



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**ESTUDIO DEL POTENCIAL EFECTO PROTECTOR DE
METABOLITOS INTRACELULARES DE *Lactobacillus*
casei CRL 431 CONTRA EL ESTRÉS OXIDATIVO
INDUCIDO POR AFLATOXINA B₁**

Por:

José Eleazar Aguilar Toalá

TESIS APROBADA POR LA COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTORADO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de “Estudio del potencial efecto protector de metabolitos intracelulares de *Lactobacillus casei* CRL 431 contra el estrés oxidativo inducido por aflatoxina B₁”, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias

Dr. Adrián Hernández Mendoza
Director

Dra. Belinda Vallejo Galland
Asesora

Dr. Aarón Fernando González Córdova
Asesor

Dr. Hugo Sergio García Galindo
Asesor

Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar
Asesor

Dr. Humberto Francisco Astiazarán García
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Estudio del Potencial Efecto Protector de Metabolitos Intracelulares de *Lactobacillus casei* CRL 431 Contra el Estrés Oxidativo Inducido por Aflatoxina B₁” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor José Eleazar Aguilar Toalá siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional en Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. por darme la oportunidad de realizar mis estudios en el programa de Doctorado en Ciencias.

A Dios por permitirme vivir este momento de mi vida.

A mi Director de Tesis, Dr. Adrián Hernández Mendoza por darme la oportunidad de ser formado bajo su supervisión, por compartir sus experiencias académicas, por exigirme hasta llegar a descubrir mis límites. Su confianza, paciencia y apoyo fueron piezas claves durante mi formación académica.

A mis asesores Dr. Aarón F. González Córdova y Dra. Belinda Vallejo Galland, por integrarme al grupo de trabajo del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos e iniciarme en el interesante mundo de la investigación. Agradezco sus acertadas sugerencias y aportes al proyecto de investigación de la tesis doctoral.

Al Dr. Hugo S. Garcia Galindo y al Dr. Gustavo A. González Aguilar por sus acertados consejos, sugerencias, comentarios y aportes al proyecto de investigación de la tesis doctoral.

Expreso un especial agradecimiento al Dr. Adrián Hernández Mendoza y Dr. Aarón F. González Córdova por los consejos personales, las palabras de ánimo.

Agradezco el apoyo técnico y experiencias brindados en diversas fases del trabajo experimental al M.C. Ricardo Reyes Díaz, M.C. Carmen Estrada Montoya y Dra.

María de Jesús Torres Llanez. Las facilidades en los laboratorios, asesorías y asistencia en el experimental contribuyeron valiosamente en el proyecto.

Al personal de la biblioteca Gerardo Reyna y Luis Conde y secretarías que siempre me atendieron amablemente, en especial a Faly Gil Lamadrid, Laura García, Verónica Araiza y Argelia Marín por el apoyo técnico brindado. También se agradece el apoyo técnico brindado por Héctor Galindo Murrieta, en la revisión del documento final de la tesis.

A mis compañeros de laboratorio con quienes compartí muchas experiencias y horas de trabajo Isidro, Ma. Alejandra, Ariana, Cecilia, Lady, Braulia, Verónica, Miguel Rendón, Miguel Álvarez, José, Miriam y Carmen Manzanarez, porque su amistad y convivencia hicieron más ameno el trabajo. A las postdoctorantes, Priscilia Heredia y Lilia Beltrán. Cada uno ha puesto un granito de arena y ha aportado en poco o gran medida algo a mi crecimiento personal y profesional, sin duda contribuyeron valiosamente.

A la Dra. Andrea M. Liceaga de la Universidad de Purdue por haberme brindado la oportunidad de realizar una estancia académica en su Laboratorio de Química de Proteínas y Péptidos Bioactivos para la culminación de la tesis doctoral. A los estudiantes Uriel Urbizo Reyes, Gabriela Calzada Luna y Felicia Hall, por hacerme sentir como un miembro más de su grupo de trabajo y por todas las facilidades técnicas durante mi estancia

Un agradecimiento especial a los últimos Chapingueros que aún están en el laboratorio, Alejandro Santos y Lulú Santiago, con quienes he compartido muchas experiencias personales y académicas.

DEDICATORIA

A mis padres **Eleazar Aguilar** (q.e.p.d.) y **Pilar Toalá** por todo su amor, apoyo y confianza incondicional que siempre me han brindado. Por estar ahí cuando los necesito y apoyarme en las decisiones que he tomado a lo largo de la vida. No ha sido fácil el camino recorrido, pero en este documento queda plasmado un logro más.

A mis hermanos **Milton Manolo y Jasive**, quienes me han apoyado en todo y han sabido compartir mis logros con ustedes. Apoyándonos siempre hemos salido adelante y superado muchos obstáculos.

A mi esposa **Fran**, por apoyarme en cada paso que hemos dado juntos, por estar siempre pendiente de mí. Agradezco inmensamente, tu paciencia en las largas noches de desvelo, tu disposición a los apretados horarios del trabajo y tu comprensión en mis trabajos durante todo el doctorado.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABLAS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1. Aspectos Generales del Estrés Oxidativo.....	16
2.2. Estrés Oxidativo Inducido por Xenobióticos Dietarios.....	17
2.3. Enfermedades Relacionadas con el Estrés Oxidativo.....	20
2.4. Estrategias Contra el Estrés Oxidativo.....	21
2.4.1. Uso de Fitoquímicos.....	21
2.4.2. Uso de Vitaminas.....	22
2.5. Uso de Bacterias Ácido Lácticas/Probióticas como Estrategia Contra el Estrés Oxidativo.....	22
2.5.1. Estudios <i>In Vitro</i>	23
2.4.2. Estudios <i>In Vivo</i>	24
3. HIPOTESIS	26
4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo General.....	27
4.2. Objetivos Específicos.....	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1. Reactivos.....	28
5.2. Bacterias Ácido Lácticas de Estudio.....	28
5.3. Preparación de Células Completas, Contenido Intracelular y Fragmentos de Pared de las Bacterias	30
5.4. Evaluación de la Capacidad Antioxidante.....	30
5.4.1. Método ABTS.....	31
5.4.2. Método ORAC.....	32
5.4.1. Método LOI.....	33

CONTENIDO (Continuación)

5.5. Determinación de la Composición Elemental de los Metabolitos que Contribuyen a las Propiedades Antioxidantes y sus Posibles Interacciones de la Cepa Seleccionada <i>Lactobacillus casei</i> CRL 431.....	34
5.5.1. Determinación de Glutación.....	34
5.5.2. Determinación de Compuestos Lipídicos.....	35
5.5.3. Determinación de Compuestos Proteínicos.....	36
5.5.4. Determinación de Compuestos Polisacáridos.....	36
5.5.5. Determinación de Vitamina B ₁₂	37
5.5.6. Determinación de Ácido Gamma-Aminobutírico.....	38
5.5.7. Método de Inhibición de Hemólisis Oxidativa	39
5.6. Evaluación de las Posibles Interacciones de los Componentes Antioxidantes del Contenido Intracelular de la Cepa Seleccionada.....	39
5.7. Identificación de Metabolitos del Contenido Intracelular de <i>Lactobacillus casei</i> CRL 431 Mediante Espectroscopia de Raman.....	40
5.7.1. Preparación del Contenido Intracelular.....	40
5.7.2. Identificación de los Metabolitos por Análisis del Espectro de Raman.....	40
5.7.3. Análisis Actividad-Metabolito Utilizando el Programa PASS.....	41
5.8. Evaluación <i>In Vitro</i> , <i>Ex Vivo</i> e <i>In Vivo</i> del Potencial Efecto Protector de CI-CRL431 en Modelos con Estrés Oxidativo Inducido.....	42
5.8.1. Evaluación <i>In Vitro</i> y <i>Ex Vivo</i> del Efecto Protector de la Cepa Seleccionada Sobre Modelos Basados en Células: Caco-2 y Eritrocitos.....	42
5.8.2. Evaluación <i>In Vivo</i> del Efecto Protector de la Cepa Seleccionada Utilizando un Modelo Murino con Estrés Oxidativo Inducido por Aflatoxina B ₁	44
5.8.2.1 Preparación del contenido intracelular.....	44
5.8.2.2. Animales de estudio.....	44
5.8.2.3. Procedimiento de aleatorización.....	46
5.8.2.4. Preparación de la solución de trabajo de aflatoxina B ₁ ...	46
5.8.2.5. Administración de tratamientos.....	47
5.8.2.6. Determinación de la capacidad antioxidante.....	48
5.8.2.7. Determinación de la peroxidación lipídica.....	48
5.8.2.8. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).....	48
5.8.2.9. Cálculo del índice de estrés oxidativo.....	49
5.9. Análisis Estadístico.....	49

CONTENIDO (Continuación)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
6.1. Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Célula Completas, Contenido Intracelular y Fragmentos de Pared de las Bacterias Probióticas.....	50
6.2. Composición Elemental de los Metabolitos que Contribuyen a las Propiedades Antioxidantes y sus Posibles Interacciones de la Cepa Seleccionada <i>Lactobacillus casei</i> CRL 431.....	54
6.3. Metabolitos del Contenido Intracelular de <i>Lactobacillus casei</i> CRL431 Identificados Mediante Espectroscopia de Raman.....	61
6.4. Análisis Actividad-Metabolito Utilizando el Programa PASS...	65
6.5. Efecto Protector <i>In Vitro</i> , <i>Ex Vivo</i> e <i>In Vivo</i> del Contenido Intracelular de <i>Lactobacillus casei</i> CRL 431 en Modelos con Estrés Oxidativo Inducido.....	66
7. CONCLUSIONES	76
8. REFERENCIAS	77
8. APÉNDICE	85

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema representativo del estrés oxidativo y sus efectos patológicos..	17
2	Espectro de Raman representativo del contenido intracelular de la cepa <i>Lactobacillus casei</i> CRL 431.....	62
3	(A) Capacidad antioxidante de células completas, contenido intracelular y fragmentos de pared obtenidos de <i>Lactobacillus casei</i> CRL-431. (B) Micrografías representativas del efecto protector del contenido intracelular de <i>Lactobacillus casei</i> CRL-431 en eritrocitos con estrés oxidativo inducido por AAPH. (C) Inhibición de la oxidación celular del contenido intracelular de <i>Lactobacillus casei</i> CRL-431 en células caco-2 con estrés oxidativo inducido por AAPH...	68
4	Índice de estrés oxidativo basado en el balance entre la peroxidación lipídica y las actividades de las enzimas antioxidantes, determinado en plasma e homogeneizado de hígado del testigo (PBS) y los tratamientos.....	75

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Bacterias ácido lácticas utilizadas en el presente trabajo.....	29
2	Capacidad antioxidante (μM de Trolox) de las cepas utilizadas en el presente estudio utilizando diferentes métodos.....	52
3	Participación de los principales compuestos sobre la capacidad antioxidante del contenido intracelular de la cepa Lc-CRL 431.....	56
4	Perfil de ácidos grasos (expresada como % en peso del total de ácidos grasos) del contenido intracelular de Lc-CRL 431.....	57
5	Posibles interacciones (sinergista, antagonista o aditiva) entre los principales componentes del contenido intracelular de Lc-CRL 431.....	60
6	Posición y su posible correspondiente metabolito detectado en el espectro de Raman del contenido intracelular de la cepa <i>Lactobacillus casei</i> CRL 431.....	63
7	Ganancia de peso, consumo de alimento y agua durante de los grupos experimentales durante el periodo de administración.....	70
8	Actividad antioxidante (μM Trolox) determinado por los métodos ABTS y ORAC en homogeneizado de hígado y plasma de los grupos experimentales.....	72
9	Actividad de las enzimas antioxidantes ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) y niveles de peroxidación lipídica (nM MDA/ mg de protein) en plasma y homogeneizado de hígado de los grupos experimentales.....	74

RESUMEN

Estudios recientes han demostrado que las bacterias ácido lácticas (BAL) poseen propiedades antioxidantes, lo cual podría ser utilizado como estrategia para la prevención de enfermedades crónico degenerativas relacionadas con el estrés oxidativo. Sin embargo, se necesitan estudios que permitan profundizar en la identificación de los metabolitos responsables de dicha actividad. En este sentido, el objetivo de la presente investigación fue estudiar el potencial efecto protector del contenido intracelular de bacterias ácido lácticas específicas, contra el estrés oxidativo inducido por aflatoxina B₁ e identificar los metabolitos relacionados con las propiedades antioxidantes. Los resultados de la presente tesis demostraron, en general, que el contenido intracelular de las cepas probióticas presentan las mayores propiedades antioxidantes en comparación con las células completas y fragmentos de pared. La etapa de selección, evidenció que el contenido intracelular de la cepa *Lactobacillus casei* CRL 431 fue la que mostró las mejores propiedades antioxidantes. Los datos sugieren que la naturaleza de los compuestos antioxidantes es principalmente de origen lipídico y proteico, observándose la participación de glutatión, pero en menor medida. Por otra parte, el análisis del espectro de Raman mostró una variedad de compuestos con potencial antioxidante, incluyendo cisteína, triptófano, tirosina, ácido mirístico, ácido esteárico, ácido palmítico y ácido oleico y glutatión. Finalmente, los resultados de los ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* sugieren que CI-CRL431, posee metabolitos capaces de atravesar las membranas de células epiteliales e inhibir la oxidación a nivel celular, reducir el daño oxidativo de las membranas de eritrocitos, así como modular el sistema antioxidante en organismos vivos, respectivamente. Por lo tanto, se concluye que el contenido intracelular de la cepa *Lactobacillus casei* CRL 431 puede ser una fuente prometedora de antioxidantes dietarios, con un alto potencial para ser utilizado en la preparación de alimentos fermentados y/o suplementos. De esta forma, pueden mejorar la capacidad antioxidante total del consumidor y puedan ayudar en la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo inducido por agentes pro-oxidantes, particularmente por aflatoxina B₁.

Palabras clave: Antioxidantes, metabolitos intracelulares, glutatión

ABSTRACT

Recent studies have shown that lactic acid bacteria (LAB) possess antioxidant properties, which could be used as a strategy for the prevention of oxidative stress-related to chronic degenerative diseases. However, further studies are needed to identify the metabolites responsible for this activity. Hence, the aim of this work was to evaluate the potential protective effect of the intracellular content of specific lactic acid bacteria against aflatoxin B₁-induced oxidative stress and to identify metabolites related to its antioxidant properties. Overall, results demonstrated that bacterial intracellular content have higher antioxidant capacity than whole cells and wall fragments, being the intracellular content of *Lactobacillus casei* CRL 431 which presented the one with the highest antioxidant properties. Furthermore, data suggested that the nature of the antioxidant compounds is mainly of lipidic and protein origin, which include glutathione participation. On the other hand, Raman spectrum analysis showed a variety of compounds with antioxidant capacity, e.g., cysteine, tryptophan, tyrosine, myristic acid, stearic acid, palmitic acid and oleic acid and glutathione. Besides, the results of *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* assays, suggested that CI-CRL431 possesses metabolites capable of penetrating epithelial cell membranes and inhibiting oxidation at the cellular level, reducing oxidative damage to red cell membranes, as well as modulating the antioxidant system in living organisms, respectively. Therefore, we concluded that the intracellular content of the *Lactobacillus casei* CRL 431 strain can be a promising source of dietary antioxidants, with a high potential to be used in the preparation of fermented foods and/or supplements that improve the total antioxidant capacity of the consumer and can help in the prevention of diseases associated with oxidative stress induced by pro-oxidant agents, particularly aflatoxin B₁.

Keywords: Antioxidants, intracellular metabolites, glutathione

1.INTRODUCCIÓN

Las especies reactivas del oxígeno son utilizadas a nivel fisiológico como moléculas de señalización óxido-reducción, con importantes funciones reguladoras a nivel fisiológico (Niki, 2016). Sin embargo, bajo ciertas circunstancias puede presentarse un desequilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno y la disponibilidad y acción de los antioxidantes, lo que conlleva a una disrupción de la señalización y control óxido-reducción, tal condición biológica dinámica y compleja es conocida como estrés oxidativo (Gutteridge y Halliwell, 2018). La disrupción de la homeostasis óxido-reducción conlleva a modificaciones en la estructura y cambios en la función de ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, principalmente, en células y tejidos (Pisoschi y Pop, 2015). Estas modificaciones o cambios desencadenan perturbaciones en las funciones normales de las células y tejidos, lo que ocasiona un mal funcionamiento de órganos y sistemas en el cuerpo humano. Lo anterior ha sido asociado como la etiología de varias enfermedades crónico-degenerativas (Niki, 2016).

Con base en lo anterior, se han planteado ciertas estrategias para regular el estrés oxidativo en los organismos vivos, tales como el uso de fitoquímicos, vitaminas, minerales, proteínas (Bouayed y Bohn, 2010; Firuzi *et al.* 2011; Sarmadi e Ismail, 2010). Lo anterior constituyen terapias antioxidantes y están directamente relacionadas con los mecanismos de neutralización de especies reactivas de oxígeno y quelación de metales pro-oxidantes (Benfeito *et al.* 2013; Davies y Holt, 2018). Actualmente, la evidencia científica ha señalado que algunos compuestos antioxidantes son más efectivos cuando presentan varios mecanismos, adicionales a las propiedades antioxidantes antes mencionados, como la inducción de genes relacionados con la respuesta antioxidante (e.g. activación del factor de transcripción Nrf2) o sobre la inhibición de enzimas involucradas en la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (Benfeito *et al.* 2013; Rodrigo *et al.* 2011).

Algunas alternativas novedosas que se han estudiado como estrategia para contrarrestar el estrés oxidativo es el uso de bacterias probióticas completas y viables, las cuales han demostrado exhibir propiedades antioxidantes *in vitro* (Amaretti *et al.* 2013; Li *et al.* 2012) e *in vivo* en modelos animales y humanos (Chamari *et al.* 2008; Martarelli *et al.* 2011). A pesar de que estudios *in vitro* han demostrado que el contenido intracelular de diversas bacterias probióticas muestran propiedades antioxidantes, incluso mayor que las células completas, hasta el momento no existen estudios *in vivo* que evalúen el potencial efecto antioxidante contra el estrés oxidativo inducido por agentes pro-oxidantes. Además de lo anterior, no se ha documentado la naturaleza de los metabolitos responsables de la capacidad antioxidante, ni realizado estudios detallados acerca de su identificación. En este sentido el objetivo de la presente investigación fue estudiar el potencial efecto protector del contenido intracelular de bacterias ácido lácticas específicas contra el estrés oxidativo inducido por aflatoxina B₁.

2.ANTECEDENTES

2.1. Aspectos Generales del Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo, como condición dinámica y compleja, es caracterizada por un desbalance entre la generación de especies reactivas de oxígeno y la disponibilidad y acción de los antioxidantes (Gutteridge y Halliwell, 2018). La excesiva producción de especies reactivas de oxígeno puede aparecer debido a una deficiencia en los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, así como al mal funcionamiento de la cadena transportadora de electrones y la sobreestimulación de algunas enzimas relacionadas con la producción controlada de especies reactivas de oxígeno (e.g. NAD(P)H) (Bhattacharyya *et al.* 2014; Nita y Grzybowski, 2016). Los factores desencadenantes de las situaciones antes mencionadas, están relacionados con procesos inflamatorios, la actividad del citocromo P450, los metales pesados de transición, la radicación y los compuestos xenobióticos (Figura 1).

El estrés oxidativo causa principalmente daño oxidativo a lípidos (peroxidación lipídica), proteínas y ADN (Ichiishi *et al.* 2016). Estas alteraciones moleculares forman parte de los múltiples factores etiológicos que desencadena en diversas enfermedades crónico-degenerativas, tales como la hipertensión, diabetes y cáncer, entre otras (Ichiishi *et al.* 2016; Gutteridge y Halliwell, 2018).

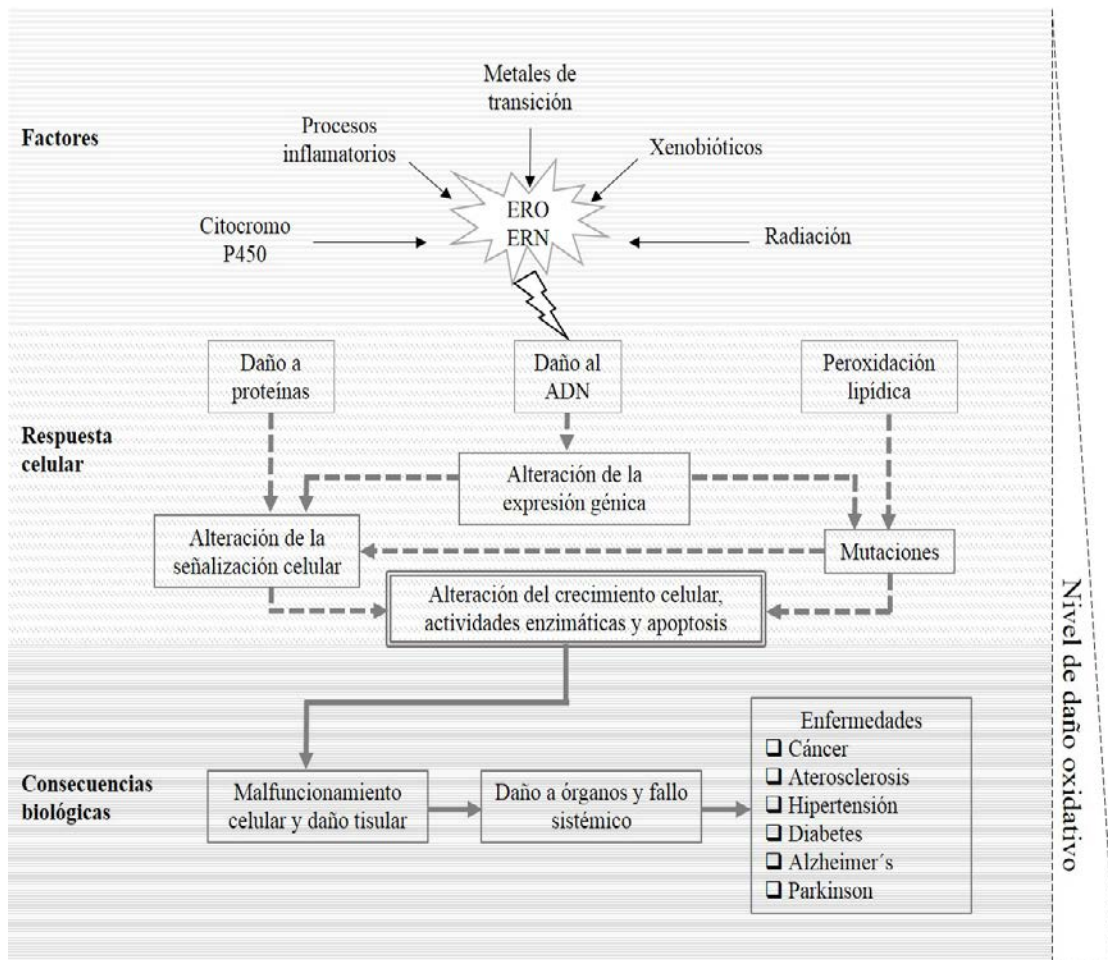


Figura 1. Esquema representativo del estrés oxidativo y sus efectos patológicos

2.2. Estrés Oxidativo Inducido por Xenobióticos Dietarios

Los xenobióticos son compuestos extraños al cuerpo humano, no producidos o presentes naturalmente en el organismo, que pueden tener un efecto tóxico al desestabilizar procesos fisiológicos y celulares a través de la interacción con macromoléculas biológicas (Obach y Kalgutkar, 2010; Pollard *et al.* 2018). Los xenobióticos dietarios pueden estar presentes de forma natural en los alimentos (e.g. micotoxinas) o formarse durante el manejo y procesamiento de estos (e.g. acrilamida, aminos heterocíclicas) (Das et al 2016; Koppel *et al.* 2017). Las enzimas encargadas de metabolizar a los xenobióticos pueden ser divididos

en enzimas de tipo fase I, fase II y transportadoras. La fase I generalmente involucra reacciones de oxidación, hidrólisis o reducción para transformar compuestos apolares o de carácter lipofílico en compuestos más hidrofílicos o polares. Estas reacciones, habitualmente implican adicionar grupos hidroxilos, amino, carboxilos o tioles a las moléculas para aumentar su solubilidad en agua (Evans, 2013). En general, las reacciones de oxidación son las más comunes para la mayoría de los compuestos xenobióticos, siendo biotransformadas principalmente por el complejo enzimático citocromo P450.

Por otra parte, en la fase II la biotransformación de los xenobióticos se lleva a cabo a través de la conjugación de los compuestos metabolizados por la fase I, en el que regularmente se conjugan con otros compuestos y/o grupos funcionales (*e.g.*, sulfato, aminoácidos, glutatión y grupos acilo/metilo) (Koppel *et al.* 2017).

En el proceso de biotransformación de la fase II, la mayoría de los compuestos xenobióticos resultan en compuestos menos tóxicos. Sin embargo, existen algunos xenobióticos, tales como el acetaminofeno y la aflatoxina B₁, que después de su metabolismo en el hígado por la fase I, resulta en sub-productos más tóxicos que los compuestos precursores (Evans, 2013).

En este sentido, en el caso de la aflatoxina B₁ (AFB₁), durante su metabolismo se generan metabolitos altamente tóxicos como los epóxidos AFB₁-8,9, así como la formación de diversas especies reactivas del oxígeno (Bbosa *et al.* 2013). Shen *et al.* (1995, 1996) investigaron cuáles especies reactivas de oxígeno eran producidas por la aflatoxina B₁ en un experimento utilizando un cultivo celular de hepatocitos obtenidos de ratas. Los resultados evidenciaron la producción de especies reactivas de oxígeno, tales como el radical superóxido (O₂^{•-}), hidroxilo (OH[•]) y peróxido de hidrogeno (H₂O₂).

Mary *et al.* (2012) estudio las posibles rutas de producción de especies reactivas del oxígeno inducido por exposición de AFB₁ en células mononucleares de bazo de ratas. Los resultados de su investigación evidenciaron que principalmente tres rutas están

involucradas: la ruta del metabolismo del ácido araquidónico, de la actividad del citocromo P450 y a través del complejo I de la cadena transportadora de electrones.

1) Metabolismo del ácido araquidónico:

La AFB₁ induce un aumento de la actividad de la enzima Fosfolipasa A2, lo cual incrementa la liberación del ácido araquidónico proveniente de la membrana de glicerofosfolípidos. Este aumento de la liberación del ácido araquidónico provoca un incremento descontrolado de su metabolismo a través de las enzimas ciclooxigenasa y lipoxigenasa; durante este metabolismo se da la producción de hidroperóxidos y radicales peróxilos. Lo que trae como consecuencia una excesiva producción de tales especies reactivas (Mary *et al.* 2012).

2) Actividad del citocromo P450:

Cuando la AFB₁ es metabolizada por el sistema citocromo P450, aumenta la fuga de protones lo que ocasionará un aumento de la generación de especies reactivas de oxígeno. Se ha reportado que en hepatocitos expuestos a AFB₁ aumentan los niveles de RNA mensajero de CYP1A (Ayed-Boussema *et al.* 2012), CYP2B6 y CYP3A4 (Ratajewski *et al.* 2011), lo cual sugiere que al aumentar la actividad de cierto grupo de enzimas del citocromo P450, favorece el aumento descontrolado de las especies reactivas de oxígeno (Mary *et al.* 2012).

3) Complejo I de la cadena transportadora de electrones:

La aflatoxina B₁ puede actuar al promover el transporte inverso de electrones, en el cual se generan especies reactivas de oxígeno. Este transporte inverso se produce cuando electrones provenientes del ubiquinol son transferidos nuevamente al complejo I de la mitocondria reduciendo el NAD⁺ a NADH. Generando un aumento anormal de especies reactivas del oxígeno (Mary *et al.* 2012).

2.3. Enfermedades Relacionadas con el Estrés Oxidativo

El daño oxidativo al ácido desoxirribonucleico (ADN) se considera el suceso crucial en la carcinogénesis. La oxidación puede darse a las bases del ADN o al azúcar de cinco carbonos lo que ocasiona mutaciones, cambios en la secuencia de nucleótidos, que alteran la expresión de genes críticos para el mantenimiento celular (Klauning y Wang, 2018). Asimismo, el estrés oxidativo puede ocasionar un malfuncionamiento de los mecanismos de reparación del ADN (Sosa *et al.* 2013). Lo anterior, puede generar una inestabilidad en el genoma, resistencia a la apoptosis y una proliferación celular descontrolada y tejidos anormales en el cuerpo humano, lo que desencadena en la aparición de tumores y eventualmente en distintos tipos de cáncer (Reuter *et al.* 2011).

Por otra parte, en la hipertensión arterial el estrés oxidativo es un factor que contribuye a la patología vascular y daño renal. La patología vascular, contribuye a la hipertensión debido a la disminución de la función endotelial, causado por la oxidación del óxido nítrico (NO), el cual es el encargado de la vasodilatación; cuando el NO es oxidado a peroxinitrito (ONOO^-) ocurre vasoconstricción lo cual induce un aumento en la presión arterial (Harrison *et al.* 2007; Montezano *et al.* 2015). Adicionalmente, la generación de radicales ONOO^- daña las biomoléculas estructurales (*e.g.*, lípidos y proteínas) de las paredes vasculares ocasionado un mal funcionamiento (Baradaran *et al.* 2014). Finalmente, el daño renal, ocasionado por el estrés oxidativo, altera la presión sanguínea natriuresis y provoca vasoconstricción renal (Briones y Touyz, 2010; Small *et al.* 2018).

De manera similar al cáncer o a la hipertensión arterial, el estrés oxidativo ha sido asociado a la aparición y desarrollo de la diabetes. Los mecanismos principales relacionados con el estrés oxidativo están mediados por el daño a sistema de secreción de insulina y al daño realizado a la insulina, lo que modifica su función biológica (Ighodaro, 2018). Las especies reactivas del oxígeno ocasionan un mal funcionamiento de las células beta del páncreas, las cuales son las encargadas de producir la insulina, lo que provoca una hiperglicemia a nivel circulatorio debido a la baja producción de insulina (Rochette *et al.*

2014). Posteriormente, al daño ocasionado a las células beta, las especies reactivas de oxígeno pueden oxidar la insulina, lo que causa una modificación de su función, y dañar los receptores de insulina, ocasionado resistencia a la insulina (Hurrell y Hsu, 2017; Ighodaro, 2018).

Existen otras enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como las cardiovasculares y neurológicas, en el que las especies reactivas de oxígeno dañan células y biomoléculas involucrados en funciones biológicas o cascadas de señalización, necesarias para el correcto funcionamiento de células, tejidos, órganos y sistemas (Ichiishi *et al.* 2016; Gutteridge y Halliwell, 2018).

2.4. Estrategias Contra el Estrés Oxidativo

Existen diversas estrategias que se han planteado para contrarrestar el estrés oxidativo, incluyendo el uso de fitoquímicos y vitaminas (Yoshihara *et al.* 2010).

2.4.1. Uso de Fitoquímicos

Dentro del grupo de los compuestos fitoquímicos se encuentran los compuestos fenólicos o polifenoles, los cuales son metabolitos secundarios de las plantas tales como frutas, vegetales, hierbas, y té, y en menor medida las leguminosas, especias, flores, granos y nueces (Benfeito *et al.* 2013; Kasote *et al.* 2015). Los polifenoles pueden ser divididos en dos grupos: flavonoides (e.g. flavonoles, flavanoles, isoflavonas y antocianinas) o no flavonoides (e.g. ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos y estilbenos) (Benfeito *et al.* 2013). Se ha reportado que otros compuestos derivados de las plantas como los carotenoides, exhiben propiedades antioxidantes (Kasote *et al.* 2015).

2.4.2. Uso de Vitaminas

Las principales vitaminas utilizadas como estrategia contra el estrés oxidativo son la vitamina C y E. La vitamina C es un antioxidante que presenta un mecanismo de donación de electrones. Se ha descrito que específicamente puede donar dos electrones del doble enlace localizado entre el segundo y tercer carbono de la molécula (Padayatty *et al.* 2003). Por otro lado, la vitamina E tiene la capacidad de donar átomos de hidrogeno, debido a su anillo fenólico (Niki, 2014; Traber y Atkinson, 2007). Ambas vitaminas han sido utilizadas ampliamente como tratamiento farmacológico contra diversas enfermedades cardiovasculares (Niki, 2014; Padayatty *et al.* 2003; Pazdro y Burgess, 2010; Traber y Atkinson, 2007).

Aunque algunos de estos antioxidantes poseen buenas propiedades antioxidantes a nivel *in vitro*, en sistemas biológicos poseen baja bioaccesibilidad y biodisponibilidad, mientras que otros son de origen sintético y presentan propiedades pro-oxidantes en altas concentraciones (Carocho y Ferreira, 2013; Liu, 2014; Pokorný, 2007). Ante estas vicisitudes, actualmente la comunidad científica ha propuesto el uso de probióticos como células completas viables como estrategia contra el estrés oxidativo, ya que diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que exhiben propiedades antioxidantes.

2.5. Uso de Bacterias Ácido Lácticas/Probióticas como Estrategia Contra el Estrés Oxidativo

Un nuevo enfoque que se ha estudiado como estrategia para contrarrestar el estrés oxidativo es el uso de bacterias ácido lácticas (BAL)/probióticas como células completas viables y de su contenido intracelular, los cuales han demostrado exhibir propiedades antioxidantes *in vitro* (Amaretti *et al.* 2013; Li *et al.* 2012) e *in vivo* en modelos animales y humanos (Chamari *et al.* 2008; Martarelli *et al.* 2011).

2.5.1. Estudios *In Vitro*

Diversos estudios han analizado la capacidad antioxidante de células completas y contenidos intracelulares de diversas bacterias ácido lácticas/probióticas. Lin y Yen (1999) estudiaron la capacidad antioxidante del contenido intracelular de 19 cepas de bacterias ácido lácticas. Los autores encontraron que todas las cepas exhiben propiedades antioxidantes y que los posibles mecanismos involucrados, están relacionados con las propiedades de quelación de hierro, neutralización de especies reactivas de oxígeno y capacidad reductora. Por otro lado, Lin y Chang (2000) estudiaron las propiedades antioxidantes de *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Los autores reportaron que, en general, el contenido intracelular de las cepas estudiadas mostró un porcentaje de inhibición de oxidación del ácido linoleico (45.3 a 48%) mayor ($P < 0.05$) que las células completas (28.1 a 33.2%). En contraste, la actividad antioxidante evaluado por el método DPPH mostró un comportamiento inverso, las células completas mostraron un porcentaje de neutralización del radical DPPH (43.2 a 52.1%) mayor ($P < 0.05$) que el contenido intracelular (20.8 a 41.6%). Kullisar *et al.* (2002) encontraron resultados similares en el método de inhibición de la oxidación del ácido linoleico evaluando las cepas *Lactobacillus fermentum* E-3 y E-18. Los contenidos intracelulares de éstas cepas mostraron valores de inhibición de la oxidación de 51 a 59%, significativamente mayores a las células completas de 21 a 29%. Por otra parte, Wang *et al.* (2009) demostraron que la capacidad antioxidante de células completas de *Lactobacillus fermentum* ajustado a diferentes concentraciones bacterianas, en un rango de 10^6 - 10^9 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL). Los resultados mostraron que la capacidad antioxidante incrementa de forma concentración-dependiente, es decir, una concentración de 10^6 UFC/mL mostró una capacidad antioxidante de 64.2%, mientras que una concentración de 10^9 UFC/mL mostró una inhibición de 87.9%.

Amaretti *et al.* (2013) evaluaron la capacidad antioxidante de 34 cepas de BAL (7 cepas del género *Bifidobacterium*, 11 cepas del género *Lactobacillus*, 6 cepas del género *Lactococcus* y 10 cepas del género *Streptococcus*) encontrando una amplia dispersión de

las propiedades antioxidantes, lo cual sugirió que la capacidad antioxidante es cepa-dependiente.

Los estudios *in vitro* sugirieron que la capacidad antioxidante, en general, de las cepas de BAL/probióticas son cepa-dependiente. Adicionalmente, la mayoría de los ensayos *in vitro* sugieren que las propiedades antioxidantes, están relacionadas con sus propiedades neutralizantes de especies reactivas de oxígeno y propiedades quelantes de metales de transición, tales como el hierro y cobre.

2.5.2. Estudios In Vivo

Los estudios *in vivo* se han realizado utilizando modelos animales con estrés oxidativo inducido por algún agente químico, biológico o físico (*e.g.*, 1,2-dimetilhidracina, estreptozotocina, aflatoxina B₁, radiación), o con humanos con estrés oxidativo debido a alguna exposición habitual o en personas sanas.

Yadah *et al.* (2008) evaluaron el efecto de Dahi, una leche fermentada con *Lactobacillus acidophilus* NCDC14 y *Lactobacillus casei* NCDC19, en un modelo de ratas con estrés oxidativo inducido por estreptozotocina. Los autores reportaron que la administración de Dahi redujo significativamente el estrés oxidativo en páncreas, mediante la disminución de los niveles de peroxidación lipídica y preservando las enzimas antioxidantes. En un estudio similar, Sinha *et al.* (2009) demostraron que Dahi probiótico mostró un mayor efecto sobre una disminución significativa de peroxidación lipídica en hígado y tejido de colon en ratas con carcinogénesis inducida por 1,2-dimetilhidracina, en comparación con Dahi normal.

Por su parte, Kumar *et al.* (2012) evaluaron el efecto de leche probiótica, fermentadas con las cepas *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus casei* Shirota, en un modelo de ratas con carcinoma inducido por aflatoxina B₁. Los resultados mostraron una reducción

significativa de la peroxidación lipídica y aumentó en la actividad de enzimas antioxidantes en el grupo administrado con la leche probiótica, en comparación con el grupo de administración de la aflatoxina B₁. Por su parte, Ishii *et al.* (2014) reportaron que la administración oral de *Bifidobacterium breve* disminuyó significativamente los niveles de peróxido de hidrogeno y la oxidación de lípidos y proteínas en tejido de piel en ratones con daño inducido por exposición a radiación UV. Los autores sugirieron que la administración de *Bifidobacterium breve* previene la generación de especies reactivas de oxígeno.

A pesar de que estudios *in vitro* han demostrado que el contenido intracelular de diversas bacterias probióticas muestran propiedades antioxidantes, incluso mayor que su contraparte de células completas, no existen estudios *in vivo* que evalúen el potencial efecto antioxidante contra el estrés oxidativo inducido por agentes pro-oxidantes. Además de lo anterior, no se ha documentado la naturaleza de los metabolitos responsables de la capacidad antioxidante, ni se han realizado estudios detallados acerca de su identificación de tales metabolitos.

3. HIPÓTESIS

El contenido intracelular de bacterias ácido lácticas específicas tiene un efecto protector contra el estrés oxidativo inducido por aflatoxina B₁, en un modelo murino

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Estudiar el potencial efecto protector del contenido intracelular de bacterias ácido lácticas específicas, contra el estrés oxidativo inducido por aflatoxina B₁ e identificar los metabolitos relacionados con las propiedades antioxidantes

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar *in vitro* las propiedades antioxidantes de diferentes bacterias ácido lácticas y seleccionar la cepa con mayor capacidad antioxidante
2. Determinar la naturaleza de los componentes intracelulares con capacidad antioxidante de la bacteria seleccionada y sus posibles interacciones
3. Identificar los metabolitos intracelulares de la cepa seleccionada asociados a la capacidad antioxidante mediante espectroscopia de Raman
4. Evaluar *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* el potencial efecto protector del contenido intracelular de la bacteria seleccionada, utilizando modelos con estrés oxidativo inducido.

5.MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Los siguientes reactivos: radical catión ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), lizosima, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), fluoresceína, 2,2'-Azobis (2-amidopropano) dihidroclorado (AAPH), Tween 80, FeCl₂, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), aflatoxina B₁, o-ftalaldehído, NaOH, albumina sérica bovina, glutatión reducido, metaperiodato, vitamina B12, ácido gamma-aminobutírico, ácido gamma-aminobutírico transaminasa, ácido tiobarbitúrico, fluoresceína, ácido linoleico, cloruro de metileno, glucosa, L-glutámico, piruvato de sodio, penicilina, estreptomycin, diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) y medio de cultivo DMEM (dulbecco modified Eagles minimal essential medium), fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE.UU.). El medio de cultivo MRS (De Man, Rogosa, y Sharpe, Difco™) fue obtenido de BectonDickinson (Le Pont de Claix, Francia). Los solventes: etanol, acetato, hexano, y cloruro de metilo fueron grado HPLC o con una pureza $\geq 99\%$ fueron obtenidos de JT Baker (JT Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ, EE.UU.). El óxido nitroso fue obtenido de ISI Austria en forma de cartucho presurizado (modelo S8602) para sifón comercial. El kit DC Protein Assay utilizado para la determinación de proteína fue obtenido de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EE.UU.).

5.2. Bacterias Ácido Lácticas de Estudio

Para el presente estudio, se utilizaron 13 cepas probióticas y 6 cepas aisladas de productos lácteos artesanales (Tabla 1), pertenecientes al cepario del Laboratorio de Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Las

cepas fueron reactivadas en caldo MRS (*Lactobacillus*) o M17 (*Lactococcus*), y subcultivadas dos veces a 37 °C (*Lactobacillus*) o 30 °C (*Lactococcus*) durante 18 y 12 h, respectivamente. Las bacterias del último subcultivo fueron recuperadas por centrifugación (3600 g, 4 °C, 10 min), lavadas dos veces con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, 0.5 mM, pH 7.2) y finalmente, resuspendidas en PBS hasta ajustar a $DO_{600\text{ nm}} = 0.5$ equivalentes a una concentración celular de *ca.* 10^8 UFC/mL.

Tabla 1. Bacterias ácido lácticas utilizadas en el presente trabajo

Cepas probióticas	Código	Cepa aisladas	Código
<i>Lb. reuteri</i> NRRL 14171	Lr-14171	<i>Lb. fermentum</i>	Lf-B3
<i>Lb. casei</i> NRRL B-1922	Lc-B1922	<i>Lb. pentosus</i>	Lf-B11
<i>Lb. fermentum</i> NRRL B-1932	Lf-B1932	<i>Lb. pentosus</i>	Lf-B17
<i>Lb. plantarum</i> NRRL B-4496	Lp-B4496	<i>Lc. lactis</i>	Ll-R1
<i>Lb. casei</i> DPC3968	Lc-3968	<i>Lc. lactis</i>	Ll-R7
<i>Lb. casei</i> L9	Lc-L9	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Ll-Q2
<i>Lb. casei</i> 12A	Lc-12A		
<i>Lb. casei</i> 7R1	Lc-7R1		
<i>Lb. casei</i> CRL 431	Lc-CRL 431		
<i>Lb. casei</i> Shirota	Lc-Shi		
<i>Lb. plantarum</i> 26	Lp-26		
<i>Lb. plantarum</i> 55	Lp-55		
<i>Lb. plantarum</i> 56	Lp-56		

5.3. Preparación de Células Completas, Contenido Intracelular y Fragmentos de Pared de las Bacterias

Para la preparación de las muestras de células completas, contenido intracelular y fragmentos de pared de las cepas, se empleó la metodología descrita por Lin y Yen (1999) y Li *et al.* (2012) con algunas modificaciones. Brevemente, una alícuota (10 mL) de cada cepa suspendida en PBS, fue centrifugada (3600 g, 4 °C, 10 min), el paquete celular fue re-suspendido en una solución de lisozima (1 mg/mL) e incubado a 37 °C durante 150 min. Posteriormente, las células fueron colocadas en un baño de agua fría (10 °C) y lisadas en un procesador ultrasónico (Aquasonic 50D, Ultrasonic Cleaner, San Jose, CA, USA), programado en nivel 9 (60 Hz), empleando 3 ciclos de 30 min con intervalos de 1 min. Posteriormente, los lisados celulares fueron centrifugados (3600 g, 4 °C, 10 min), el contenido intracelular (CI) de cada cepa fue recolectado y los fragmentos de pared celular (PC) fueron resuspendidos en el mismo volumen inicial. Las bacterias suspendidas en PBS sin tratamiento enzimático y sonicación fueron colectadas por centrifugación y utilizadas como células completas (CC). Todas las muestras fueron almacenadas inmediatamente en oscuridad a 4 °C hasta su análisis. La capacidad antioxidante de las muestras, incluyendo CI, PC y CC, fue evaluada utilizando los métodos ABTS, ORAC y LOI como se describe en la siguiente sección.

5.4. Evaluación de la Capacidad Antioxidante

Debido a que los métodos empleados para evaluar la capacidad antioxidante implican diferentes mecanismos de acción, y a que los compuestos antioxidantes en muestras complejas pueden responder de diferente manera a los radicales o agentes oxidantes, diversos autores sugieren que es necesario utilizar al menos dos métodos (Alam *et al.* 2013; Apak *et al.* 2016). Por lo anterior, se utilizaron tres métodos para la determinación de la capacidad antioxidante: ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico

(ABTS), capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y el método de inhibición de la oxidación lipídica (LOI). Estos métodos fueron utilizados debido a sus diferentes mecanismos de acción: transferencia de átomos de hidrogeno (ORAC), transferencia de electrones (ABTS) (Zulueta *et al.* 2009). El método LOI, además de que combina los dos mecanismos anteriores, también considera la quelación del metal prooxidante Fe^{+2} .

Adicionalmente, otras características de elección fueron que el método ORAC utiliza radicales biológicamente relevantes (radicales peroxilo), incorpora una biomolécula de naturaleza proteica (fluoresceína) e integra tanto el grado y tiempo de la reacción antioxidante. El método LOI utiliza una biomolécula de naturaleza lipídica, lo cual simula los lípidos de las membranas celulares. Por su parte, el método ABTS utiliza un radical muy estable, la reacción es rápida y es estable a un rango amplio de pH (Wang *et al.* 2004; Zulueta *et al.* 2009).

5.4.1.Método ABTS

Para determinar la actividad antioxidante de las muestras mediante este ensayo se siguió la metodología descrita por Re *et al.* (1999). Para ello, primero se produjo en oscuridad el radical ABTS mediante la mezcla de una solución de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (2.45 Mm) (1:05, v/v). La mezcla se incubó en oscuridad durante 16 h a una temperatura de 30 °C. Una vez formado el radical, éste fue diluido con PBS (0.05 mM, pH 7.2) hasta obtener una absorbancia (734 nm) de 0.7 ± 0.02 en un espectrofotómetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU). Posteriormente, una alícuota (5 μ L) de cada una de las muestras de CI, PC y CC fueron mezcladas con 200 μ L de la solución diluida del radical ABTS. Después de 7 min, se registró la absorbancia 734 nm.

Los resultados fueron expresados como μM Trolox equivalentes, para lo cual se construyó una curva estándar (APÉNDICE A) de cinco puntos con Trolox como estándar (0-500 μM).

5.4.2. Método ORAC

Para determinar la actividad antioxidante de las muestras mediante este ensayo se siguió la metodología descrita por Paul *et al.* (2012). El ensayo consistió en mezclar 80 μL de cada una de las muestras con 60 μL de una solución de fluoresceína (70 nM) contenida en un pozo de una microplaca de 96 pocillos. Las mezclas anteriores fueron incubadas durante 15 min a 37 °C. Inmediatamente después, se agregaron 60 μL de una solución de AAPH (12 nM) utilizando una micropipeta multicanal. Después, se registró la fluorescencia cada minuto durante 80 min a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 527 nm en un espectrofotómetro SpectraMax M3. La placa fue agitada automáticamente (10 s) previo a cada lectura y se mantuvo a una temperatura constante de 37 °C. Los datos de fluorescencia obtenidos fueron normalizados con respecto a la curva del blanco, multiplicando los datos originales por el siguiente un factor de corrección (fluorescencia del blanco, $t=0$ /fluorescencia muestra= 0) (Dávalos *et al.*, 2004). Posteriormente, los datos normalizados fueron graficados con respecto al tiempo con el fin de obtener las áreas bajo la curva de decaimiento de fluorescencia (APÉNDICE B). El área bajo la curva (S) se calculó de la siguiente manera:

$$S = 0.5 + \sum_{i=1}^{i=80} f_i/f_0 \quad (1)$$

En donde f_0 es la fluorescencia inicial a tiempo cero y f_i medidas de fluorescencia al

tiempo i. Los resultados fueron expresados como μM Trolox equivalentes, para lo cual se construyó una curva estándar (APÉNDICE C) de cinco puntos con Trolox como estándar (0-500 μM).

5.4.3. Método LOI

El método de inhibición de la oxidación lipídica fue realizado de acuerdo a lo reportado por Muñiz-Márquez *et al.* (2014) y Starzynska-Janiszewska *et al.* (2008), con algunas modificaciones. Primero, se preparó una solución lipídica mezclando 0.56 g de ácido linoleico con 1.5 g de Tween 20 en 8 mL de etanol al 96%. Después, 50 μL de cada una de las muestras o agua destilada (testigo) se mezcló con 100 μL de la solución de ácido linoleico y 1.5 mL de solución amortiguadora de acetato (0.02 M, pH 4.0). La mezcla anterior fue homogeneizada y se le adicionaron 750 μL de una solución de 0.4 mM FeCl_2 –0.5 mM EDTA (1:1, v/v) para inducir la oxidación lipídica. La emulsión fue incubada a 37 °C durante 1 h; Al finalizar el periodo de incubación, una alícuota (250 μL) fue mezclada con 1 mL de NaOH (0.1 M en 10% v/v etanol) y 2.5 mL de una solución de etanol (10%); posteriormente, se registró la absorbancia a 232 nm en un espectrofotómetro SpectraMax M3. El porcentaje de inhibición de oxidación del ácido linoleico fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición: } ([A-B]/A)*100 \quad (2)$$

En donde A es la absorbancia del testigo y B la absorbancia de la muestra después de una hora de incubación. Los resultados fueron expresados como μM Trolox equivalentes, para lo cual se construyó una curva estándar (APÉNDICE D) de cinco puntos con Trolox como patrón (0-500 μM).

Los resultados de los ensayos anteriores, evidenciaron que el contenido intracelular de *Lactobacillus casei* CRL 431 (CI-CRL431) fue la muestra que presentó la mayor capacidad antioxidante, por lo que ésta cepa fue seleccionada para llevar a cabo los subsecuentes ensayos.

5.5. Determinación de la Composición Elemental de CI-CRL431 y su Posible Contribución en sus Propiedades Antioxidantes

Con el objetivo de identificar la composición elemental de los metabolitos que contribuyen a la capacidad antioxidante de CI-CRL431, se determinó la presencia y contenido de los siguientes componentes: glutatión, compuestos lipídicos, proteínicos, y polisacáridos, vitamina B₁₂ y ácido gamma-aminobutírico. Adicionalmente, se determinaron sus propiedades antioxidantes empleando un ensayo (OxHLIA) basado en células simples (eritrocitos), debido a su relevancia biológica.

5.5.1. Determinación de Glutatión

El contenido de glutatión fue determinado utilizando el método de o-ftalaldehído reportado por Barrachina *et al.* (2002) y Senft *et al.* (2000), con ligeras modificaciones. Primero, las muestras del CI-CRL431 fueron desproteinizadas mediante la adición de un volumen equivalente a la muestra de una solución de ácido tricloroacético preparada al 10% (Kullisaar *et al.*, 2003). Las mezclas fueron agitadas vigorosamente e incubadas durante 5 min a temperatura ambiente. Después, los sobrenadantes fueron colectados por centrifugación (3600 g, 5 min). Una alícuota (50 µL) de las muestras desproteinizadas fue mezclada con 150 µL de o-ftalaldehído (5 mg/mL, preparado en metanol inmediatamente antes de su uso). La mezcla fue incubada durante 5 min a temperatura ambiente, e inmediatamente después se registró la fluorescencia a 365 nm de excitación y 430 nm de

emisión en un espectrofotómetro SpectraMax M3. Los resultados fueron expresados como $\mu\text{M}/\text{mL}$, para lo cual se construyó una curva estándar (APÉNDICE E) de cinco puntos con glutatión como patrón (0-10 $\mu\text{M}/\text{mL}$).

Con la finalidad de evaluar la contribución de este componente en la capacidad antioxidante del contenido intracelular de *Lactobacillus casei* CRL 431, se crearon células deficientes de glutatión utilizando butionina sulfoximina (Izawa *et al.*, 1995). Para ello, un inóculo (1%) del subcultivo procedente de 18 h de incubación (ver sección 5.2), fue transferido a medio MRS suplementado con butionina sulfoximina 1 mM (concentración final) e incubado por 12 h a 37 °C. Posteriormente, el paquete celular fue colectado por centrifugación y utilizado para obtener el contenido intracelular siguiendo la metodología descrita en la sección 5.3.

5.5.2. Componentes Lipídicos

La concentración de compuestos lipídicos fue determinada por la abundancia relativa de ácidos grasos utilizando cromatografía de gases. La extracción de lípidos fue realizada mediante la extracción de Folch (Folch *et al.*, 1957). Para ello, las muestras fueron mezcladas vigorosamente con 200 μL de NaOH (0.5 N, en metanol) y 200 μL de cloruro de metileno; inmediatamente después fueron desgasificadas a 90 °C en baño maría con agitación cada 2 min durante 10 min, bajo un flujo de nitrógeno. Posteriormente, las muestras fueron metiladas utilizando 1 mL de trifluoruro de boro (14 %, en metanol) e inmediatamente después desgasificadas como se describió previamente. Finalmente, los tubos fueron enfriados a temperatura ambiente, seguido de la adición de 1 mL de agua destilada y 0.5 mL de hexano y mezclados vigorosamente.

Un microlitro de la fase orgánica (hexano) fue inyectada en un cromatógrafo de gases HP 6890 GC (Hewlett Packard, CA, EE.UU.) equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar de sílice fundida Supelco SP 2560 (100 m x 0.25 mm). Se utilizó

helio como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min. El horno fue programado con una temperatura inicial de 140 °C, con un incremento de 2.7 °C por min, hasta alcanzar una temperatura de 240 °C. Los ácidos grasos fueron identificados utilizando una mezcla de estándares de ácidos grasos metilados (0.1 µg/mL) preparados en metanol de la casa comercial Matreya LLC (Pleasant Gap, PA, EE.UU).

Adicionalmente, la extracción de Folch fue utilizada para remover la fracción lípida del CI-CRL431, y así poder determinar su posible contribución en la capacidad antioxidante de CI-CRL431.

5.5.3. Componentes Proteínicos

La concentración de componentes proteínicos fue determinada por el método de Lowry utilizando el kit comercial DC Protein Assay acuerdo al protocolo (APÉNDICE I) del proveedor (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). Para ello, una alícuota (5 µL) de cada una de las muestras fue mezclado con 25 µL del reactivo A y 200 µL del reactivo B. Después de 15 min, se registró la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro SpectraMax M3. Los resultados fueron expresados como mg/mL, para lo cual se construyó una curva estándar (APÉNDICE F) de cinco puntos con albúmina sérica bovina como patrón (0.2-1.5 mg/mL).

Adicionalmente, el CI-CRL431 fue desproteinizado para determinar su posible contribución en la capacidad antioxidante. Para esto, las muestras fueron tratadas con ácido tricloroacético (10%), con un volumen igual al de la muestra. Se dejó reposar durante 1 min y posteriormente fue centrifugada a 3600 g durante 5 min. Finalmente, el sobrenadante desproteinizado fue recuperado para su posterior uso (Kullisaar *et al.*, 2003).

5.5.4. Compuestos Polisacáridos

El contenido de polisacáridos fue determinado utilizando el método fenol-sulfónico (DuBois *et al.*, 1956). Para ello, las muestras fueron primero desproteinizadas utilizando el procedimiento descrito en el apartado anterior. Las muestras desproteinizadas fueron utilizadas para determinar el contenido de polisacáridos utilizando glucosa como estándar (10 a 100 µg/mL) (APÉNDICE G). Para ello, una alícuota (50 µL) de cada una de las muestras fue mezclada con 150 µL de ácido sulfúrico concentrado y 30 µL de 5% de fenol e incubado durante 10 min a 90 °C. Después de 15 min de reposo a temperatura ambiente (20 °C), se registró la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro SpectraMax M3.

En paralelo, muestras de CI-CRL431, fueron tratadas con metaperiodato con la finalidad de oxidar a los polisacáridos (Li *et al.*, 2012a) y determinar así la posible contribución de estos componentes en la capacidad antioxidante del contenido intracelular de *Lactobacillus casei* CRL 431. Para ello, el CI-CRL431 fue incubado con metaperiodato (10 mg/mL) a 37 °C durante 30 min, para su posterior uso en el ensayo.

5.5.5. Contenido de Vitamina B₁₂

La determinación del contenido de vitamina B₁₂ se realizó utilizando un método fluorométrico descrito por Li y Chen (2000). Con la finalidad de eliminar posibles interferencias, las muestras fueron desproteinizadas como se describió anteriormente. La intensidad de la fluorescencia de las muestras fue registrada a 275 nm de excitación y 305 de emisión en un espectrofotómetro SpectraMax M3. Vitamina B₁₂ fue utilizada como estándar (20 a 100 ng/mL) (APÉNDICE H).

El contenido intracelular de *Lactobacillus casei* CRL 431 fue tratado con óxido nitroso para degradar la vitamina B₁₂ (Alston, 1991), y poder así determinar la posible

participación de ésta vitamina en las propiedades antioxidantes de CI-CR431. Para la inactivación, muestras de CI-CRL431 fueron inyectadas con óxido nitroso gaseoso utilizando un sifón comercial, empleando 3 ciclos de inyección de 1 min con intervalos de 1 min de reposo.

5.5.6. Ácido Gamma-Aminobutírico (GABA)

El contenido de GABA fue cuantificado por HPLC utilizando el método descrito por Diana *et al.* (2014) con algunas modificaciones. Las muestras fueron sujetas a derivatización utilizando el kit comercial AccQ•Tag™ Ultra derivatization de acuerdo al protocolo del proveedor (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.). Brevemente, 10 µL de muestra o estándar (0.0078-1 mg GABA/mL), fue mezclado con 70 µL de una solución amortiguadora de borato AccQ•Tag Ultra y 20 µL del reactivo AccQ•Tag. La mezcla anterior fue agitada y dejada en reposo durante 1 min a temperatura ambiente e inmediatamente después fue calentada a 55 °C durante 10 min. Las muestras derivatizadas fueron utilizadas para determinar el contenido de GABA.

El análisis cromatográfico fue realizado en un sistema HPLC Agilent modelo 1260 (Agilent Technologies, Alemania) equipado con una columna C18 (2.1 mm x 100 mm, 1.7 µm, Waters Corporation, Milford, MA), bomba cuaternaria e inyector automático. Se utilizó un volumen de inyección de 20 µL y una fase móvil A (eluyente AccQ•Tag), una fase B (acetonitrilo grado HPLC) y una fase C (agua milli-Q). El gradiente de separación programada fue el siguiente: tiempo = 0 min, A:B:C (100:0:0); tiempo = 0.5 min, A:B:C (100:0:0); tiempo = 18 min, A:B:C (95:5:0); tiempo = 19 min, A:B:C (91:9:0); tiempo = 29.5 min, A:B:C (83:17:0), tiempo = 38 min, A:B:C (0:60:40); tiempo = 41 min, A:B:C (100:0:0). La detección fue realizada a una absorbancia de 254 nm.

Para poder evaluar la posible contribución de este componente a la capacidad antioxidante del contenido intracelular de *Lactobacillus casei* CRL 431. Las muestras fueron tratadas con volumen igual al de la muestra de glutamato-GABA transaminasa (0.01 M) durante 1 min a 37 °C (Dhakal *et al.*, 2012), para su posterior uso en el ensayo.

5.5.7. Método de Inhibición de Hemólisis Oxidativa (OxHLIA)

La capacidad antioxidante de todas las muestras, con y sin tratamiento, fue evaluada mediante el método OxHLIA. Los métodos basados en células (*e.g.* OxHLIA) son ideales para estudiar el daño oxidativo inducido a membranas celulares y entender como los compuestos antioxidantes pueden potencialmente actuar a nivel fisiológico (Takebayashi *et al.*, 2010). Brevemente, se colectaron muestras de sangre (5 mL) de tres diferentes personas aparentemente sanas en tubos con anticoagulante EDTA. Los eritrocitos fueron recuperados por centrifugación (2500 g, 10 min), lavados dos veces con PBS (75 mM, pH 7.0) y resuspendidos en PBS al 1% de su volumen original. Posteriormente, 100 µL de muestra fue mezclada con 100 µL de eritrocitos (1% v/v) y 100 µL de AAPH (concentración final de 50 mM) e incubados durante 3 h a 37 °C. A continuación, las muestras fueron centrifugadas (2500 g, 10 min) y el nivel de hemólisis fue determinado a 540 nm (A) en un espectrofotómetro SpectraMax M3. El porcentaje de hemólisis fue calculado en relación a una muestra con 100% de hemólisis inducida (B) con una solución de agua mili-Q/eritrocitos al 1% (relación 9:1 v/v). El porcentaje fue calculado con la siguiente formula: $A/B \times 100$. En todos los experimentos, un testigo (eritrocitos en PBS) fue utilizado para sustraer la absorbancia del hemólisis natural a todas las muestras experimentales.

5.5. Evaluación de las Posibles Interacciones de los Componentes con Actividad Antioxidante de CI-CRL431

Para poder determinar las posibles interacciones sinérgicas, antagónicas o aditivas entre los diferentes componentes con actividad antioxidante del CI-CR431, se establecieron todas las posibles combinaciones. La capacidad antioxidante experimental de cada combinación fue comparada con el valor teórico de la capacidad antioxidante, el cual es la suma matemática de las capacidades antioxidantes experimentales de cada componente. Cuando la capacidad antioxidante teórica (ACT) fue menor ($P < 0.05$) que la capacidad antioxidante experimental (ACR), la interacción fue considerada como sinérgica; si la ACT fue mayor ($P < 0.05$) que la ACR, fue considerada antagónica; finalmente, si la ACT y ACR no mostraban diferencias ($P > 0.05$) fue considerado una interacción aditiva (Palafox-Carlos *et al.*, 2012).

5.7. Identificación de los Principales Metabolitos de CI-CRL431 Asociados a la Capacidad Antioxidante Mediante Espectroscopia de Raman

5.7.1. Preparación del Contenido Intracelular

Una alícuota (10 mL) de la cepa suspendida en PBS ($DO_{600nm}=0.5$) fue centrifugada (3600 g, 4 °C, 10 min). El paquete celular recuperado fue re-suspendido (PBS) en 10% de su volumen original. Posteriormente, las células fueron colocadas en un baño de agua fría (10 °C) y lisadas en un procesador ultrasónico FS110H (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EE.UU.) ajustado a 42 kHz, aplicando 2 ciclos de 30 min con intervalos de 1 min. A continuación, los lisados celulares fueron centrifugados (3600 g, 4 °C, 10 min) y el sobrenadante (contenido intracelular) fue liofilizado (LABCONCO CE FreeZone, -40 °C, 24 h, 0.13 mBar) y almacenado en refrigeración y oscuridad hasta su uso posterior.

5.7.2. Identificación de los Metabolitos por Análisis del Espectro de Raman

Una muestra (5 ± 0.14 mg) del contenido intracelular liofilizado fue montado en un contenedor de aluminio y colocado en el lector del equipo. El espectro fue obtenido, a una temperatura constante de 20 °C, utilizando un espectrómetro de Raman (MultiRAM, Bruker RFS 100/S FT, Billerica, MA, EE.UU) equipado con un detector de diodo de germanio (Ge, Bruker Optics Inc, Billerica, MA, EE.UU) enfriando con nitrógeno líquido. La muestra fue excitada con un láser a 1064-nm Nd-YAG con una fuente de poder de 300 mW en un rango del desplazamiento de Raman de 3300 a 200 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} . Dos diferentes muestras liofilizadas del CI-CRL431 fueron examinadas de forma independiente y se realizaron 100 escaneos por cada muestra. El procesamiento de los datos fue realizado con el software OPUS 2.2 (Bruker, Karlsruhe, Alemania) para la corrección de línea base y suavizado del espectro. Finalmente, la normalización se realizó utilizando la rutina de área bajo el espectro a 100 unidades, de acuerdo con lo reportado por Read y Whiteley (2015).

Posteriormente, el espectro procesado fue analizado utilizando el programa KnowItAll[®] Informatics System software (Analytical Edition, ID Expert, Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, EE.UU) utilizando el módulo ProcessIt Raman. Para ello, la rutina Peak Picking fue utilizada para detectar los principales picos y su correspondiente posición (cm^{-1}). La asignación del posible metabolito correspondiente a cada pico fue realizada de acuerdo a la literatura utilizando las bases de datos de espectros de Raman (e.g. proteínas, amino ácidos, ácidos grasos) para moléculas biológicas (Chisanga *et al.*, 2017; De Gelder *et al.*, 2007; Jain *et al.*, 2014; Lemma *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2009; Read y Whiteley, 2015; Saggu *et al.*, 2015).

5.7.3. Análisis Actividad-Metabolito Utilizando el Programa PASS

Los metabolitos identificados por espectroscopia de Raman fueron evaluados en el programa Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS, ver. 10.4, Moscú, Rusia) obtenido del Orechovich Institute of Biomedical Chemistry (<http://www.ibmc.msk.ru/>) con el objetivo de evaluar las potenciales actividades biológicas, particularmente, la actividad antioxidante. El programa PASS realiza una predicción simultanea de actividades biológicas basados en la estructura química del compuesto, el cual es reportado en forma de probabilidades de “probable” P_a y “no probable” P_i , los cuales toman valores de entre 0 y 1. La predicción de actividades biológicas es interpretada con los siguientes criterios: si $P_a > 0.7$, indica que la probabilidad de presentar la actividad biológica es alta y valores entre $0.5 < P_a < 0.7$ indican que existe la probabilidad de presentar el efecto experimentalmente. Finalmente, si $P_a < 0.05$ indican que es menos probable que la actividad biológica sea presentada experimentalmente. Se eligieron solo aquellas actividades que presentaron una $P_a > 0.05$.

Para procesar los metabolitos, cada estructura fue descargada de la base de datos en línea PubChem Substance and Compound (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) en formato SDF.

5.8. Evaluación *In Vitro*, *Ex Vivo* e *In Vivo* del Potencial Efecto Protector de CI-CRL431 en Modelos con Estrés Oxidativo Inducido

5.8.1 Evaluación *In Vitro* y *Ex Vivo* del Efecto Protector de la Cepa Seleccionada Sobre Modelos Basados en Células: Caco-2 y Eritrocitos

Con el objetivo de evaluar el potencial efecto protector del contenido intracelular de *Lactobacillus casei* CRL 431, se realizaron diferentes ensayos *in vitro* y *ex vivo*.

Brevemente, se evaluó el efecto protector del CI-CRL431 en un modelo de eritrocitos con estrés oxidativo inducido por AAPH y se tomaron micrografías de los tratamientos en un microscopio Axioskope A1 (Carl Zeiss, Jena, Alemania). Brevemente, 100 μ L de contenido intracelular fue mezclado con 100 μ L de eritrocitos (1% v/v) y 100 μ L de AAPH (concentración final de 50 mM) e incubados durante 3 h a 37 °C. En el ensayo se incluyó un testigo negativo (PBS) y positivo (AAPH). En paralelo, se evaluó el efecto protector mediante la inhibición de la oxidación celular en células Caco-2 (C2BBel, American Type Culture Collection) utilizando una sonda fluorescente. Las células Caco-2 fueron proporcionadas por la Dra A.M. Liceaga del Laboratorio de Química de Proteínas y Péptidos Bioactivos de la Universidad de Purdue. Las células Caco-2 fueron activadas en medio DMEM adicionado con glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio, y suplementado con 10% (v/v) suero fetal bovino, penicilina (100 unidades/mL) y estreptomycinina (100 μ g/mL) e incubadas a 37 °C en una atmosfera de 5 % CO₂.

Una alícuota (100 μ L) de células Caco-2 fueron colocadas en microplacas negras con fondo transparente de 96 pocillos a una densidad de 7.6×10^5 células/cm² durante 36 h a 37 °C en una atmosfera de 5 % CO₂. Después, el medio de cultivo de los pocillos fue desechado y las células lavadas con 100 μ L de PBS (1x). Las células fueron incubadas durante 1 h con 50 μ L de 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA, 120 μ M, preparado en DMEM) y 50 μ L del CI-CRL431. Posteriormente, el medio fue removido y

las células fueron lavadas dos veces con 100 µL de PBS (1x). Finalmente, 100 µL de AAPH (500 µM) fue adicionado a cada pocillo. Después, se registró la fluorescencia cada 5 minutos durante 1 h a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 538 nm en un espectrofotómetro Spectra Max Gemini (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU) a una temperatura constante de 37 °C. En el ensayo se incluyó un testigo negativo (PBS) y positivo (AAPH). Los resultados fueron expresados como unidades de fluorescencia relativa a través del tiempo.

5.8.2 Evaluación *In Vivo* del Efecto Protector de la Cepa Seleccionada Utilizando un Modelo Murino con Estrés Oxidativo Inducido con Aflatoxina B₁

5.8.2.1. Preparación del contenido intracelular. El contenido intracelular de la cepa 431 fue preparado como se indicó anteriormente (sección 1.3.1). El sobrenadante (contenido celular) obtenido, fue recolectado y almacenado inmediatamente en oscuridad a 4 °C, hasta su uso posterior.

5.8.2.2 Animales de estudio. Con el propósito de establecer el modelo *in vivo* con un nivel de confianza deseado y detectar diferencias significativas entre los grupos de estudio, se calculó el número de animales necesarios considerando al método descrito por Arifin y Zahiruddin (2017). De acuerdo a éste método, el número de animales por grupo (n) requeridos para comparar tres grupos de tratamientos está dado por la siguiente ecuación:

$$n = GL/k + 1(3)$$

En donde:

GL: son los grados de libertad del denominador (inter-grupo o residual) del ANOVA de una vía. Asumiendo los posibles valores de los GL, para calcular el número mínimo y máximo de animales, se utilizarón los valores de 10 y 20, respectivamente, que son los valores necesarios para comparar tres grupos experimentales (Arifin y Zahiruddin, 2017).

k: número de grupos

Remplazando los datos en la ecuación para obtener el número mínimo de animales por grupo, se obtuvo:

$$n = (10/3) + 1 = 4.3 \sim 5 \text{ animales por grupo (4)}$$

Adicionalmente, para confirmar que el número de animales calculado anteriormente ($n=5$) fuera el adecuado, se siguió el lineamiento propuesto por Charan y Kantharia *et al.* (2013). Para ello se calculó el valor de “E”, dicho valor deberá estar entre 10 y 20 (mínimo y máximo valor que toman los GL necesarios para comparar tres grupos experimentales) para considerar al tamaño de muestra calculado como adecuado para encontrar resultados significativos. Para ello se utilizó la siguiente ecuación:

$$E = \text{Número total de animales} - \text{Número total de grupos (5)}$$

Remplazando los datos en la ecuación para obtener el mínimo número de animales por grupo, se obtuvo:

$$E = (5 \times 3) - 3 = 12 (6)$$

Por lo tanto, el número de animales por grupo para comparar 3 grupos de tratamientos fue de 5 animales ($n=5$), con un total de animales experimentales de $N=15$.

Por lo anterior, el estudio fue realizado utilizando 15 ratas macho Wistar (6 semanas de edad) con un peso promedio de 250 ± 30 g, obtenidas de la Unidad de Experimentación Animal, Biología Integral para Vertebrados (BIOINVERT, Ciudad de México, México). La cepa Wistar fue seleccionada debido a la nula incidencia de tumores espontáneos que presenta durante las primeras 15 semanas de vida (Son *et al.* 2010). Los animales de experimentación fueron alojados en condiciones controladas de temperatura (21 ± 2 °C), fotoperiodos de luz/oscuridad (ciclos de 12/12 horas) y humedad controlada (52 ± 6 %). La alimentación incluyó una dieta estándar en forma de pellets (Rodent Laboratory Chow 5001, PMI Nutrition International LLC, MO, USA) y agua purificada *ad libitum*. Los animales tuvieron un periodo de adaptación de 7 días, previo al inicio del periodo experimental.

5.8.2.3. Procedimiento de aleatorización. Después del periodo de adaptación, los animales fueron aleatorizados para su asignación a cada grupo tratamiento. Para ello se utilizó el método de la aleatorización simple de acuerdo a lo reportado por Johnson y Besselsen (2002) y Kim y Shin (2014). Brevemente, se generaron números al azar utilizando el programa Excel® (Microsoft Office Professional Plus 2016) con la función “aleatorio” con un rango de valores enteros entre 0 y 100 (=aleatorio.entre(0,100)). Posteriormente se marcó a cada animal con un número de identificación único en la cola utilizando un marcador permanente punto fino (Sharpie®). Después, se generaron identificaciones de papel con cada número, los cuales fueron colocados en una caja y se mezclaron. A continuación, se fueron sacando los números, y cada animal marcado fue asignado aleatoriamente de manera lógica a diferentes grupos. Se realizó un ANOVA para comprobar que los grupos fueran estadísticamente iguales ($P>0.05$). Para ellos se utilizaron las variables de peso y los niveles basales de algunos biomarcadores de interés

(en plasma sanguíneo) como peroxidación lipídica, actividad enzimática catalasa y glutatión peroxidasa. Las muestras de sangre fueron obtenidas por el método de corte en cola (Parasuraman *et al.* 2010). El proceso se repitió hasta que no se encontró diferencia significativa para los tres grupos en todas las variables utilizadas para la aleatorización. Los animales fueron alojados individualmente en cajas marcadas con etiquetas indicando su respectivo número de identificación y grupo al cual pertenecían.

5.8.2.4. Preparación de la solución de trabajo de aflatoxina B₁. La aflatoxina B₁ (AFB₁) fue seleccionada como agente inductor de estrés oxidativo basado en su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno en estudios *in vitro* e *in vivo* (Shen *et al.* 1996; El-Nekeety *et al.* 2011). Una solución de trabajo de la AFB₁ fue preparada en PBS siguiendo el procedimiento descrito por Hernández-Mendoza *et al.* 2009). Para ello, 5 mg de AFB₁ se disolvieron en 25 mL benceno-acetonitrilo (93:7, v/v) para tener una concentración final de 200 µg/mL. Posteriormente, el solvente fue evaporado utilizando un baño maría (80 °C) y finalmente fue resuspendido en PBS. La concentración real (209 µg/mL) de la solución de trabajo de la AFB₁, fue determinada utilizando la ecuación de Lambert-Beer, midiendo la absorbancia de la solución a 354 nm y utilizando el coeficiente de extinción molar (ϵ_{354}) de 19,800 M/cm. La solución fue almacenada en un frasco de vidrio ámbar y almacenado a 4 °C, hasta su uso.

5.8.2.5. Administración de los tratamientos. La administración de los tratamientos durante el periodo experimental (12 días) fue realizado como se describe a continuación: El primer grupo (ratas tratadas con AFB₁) recibió una dosis de 2.5 mg de AFB₁ (0.8 mg/kg de peso corporal del animal) vía cánula orogástrica, la cual fue administrada en sub-dosis iguales (1 mL/rata) durante los 12 días. El segundo grupo (animales tratados con AFB₁ + CI-CRL431) primero recibió AFB₁, a la concentración y sub-dosis previamente descritos, seguido de la administración diaria vía cánula orogástrica de CI-CRL43 (1 mL/rata). El tercer grupo (animales tratados con PBS) fue administrado con una dosis diaria de PBS (0.5 mM, pH 7.2, 1 mL/rata) durante los 12 días del periodo experimental.

El peso de los animales se registró al inicio (después del periodo de adaptación) y al final del periodo experimental; mientras que el consumo de agua y alimento fue registrado en puntos específicos del periodo experimental. Al final del experimento, los animales fueron eutanasiados y el hígado fue recuperado. Este fue lavado con PBS y homogeneizado (10% p/v) durante 5 min utilizando PBS frío (4 °C) en un homogeneizador industrial (Osterizer 450–10, Sunbeam Mexicana, S.A. de CV, México), seguido de una centrifugación a 3000 g por 15 min. Posteriormente, el sobrenadante obtenido fue almacenado a -20 °C hasta su uso. Adicionalmente, 2 mL de sangre fueron obtenidos por punción cardiaca (Parasuraman *et al.* 2010) y puestos dentro de tubos con EDTA enfriados en hielo. Inmediatamente después, el plasma fue obtenido de las muestras de sangre por centrifugación (3000 g, 15, min, 4 °C) y almacenado a -20 °C para los análisis posteriores. El contenido de proteína de las muestras se realizó por el método de Lowry de acuerdo a lo reportado anteriormente en la sección 5.5.3.

Las muestras de sobrenadante obtenido del homogeneizado de hígado y plasma se emplearon para determinar los siguientes parámetros: actividad antioxidante total, peroxidación lipídica, enzimas antioxidantes (catalasa y glutatión peroxidasa). Adicionalmente, también se calculó el índice de estrés oxidativo al inicio y al final del periodo experimental.

5.8.2.6. Determinación de la capacidad antioxidante. La capacidad antioxidante en las muestras de hígado y plasma fue determinada con los métodos ABTS y ORAC, siguiendo la metodología descrita anteriormente en la sección 5.4.

5.8.2.7. Determinación de la peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica en las muestras de hígado y plasma se determinó utilizando el método del ácido tiobarbitúrico (TBA), descrito por Todorova *et al.* (2005) con algunas modificaciones. El ensayo consistió en mezclar 200 µL de la muestra (sobrenadante del homogeneizado de hígado o plasma), con 200 µL de PBS (0.5 mM, pH 7.2) y 200 µL de ácido tricloroacético (25%) en tubos de vidrio. La mezcla anterior se dejó reposar durante 5 min, fue centrifugada (2000 g, 20 min) y el sobrenadante obtenido se mezcló con 150 µL de TBA y se calentó

a 95 °C durante 1 h. Después se dejó enfriar y la intensidad del color rosa formado fue determinado a 532 nm en un espectrofotómetro SpectraMax M3. Los resultados se expresaron como concentración de malondialdehído (MDA) el cual fue calculado utilizando la ecuación de Lambert-Beer y su coeficiente de extinción ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

5.8.2.8. Determinación de la actividad catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).

La actividad de la enzima catalasa fue determinada en muestras de sobrenadante obtenido del homogeneizado de hígado y plasma, de acuerdo a lo reportado por Hwang *et al.* (2012). Dicho método consiste en monitorear la descomposición de peróxido de hidrógeno debido a la actividad de la enzima catalasa presente en la muestra ensayada. Para esto, el ensayo se inició mezclando (1:1, v/v) muestras de sobrenadante obtenido del homogeneizado de hígado o plasma con peróxido de hidrogeno 30 mM. Inmediatamente después y a los 15 min de reacción, se registró la absorbancia a 240 nm en un espectrofotómetro SpectraMax M3. Una unidad de actividad enzimática de CAT fue definida como los mM H_2O_2 descompuestos por min. Los resultados fueron expresados en unidades específicas $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$.

Por otra parte, la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) fue determinada en muestras de sobrenadante obtenido del homogeneizado de hígado y plasma, utilizando el kit Glutathione Peroxidase Cellular Activity (Sigma-Aldrich). El procedimiento fue realizado siguiendo las indicaciones incluidas por el fabricante (APÉNDICE J). La actividad fue determinada siguiendo la oxidación de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), utilizando terc-butilo hidroperóxido como sustrato. Los resultados fueron expresados en unidades específicas como $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$.

5.8.2.9. Cálculo del índice de estrés oxidativo.

El índice de estrés oxidativo es el cociente de los niveles de peroxidación lipídica (malondialdehído, MDA) y la actividad de las enzimas antioxidantes detectado en sobrenadante obtenido del homogeneizado de hígado y plasma. El índice de estrés oxidativo fue calculado de acuerdo a los reportado por Salbego *et al.* (2014), utilizando la siguiente formula:

$$\text{Índice de estrés oxidativo} = \frac{\text{Concentración de MDA}}{\text{Suma de las actividades CAT+GPx}} \quad (7)$$

5.9. Análisis Estadístico

La normalidad de todos los datos fue verificada por la prueba Shapiro-Wilk como requisito al ANOVA de una vía. Para todos los ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* las diferencias significativas entre los tratamientos fueron evaluadas utilizando la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey, utilizando una significancia de $P < 0.05$. Además, se utilizó la prueba T-student al comparar la capacidad antioxidante real y teórica. El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa estadístico NCSS versión 2007 (Kaysville, UH, EE.UU.).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Células Completas, Contenido Intracelular y Fragmentos de Pared de las Bacterias

Los resultados evidenciaron (Tabla 2) que las cepas probióticas evaluadas mostraron capacidad antioxidante variable, independientemente del método utilizado, con rangos de 23.7 a 400.1 μM de Trolox, 2.2 a 35.7 μM de Trolox y 12.2 a 163.8 μM de Trolox, para el contenido intracelular, células completas y fragmentos de pared, respectivamente. Mientras que las cepas aisladas mostraron capacidad en un rango de 3.3 a 32.3 μM de Trolox para contenido intracelular, 26.0 a 153.8 μM de Trolox para células completas y 16.2 a 187.5 μM de Trolox para fragmentos de pared. En general, el contenido intracelular, células completas y fragmentos de pared de las bacterias probióticas mostraron 1.2, 2.4 y 1.2 veces mayor capacidad antioxidante, que las bacterias aisladas de los productos lácteos, respectivamente. Se ha descrito en la literatura que las bacterias probióticas han sido seleccionadas en base a diversas características (*e.g.* producción de metabolitos, compuestos de superficie celular) que las hacen sobresalir ya que cuentan con sistemas metabolitos, enzimáticos y de resistencia más robustos (Otieno, 2011).

Dicha capacidad antioxidante tuvo un comportamiento cepa-dependiente al mostrar diferencias intra- e inter-especie. En general, el contenido intracelular (130.3 μM de Trolox) mostró una capacidad antioxidante significativamente mayor ($P < 0.05$) en comparación con las células completas (13.7 μM de Trolox) y los fragmentos de pared (63.6 μM de Trolox) en ambos tipos de cepas.

Se ha documentado que las propiedades antioxidantes en las células completas podrían estar relacionadas con los compuestos de la superficie celular. En este sentido, Li *et al.* (2012) reportaron que las proteínas y los polisacáridos de la superficie celular de *Lactobacillus plantarum* C88 contribuyen a su capacidad antioxidante. En otro estudio

realizado por Yi *et al.* (2009), se evidenció que el ácido lipoteicoico de la superficie celular de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 86321, exhibió actividad antioxidante *in vivo* en un modelo murino con estrés oxidativo inducido por D-galactosa. En este mismo sentido, las propiedades antioxidantes de los fragmentos de pared podrían estar relacionados con estos compuestos.

Por otra parte, algunos estudios han evidenciado que el contenido intracelular exhibe mayores propiedades antioxidantes que sus contrapartes de células completas y los fragmentos de pared de diversas bacterias ácido lácticas tales como *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (Li y Chang, 2000), *Lactobacillus fermentum* E-3 y E18 (Kullisaar *et al.* 2002), *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus casei* KCTC 3260, 01 y KCTC 3109 (Lee *et al.* 2005), *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3111, *Lactobacillus jonsonii* KCTC 3141, *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3151 y *Lactobacillus brevis* KCTC 3498 (Kim *et al.* 2006).

Se ha sugerido que la actividad antioxidante del contenido intracelular podría estar relacionada con las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), nicotinamida adenina dinucleótido (NADH)-oxidasa y NADH-peroxidasa, las cual son consideradas como una defensa antioxidante contra el estrés en diversos microorganismos (Kullisaar *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005; Lin y Chang, 2000). Adicionalmente, algunos estudios han reportado una correlación positiva entre el contenido de glutatión (GSH) y GPx y la capacidad antioxidante de algunas bacterias ácido lácticas (Chen *et al.*, 2015; Yoon y Byun, 2004).

Tabla 2. Capacidad antioxidante (μM de Trolox) de las cepas utilizadas en el presente estudio utilizando diferentes métodos.

Cepas	ABTS			ORAC			LOI		
	CC	CI	FP	CC	CI	FP	CC	CI	FP
Lp-26	14.6 b	144.1 e	39.1 cd	2.2 a	59.3 b	17.9 a	20.7 c	323.9 e	128.5 c
Lp-55	19.9 c	120.8 d	38.3 cd	5.6 b	52.4 b	17.8 a	18.8 c	286.9 d	123.0 c
Lp-56	22.5 c	139.5 de	17.2 a	7.9 c	75.4 b	44.5 c	12.9 b	113.2 b	130.8 c
Lc-12A	24.9 c	92.2 cd	56.3 d	6.9 c	31.1 ab	59.9 c	17.0 c	361.5 f	158.1 d
Lc-3968	17.6 c	144.9 e	34.8 bc	9.9 c	116.3 cd	19.3 a	9.1 a	310.4 de	127.0 c
Lc-Shi	15.2 b	32.8 a	21.7 ab	8.7 c	71.1 b	31.1 b	23.0 d	196.1 c	126.4 c
Lp-B4496	5.9 a	211.7 f	40.9 cd	6.8 c	134.1 d	56.0 c	19.9 c	47.2 a	148.5 cd
Lc-B1922	35.7 d	50.7 ab	27.5 bc	4.7 b	23.7 a	24.9 ab	10.3 a	224.5 c	126.2 c
Lc-CRL431	6.9 a	158.8 e	17.1 a	5.6 b	224.5 d	21.9 a	21.4 cd	400.1 g	119.5 c
Lc-7R1	14.9 b	120.1 d	23.9 ab	8.6 c	98.3 c	49.3 c	18.8 c	284.2 d	86.6 b
Lc-L9	21.0 c	117.7 d	47.1 d	7.1 c	271.8 e	80.5 d	18.7 c	122.4 b	163.8 d
Lr-14171	5.0 a	73.2 b	24.5 ab	14.4 d	289.6 e	28.0 ab	13.7 b	82.5 b	126.3 c
Lf-B1932	5.7 a	199.0 f	12.2 a	10.5 c	82.9 bc	45.8 c	18.0 c	332.5 e	129.0 c
Lf-B3	-	105.1 cd	16.22 a	3.3 a	34.8 ab	37.1	32.3 cd	46.1 a	29.4 a
Lf-B11	-	105.2 cd	113.9 e	7.6 c	57.3 b	-	23.4 d	26.0 a	30.5 a

Tabla 2. (Continuación) Capacidad antioxidante (μM de Trolox) de las cepas utilizadas en el presente estudio utilizando diferentes métodos

Cepas	ABTS			ORAC			LOI		
	CC	CI	FP	CC	CI	FP	CC	CI	FP
Lf-B17	-	36.2 a	116.0 e	6.6 c	44.9 b	-	12.6 b	47.9 a	36.9 a
Ll-R1	-	153.8 e	91.6 e	2.8 a	28.2 b	-	27.9 d	28.1 a	23.8 a
Ll-R7	6.9 a	128.2 d	187.5 f	-	-	-	17.5 c	28.9 a	25.0 a
Ll-Q2		151.8 e	105.3 e	-	47.0 b	-	16.6 c	39.7 a	32.3 a

El código de cada cepa fue definido en la Tabla 1. CC: Células completas; CI: Contenido intracelular; FP: Fragmentos de pared. Los valores representan la media. Literales diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre fracción/célula completa de las diferentes cepas para un mismo método.

La molécula de GSH está involucrada en el mantenimiento de la integridad de las membranas celulares, en la remoción de compuestos tóxicos y en la protección de células de las especies reactivas del oxígeno; mientras que el GPx se encarga de mantener los niveles intracelulares de GSH (Smirnova y Oktyabrsky, 2005). Sin embargo, los métodos antioxidantes utilizados en el presente estudio solo detectan antioxidantes de tipo no enzimático. Por lo tanto, son necesarios estudios relacionados con la identificación detallada de los metabolitos del contenido intracelular de las bacterias, lo cual es clave para elucidar los metabolitos responsables de sus propiedades antioxidantes y sus mecanismos de acción.

Considerando los resultados obtenidos con los tres diferentes métodos, se encontró que el contenido intracelular de las cepas Lc-CRL 431, Lf-1932 y Lc-3968, fueron los que presentaron mayor capacidad antioxidante, 261.1, 204.8 y 190.5 μM de Trolox, respectivamente. Por lo anterior, *Lactobacillus casei* CRL 431 fue la cepa seleccionada para llevar a cabo los subsecuentes ensayos.

Los resultados demostraron que el contenido intracelular de las bacterias podrían ser una fuente prometedora de antioxidantes; por lo tanto, esta cepa fue seleccionado para determinar la naturaleza de los componentes intracelulares con capacidad antioxidante y sus posibles interacciones, así como identificar los metabolitos intracelulares asociados a la capacidad antioxidante mediante espectroscopia de Raman y, finalmente, evaluar su potencial efecto protector contra el estrés oxidativo inducido.

6.2. Composición Elemental del CI-CRL431 y su Posible Contribución en la Propiedad Antioxidante y sus Posibles Interacciones

Los datos obtenidos mostraron un contenido de 2.2 mg/mL de proteína, 4.13 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de glutatión y 21.2. $\mu\text{g}/\text{mL}$ de polisacáridos. Por otra parte, el contenido de lípidos fue estimado como pesos porcentuales normalizado del total de ácidos grasos identificados:

ácido palmítico (47.2%), ácido esteárico (24.1%), ácido oleico (15.4%), ácido mirístico (7.3%), ácido láurico (3.2%) y ácido linoleico (2.2%). Por otro lado, no se detectó contenido de vitamina B₁₂ o GABA en el CI-CRL431, lo cual sugiere que la cepa Lc-CRL 431 no produce como parte de su metabolismo estos metabolitos y/o las condiciones de crecimiento utilizadas en el presente estudio no fueron las adecuadas para su producción.

En este sentido, Laiño *et al.* (2014) reportaron que no se encontraron niveles detectables de Vitamina B₉ en el contenido intracelular de las cepas y, hasta donde es de nuestro conocimiento, no existen estudios que evalúen la producción de GABA en la cepa Lc-CRL 431, ya que la producción de este metabolito esté principalmente relacionada con la presencia del sustrato (e.g. ácido glutámico) y el paquete enzimático *per se* en la bacteria (e.g. glutamato descarboxilasa) (Diana et al. 2014).

La participación de los principales compuestos del CI-CRL431 se muestra en la Tabla 3. El tratamiento con metaperiodato (fracción polisacárida) no tuvo un efecto sobre la capacidad antioxidante del CI-CRL431. El tratamiento con la extracción de Folch (fracción lipídica) mostró una reducción (25.5%) significativa ($P < 0.05$) de la capacidad antioxidante, seguido del tratamiento con TCA (fracción proteínica) con 22.6%; mientras que el tratamiento con butionina sulfoximina (fracción de glutatión) tuvo el menor valor.

Los resultados sugieren que los principales compuestos con propiedades antioxidantes del contenido intracelular de la cepa Lc-CRL 431 son de origen lipídico, seguido por las proteínas y finalmente glutatión.

Tabla 3. Participación de los principales compuestos sobre la capacidad antioxidante del contenido intracelular de la cepa Lc-CRL 431.

Componente evaluado	Contenido	Disminución de capacidad antioxidante (%)
Lípidos	Ver Tabla 4	25.5
Proteínas	2.2 mg/mL	22.6
Glutación	4.13 μ M/mL	13.1
Polisacáridos	21.2 μ g/mL	2.4
Vitamina B ₁₂	No detectado	-
GABA	No detectado	-

Particularmente, la molécula de glutación es un tripéptido que contiene un grupo sulfhidrilo proveniente de la cisteína que puede servir como un donante de electrones, otorgándole al glutación de propiedades reductoras y, por lo tanto, la habilidad de neutralizar diversas especies reactivas de oxígeno. Un estudio realizado por Yoon y Byun (2004) demostró que existe una correlación significativa entre la capacidad antioxidante del contenido intracelular de 11 cepas del género *Lactobacillus* y su contenido de glutación. Los autores sugirieron que esta molécula es en parte responsable de la capacidad antioxidante encontrada. Lo anterior concuerda con resultados encontrados acerca de la participación de glutación en el CI-CRL431.

Por otra parte, el perfil lipídico del contenido intracelular de la cepa Lc-CRL 431 mostró la presencia principalmente de 6 ácidos grasos (Tabla 4). Estudios *in vitro* e *in vivo* han sugerido que los ácidos grasos saturados e insaturados pueden actuar como antioxidantes indirectos (Henry *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2013; Méndez *et al.*, 2013; Richard *et al.*, 2008).

Se ha reportado que la capacidad antioxidante de los ácidos grasos, depende del tamaño de la cadena y/o de su grado de insaturación; sin embargo, el mecanismo preciso de su capacidad antioxidante no ha sido totalmente elucidado (Giordano y Visioli, 2014; Yi *et al.*, 2013).

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos (expresada como % en peso del total de ácidos grasos) del contenido intracelular de Lc-CRL 431.

Ácido graso	% en peso
Ácido láurico	3.2 ± 0.4
Ácido mirístico	7.3 ± 1.4
Ácido palmítico	47.2 ± 1.0
Ácido esteárico	24.7 ± 0.9
Ácido oleico	15.4 ± 1.6
Ácido linoleico	2.2 ± 0.3

Los valores representan la media ± desviación estándar (n=2)

Entre los ácidos grasos saturados, se ha reportado un incremento en la capacidad antioxidante del ácido graso conforme aumenta el tamaño de su cadena, del ácido caprílico al mirístico (Henry *et al.*, 2002); mientras que en los ácidos grasos poli-insaturados son oxidados de una manera insaturación-dependiente, siendo el ácido docosahexaenoico el más oxidable y el ácido palmítico el menos (Richard *et al.*, 2008). Consecuentemente, nuestros resultados sugieren un efecto sinérgico entre los ácidos grasos y otros componentes, lo cual puede explicar la capacidad antioxidante del contenido intracelular de Lc-CRL 431.

En cuanto a la fracción proteica, existe limitada información acerca de la capacidad antioxidante asociada a esta fracción en el contenido intracelular de bacterias ácido lácticas. En este sentido, Shen *et al.* (2010) aislaron la fracción proteínica <3.5 kDa del contenido intracelular de *Bifidobacterium animalis* 01, la cual mostró propiedades antioxidantes *in vitro*; sin embargo, las proteínas y/o péptidos que contribuyen a dicha capacidad no fueron identificados. Por otro lado, Yamamoto *et al.* (2009) describió una proteína similar a ferritina con propiedades de quelación de hierro como una proteína antioxidante que puede inhibir la producción de radicales hidroxilos a través de la reacción de Fenton.

La identificación del perfil de proteína es indispensable para entender los posibles componentes proteicos que son responsables, en parte, de la capacidad antioxidante del contenido intracelular de Lc-CRL 431. Por lo anterior, el estudio del perfil proteico utilizando análisis proteómicos son necesarios en estudios futuros.

Por otra parte, los resultados experimentales acerca de las diferentes combinaciones entre los principales componentes, entre glutatión (A), lípidos (B) y proteínas (C), se muestran en la Tabla 5. La primera combinación (AB), que incluyó el tratamiento con butionina sulfoximina y la extracción de Folch, respectivamente, mostró un porcentaje de disminución de la capacidad antioxidante (38.6 %) teórica menor ($P < 0.05$) que la capacidad antioxidante experimental (55.5 %). Esto parece indicar una interacción sinergista, en donde los dos componentes tienen una mayor capacidad antioxidante comparado con la simple suma de sus actividades individuales. De manera similar, la combinación AC, que implicó el tratamiento con butionina sulfoximina y TCA, respectivamente, mostró el mismo comportamiento, con un porcentaje de capacidad antioxidante teórica (35.8%) menor ($P < 0.05$) que la experimental (44.9%). Sin embargo, la combinación BC, extracción de Folch y tratamiento con TCA, respectivamente, mostró una interacción antagonista, dado que el porcentaje de reducción de la capacidad antioxidante teórica (48.1%) fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que la capacidad antioxidante experimental (32.4%). Finalmente, la combinación triple ABC, mostró una interacción aditiva, dado que el porcentaje de disminución de la capacidad antioxidante

experimental (60.8%) no fue estadísticamente diferente ($P>0.05$) de la capacidad antioxidante teórica (61.2%). Aunque los mecanismos de interacción no han sido elucidados, se ha sugerido que interacciones entre compuestos lipídicos y proteicos pueden ser atribuido a una interacción molecular como los enlaces de hidrogeno o interacciones electrostáticas (Beck-García *et al.*, 2013).

Tabla 5. Posibles interacciones (sinergista, antagonista o aditiva) entre los principales componentes del contenido intracelular de Lc-CRL 431.

Individual	Capacidad antioxidante (%)		Tipo de interacción
	Experimental	Teórica	
A	13.1		
B	25.5		
C	22.6		
Combinación			
AB	55.5	38.6*	Sinergista
AC	44.9	35.8*	Sinergista
BC	32.4	48.1*	Antagonista
ABC	60.8	61.2	Aditiva

A: Glutación; B: Fracción lipídica; C: Fracción proteínica. * Indica significancia estadística ($P<0.05$) la capacidad antioxidante experimental y la teórica en cada combinación. Ambas capacidades están expresadas como porcentajes de disminución de la capacidad antioxidante

6.3. Identificación de los Principales Metabolitos de CI-CRL431, Asociados a la Capacidad Antioxidante Mediante Espectroscopia de Raman

El espectro de Raman del contenido intracelular de la cepa *Lactobacillus casei* CRL 431 fue obtenido con el objetivo de identificar los posibles metabolitos que estén relacionados con su capacidad antioxidante. La Figura 2 muestra un espectro de Raman representativo, donde se puede observar regiones conservadas que corresponden a macromoléculas en el contenido intracelular del microorganismo; la región 2900-3000 cm^{-1} corresponde a modos vibraciones C-H de los grupos funcionales CH_2 y CH_3 de lípidos y proteínas, y la región cercana a 1450 cm^{-1} corresponde a deformaciones de los grupos CH_2/CH_3 en lípidos y proteínas (Kusić *et al.*, 2015). Otras regiones características a secuencias de aminoácidos presentes en proteínas y péptidos, son las bandas amida I y III encontradas en 1661 cm^{-1} y 1253 cm^{-1} , respectivamente (Kusić *et al.*, 2014). Otras características relacionadas con los ácidos nucleicos resultados de las bases guanina, adenina y uracilo están localizados cerca de las bandas 1101 cm^{-1} y 1253-1337 cm^{-1} (Kusić *et al.*, 2015).

Por otra parte, las regiones específicas se encuentran en las regiones 400-1200 cm^{-1} y 1900-2300 cm^{-1} . La posición (cm^{-1}) y su posible metabolito correspondiente es descrito en la Tabla 6.

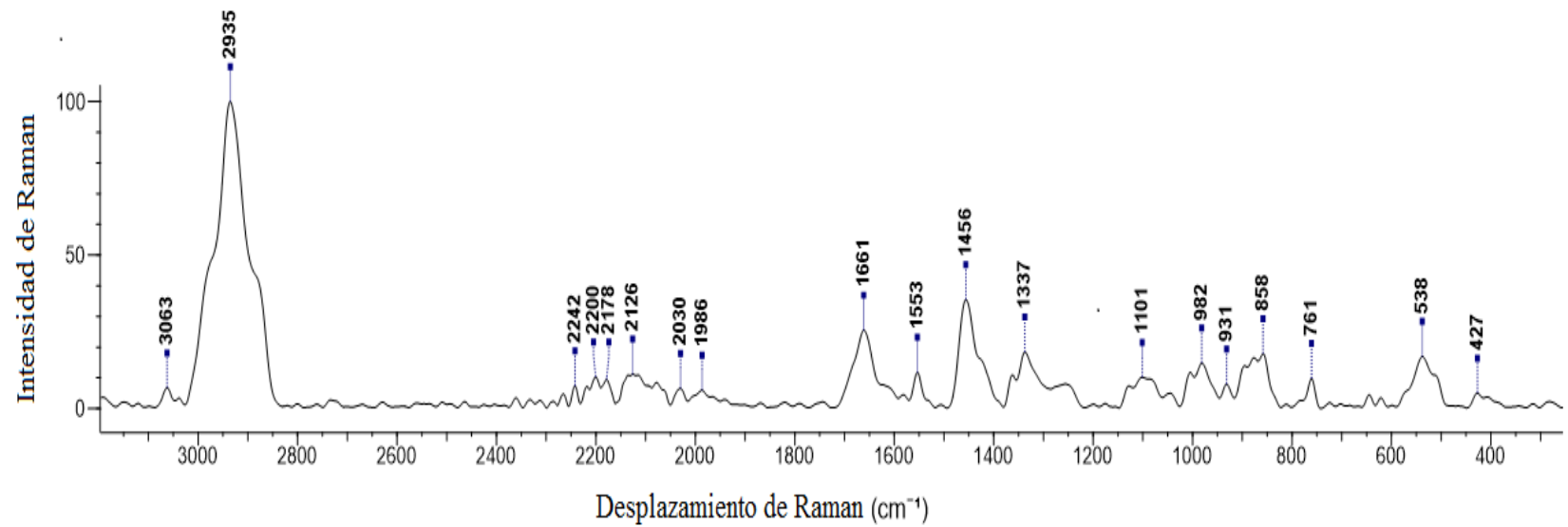


Figura 2. Espectro de Raman representativo del contenido intracelular de la cepa *Lactobacillus casei* CRL 431.

Tabla 6. Posición y su posible metabolito correspondiente detectado en el espectro de Raman del contenido intracelular de la cepa *Lactobacillus casei* CRL 431.

<i>L. casei</i> CRL 431		Posible metabolito	Referencias
Desplazamiento	Intensidad		
(cm ⁻¹)	(u.a)		
427	5	Ácido mirístico	(De Gelder <i>et al.</i> , 2007)
538	17	v(S-S) disulfuro, cisteína	(Lemma <i>et al.</i> , 2016)
761	10	Triptófano	(Lemma <i>et al.</i> , 2016)
858	18	Tirosina	(Liu <i>et al.</i> , 2017)
931	8	C-C, α-hélice proteínas	(Liu <i>et al.</i> , 2017), (Lemma <i>et al.</i> , 2016)
982	15	v(C-C) de proteínas	(Lemma <i>et al.</i> , 2016)
1101	10	v(PO ₂ ⁻) DNA/RNA, ácido palmítico	(De Gelder <i>et al.</i> , 2007)
1337	18	DNA	(Liu <i>et al.</i> , 2017), (Read y Whiteley,
1456	35	δ(CH ₂) lipidos saturados	(Liu <i>et al.</i> , 2017)
1553	12	Amida II	(Lemma <i>et al.</i> , 2016)
1661	25	Amida I; ácido oleico y <i>cis</i> -ácido	(Read y Whiteley, 2015); (De Gelder <i>et</i>
		vaccínico	<i>al.</i> , 2007)
1986	6	N.I.	
2030	7	N.I.	
2126	11	N.I.	
2178	9	N.I.	
2200	10	N.I.	
2242	7	N.I.	

2935	100	$\nu(\text{CH}_3)$. Lípidos	(Jain <i>et al.</i> , 2014)
3063	7	$\nu(\text{CH})$ aminoácidos aromáticos (proteínas)	(Jain <i>et al.</i> , 2014)

N.I. No identificado; u.a: unidades arbitrarias

El espectro de Raman muestra una diversidad de metabolitos con potencial antioxidante que pueden tener la habilidad de neutralizar especies reactivas de oxígeno. Algunos metabolitos pertenecientes al grupo de aminoácidos han sido reportados en la literatura que poseen propiedades antioxidantes tales como cisteína (538 cm^{-1}), triptófano (761 cm^{-1}) y tirosina (982 cm^{-1}) en el contenido intracelular. La capacidad antioxidante de estos aminoácidos está relacionada con su estructura, particularmente los aminoácidos con un anillo aromático como el triptófano y la tirosina pueden donar un protón como mecanismo antioxidante (Elias *et al.* 2008). Por otro lado, el grupo sulfhidrilo (-SH) del aminoácido cisteína tiene la capacidad de interactuar con las especies reactivas de oxígeno y estabilizarlos (Sarmadi e Ismail, 2010). Adicionalmente, el modo disulfuro de la cisteína (538 cm^{-1}) indica la presencia del péptido glutatión. Por otra parte, se confirmó la presencia de los ácidos grasos mirístico, palmítico, oleico y esteárico, determinador por cromatografía de gases (ver sección 6.2).

A pesar de la identificación de los compuestos antes mencionados, es necesario utilizar otras herramientas que permitan una separación de compuestos con mayor precisión y resolución, debido a que en diversas regiones del espectro de Raman se logran observar picos con gran amplitud, lo que indicaría una abundancia de metabolitos, tales como los picos localizados en los siguientes desplazamientos (cm^{-1}) de Raman 931, 982, 1456, 2935 y 3063. Herramientas como cromatografía líquida de alta resolución (UPLC) y espectroscopia de resonancia nuclear magnética (RMN), son necesarios para complementar la identificación realizada por espectroscopia de Raman.

6.4. Análisis Actividad-Metabolito Utilizando el Programa PASS

El análisis con el programa PASS confirmó que algunos metabolitos identificados mediante espectroscopia de Raman poseen propiedades antioxidantes con cuales tienen un valor de $\text{Pa} > 0.6$. Los ácidos grasos mirístico, palmítico y esteárico tienen un valor de

Pa=0.639. Mientras que el ácido graso oleico un valor de Pa=0.714. Por otro parte, el aminoácido cisteína obtuvo un valor de Pa=0.628.

Cabe señalar que el análisis PASS, también evidenció otras potenciales actividades biológicas para la mayoría de los metabolitos procesados, incluyendo: antiinflamatoria, inmunomoduladora, antitrombótica, antimutagénica, anticarcinogénica, neuroprotectora, antibacteriana, radioprotectora, quimioprotectora, citoprotectora, hepatoprotectora y antineoplásica. Dichas predicciones presentaron valores de Pa>0.05, lo cual indica un alto potencial de presentar la bioactividad de forma experimental *in vitro*. Por otra parte, en cuanto a la expresión génica, se encontró una estimulación en general de los genes TP53, HMOX1 y APOA1, los cuales están relacionados con efectos protectores. Por ejemplo, el gen TP53 es una proteína de supresión de tumores que actúa a nivel celular induciendo arresto del ciclo celular, apoptosis, senescencia y reparación del ADN. Por otra parte, HMOX1 está relacionado con efecto citoprotectores. En contraste, la inhibición de los genes CCL2, TERT y NOS2 sugiere un efecto protector, ya que estos genes están relacionados con procesos inflamatorios, artritis reumatoide y aterosclerosis (Sarmadi e Ismail, 2010).

6.4. Efecto Protector *In Vitro*, *Ex Vivo* e *In Vivo* del Contenido Intracelular de *Lactobacillus casei* CRL 431 en Modelos con Estrés Oxidativo Inducido

Los resultados obtenidos con el ensayo OxHLIA (Figura 3A), permitieron corroborar que el CI-CRL431 mostró una capacidad antioxidante ($52.3 \pm 2.1\%$) significativamente mayor ($P<0.05$) que la pared celular ($33.2 \pm 3.1\%$) y las células completas ($21.7 \pm 1.1\%$). Adicionalmente, estos resultados sugieren que los compuestos presentes en el CI-CRL 431 tienen la capacidad de neutralizar los radicales peroxilo producidos por la descomposición térmica de AAPH y a los radicales lipídicos derivados de la peroxidación de los lípidos de las membranas de los eritrocitos. Esto fue confirmado en el efecto protector observado por el CI-CRL431 en eritrocitos con estrés oxidativo inducido por

AAPH y visualizado utilizando un microscopio (Figura 3B). Se observó que el CI-CRL431 reduce la deformación de las membranas de los eritrocitos, lo cual sugiere una disminución en la hemólisis oxidativa.

Por otra parte, se evaluó el efecto protector mediante la inhibición de la oxidación celular en células Caco-2 utilizando una sonda que emite fluorescencia al ser oxidado (Figura 3C). En consecuencia, el nivel de fluorescencia es proporcional al grado de oxidación celular. Los resultados de esta prueba confirmaron que el contenido intracelular disminuye significativamente ($P < 0.05$) los niveles de oxidación celular, a través del tiempo, en comparación con el testigo (AAPH). Los resultados de este ensayo sugieren que los metabolitos intracelulares del CI-CRL431 son capaces de atravesar la membrana celular de las células Caco-2, lo cual denota un alto potencial de absorción a nivel *in vivo*.

En este sentido los metabolitos evaluados en el presente estudio pueden presentar los siguientes mecanismos antioxidantes: 1) Actuar como antioxidantes directos, al neutralizar a los radicales peróxilos y/o inhibir la formación de otros radicales derivados de la peroxidación lipídica, 2) interactuar directamente con el generador de radicales (AAPH) evitando la producción de radicales peróxilo, 3) competir con la sonda fluorescente por los oxidantes (AAPH); 4) inhibir rutas intracelulares de oxidación que podrían interactuar con la sonda fluorescente , Kellett *et al.* (2018) y López-Alarcón *et al.* (2013).

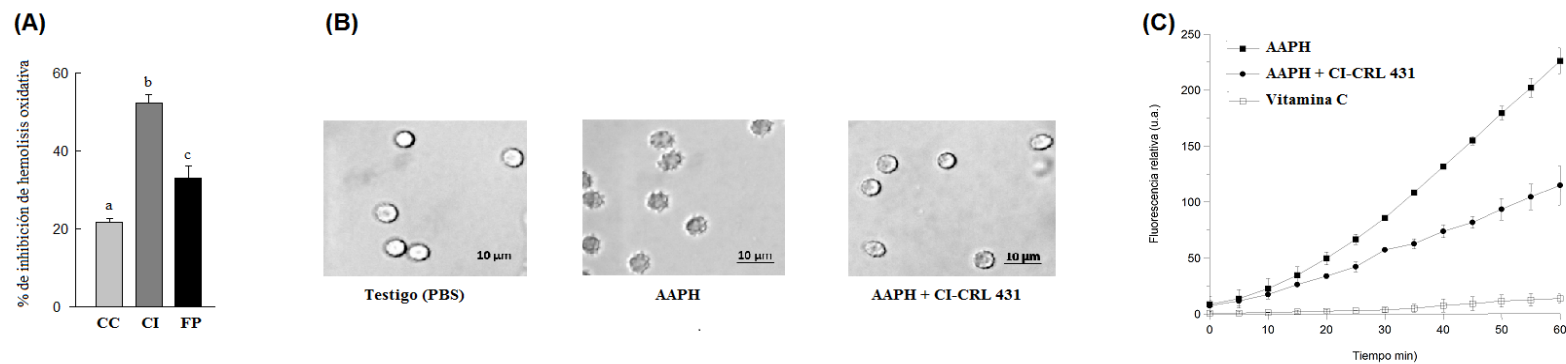


Figura 3. (A) Capacidad antioxidante de células completas (CC), contenido intracelular (CI) y fragmentos de pared (FP) obtenidos de *Lactobacillus casei* CRL-431 por el método OxHLIA. (B) Micrografías representativas del efecto protector del contenido intracelular de *Lactobacillus casei* CRL-431 en eritrocitos con estrés oxidativo inducido por AAPH (todas las imágenes fueron adquiridas con un objetivo de 100x). (C) Inhibición de la oxidación celular del contenido intracelular de *Lactobacillus casei* CRL-431 en células Caco-2 con estrés oxidativo inducido por AAPH.

Estos resultados pueden estar relacionados con las propiedades antioxidantes detectadas por los métodos antioxidantes ABTS, ORAC y LOI, por lo tanto, los mecanismos antioxidantes de transferencia de electrones e hidrógenos, así como de quelación del metal prooxidante Fe están involucrados en la disminución de la oxidación de las proteínas y lípidos de la superficie de los eritrocitos, así como de la oxidación celular observada en el ensayo con células Caco-2 (Takebayashi *et al.*, 2010). Aunque no se han esclarecido claramente el mecanismo de protección, los resultados indican que los metabolitos contenidos en el CI-CRL431 pueden actuar como antioxidantes directamente en el medio de reacción, y/o internalizarse en las células (e.g. eritrocito y células Caco-2) y protegerlas.

Aunque resulta aventurado, los metabolitos del CI-CRL431 podrían también inducir una respuesta antioxidante mediada por la activación de factores de transcripción (e.g. Nrf2) ya que existen estudios previos que han reportado que algunas BAL son capaces de inducir este tipo de respuesta. Por ejemplo, Kobatake *et al.* (2017) reportaron que *Lactobacillus gasseri* SBT2055 incrementa la expresión de factor de transcripción Nrf2, así como su translocación al núcleo, en un modelo de células embrionarios de fibroblasto de ratones con estrés oxidativo inducido por paraquat. Por otra parte, Chauhan *et al.* (2014) reportaron que *Lactobacillus fermentum* Lf1 fue capaz de incrementar la expresión de Nrf2 en células HT-29 con estrés oxidativo inducido por H₂O₂. Aunque en los estudios anteriormente descritos la célula estaba completa y viables, es posible hipotetizar que los metabolitos intracelulares del CI-CRL431 pudieron ser capaces de activar las respuestas antioxidantes tales como el factor de transcripción Nrf2. Sin embargo, se requieren más estudios que permitan confirmar dicha hipótesis.

Los resultados relacionados con la ganancia de peso, consumo de alimento y agua de los grupos experimentales son mostrados en la Tabla 7. Los datos indicaron que los grupos tratados con AFB₁ mostraron una reducción significativa (P<0.05) en el consumo de alimento comparado con el grupo testigo. En contraste, no hubo diferencia significativa (P>0.05) en la ganancia de peso entre los grupos experimentales. Por otro lado, solo el grupo CI-CRL431 + AFB₁ mostró una reducción significativa (P<0.05) en el consumo de

agua. Los resultados sugieren que la administración de AFB₁ en una dosis de 0.8 mg/kg de peso corporal durante 12 días no afecta la ganancia de peso. Sin embargo, se observa una disminución no significativa (P>0.05) de la ganancia de peso en el grupo al cual fue administrado la AFB₁. Lo anterior puede estar relacionado con la disminución significativa (P<0.05) del consumo de alimento y agua debido a la administración de AFB₁, ya que han sido previamente reportado los efectos negativos de la AFB₁ sobre los niveles de leptina en sangre, hormona que está relacionada con la regulación del balance de energía y control del peso corporal (Abdel-Wahhab *et al.*, 2006; Barber *et al.*, 2004). Adicionalmente, se ha reportado que la AFB₁ induce alteraciones en el apetito al afectar neuropéptidos hipotalámicos (*e.g.* péptidos oroxigénicos o anorexigénicos), cambios en el metabolismo de lípidos y proteínas (Khlanguiset *et al.*, 2011) y en el factor de crecimiento insulínico (Castelino *et al.*, 2015), lo que repercute en el comportamiento alimentario y, finalmente, en la ganancia de peso de los animales experimentales.

Tabla 7. Ganancia de peso, consumo de alimento y agua de los grupos experimentales durante el periodo de administración.

Grupo experimental	Ganancia de peso (g)	Consumo de alimento (g)	Consumo de agua (mL)
PBS	49.2 ± 7.5 ^a	179.41 ± 9.5 ^a	369.3 ± 15.4 ^a
AFB ₁	36.3 ± 7.7 ^a	152.9 ± 10.9 ^b	331.7 ± 18.0 ^{ab}
CI-CR431 + AFB ₁	44.3 ± 13.0 ^a	163.6 ± 16.1 ^b	318.8 ± 23.1 ^b

Literales diferentes indican significancia (P<0.05) entre grupos experimentales en una misma columna.

En las muestras de plasma se registró un rango de actividad antioxidante de 179.7 a 334.5 μM Trolox y de 137.7 a 160.3 μM Trolox para los métodos ORAC y ABTS, respectivamente. Por otro lado, solo el grupo CI-CRL431 + AFB₁ mostró mayor (P<0.05)

capacidad antioxidante en plasma, por el método ABTS, comparado con el grupo AFB₁. Adicionalmente, la actividad antioxidante determinada por el método ORAC en el plasma de las ratas del grupo CI-CRL431 + AFB₁ fue significativamente mayor (ca. 0.3 veces) que el grupo AFB₁. Mientras que las muestras de homogeneizado de hígado mostraron valores de 247.6 a 266.6 μM Trolox y de 143.1 a 144.7 μM Trolox para los métodos ORAC y ABTS, respectivamente. En general, las muestras de homogeneizado de hígado no mostraron diferencia significativa (P>0.05) entre los grupos experimentales. En el presente estudio, la capacidad antioxidante detectada en plasma y en hígado refleja la suma de actividades de los distintos antioxidantes de tipo no enzimático contenido de este fluido biológico/órgano, lo cual provee información acerca del balance entre los compuestos pro-oxidantes y el sistema antioxidante (Baser *et al.*, 2015; Ghiselli *et al.*, 2000). La capacidad antioxidante presente en el grupo administrado con PBS revela los niveles basales de antioxidantes en plasma. En contraste, los bajos valores de capacidad antioxidante en el grupo AFB₁ indican un estado de estrés oxidativo, lo cual está relacionado con la producción de especies reactivas de oxígeno durante el metabolismo de la AFB₁ tales como los radicales libres (*e.g.* hidroxilo [OH^{*}] y superóxido [O₂^{*-}] y pro-oxidantes (*e.g.* H₂O₂) (Mary *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 1996, 1994; Towner *et al.*, 2003). Adicionalmente, se generan radicales lipídicos derivados de la acción inmediata de las especies reactivas generadas durante el metabolismo de la AFB₁ en los hepatocitos.

La capacidad antioxidante en el plasma de las ratas del grupo CI-CRL431 + AFB₁ mostró que la condición de estrés oxidativo fue atenuada por el contenido intracelular de la cepa *Lactobacillus casei* CRL 431 (Tabla 8). A pesar de que el mecanismo preciso no está elucidado, se ha hipotetizado que el contenido intracelular posee compuestos antioxidantes que pueden neutralizar las especies reactivas del oxígeno producidas durante el metabolismo de la AFB₁. Se ha reportado que diversas cepas del género *Lactobacillus* posee metabolitos con potencial antioxidantes tales como polisacáridos (Xu *et al.*, 2011), proteínas (Yamamoto, 2009), vitaminas (LeBlanc *et al.*, 2011), plasmalógenos (Wang y Wang, 2010) y glutatión (Kim *et al.*, 2006; Yoon y Byun, 2004). Estos metabolitos pueden actuar a nivel gastrointestinal, permanecer en el lumen y crear un microambiente antioxidante (Saura-Calixto, 2011), pueden unirse a receptores a nivel gastrointestinal

para activar respuestas antioxidantes (Kobatake *et al.*, 2017) o atravesar el epitelio intestinal para alcanzar el torrente sanguíneo y llegar a diversos órganos diana (Annalisa *et al.*, 2014).

Tabla 8. Actividad antioxidante (μM Trolox) determinado por los métodos ABTS y ORAC en homogeneizado de hígado y plasma de los grupos experimentales.

	Grupo experimental		
	PBS	AFB ₁	CI-CRL431 + AFB ₁
Plasma			
ORAC	334.5 \pm 22.0 a	179.7 \pm 11.3 b	238.7 \pm 17.1 c
ABTS	160.3 \pm 10.4 a	137.7 \pm 12.6 b	148.3 \pm 16.05 ab
Homogeneizado de hígado			
ORAC	266.6 \pm 30.5 a	247.6 \pm 25.8 a	250.6 \pm 23.9 a
ABTS	144.7 \pm 17.2 a	145.9 \pm 23.4 a	143.1 \pm 12.82 a

Filas con literales diferentes indican significancia ($P < 0.05$) entre grupos experimentales

Por otra parte, en general, se encontraron valores mayores de MDA en las muestras de plasma (83.8 a 335 nM/mg proteína) que en hígado (14.7 a 55.9 nM/mg proteína). En ambos tipos de muestra, se encontró que el grupo CI-CRL431 + AFB₁ redujo significativamente ($P < 0.05$) los niveles de MDA en comparación del grupo AFB₁. Los altos niveles de MDA detectados en el grupo AFB₁ están relacionados con la lipoperoxidación en diversos órganos, principalmente en el hígado y riñones, ocasionada por la generación de lipoperóxidos derivados de las especies reactivas de oxígeno formadas durante el metabolismo de la AFB₁ (Mary *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 1996; Towner *et al.*, 2003). Los altos valores de MDA encontrados en plasma están relacionados con la lipoperoxidación que ocurre en otros órganos diana de la AFB₁, como el riñón, intestino

y pulmones, en el que los productos de oxidación de la membrana de estos tejidos pasan a torrente sanguíneo (Abdel-Wahhab y Aly, 2003; Choudhary y Verma, 2005; Naaz *et al.*, 2014).

Adicionalmente, a pesar de que no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la actividad de la enzima CAT entre los grupos experimentales en las muestras de homogeneizado de hígado, los resultados mostraron que las actividades de las enzimas CAT y GPx en muestras de plasma fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) en ratas del grupo CI-CRL431 + AFB₁ en comparación del grupo AFB₁ (Tabla 9). En consecuencia, los bajos niveles de MDA encontrados en el grupo de ratas CI-CRL431 + AFB₁, en comparación con el grupo AFB₁, puede estar asociado con el incremento de las actividades de las enzimas CAT y GPx, ya que tales enzimas pueden actuar contra las especies reactivas del oxígeno o interrumpir el proceso de peroxidación lipídica (Naaz *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 1996).

El mecanismo preciso por el cual las enzimas CAT y GPx incrementan no está totalmente elucidado; sin embargo, existe evidencia sobre la activación del factor de transcripción Nrf2, que regula la expresión de numerosos genes de enzimas antioxidantes como CAT y GPx, en modelos animales y líneas celulares por diversas bacterias viables del género *Lactobacillus* (Gao *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2017; Kobatake *et al.*, 2017).

En este sentido, Huang *et al.* (2017) reportaron que la administración de células viables de *Lactobacillus plantarum* C88 logró contrarrestar el estrés oxidativo inducido por AFB₁ en ratones mediante el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes a través de la activación de Nrf2. Gao *et al.* (2013) reportaron que la administración de células viables de *Lactobacillus plantarum* FC225 aumentó los niveles del factor de transcripción Nrf2 en un modelo de ratones hiperlipidémicos.

La administración oral del contenido intracelular de *Lactobacillus casei* CRL 431 redujo significativamente el estrés oxidativo inducido por AFB₁ en un modelo murino mediante la reducción de la peroxidación lipídica y el incremento de la actividad de las enzimas

antioxidantes y capacidad antioxidante en plasma e hígado. Lo anterior sugiere que este contenido intracelular posee metabolitos capaces de modular el sistema antioxidante en organismos vivos.

Tabla 9. Actividad de las enzimas antioxidantes ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) y niveles de peroxidación lipídica ($\text{nM MDA}/\text{mg}$ de proteína) en plasma y homogeneizado de hígado de los grupos experimentales.

	Grupo experimental		
	PBS	AFB ₁	CI-CRL431 + AFB ₁
Plasma			
MDA	83.8 \pm 25.3 a	335.5 \pm 80.6 b	163.6 \pm 51.7 c
CAT	5.51 \pm 0.14 a	3.47 \pm 0.09 b	3.98 \pm 0.71 c
GPx	2.1 \pm 0.03 a	1.46 \pm 0.03 b	1.88 \pm 0.06 c
Homogeneizado de hígado			
MDA	14.7 \pm 5.4 a	55.9 \pm 14.2 b	26.8 \pm 4.1 c
CAT	0.49 \pm 0.05 a	0.50 \pm 0.04 a	0.45 \pm 0.06 a
GPx	1.52 \pm 0.09 a	1.02 \pm 0.07 b	1.27 \pm 0.04 c

Filas con literales diferentes indican significancia ($P < 0.05$) entre grupos experimentales

El índice de estrés oxidativo determinado en muestras de plasma y homogeneizado de hígado del grupo AFB₁ fue *ca.* 5 y 6 veces mayor, respectivamente, comparado con el grupo PBS. Sin embargo, el grupo tratado con CI-CRL431 + AFB₁ mostró menores valores ($P < 0.05$) del índice de estrés oxidativo en plasma y homogeneizado de hígado (17.9 y 27.8, respectivamente) comparado con el grupo AFB₁ (36.5 y 68, respectivamente).

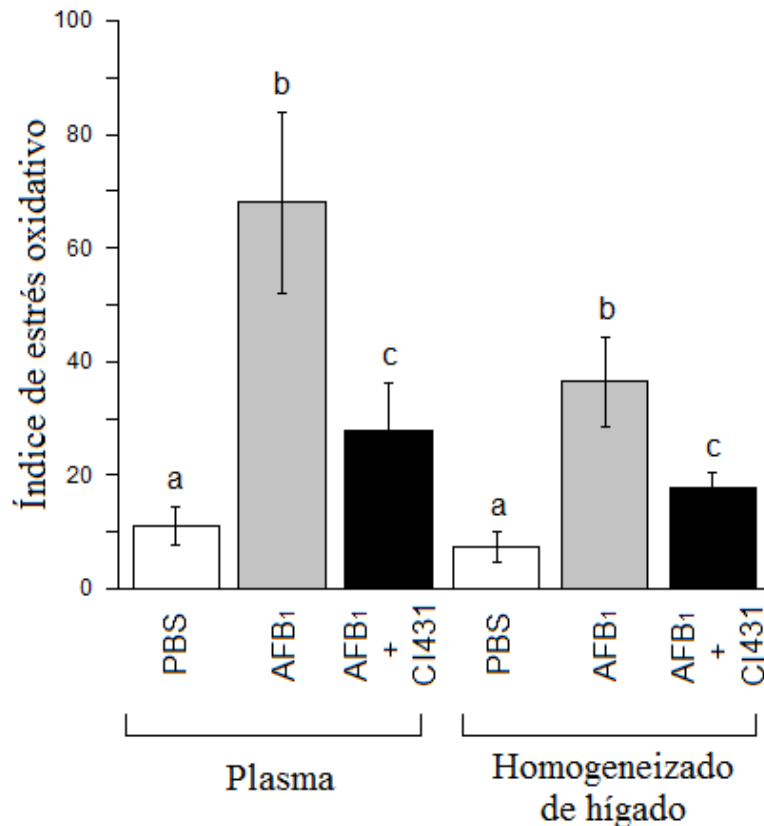


Fig. 4. Índice de estrés oxidativo basado en el balance entre la peroxidación lipídica y las actividades de las enzimas antioxidantes, determinado en plasma e homogeneizado de hígado del testigo (PBS) y los tratamientos. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre tratamientos en cada tipo de muestra.

Con base en lo anterior, los resultados del presente estudio sugieren que el contenido intracelular de *Lactobacillus casei* CRL 431 podría contener metabolitos que activen directa o indirectamente el factor de transcripción Nrf2, que puedan participar en la fuga de protones mitocondrial y/o modular el sistema citocromo P450; sin embargo, hacen falta estudios que avalen estas hipótesis. De acuerdo a la etapa de identificación de metabolitos responsables de la capacidad antioxidante CI-CRL431, los metabolitos involucrados en estos efectos protectores podrían ser la cisteína, triptófano, tirosina, ácido mirístico, ácido esteárico, ácido palmítico y ácido oleico y glutatión. Sin embargo, son necesarios estudios más detallados con el objetivo de elucidar los metabolitos y los mecanismos precisos.

7. CONCLUSIONES

Los resultados de la presente tesis demostraron, en general, que el contenido intracelular de las cepas probióticas tienen las mayores propiedades antioxidantes en comparación con las células completas y fragmentos de pared. La etapa de selección, mostró que el contenido intracelular cepa *Lactobacillus casei* CRL 431, fue la que mostró las mejores propiedades antioxidantes y se infirió que la naturaleza de los compuestos antioxidantes es principalmente de origen lipídico y proteico; además, se observó en menor medida la participación de glutatión. Por otra parte, el análisis del espectro de Raman mostró una variedad de compuestos con potencial antioxidante, confirmando la naturaleza de los compuestos antioxidantes. Finalmente, los resultados de los ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, sugieren que el contenido intracelular posee metabolitos capaces de atravesar las membranas de células epiteliales e inhibir la oxidación a nivel celular, reducir el daño oxidativo de las membranas de eritrocitos, y modular el sistema antioxidante en organismos vivos. Por lo tanto, concluimos que el contenido intracelular de la cepa *Lactobacillus casei* CRL 431 podría ser una fuente prometedora de antioxidantes dietarios, con un alto potencial para ser utilizado en la preparación de alimentos fermentados y/o suplementos que mejoren la capacidad antioxidante total del consumidor, y coadyuven a prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo inducido por agentes pro-oxidantes, particularmente por aflatoxina B₁.

8. REFERENCIAS

- Abdel-Wahhab, M., Ahmed, H.H., Hazagi, M.M., 2006. Prevention of aflatoxin B₁-initiated hepatotoxicity in rat by marine algae extract. *J. Appl. Toxicol.* 26, 229–238.
- Abdel-Wahhab, M.A., Aly, S.E., 2003. Antioxidants and radical scavenging properties of vegetable extracts in rats fed aflatoxin-contaminated diet. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2409–2414.
- Alam, M.D., Bristi, N.J., Rafiquzzaman, M. 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm. J.* 21, 143-152.
- Alston, T.A. 1991. Inhibition of vitamin B₁₂-dependent microbial growth by nitrous oxide. *Life Sci.* 48, 1591–1595.
- Amaretti, A., di Nunzio, M., Pompei, A., Raimondi, S., Rossi, M., Bordoni, A. 2013. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *in vitro* and *in vivo* activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 809-817.
- Annalisa, N., Alessio, T., Claudette, T.D., Erald, V., Antonino, D.L., Nicola, D.D. 2014. Gut microbioma population: An indicator really sensible to any change in age, diet, metabolic syndrome, and life-style. *Mediators Inflamm.* doi:10.1155/2014/901308
- Apak, R., Özyürek, Güclü, K., Capanoglu. 2016. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *J. Agric. Food Chem.* 64, 997-1027.
- Arifin, W.N., Zahiruddin, W.M. 2017. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. *Malays. J. Med. Sci.* 24(5), 101-105.
- Baradaran, A., Nasri, H., Raflejan-Kopaei, M. 2014. Oxidative stress and hypertension: possibility of hypertension therapy with antioxidants. *J. Res. Med. Sci.* 19, 358-367.
- Barber, M.D., McMillan, D.C., Wallace, A.M., Roos, J.A., Preston, T. 2004. The response of leptin, interleukin-6 y fat oxidation to feeding in weight-losing patients with pancreatic cancer. *Br. J. Cancer.* 90, 1129–1132.
- Barrachina, M., Secades, J., Lozano, R., Gómez-Santos, C., Ambrosio, S., Ferrer, I. 2002. Citicoline increases glutathione redox ratio and reduces caspase-3 activation and cell death in staurosporine-treated SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res.* 957, 84–90.
- Baser, U., Gamsiz-Isik, H., Cifcibasi, E., Yalcin, F. 2015. Plasma and salivary total antioxidant capacity in healthy controls compared with aggressive and chronic periodontitis patients. *Saudi Med. J.* 36, 856–861.
- Beck-García, E., Beck-García, K., Schlosser, A., Schamel, W.W., 2013. Analysis of interactions between proteins and fatty acids or cholesterol using a fatty acid/cholesterol pull-down assay. *Anal. Biochem.* 436, 75–77.

- Benfeito, S., Oliveira, C., Soares, P., Fernandez, C., Silva, T., Texeira, J., Borges, F. 2013. Antioxidant therapy: still in search of the “magic bullet”. *Mitochondrion*. 13, 427-435.
- Briones, A.M., Touyz, R.M. 2010. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr Hypertens. Rep.* 12, 135-142.
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51, 15-25.
- Castelino, J.M., Routledge, M.N., Wilson, S., Dunne, D.W., Mwatha, J.K., Gachuhi, K., Wild, C.P., Gong, Y.Y. 2015. Aflatoxin exposure is inversely associated with IGF1 y IGFBP3 levels in vitro y in Kenyan school children. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 574–581.
- Chamari, M., Djazayeri, A., Jalali, M., Yaganeh, H.S., Hosseini, S., Heshmar, R., Haeri, B.B. 2008. The effect of daily consumption of probiotic and conventional yoghurt on some oxidative stress factors in plasma of young healthy women. *ARYA Atheroscler. J.* 4, 175-179
- Charan, J., Kantharia, N.D. 2013. How to calculate sample size in animal studies?. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 4(4), 303-306.
- Chen, Q., Kong, B., Sun, Q., Dong, F., Liu, Q. 2015. Antioxidant potential of a unique LAB culture isolated from Harbin dry sausage: *In vitro* and in a sausage mode. *Meat Sci.* 110, 185–188.
- Chisanga, M., Muhamadali, H., Kimber, R., Goodacre, R. 2017. Quantitative detection of isotopically enriched *E. coli* cells by SERS. *Faraday Discuss.* 205, 331–343.
- Choudhary, A., Verma, R.J. 2005. Ameliorative effects of black tea extract on aflatoxin-induced lipid peroxidation in the liver of mice. *Food Chem. Toxicol.* 43, 99–104.
- Davies, A.M., Holt, A.G. 2018. Why antioxidant therapies have failed in clinical trials. *J Theor. Biol.* 457:1-5.
- De Gelder, J., De Gussem, K., Vyenabeele, P., Moens, L. 2007. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *J. Raman Spectrosc.* 38, 1133–1147.
- Dhakal, R., Bajpai, V.K., Baek, K.-H. 2012. Production of gaba (γ – Aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Brazilian J. Microbiol.* 43, 1230–1241.
- Diana, M., Rafecas, M., Arco, C., Quílez, J. 2014. Free amino acid profile of Spanish artisanal cheeses: Importance of gamma-aminobutyric acid (GABA) y ornithine content. *J. Food Compos. Anal.* 35, 94–100.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars y related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- El-Nekeety, A.A., Mohamend, S.R., Hathout, A.S., Hassan, N.S., Aly, S.E., Abdel-Wahhab, M.A. 2011. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin- induce oxidative stress in male rats. *Toxicol.* 57, 984–991.

- Firuzi, O., Miri, R., Tavakkoli, M., Saso, L. 2011. Antioxidant therapy: current status and future prospects. *Curr. Med. Chem.* 18, 3871-3888.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, S. 1957. A simple method for the isolation y purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Gao, D., Gao, Z., Zhu, G. 2013. Antioxidant effect of *Lactobacillus plantarum* via activation of transcription factor Nrf2. *Food Funct.* 4, 982–989.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C. 2000. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 1106–1114.
- Giordano, E., Visioli, F. 2014. Long-chain omega 3 fatty acids: Molecular bases of potential antioxidant actions. *Prostaglyins, Leukot. Essent. Fat. Acids* 90, 1–4.
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B. 2018. Oxidative stress, redox stress or redox succes?. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 502, 183-186.
- Harrison, D.G., Gongora, M.C., Guzik, T.J., Widder, J. 2007. Oxidative stress and hypertension. *J. Am. Soc. Hypertens.* 1, 30-44.
- Henry, G.E., Momin, R.A., Nair, M.G., Dewitt, D.L., 2002. Antioxidant y Cyclooxygenase Activities of Fatty Acids Found in Food. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2231–2234.
- Hernández-Mendoza, A., Guzman-de-Peña, D., Garcia, H.S. 2009. Key role of teichoic acids on aflatoxin B₁ binding by probiotic bacteria. *J Appl Microbiol.* 107: 395-403.
- Huang, L., Duan, C., Xhao, Y., Gao, L., Niu, C., Xu, J., Li, S. 2017. Reduction of aflatoxin B₁ toxicity by *Lactobacillus plantarum* C88: a potential probiotic strain isolated from Chinese traditional fermented food. *PLoS One* 12, e0170109.
- Hurrle, S., Hsu, W.H. 2017. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomed J.* 40, 257-262.
- Hwang, J.W., Kim, E.K., Lee, S.J., Kim, Y.S., Choi, D.K., Park, T.K., Moon, S.H., Jeon, B.T., Park, P.J. 2012. Anthocyanin effectively scavengers free radicals and protects retinal cells from H₂O₂-triggered G2/M arrest. *Eur. Food Res. Technol.* 234, 431-439.
- Ichiishi, E., Li, X.K., Iorio, E.L. 2016. Oxidative stress and diseases: clinical trials and approaches. *Oxid. Med. Cell Longev.* 3458276.
- Ighadoro, O.M. 2018. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed. Pharmacother.* 108, 656-662.
- Ishii, Y., Sugimoto, S., Izawa, N., Sone, T., Chiba, K., Miyazaki, K. 2014. Oral administration of *Bifidobacterium breve* attenuates UV-induced barrier perturbation and oxidative stress in hairless mice skin. *Arch. Dermatol. Res.* 306, 467-473.
- Izawa, S., Inoue, Y., Kimura, A. 1995. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces*

cerevisiae. FEBS Lett. 368, 73–76. doi:10.1016/0014-5793(95)00603-7

- Jain, R., Calderon, D., Kierski, P.R., Schurr, M.J., Czuprynski, C.J., Murphy, C.J., McAnulty, J.F., Abbott, N.L. 2014. Raman spectroscopy enables non-invasive biochemical characterization and identification of the stage of healing of a wound. *Anal. Chem.* 86, 3764–3772.
- Khlangwiset, P., Shephard, G.S., Wu, F. 2011. Aflatoxins and growth impairment: A review. *Crit. Rev. Toxicol.* 41, 740–755.
- Kim, H.S., Chae, H.S., Jeong, S.G., Ham, J.S., Im, S.K., Ahn, C., Lee, J. 2006. *In vitro* antioxidative properties of lactobacilli. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 19, 262–265.
- Kim, J., Shin, W. 2014. How to do random allocation (randomization). *Clin. Orthop. Surg.* 6(1), 103-109.
- Klauning, J.E., Wang, Z. 2018. Oxidative stress in carcinogenesis. *Curr. Opin. Toxicol.* 7, 116-121.
- Kobatake, E., Nakagawa, H., Seki, T., Miyazaki, T. 2017. Protective effects and functional mechanisms of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 against oxidative stress. *PLoS One* 12, e0177106.
- Kullisaar, T., Songisepp, E., Milkesarr, M., Zilmer, K., Vihalemm, T., Zilmer, M. 2003. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *Br. J. Nutr.* 90, 449–456.
- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairene, C., Kilk, A. 2002. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 72, 215–224.
- Kumar, M., Verma, V., Nagpal, R., Kumar, A., Behare, P.V., Singh, B., Aggarwal, P.K. 2012. Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on aflatoxin B-induced liver carcinogenesis in rats. *Br. J. Nutr.* 107, 1006-1016.
- Kusić, D., Kampe, B., Ramoji, A., Neugebauer, U., Rösch, P., Popp, J. 2015. Raman spectroscopic differentiation of planktonic bacteria and biofilms. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 6803–6813.
- Kusić, D., Kampe, B., Rösch, P., Popp, J. 2014. Identification of water pathogens by Raman microspectroscopy. *Water Res.* 48, 179–189.
- LeBlanc, J.G., Laiño, J.E., del Valle, M.J., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M.P., de Valdez, G.F., de Giori, G.S., Sesma, F. 2011. B-group vitamin production by lactic acid bacteria--current knowledge y potential applications. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1297–309.
- Lee, J., Hwang, K.Y., Chung, M.Y., Cho, D.H., Park, C.S. 2005. Resistance of *Lactobacillus casei* KCTC 3260 to reactive oxygen species (ROS): role for a metal ion chelating effect. *J. Food Sci.* 70, 388–391.
- Lee, L.K., Shahar, S., Rajab, N., Yusoff, N.A.M., Jamal, R.A., Then, S.M. 2013. The role of long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids in reducing lipid peroxidation among elderly patients with mild cognitive impairment: a case-control study. *J.*

- Nutr. Biochem. 24, 803–808.
- Lemma, T., Saliniemi, A., Hynninen, V., Hytönen, V.P., Toppari, J.J. 2016. SERS detection of cell surface and intracellular components of microorganisms using nano-aggregated Ag substrate. *Vib. Spectrosc.* 83, 36–45.
- Li, H.B., Chen, F. 2000. Determination of vitamin B₁₂ in pharmaceutical preparations by a highly sensitive fluorimetric method. *Fresenius J. Anal. Chem.* 368, 836–838.
- Li, S., Zhao, Y., Zhang, L., Zhang, X., Huang, L., Li, D., Niu, C., Yang, Z., Wang, Q. 2012. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chem.* 135, 1914–1919.
- Lin, M.Y., Chang, F. 2000. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Dig. Dis. Sci.* 45, 1617–1622.
- Lin, M.Y., Yen, C.L. 1999. Antioxidantive ability of lactic acid bacteria. *J. Agric Food Chem.* 47, 1460-1466.
- Liu, C.F., Tseng, K.C., Chiang, S.S., Lee, B.H., Hsu, W.H., Pan, T.M. 2011. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *J. Sci. Food Agric.* 91, 2284–2291.
- Liu, Z.Q. 2014. Antioxidants may not always be beneficial to health. *Nutrition.* 30, 131-133.
- Liu, T.-T., Lin, Y.-H., Hung, C.-S., Liu, T.-J., Chen, Y., Huang, Y.-C., Tsai, T.-H., Wang, H.-H., Wang, D.-W., Wang, J.-K. 2009. A high speed detection platform based on surface-enhanced Raman scattering for monitoring antibiotic-induced chemical changes in bacteria cell wall. *PLoS One* 4, e5470.
- Liu, Y., Zhou, H., Hu, Z., Yu, G., Yang, D., Zhao, J. 2017. Label and label-free based surface-enhanced Raman scattering for pathogen bacteria detection: A review. *Biosens. Bioelectron.* 94, 131–140.
- Mary, V.S., Theumer, M.G., Arias, S.L., Rubinstein, H.R. 2012. Reactive oxygen species sources and biomolecular oxidative damage induced by aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in rat spleen mononuclear cells. *Toxicol.* 302, 299–307.
- Martarelli, D., Verdenelli, M.C., Scuri, S., Cocchioni, M., Silvi, S., Cecchini, C., Pompei, P. 2011. Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training. *Curr. Microbiol.* 62, 1689-1696.
- Méndez, L., Pazos, M., Gallardo, J.M., Torres, J.L., Pérez-Jiménez, J., Nogués, R., Romeu, M., Medina, I. 2013. Reduced protein oxidation in Wistar rats supplemented with marine ω 3 PUFAs. *Free Radic. Biol. Med.* 55, 8–20.
- Montezano, A.C., Dulak-Lis, M., Tsiropoulou, S., Harvey, A., Briones, A.M., Touyz, R.M. 2015. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can. J. Cardiol.* 31, 631-641.
- Muñiz-Márquez, D.B., Rodríguez, R., Balagurusamy, N., Carrillo, M.L., Belmares, R., Contreras, J.C., Nevárez, G.V., Aguilar, C.N. 2014. Phenolic content and

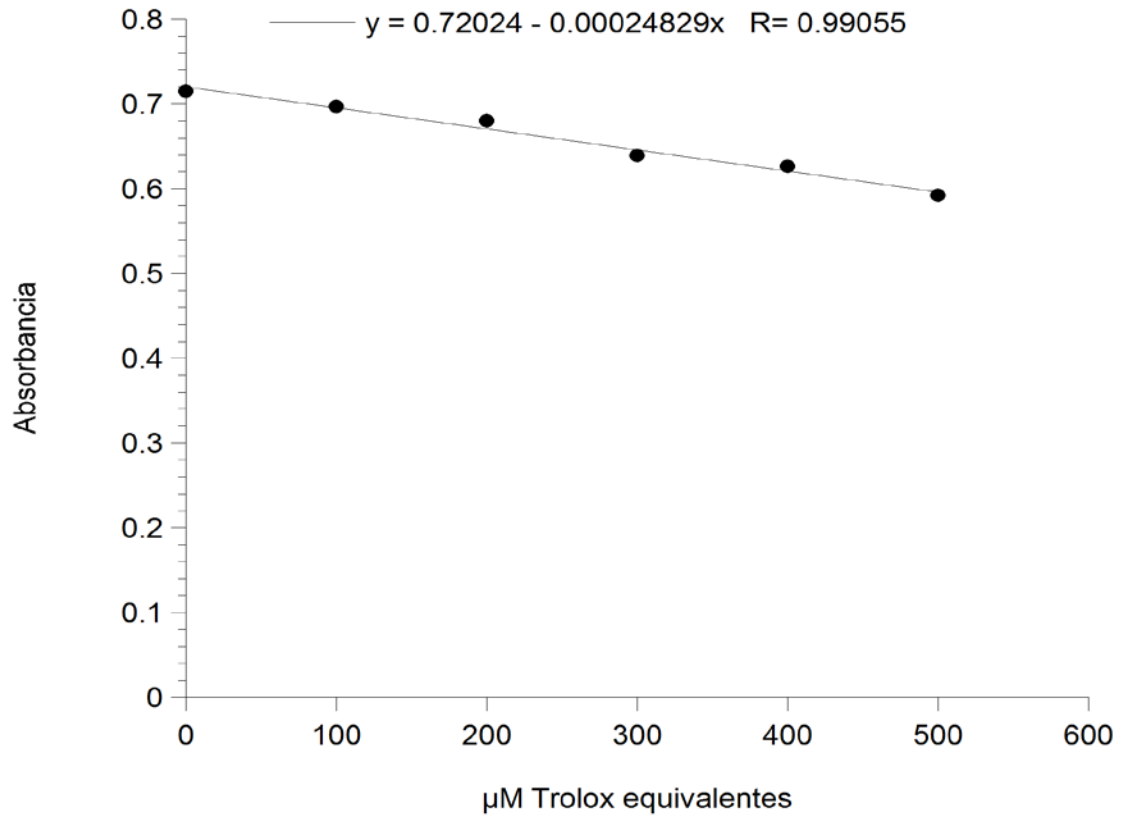
- antioxidant capacity of extracts of *Laurus nobilis* L., *Coriaryum sativum* L. and *Amaranthus hybridus* L. *CyTA - J. Food* 12, 271–276.
- Naaz, F., Abdin, M.Z., Javed, S. 2014. Protective effect of esculin against prooxidant aflatoxin B₁-induced nephrotoxicity in mice. *Micotoxin Res.* 31, 25–32.
- Niki, E. 2014. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: *in vitro* and *in vivo* evidence. *Free Rad Biol Med.* 66, 3-12
- Niki, E. 2016. Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress?. *Arch. Biochem. Biophys.* 595, 19-24.
- Otieno, D.O. 2011. Biology of prokaryotic probiotics. *In Probiotics: Biology, genetics and health aspects.* Liang, M.T. (Ed.) Springer, New York. 321 pp.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., Levine, M. 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr.* 22, 18-35.
- Palafox-Carlos, H., Gil-Chávez, J., Sotelo-Mundo, R.R., Namiesnik, J., Gorinstein, S., González-Aguilar, A.G. 2012. Antioxidant interactions between major phenolic compounds found in ‘ataulfo’ mango pulp: chlorogenic, gallic, protocatechuic y vanillic acids. *Mol.* doi:10.3390/molecules171112657
- Parasuraman, S., Raveendran, R., Kesavan, R. 2010. Blood sample collection in small laboratory animals. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 1, 87-93.
- Pisoschi, A.M., Pop, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 55-74.
- Pokorný, J. 2007. Are natural antioxidants better-and safer-than synthetic antioxidants?. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 629-642.
- Pazdro, R., Burgess, J.R. The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. *Mechanisms of Ageing and Development.* 131, 276-286.
- Read, D.S., Whiteley, A.S. 2015. Chemical fixation methods for Raman spectroscopy-based analysis of bacteria. *J. Microbiol. Methods* 109, 79–83.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B. 2011. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?. *Free Radic. Biol. Med.* 49(11), 1603-1616.
- Richard, D., Kefi, K., Barbe, U., Bausero, P., Visioli, F. 2008. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacol. Res.* 57, 451–455.
- Rochette, L., Zeller, M., Cottin, Y., Vergely, C. 2014. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1840, 2709-2729.
- Rodrigo, R., Miranda, A., Vergara, L. 2011. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clin. Chim. Acta.* 412, 410-424.
- Saggu, M., Liu, J., Patel, A., 2015. Identification of subvisible particles in biopharmaceutical formulations using raman spectroscopy provides insight into polysorbate 20 degradation pathway. *Pharm. Res.* 32, 2877–2888.

- Salbego, J., Becker, A.G., Golcalves, J.F., Menezes, C.C., Heldwein, C.G., Spanevello, R.M., Loro, V.L., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B. 2014. The essential oil from *Lippia alba* induces biochemical stress in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transportation. *Neotrop. Ichthyol.* 12, 811-818.
- Saura-Calixto, F. 2011. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *J. Agric. Food Chem.* 59, 43-49.
- Senft, A.P., Dalton, T.P., Shertzer, H.G. 2000. Determining glutathione Aand glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde. *Anal. Biochem.* 280, 80-86.
- Shen, H.M., Shi, C.Y., Lee, H.P., Ong, C.N. 1994. Aflatoxin B₁-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicol. Applies Pharmacol.* 127, 145-150.
- Shen, H.M., Shi, C.Y., Shen, Y., Ong, C.N. 1996. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B₁. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 139-146.
- Small, H.Y., Migliarino, S., Czesnikiewicz-Guzik, M., Guzik, T.J. 2018. Hypertension: focus on autoimmunity and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 125, 104-115.
- Smirnova, G.V., Oktyabrsky, O.N. 2005. Glutathione in bacteria. *Biochem.* 70, 1199-1211.
- Son, W.C., Bell, D., Taylor, I., Mowat, A.V. 2010. Profile of early occurring spontaneous tumors in Han Wistar Rats. *Toxicol Pathol.* 38, 292-296.
- Sosa, V., Moline, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., Lleonart, M.E. 2013. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev.* 12, 376-390.
- Starzynska-Janiszewska, A., Stodolak, B., Jamróz, M. 2008. Antioxidant properties of extracts from fermented and cooked seeds of Polish cultivars of *Lathyrus sativus*. *Food Chem.* 109, 285-292.
- Takebayashi, J., Chen, J., Tai, A. 2010. A method for evaluation of antioxidant activity based on inhibition of free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Methods Mol. Biol.* 594, 287-296.
- Todorova, T., Simeonova, G., Kyuchukova, D., Dinev, D., Gadjeva, V. 2005. Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs y cats. *Comp. Clin. Pathol.* 13, 190-194.
- Towner, R.A., Qian, S.Y., Kadiiska, M.B., Mason, R.P. 2003. *In vivo* identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 1330-1340.
- Traber, M.G., Atkinson, J. 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Rad. Biol. Med.* 43, 4-15
- Wang, C.C., Chu, C.Y., Choy, K.W., Khaw, K.S., Rogers, M.S., Pang, C.P. 2004. Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. *Clin Chem.* 50(5), 952-954
- Wang, A.N., Yi, X.W., Yu, H.F., Dong, B., Qiao, S.Y. 2009. Free radical scavenging

- activity of *Lactobacillus fermentum in vitro* and its antioxidative effect on growing-finishing pigs. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1140-1148.
- Wang, G., Wang, T. 2010. The role of plasmalogen in the oxidative stability of neutral lipids y phospholipids. *J. Agric. Food Chem.* 58, 2554–2561.
- Xu, R., Shang, N., Li, P., 2011. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from *Bifidobacterium animalis* RH. *Anaerobe* 17, 226–231.
- Yamamoto, Y., 2009. Identification of antioxidant(s) from lactic acid bacteria y screening of high antioxidative strain(s).
<http://www.nisr.or.jp/englishHP/report2009/NISR09Yamamoto.pdf> (accessed 2.27.16).
- Yi, J., Zhu, Z., Dong, W., McClements, D.J., Decker, E.A. 2013. Influence of free fatty acids on oxidative stability in water-in-walnut oil emulsions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 115, 1013–1020.
- Yi, Z., Fu, Y., Li, M., Gao, K., Zhang, X. 2009. Effect of LTA isolated from bifidobacteria on D-galactose-induced aging. *Exp. Gerontol.* 44, 760–765.
- Yoon, Y.H., Byun, J.R., 2004. Occurrence of glutathione sulphhydryl (GSH) and antioxidant activities in probiotic *Lactobacillus* spp. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 17, 1582–1585.
- Yoshihara, D., Fujiwara, N., Suzuki, K. 2010. Antioxidants: benefits and risks for long-term health. *Maturitas.* 67, 103-107.
- Zulueta A., Esteve M.J., Frígola A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem.* 114: 310-316.

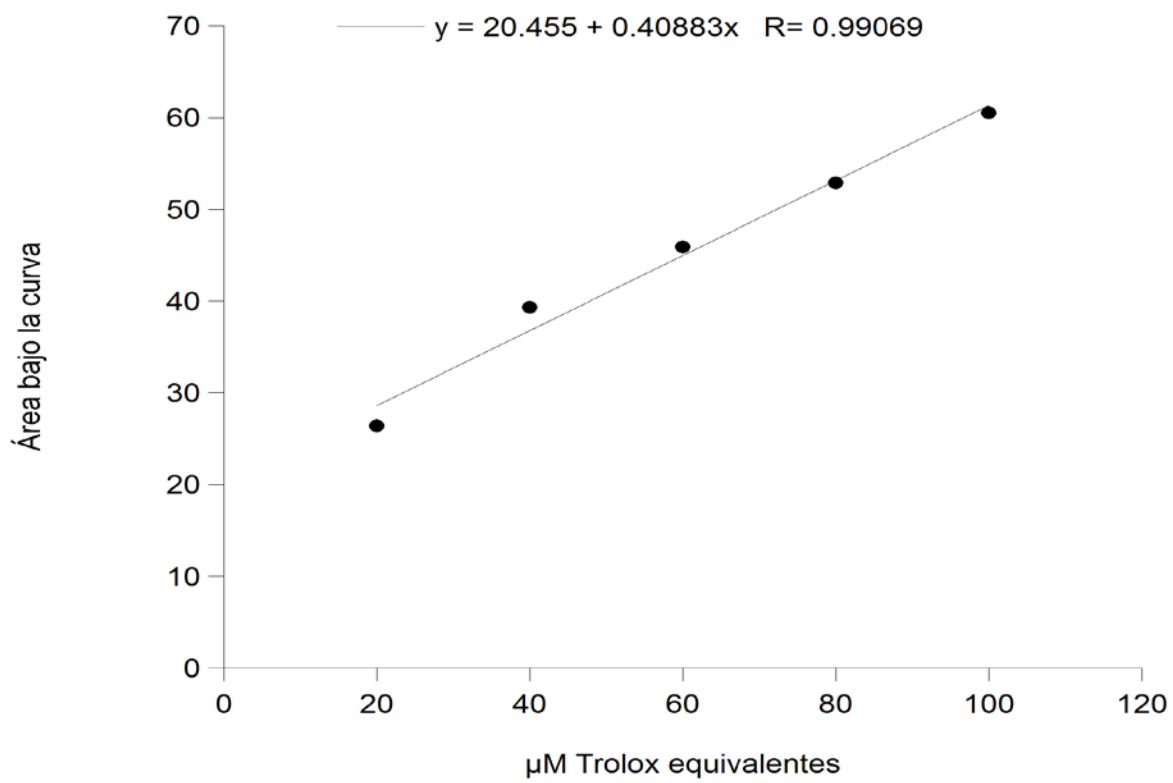
APÉNDICE A

Curva estándar representativa de Trolox para el método ABTS



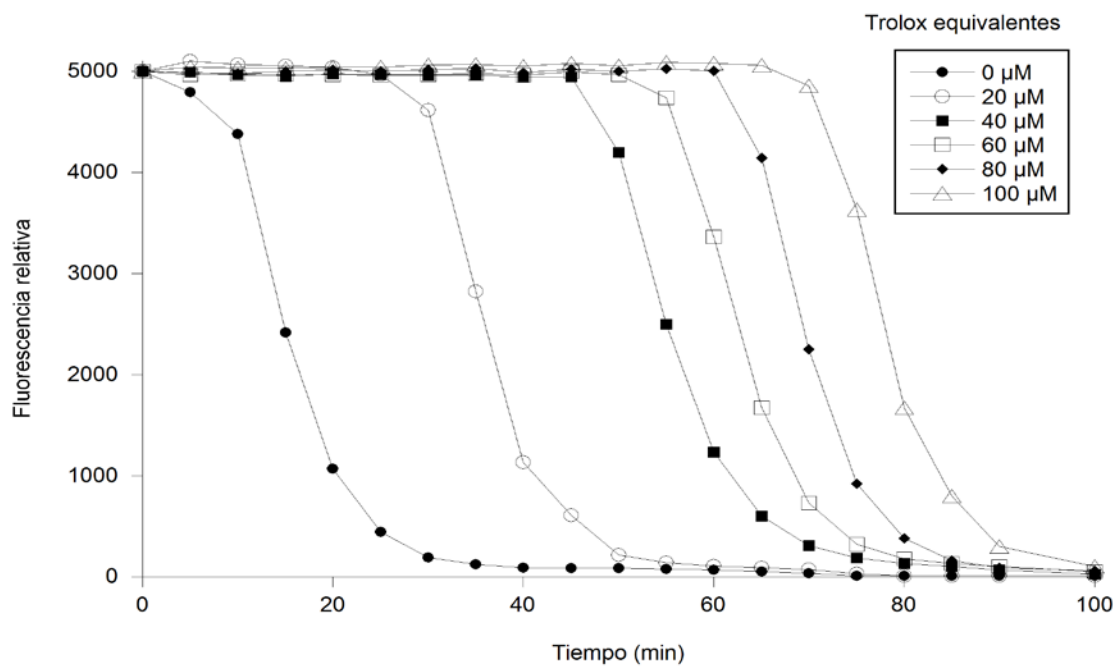
APÉNDICE B

Curva estándar representativa de Trolox para el método ORAC



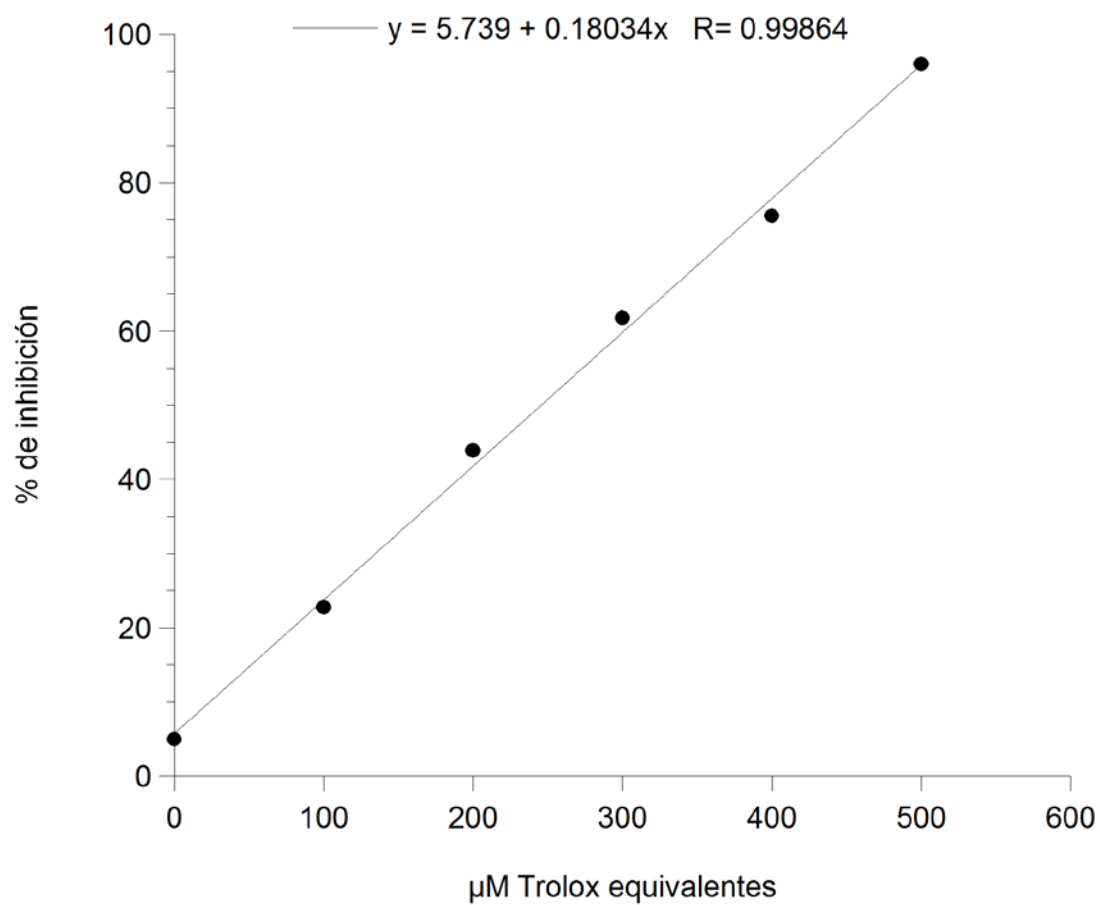
APÉNDICE C

Curvas representativas de decaimiento de la fluorescencia de diferentes concentraciones de Trolox en el método ORAC



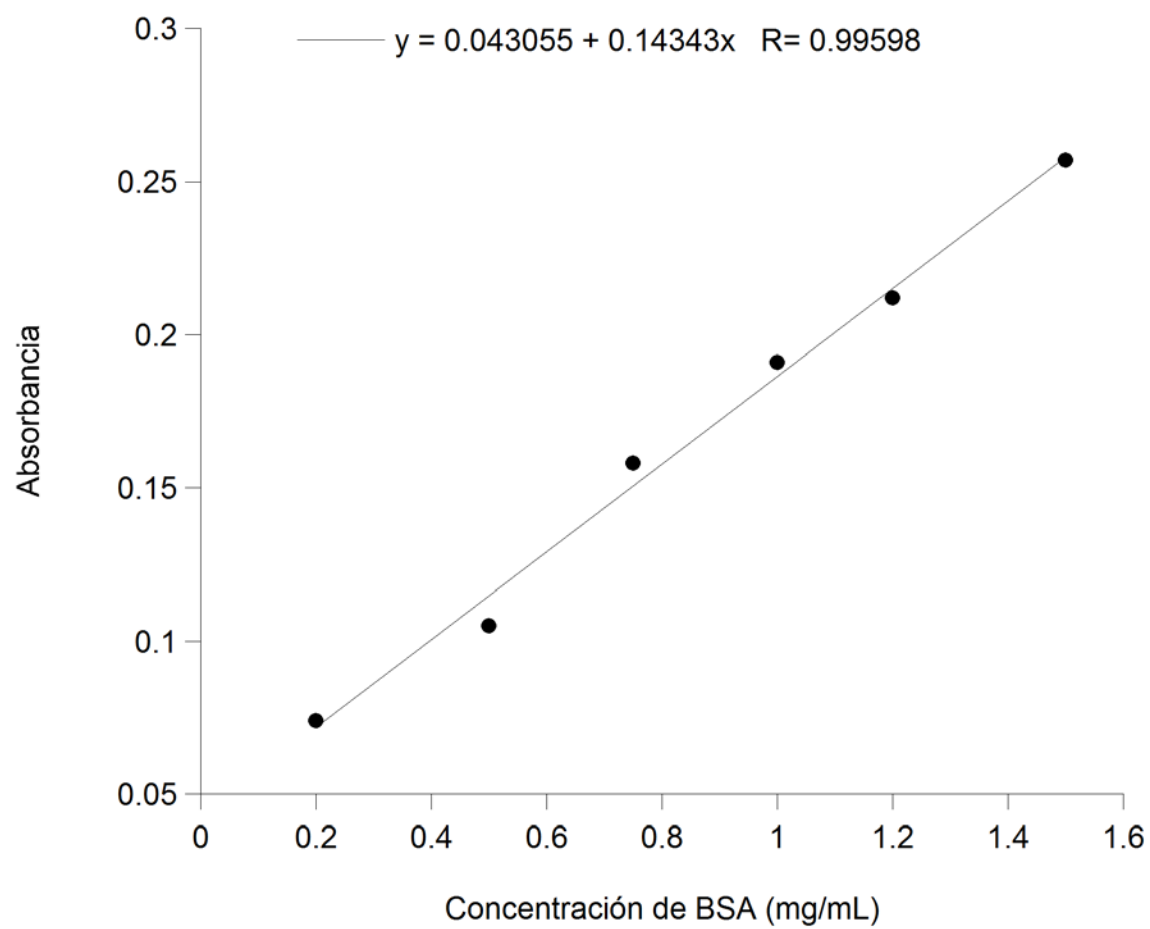
APÉNDICE D

Curva estándar representativa de Trolox para el método LOI



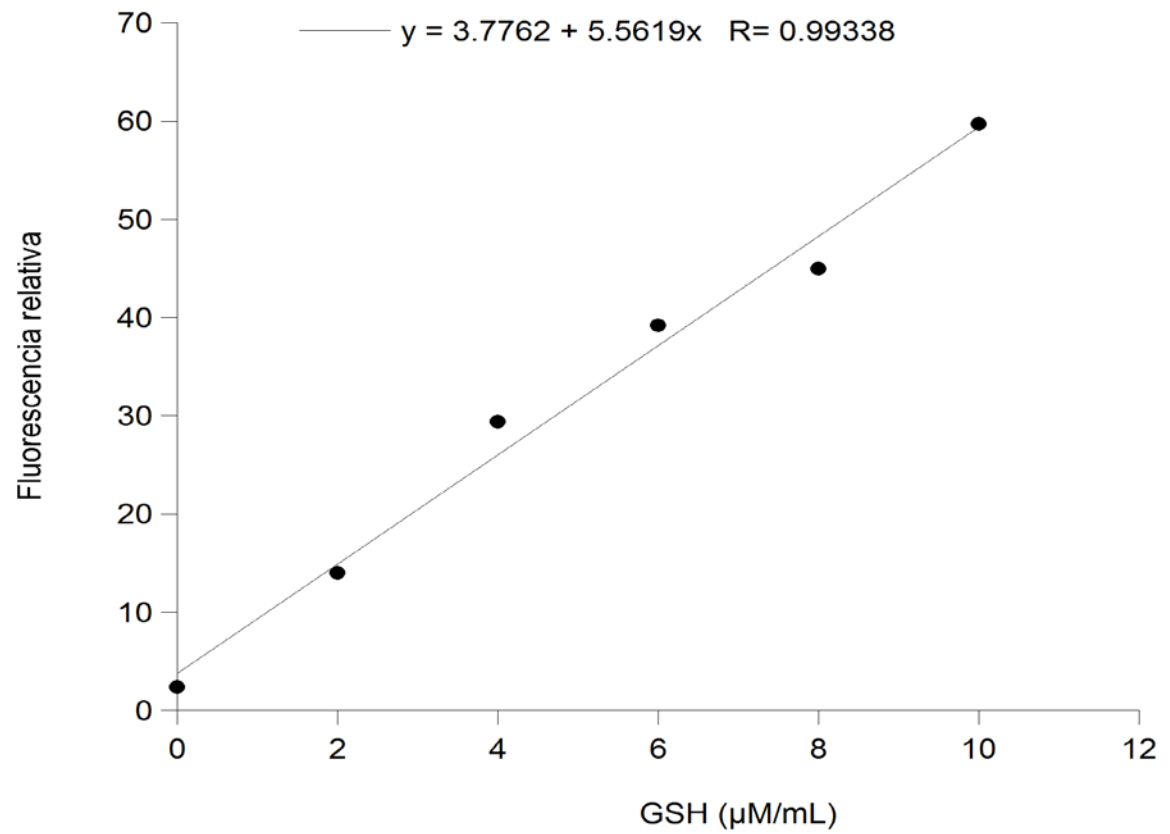
APÉNDICE E

Curva estándar representativa del método de Lowry para cuantificación de proteína



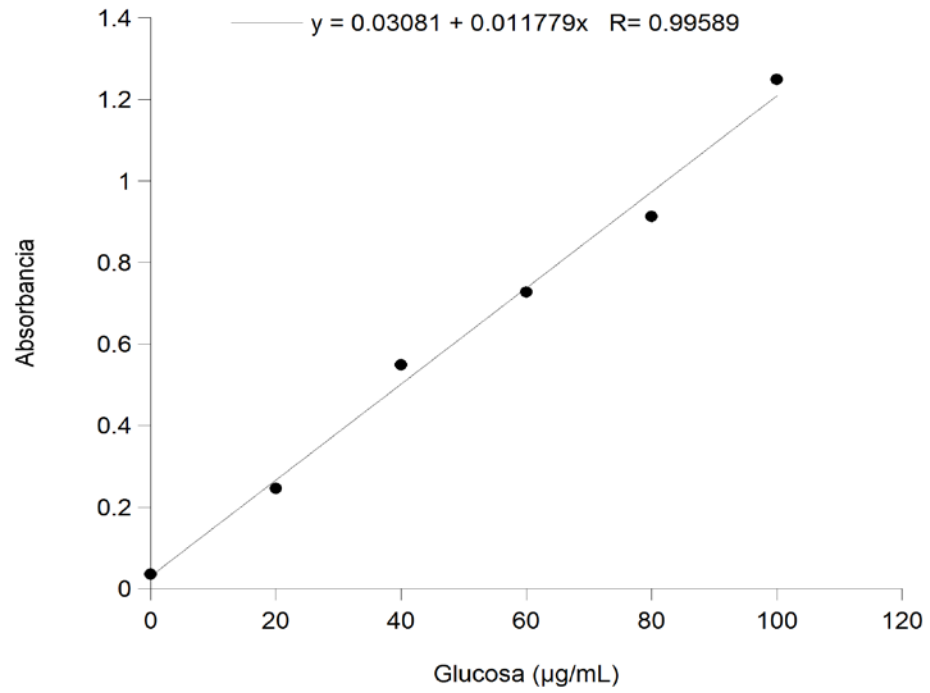
APÉNDICE F

Curva estándar representativa para cuantificación la cuantificación de glutatión (GSH)



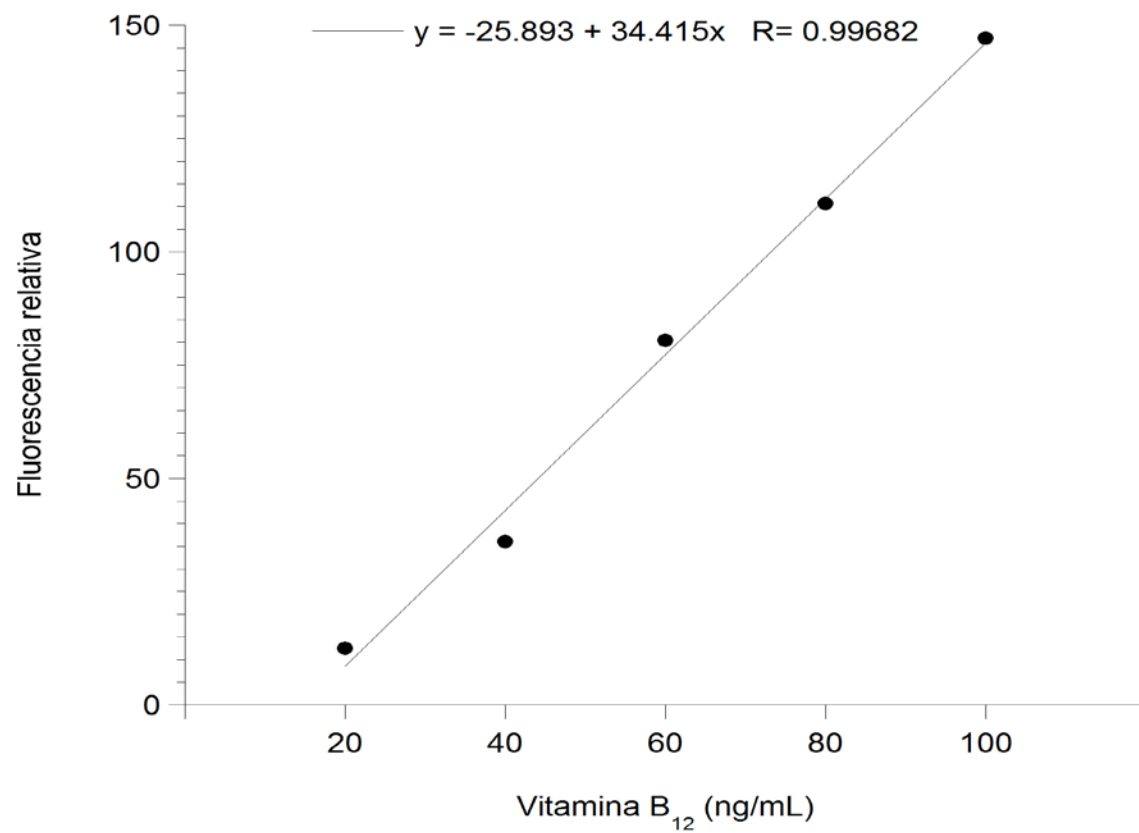
APÉNDICE G

Curva estándar representativa para cuantificación la cuantificación de polisacáridos



APÉNDICE H

Curva estándar representativa para cuantificación la cuantificación de vitamina B₁₂



APÉNDICE I

Manual del kit DC Protein Assay para la cuantificación de proteína



DC Protein Assay Instruction Manual

For Technical Service
Call Your Local Bio-Rad Office or
in the U.S. Call **1-800-4BIORAD**
(1-800-424-6723)



Table of Contents

Section 1	Introduction and Principle	1
Section 2	Product Description	1
Section 3	Materials Required but Not Supplied.....	1
3.1	Safety Considerations	2
Section 4	Reagent Compatibility	2
Section 5	Instructions	3
5.1	Standard Assay Protocol	3
5.2	Microplate Assay Protocol	3
Section 6	Response of Various Proteins	4
Section 7	Storage	4
Section 8	Troubleshooting Guide.....	5
Section 9	Ordering Information	6
Section 10	Related Materials	6
Section 11	References	7
Section 12	Safety Information	8

Section 1 Introduction and Principle

The Bio-Rad *DC* Protein Assay is a colorimetric assay for protein concentration following detergent solubilization. The reaction is similar to the well-documented Lowry¹ assay, but with the following improvements: The reaction reaches 90% of its maximum color development within 15 minutes thereby saving valuable time, and the color changes not more than 5% in 1 hour or 10% in 2 hours after the addition of reagents.

The assay is based on the reaction of protein with an alkaline copper tartrate solution and Folin reagent. As with the Lowry assay, there are two steps which lead to color development: The reaction between protein and copper in an alkaline medium, and the subsequent reduction of Folin reagent by the copper-treated protein.¹ Color development is primarily due to the amino acids tyrosine and tryptophan, and to a lesser extent, cystine, cysteine, and histidine.^{1,2} Proteins effect a reduction of the Folin reagent by loss of 1, 2, or 3 oxygen atoms, thereby producing one or more of several possible reduced species which have a characteristic blue color with maximum absorbance at 750 nm and minimum absorbance at 405 nm.²

Section 2 Product Description

Reagent package (catalog number 500-0116) includes:

- 250 ml REAGENT A, an alkaline copper tartrate solution
- 2000 ml REAGENT B, a dilute Folin Reagent
- 5 ml REAGENT S
- (Sufficient for 500 standard assays or 10,000 microplate assays)

The reagent package may be purchased as a kit with a bovine gamma globulin standard (kit catalog number 500-0111) or bovine serum albumin standard (kit catalog number 500-0112).

Section 3 Materials Required but Not Supplied

For standard assay:

- 13 x 100 mm test tubes
- Reservoir for working reagent (size depends on amount of reagent that will be prepared)
- Pipets accurately delivering 100 μ l, 500 μ l, and 4.0 ml
- Graduated cylinders or pipets for reagent preparation
- Spectrophotometer set to 750 nm

Vortex mixer

Plastic or glass cuvettes with 1 cm path length matched to laboratory spectrophotometer

Test tube rack to hold 13 x 100 mm test tubes

For microplate assay:

Microtiter plates

Reservoir for working reagent

Pipets for reagent preparation

Pipets accurately delivering 5 μ l, 25 μ l, and 200 μ l

Microplate reader set to 750 nm

3.1 Safety Considerations

Eye protection and gloves should be worn while using this product. Consult MSDS at the end of this manual for additional information.

Section 4 Reagent Compatibility

The listed compounds were tested and found to be compatible with the Bio-Rad DC Protein Assay. In some cases, the presence of one or more of these substances will effect a change in the response of the protein to the assay reagents; therefore, the standard should **always** be prepared in the same buffer as the sample.

10% SDS	1% CHAPS	2% NP-40
1% Triton [†] X-100	1% CHAPSO	1% Thesit [†]
1% Tween [†] 20	1% Octyl glucoside	1% Brij [†] -35
0.2% C ₁₂ E ₈ [*]	0.1 M Tris, pH 8	0.5 M NaOH
0.5 M HCl	0.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄	0.025 M EDTA
0.05 M CaCl ₂	0.4 M Guanidine HCl	4 M Urea
0.05% Sodium azide	1 mM DTT (dithiothreitol)	

Note: The DC Protein Assay is incompatible with 2-mercaptoethanol (BME)

[†] BRIJ and TWEEN are registered trademarks of Atlas Chemical. THESIT is a registered trademark of Desitin Arzneimittel GMBH. TRITON is a registered trademark of Rohm and Haas.

^{*}octaethyleneglycol dodecyl ether

Section 5 Instructions

5.1 Standard Assay Protocol

1. Preparation of working reagent

Add 20 μ l of reagent S to each ml of reagent A that will be needed for the run. (This **working reagent A'** is stable for one week even though a precipitate will form after one day. If precipitate forms, warm the solution and vortex. Do not pipet the undissolved precipitate, as this will likely plug the tip of the pipet, thereby altering the volume of reagent that is added to the sample.)

If samples do not contain detergent, you may omit step #1 and simply use reagent A as supplied.

2. Prepare 3 - 5 dilutions of a protein standard containing from 0.2 mg/ml to about 1.5 mg/ml protein. A standard curve should be prepared each time the assay is performed. *For best results, the standards should always be prepared in the same buffer as the sample.*
3. Pipet 100 μ l of standards and samples into clean, dry test tubes.
4. Add 500 μ l of reagent A' or A (see note from step 1) into each test tube. Vortex.
5. Add 4.0 ml reagent B into each test tube and vortex immediately.
6. After 15 minutes, absorbances can be read at 750 nm. The absorbances will be stable at least 1 hour. (See Troubleshooting Guide for recommendation on using a wavelength other than 750 nm.)

5.2 Microplate Assay Protocol

1. Preparation of working reagent

Add 20 μ l of reagent S to each ml of reagent A that will be needed for the run. (This **working reagent A'** is stable for 1 week even though a precipitate will form after 1 day. If precipitate forms, warm the solution and vortex. Do not pipet the undissolved precipitate, as this will likely plug the tip of the pipet, thereby altering the volume of reagent that is added to the sample.)

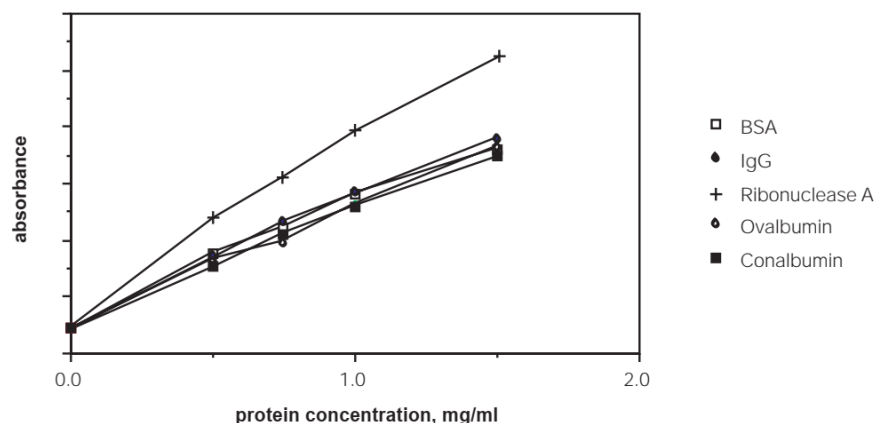
If samples do not contain detergent, you may omit step #1 and simply use reagent A as supplied.

2. Prepare 3 - 5 dilutions of a protein standard containing from 0.2 mg/ml to about 1.5 mg/ml protein. A standard curve should be prepared each time the assay is performed. *For best results, the standard should be prepared in the same buffer as the sample.*
3. Pipet 5 μ l of standards and samples into a clean, dry microtiter plate.

4. Add 25 μ l of reagent A' or reagent A (see note from step 1) into each well.
5. Add 200 μ l reagent B into each well. If microplate reader has a mixing function available, place plate in reader and let the plate mix for 5 seconds. If not, gently agitate the plate to mix the reagents. If bubbles form, pop them with a clean, dry pipet tip. Be careful to avoid cross-contamination of sample wells.
6. After 15 minutes, absorbances can be read at 750 nm. The absorbances will be stable for about 1 hour. (See Troubleshooting Guide for recommendation on using a wavelength other than 750 nm.)

Section 6 Response of Various Proteins

As with any colorimetric assay, different proteins will elicit greater or lesser color formation. The following proteins have been assayed with the protein assay. As demonstrated by the graph, there is a slight variation in color development with different proteins.



Section 7 Storage

Lyophilized preparations of Protein Standard I (bovine gamma globulin) and Protein Standard II (bovine serum albumin), if included, should be refrigerated upon arrival. These lyophilized preparations have a shelf life of one year at 4 °C. Rehydrated and stored at 4 °C, the protein solutions should be used within 60 days. Rehydrated and stored at -20 °C, the protein solutions should be used within 6 months.

REAGENT A, REAGENT B, and REAGENT S should be stored away from direct sunlight at room temperature (25-30 °C). (Reagents A and B may also be stored in the refrigerator.) All reagents are good for 6 months from date of purchase.

Section 8 Troubleshooting Guide

1. The buffer that I normally use is not listed in the reagent compatibility list. How will I know if it interferes with the assay?

It is best to run two standard curves: One with protein in the same buffer as your sample and one with protein in water and then plot a graph of protein concentration vs. absorbance. If the buffer does not interfere, the two graphs of the standard curve will have identical slope. Partial interference can be compensated for by adding the buffer or interfering component to the standard curve for the actual protein assay.
2. My sample is a mixture of proteins. Which standard should I use for the standard curve?

In any protein assay, the best protein to use as a standard is a purified preparation of the protein being assayed. In the absence of such an absolute reference protein, one must select another protein as a relative standard. The best relative standard to use is one which gives a color yield similar to that of the protein being assayed.

Any purified protein can be selected as a reference standard if only relative protein values are desired. Bio-Rad offers two standards: bovine gamma globulin (Standard I, catalog number 500-0005) and bovine serum albumin (Standard II, catalog number 500-0007).
3. Is any sample preparation required?

In general, no. However, the protein must be solubilized. (The sample can not be a suspension or an unfiltered homogenate.)
4. May I use a wavelength other than 750 nm?

Yes. Absorbance can be measured at 650-750 nm.
5. May I store the reagents in the refrigerator?

Yes, but all components must be warmed to 25-30 °C prior to use. Reagent S will develop a precipitate during cold room storage. Warming to 37 °C for 5 minutes will dissolve the precipitate.

Section 9 Ordering Information

Catalog Number	Product Description
500-0111	Bio-Rad DC Protein Assay Kit I , includes contents of Reagents Package and bovine gamma globulin standard
500-0112	Bio-Rad DC Protein Assay Kit II , includes contents of Reagents Package and bovine serum albumin standard
500-0116	Bio-Rad DC Protein Assay Reagents Package , does not include a standard

Section 10 Related Materials

Catalog Number	Product Description
500-0001	Bio-Rad Protein Assay Kit I , 450 ml dye reagent concentrate and bovine gamma globulin standard for general use, based on Bradford method
500-0002	Bio-Rad Protein Assay Kit II , 450 ml dye reagent concentrate and bovine serum albumin standard for general use, based on Bradford method
500-0006	Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate , 450 ml dye reagent concentrate supplied without a standard, based on Bradford method
500-0005	Protein Standard I , bovine gamma globulin
500-0007	Protein Standard II , bovine serum albumin
223-9950	Disposable Polystyrene Cuvettes , 100 -3.5 ml cuvettes
224-0096	Costar 96 Well Flat Bottom EIA Plate , polystyrene microtiter plates, 5 per package, carton of 100
170-6601	Model 3550 Microplate Reader , 100/120 VAC
170-6602	Model 3550 Microplate Reader , 220/240 VAC
170-6621	Model 450 Microplate Reader , 100/120 VAC
170-6622	Model 450 Microplate Reader , 220/240 VAC

For information on Bio-Rad's extensive Microplate Data Analysis Systems, please call 800/4-BIORAD in the U.S., or contact your local Bio-Rad Representative.

Section 11 References

1. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," *Journal of Biological Chemistry*, **193** (1951): 265-275.
2. Peterson, Gary L., "Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr, and Randall," *Analytical Biochemistry*, **100** (1979): 201-220.

Section 12 Material Safety Data Sheets

I. PRODUCT IDENTIFICATION

TRADE NAME: DC PROTEIN ASSAY REAGENT A

Catalog No.: Used in Kits: 500-0111, 500-0112, and 500-0116

Chemical identity, Common names: SODIUM HYDROXIDE, Caustic soda, lye.

Formula: NaOH, a caustic.

M.W.: 40.00

MANUFACTURER'S NAME:

BIO-RAD LABORATORIES

LIFE SCIENCE GROUP

2000 ALFRED NOBEL DRIVE

HERCULES, CA 94547

EMERGENCY PHONE No:

510/232-7000

DATE PREPARED OR REVISED: 2/3/95

NAME OF PREPARER: ROY WOOD

II. HAZARDOUS INGREDIENTS

<u>CHEMICAL NAMES</u>	<u>CAS NUMBERS</u>	<u>PERCENT</u>	<u>EXPOSURE LIMITS IN AIR</u>		
			<u>ACGIH TLV</u>	<u>OSHA PEL</u>	<u>OTHER</u>
Sodium Hydroxide	1310-73-2	1-5%*	—	2 mg/m ³	—

*Aqueous solution also containing less than 1% sodium tartrate and less than .1% copper sulfate.

III. PHYSICAL/CHEMICAL CHARACTERISTICS

BOILING POINT: 100 °C

VAPOR PRESSURE: N/A

VAPOR DENSITY(AIR = 1): N/A

SOLUBILITY IN WATER: Infinite.

SPECIFIC GRAVITY(H₂O = 1): 1

MELTING POINT: N/A

EVAPORATION RATE (BUTYL ACETATE = 1): N/A

APPEARANCE AND COLOR: Pale blue liquid.

IV. FIRE AND EXPLOSION HAZARD DATA

FLASH POINT: N/A

(METHOD USED): N/A

FLAMMABLE LIMITS: N/A

EXTINGUISHING MEDIA: Not required. Use media suitable for surrounding materials.

SPECIAL FIRE FIGHTING PROCEDURES: In the event of a fire, wear full protective clothing and NIOSH-approved self-contained breathing apparatus with full facepiece operated in the pressure demand or other positive pressure mode.

UNUSUAL FIRE AND EXPLOSION HAZARDS: None expected .

V. HEALTH HAZARD INFORMATION

SYMPTOMS OF OVEREXPOSURE (for each potential route of exposure):

INHALED: Corrosive! Inhalation not likely due to nature of the product. If product dries out, the inhaled sodium hydroxide dust may be fatal as a result of spasm, inflammation and edema of the larynx and bronchi, chemical pneumonitis and pulmonary edema.

CONTACT WITH SKIN OR EYES: Corrosive! Extremely destructive to tissue of the skin and eyes. May cause irritation of eyes and with greater exposures, severe burns with possibility of blindness resulting.

ABSORBED THROUGH SKIN: Corrosive! Destructive to skin on contact can cause irritation or severe burns and scarring with greater exposures.

SWALLOWED: Corrosive! DANGER: May be fatal if swallowed. Causes severe burns. Sodium hydroxide is classified as a poison under Federal Caustic Poison Act.

HEALTH EFFECTS OR RISKS FROM EXPOSURE

ACUTE: Corrosive! Causes severe burns. See above.

CHRONIC: Prolonged contact with dilute solutions or dust has a destructive effect upon tissue.

FIRST AID: EMERGENCY PROCEDURES

EYE CONTACT: Flush with large amounts of water for at least 15 minutes, lifting the upper and lower lids occasionally. Get immediate medical attention.

SKIN CONTACT: Flush skin with large amounts of water for at least 15 minutes, while removing contaminated clothing and shoes. Wash clothes before reuse. Get medical attention.

INHALED: Remove to fresh air. If not breathing, give artificial respiration. Get immediate medical attention.

SWALLOWED: DO NOT INDUCE VOMITING! Give large quantities of water or milk if available. Never give anything by mouth to an unconscious person. Get medical attention immediately.

SUSPECTED CANCER AGENT

NO: THIS PRODUCT'S INGREDIENTS ARE NOT FOUND IN THE LISTS BELOW.

YES: FEDERAL OSHA NTP IARC

MEDICAL CONDITIONS AGGRAVATED BY EXPOSURE: Persons with pre-existing skin disorders or eye problems or impaired respiratory function may be more susceptible to the effects of this substance.

VI. REACTIVITY DATA

STABLE

UNSTABLE

CONDITIONS TO AVOID: NA

INCOMPATIBILITY(Materials to avoid): Strong acid solutions, organic halogen compounds, and nitromethane.

HAZARDOUS DECOMPOSITION PRODUCTS: Sodium oxide.

HAZARDOUS POLYMERIZATION MAY OCCUR WILL NOT OCCUR

CONDITIONS TO AVOID: N/A

VII. SPILL, LEAK, AND DISPOSAL PROCEDURES

SPILL RESPONSE PROCEDURES: CAUTION: Caustic material. Cover spill with adsorbent and collect for solid waste disposal.

PREPARING WASTES FOR DISPOSAL: Comply with all applicable federal, state, and local regulations on spill reporting, waste handling, and waste disposal.

VIII. SPECIAL HANDLING INFORMATION

VENTILATION AND ENGINEERING CONTROLS: In general, dilution ventilation is a satisfactory health hazard control for this substance.

RESPIRATORY CONTROLS: This product is a liquid and does not contain volatile organics and should not require any special respiratory controls. Respiratory controls may be required for protection against other chemicals being used in the same area.

EYE PROTECTION: Use chemical safety goggles. Contact lenses should not be worn when working with this material. Maintain eye wash fountain and quick-drench facilities in work area.

GLOVES: Chemical resistant gloves such as neoprene.

OTHER CLOTHING AND EQUIPMENT: Lab coat or apron.

WORK PRACTICES, HYGIENIC PRACTICES: Use good laboratory practices. Wash hands after using and before eating. Do not eat, drink, or smoke in the work area.

OTHER HANDLING AND STORAGE REQUIREMENTS: Keep in a tightly closed container to protect product quality. Store in a cool, dry, ventilated area.

PROTECTIVE MEASURES DURING MAINTENANCE OF CONTAMINATED EQUIPMENT: Protective clothing, eyewear and appropriate NIOSH-approved respiratory protection should be worn.

We believe that the information contained herein is current as of the date of this Material Safety Data Sheet. Since the use of this information and conditions of use of the product are not within the control of Bio-Rad, it is the user's responsibility to handle the product under conditions of safe use.

I. PRODUCT IDENTIFICATION

TRADE NAME: DC PROTEIN ASSAY REAGENT B

Catalog No.: Used in Kits: 500-0111, 500-0112, and 500-0116

Chemical identity, Common names: FOLIN REAGENT.

Formula: MIXTURE

M.W.: NA

MANUFACTURER'S NAME:

BIO-RAD LABORATORIES

LIFE SCIENCE GROUP

2000 ALFRED NOBEL DRIVE

HERCULES, CA 94547

EMERGENCY PHONE No:

510/232-7000

DATE PREPARED OR REVISED: 2/3/95

NAME OF PREPARER: ROY WOOD

II. HAZARDOUS INGREDIENTS

<u>CHEMICAL NAMES</u>	<u>CAS NUMBERS</u>	<u>PERCENT</u>	<u>EXPOSURE LIMITS IN AIR</u>	
			<u>ACGIH TLV</u>	<u>OSHA PEL</u>
REAGENT B is a diluted FOLIN reagent containing less than 1% each of the following ingredients:				
Lithium Sulfate	10377-48-7		no data found	
Tungstic acid, sodium salt	10213-10-2	1 mg/m ³		1 mg/m ³ (TWA)
Molybdic acid, sodium salt	10102-40-6	5 mg/m ³		5 mg/m ³
Hydrochloric acid	7647-01-0	7.5 mg/m ³		7 mg/m ³
Phosphoric acid	7664-38-2	1 mg/m ³		1 mg/m ³

III. PHYSICAL/CHEMICAL CHARACTERISTICS

BOILING POINT: 100 °C (water)

SPECIFIC GRAVITY(H₂O = 1): 1

VAPOR PRESSURE: NA

MELTING POINT: NA

VAPOR DENSITY(AIR = 1): NA

EVAPORATION RATE (BUTYL ACETATE = 1): NA

ODOR: odorless

SOLUBILITY IN WATER: infinite

APPEARANCE AND COLOR: Clear liquid.

IV. FIRE AND EXPLOSION HAZARD DATA

FLASH POINT: NA

FLAMMABLE LIMITS: NA

(METHOD USED): NA

EXTINGUISHING MEDIA: Nothing special required. Use media suitable for surrounding materials.

SPECIAL FIRE FIGHTING PROCEDURES: For surrounding fire wear self-contained breathing apparatus and protective clothing to prevent contact with skin and eyes.

UNUSUAL FIRE AND EXPLOSION HAZARDS: No special hazards known.

V. HEALTH HAZARD INFORMATION

SYMPTOMS OF OVEREXPOSURE (for each potential route of exposure):

INHALED: Not expected due to nature of product.

CONTACT WITH SKIN OR EYES: Would be irritating to eyes.

ABSORBED THROUGH SKIN: Could be mildly irritating to skin.

SWALLOWED: Large doses may cause gastrointestinal distress.

HEALTH EFFECTS OR RISKS FROM EXPOSURE

ACUTE: Contains dilute acids. Could be a mild irritant. The concentration of all the ingredients are less than 1% each. There is no specific information available for diluted FOLIN reagent. The diluted solution does contain dilute acids and heavy metals: SAX, 5th Ed. lists Molybdenum as "slightly toxic" and tungsten is listed as somewhat more toxic than molybdenum but "does not constitute an important health hazard".

CHRONIC: To the best of our knowledge, the chemical, physical, and toxicological properties have not been thoroughly investigated for FOLIN reagent.

FIRST AID: EMERGENCY PROCEDURES

EYE CONTACT: Flush with large volumes of water for at least 15 minutes, lifting the upper and lower lids occasionally. Get medical attention.

SKIN CONTACT: Remove any contaminated clothing. Wash skin with plenty of flowing water for at least 15 minutes. If irritation develops, get medical attention.

INHALED: Remove to fresh air. Get medical attention for any breathing difficulty.

SWALLOWED: Induce vomiting by giving two glasses of water, or milk if available and sticking finger down throat. Call a physician immediately. Never give anything by mouth to an unconscious person.

SUSPECTED CANCER AGENT

NO: THIS PRODUCT'S INGREDIENTS ARE NOT FOUND IN THE LISTS BELOW.

YES: FEDERAL OSHA NTP IARC

MEDICAL CONDITIONS AGGRAVATED BY EXPOSURE:

No information found.

VI. REACTIVITY DATA

STABLE

UNSTABLE

CONDITIONS TO AVOID: N/A

INCOMPATIBILITY (Materials to avoid): Strong oxidizers.

HAZARDOUS DECOMPOSITION PRODUCTS: Upon dehydration oxides of phosphorous and hydrogen chloride gas may form.

HAZARDOUS POLYMERIZATION MAY OCCUR WILL NOT OCCUR

CONDITIONS TO AVOID: N/A

VII. SPILL, LEAK, AND DISPOSAL PROCEDURES

SPILL RESPONSE PROCEDURES: Cover spill with a sorbent and collect for solid waste disposal..

PREPARING WASTES FOR DISPOSAL: Comply with all applicable federal, state, and local regulations on spill reporting waste handling, and waste disposal.

VIII. SPECIAL HANDLING INFORMATION

VENTILATION AND ENGINEERING CONTROLS: In general, good ventilation is sufficient. However, if conditions of use create discomfort to the worker a local exhaust system should be considered.

RESPIRATORY CONTROLS: Should not be required for this product.

EYE PROTECTION: Chemical safety goggles.

GLOVES: Use chemical resistant gloves such as neoprene.

OTHER CLOTHING AND EQUIPMENT: Wear lab coat or apron.

WORK PRACTICES, HYGIENIC PRACTICES: Use good laboratory practices. Wash hands after using and before eating. Do not eat, drink, or smoke in the work area.

OTHER HANDLING AND STORAGE REQUIREMENTS: Keep tightly sealed to protect quality. Store in a cool, dry, ventilated area.

PROTECTIVE MEASURES DURING MAINTENANCE OF CONTAMINATED EQUIPMENT:

Proper protective clothing, eye protection, and respiratory equipment should be worn.

We believe that the information contained herein is current as of the date of this Material Safety Data Sheet. Since the use of this information and conditions of use of the product are not within the control of Bio-Rad, it is the user's responsibility to handle the product under conditions of safe use.

1. PRODUCT IDENTIFICATION

TRADE NAME: DC PROTEIN ASSAY REAGENT S

Catalog No.: Used in Kits: 500-0111, 500-0112, and 500-0116

Chemical identity, Common names: Sodium dodecyl sulfate.

Formula: C₁₂H₂₅NaO₄S

M.W.: 288.38

MANUFACTURER'S NAME:

BIO-RAD LABORATORIES

LIFE SCIENCE GROUP

2000 ALFRED NOBEL DRIVE

HERCULES, CA 94547

EMERGENCY PHONE No:

510/232-7000

DATE PREPARED OR REVISED: 2/3/95

NAME OF PREPARER: ROY WOOD

II. HAZARDOUS INGREDIENTS

<u>CHEMICAL NAMES</u>	<u>CAS NUMBERS</u>	<u>PERCENT</u>	<u>EXPOSURE LIMITS IN AIR</u>		
			<u>ACGIH TLV</u>	<u>OSHA PEL</u>	<u>OTHER</u>
sodium dodecyl sulfate	151-21-3	5-10%†		no data found *	

†Aqueous solution. Data given is for 100% SDS unless otherwise noted.

*orl-rat LD50: 1288 mg/kg

III. PHYSICAL/CHEMICAL CHARACTERISTICS

BOILING POINT: 100 °C (water)

SPECIFIC GRAVITY (H₂O = 1): N/A

VAPOR PRESSURE: N/A

MELTING POINT: 200 °C (362 °F) decomposes

VAPOR DENSITY(AIR = 1): N/A

EVAPORATION RATE (BUTYL ACETATE = 1): N/A

ODOR: Slight fatty odor

SOLUBILITY IN WATER: 0.1 g/ml

APPEARANCE AND COLOR: Clear liquid.

IV. FIRE AND EXPLOSION HAZARD DATA

FLASH POINT: N/A

FLAMMABLE LIMITS: N/A

(METHOD USED): N/A

EXTINGUISHING MEDIA: Water spray, dry chemical, alcohol foam, or carbon dioxide.

SPECIAL FIRE FIGHTING PROCEDURES: As with most organic solids, fire is possible at elevated temperatures or by contact with an ignition source.

UNUSUAL FIRE AND EXPLOSION HAZARDS: Fine dust dispersed in air in sufficient concentrations, and in the presence of an ignition source is a potential dust explosion hazard.

V. HEALTH HAZARD INFORMATION

SYMPTOMS OF OVEREXPOSURE (for each potential route of exposure):

INHALED: Not expected due to nature of product. However, it dried out the powder causes irritation of mucous membranes, throat and respiratory tract. Symptoms of sore throat, coughing, and choking can occur.

CONTACT WITH SKIN OR EYES: Irritating to eye tissue with redness and pain.

ABSORBED THROUGH SKIN: Mildly irritating to skin, causes a rash on continued exposure.

SWALLOWED: Large doses may cause gastrointestinal distress.

HEALTH EFFECTS OR RISKS FROM EXPOSURE

ACUTE: See above.

CHRONIC: To the best of our knowledge, the chemical, physical, and toxicological properties have not been thoroughly investigated.

FIRST AID: EMERGENCY PROCEDURES

EYE CONTACT: Flush with large volumes of water for at least 15 minutes, lifting the upper and lower lids occasionally. Get medical attention.

SKIN CONTACT: Remove any contaminated clothing. Wash skin with plenty of flowing water for at least 15 minutes. If irritation develops, get medical attention.

INHALED: Remove to fresh air. Get medical attention for any breathing difficulty.

SWALLOWED: Induce vomiting by giving two glasses of water, or milk if available and sticking finger down throat. Call a physician immediately. Never give anything by mouth to an unconscious person.

SUSPECTED CANCER AGENT

NO: THIS PRODUCT'S INGREDIENTS ARE NOT FOUND IN THE LISTS BELOW.

YES: FEDERAL OSHA NTP IARC

MEDICAL CONDITIONS AGGRAVATED BY EXPOSURE:

No information found.

VI. REACTIVITY DATA

STABLE

UNSTABLE

CONDITIONS TO AVOID: N/A

INCOMPATIBILITY (Materials to avoid): Strong oxidizers.

HAZARDOUS DECOMPOSITION PRODUCTS: Oxides of sulfur and hydrogen sulfide.

HAZARDOUS POLYMERIZATION MAY OCCUR WILL NOT OCCUR

CONDITIONS TO AVOID: N/A

VII. SPILL, LEAK, AND DISPOSAL PROCEDURES

SPILL RESPONSE PROCEDURES: Caution, may be slippery. Small spill may be cleaned up with a sponge and water washed down the drain.

PREPARING WASTES FOR DISPOSAL: Comply with all applicable federal, state, and local regulations on spill reporting waste handling, and waste disposal.

VIII. SPECIAL HANDLING INFORMATION

VENTILATION AND ENGINEERING CONTROLS: In general, good ventilation is sufficient. However, if conditions of use create discomfort to the worker a local exhaust system should be considered.

RESPIRATORY CONTROLS: Should not be required for this product.

EYE PROTECTION: Chemical safety goggles.

GLOVES: Use chemical resistant gloves such as neoprene.

OTHER CLOTHING AND EQUIPMENT: Wear lab coat or apron.

WORK PRACTICES, HYGIENIC PRACTICES: Use good laboratory practices. Wash hands after using and before eating. Do not eat, drink, or smoke in the work area.

OTHER HANDLING AND STORAGE REQUIREMENTS: Keep tightly sealed to protect quality. Store in a cool, dry, well-ventilated place away from incompatible materials.

PROTECTIVE MEASURES DURING MAINTENANCE OF CONTAMINATED EQUIPMENT:

Proper protective clothing, eye protection, and respiratory equipment should be worn.

We believe that the information contained herein is current as of the date of this Material Safety Data Sheet. Since the use of this information and conditions of use of the product are not within the control of Bio-Rad, it is the user's responsibility to handle the product under conditions of safe use.



**Bio-Rad
Laboratories**

*Life Science
Group*

Website www.bio-rad.com **U.S.** (800) 4BIORAD **Australia** 02 9914 2800
Austria (01) 877 89 01 **Belgium** 09-385 55 11 **Canada** (905) 712-2771
China 86-10-62051850 86-10) 62051850 **Denmark** 45 39 17 99 47
Finland 358 (0)9 804 2200 **France** (01) 43 90 46 90 **Germany** 089 318 84-0
Hong Kong 852-2789-3300 **India** (91-11) 461 0103 **Israel** 03 951 4127
Italy 02 21609.1 **Japan** 03-5811-6270 **Korea** 82-2-3473-4460
The Netherlands 31 318-540666 **New Zealand** 64-9-4152280
Singapore 65-2729877 **Spain** (91) 661 70 85 **Sweden** 46 (0)8 627 50 00
Switzerland 01-809 55 55 **United Kingdom** 0800-181134

000097 Sig 120197

LIT448 Rev D

APÉNDICE J

Manual del kit Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay para la cuantificación de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA
Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757
email: techservice@sial.com sigma-aldrich.com

Product Information

Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit

Catalog Number **CGP1**
Storage Temperature $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

TECHNICAL BULLETIN

Product Description

Glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) provides a mechanism for detoxification of peroxides in living cells.^{1,2} This reaction plays a crucial role in protecting cells from damage by free radicals, which are formed by peroxide decomposition. Lipid components of the cell are especially susceptible to reactions with free radicals, resulting in lipid peroxidation. GPx enzymes reduce peroxides to alcohols using glutathione, thus preventing the formation of free radicals.

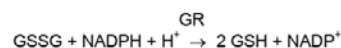
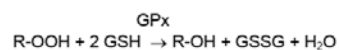
GPx enzymes will catalyze the reduction of hydrogen peroxide (H_2O_2) and a wide variety of organic peroxides (R-OOH) to the corresponding stable alcohols (R-OH) and water using cellular glutathione as the reducing reagent.

Most cellular glutathione peroxidases are tetrameric enzymes consisting of four 22 kDa monomers, each of which contains a selenocysteine moiety in the active site.² The selenocysteine participates directly in electron donation to the peroxide substrate and becomes oxidized in the process. The enzyme then uses reduced glutathione as a hydrogen donor to regenerate the selenocysteine. GPx enzymes also exist as non-selenium (non-Se) containing enzymes.³

Cellular GPx is present in all tissues; however, various diseases may influence its level. An increase in the level of glutathione peroxidase has been observed in reticulocytes of diabetic rats. The level returned to normal after administration of insulin.⁵ A decrease in the level of the enzyme has been observed in patients suffering from diseases such as Favism⁷ (a disease associated with extreme hemolytic crisis) or hairy cell leukemia.⁸

This kit uses an indirect determination method. It is based on the oxidation of glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG) catalyzed by GPx, which is then coupled to the recycling of GSSG back to GSH utilizing glutathione reductase (GR) and NADPH (β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, Reduced).

The decrease in NADPH absorbance measured at 340 nm during the oxidation of NADPH to NADP^+ is indicative of GPx activity, since GPx is the rate limiting factor of the coupled reactions.^{1,6}



GPx is glutathione peroxidase, GR is glutathione reductase, and R-OOH is an organic peroxide.

The reaction is performed at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ and pH 8.0,¹⁰ and is started by adding an organic peroxide, *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-Bu-OOH).¹¹ This substrate is suitable for the assay since its spontaneous reaction with GSH is low and it is not metabolized by catalase. The reaction with *tert*-butyl hydroperoxide measures the amount of selenium-containing glutathione peroxidase activity present.

If the presence of non-Se enzymes is suspected, cumene hydroperoxide can be used as the substrate at a concentration of 0.25–1.0 mM.^{4,5} This will measure the total GPx (Se and non-Se enzymes) activity. The difference between the activity observed with cumene hydroperoxide and the *tert*-butyl hydroperoxide activity is the non-Se glutathione peroxidase activity.

Reagents provided

Sufficient for 100 tests

- Glutathione Peroxidase Assay Buffer, 120 ml
Catalog Number G8664
50 mM Tris HCl, pH 8.0,
containing 0.5 mM EDTA
- NADPH Assay Reagent, 5 vials
Catalog Number N5283
When reconstituted with 1.25 ml of water,
each vial will prepare a solution containing
5 mM NADPH, 42 mM reduced glutathione,
and 10 units/ml of glutathione reductase
- Luperox[®] TBH70X 1 ml
Catalog Number 458139
70% aqueous solution of *tert*-Butyl Hydroperoxide

Reagents and equipment required but not provided

- UV/Vis spectrophotometer with thermostated cuvette holder and a kinetic program
- Quartz cuvette
- Cumene hydroperoxide, Catalog Number 513296, if total GPx level is to be measured.
- Glutathione peroxidase, Catalog Number G6137, for use as control enzyme
- Human immunoglobulin G, Catalog Number I4506, and dithiothreitol, Catalog Number D0632, for use with the control enzyme glutathione peroxidase

Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Storage/Stability

Store the kit at -20 °C. If daily use of the kit is needed, the assay buffer and *tert*-butyl hydroperoxide may be stored for convenience at 2-8 °C. The components in this kit are stable for 24 months when unopened.

Preparation Instructions

Glutathione Peroxidase Assay Buffer – Bring a suitable aliquot to room temperature. For long term stability of the solution after opening, handle the solution in an aseptic manner.

NADPH Assay Reagent – Reconstitute 1 vial in 1.25 ml of water. Store the solution at 2-8 °C. This reconstituted solution should be used within 3 hours. Each vial is sufficient for at least 20 tests. Do not freeze the solution for reuse.

30 mM *tert*-Butyl Hydroperoxide Solution – Dilute 21.5 µl of Luperox TBH70X, Catalog Number 458139, to a total volume of 5 ml with water to prepare a 30 mM *tert*-Butyl Hydroperoxide solution.

Glutathione Peroxidase Positive Control (not supplied)

The Glutathione Peroxidase Positive Control is used qualitatively to assure the reaction is working. The Glutathione Peroxidase Assay Kit can determine enzyme activity from different biological sources.

Positive control using Catalog Number G6137:

- Dissolve a 100 unit vial of glutathione peroxidase, Catalog Number G6137, in 1 ml of Glutathione Peroxidase Assay Buffer.
- The 100 units/ml solution is diluted 400-fold to a Working Stock Solution of 0.25 units/ml. The dilution to 0.25 unit/ml is made with Glutathione Peroxidase Assay Buffer supplemented with 1 mg/ml IgG, Catalog Number I4506 or equivalent, and 1 mM DTT, Catalog Number D0632 or equivalent.
- Use 20-50 ml of the Working Stock Solution in the reaction to obtain values within the linear range of 0.005-0.02 units per reaction volume of 1 ml. This is equivalent to an absorbance decrease of 0.032-0.13 per minute.

Note: The IgG is required for stabilization of the enzyme. It is only required in cases of very pure and dilute enzyme solutions.

Positive control using red blood cells:

- Obtain 10 ml of red blood cells, wash twice with 10 ml PBS, centrifuge 3,000 × *g* for 5 minutes at 4 °C. Discard supernatant.
- Resuspend the pellet with 15 ml of a solution containing 1 mM DTT and 5 mM EDTA in ultrapure water.
- Mix gently for 20 minutes at 4 °C.
- Ultracentrifuge the suspended blood at 35,000 rpm for 80 minutes at 4 °C.

As described in the "Sample preparation" section, perform several dilutions of the supernatant for use in the reaction in order to obtain results within the linear range where the absorbance decreases between 0.032 and 0.13 OD per minute

Sample preparation – Dilute crude biological samples in Glutathione Peroxidase Assay Buffer.

Notes:

- Perform several dilutions of the sample for use in the reaction in order to obtain results within the linear range.
- The final concentration of the reagents in the assay mixture is 0.25 mM NADPH, 2.1 mM reduced glutathione, 0.5 unit/ml glutathione reductase, and 300 μ M *t*-Bu-OOH.

Procedure

Tissue extracts may contain enzymes that utilize NADPH and skew the results. A blank without *t*-Bu-OOH can be used as a control for these endogenous activities. When liver samples are analyzed, H₂O₂ should be used to start the reaction (0.15–0.30 mM solution) since *t*-Bu-OOH is also a substrate for glutathione S-transferase. In this case, catalase must be blocked by addition of 1 mM NaN₃ in the reaction mixture.¹² In addition, when using H₂O₂ instead of *t*-Bu-OOH, the pH of the Glutathione Peroxidase Assay Buffer should be adjusted to pH 7.0 with HCl. At a pH greater than 7.0 there will be a spontaneous reaction of hydrogen peroxide with reduced glutathione.

High concentrations of reducing agents such as DTT or 2-mercaptoethanol (>0.1 mM final concentration in the assay system) will depress the measured activity by ~40% at 0.15 mM and up to 70% at 1 mM concentration in the assay. EDTA at 5 mM in the assay will depress the activity by ~50%.

Nonionic detergents such as TWEEN® 20 and Triton™ X-100 that contain high levels of endogenous peroxides will raise the apparent activity. If these detergents are vital to the extraction of the proteins of interest, a low peroxide detergent should be used, such as Catalog Numbers X100PC (Triton X-100), P6585 (TWEEN 20), or P8192 (TWEEN 80).

1. Pipette the volume of Glutathione Peroxidase Assay Buffer indicated in Table 1 into a 1 ml quartz cuvette. Keep the temperature of the assay buffer in the spectrophotometer at 25 °C by using a thermostated cell holder.

Table 1.
Glutathione Peroxidase Reaction Scheme

	GPx Assay Buffer (μ l)	NADPH Assay Reagent (μ l)	Enzyme (0.25 units/ml) (μ l)	Sample (μ l)	30 mM <i>t</i> -Bu-OOH (μ l)
Blank	940	50	–	–	10
Positive control	890–920	50	20–50	–	10
Sample	890–930	50	–	10–50	10

2. Add 50 μ l of the NADPH Assay Reagent and 10–50 μ l of sample or 20–50 μ l of enzyme to the cuvette and mix by inversion. The total volume in the cuvette should be 1.00 ml.
3. Start the reaction by addition of 10 μ l of the 30 mM *tert*-Butyl Hydroperoxide Solution. Mix by inversion.
4. Follow the decrease in absorbance at 340 nm using a kinetic program. The following program is recommended:
Wavelength: 340 nm
Initial delay: 15 seconds
Interval: 10 seconds
Number of readings: 6
5. Calculate the amount of enzyme in the sample.

Calculation

The spectrophotometer should give the A_{340}/min from the reaction automatically. If the absorbance is measured manually, calculate this value for the blank, positive controls, and all samples.

The activity of Glutathione Peroxidase in the sample can be calculated using the formula:

$$\text{Activity per extract (mmol/min/ml) = Units/ml}$$

$$\frac{\Delta A_{340} \times DF}{6.22 \times V}$$

$$\Delta A_{340} = A_{340}/\text{min}_{(\text{blank})} - A_{340}/\text{min}_{(\text{sample})}$$

$$6.22 = \epsilon^{mM} \text{ for NADPH}$$

DF = dilution factor of sample before adding to reaction

V = sample volume in ml

Unit definition: 1 unit of glutathione peroxidase will cause the formation of 1.0 μ mol of NADP⁺ from NADPH per minute at pH 8.0 at 25 °C in a coupled reaction in the presence of reduced glutathione, glutathione reductase, and *tert*-butyl hydroperoxide.

References

1. Mannervik, B., *Methods in Enzymol.*, **113**, 490-495 (1985).
 2. Ursini, F. *et al.*, *Methods in Enzymol.*, **252**, 38-52 (1995).
 3. Wendel, A., in "Enzymatic Basis of Detoxification" Vol. 1, Academic Press (New York, NY: 1980) pp. 333-353.
 4. Thomson, C.D., *Biochem. Int.*, **10**, 673-679 (1985).
 5. Carmagnol, F. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **759**, 49-57 (1983).
 6. Gupta, B.L., and Baquer, N.Z., *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **46**, 1145-1152 (1998).
 7. Mavelli, I. *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **139**, 13-18 (1984).
 8. Arruda, V.R. *et al.*, *Neoplasma*, **43**, 99-102 (1996).
 9. Paglia, D.E., and Valentine, W.N., *J. Lab. And Clin. Med.*, **70**, 158-169 (1967).
 10. Beutler, E. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, **35**, 331-340 (1977).
 11. Thomson, C.D. *et al.*, *Br. J. Nutr.*, **37**, 457-460 (1977).
 12. Flohe, L., and Gunzler, W.W., *Methods in Enzymol.*, **105**, 114 -121 (1984).
- Triton is a trademark of The Dow Chemical Company or an affiliated company of Dow.
TWEEN is a registered trademark of Croda International PLC.
Luperox is a registered trademark of Arkema Inc.

DS,EM,ESS,NDH,PHC,MAM 11/17-2