M., Huys, G., Vandamme, P., Abraham, A.G., 2016. Selected *Lactobacillus* strains isolated from sugary and milk kefir reduce *Salmonella* infection of epithelial cells *in vitro*. *Benef. Microbes* 7, 585–595.
- Zeidan, A.A., Poulsen, V.K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P.M.F., Øregaard, G., Neves, A.R., 2017. Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, S168–S200.
- Zhai, Z., Torres-Fuentes, C., Heeney, D.D., Marco, M.L., 2019. Synergy between probiotic *Lactobacillus casei* and milk to maintain barrier integrity of intestinal epithelial cells. *J. Agric. Food Chem.* 67, 1955–1962.
- Zhang, D.D., Liu, J.L., Jiang, T.M., Li, L., Fang, G.Z., Liu, Y.P., Chen, L.J., 2017. Influence of *Kluyveromyces marxianus* on proteins, peptides, and amino acids in *Lactobacillus*-fermented milk. *Food Sci. Biotechnol.* 26, 739–748.
- Zhang, H., Sun, J., Liu, X., Hong, C., Zhu, Y., Liu, A., Li, S., Guo, H., Ren, F., 2013. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LC01 positively modulates intestinal microflora in healthy young adults. *J. Microbiol.* 51, 777–782.

- Zhao, K., Xie, Q., Xu, D., Guo, Y., Tao, X., Wei, H., Wan, C., 2018. Antagonistics of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 against *Helicobacter pylori* SS1 and its infection *in vitro* in human gastric epithelial AGS cells. *J. Biosci. Bioeng.* 126, 458–463.
- Zhou, C., Ma, F.Z., Deng, X.J., Yuan, H., Ma, H.S., 2008. Lactobacilli inhibit interleukin-8 production induced by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-activated Toll-like receptor 4. *World J. Gastroenterol.* 14, 5090–5095.
- Zhu, Y., Wang, X., Pan, W., Shen, X., He, Y., Yin, H., Zhou, K., Zou, L., Chen, S., Liu, S., 2019. Exopolysaccharides produced by yogurt-texture improving *Lactobacillus plantarum* RS20D and the immunoregulatory activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 121, 342–349.
- Zoetendal, E.G., Plugge, C.M., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M., 2003. *Victivallis vadensis* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting anaerobe from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 211–215.
- Zoumpourtikoudi, V., Pyrgelis, N., Chatzigrigoriou, M., Tasakis, R.N., Touraki, M., 2018. Interactions among yeast and probiotic bacteria enhance probiotic properties and metabolism offering augmented protection to *Artemia franciscana* against *Vibrio anguillarum*. *Microb. Pathog.* 125, 497–506.

El desarrollo de nuevos alimentos funcionales se ha convertido en una de las áreas de investigación e innovación de mayor interés para la industria alimentaria. Dentro de los alimentos funcionales, se destacan las leches fermentadas con microorganismos probióticos cuyo consumo ha sido asociado con diversos efectos beneficiosos sobre la salud.

En el presente trabajo se analizó la potencialidad probiótica de tres cepas *L. paracasei* productoras de exopolisacárido aisladas de kefir para la obtención de leches fermentadas funcionales.

L. paracasei CIDCA 8339 y CIDCA 83124 presentaron propiedades tecnológicas y probióticas adecuadas para ser utilizadas como *starters*. Las leches fermentadas con estas cepas modulan la respuesta inflamatoria a nivel gástrico e intestinal siendo el lactato el principal metabolito responsable del efecto. Además, los exopolisacáridos producidos en leche pueden modificar la microbiota fecal y el perfil de ácidos grasos de cadena corta contribuyendo a reducir el estado inflamatorio.

Los resultados obtenidos permiten proponer a las cepas CIDCA 8339 y CIDCA 83124 como nuevos candidatos para la obtención de leches fermentadas con propiedades antiinflamatorias para aliviar la sintomatología en personas que sufren de gastritis o enfermedades inflamatorias intestinales.

