



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

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD ANTIDEPRESIVA Y
ANSIOLÍTICA DE LECHE FERMENTADAS CON BACTERIAS
ÁCIDO LÁCTICAS ESPECÍFICAS EN UN MODELO MURINO**

Por:

QBC. Arantxa Almada Corral

TESIS APROBADA POR LA:

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

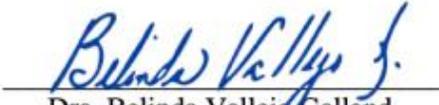
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Arantxa Almada Corral, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



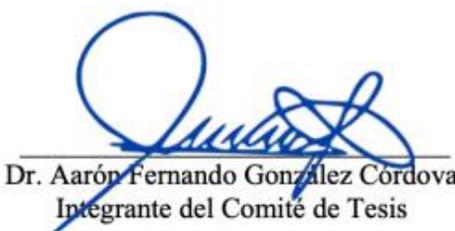
Dr. Adrián Hernández Mendoza
Director de Tesis



Dra. Lourdes Santiago López
Integrante del Comité de Tesis



Dra. Belinda Vallejo Galland
Integrante del Comité de Tesis



Dr. Aarón Fernando González Córdova
Integrante del Comité de Tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Evaluación de la Funcionalidad Antidepresiva y Ansiolítica de Leches Fermentadas con Bacterias Ácido Lácticas Específicas en un Modelo Murino” 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 de la autora Arantxa Almada Corral, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección 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 director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para poder realizar mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por darme la oportunidad de formar parte de su institución y de poder desarrollarme profesionalmente. Gracias por brindarme sus instalaciones y equipos para poder concluir mi tesis de maestría.

Gracias a Dios, por nunca soltarme de su mano y permitirme siempre, cumplir mis sueños y metas. Gracias por darme fuerza en los momentos más difíciles y no dejarme caer.

Gracias a mi director de tesis, Dr. Adrián Hernández Mendoza, por apoyarme y brindarme siempre de su tiempo y conocimiento para realizar este proyecto. Gracias por confiar en mí para realizar este proyecto y por ser un asesor muy cumplido y eficiente en todo momento.

Agradezco a los miembros de mi comité de tesis, Dra. Lourdes Santiago, Dr. Aarón F. González Córdova y Dra. Belinda Vallejo Galland, por su disposición brindada en este proyecto, gracias por sus valiosas sugerencias y aportaciones, siempre con el fin de mi crecimiento personal y profesional.

Gracias especialmente a la Dra. Lourdes Santiago, por apoyarme durante estos dos años, gracias por su paciencia y por su valioso tiempo que le dedicó a este proyecto, gracias por resolver todas las dudas que me surgían y no dejarme sola en ningún momento. Sin usted, no habría podido sacar adelante ésta tesis, es un gran ejemplo de responsabilidad y dedicación para mí.

Agradezco a la Dra. Lilia Beltrán, a la Dra. María de Jesús Torres, M.C. Ricardo Reyes y M.C. Carmen Estrada por el apoyo técnico para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Cecilia Castro, Ariana Domínguez, Miriam Zambrano, Carmen

Manzanares, Miguel Álvarez, Miguel Rendón, Isidro Méndez, Fernando Lizárraga, Miguel Pérez, Oscar Espejel, Rodrigo Sigala, Nohemí y Cinthya Utrera. Gracias por tan buenos momentos.

Especialmente quiero agradecer a mis amigos que me ayudaron en este proyecto. Gracias Adelmo Rosas por todo el conocimiento que me brindaste en el tiempo que nos tocó convivir juntos. Gracias Mónica García, Juquila Chávez, Maritza Salomón, Alejandra López, Jesús Ayala, Juan Pablo Durazo, por su amistad y apoyo durante mi proyecto. Gracias a mi compañero de maestría y laboratorio, Wilver Vargas, sin ti la maestría no hubiera sido tan divertida.

Gracias a mis compañeras de generación virtuales, Marissa Flores y Daniela Pérez, que se hicieron mis grandes amigas a pesar de la distancia.

Gracias a mis amigas de toda la vida Tania Véjar, Maritza Cordero, Melissa Uzeta, Aneth Salido y Zaira Salazar por su apoyo y motivación durante todos estos meses. Gracias a mi amigo Ángel Aguilar por escucharme siempre y darme ánimos cuando más lo necesito.

Gracias a mi novio Héctor Cuellar, por ser de las personas que más cree en mí, a veces incluso más que yo. Gracias por escucharme, aconsejarme y apoyarme aún en los momentos más difíciles. Eternamente agradecida contigo por tu paciencia y tu amor, cada vez más cerca de cumplir nuestros sueños.

DEDICATORIA

A mis padres, **Héctor I. Almada Vílchez y Patricia A. Corral Leñero**, por su apoyo incondicional durante toda mi vida escolar, pero sobre todo durante estos dos años de maestría. Gracias por ser mi mayor ejemplo de responsabilidad, entrega y constancia. Espero algún día poder devolverles todo lo que han hecho por mí, son mi mayor motivación para superarme personal y profesionalmente. Los quiero demasiado.

A mis hermanos, **Héctor I. Almada Corral y Arely Almada Corral**, por estar para mí siempre que los necesito. A mi sobrinito **Andrés Almada**, por ser la alegría del hogar desde que nació.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE CUADROS	12
RESUMEN	13
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCIÓN	17
2. ANTECEDENTES	19
2.1. Trastornos Mentales más Comunes: Ansiedad y Depresión.....	19
2.2. Estadísticas e Impacto de la Depresión y Ansiedad a Nivel Mundial.....	20
2.3. Aumento de Cuadros Depresivos y de Ansiedad por la Contingencia de la COVID-19.....	20
2.4. Tratamientos Actuales Utilizados para la Depresión y Ansiedad.....	22
2.5. Mecanismos de los Trastornos Mentales en un Enfoque Neurológico.....	22
2.6. Microbiota Intestinal y su Vinculación con la Salud Mental.....	26
2.7. Bacterias Ácido Lácticas y su Papel en la Comunicación Eje Intestino-Cerebro.....	27
2.8. Modelos Establecidos para el Estudio de Trastorno Mentales.....	30
2.9. Propiedades Psicobióticas de Bacterias Probióticas.....	32
2.9.1. Propiedades Antioxidantes y Antiinflamatorias de Bacterias Probióticas y su Relación con Depresión y Ansiedad.....	34
2.9.2. Multicultivos Psicobióticos Involucrados en Procesos Antiinflamatorios y Antidepresivos.....	35
2.9.3. Metabolitos y Neurotransmisores Involucrados en la Modulación de Comportamiento Asociado a la Administración de Probióticos.....	36
2.10. Alimentos Fermentadas en la Modulación de Ansiedad y Depresión en Modelos Murino.....	37
3. HIPÓTESIS	40
4. OBJETIVOS	41
4.1. Objetivo General.....	41
4.2. Objetivos Específicos.....	41
5. MATERIALES Y MÉTODOS	42
5.1. Reactivos y Materiales.....	42
5.2. Cultivos Bacterianos.....	42
5.3. Preparación de leche(s) Fermentada(s) con Monocultivos o Multicultivo.....	43

CONTENIDO (Continuación)

5.4. Evaluación de la Actividad Antioxidante y Antiinflamatoria <i>in vitro</i> de la(s) Leche(s) Fermentada(s).....	43
5.4.1. Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS.....	44
5.4.2. Determinación de la actividad antioxidante por el método ORAC.....	44
5.4.3. Determinación de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	45
5.4.3.1. Inhibición de actividad de tripsina.....	46
5.4.3.2. Actividad de Lipoxigenasa.....	46
5.5. Determinación de la actividad proteolítica de bacterias ácido lácticas en leches fermentadas.....	46
5.6. Estudio <i>in vivo</i> para Determinar la Potencial Capacidad Antidepresiva y Ansiolítica de la(s) Leche(s) Fermentada(s) Seleccionada(s).....	47
5.6.1. Animales de Estudio y Grupos Experimentales.....	47
5.6.2. Pruebas no condicionadas de comportamiento depresivo y de ansiedad.....	51
5.6.2.1. Ensayo para determinar el efecto ansiolítico.....	51
5.6.2.2. Ensayos para determinar el efecto antidepresivo.....	53
5.6.3. Determinación de parámetros antioxidantes y biomarcadores de inflamación.....	55
5.6.3.1. Actividad antioxidante total y peroxidación lipídica.....	55
5.6.3.2. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes e índice de estrés oxidativo.....	56
5.6.3.3. Determinación de Proteína.....	56
5.6.3.4. Determinación de biomarcadores de inflamación.....	57
5.7. Análisis Estadístico.....	57
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
6.1. Determinación de Características Tecnológicas: pH, Acidez y Cuenta Viable.....	58
6.2. Actividad Antioxidante de Leches Fermentadas.....	61
6.3. Actividad Antiinflamatoria de Leches Fermentadas.....	63
6.4. Propiedades Tecnológicas de Leches Fermentadas en Monocultivo y Multicultivo.....	65
6.5. Actividad Antioxidante de Leches Fermentadas en Monocultivo y Multicultivo.....	66
6.6. Actividad Antiinflamatoria de Leches Fermentadas en Monocultivo y Multicultivo.....	67
6.7. Actividad Proteolítica de BAL en Leches Fermentadas.....	68
6.8. Resultados de los Ensayos No Condicionados de Comportamiento.....	70
6.8.1. Efecto Ansiolítico en Ratones.....	70
6.8.2. Pruebas de comportamiento depresivo en ratones.....	73
6.9. Actividad Antioxidante.....	74
6.10. Actividad de Enzimas Antioxidantes.....	76
6.11. Cuantificación del Índice de Estrés Oxidativo.....	77
6.12. Cuantificación de Biomarcadores Inflamatorios.....	78
6.12.1. Actividad de Lipoxigenasa en muestras de hipocampo.....	80
6.13. Análisis de Correlación.....	82
7. CONCLUSIONES.....	84
8. RECOMENDACIONES.....	85

CONTENIDO (Continuación)

9. BIBLIOGRAFÍA.....	86
10. ANEXOS.....	98
10.1. Curva Estándar de Trolox para Determinación de Actividad Antioxidante Empleando el Método del Radical ABTS.....	98
10.2. Curva Estándar de Trolox para Determinación de la Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno.....	99
10.3. Carta de Aprobación de Protocolo Experimental por Parte del Comité de Ética.....	100
10.4. Curva Estándar de Determinación de Proteína Empleando el Método de Lowry.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Incremento de casos de ansiedad y depresión asociados a pandemia de COVID-19.....	22
2 Mecanismos de ansiedad y depresión desde un enfoque neurológico.....	26
3 Vías y estructuras involucradas en la comunicación bidireccional entre la microbiota intestinal y el cerebro.....	29
4 Componentes funcionales de los alimentos fermentados y los mecanismos biológicos que influyen en la depresión y ansiedad.....	32
5 Representación gráfica de la batería de pruebas de comportamiento para ansiedad y depresión.....	39
6 Procedimiento de estrés.....	49
7 Procedimiento experimental.....	50
8 Ensayo de campo abierto.....	52
9 Ensayo de laberinto elevado en cruz.....	52
10 Ensayo de luz-oscuridad.....	53
11 Prueba de suspensión de cola.....	54
12 Prueba de natación forzada.....	54
13 Prueba de preferencia a la sacarosa.....	55
14 Valores de pH y Producción de ácido láctico en leche(s) fermentada(s) por las diferentes bacterias lácticas en fase de crecimiento exponencial (Exp) y estacionaria (Est).....	60
15 Incremento de viabilidad (Log N/No) de las diferentes bacterias lácticas en fase de crecimiento exponencial (Exp) y estacionaria (Est) en las leches fermentadas.....	61
16 Actividad antioxidante por el método ABTS de leches fermentadas.....	62
17 Actividad antioxidante por el método ORAC de leches fermentadas.....	63
18 Porcentajes de inhibición para la actividad de tripsina y lipoxigenasa de leches fermentadas.....	64
19 Valores de pH, producción de ácido láctico en leche(s) fermentada(s) en monocultivo (Lp39) y multicultivo (Lp22, Lp24 y Lp39).....	66
20 Incremento en la concentración celular (Log N/No) en leches fermentadas en monocultivo (Lp39) y multicultivo (Lp22, Lp24 y Lp39).....	66
21 Actividad antioxidante por el método ABTS y ORAC en leches fermentadas en monocultivo (Lp39) y multicultivo (Lp22, Lp24 y Lp39).....	67

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura	Página
22 Porcentajes de inhibición de tripsina y lipoxigenasa en leches fermentadas en monocultivo (Lp39) y multicultivo (Lp22, Lp24 y Lp39).....	68
23 Actividad proteolítica de bacterias ácido lácticas, en mono cultivo, en leches fermentadas y multicultivo (Lp22, Lp24 y Lp39).....	69
24 Efecto de los tratamientos sobre el comportamiento similar a la ansiedad en las pruebas EPM, LO y OFT.....	71
25 Efecto de los tratamientos sobre el comportamiento similar a la depresión en las pruebas TST, FST y PS.....	74
26 Actividad antioxidante por los métodos ABTS y ORAC.....	75
27 Determinación de índice de estrés oxidativo.....	78
28 Efecto de la administración de los tratamientos sobre la concentración de citocinas inflamatorias en muestras de suero de ratones previamente estresados.....	80
29 Determinación de IFN y % de Inhibición de Lipoxigenasa en muestras de hipocampo.....	81
30 Análisis de correlación entre parámetros antioxidantes y antiinflamatorios con pruebas de comportamiento.....	83

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Comparación de estudios con cepas potencialmente psicobióticas y sus variables evaluadas.....	37
2 Correlación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria con la actividad proteolítica de las bacterias ácido lácticas en leche(s) fermentada(s).....	70
3 Actividad de enzimas antioxidantes (U/g P) en muestras de hígado e hipocampo.....	77
4 Peso promedio muestras de hipocampo por grupo.....	81

RESUMEN

La ansiedad y depresión son trastornos mentales que afectan la calidad de vida de las personas, así como su capacidad y productividad laboral-escolar. Estos trastornos son multifactoriales y conllevan a una respuesta inflamatoria y estrés oxidativo. Por ello, existe gran interés por el uso de productos fermentados funcionales, ya que han demostrado reducir la inflamación y el daño oxidativo asociado a estos trastornos. Por ende, el objetivo del presente estudio fue evaluar la potencial actividad antidepresiva y ansiolítica, en un modelo murino, asociado a la administración de leches fermentadas preparadas con BAL específicas en mono o multicultivo. Para ello, primero se fermentaron leches con seis cepas de *Lactobacillus* en monocultivo, en fase de crecimiento exponencial o estacionaria, durante 24 y 48h. Las leches fermentadas (LF) durante 24h con monocultivos (fase estacionaria), de *L. plantarum* Lp22, Lp24 y Lp39 mostraron los mejores ($p<0.05$) resultados en términos de acidez, pH, proteólisis y concentración celular, en particular la cepa Lp39. Estas tres cepas en multicultivo, se contrastaron contra la LF con Lp39. Aunque la LF con el multicultivo presentó mejores características tecnológicas la LF con Lp39 exhibió mayor ($p<0.05$) actividad antioxidante (ORAC). Considerando estos hallazgos, la LF con este monocultivo se utilizó para evaluar su potencial efecto antidepresivo y ansiolítico mediante pruebas no condicionadas de comportamiento (suspensión en cola, natación forzada, preferencia a sacarosa, laberinto elevado, luz-oscuridad y campo abierto) en un modelo murino. Los ratones de estudio se repartieron en cuatro grupos, estresados (RE), estresados administrados con LF (LF), estresados administrados con ansiolítico (RAns) y estresados administrados con antidepresivo (RAnt). Los resultados de las pruebas de comportamiento mostraron que la administración de LF originó un efecto ansiolítico y antidepresivo, igual o mayor al originado por los fármacos empleados. Dichos efectos se reflejaron en los biomarcadores antioxidantes/antiinflamatorios evaluados en muestras de hígado e hipocampo. Se registró un menor índice de estrés oxidativo (OSi) ($P<0.05$), actividad de enzimas antioxidantes (glutación reductasa, catalasa) y peroxidación lipídica ($P<0.05$) en las muestras del grupo tratado con LF. Por otra parte, se observó mayor inhibición de lipoxigenasa y regulación ($P<0.05$) de citocinas inflamatorias, destacando el incremento de IL-10 y disminución de IL-6. Finalmente, algunos biomarcadores antioxidantes (OSi) y antiinflamatorios (IL-10, TNF) se

correlacionaron positivamente con pruebas de comportamiento. Por consiguiente, los hallazgos obtenidos sugieren que la administración de LF con Lp39 podría ayudar a mejorar la función antiinflamatoria/antioxidante del organismo, coadyuvando en el manejo de estos trastornos mentales.

Palabras Clave: *Leche fermentada, Depresión, Ansiedad, Antioxidante, Antiinflamatorio*

ABSTRACT

Anxiety and depression are mental disorders that affect people's quality of life, as well as their ability and productivity at work or school. These disorders are multifactorial and lead to an inflammatory response and oxidative stress. Therefore, there is great interest in the use of functional fermented products, as they have been shown to reduce inflammation and oxidative damage associated with these disorders. Therefore, the objective of this study was to evaluate the potential antidepressant and anxiolytic activity, in a murine model, associated with the administration of fermented milks prepared with specific LAB in mono or multiculture. To do this, milk was first fermented with six strains of *Lactobacillus* in monoculture, in the exponential or stationary growth phase, for 24 and 48 hours. Fermented milk (LF) for 24h with monocultures, in stationary phase, of *L. plantarum* Lp22, Lp24 and Lp39 showed the best ($p < 0.05$) results in terms of acidity, pH, proteolysis and cell concentration, in particular the Lp39 strain. These three strains fermented in multiculture, contrasting it against LF with Lp39. Although LF with multiculture presented better technological characteristics, LF with Lp39 exhibited higher ($p < 0.05$) antioxidant activity (ORAC). Considering these findings, LF with this monoculture was used to evaluate its potential antidepressant and anxiolytic effect through unconditioned behavioral tests (tail suspension, forced swimming, sucrose preference, elevated maze, light-dark, and open field) in a murine model. The study mice were divided into four groups, stressed (RE), stressed administered with LF (LF), stressed administered with anxiolytic (RAn) and stressed administered with antidepressant (RAnt). The results of the behavioral tests showed that the administration of LF caused an anxiolytic and antidepressant effect, equal to or greater than that caused by the drugs used. These effects were reflected in the antioxidant/anti-inflammatory biomarkers evaluated in liver and hippocampus samples. A lower oxidative stress index (OSi) ($P < 0.05$), antioxidant enzyme activity (glutathione reductase, catalase) and lipid peroxidation ($P < 0.05$) were recorded in the samples from the group treated with LF. On the other hand, a greater inhibition of lipoygenase and regulation ($P < 0.05$) of inflammatory cytokines in plasma were observed, highlighting the increase in IL-10 and the decrease in IL-6. Finally, some antioxidant (OSi) and anti-inflammatory (IL-10, TNF) biomarkers were positively correlated with behavioral tests. Therefore, the findings obtained suggest that the administration of LF with Lp39 could help improve the anti-

inflammatory/antioxidant function of the organism and help in the management of these mental disorders.

Keywords: *Fermented milk, Depression, Anxiety, Antioxidant, Anti-inflammatory*

1. INTRODUCCIÓN

Durante la vida cotidiana, los humanos están expuestos a diversos factores estresantes que podrían impactar negativamente su salud mental, dichos factores pueden conducir al desarrollo de ansiedad o trastornos depresivos (Tyagi *et al.*, 2020). Estos problemas mentales no solo afectan la calidad de vida de las personas (Zhou *et al.*, 2017), sino que también afectan su capacidad y productividad laboral o escolar, por lo que es preocupante que en los últimos años vayan en aumento. De hecho, tan sólo en el 2017, la Organización Mundial de la Salud había reportado que la ansiedad y depresión afectó a nivel mundial alrededor de 260 y 300 millones de personas, respectivamente (OMS, 2017). Sin embargo, se ha previsto que se convertirá en un problema mayor en los próximos 20 años. Además, los trastornos depresivos y de ansiedad se han asociado como una de las principales causas de suicidios en jóvenes, ya que cerca de ochenta mil personas, entre 15 y 29 años, mueren cada año por esta causa (OMS, 2019). Adicionalmente, el confinamiento causado por la pandemia de COVID-19 ha provocado una crisis de salud mental a nivel mundial, ya que de acuerdo a la OMS se ha registrado un aumento de casos de trastorno depresivo (27.6%) y de casos de trastornos de ansiedad (25.6%) durante la pandemia (Cénat *et al.*, 2021; OMS, 2022). De forma generalizada, profesionales de la salud abogan que los desórdenes mentales presentan una etiología multifactorial con implicaciones sistémicas, por lo que se requiere un tratamiento integral. En este sentido, se ha evidenciado que la inflamación y el estrés oxidativo tienen influencia en la ansiedad y la depresión, por lo que la actividad ansiolítica y antidepresiva pueden ser mediadas a través de la mejora de la función antiinflamatoria/antioxidante (Jiménez-Fernández *et al.*, 2015; Torre-Luque *et al.*, 2019). Aunque se han explorado diferentes tratamientos farmacológicos no todos son efectivos, debido a que un porcentaje significativo de personas puede no responder a un antidepresivo prescrito, puede presentar resistencia o abandonarlo por efectos secundarios como náuseas y vómitos, así como presentar trastornos del sueño o aumento de peso (Kolar, 2018; Luna *et al.*, 2001). Es por ello que se ha incrementado el interés por tratamientos alternativos, incluyendo aquellos basados en los alimentos. Existe evidencia creciente que el uso de probióticos podría tener un efecto positivo en el manejo de estos desórdenes (Chao *et al.*, 2020). En este sentido, se ha documentado que algunas cepas específicas, denominadas psicobióticos, logran influir en el funcionamiento del sistema nervioso central, provocando cambios en el

comportamiento y capacidades cognitivas en animales y humanos (Yunes *et al.*, 2020).

La información disponible hasta el momento, sugiere que los probióticos podrían considerarse como una alternativa coadyuvante prometedora para reducir la activación inflamatoria asociada a estos desórdenes y su relación con el sistema nervioso central. Cabe señalar que, aunque se ha documentado ampliamente que el efecto de los probióticos es cepa dependiente, existen algunos criterios que no han sido considerados en los estudios, como el efecto sobre el intestino permeable, la exposición a condiciones de estrés y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Park *et al.*, 2018). Sin embargo, algunos estudios realizados en modelos animales han demostrado resultados prometedores. Por ejemplo, Desbonnet y col. (2008) evaluaron, en un modelo murino, las posibles propiedades antidepresivas asociadas a la cepa *Bifidobacteria infantis* 35624. Los resultados obtenidos evidenciaron una atenuación significativa de citocinas proinflamatorias (IFN γ , TNF α , y IL-6), así como un incremento de los niveles de triptófano y ácido quinurénico. Estos hallazgos proporcionaron evidencia alentadora que plantea que dicho probiótico puede inducir cambios benéficos en la comunicación intestino-cerebro.

Por otra parte, Ramalho y col., (2019), evaluaron las características probióticas, la actividad antioxidante y el efecto antidepresivo-ansiolítico de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LL95 en un modelo murino. Los autores demostraron que esta cepa tiene la capacidad de eliminar radicales libres, además de mejorar el comportamiento antidepresivo y ansiolítico, y mejorar el estatus antioxidante en hipocampo, sugiriendo que esta cepa podría tener potencial terapéutico contra condiciones neurodegenerativas mediadas por daño oxidativo. A pesar de estos resultados, es importante recordar que los efectos biológicos de los probióticos son específicos de la cepa, y que el éxito de una no puede extrapolarse a otra. De hecho, no se ha documentado si las leches fermentadas con bacterias potencialmente probióticas pueden presentar efecto ansiolítico y antidepresivo. Pero sí se ha reportado que estos productos, y las bacterias *per se*, pueden presentar propiedades antioxidantes y/o antiinflamatorias, lo cual sugiere que podrían conferir protección contra la depresión y ansiedad (Selhub *et al.*, 2014). Sin embargo, aún hacen falta estudios que permitan comprobar esta hipótesis. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo es evaluar la potencial actividad antidepresiva y ansiolítica, en un modelo murino, asociado a la administración de leches fermentadas preparadas con bacterias ácido lácticas específicas en mono o multicultivo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Trastornos Mentales más Comunes: Ansiedad y Depresión

Las enfermedades mentales se han vuelto un problema importante de salud pública, ya que no solo afectan su capacidad y productividad laboral o escolar, sino también su bienestar y sus relaciones personales. Actualmente, la depresión y ansiedad son los trastornos mentales más comunes en la salud humana (Chao *et al.*, 2020). La depresión es un trastorno neurológico heterogéneo con un curso muy variable, se caracteriza por la presencia de tristeza (la cual dura tiempo prolongado e interfiere con actividades normales), pérdida de interés, sentimientos de culpa o falta de autoestima, trastornos del sueño o del apetito, sensación de cansancio, falta de concentración e incluso impulsos para autolesionarse (CDC, 2020; OMS, 2019; Ramalho *et al.*, 2019). Por lo general, la depresión puede ser tratada sin necesidad de medicamentos, pero puede llegar a ser un trastorno crónico y persistente que puede dificultar el desempeño en el trabajo o la escuela y la capacidad para afrontar la vida diaria, en su forma más grave, puede conducir al suicidio. En cualquiera de estos dos casos se necesitan medicamentos y psicoterapia profesional (OMS, 2017).

Los trastornos de ansiedad con frecuencia se relacionan con la depresión, ya que la ansiedad es un estado emocional en el que las personas enfrentan sentimientos intensos e incontrolables de pánico, tensión, preocupación, miedo y cambios físicos como palpitaciones, temblores, trastornos del tracto gastrointestinal, respiratorios y circulatorios. Estos sentimientos pueden interferir con las actividades diarias y durar por periodos prolongados de tiempo, incluso la ansiedad crónica se asocia con efectos negativos para la salud, como un mayor riesgo de enfermedad coronaria y trastornos del sueño (CDC, 2020; Chao *et al.*, 2020). Además, la comorbilidad de los trastornos depresivos y de ansiedad es muy común, los individuos afectados por ambos trastornos han mostrado una calidad de vida reducida (Ramalho *et al.*, 2019). Es por ello, que las enfermedades mentales se han considerado como problema de salud pública.

2.2. Estadísticas e Impacto de la Depresión y Ansiedad a Nivel Mundial

Los trastornos por depresión y ansiedad afectan a más de 300 y 260 millones de personas en el mundo, respectivamente (OMS, 2017). Además, la comorbilidad de ambos trastornos es común y las personas afectadas presentan una menor calidad de vida (Zhou *et al.*, 2017). En el caso de la depresión, se ha observado que puede estar presente en todos los grupos de edad (incluidos bebés); y que una de cada cuatro personas experimentará esta enfermedad en alguna etapa de la vida (Tyagi *et al.*, 2020). Además, se ha considerado a la depresión como el principal contribuyente a la carga global de discapacidad, e incluso la OMS pronostica que se convertirá en el mayor trastorno mental en los próximos 20 años (OMS, 2017). Por otra parte, datos recientes evidencian que una de cada nueve personas en todo el mundo sufrió este padecimiento en el año 2020, y debido a su alta prevalencia y características debilitantes, los trastornos de ansiedad ocupan el sexto lugar entre todas las enfermedades en la población mundial (Chao *et al.*, 2020).

Las consecuencias más preocupantes de estos trastornos están relacionadas con la pérdida de vidas, ya que se sabe que son una de las principales causas de suicidios, cerca de 80 000 personas cada año se quitan la vida, específicamente entre 15 y 29 años de edad (OMS, 2019). Además de la afectación a la salud física, la vida social y laboral que esto conlleva, la depresión y ansiedad también representan una carga económica importante, se ha visto que cuestan a la economía mundial \$1 billón al año (OMS, 2016). De 2005 a 2010, la carga económica de las personas con trastornos depresivos mayores en adultos aumentó de \$173,2 mil millones a \$210,5 mil millones, por lo que es evidente que al ser un trastorno complejo impacta en la sociedad y se requiere implementar medidas efectivas (Capuco *et al.*, 2020; OMS, 2016).

2.3. Aumento de Cuadros Depresivos y de Ansiedad por la Contingencia de la COVID-19

En el año 2020 ocurrió un factor estresante generalizado ocasionado por un evento sin precedentes, un nuevo coronavirus denominado Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS)-CoV-2 que comenzó a afectar a miles de personas en varios países del mundo. A medida que la pandemia

avanzó, fue reconocida como la COVID-19 y se observaron, además de los síntomas comunes de la infección, implicaciones psiquiátricas en la población. Estudios previos han demostrado que los brotes de enfermedades infecciosas están asociados con síntomas y trastornos de salud mental (depresión, ansiedad, insomnio, etc.) en sobrevivientes, familiares y trabajadores (Cénat *et al.*, 2020). En el caso específico de la pandemia generada por la COVID-19, las principales causas que dieron paso a los trastornos de depresión y ansiedad fueron las medidas de distanciamiento físico, el aislamiento social, el miedo a la infección, el estrés en trabajadores de la salud y otros trabajos esenciales, así como el desempleo, las dificultades económicas que la mayor parte de la población comenzó a padecer y el dolor después del duelo por perder a algún ser querido (ONU, 2022; Rogers *et al.*, 2020).

Una revisión sistemática sobre diferentes coronavirus mostró que del 14 al 61% de las personas infectadas enfrentan problemas psiquiátricos y neuropsiquiátricos graves durante la enfermedad como depresión, deterioro de la memoria, insomnio y ansiedad (Rogers y col., 2020). Mientras que otro estudio específico sobre COVID-19 en países asiáticos, evidenció una prevalencia de 23.20% para la ansiedad, 22.8% para la depresión y 34.32% para el insomnio (Cénat *et al.*, 2021). De igual forma, en México, los monitoreos realizados por la Encovid-19 revelaron un aumento preocupante en la depresión poblacional tras el confinamiento. Para ambos sexos se reportan niveles elevados de ansiedad y depresión, pero las mujeres jóvenes han sido las más propensas a ver afectada su calidad de sueño, uno de los síntomas más comunes (Teruel *et al.*, 2021). Incluso, se ha registrado un aumento en casos de trastorno depresivo 27.6% y en casos de trastornos de ansiedad (25.6%) durante la pandemia a nivel mundial (OMS, 2022). Esto sugiere que la pandemia del virus SARS-CoV-2 impactó de manera negativa la salud mental de la población (Figura 1), por lo que es de gran importancia buscar tratamientos adecuados que permitan mitigar estos trastornos.

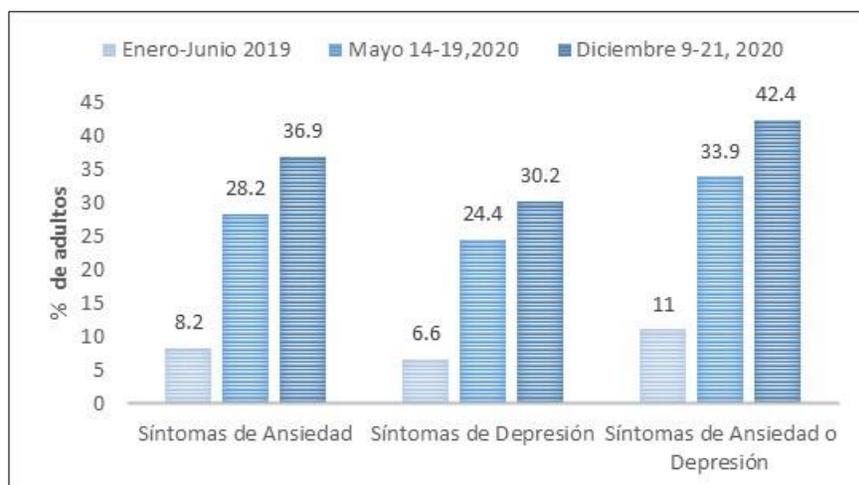


Figura 1. Incremento de casos de ansiedad y depresión asociados a la pandemia de la COVID-19. Datos obtenidos por la Oficina del Censo de EE. UU. y el Centro Nacional de Estadísticas de Salud. Los valores presentados son porcentajes de personas adultas en EE. UU. Modificado de Richter (2021).

2.4. Tratamientos Actuales Utilizados para la Depresión y Ansiedad

Actualmente, la mayoría de los tratamientos farmacológicos para la depresión están dirigidos contra la actividad de los neurotransmisores en el cerebro. Sin embargo, estos fármacos tienen una acción retardada y pueden presentar efectos secundarios adversos como dolores de cabeza, náuseas, agitación o sedación, ocasionando que algunos pacientes abandonen el tratamiento (Wallace y Milev, 2017). Adicionalmente, existe otro grupo de pacientes que presentan resistencia a los medicamentos o incluso, aunque ellos estén bajo medicación correcta, solo la mitad logra una remisión completa (Burokas *et al.*, 2015). Por lo tanto, se ha impulsado cada vez más la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos que mejoren la respuesta hacia estos padecimientos, buscando siempre una óptima calidad de vida para las personas afectadas por dichos trastornos.

2.5. Mecanismos de los Trastornos Mentales en un Enfoque Neurológico

El uso de fármacos u otros tratamientos para enfrentar estos padecimientos está un tanto rezagado;

una de las posibles razones es por la complejidad de estas enfermedades. A pesar de que los trastornos mentales, ansiedad y depresión, tienen alta prevalencia e impacto en la salud humana, es poco lo que se conoce acerca de las regiones cerebrales involucradas en la aparición de la enfermedad, los factores que pueden desencadenarlos y los mecanismos donde se producen dichas condiciones (Duman *et al.*, 2019; Sequeira y Fornaguera, 2009).

La evidencia científica sugiere la existencia de más de un solo circuito neuroanatómico involucrado, son varias estructuras, vías nerviosas y regiones cerebrales implicadas. Siendo los principales participantes las alteraciones en transmisión (monoaminas), los cambios en vías de señalización (neurotrofinas), el papel de la inflamación y los efectos sobre neurotransmisores, como el glutamato y el ácido amino- γ -butírico (GABA), por mencionar algunos (Duman *et al.*, 2019; Villa y González, 2012). Cada una de ellas se explicará de forma breve en los siguientes apartados.

Uno de los mecanismos explorados es la de las monoaminas, también conocidas como catecolaminas. Tres de ellas (noradrenalina, adrenalina y dopamina) son sintetizadas a partir de tirosina; mientras que la monoamina serotonina (5-HT) se sintetiza a partir de triptófano. Estas catecolaminas se concentran en vesículas en las células presinápticas y son liberadas durante el proceso de sinapsis, permitiendo la transmisión del impulso nervioso entre neuronas. Se ha propuesto que el trastorno depresivo se debe a una deficiencia en la actividad monoaminérgica cerebral, generando una disminución en los neurotransmisores 5-HT, noradrenalina (NA) y dopamina (en menor grado). De hecho, la mayoría de los fármacos antidepresivos aumentan la 5-HT y NA a nivel cerebral, inhibiendo su recaptura o por degradación enzimática (Hernández *et al.*, 2016; Ruíz *et al.*, 2018).

Un segundo mecanismo involucra a los neurotransmisores del sistema nervioso central (SNC), glutamato y GABA. El glutamato, ejerce funciones de excitación sobre neuronas y es la principal vía de biosíntesis de GABA, mientras que este último es el principal neurotransmisor inhibitor involucrado en circuitos interneuronales como los noradrenérgicos, dopaminérgicos y serotoninérgicos. En el cerebro de personas adultas, el GABA actúa principalmente por la activación del receptor ionotrópico postsináptico GABA_A, por lo que la deficiencia de este receptor se encuentra implicado en diversos trastornos neuropsiquiátricos, entre ellos la depresión (Villa y González, 2012). Actualmente se sabe que, pacientes con trastorno depresivo mayor muestran menores concentraciones corticales de GABA y mayores de glutamato, lo que se ha relacionado

con comportamientos melancólicos y psicóticos (Flores-Ramos *et al.*, 2017).

Por otra parte, se ha observado que pacientes con depresión presentan una disminución en el volumen del hipocampo y otras regiones cerebrales, lo que podría estar asociado con una disminución en los niveles de los factores neurotróficos (Roddy *et al.*, 2019). Las neurotrofinas son factores de sobrevivencia en neuronas sensoriales, siendo una de las principales el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), por lo que una disminución en la expresión de este factor puede contribuir a la atrofia del hipocampo en respuesta al estrés en pacientes deprimidos (Hernández *et al.*, 2016). Por lo tanto, la respuesta aumentada o disminuida al estrés es un elemento clave en el desarrollo de la depresión. Aunque la respuesta corporal al estrés es un proceso normal, la activación del sistema de respuesta mantenida a largo plazo puede tener efectos peligrosos, e inclusive mortales, incrementando el riesgo no sólo de depresión, sino de obesidad, enfermedades cardiovasculares y otros padecimientos (Ivanovs *et al.*, 2018).

Durante los últimos años, diferentes hallazgos han evidenciado la relación entre ciertas enfermedades crónicas, incluyendo a enfermedades neurodegenerativas y la depresión, con procesos inflamatorios. En particular, las citocinas proinflamatorias se han identificado como mediadores de diversos estados patológicos en el SNC. Emociones negativas y experiencias estresantes aumentan la producción de citocinas proinflamatorias (P ej., IL-6, IL-1 y TNF- α) en pacientes con depresión lo que contribuye al progreso de la depresión (Villa y González, 2012). Se ha reportado, por ejemplo que, una concentración de 10 nM de citocinas proinflamatorias se unen a sus receptores específicos en el cerebro y, por medio de diferentes vías fisiológicas, inducen 1) procesos neuroinmunológicos (que activan la liberación de citocinas en el mismo cerebro), 2) neuroquímicos (que inducen la liberación de neurotransmisores), y 3) neuroendocrinos, que se inician con la secreción de la hormona liberadora de adrenocorticotropica (CRH), la cual activa el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), lo que a su vez induce la liberación de cortisol y andrógenos anabólicos (Pavón *et al.*, 2004). Por lo anterior, se considera que la depresión es una enfermedad inflamatoria periférica; por lo que es importante prestar atención a este trastorno debido a su etiología multifactorial.

En México se ha documentado que los trastornos psiquiátricos son los más frecuentes a lo largo de la vida (Mallén y Garza, 2017), por lo que es importante conocer los mecanismos e implicaciones de estos padecimientos, con la finalidad de encontrar posibles estrategias terapéuticas. Hasta el momento se desconoce qué es lo que desencadena la ansiedad. Sin embargo, como ocurre con otras

manifestaciones del SNC, no existe solo una región encargada de la integración de la ansiedad. Participan, por ejemplo, neurotransmisores con acciones ansiolíticas (deprime el SNC) o ansiogénicas (causan ansiedad), por lo que es posible que la modulación de la ansiedad sea a través del sistema GABAérgico y el sistema glutamatérgico, que utiliza al ácido glutámico como neurotransmisor (Savage *et al.*, 2018).

Aunque el grado de ansiedad depende en gran medida del individuo, en el caso de dichos trastornos, se ha establecido que su base neurobiológica está en las alteraciones del circuito cerebral del miedo, siendo la amígdala la que controla y regula estas reacciones de alarma. Se sabe que existe una sobreactividad de los sistemas adrenérgicos y serotoninérgicos en el SNC y una leve atenuación del sistema GABAérgico, debido a que existe una alteración en el funcionamiento del receptor GABA_A lo que conlleva a una disminución en su concentración provocando agitación, insomnio y ansiedad. En cambio, el papel de la serotonina no está del todo esclarecido, se cree que existe una alteración en la sensibilidad de los receptores serotoninérgicos pre- y post-sinápticos dando lugar a una variedad de alteraciones como pánico, fobia y trastornos obsesivos (Ildefonso, 2017) (Figura 2).

Por otra parte, también se ha sugerido que el estrés oxidativo contribuye a la etiología de ambos trastornos. El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción celular de especies reactivas de oxígeno y los mecanismos antioxidantes que lo contrarrestan, por lo que, cuando este es excesivo, daña las principales macromoléculas y consecuentemente afecta varias funciones celulares fundamentales. El cerebro, con su alto consumo de oxígeno y un entorno rico en lípidos, se considera altamente susceptible al estrés oxidativo (Hovatta *et al.*, 2010; Salim, 2014). A causa de este estrés, la constitución del cerebro rica en lípidos favorece la peroxidación lipídica, dando como resultado una disminución de la fluidez de la membrana y daño en las proteínas de membrana que inactivan receptores, enzimas y canales iónicos. Como resultado, se puede alterar la neurotransmisión, la función neuronal y la actividad cerebral en general (Bhatt *et al.*, 2020; Bouayed *et al.*, 2009).

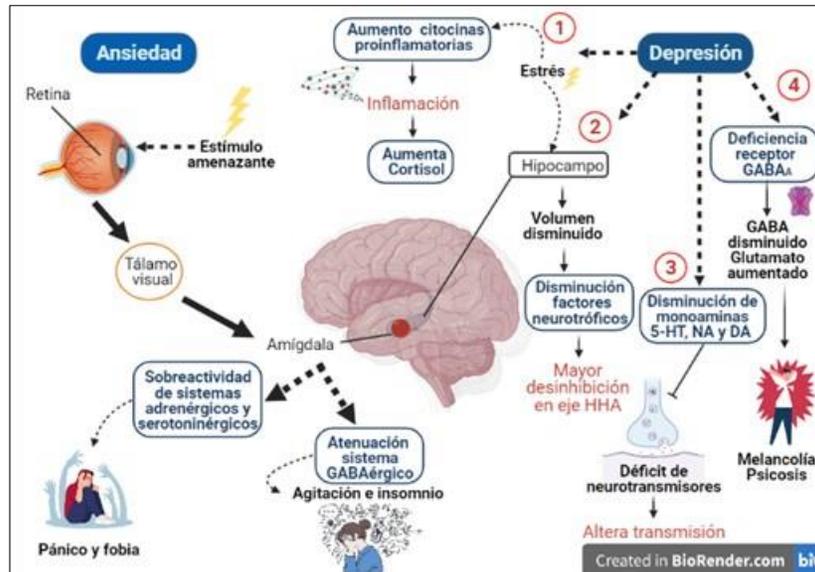


Figura 2. Mecanismos de ansiedad y depresión desde un enfoque neurológico. Existen diferentes mecanismos posibles y regiones involucradas en los trastornos de ansiedad y depresión. En ansiedad el más aceptado es el que involucra a la amígdala la cual controla y regula las reacciones de alarma. Mientras que la depresión tiene cuatro vías posibles, 1) el mecanismo inflamatorio, 2) la reducción del volumen del hipocampo, 3) la monoaminérgica y 4) el que involucra a los neurotransmisores glutamato y GABA. Eje HHA: Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal 5-HT: Serotonina NA: Noradrenalina, DA: Dopamina

Como se ha evidenciado, la información sobre los mecanismos, así como la de los posibles tratamientos de estos trastornos aún está en desarrollo, y en los últimos años, se ha publicado nueva información para entender y tratar estos padecimientos (Sharma *et al.*, 2021). En este sentido, la interacción entre el intestino, el cerebro y diversos microorganismos, es un campo novedoso y prometedor para esta área neurobiológica y sus posibles aplicaciones en los tratamientos relacionados con desórdenes neurológicos. A continuación se describe la posible relación que existe entre la microbiota y los trastornos mentales.

2.6. Microbiota Intestinal y su Vinculación con la Salud Mental

La microbiota intestinal se define como el conjunto de microorganismos que residen en el intestino en forma simbiótica con el hospedero, y está compuesta por una gran cantidad de especies

bacterianas, alrededor de 10^{14} microorganismos (Scorza *et al.*, 2019; Westfall *et al.*, 2017). La microbiota bacteriana está compuesta por más de mil especies, destacando *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. Las funciones primordiales que se atribuyen a ella son: generación de energía, digestión y absorción de nutrientes, control de la proliferación y diferenciación del epitelio intestinal, estimulación del sistema inmune, regulación de la motilidad y mantenimiento de la homeostasis intestinal. Sin embargo, en los últimos años se ha observado que existe también un papel relevante en el neurodesarrollo y la etiopatogenia de ciertos trastornos mentales. De hecho, la disbiosis (perturbación de la estructura normal de la microbiota intestinal inducida por distintos factores) se ha asociado a trastornos neuropsiquiátricos, por lo que estudiar esta posible relación es un tema prometedor (Scorza *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2021).

Diferentes estudios han demostrado cómo el desarrollo del cerebro ocurre de manera paralela al desarrollo de la microbiota humana. Por lo que la disbiosis intestinal, puede influir en el progreso de la enfermedad neurológica, iniciar la aparición de la enfermedad o ser un factor para el desarrollo de neurodegeneración (Westfall *et al.*, 2017). Se cree que los factores estresantes físicos o psicológicos pueden perturbar la composición y la actividad metabólica de la microbiota intestinal, así como los cambios experimentales en el microbioma pueden afectar el comportamiento emocional y los sistemas cerebrales relacionados (Scorza *et al.*, 2019). Por lo tanto, la importancia de la microbiota intestinal para la salud humana se ha reconocido debido a la conectividad bilateral de la comunidad bacteriana con el resto del cuerpo y, en particular, con el cerebro. El TGI y el SNC están conectados a través de una red bidireccional de vías de señalización conocida como el eje intestino-cerebro, el cual involucra las vías endocrinas (cortisol), inmunes (citocinas), oxidativas (antioxidantes) y neurales (sistema nervioso entérico y vago) a la vez (Mayer *et al.*, 2014; Burokas *et al.*, 2015).

2.7. Bacterias Ácido Lácticas y su Papel en la Comunicación Eje Intestino-Cerebro

Existen diversos estudios que refuerzan la noción de que la microbiota intestinal y el funcionamiento del cerebro están estrechamente entrelazados. Por ejemplo, Sharma y col., (2021) estudiaron ratones axénicos (sin microbiota intestinal), los cuales exhibieron patrones de

comportamiento alterados en circunstancias estresantes, en comparación con los ratones normales. Además, estudios han evidenciado que la microbiota transmite información contenida en los componentes ingeridos que pasan a través del tracto gastrointestinal (TGI) (p ej., vitaminas, minerales, carbohidratos, grasas, etc.) hacia el SNC. Esto produce una respuesta sistémica que refleja los estados nutricionales y energéticos, y modifica los niveles de citocinas circulantes, lo que a su vez puede tener un efecto marcado en la función cerebral (Westfall *et al.*, 2017).

En general, se considera que el eje intestino-cerebro está formado por la totalidad de la microbiota intestinal, el sistema nervioso entérico, sistema nervioso simpático y parasimpático, el SNC, las conexiones neuroendocrinas, citocinas, neuropéptidos y las moléculas de señalización. Muchos de los metabolitos secretados por la microbiota y las células enterocromafines (CE) intestinales se cruzan con vías bioquímicas que influyen en los procesos del SNC creando un medio de comunicación directo entre la microbiota intestinal y el cerebro (O'Mahony *et al.*, 2015). Por ello se sabe que existen principalmente tres formas de comunicación entre el intestino y el cerebro. Siendo la primer forma a través de mensajes neuronales transmitidos por nervios aferentes vagales, el segundo por medio de mensajes endocrinos que involucra hormonas intestinales, y por último con mensajes inmunitarios mediados por citocinas (Westfall *et al.*, 2017). Por lo tanto, las bacterias intestinales son capaces de producir y proveer grandes cantidades de sustancias neuroactivas, citocinas y hormonas que se describirán brevemente (Figura 3).

La serotonina y GABA, son sustancias neuroactivas que actúan sobre el eje intestino-cerebro y poseen un papel muy importante, tanto en la fisiopatología de la depresión como en los trastornos de ansiedad. La gran mayoría de estos neurotransmisores se encuentran principalmente en el tracto gastrointestinal, por lo que pueden modular el SNC a través del sistema nervioso entérico o la activación del nervio vago (Bauer *et al.*, 2016). En algunos casos las bacterias intestinales promueven la biosíntesis de 5-HT y GABA en el hospedero a partir de células enterocromafines (células que cubren el lumen del tracto gastrointestinal). Esto se ha demostrado debido a que el uso de antibióticos reduce la población bacteriana (que es productora de serotonina y GABA) ocasionando alteraciones en el funcionamiento normal del SNC. Este efecto demuestra que gran parte de la producción local de estas moléculas en el intestino puede ejercer acción sobre el cerebro por medio de la circulación sanguínea (Scorza *et al.*, 2019).

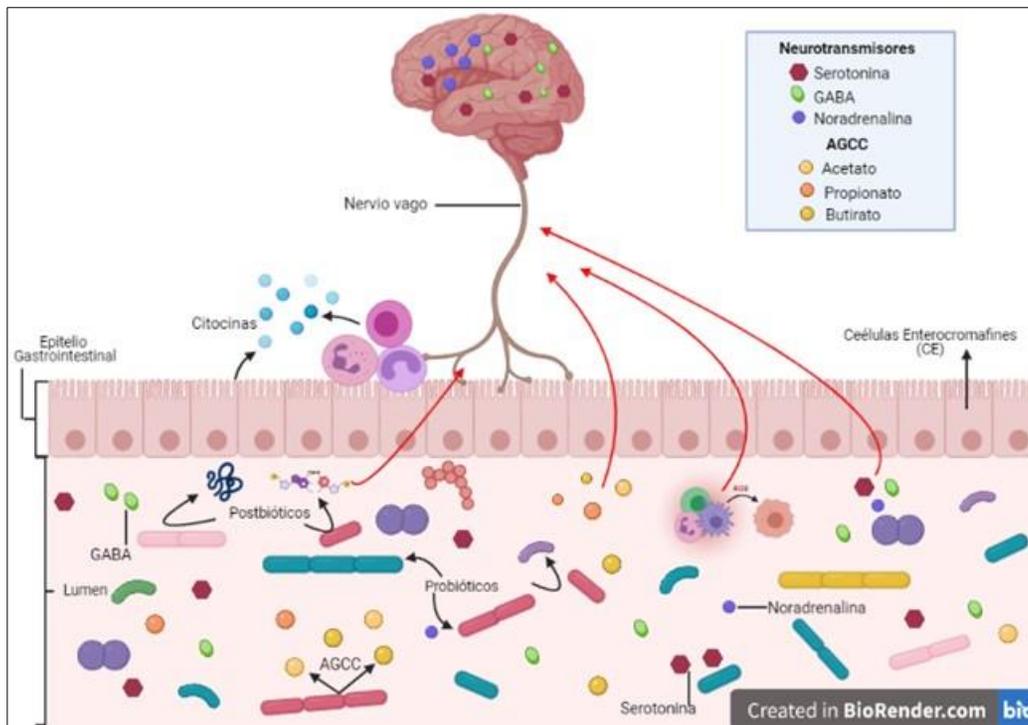


Figura 3. Vías y estructuras involucradas en la comunicación bidireccional entre la microbiota intestinal y el cerebro. Existen diversas moléculas y vías de señalización a través de las cuales la microbiota intestinal puede modular el eje intestino-cerebro. Las células epiteliales e inmunes a lo largo del tracto gastrointestinal (GI) liberan citocinas proinflamatorias las cuales pueden cruzar la barrera hematoencefálica (BHE), provocando comportamientos depresivos. Otra ruta es a través de la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por acción de la microbiota, los cuales pueden actuar como metabolitos neuroactivos que ayudan a modular actividades del cerebro relacionadas con el comportamiento. Además, algunas bacterias formadoras de esporas pueden liberar metabolitos que estimulan a las células enterocromafines dentro del colon, las cuales promueven la síntesis de neurotransmisores (p ej., serotonina y GABA) lo cual podría afectar directa o indirectamente al SNC. Por último, las BAL pueden activar la vía Nrf2 provocando la liberación de enzimas antioxidantes, lo cual puede disminuir el estrés oxidativo a nivel cerebral. Adaptado de Bauer y col., (2016).

Por otra parte, las bacterias intestinales degradan la fibra dietética que lleva a la generación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como acetato, propionato y butirato, y que su producción está en función del tipo de microbiota presente (Bauer *et al.*, 2016). Por ejemplo, los niveles más altos de ácido propiónico se han asociado con bacterias dañinas; mientras que niveles más altos de ácido butírico o acético se asocian a una microbiota más saludable (Marteau, 2013). Los AGCC regulan la homeostasis energética, ayudan a reducir el estrés oxidativo y la inflamación, estimulan las CE dentro del colon y promueven la síntesis de serotonina (Hyland y Stanton, 2016; Westfall y

col., 2017). Además, se ha observado que el butirato disminuye el comportamiento depresivo, con cambios concurrentes en la acetilación de histonas y la expresión de la neurotrofina BDNF, la cual tiene un importante papel en la memoria y aprendizaje (Scorza *et al.*, 2019). De modo que, todas estas sustancias producidas por la microbiota pueden influir en enfermedades neurodegenerativas por lo que su estudio es de gran importancia.

Debido al aumento de los trastornos mentales en la población mundial, y la creciente evidencia que relaciona a la microbiota intestinal con la respuesta del SNC, ha aumentado el interés por desarrollar estrategias que permitan modular esta respuesta. En este sentido, se ha registrado un aumento por el interés de ciertos probióticos y prebióticos específicos (también llamados psicobióticos) que, cuando se ingieren en cantidades adecuadas, producen un beneficio para la salud mental (Mörkl *et al.*, 2020). En este particular, aunque numerosas bacterias ácido lácticas (BAL) y *Bifidobacterium* han sido las más estudiadas (Saad *et al.*, 2013), los efectos observados entre dichas bacterias son cepa-específicos.

2.8. Modelos Establecidos para el Estudio de Trastornos Mentales

Debido a que el entendimiento de las enfermedades mentales es complejo, el uso de modelos animales se ha convertido en una herramienta imprescindible para identificar factores genéticos y/o ambientales específicos, circuitos, mecanismos, etc., relacionados con el desarrollo de la depresión y la ansiedad. Por lo que para poder estudiar enfermedades cognitivas es necesario utilizar baterías de pruebas de comportamiento (Feyissa *et al.*, 2017). Sin embargo, al existir una gran variedad de pruebas y de modelos animales, se deberá elegir específicamente el ensayo más acorde al comportamiento que se desea evaluar.

Cualquier estudio *in vivo* que involucre un modelo animal, primero debe validar, a través del cumplimiento de una serie de requisitos, que los resultados podrán ser extrapolados a los seres humanos. Por ello deben ser similares en el perfil de síntomas, coincidir en la ausencia de efectos, en aquellos casos en los que tampoco hay efecto en el humano, y estar involucrados en procesos neuroquímicos similares (Sequeira y Fornaguera, 2009). Las ratas y los ratones han sido los principales organismos modelo utilizados en la investigación biomédica, y actualmente ambos

animales, a pesar de sus múltiples diferencias, juegan un papel muy importante en la comprensión de la etiología, fisiopatología y farmacología de las enfermedades neuropsiquiátricas (Ellenbroek y Youn, 2016). Por lo que es necesario un examen cuidadoso de ambos organismos antes de poder elegir el modelo óptimo de estudio.

En la mayoría de los artículos que estudian los efectos de algún microorganismo probiótico sobre trastornos de ansiedad y depresión, los modelos más utilizados incluyen ratas de la cepa Wistar y Sprague Dawley (Liang *et al.*, 2015; Luang-In *et al.*, 2020; Mehrabadi y Sadr, 2020), ratones C57BL/6 y BALB/c (Ramalho *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2016; Savignac *et al.*, 2014). En cuanto a la elección de las pruebas a evaluar, existen diferentes tipos, por lo que también deben seleccionarse dependiendo del problema que se interese estudiar.

Para evaluar los efectos de ansiedad y depresión, la batería de pruebas de comportamiento se basa en la exposición del animal a un estrés agudo o crónico. Se sabe que el estrés transmite efectos negativos en el desarrollo del cerebro y genera cambios en el comportamiento (Liu *et al.*, 2016). Por ello se estudia a diferentes niveles el efecto del estrés y las conductas que puedan ser interpretadas como depresivas o de ansiedad, de forma que se pueden identificar los elementos y mecanismos involucrados. Algunos ejemplos de las pruebas más utilizadas para la depresión son la prueba de natación forzada (FST) y suspensión de cola (TST). En la primera, el animal es introducido en un recipiente con agua y lucha por escapar hasta que se inmoviliza como conducta de desesperanza similar a lo que representa la depresión. En la segunda, se registran los periodos de actividad e inmovilidad de un ratón suspendido por la cola, ya que la inmovilidad de nueva cuenta es considerada una conducta depresiva (Kara *et al.*, 2018; Stukalin *et al.*, 2020) (Figura 4). En cuanto a pruebas relacionadas con la ansiedad, se incluyen distintas situaciones de conflicto que pueden representar los diversos tipos de ansiedad clínica, por ejemplo la prueba de laberinto elevado (EPM) o campo abierto (OFT) (Sukoff Rizzo y Crawley, 2017). Ambos ensayos buscan evaluar la reacción de los sujetos de estudio a un acontecimiento estresante, que en este caso son de naturaleza espacio-temporal, ya que muestran miedo a espacios nuevos o abiertos en los que se ven obligados a estar (Polanco *et al.*, 2011) (Figura 5). Estas interpretaciones no son tan complicadas como parece, requiere de un mayor análisis y apoyo de especialistas en la temática, y bajo este esquema, se han documentado diversos estudios que han logrado relacionar esta batería de pruebas con trastornos mentales (Liu *et al.*, 2016; Ramalho *et al.*, 2019).



Figura 4. Representación gráfica de la batería de pruebas de comportamiento para ansiedad y depresión.

En un estudio realizado por Ramalho y col., (2019), ratones C57BL/6 recibieron vía oral la cepa *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LL95, la cual mostró un efecto antidepresivo y ansiolítico, al disminuir los tiempos de respuesta en las pruebas TST y FST, mientras que aumentó el porcentaje de tiempo con los brazos abiertos en la prueba EPM. En un estudio similar, *Lactobacillus helveticus* NS8 mostró la capacidad de disminuir la ansiedad de ratas Sprague-Dawley, sometidas a un proceso de estrés, ya que incrementó el tiempo de permanencia en los brazos abiertos en la técnica de laberinto en cruz elevado (Liang *et al.*, 2015). Por lo tanto, es de esperarse que al evaluar cepas con características similares a la de esos estudios en un modelo murino, se logre ver reflejado el comportamiento antidepresivo y ansiolítico en la conducta del animal.

2.9. Propiedades Psicobióticas de Bacterias Probióticas

Dinan y col., (2013) han definido a los psicobióticos como microorganismos vivos que, cuando se ingieren en cantidades adecuadas, producen un beneficio para la salud en pacientes que padecen

una enfermedad psiquiátrica. Aunque posteriormente se sugirió que cualquier simbiótico que contenga una mezcla de bacterias con prebióticos suplementarios también puede incluirse en este término (Sharma *et al.*, 2021). Algunas propiedades que distinguen a estos psicobióticos son: 1) capacidad para mejorar la barrera intestinal, lo que ocasiona una modulación en las funciones del SNC, 2) capacidad de liberar neuropéptidos que activan directamente la vía neuronal, y 3) modular factores neurotróficos que sirven de protección a la microbiota contra el estrés, por mencionar algunos (Misra y Mohanty, 2017).

En este sentido, existen diversos estudios preclínicos que han evaluado si el consumo de probióticos tiene efecto sobre la microbiota intestinal, y a la vez modular comportamientos relacionados con trastornos psiquiátricos. Por ejemplo, en un estudio realizado por Ait-Belganoui y col., (2014) evaluaron si la administración de psicobióticos disminuía significativamente la actividad neuronal inducida por el estrés en tres regiones del cerebro. Por su parte, Akkaseh y col., (2016) observaron que los probióticos *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* spp. mostraron puntuaciones significativamente más bajas en el cuestionario que mide la gravedad de la depresión en comparación con el grupo placebo. Sin embargo, estos hallazgos sugieren que los probióticos podrían usarse para mejorar los trastornos inducidos por el estrés, pero revelan la complejidad de las interacciones intestino-cerebro tras situaciones estresantes.

También se ha demostrado que diversos probióticos tienen efectos sobre los comportamientos anormales inducidos por el estrés y las respuestas inflamatorias en modelos animales. En un estudio realizado por Savignac y col., (2014), las cepas *B. longum* 1714 y *B. breve* 1205 lograron reducir el comportamiento similar a la ansiedad en ratones BALB/c. De igual forma, en otro estudio se determinó que la administración de probióticos a ratas deprimidas restauró los niveles de monoamina en regiones clave del cerebro (Liu *et al.*, 2016). A pesar de la abundancia de estudios y datos relacionados con la capacidad de la microbiota intestinal para comunicarse con el sistema nervioso central y el efecto de los probióticos en modelos *in vitro* o *in vivo* (Daugé *et al.*, 2020), las vías y estructuras cerebrales involucradas siguen siendo poco conocidas. Aunado a estas limitaciones se suman la falta de evidencia en cuanto a inmersión de diferentes psicobióticos potenciales en matrices lácteas y su aplicación a modelos murinos.

2.9.1. Propiedades Antioxidantes y Antiinflamatorias de Bacterias Probióticas y su Relación con Depresión y Ansiedad

Como ya se ha descrito con anterioridad, algunos probióticos pueden mejorar el eje intestino-cerebro y regulan el sistema nervioso a través de mecanismos neuroendocrinos, neurometabólicos y neuroinmunológicos (Mehrabadi y Sadr, 2020). Los cuales pueden ser asociados a las propiedades antioxidantes y/o antiinflamatorias de las bacterias, reduciendo biomarcadores de estrés oxidativo y citocinas inflamatorias (Panahipour *et al.*, 2019). Esto es debido a que las BAL tienen un sistema de defensa antioxidante, del cual producen vitaminas, péptidos bioactivos y varias enzimas (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa, etc.) con actividad antioxidante. Esto ha sido probado en ensayos *in vitro*, donde se ha observado su capacidad de quelación de iones metálicos, producción de metabolitos antioxidantes (folato y glutatión) y una alta capacidad resistente contra la oxidación (Gayathri y Rashmi, 2017; Ramalho *et al.*, 2019). Por otra parte, se ha reportado efectos inmunomoduladores que pueden ser ejercidos por bacterias, incluyendo componentes de la pared celular, o por exopolisacáridos y péptidos bioactivos liberados durante el proceso de fermentación (Santiago-López *et al.*, 2018). De esta manera, los probióticos mejoran la función de las células de Paneth, las cuales secretan una variedad de sustancias antibacterianas, como péptidos antimicrobianos y estimulan la producción de citocinas antiinflamatorias (Ashaolu y Fernández-Tomé, 2021); por lo que la respuesta generada en el intestino puede extenderse por todo el sistema.

Dichas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que generan las bacterias probióticas en productos lácteos fermentados, han recibido una mayor atención debido a que se considera una novedosa alternativa adyuvante en el tratamiento de trastornos psiquiátricos, como la ansiedad y depresión, caracterizados por un aumento en la inflamación y estrés oxidativo en regiones cerebrales (Gayathri y Rashmi, 2017). Esto es debido a que el cerebro, al tener una alta cantidad de ácidos grasos poliinsaturados y consumir cantidades altas de oxígeno para la producción de energía es muy susceptible al estrés oxidativo al tener un mecanismo de defensa antioxidante bajo en comparación con otros órganos, lo que provoca una alteración de la neurotransmisión y la función neuronal, desencadenando los trastornos mentales mencionados (Adibhatla y Hatcher, 2007). En este sentido, la administración de bacterias probióticas mostró mejorar la actividad

antioxidante enzimática y no enzimática en cerebro de ratas, lo que contribuyó a que éstos animales presentaran conductas menos compulsivas y ansiosas (Luang-In *et al.*, 2020). Estos efectos se vieron complementados al aumentar la producción de neurotransmisores (P ej., GABA, serotonina, etc.) y la expresión de BDNF, así como de reducir los niveles de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β y TNF α (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2012; Desbonnet *et al.*, 2008; Wallace y Milev, 2017), lo que indica que pueden tener la capacidad de reducir la oxidación e inflamación generada por la ansiedad y depresión.

2.9.2. Multicultivos Psicobióticos Involucrados en Procesos Antiinflamatorios y Antidepresivos

Algunos estudios con animales han sugerido que el uso de mezclas de probióticos, comparado con los mono-cultivos, podría multiplicar los efectos. En este sentido, se ha reportado que diferentes tipos de probióticos pueden funcionar de manera distinta en la modificación del sistema inmunológico intestinal, inhibiendo el crecimiento de patógenos, promoviendo la regulación positiva de la respuesta inmune o fortaleciendo la barrera mucosa (Chang *et al.*, 2017). En un estudio realizado por Luang-In y col., (2020), se observó que el consorcio formado por seis probióticos aumentó la función locomotora en los animales de estudio; además, redujo el comportamiento compulsivo y ansioso, mejoró el rendimiento de la memoria y las actividades antioxidantes enzimáticas. Estos resultados sugieren que la mezcla de bacterias tuvo efectos neuroprotectores; sin embargo, los mismos autores concluyen que sus hallazgos son limitados y es necesario una mayor investigación en el área.

De manera similar, Chapman y col., (2011) reportaron que en la mayoría de los estudios con probióticos se utilizan mono-cultivos incorporados en yogur, y los estudios con mezclas de cepas probióticas son limitados. Aunque los consorcios parecen ser efectivos contra una amplia gama de puntos finales, no está claro si esto se debe a interacciones sinérgicas entre cepas o una consecuencia de la dosis más alta de probióticos utilizada en algunos estudios.

2.9.3. Metabolitos y Neurotransmisores Involucrados en la Modulación de Comportamiento Asociado a la Administración de Probióticos

En un estudio realizado por Bravo y col., (2011) se demostró que *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 fue capaz de reducir los niveles de corticosterona, inducida por el estrés y el comportamiento ansiolítico en animales sanos. Además, se realizó una prueba de comportamiento (FST) donde se obtuvo un menor tiempo en la prueba de natación forzada. Estos resultados sugieren, que la administración del probiótico podría tener un efecto en el tratamiento contra la depresión.

En el Cuadro 1, se describe el efecto de cepas potencialmente psicobióticas sobre diferentes biomarcadores involucrados en la modulación de comportamiento, incluyendo la reducción de corticosterona (CORT), la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), y las citocinas IL-6 y TNF- α ; y el aumento de metabolitos cerebrales como 5-HT, Norepinefrina (NE) y BDNF, así como la citocina antiinflamatoria IL-10. Los niveles plasmáticos elevados de CORT y ACTH se relacionan con comportamientos similares a la ansiedad (Liang *et al.*, 2015). Por lo tanto, el hecho de que las cepas psicobióticas logren una disminución de estos biomarcadores es un buen pronóstico. Además de disminuir los niveles de citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α , los cuales se aumentan en trastornos relacionados al estrés (Liu *et al.*, 2016). Por otra parte, el aumento en la citocina reguladora de diferentes procesos de inflamación, IL-10, ayuda a mantener la homeostasis reprimiendo la respuesta proinflamatoria (Santiago-López *et al.*, 2018), evitando de igual forma un impacto negativo a nivel cerebral.

Además, el aumento de 5-HT y NE proporciona un efecto muy similar al que utilizan los antidepresivos comunes, ya que su mecanismo se basa en aumentar la serotonina y noradrenalina, inhibiendo su recaptura o degradación, logrando así que no se afecte la actividad monoaminérgica cerebral (Hernández *et al.*, 2016). El hecho de que BDNF también haya aumentado, disminuye el riesgo de depresión, ya que una disminución en ese factor se ha asociado con la pérdida neuronal y atrofia del hipocampo, lo cual es muy común en la depresión mayor (Liang *et al.*, 2015). Por último, existen diversos estudios que demuestran además, como ciertas bacterias probióticas presentan actividad antioxidante logrando reducir el daño causado por oxidación, mediante las propias enzimas antioxidantes producidas por las BAL (superóxido dismutasa y catalasa), la producción de metabolitos (folato y glutatión) o las actividades de regulación negativa de ROS y

la regulación de la microbiota intestinal (Ramalho *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2017). Estos resultados sugieren que la ingesta crónica de bacterias probióticas con propiedades psicotrópicas tiene un gran potencial para mejorar los síntomas relacionados con el estrés, por lo que abre vías para nuevas estrategias terapéuticas.

Cuadro 1. Comparación de estudios con cepas potencialmente psicobióticas y sus variables evaluadas.

Referencia	Cepa probiótica de estudio	Prueba de comportamiento	Resultado en el comportamiento	Marcadores alterados
Liang y col., 2015	<i>Lactobacillus helveticus</i> NS8	Depresión (SPT) Ansiedad (EPM, OFT) Memoria no espacial (ORT, OPT)	Ansiedad ↓ Depresión ↓	CORT y ACTH ↓ Metabolitos cerebrales: 5-HT ↑ y NE ↑ BDNF ↑ Citocinas: IL-10 ↑
Liu y col., 2016	<i>Lactobacillus plantarum</i> PS128	Actividad locomotora (OFT) Ansiedad (OFT, EPM) Depresión (SPT, FST)	Actividad locomotora ↑ Ansiedad ↓ Depresión ↓	CORT ↓ Citocinas: TNF- α , IL-6 ↓, IL-10 ↑ Metabolitos cerebrales: 5-HT ↑, 5-HIAA ↓, DA ↑, DOPAC ↓
Tian y col., 2020	<i>Bifidobacterium breve</i> CCFM1025	Ansiedad (OFT, EPM) Depresión (SPT, FST, TST)	Ansiedad ↓ Depresión ↓	5-HTP ↑, BDNF ↑ Citocinas: TNF- α ↓

Se presentan tres estudios de comportamiento, en los cuales se evaluó la administración de cepas potencialmente psicobióticas en modelos murino. Se obtuvieron resultados favorables en la batería de pruebas conductuales así como en los marcadores utilizados. CORT: Corticosterona, ACTH: hormona adrenocorticotrópica plasmática, BDNF: factor neurotrópico derivado del cerebro, 5-HT: Serotonina, 5-HTP: 5-hidroxitriptófano, NE: Norepinefrina, 5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético, DA: dopamina, DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético, TNF- α : factor de necrosis tumoral, SPT: Preferencia de sacarosa, OFT: Campo abierto, EPM: Laberinto elevado, ORT: Reconocimiento de objetos, OPT: Prueba de colocación de objetos, FST: natación, TST: Suspensión de cola, ↑: Aumento, ↓: Disminución.

2.10. Alimentos Fermentados en la Modulación de Ansiedad y Depresión en Modelos Murino

Actualmente algunos alimentos fermentados pueden ser considerados alimentos funcionales debido a que pueden presentar múltiples beneficios para la salud. Los alimentos fermentados se han definido como aquellos alimentos elaborados mediante el crecimiento microbiano deseado y las conversiones enzimáticas de los componentes de los alimentos (Marco *et al.*, 2021). En general,

los alimentos funcionales fermentados deben presentar al menos uno de tres componentes principales, a saber, probióticos, prebióticos y/o componentes bioactivos (Stanton *et al.*, 2005). Estos compuestos pueden influir en la composición del microbioma intestinal, alterar la absorción de nutrientes, modificar la permeabilidad intestinal, estimular células inmunológicas en el intestino y presentar efectos antiinflamatorios y moduladores a nivel cerebral (Tillisch *et al.*, 2013) (Figura 5). Para lograr los efectos atribuidos a los probióticos, es necesario que los microorganismos estén en las dosis adecuadas y sobrevivir a las condiciones gastrointestinales (Luang-In *et al.*, 2020).

Se ha postulado que ciertos alimentos funcionales fermentados podrían influir significativamente en mejorar la respuesta inflamatoria asociada con depresión y ansiedad. La evidencia actual se ha centrado en que los alimentos funcionales fermentados pueden modificar la inflamación al reducir las citocinas inflamatorias pro-circulantes, produciendo AGCC, y mejorando la función barrera. Además de disminuir procesos inflamatorios asociados al estrés oxidativo, el cual se sabe que puede estar implicado en el desarrollo de enfermedades mentales (Aslam *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2020). En este sentido, en el estudio de Liu y col., (2016), los resultados mostraron que la administración de la cepa *Lactobacillus plantarum* PS128, aislada de hojas de mostaza fermentadas, normalizó la hiperactividad del eje HPA en un modelo murino, por lo que se redujeron los comportamientos similares a depresión y ansiedad. También aumentó la actividad locomotora y moduló los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico.

A pesar de la información antes mencionada, no se han reportado estudios que demuestren el potencial efecto de leches fermentadas con bacterias potencialmente probióticas y su efecto para mejorar los síntomas de depresión y ansiedad. Sin embargo, estudios previos han demostrado que cepas aisladas de productos lácteos artesanales (*Limosilactobacillus fermentum* J32 y J38, *Lactobacillus pentosus* J34), y plantas (*Lactiplantibacillus plantarum* Lp22, Lp24 y Lp39) con potencial probiótico, tiene la capacidad para fermentar leche, la cual, al ser administrada en modelos animal mejoraron los niveles de IL-10, IL-6 e IgA en muestras de suero de ratas (Santiago-López *et al.*, 2018). Por lo tanto estas bacterias pueden modular el sistema inmunológico y son candidatas para ser utilizadas en la preparación de leche fermentada y así poder observar su potencial efecto psicobiótico.

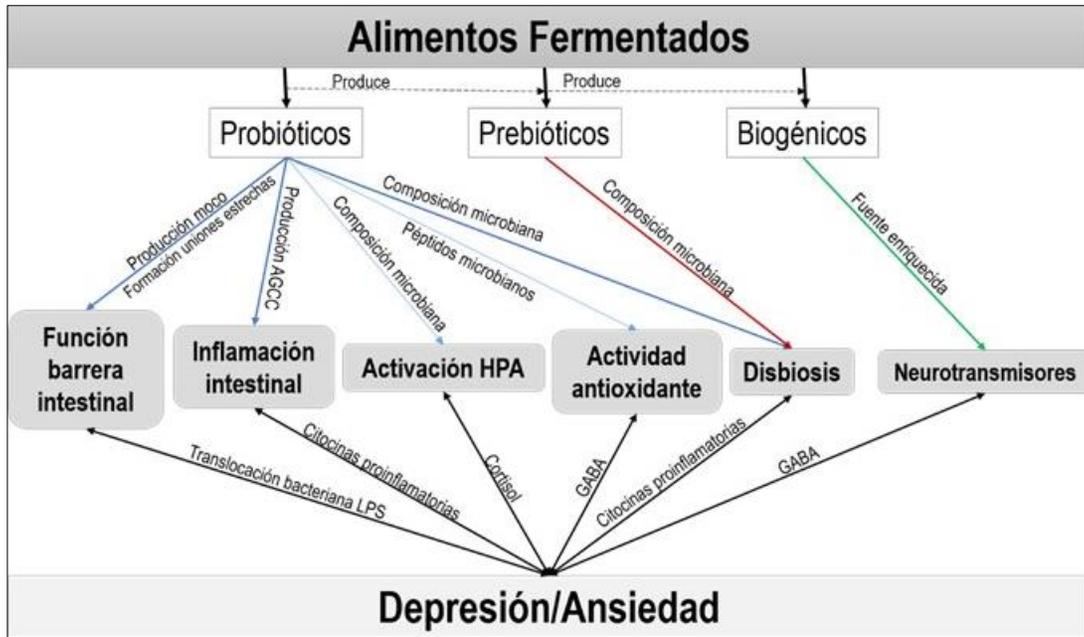


Figura 5. Componentes funcionales de los alimentos fermentados y los mecanismos biológicos que influyen en la depresión y ansiedad. Las cajas rectangulares de color blanco son los componentes funcionales de los alimentos fermentados. Las flechas de cada componente funcional muestra los mecanismos biológicos que influyen en la salud mental (recuadros grises con esquinas redondeadas) indicando un beneficio o restauración. Las flechas negras de dos puntas denotan relaciones bidireccionales entre los mecanismos biológicos y la depresión y/o ansiedad. Modificado de Aslam y col., (2020).

3. HIPÓTESIS

Leches fermentadas preparadas con bacterias ácido lácticas específicas, aisladas de queso cocido de Sonora o Huauzontle, en monocultivo o multicultivo, modulan la respuesta antidepresiva y ansiolítica en un modelo murino a través de sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la potencial actividad antidepresiva y ansiolítica, en un modelo murino, asociado a la administración de leches fermentadas preparadas con bacterias ácido lácticas específicas en monocultivo y multicultivo.

4.2. Objetivos Específicos

1. Caracterizar las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias *in vitro* de leches fermentadas preparadas con bacterias ácido lácticas específicas, en monocultivo y multicultivo, y seleccionar aquella(s) con mejor(es) resultado(s).
2. Evaluar la potencial actividad antidepresiva y ansiolítica de la(s) leche(s) fermentada(s) seleccionada(s) mediante pruebas no condicionadas de comportamiento en un modelo murino.
3. Determinar el efecto de la administración de las leches fermentadas en biomarcadores de estatus antioxidante y antiinflamatorio del modelo murino, y correlacionarlos con los resultados de las pruebas no condicionadas de comportamiento.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos y Materiales

Los reactivos que se utilizaron en el presente proyecto fueron: cloruro de sodio (CAS No. 7647-14-5), fosfato de sodio dibásico (CAS No. 7558-79-4), fosfato de sodio monobásico (CAS No. 7558-80-7), fluoresceína sódica (CAS No. 518-47-8), 2,2'-azobis (2-aminopropano) dihidrocloruro (AAPH; CAS No. 2997-92-7), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox; CAS No. 53188-07-1), ácido 2,2'-azinobis-3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS; CAS No. 30931-67-0), persulfato de potasio (CAS No. 7727-21-1), ácido tricloroacético (TCA; CAS No. 76-03-9), ácido tiobarbitúrico (TBA; CAS No. 504-17-6), hidroxitolueno butilado (BHT; CAS No. 128-37-0), glutatión reducido (GSH; CAS No. 70-18-8), peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 30%; CAS No. 7722-84-1), glutatión reductasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GR; CAS No. 90001-48-3), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH; CAS No. 2646-71-1), bicarbonato de sodio (CAS No. 144-55-8), Lipoxigenasa de soya (Glycine max, tipo 1-B), Tripsina (CAS No. 9002-07-7), Borato de sodio (CAS No. 1303-96-4), Caseína (CAS No. 9000-71-9), Ácido perclórico, ácido linoleico, Tween 80, adquiridos en la empresa Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.), o-ftalaldehido (OPA; CAS No. 643-79-8) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), y caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe) de BD Difco™ (Sparks, MD, USA.), 3,5,-di-ter-4butylhydro-xytoluene (CAS No. 128-37-0, Supelco).

5.2. Cultivos Bacterianos

Las bacterias que se emplearon en el presente estudio incluyen 3 cepas aisladas de queso cocido de Sonora, a saber, *Limosilactobacillus fermentum* J32 y J38, *Lactobacillus pentosus* J34, y 3 cepas aisladas de Huauzontle (*Lactiplantibacillus plantarum* Lp22, Lp24 y Lp39), las cuales han mostrado previamente propiedades probióticas y tecnológicas (Santiago-López *et al.*, 2018). Dichas cepas pertenecen a la colección de cultivos del Laboratorio de Química y Biotecnología de

Productos Lácteos, del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Las cepas se reactivaron inoculando (1%, v/v) cada una de las bacterias en caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, BD Difco™, Sparks, MD, EE.UU.), dejando incubar a 37 °C por 24 h. seguido de dos sub-cultivos de 18 y 12 h, respectivamente. Se realizaron curvas de crecimiento para determinar los tiempos de fase exponencial y estacionaria, así como para evaluar la capacidad fermentativa en leche en dos fases de crecimiento de cada una de las bacterias.

Las cepas de cada fase de crecimiento definido se recuperaron por centrifugación (4500 x g, 10 min, 4 °C). El paquete celular obtenido se lavó dos veces, utilizando una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, pH 7.2, 0.2 M), y se re-suspendió en la misma solución a una $DO_{600nm} = 0.8$ (ca. 10^9 UFC/mL) empleando un lector de placas multimodal (SpectraMax M3, Molecular Device, Sunnyvale, CA, EE.UU.).

5.3. Preparación de Leche(s) Fermentada(s) con Monocultivos o Multicultivo

Los cultivos suspendidos en PBS, de dos fases de crecimiento (fase exponencial y estacionaria), se inocularon individualmente al 2%, (v/v) en leche descremada en polvo, reconstituida al 10% (p/v) y previamente tratada térmicamente (85 °C, 30 min). Las leches inoculadas se incubaron a 37 °C por 48 h, y se tomaron muestras en tiempos específicos (0, 24, y 48 h) para realizar diferentes determinaciones, incluyendo cuenta viable (ufc/mL), pH y acidez titulable (% de ácido láctico), siguiendo las metodologías reportadas por Sanders (2012), y la AOAC (2000), respectivamente. Las cepas que mostraron mayor crecimiento y capacidad fermentativa se pre-seleccionaron y emplearon en monocultivo y/o multicultivo (1:1) para evaluar nuevamente su capacidad fermentativa, propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

5.4. Evaluación de la Actividad Antioxidante y Antiinflamatoria *in vitro* de la(s) Leche(s) Fermentada(s)

La actividad antioxidante se evaluó empleando el ensayo de decoloración con el radical catiónico

ABTS•+ y el método de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, por sus siglas en inglés). Se utilizó Trolox (ácido 6-hidroxi-2,3,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) como estándar para preparar una curva de referencia (0 a 500 μM en PBS). Los resultados de actividad antioxidante se expresaron como μM de equivalentes de Trolox. La actividad antiinflamatoria se evaluó *in vitro* con dos métodos enzimáticos (inhibición de la actividad de tripsina y lipoxigenasa) y los resultados se presentaron como % de inhibición. Para los ensayos antiinflamatorios, previamente, la(s) leche(s) fermentada(s) se centrifugaron (450 x g, 40 min, 4 °C) y el sobrenadante fue utilizado para las diferentes técnicas.

5.4.1. Determinación de la Actividad Antioxidante por el Método ABTS

La actividad antioxidante de las muestras se determinó siguiendo la metodología descrita por Aguilar-Toalá *et al.* (2017). Para ello, primero se preparó el radical ABTS•+ (7mM) en una solución de persulfato de potasio (140 mM) y se dejó incubar 16 h a 25 °C. Una vez obtenido el radical, éste se mezcló con PBS (5 mM, pH 7.2) hasta obtener una $\text{DO}_{734\text{nm}}$ de 0.7 ± 0.02 (SpectraMax M3). Para el ensayo, una alícuota (5 μL) de la(s) leche(s) fermentada(s), PBS (blanco) o trolox (curva estándar), se mezcló (15 s) con 200 μL de radical ABTS•+, y se incubó por 7 min a 30 °C en oscuridad. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se registró la absorbancia empleando un lector de placas multimodal (SpectraMax M3). Los resultados obtenidos se expresaron como μM de Equivalente de Trolox, el cual se utilizó para crear una curva estándar (ANEXO 1).

5.4.2. Determinación de la Actividad Antioxidante por el Método ORAC

Para este ensayo se siguió la metodología reportada por Zulueta *et al.*, (2009). Para ello, 50 μL de la(s) leche(s) fermentada(s), PBS o trolox, se mezclaron con 50 μL de fluoresceína sódica (78 mM, Sigma-Aldrich), en una microplaca de 96 pocillos, y se pre-incubaron durante 15 min a 37 °C en

oscuridad. Posteriormente, se añadieron 25 μL de radical AAPH (221 mM, 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro). Las muestras se mezclaron (15 s), y se registró la fluorescencia cada 5 min, durante 5 h en oscuridad. Las condiciones fueron una longitud de onda de excitación de 485nm y de emisión de 535nm, y a una temperatura constante de 37° C.

La recopilación de los datos obtenidos y los cálculos se realizaron en una hoja de cálculo de Excel (Microsoft Corporation., Redmond, WA, EE.UU.) para preparar las curvas de cada muestra, las cuales se normalizaron con respecto a una curva testigo. A partir de los datos normalizados, se calculó el área bajo la curva de disminución de la fluorescencia (AUC) de acuerdo con la ecuación 1:

$$AUC = 1 + \sum_{i=5}^{i=60} \int i - \int 0 \quad (1)$$

Donde f_0 corresponde a la lectura de fluorescencia inicial a los 0 min y la f_i es la lectura de fluorescencia después de 5 h. El AUC neto correspondiente a una muestra se calculó restando el AUC correspondiente al testigo (PBS). Los resultados obtenidos se expresaron como μM de Equivalente de Trolox, el cual se utilizó para crear una curva estándar (ANEXO 2).

5.4.3. Determinación de la Actividad Antiinflamatoria *in vitro*

Los ensayos antiinflamatorios se realizaron siguiendo la metodología reportada por Nile y Park, 2014 y Gunathilake *et al.*, (2018). Los porcentajes de inhibición se determinaron considerando la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = 1 - \frac{(\text{ABS del testigo (sustrato + enzima)})}{(\text{ABS de la muestra})} * 100$$

5.4.3.1. Inhibición de actividad de tripsina. Este ensayo consistió en mezclar 500 μL de extracto de leche fermentada(s) y 500 μL de una solución de Tris-HCl 25 mM (pH 7.4), conteniendo tripsina (0.06 mg/mL), y se incubó durante 5 min a 37 °C. Posteriormente, se adicionó 500 μL de una solución de caseína (0.8% p/v), y se incubó por 20 min a 37 °C. La reacción se detuvo al agregar ácido perclórico (60%). Las mezclas se centrifugaron (4500 x g, 5 min) y se registró la absorbancia (280 nm) utilizando un lector de placas multimodal, SpectraMax M3. Se utilizó PBS como testigo negativo (Gunathilake *et al.*, 2018).

5.4.3.2. Actividad de lipoxigenasa. Para este ensayo, la mezcla de reacción consistió en la adición de 10 μL de la enzima lipoxigenasa (Lipoxidasa de Glycine max (Soya), concentración final de 20,000 U/mL), 10 μL de extracto de leche(s) fermentada(s) y 970 μL de solución de borato de sodio (0.1M, pH 9.0) y 10 μL de ácido linoleico (0.6 mM). La reacción se dejó incubar por 5 min a 37 °C, y se registró la absorbancia a 234 nm. Se utilizó PBS como testigo negativo.

5.5. Determinación de la Actividad Proteolítica de Bacterias Ácido Lácticas en Leche(s) Fermentada(s)

La actividad proteolítica se determinó por el método de OPA (o-phthaldialdehído) que consiste en la reacción de grupos NH_3 libres con el reactivo de OPA (Church *et al.*, 1983). Para ello, una muestra de leche fermentada (500 μL) se mezcló con 1 mL de TCA (0.75%), se mezclaron durante 1 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó (4000 x g, 40 min, 4 °C) y se recuperó el sobrenadante. La mezcla de reacción para determinar actividad proteolítica consistió en mezclar 20 μL del sobrenadante en pozos de una microplaca de 96 pocillos negra, inmediatamente se añadió 200 μL del reactivo OPA. Después de 2 min de incubación en oscuridad a temperatura ambiente (20 °C), se midió la fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 330 nm y de emisión de 436 nm utilizando un espectrofotómetro. Los resultados se reportaron como μg de L-leucina en función de una curva estándar (0-250 μg de L-leucina). La actividad proteolítica se interpretó como la diferencia entre la cantidad de grupos amino libres de las leches fermentadas contra el testigo (leche sin fermentar) (Donkor *et al.*, 2007).

5.6. Estudio *in vivo* para Determinar la Potencial Capacidad Antidepresiva y Ansiolítica de la(s) leche(s) Fermentada(s) Seleccionada(s)

Los ensayos con el modelo murino se llevaron a cabo siguiendo las especificaciones de la NOM 062-ZOO-1999 para el manejo de animales. Además de que se recibió capacitación previa por parte de doctores con experiencia en el manejo de animales de Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos, del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. sobre el cuidado y manejo de animales en experimentación. También se mantuvo monitoreo constante sobre las condiciones en las cuales se tuvo el ensayo con el fin de mantener la tranquilidad de los animales de estudio. El protocolo fue sometido y aprobado por el Comité de Ética Institucional del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., con el oficio probatorio de CONBIOÉTICA-26-CEI-001-20200122 CEI/017-1/2021 (Anexo 3).

5.6.1. Animales de Estudio y Grupos Experimentales

Para este ensayo se utilizaron 20 ratones machos de la cepa C57Bl/6, de seis semanas de edad, con peso promedio de 25 ± 2 g, los cuales fueron mantenidos individualmente en cajas de acero inoxidable bajo condiciones controladas de temperatura (25 ± 2 °C), humedad (60-70%), y ciclos de luz/oscuridad (12/12 h). Los animales experimentales recibieron agua purificada *ad libitum* y alimento en forma de pellets en libre acceso (Rodent Laboratory Chow 5001, PMI Nutrition International LLC, MO, EE.UU.). Los animales tuvieron dos semanas de adaptación antes de iniciar el estudio.

El número de animales para los grupos experimentales se determinó considerando la ecuación reportada por Arifin y Zahiruddin (2017) que está dada por:

$$n = GL / k + 1$$

Donde:

GL son los grados de libertad, k: número de grupos

Basado en el rango aceptable de los grados de libertad para el término del error en un análisis de

varianza se consideraron los valores 10 y 20 (mínimo y máximo), valores necesarios para comparar tres grupos experimentales.

El número de animales mínimo por grupo fue:

$$n = 10/4 + 1 = 3.5 \sim 4 \text{ animales por grupo}$$

El número de animales por grupo fue corroborado al calcular el valor “E” que representa los grados de libertad del análisis de varianza y que debe estar entre 10 y 20 (Charan y Kantharia, 2013).

$$E = \text{Número total de animales} - \text{Número total de grupos} = ((4 \times 4) - 4) = 12$$

El valor de E es aceptable, por lo que cada grupo se conformó por 4 animales; sin embargo, se consideró un 1 animal adicional por grupo, con el fin de suplir cualquier animal que pudiera sufrir algún contra tiempo durante el experimento. Posterior a periodo de adaptación, los animales se distribuyeron utilizando el método de aleatorización simple reportado por Johnson y Besselsen (2002), y Kim y Shin (2014), considerando como principales variables de respuesta: marcador de estrés oxidativo (Glutación Peroxidasa), y marcadores de inflamación (citocina proinflamatoria IL-6). La distribución se realizó al generar números aleatorios utilizando el programa Excel® (Microsoft Office Profesional Plus 2016, WA, EU). Para confirmar que los grupos no mostraban diferencia significativa se realizó un análisis de varianza con una $p > 0.05$ con cada variable de respuesta.

Una vez formado los grupos, se inició con la administración *per os* (p.o.) de los diferentes tratamientos, para ello se calculó la dosis de leche fermentada utilizando las siguientes consideraciones: consumo normal de leche fermentada (g por día) y el peso corporal (humano), convertido al equivalente en ratón, de acuerdo a lo reportado por Lovita (2012; 2019) y Janhavi y col. (2019), como se describe a continuación:

Considerando que el consumo promedio de un producto fermentado es de aproximadamente 250 mL (García et al., 2019), este valor se consideró para realizar la conversión para ratones de un peso de 30 g.

Considerando estos datos:

Dosis en ratones (30 g) = volumen de consumo en humanos (60 kg) x (área de superficie corporal de ratón / humano) (factor de conversión)

El área de superficie corporal de una persona promedio de 60 kg es de 1.6 m² y para ratón es de 0.0105 m²

Calculamos el Factor de Conversión promedio = área de superficie corporal ratón / humano = 1.62

$$m^2 / 0.0105 m^2 = 0.006$$

Despejando

Dosis en ratones (30 g) = 250 mL por día x 0.006 = 1.5 mL

Los grupos experimentales (tratamientos) se establecieron de la siguiente manera:

G1 (Testigo positivo): solución salina estéril (1.5 mL p.o) + estrés (luz roja)

G2 (Testigo ansiolítico): Diazepam (5 mg/kg p.o) + estrés (luz roja)

G3 (Testigo antidepressivo): Fluoxetina (10 mg/kg p.o) + estrés (luz roja)

G4 (Leche fermentada): Leche Fermentada con Lp39 (1.5 mL p.o) + estrés (luz roja)

La generación de estrés crónico se realizó con las condiciones evaluadas en estudios previos (Espallergues *et al.*, 2009; Stenman *et al.*, 2020). Para ello, los animales se colocaron en un cilindro de acrílico transparente (10 cm de largo x 2.5 cm de diámetro), y se expusieron a la luz roja (13.5 W, 50/60 Hz, Ángulo 60°, lámpara LED, Tecnolite, Zapopan, Jalisco, México) por un periodo de 60 min durante los cinco días de pruebas de comportamiento (Figura 6). Se manejó el mismo horario para la generación de estrés y aplicación de las diferentes pruebas, respetando el horario de 10:00 am a 17:00 pm. La administración de los tratamientos se realizó durante 15 días continuos, seguido de los diferentes ensayos de comportamiento, bajo un calendario experimental escalonado (Figura 7). El peso de los animales se registró cada tercer día hasta el final del periodo experimental; mientras que el consumo de agua y alimento se registró cada dos días.



Figura 6. Procedimiento de generación de estrés

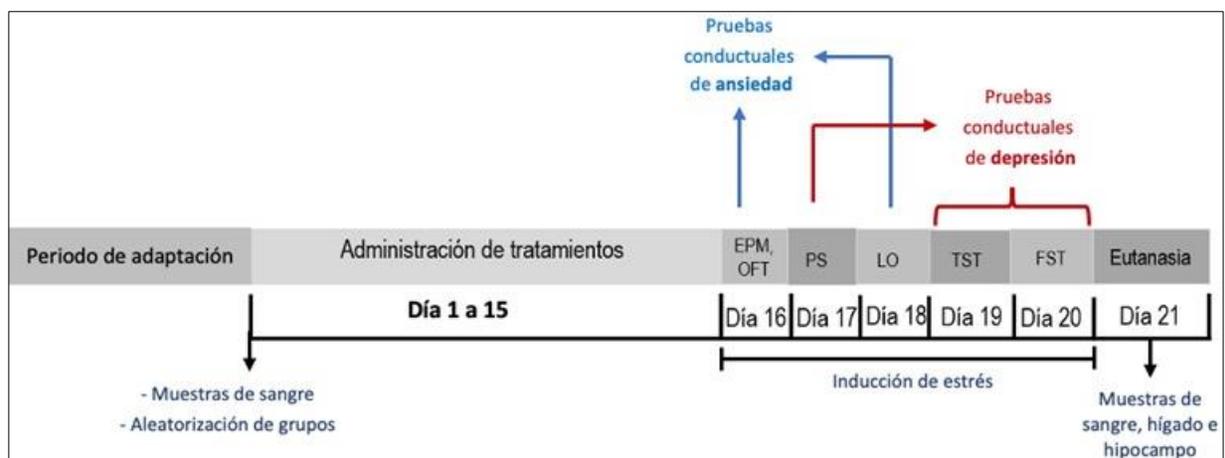


Figura 7. Calendario experimental. Abreviaciones: EPM, Laberinto elevado, OFT, Prueba de campo abierto; PS, preferencia a sacarosa; LO, Luz Oscuridad; TST, Suspensión de cola; FST, Nado forzado.

Al inicio del periodo experimental (después del periodo de adaptación) se colectaron muestras de sangre por el método de corte de cola. El procedimiento consistió en limpiar la cola con etanol al 75% y se hizo un corte de 1-2 mm en la punta de la cola con unas tijeras quirúrgicas en ángulo perpendicular a la superficie de trabajo. Una vez colectado el volumen apropiado de muestra, se detuvo el sangrado aplicando un algodón con peróxido de hidrógeno sobre la herida (Parasuraman, *et al.*, 2010). Al final del periodo experimental, los animales fueron eutanasiados, y se recuperaron muestras de sangre por punción cardíaca (Parasuraman *et al.*, 2010), hígado e hipocampo. Todas las muestras de sangre fueron colectadas y colocadas en tubos con EDTA (Vacutainer, K2EDTA, BD, NJ, EE.UU.). Inmediatamente después, las muestras de sangre se centrifugaron (3000 x g, 15, min, 4 °C), se recuperó el plasma y se almacenó a -80 °C para los análisis posteriores. Los hígados colectados fueron lavados con solución Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) y se homogenizaron con el mismo buffer (10% p/v) durante 5 min (Bio-Gen Pro200 Homogenizer, ProScientific, Oxford, CT, EE.UU.), seguido de una centrifugación a 3000 x g por 15 min. El sobrenadante obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso (Guerrero-Encinas *et al.*, 2021). El hipocampo se removió cuidadosamente de cada uno de los ratones, y se pesaron – el resultado se expresó como el peso del hipocampo relativo (peso del hipocampo/peso corporal). Posteriormente, éstos se colocaron en una solución de Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) en una relación 1:5 (p/v), se homogenizaron y centrifugaron (2500 x g, 10 min, 10 °C). Los sobrenadantes se recuperaron y almacenaron a -20°C para su uso posterior (Liu *et al.*, 2016; Ramalho *et al.*, 2019).

A partir de las muestras obtenidas de plasma y órganos, se determinó el contenido de proteína, así como parámetros de actividad antioxidante enzimática (CAT – catalasa y GPx – glutatión peroxidasa), estrés oxidativo (actividad antioxidante total, peroxidación lipídica, e índice de estrés oxidativo), así como diferentes biomarcadores de inflamación (Procedimientos descritos en la sección 5.6.3).

5.6.2 Pruebas No condicionadas de Comportamiento Depresivo y de Ansiedad

Cada una de las técnicas que se utilizaron para evaluar el efecto antidepresivo y ansiolítico han sido documentados en estudios previos (Wahlsten, 2010; Feyissa *et al.*, 2017; Ramalho *et al.*, 2019; Stenman *et al.*, 2020). Durante las pruebas de comportamiento se controlaron las condiciones de iluminación y ruido, colocando para este último un sonido blanco durante todas las grabaciones. Todas las pruebas fueron grabadas con una cámara Canon EOS Rebel T5 y con una GoPro Hero 7 Black. La inducción de estrés y las pruebas conductuales se realizaron en cuartos separados. Los videos de las pruebas de campo abierto, suspensión en cola y natación forzada se analizaron utilizando el software ToxTrac v2.61 (Umea, University, Umeå, Suecia).

5.6.2.1. Ensayos para determinar el efecto ansiolítico. Ensayo de campo abierto (OFT). Este ensayo (OFT, por sus siglas en inglés), se realizó con el fin de evaluar el efecto de la administración de la leche fermentada sobre la actividad de locomoción y evaluar el comportamiento de ansiedad (Seibenhener y Wooten, 2015). Para ello, los ratones fueron colocados dentro de un campo abierto donde escapar está impedido por las paredes que lo rodean (caja de 50 cm x 50 cm), y la parte inferior de la caja se encuentra cuadrículada (16 cuadrados). Cada uno de los animales se colocó individualmente en el centro de la caja y se monitoreó el movimiento por 5 min (Figura 8). La caja se limpió con etanol al 70% después de cada prueba. Las actividades de locomoción (distancia total recorrida (cm), tasa de movilidad (%)), se evaluaron con el programa especializado ToxTrac v2.61 (Rodríguez *et al.*, 2017; 2018), donde una mayor locomoción y un mayor tiempo de permanencia en las áreas centrales indican una disminución en su ansiedad (Polanco *et al.*, 2011).

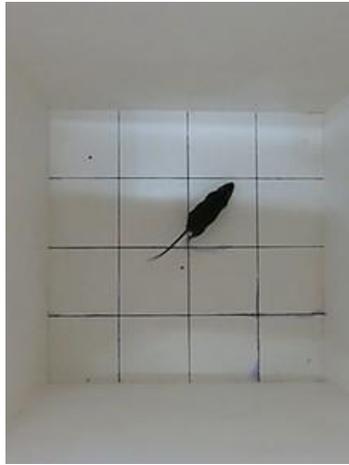


Figura 8. Ensayo de campo abierto

Ensayo de laberinto elevado en cruz (EPM)

Para el ensayo de laberinto elevado en cruz (EPM; por sus siglas en inglés), se utilizó un aparato compuesto por dos brazos abiertos (30 cm x 8 cm), dos brazos opuestos cerrados (30 cm x 8 cm x 15 cm), conectados por un área central de 8 cm x 8 cm, elevado por encima del suelo (120 cm). Los animales, se colocaron en el centro de la plataforma, frente a un ala abierta, y se le permitió la exploración por 1 minuto. El tiempo de permanencia, tanto en alas abiertas como cerradas, se evaluó durante un periodo de 5 min (Figura 9). Una reducción del tiempo utilizado en las alas abiertas se consideraron como un índice de actividad ansiolítico, independiente de la actividad locomotora (Ramalho *et al.*, 2019).

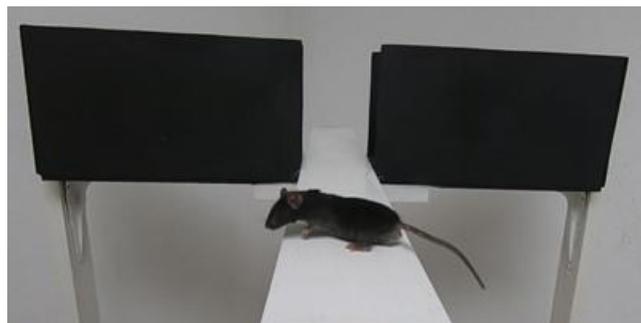


Figura 9. Ensayo de laberinto elevado en cruz

Ensayo de luz-oscuridad (LO)

Este ensayo se basa en la aversión natural de los roedores hacia los espacios muy iluminados y, al mismo tiempo, una tendencia al comportamiento exploratorio. Para este ensayo, se implementó una caja de prueba la cual constaba de dos compartimentos, una clara y otra oscura (30 cm x 28.5 cm x 33 cm) conectadas por una puerta (7.5 cm x 7.5 cm) (Figura 10). La zona clara fue iluminada con un foco de luz LED de 800 Lumens (Tecnolite, Zapopan, Jalisco, México) durante el desarrollo de la prueba. El animal de estudio se colocó en la zona oscura y se registró el tiempo que pasó en cada zona. La prueba se registró durante 10 minutos. Esta prueba es una de las más utilizadas para medir comportamiento de ansiedad. Los ratones tienden a evitar la zona iluminada cuando se encuentran estresados, por lo que el tiempo empleado en la zona clara es un buen índice de disminución de la ansiedad como comportamiento (Takao y Miyakawa, 2006).



Figura 10. Ensayo de luz-oscuridad

5.6.2.2. Ensayos para determinar el efecto antidepresivo. Prueba de suspensión en cola (TST). Este ensayo se realizó siguiendo la metodología reportada por Ramalho y col. (2019). En esta prueba, los ratones fueron adheridos de la cola, con cinta ScotchBlue™ #2090 de papel crepado con adhesivo acrílico, a un tubo y suspendidos durante 5 min a 25 cm del suelo (Figura 11). Durante este tiempo, se registró el tiempo que permaneció inmóvil, después de un período de habituación de 1 minuto. Los ratones se consideraron inmóviles solo cuando se encontraban colgados pasivamente y completamente inmóviles, lo que indica una conducta depresiva. Cada animal se prueba solo una vez y está fuera de la vista de los otros animales. El tiempo de inmovilidad fue evaluado con el software ToxTrac v2.61.

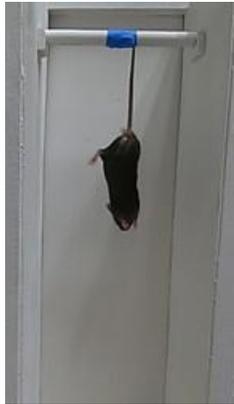


Figura 11. Prueba de suspensión de cola

Prueba de natación forzada (FST).

En esta prueba, los animales se colocaron individualmente en un cilindro (23 cm de altura y 22 cm de diámetro) de policarbonato transparente. Los cilindros contenían agua (23 °C), a una altura de 13 cm, de forma que los ratones no pueden salir ni tocar el fondo y se ven forzados a nadar. Los animales fueron colocados en el centro del cilindro y se mantuvieron por 6 min. El primer minuto fue considerado de adaptación, el animal se acomoda en una postura inmóvil, dejando la cabeza fuera del agua para respirar. A partir de ahí se registran diferentes movimientos a lo largo de 5 minutos (Figura 12). Cada uno de los animales se consideraron inmóviles cuando permanecieron flotando en el agua, haciendo solo los movimientos necesarios para mantener la cabeza sobre el agua. Una disminución en la duración de la inmovilidad fue indicativo de un efecto antidepresivo (Cryan *et al.*, 2002; Ramalho *et al.*, 2019). El tiempo de inmovilidad fue evaluado con el software ToxTrac v2.61.



Figura 12. Prueba de natación forzada

Prueba de preferencia a sacarosa (PS).

En esta prueba, los animales tuvieron acceso a una solución de sacarosa preparada al 1% (Figura 13). Para esta prueba, todos los ratones se alojaron individualmente y se les presentaron dos botellas con el mismo volumen de agua purificada y/o solución de sacarosa. La posición de las botellas se intercambiaba a las 12 h para evitar los efectos de la preferencia lateral. La ingesta de agua y solución de sacarosa se midió 24 h después de haber colocado las botellas. La preferencia se calculó como consumo de sacarosa entre consumo de sacarosa más consumo de agua por 100. El porcentaje de reducción del interés por una recompensa es manifestación del comportamiento depresivo (Belovicova *et al.*, 2017).



Figura 13. Prueba de preferencia a la sacarosa

5.6.3. Determinación de Parámetros Antioxidantes y Biomarcadores de Inflamación

5.6.3.1 Actividad antioxidante total y peroxidación lipídica. La actividad antioxidante total en las muestras de hígado e hipocampo, se evaluó por los métodos ABTS y ORAC, siguiendo las metodologías descritas previamente en los ensayos *in vitro*. La peroxidación lipídica, estimada en términos de malondialdehído (MDA) se determinó mezclando una alícuota (0.5 mL) de las muestras con 0.5 mL de solución salina y 0.5 mL de ácido tricloroacético al 25%. Posteriormente se centrifugaron (1500 x g, 20 min) y 1 mL del sobrenadante se mezcló con 0.25 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA, 0.5%). La mezcla se calentó a 95°C por 1 h. La mezcla de reacción se dejó

enfriar y se determinó la intensidad del color rosa del producto final a 532nm. La concentración de MDA se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$1 \mu\text{mol/MDA} = \frac{DO_{532} \times 1.75}{0.156}$$

Donde DO_{532} corresponde a la densidad óptica a 532nm y $0.156 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ el coeficiente de extinción molar del MDA (Todorova *et al.*, 2005).

5.6.3.2 Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes e índice de estrés oxidativo. Se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes (GPx y CAT) en muestras de hígado e hipocampo. La actividad GPx se determinó midiendo la oxidación del NADPH en presencia de glutatión exógeno, 3,5,-di-ter-4butylhydro-xytoluene (BHT; 0.012M) y glutatión reductasa. Los resultados se expresaron en $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Flohé y Günzler, 1984); mientras que la actividad CAT se determinó monitoreando la descomposición del H_2O_2 a 240 nm. los resultados se expresaron como U/mg de proteína/min, de acuerdo a la metodología descrita por Aebi y col. (1984). Además, se determinó la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) después de la reacción con yoduro de potasio (KI), siguiendo la metodología reportada por Caetano y col. (2013). La cantidad de H_2O_2 se calculó utilizando una curva estándar de 0-500 μM . El índice de estrés oxidativo (OSi) se calculó dividiendo el estado oxidante total biológico en términos de producción de $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$ entre el estado antioxidante total químico ($\mu\text{mol Equivalentes de Trolox/ L}$). (González-González *et al.*, 2020).

5.6.3.3. Determinación de Proteína. La concentración de proteína de las muestras de hígado e hipocampo se determinaron usando el kit de DC Protein Assay siguiendo la metodología reportada por el proveedor. La concentración final de proteína se expresó como mg de proteína/mL, y se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) para elaborar una curva estándar de siete puntos (Anexo 4).

5.6.3.4. Determinación de biomarcadores de inflamación. En muestras de plasma se determinó la concentración de las citocinas IL-6, IL-10, MCP-1 y TNF- α por citometría de flujo (BD FACSSII Canto, CA, EE.UU.) y utilizando el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation (BD, Life Sciences, San José, CA, EE.UU.). La actividad de lipoxigenasa se determinó en muestras de hipocampo considerando la metodología reportada en la sección 5.6.1.

5.7. Análisis Estadístico

Los resultados de cada una de las determinaciones *in vitro* se representaron como media y desviación estándar ($n = 3$). Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y en caso de existir diferencia significativa se realizó una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey-Kramer entre tiempos de fermentación ($P < 0.05$). Adicionalmente se realizó una prueba de T para comparar la capacidad fermentativa en leche de los monocultivos en fase exponencial y estacionaria. Finalmente, se realizó una correlación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria con la actividad proteolítica utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

En el ensayo del modelo animal, se aplicó un diseño completamente al azar con un análisis de varianza para la asignación de los animales en cada uno de los grupos de estudio, considerando una $P > 0.05$. Para las variables de respuesta del modelo *in vivo*, se utilizó estadística no paramétrica (análisis de Kruskal-Wallis o Mann Whitney, dependiendo el ensayo, $P < 0.05$), considerando los supuestos de normalidad y el tamaño de muestra. Se realizó un análisis de correlación entre la respuesta de las pruebas de comportamiento y las variables bioquímicas (antioxidantes y antiinflamatorias) evaluadas. Los análisis se realizaron usando el coeficiente de correlación de Spearman. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa estadístico NCSS 2021 (Kaysville, UT, EE.UU.).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Determinación de Características Tecnológicas: pH, Acidez y Cuenta Viable

Los resultados de pH y acidez se muestran en la Figura 14. En general, los datos evidenciaron que todas las cepas produjeron ácido láctico ($P < 0.05$), lo cual a su vez se vio reflejado en la respectiva disminución de pH a las 24 y 48 h de fermentación. En el caso del pH, únicamente la leche fermentada con la cepa *L. plantarum* Lp39 mostró diferencia ($P < 0.05$) entre fase exponencial y estacionaria a 24 h de fermentación (Figura 14A).

La concentración de ácido láctico fue diferente ($P < 0.05$) entre las leches fermentadas a las 24 y 48 h con las cepas *L. pentosus* J34, *L. plantarum* Lp22, *L. fermentum* J32 y J38, en ambas fases de crecimiento; mientras que las leches fermentadas con las cepas Lp24, J38, y Lp39 fueron las únicas que mostraron diferencia ($P < 0.05$) entre fase exponencial y estacionaria, tanto para 24 h y 48 h de fermentación (Figura 14B). Se ha reportado que valores de pH por debajo de 6.5, y acidez titulable por arriba de 2.2 g/L de ácido láctico, es indicativo del efecto de los microorganismos que desencadenan la coagulación de las caseínas de la leche (Bautista, 2020; Negri, 2005). En este sentido, todas las bacterias de este estudio mostraron capacidad acidificante al modificar ambos parámetros en los diferentes tiempos de fermentación.

El incremento en la concentración celular determinada en las leches fermentadas se presenta en la Figura 15. La concentración celular se registró en un rango de 10^7 - 10^8 UFC/mL para los dos tiempos de fermentación, obteniendo un incremento de 1.49 y 2.07 ciclos logarítmicos con respecto a la concentración inicial (10^6 UFC/mL) para 24 y 48 h, respectivamente ($P > 0.05$). El incremento en la concentración celular para las leches fermentadas con las cepas J32 y Lp22, en fase estacionaria, fue significativamente diferente entre 24 y 48 h de fermentación; mientras que la leche fermentada con la cepa J34 mostró diferencias significativas cuando la leche se inóculo con la bacterias en fase de crecimiento exponencial. En cuanto a la etapa de crecimiento, fase exponencial y estacionaria, la concentración celular a las 48 h de fermentación fue diferente ($P < 0.05$) para las leches fermentadas con las cepas J32 y Lp39, siendo mayor cuando la bacteria se inoculó en fase estacionaria, destacando la leche fermentada con la cepa Lp39.

La naturaleza de la matriz láctea provee los componentes necesarios para el crecimiento de microorganismos, como ha sido descrito en estudios previos, donde se han reportado concentraciones celulares de 10^8 o 10^9 UFC/mL (Sanders, 2012). En estudios previos se ha reportado que leches fermentadas con esta concentración de bacteria posee efectos benéficos a la salud, tales como inmunomoduladores y antiinflamatorios (Santiago-López *et al.*, 2019).

En general, los resultados de pH, acidez y concentración celular evidencian que las cepas estudiadas pueden ser consideradas para ser utilizadas en procesos de fermentación láctea. Considerando los hallazgos obtenidos, la capacidad de cada una de las bacterias de estudio para fermentar leche es dependiente del tipo de cepa y de la fase en la que se encuentra previo a su incorporación en leche.

De manera general, no se observaron diferencias ($P > 0.05$) en la concentración celular entre las leches fermentadas por 24 y 48 h, utilizando las cepas en distintas fases de crecimiento, por lo que se seleccionaron las leches fermentadas por 24 h, las cuales fueron inoculadas con cada una de las cepas en la fase de crecimiento estacionaria. A dichas leches seleccionadas se les evaluó la actividad antioxidante y antiinflamatoria. Se ha reportado que las bacterias en esta etapa de crecimiento permanecen metabólicamente activas, y las proteínas que se generan son indispensables para su viabilidad (Jaishankar y Srivastava, 2017). Incluso, se sabe que las bacterias ácido lácticas en su fase estacionaria ayudan a mejorar las características sensoriales de los alimentos fermentados (Van de Bunt *et al.* 2014; Núñez, 2019), lo cual podría ser de gran importancia en la industria de alimentos.

Aunque la Asociación de Leches Fermentadas y Bebidas Lácteas en Japón y el Organismo de Regulación Alimentaria en Suiza, sugieren que los productos lácteos deben presentar valores de microorganismos viables $\geq 10^6$ - 10^7 UFC/mL, actualmente se ha reconocido que la concentración óptima de bacterias es variable, ya que los efectos benéficos son cepa dependiente en una dosis determinada (Gómez, 2013; Murti, 2021).

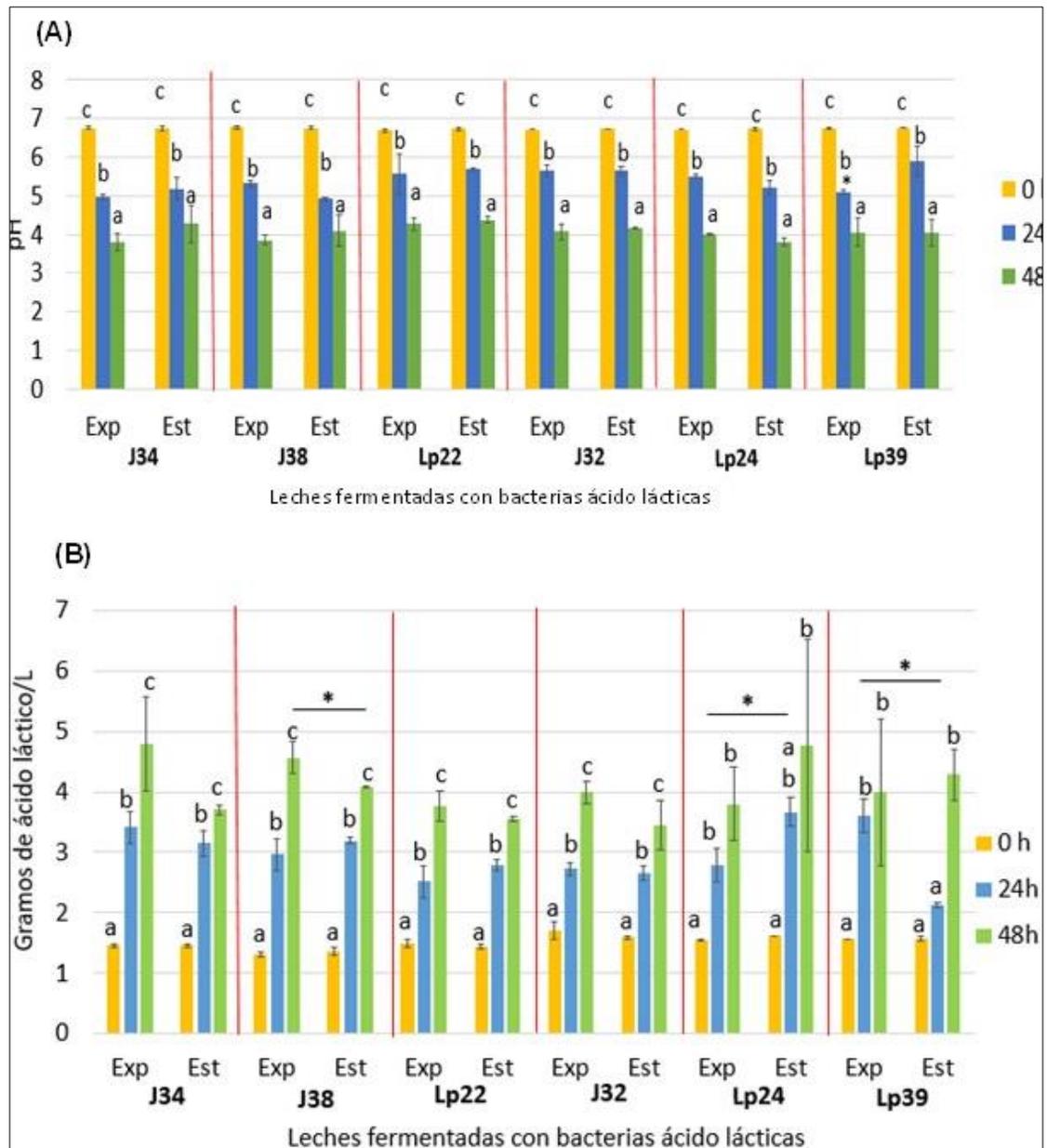


Figura 14. (A) Valores de pH y (B) Producción de ácido láctico en leche(s) fermentada(s) por las diferentes bacterias lácticas en fase de crecimiento exponencial (Exp) y estacionaria (Est). Los resultados se muestran como medias \pm DE (n=3). Literales diferentes indican diferencias estadísticas entre tiempos de fermentación, mientras que los símbolos (*) denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre fases de crecimiento.

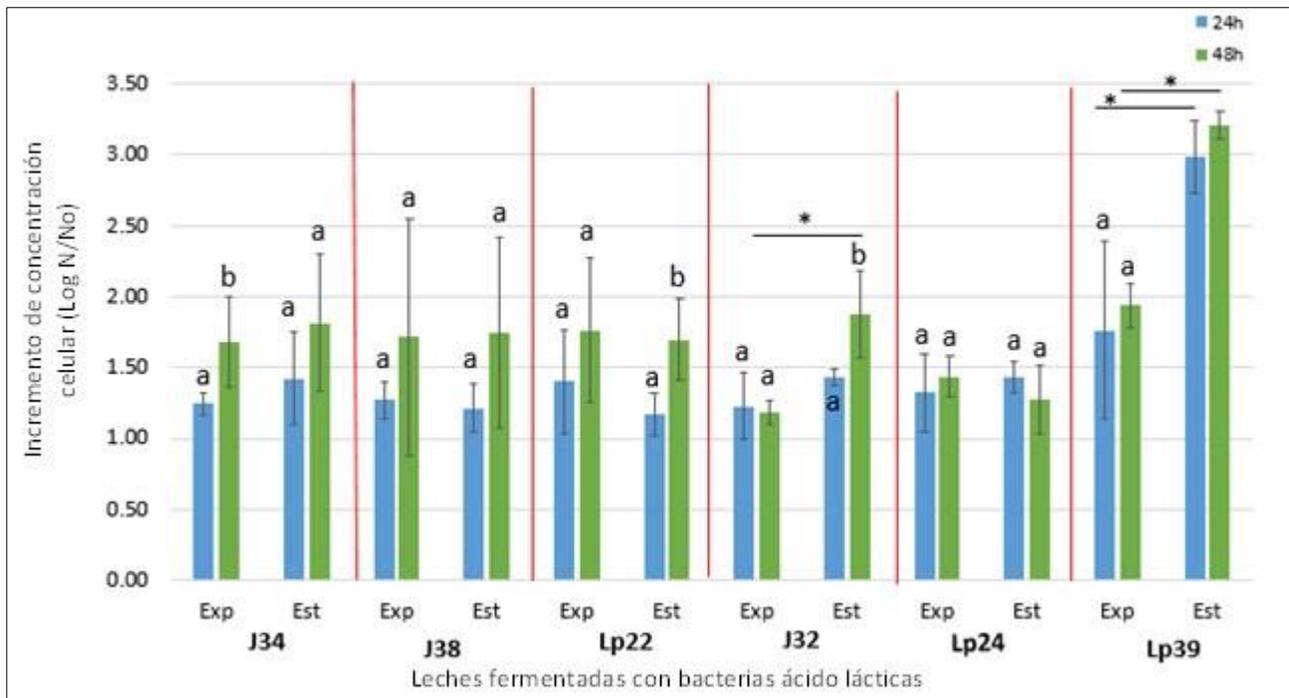


Figura 15. Incremento de viabilidad (Log N/No) de las diferentes bacterias lácticas en fase de crecimiento exponencial (Exp) y estacionaria (Est) en las leches fermentadas. Los resultados se muestran como medias \pm DE (n=3). Literales diferentes indican diferencias estadísticas entre los tiempos de fermentación, mientras que los símbolos (*) denotan diferencias significativas (P<0.05) entre fases de crecimiento.

6.2. Actividad Antioxidante de Leches Fermentadas

Los resultados de actividad antioxidante por el método de ABTS se muestran en la Figura 16. Las leches fermentadas con las cepas Lp22 y Lp39 presentaron mayor actividad antioxidante, no presentando diferencia significativas entre ellas, pero si respecto a la leche no fermentada (P<0.05). Los resultados de actividad antioxidante obtenidos por el método ORAC se muestran en la Figura 17. Las leches fermentadas con las cepas J32, Lp22 y Lp39 mostraron la mayor actividad (P <0.05), respecto a la leche sin fermentar. Considerando las dos técnicas empleadas, la mayor actividad antioxidante se registró para las leches fermentadas con las cepas Lp22 y Lp39.

En un estudio previo, el contenido intracelular obtenido de ambas bacterias mostró la mayor actividad antioxidante por ambos métodos (Rosas-Anaya, 2021); aunque es importante destacar que en el presente estudio, las cepas se encuentran inmersas en una matriz láctea, por lo que otros

compuestos derivados de la fermentación podrían estar contribuyendo en la actividad antioxidante observada.

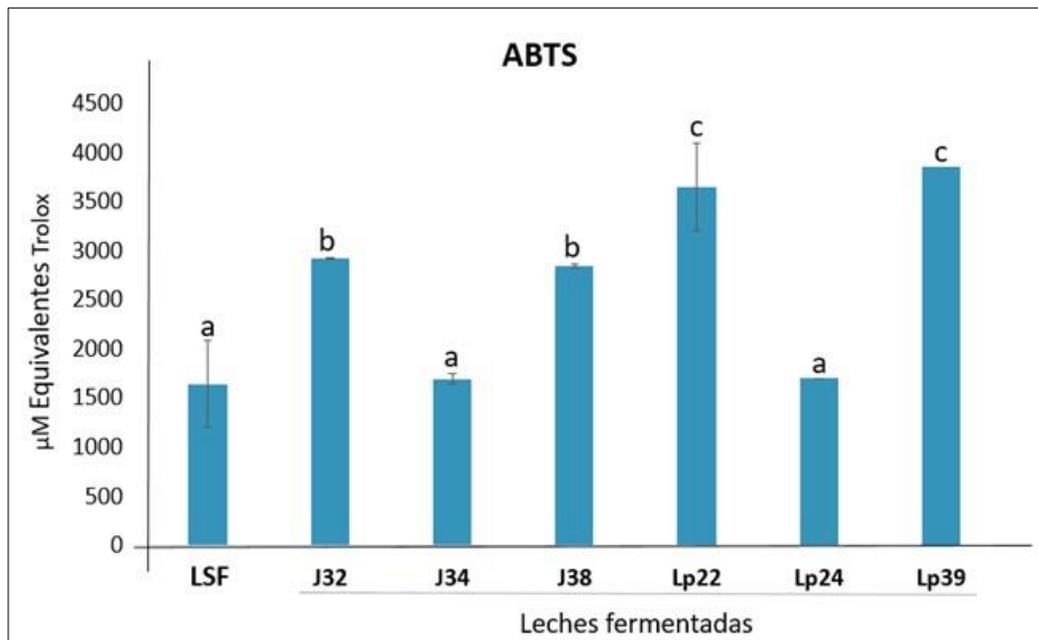


Figura 16. Actividad antioxidante por el método ABTS de leches fermentadas. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencia (P<0.05) entre leches fermentadas. LSF: Leche sin fermentar.

Algunos estudios han evidenciado que la producción de péptidos, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas C y E, enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa), además de la bacteria *perse* contribuyen a la actividad antioxidante de productos lácteos fermentados (Virtanen *et al.*, 2007; Aguilar-Toalá *et al.*, 2019). La producción de cada uno de estos metabolitos es cepa dependiente, lo cual podría explicar porque algunas leches fermentadas tienen mayor capacidad antioxidante (Virtanen *et al.*, 2007).

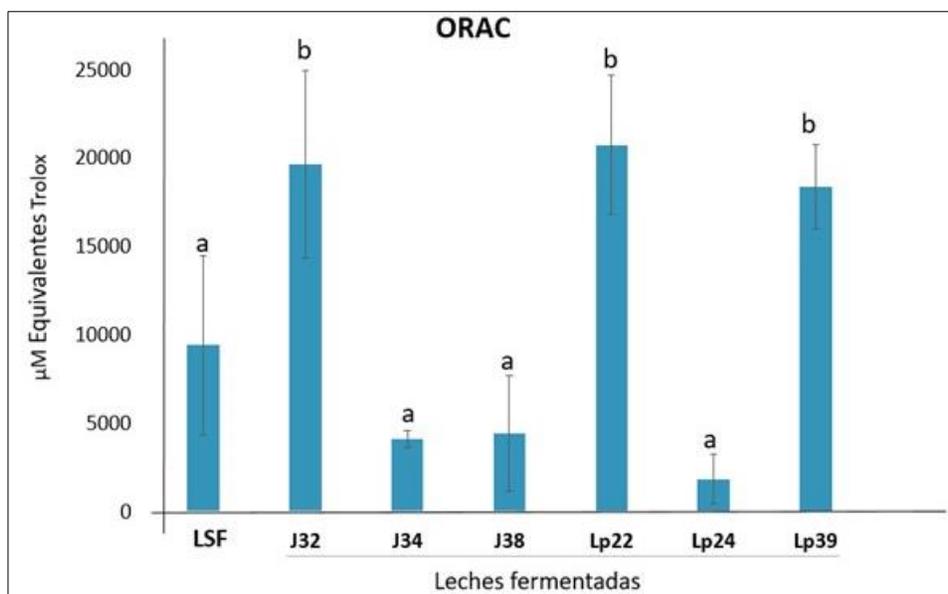


Figura 17. Actividad antioxidante por el método ORAC de leches fermentadas. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencia (P<0.05) entre leches fermentadas. LSF: Leche sin fermentar.

6.3. Actividad Antiinflamatoria de Leches Fermentadas

Los porcentajes de inhibición para tripsina y lipoxigenasa se muestran en la Figura 18. En el caso de inhibición de la actividad de tripsina, el porcentaje más alto fue observado para la leche fermentada con la cepa Lp39, seguido de Lp24 y J38 (P<0.05); mientras que las leches fermentadas con las cepas J34, Lp22 y J32 no mostraron diferencias significativas respecto a la leche no fermentada. Por otro lado, las leches fermentadas con las cepas Lp22, y Lp39 mostraron porcentajes de inhibición de la actividad lipoxigenasa significativamente mayor y diferente (P<0.05) respecto a la leche no fermentada.

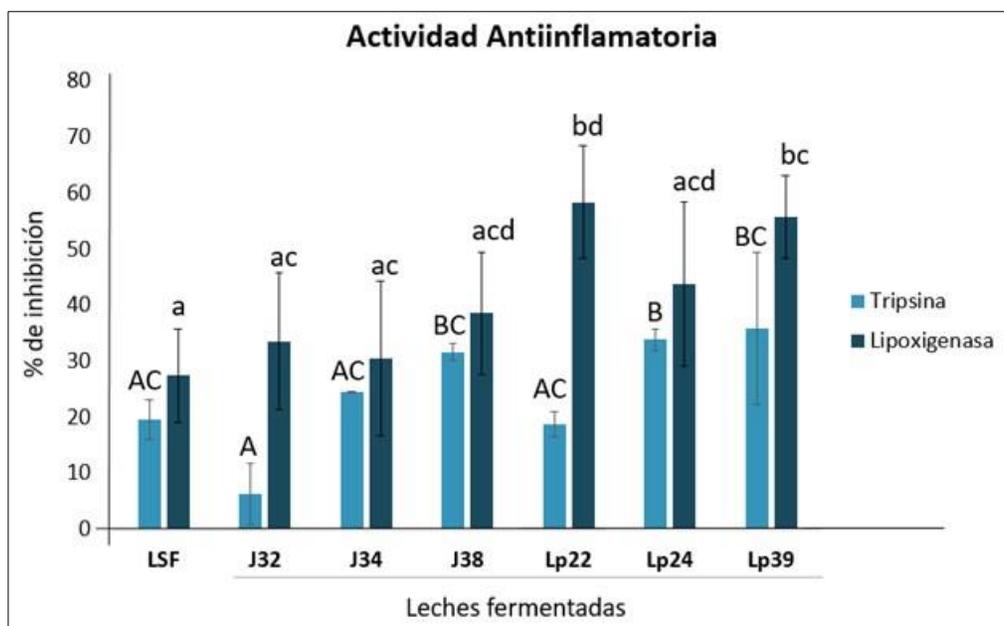


Figura 18. Porcentajes de inhibición para la actividad de tripsina y lipoxigenasa de leches fermentadas. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar (n=3). Letras minúsculas indican diferencia ($P < 0.05$) entre leches fermentadas para la actividad de Lipoxigenasa y letras mayúsculas para la actividad de inhibición de tripsina. LSF: Leche sin fermentar.

Hasta donde es de nuestro conocimiento, no existen estudios previos que reporten dichas actividades para productos lácteos fermentados; sin embargo, si se ha reportado para el contenido intracelular de bacterias probióticas o potencialmente probióticas. Por ejemplo, en el trabajo desarrollado por Valera-Molina (2019), se reportaron porcentajes de inhibición de entre 40 y 50% para el contenido intracelular de las bacterias *L. pentosus* J24 y *L. fermentum* J20. Estos resultados sugieren que estos compuestos pueden ser inhibidores de proteasas específicas y podrían regular procesos inflamatorios. En particular, la inhibición de tripsina (una serín proteinasa producida por los neutrófilos), podría indicar una disminución en las rutas de señalización que conllevan a la producción de moléculas inflamatorias. De la misma manera, la inhibición de lipoxigenasa (enzima oxidativa que cataliza la conversión de ácido araquidónico en leucotrienos) se asocia a una regulación negativa de la respuesta inflamatoria al evitar la formación de leucotrienos, moléculas que participan en procesos inflamatorios (Patel y Zaveri, 2014; Valera-Molina, 2019; Wisastra y Dekker, 2014).

Considerando los resultados de capacidad fermentativa (pH, acidez y concentración celular), y las dos propiedades bioactivas evaluadas (antioxidante, antiinflamatoria), se seleccionaron las leches

fermentadas con las cepas Lp22, Lp24 y Lp39, ya que fueron las que presentaron, de manera general, los mejores resultados. Esas tres bacterias se utilizaron para preparar un multicultivo, el cual se comparó con el monocultivo de Lp39, el que mostró la mejor actividad en monocultivo.

6.4. Propiedades Tecnológicas de Leches Fermentadas en Monocultivo y Multicultivo

La leche fermentada con el multicultivo presentó un valor de pH de 5.30 siendo diferente ($P < 0.05$) al mostrado por el monocultivo de Lp39, el cual fue de 6.05. En cuanto a los resultados de acidez, el multicultivo presentó 1.5 veces más concentración de ácido láctico ($p < 0.05$) que la leche fermentada con el monocultivo de Lp39 (Figura 19). Por otro lado, el incremento en la concentración total bacteriana de la leche fermentada con el multicultivo fue de 1.45 ciclos logarítmicos ($p < 0.05$), mientras que para la leche fermentada con el monocultivo fue de 1.17 ciclos (Figura 20). Estos resultados concuerdan con lo que se ha reportado previamente, donde generalmente un consorcio bacteriano tiende a lograr una mayor acidez y un menor pH debido al metabolismo de cada una de las bacterias que conforman el consorcio, ya que puede existir una posible interacción sinérgica de las bacterias, de tal manera que una bacteria promueve el crecimiento de la otra (Ouwehand *et al.*, 2018). De manera general, se considera que el uso de múltiples cepas probióticas es más favorable que los de una sola cepa, no solo por las características tecnológicas sino también por el probable beneficio para la salud (Chapman *et al.*, 2011). Pero es importante recordar que trabajar con un multicultivo siempre será más costoso y se requerirá una mayor cantidad de recursos y de tiempo, además la eficacia clínica los multicultivos no son fácilmente patentables (Timmerman *et al.*, 2004).

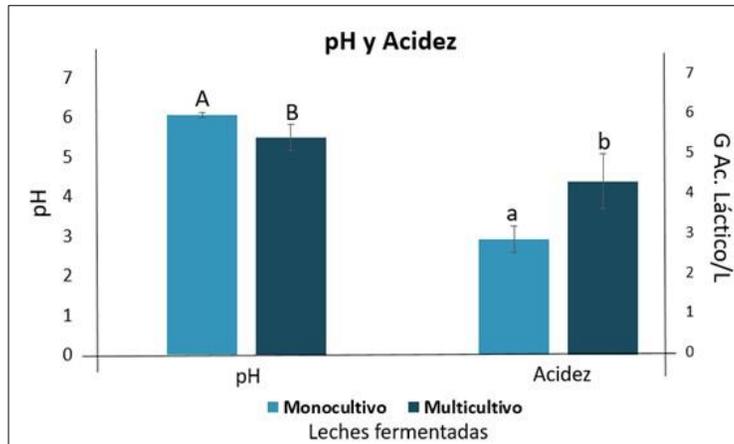


Figura 19. Valores de pH, producción de ácido láctico en leche(s) fermentada(s) en monocultivo (Lp39) y multicultivo (Lp22, Lp24 y Lp39). Los valores representan el promedio \pm desviación estándar (n=3). Letras minúsculas indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre leches fermentadas en términos de acidez, y letras mayúsculas muestra diferencia para los valores de pH.

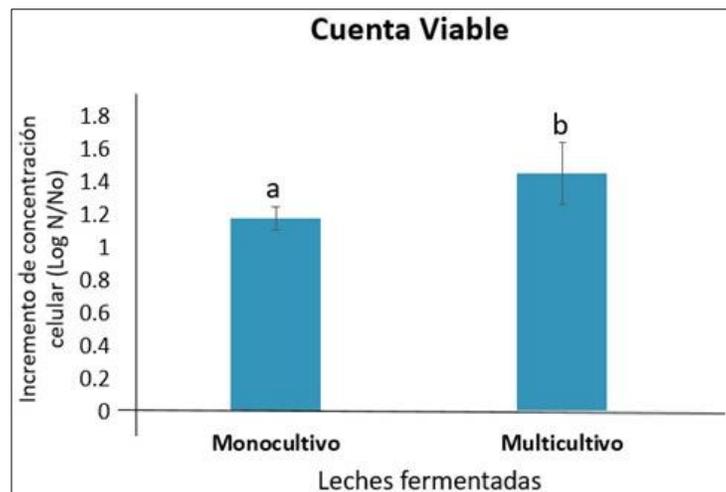


Figura 20. Incremento en la concentración celular (Log N/No) en leches fermentadas en monocultivo (Lp39) y multicultivo (Lp22, Lp24 y Lp39). Los valores representan el promedio \pm desviación estándar (n=3). Distintas literales indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre leches fermentadas.

6.5. Actividad Antioxidante de Leches Fermentadas en Monocultivo y Multicultivo

No se observó diferencia ($P > 0.05$) en la actividad antioxidante determinada por el método de ABTS entre las leches fermentadas con mono y multicultivo. Sin embargo, cuando se determinó por la

técnica de ORAC, la leche fermentada con la cepa Lp39 presentó mayor actividad ($P < 0.05$) que la leche fermentada con el multicultivo (Figura 21). Comparando los resultados obtenidos por ambas técnicas, el método ORAC tiene mayor relevancia biológica, debido a que utiliza un radical de origen fisiológico (Aguilar-Toalá, 2014; Dávalos *et al.*, 2004). Es importante destacar, que aunque el multicultivo presentó mejores propiedades tecnológicas, el efecto funcional, en términos de actividad antioxidante, fue mejor para el monocultivo. Esto podría ser relevante, ya que se ha reportado que una mayor actividad antioxidante enzimática en el cerebro de ratones, induce conductas menos compulsivas y ansiosas (Luang-In *et al.*, 2020).

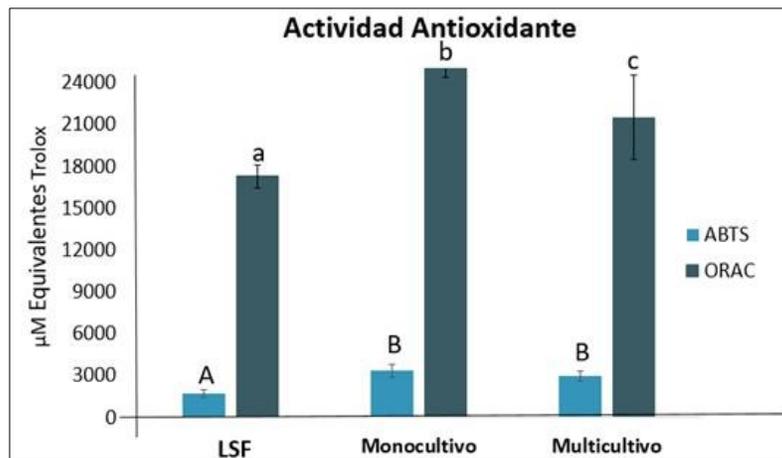


Figura 21. Actividad antioxidante por el método ABTS y ORAC en leches fermentadas en monocultivo (Lp39) y multicultivo (Lp22, Lp24 y Lp39). Los valores representan el promedio \pm desviación estándar ($n=3$). Letras minúsculas indican diferencia ($P < 0.05$) entre leches fermentadas por el método de ORAC y letras mayúsculas para los resultados obtenidos por el método de ABTS.

6.6. Actividad Antiinflamatoria de Leches Fermentadas en Monocultivo y Multicultivo

En las técnicas de actividad antiinflamatoria (inhibición de tripsina y lipoxigenasa) no hubo diferencias ($P > 0.05$) entre mono- y multicultivo (Figura 22). Estos resultados podrían indicar que los compuestos presentes en ambas leches fermentadas son las que participan en los procesos de inhibición, por lo que no es necesario la mezcla de cultivos para incrementar dicha actividad. Los porcentajes de inhibición observados en ambas técnicas, sugieren que las leches fermentadas

podrían conducir a una disminución en la producción de moléculas inflamatorias (Valera-Molina, 2019), lo cual podría ser benéfico, ya que la reducción de citocinas proinflamatorias podría conllevar a una regulación negativa del cortisol, reduciendo la posibilidad de un deterioro cognitivo y la producción de trastornos como la depresión y la ansiedad (Sequeira y Fornaguera, 2009; Villa y González, 2012). Por lo cual, es importante evaluar *in vivo* el efecto de la administración de estas leches fermentadas.

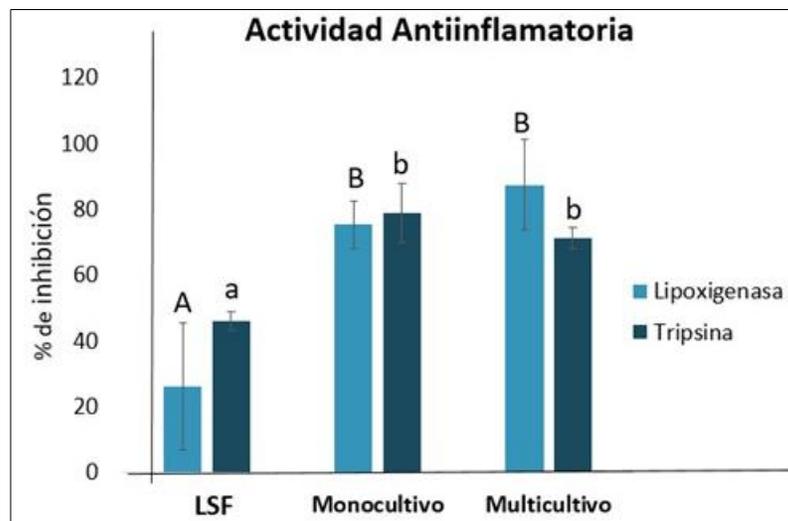


Figura 22. Porcentajes de inhibición de tripsina y lipoxigenasa en leches fermentadas en monocultivo (Lp39) y multicultivo (Lp22, Lp24 y Lp39). Los valores representan el promedio \pm desviación estándar ($n=3$). Letras minúsculas indican diferencia ($P<0.05$) entre leches fermentadas en tripsina y letras mayúsculas en lipoxigenasa.

6.7. Actividad Proteolítica de Bacterias Ácido Lácticas en Leches Fermentadas

Con la finalidad de indagar la naturaleza de alguno de los compuestos que podrían estar involucrados tanto en la actividad antioxidante y antiinflamatoria, se evaluó la actividad proteolítica (liberación de grupos amino) de las cepas de manera individual y en forma conjunta (multicultivo). La concentración de L-Leucina fue aproximadamente tres veces mayor que lo obtenido en los monocultivos de leche fermentada ($P<0.05$) (Figura 23). Estos resultados indican que las bacterias de estudio están hidrolizando las proteínas de la leche y liberando péptidos que

podrían tener actividad biológica; además, la liberación de algunos aminoácidos aumentan la calidad nutritiva del alimento y pueden mejorar sus características sensoriales (Villadóniga *et al.*, 2009). En estudios previos se ha documentado que las BAL secretan proteinasas que hidrolizan lactoproteínas con el subsecuente aumento en la concentración de los grupos amino libres (González-Córdova *et al.*, 2011).

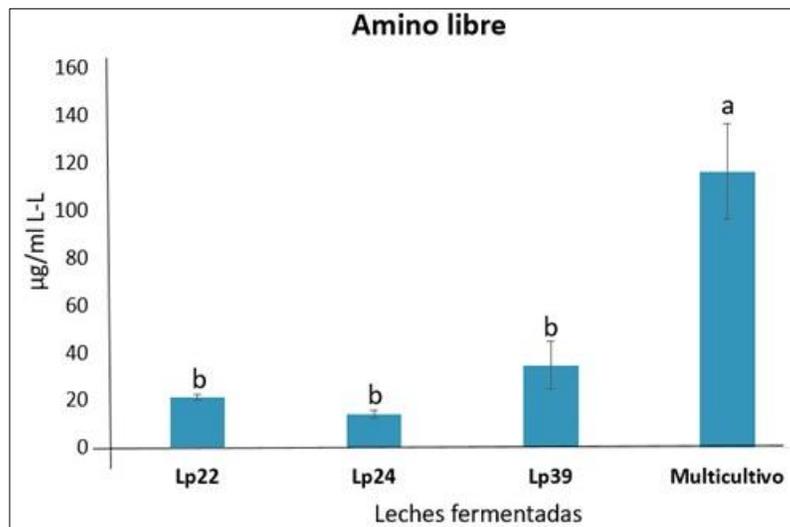


Figura 23. Actividad proteolítica de bacterias ácido lácticas, en mono cultivo, en leches fermentadas y multicultivo (Lp22, Lp24 y Lp39). Los valores representan el promedio \pm desviación estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencia ($P < 0.05$) entre leches fermentadas.

Los resultados de actividad proteolítica fueron correlacionados con los resultados obtenidos en actividad antioxidante y antiinflamatoria. En el Cuadro 2 se puede observar que la actividad proteolítica se correlaciono con la actividad de lipoxigenasa de manera positiva, y de manera negativa para la actividad antioxidante (método de ABTS). Estos datos sugieren que los amino libres o péptidos presentes en la leche fermentada no participan en la actividad antioxidante obtenida *in vitro*. Considerando estos hallazgos, se puede destacar que no solo los péptidos podrían estar involucrados en la actividad antioxidante o antiinflamatoria, ya que la matriz láctea es muy compleja, y estas características pueden deberse a otros componentes.

Cuadro 2. Correlación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria con la actividad proteolítica de las bacterias ácido lácticas en leche(s) fermentada(s).

Actividad Antioxidante y Antiinflamatoria	Correlación de Pearson (r)	Valor de P
ORAC	-0.5870	0.1260
ABTS	-0.9091	0.0018
Lipoxigenasa	0.7220	0.0431
Tripsina	-0.6749	0.0663

6.8. Resultados de los Ensayos no Condicionados de Comportamiento

Los ratones que recibieron los diferentes tratamientos se mantuvieron saludables durante todo el experimento. No presentaron signos de diarrea, pérdida de peso o de apetito.

6.8.1. Efecto Ansiolítico en Ratones

En el ensayo de laberinto elevado (EPM), aunque se observó una tendencia a incrementar el tiempo de permanencia (expresado en segundos) en los brazos abiertos del laberinto por parte de los animales tratados con la LF (Figura 24A), respecto a los animales tratados con el fármaco ansiolítico (Rans) y los animales estresados (RE), dicha tendencia no fue ($P > 0.05$) significativa.

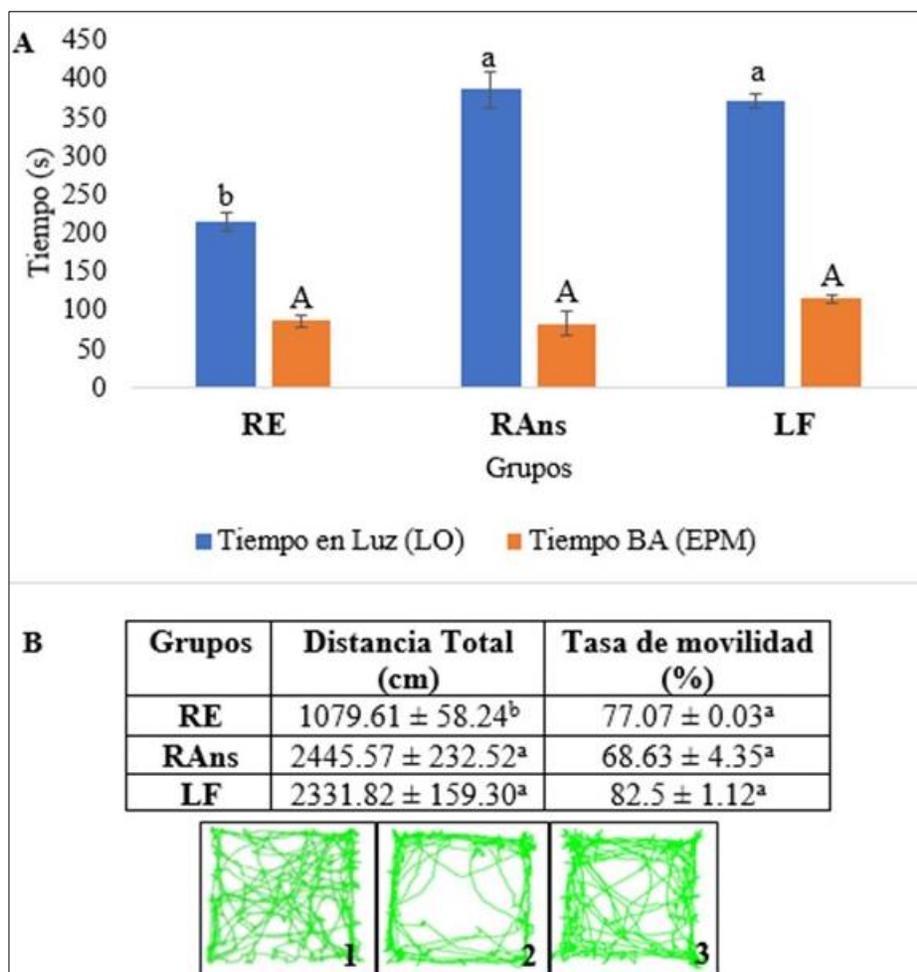


Figura 24. Efecto de los tratamientos sobre el comportamiento de ansiedad en el ensayo de laberinto elevado (EPM) y de luz-oscuridad (LO) (A), y ensayo de campo abierto (B). 1) Animales estresados (RE), 2) Animales estresados administrados con ansiolítico (RAns), 3) Animales estresados administrados con leche fermentada (LF). Los valores representan la media \pm SEM (n=5). Literales distintas indican diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$). BA: Brazos Abiertos.

En contraste, el tiempo de permanencia (expresado en segundos) en el campo claro, en el ensayo de Luz-Oscuridad (LO), fue significativamente mayor ($P < 0.05$) por parte de los animales tratados con la LF (386 s), comparado al de los animales del grupo estresado (214 segundos), e igual al de los animales tratados con el fármacos (372 s).

Por otra parte, se observó que la tasa de movilidad (expresada en el porcentaje) en el ensayo de campo abierto (OFT) fue igual ($P > 0.05$) entre todos los grupos (Figura 24B). De forma similar, no se registró diferencia en la distancia total recorrida (expresada en centímetros) entre los animales del grupo RAns y los del grupo LF, sin embargo, dicha distancia fue significativamente mayor a la

mostrada por los animales del grupo RE ($P < 0.05$). Así mismo, se observó que el patrón de comportamiento (recorrido, actividad cerca de la pared y zona central) realizado por los animales del grupo administrado con LF fueron semejantes a los realizados por los animales que recibieron el fármaco (Figura 24B, imágenes 1, 2 y 3), cuya tendencia fue moverse de una forma sistemática, contraria al presentado por los animales estresados, cuyos movimientos fueron más erráticos y heterogéneos, comportamiento no habitual de un ratón.

De manera general, se pudo observar como los ratones tratados con la leche fermentada y con el fármaco ansiolítico, presentaron una mayor preferencia por el área abierta (prueba de EPM) e iluminada (prueba de LO). Lo cual refleja un comportamiento del tipo ansiolítico (Daugé *et al.*, 2020; Walf y Frye, 2007). Esto debido a que los mecanismos fisiológicos "normales" de los roedores, tienden a tener miedo por las áreas abiertas e iluminadas (como las áreas de la prueba mencionada anteriormente), por lo que una preferencia sobre esta zonas, nos indica que los ratones se expusieron a actividades que desafían el comportamiento ansioso. Estos comportamientos se equiparan con mecanismos que ocurren en los seres humanos (Ramalho *et al.*, 2019, Stenman *et al.*, 2020). Por otra parte, en la prueba EPM no se obtuvo diferencia en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto, y el porcentaje de entradas en brazos abiertos (Datos no mostrados). Aunque algunos datos de la literatura han demostrado un efecto ansiogénico en la prueba de EPM (Daugé *et al.*, 2020). Cabe mencionar que algunas condiciones de estrés evaluadas en algunos estudios fueron mayores en comparación con las evaluadas en este estudio, lo cual podría influir en la respuesta ansiolítica de los ratones (Liang *et al.*, 2015; Ramalho *et al.*, 2019). En el ensayo de campo abierto, se origina conflicto al roedor, por lo que generalmente presenta impulsos opuestos a explorar nuevos entornos y a áreas brillantes/expuestas (Bailey y Crawley, 2009; Sturman *et al.*, 2018). La mayoría de los roedores presenta una tendencia a pasar la mayor parte del tiempo en cercanía a las paredes, además, de generar inmovilidad lo cual es un índice de ansiedad (Gould *et al.*, 2009). Por lo que, como pudo observarse en la Figura 24B (imágenes 1, 2 y 3) el grupo tratado con el fármaco y con la LF presentaron una mayor tendencia a explorar las áreas de la caja, al tener una mayor distancia recorrida, incluyendo el área central, la cual es el área más desprotegida y amenazante para el animal.

6.8.2. Pruebas de Comportamiento Depresivo en Ratones

Los tiempos de inmovilidad en las pruebas de suspensión en cola (TST) y natación forzada (FST) se muestran en la Figura 25A y 25B, respectivamente. En los resultados se observa que en la prueba de TST, el grupo tratado con el antidepresivo (RAnt) y el administrado con LF obtuvieron los tiempos promedio de congelamiento (considerando como aquel tiempo en el que el ratón se queda completamente inmóvil) similares ($P>0.05$), mismos que fueron significativamente menores ($P<0.05$) que el mostrando por el grupo de animales estresados.

En el caso de la prueba FST, el grupo que recibió la LF mostró el menor tiempo de inmovilidad (27 s), siendo diferente al del grupo de animales estresados ($P<0.05$), pero similar al del grupo tratado con el antidepresivo. Adicionalmente, la trayectoria de la movilidad representativa de los animales de cada grupo evidenció que el grupo de ratones administrado con la LF fue mayor a la de los otros dos grupos, RE y RAnt (Figura 25B, imagen 1, 2 y 3).

Por último, en la prueba de preferencia a la sacarosa (Figura 25C), no hubo diferencias significativas entre el grupo de animales estresados y el grupo tratado con el fármaco, mientras que el grupo tratado con LF mostró mayor preferencia a la solución azucarada ($P<0.05$).

Estas tres pruebas son las principales consideradas para evaluar un comportamiento depresivo en animales. En la prueba de suspensión en cola, se observó una clara disminución en el tiempo de congelamiento por parte del grupo tratado con el antidepresivo seguido del grupo con la LF, lo cual ya ha sido comprobado en estudios anteriores (Hodes *et al.*, 2010; Stukalin *et al.*, 2020). Estos momentos de inmovilidad son considerados los momentos "depresivos" del ratón, ya que deja de luchar por sobrevivir y es tomado como una actitud de desesperanza (aparentemente se rinde) (Armario, 2021). Por lo que este tipo de pruebas son herramientas válidas para capturar cuantitativa y consistentemente los efectos depresivos (Stukalin *et al.*, 2020). De igual manera, la prueba de nado forzado (FST), se basa en el mismo principio; sin embargo, aquí el grupo con el fármaco presentó estadísticamente los mismos niveles de inmovilidad que el grupo RE. Mientras que el grupo tratado con LF pasó menos segundos inmóviles, demostrando un comportamiento de tipo antidepresivo.

Por último, el ensayo de preferencia a la sacarosa, se basa en la incapacidad de experimentar placer por alguna actividad agradable o gratificante (en este caso, la recompensa del agua azucarada), un

síntoma típico de la depresión (Zhang *et al.*, 2017). En esta prueba la preferencia por la solución azucarada fue menor para el grupo RE y RAnt, demostrando anhedonia (incapacidad de experimentar placer por actividades placenteras) por parte de esos ratones, siendo este un síntoma característico en las pruebas de depresión. Exponiendo entonces, que el modelo animal presentó síntomas de depresión (Liu *et al.*, 2018). Considerando el fundamento de la prueba, en el presente estudio, el grupo que administrado con LF mostró mayor preferencia por la sacarosa, indicando una disminución en síntomas de depresión del animal, tal y como lo demuestran estudios donde el tratamiento con antidepressivos restaura la preferencia por la sacarosa (Liu *et al.*, 2015).

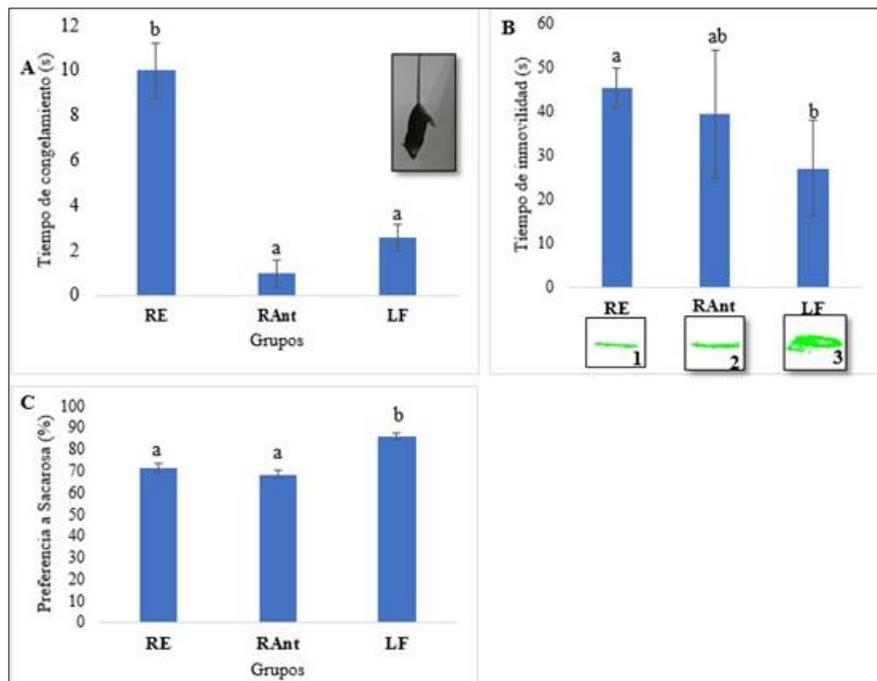


Figura 25. Efecto de los tratamientos sobre el comportamiento similar a la depresión en las pruebas de suspensión en cola (A) y de natación forzada (B). 1) Animales estresados (RE), 2) Animales estresados administrados con Fluoxetina (RAnt), 3) Animales estresados administrados con leche fermentada (LF). Literales distintas indican diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$).

6.9. Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante determinada por los métodos de ABTS y ORAC en muestras de hígado

e hipocampo se reportan en la Figura 26. En las muestras de hígado (Figura 26A), la actividad antioxidante reportada por el método ABTS fue similar la concentración para ambos grupos ($P>0.05$). Por el contrario, en el ensayo de ORAC, el grupo de animales estresado mostró mayor actividad antioxidante ($P<0.05$), comparado con el grupo tratado con leche fermentada. En cuanto a la muestra de hipocampo (Figura 26B), la tendencia fue contraria, el grupo tratado con LF presentó 3.02 veces y 2.68 mayor actividad tanto en el ensayo de neutralización del radical ABTS como en el ensayo de ORAC, respectivamente ($P<0.05$).

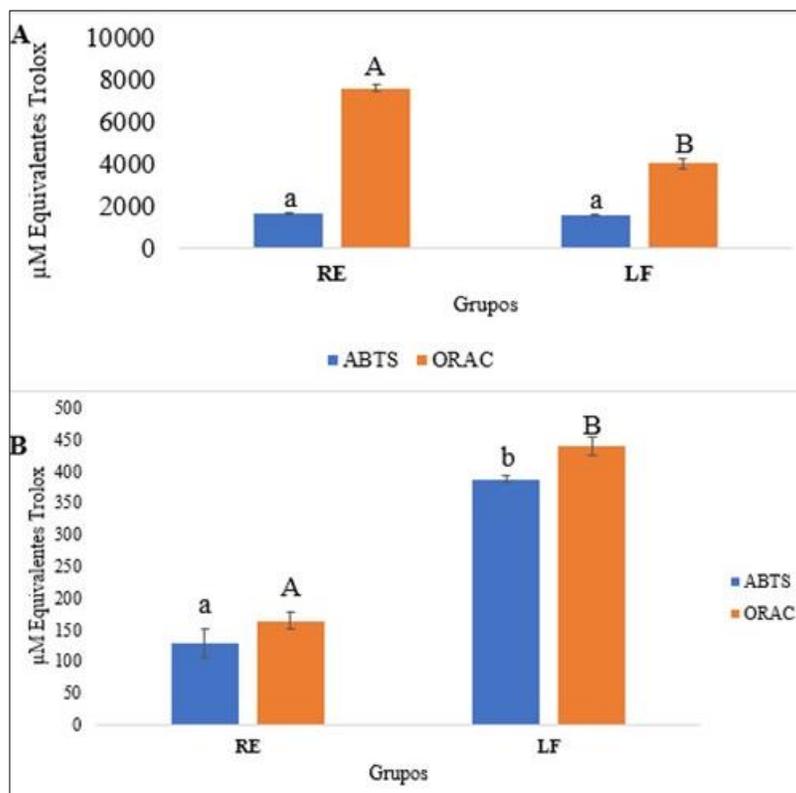


Figura 26. Actividad antioxidante por los métodos ABTS y ORAC. (A) muestras de hígado, (B) muestras de hipocampo. Los valores representan la media \pm SEM (n=5). Literales distintas indican diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$). RE= Animales estresados (RE), LF= Animales estresados administrados con leche fermentada.

En varios estudios se ha demostrado que bacterias probióticas pueden ejercer actividad antioxidante de diferentes maneras, reduciendo el daño causado por la oxidación (Wang *et al.*, 2017). Por lo que estos resultados concuerdan con lo reportado en estudios previos de nuestro grupo de laboratorio,

donde esta actividad antioxidante puede deberse a la presencia de diversas enzimas como SOD, CAT, GPx (Rosas-Anaya, 2021). Por ello, el haber obtenido una menor actividad antioxidante en hígado, nos demuestra que el tratamiento con LF logró reducir la oxidación y no se requirió atrapar tantos radicales peroxilo, debido a que no se habían formado. En cuanto a los resultados en muestras de hipocampo, se observa una alta actividad antioxidante, por lo que hubo una gran cantidad de moléculas antioxidantes intentando disminuir la oxidación a nivel cerebral.

6.10. Actividad de Enzimas Antioxidantes

En el Cuadro 3 se presentan los valores obtenidos de la actividad antioxidante enzimática (a saber, CAT y GPx) y no enzimática (MDA) de las muestras de hígado e hipocampo de los grupos RE y LF. En las muestras de hígado, se observó que el grupo administrado con LF presentó 1.20 veces mayor actividad GPx que el grupo RE ($P < 0.05$). Aunque los niveles de MDA fueron 1.94 veces menor, la respuesta de CAT fue menor en este grupo ($P < 0.05$).

Por otra parte, en las muestras de hipocampo, se observó que únicamente la actividad de CAT ($P < 0.05$) fue mayor para el grupo tratado con LF; por el contrario, se presentaron mayores niveles de MDA ($P > 0.05$) y actividad GPx en el grupo tratado con LF ($P < 0.05$).

Estos resultados indican que a diferencia de la actividad antioxidante (ABTS, ORAC), las enzimas antioxidantes tienen mayor participación para disminuir el estrés oxidativo, a nivel de hígado, puede ser regulado por la actividad de GPx; mientras que en hipocampo, puede ser regulado por la actividad de CAT. Estos resultados son favorables, indicando que la administración de leche fermentada puede regular en dos órganos importantes, generando una respuesta antioxidante. El efecto en peroxidación lipídica, reflejada por el malondialdehído, aumenta en casos de depresión (Palta *et al.*, 2014) y en el trastorno bipolar; sin embargo se pudo observar que la leche fermentada puede regular esta actividad a nivel de hígado, aunque en hipocampo, no se mostró diferencia. En un estudio previo, los niveles de MDA fueron más bajos en el grupo tratado con bacterias probióticas, lo cual puede estar asociado a la mayor actividad de CAT y GPx, ya que estas enzimas son importantes para la estabilización de especies reactivas de oxígeno y pueden detener el proceso de peroxidación lipídica inducido por agentes oxidantes (González-González *et al.*, 2020).

Cuadro 3. Actividad de enzimas antioxidantes (U/g P) en muestras de hígado e hipocampo.

	Grupos	Hígado	Hipocampo
CAT	RE	12.830 ± 0.570 ^A	0.937±0.067 ^a
	LF	6.841± 0.491 ^B	1.134±0.064 ^b
MDA	RE	0.733 ± 0.049 ^A	0.634±0.026 ^a
	LF	0.378 ± 0.026 ^B	0.903±0.078 ^a
GPx	RE	20.75±1.844 ^A	2.077±0.091 ^a
	LF	25.44± 0.737 ^B	1.066± 0.095 ^b

Los valores representan la media ± SEM (n=5). Literales distintas indican diferencias entre grupos (P <0.05). RE= Animales estresados (RE), LF= Animales estresados administrados con leche fermentada.

A nivel cerebral, se sabe que se requiere de un alto consumo de oxígeno y al ser un entorno rico en lípidos es muy susceptible al daño oxidativo, ya que sus ácidos grasos son propensos a la peroxidación lipídica y por tanto generar una alteración en la función neuronal (Bhatt *et al.*, 2020; Salim, 2014). Sin embargo, la expresión de la enzima CAT (evita la producción de radicales hidroxilo al descomponer el peróxido de hidrogeno), por mencionar un ejemplo, por lo que el aumento de esta enzima es favorable, lo cual puede observarse en el grupo tratado con LF (Cuadro 3). Por lo que el aumento en enzimas antioxidantes a nivel cerebral se puedan asociar con el efecto antidepressivo y ansiolítico, como ha sido descrito por otros autores (Luang-In *et al.*, 2020).

6.11. Cuantificación del Índice de Estrés Oxidativo

Los resultados obtenidos del estado oxidante total (niveles de H₂O₂) y la actividad antioxidante total (representada por el valor en ABTS), se reflejan en la cuantificación del Índice de Estrés Oxidativo (OSi, por sus siglas en inglés) (Figura 27). En ambas muestras (hígado e hipocampo) obtenidas del grupo tratado con LF, se observó una disminución significativa del índice de estrés oxidativo (P<0.05).

Al igual que los niveles de MDA, la concentración de H₂O₂ también se ha utilizado como indicador de estrés oxidativo. Es por ello que, altas concentraciones de H₂O₂ están estrechamente relacionadas con la peroxidación lipídica, donde el H₂O₂ en la célula puede convertirse mediante la reacción de Fenton en el radical hidroxilo, un compuesto altamente reactivo que participa en el inicio de la peroxidación lipídica (Valko *et al.*, 2007). Como se ha mencionado, el estrés oxidativo está implicado en los trastornos mentales (Salim, 2014; Schiavone *et al.*, 2015), por lo que la

administración de LF podría promover la regulación del sistema antioxidante. Este mecanismo de regulación se puede generar al activar el sistema antioxidante enzimático (CAT, SOD y GPx), ya que estas pueden proteger contra el estrés oxidativo, tanto en hipocampo como en hígado, al desempeñar funciones esenciales en la degradación de los aniones superóxido y peróxido de hidrógeno (Wang *et al.*, 2020).

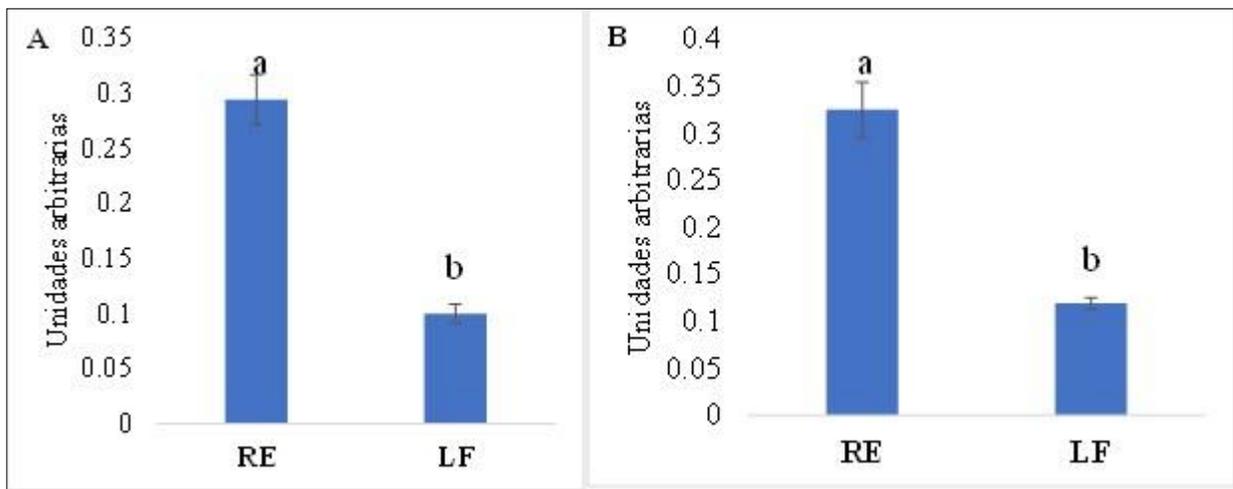


Figura 27. Determinación de índice de estrés oxidativo. (A) Muestras de Hígado, (B) Muestras de Hipocampo. Los valores representan la media \pm SEM (n=5). Literales distintas indican diferencias entre grupos ($P < 0.05$). RE= Animales estresados (RE), LF= Animales estresados administrados con leche fermentada.

6.12. Cuantificación de Biomarcadores Inflamatorios

La cuantificación de las citocinas TNF y MCP1 no mostraron diferencias significativas en muestras de suero ($P > 0.05$) (Figura 28). Pero se puede observar que la citocina reguladora IL-10 presentó mayor concentración en el grupo tratado con LF; mientras que en el grupo RE no fue posible determinar su concentración. Por el contrario, la citocina IL-6 se encontró en mayor concentración en el grupo RE con 1.72 pg/mL mientras que el grupo LF obtuvo 0.832 pg/mL ($P < 0.05$).

Los resultados obtenidos evidenciaron que se puede estar generando un efecto de regulación en la producción de citocinas, a nivel sistémico. Estudios recientes han sugerido que la función inmunitaria puede jugar un papel fundamental en personas con trastornos depresivos y de ansiedad,

y que la regulación en la producción de citocinas pro y antiinflamatorias podría ser una vía para disminuir los síntomas asociados a estos trastornos (Huang *et al.*, 2018). Por ejemplo, en algunos estudios clínicos, por ejemplo, se observó que se tiene una mayor proporción sérica de IL-6 y un nivel más bajo en IL-10 en pacientes con trastorno depresivo, mayor que en aquellos pacientes sin este trastorno (Dhabhar *et al.*, 2009), además que Pace y col. (2006) demostraron que IL-6 se correlaciona positivamente con la gravedad de la depresión en ciertos pacientes. Es por ello que la administración de la LF puede estar favoreciendo la regulación de marcadores de inflamación asociados a estos trastornos.

Adicionalmente, la producción de MCP1 en suero es un buen indicio, ya que esta quimiocina se expresa en áreas neuronales lo que lleva a un tipo de modulación en esta zona. MCP-1 se produce entonces, después de la inducción de estrés oxidativo y se ha relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades del SNC, como Alzheimer y otros trastornos que se acompañan de síntomas depresivos (Pae, 2014; Young *et al.*, 2014). Esta información respalda que las mismas pruebas utilizadas generaron estrés en los animales y esto se vio reflejado en el comportamiento. Por último, se pudo cuantificar TNF- α , la cual es una citocina secretada principalmente por macrófagos, promoviendo la proliferación celular y la inflamación, como se puede observar en la Figura 28, la concentración de esta proteína es baja lo cual es favorable, ya que en diversos estudios se ha observado que los pacientes con trastornos en el estado de ánimo tienen a tener niveles elevados de TNF- α en plasma (Uzzan y Azab, 2021). Esto es importante a considerar ya que una alta concentración de TNF inhibe la liberación del neurotransmisor norepinefrina generando depresión (Fasick *et al.*, 2015). Con estos antecedentes podemos sugerir que la administración de la leche fermentada podría regular la producción de citocinas inflamatorias y modular el estado de depresión y ansiedad.

Entonces, tal como la evidencia sugiere, la inflamación puede ser una de las posibles teorías o causas de los trastornos psiquiátricos (Uzzan y Azab, 2021; Villa y González, 2012), lo cual se ha reforzado con los fármacos recetados, los cuales poseen efectos antiinflamatorios (Kappelmann *et al.*, 2018) por lo que el hecho de que nuestro grupo tratado con LF regule la producción de citocinas proinflamatorias es un resultado favorecedor.

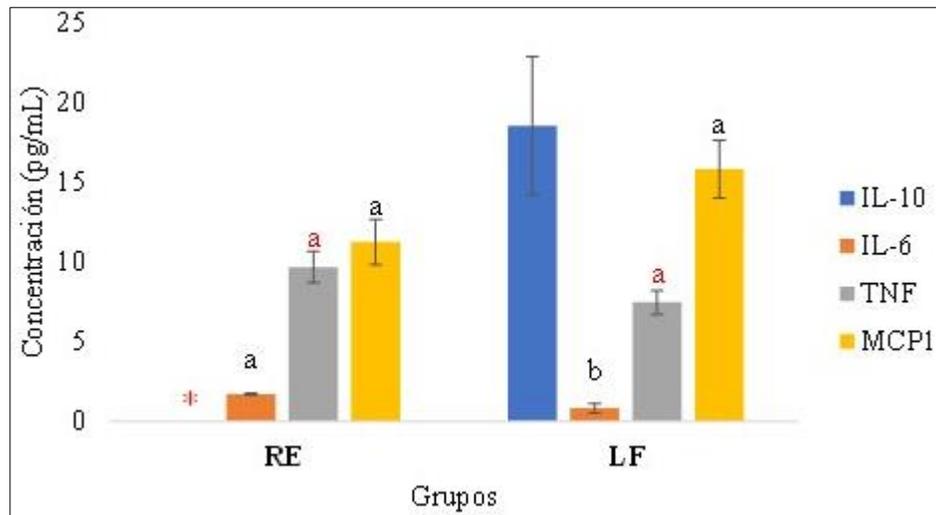


Figura 28. Efecto de la administración de los tratamientos sobre la concentración de citocinas inflamatorias en muestras de suero de ratones previamente estresados. Los valores representan la media \pm SEM (n=5). Literales distintas indican diferencias significativas entre grupos (P<0.05). *: IL-10 < límite de detección de fluorescencia (10.55).

6.12.1. Actividad de Lipoxigenasa en Muestras de Hipocampo

Los resultados de la determinación de Lipoxigenasa se muestran en la Figura 29. El grupo tratado con LF presentó mayor porcentaje de inhibición (39.42%) que el grupo RE (19.38%) (P<0.05).

Haber obtenido un mayor % de inhibición de la enzima lipoxigenasa en el grupo con LF, está correlacionado con menor inflamación en el cerebro (como se explicó en la sección 6.3). La enzima lipoxigenasa es la encargada de convertir el ácido araquidónico generando prostaglandinas proinflamatorias, prostaciclina, tromboxano y leucotrienos, produciendo también resolvinas y protectinas antiinflamatorias (Pereira *et al.*, 2020); así mismo, al inhibir la actividad de esta enzima habrá un menor reclutamiento de moléculas inflamatorias (Wisastra y Dekker, 2014).

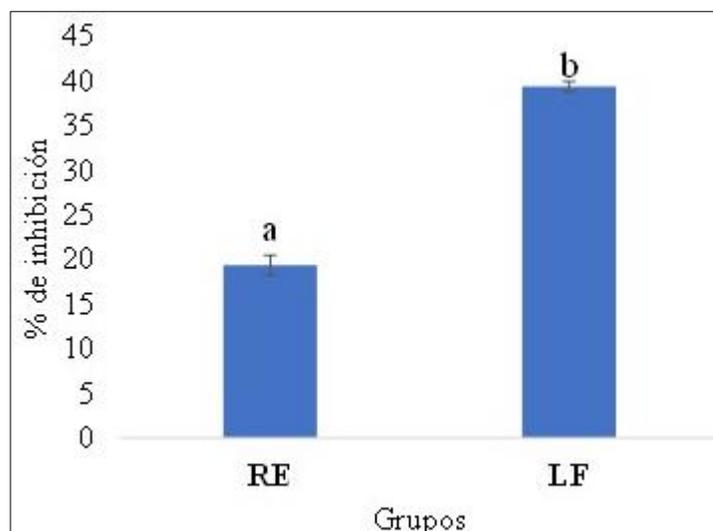


Figura 29. % de Inhibición de Lipoxigenasa en muestras de hipocampo. Los valores representan la media \pm SEM (n=5). Literales distintas indican diferencias entre grupos (P < 0.05).

Por último, el peso de las muestras de hipocampo se presenta en el Cuadro 4. En este sentido, el peso del hipocampo del grupo con LF fue de 0.076 g mientras que el grupo RE fue el más pequeño con 0.048 g (P<0.05). estos resultados concuerdan con lo reportado por Ramalho y col. (2019). Esto podría indicar que los ratones no tratados presentan una disminución en el volumen del hipocampo, lo cual es característico de pacientes con depresión (Santos *et al.*, 2018), ya que por lo general se tiene una menor expresión del BDNF lo que puede contribuir a la atrofia del hipocampo (Hernández *et al.*, 2016).

Cuadro 4. Peso promedio de hipocampo por grupo.

Grupo	Peso (g)
RE	0.048 \pm 0.003 ^b
RAns	0.070 \pm 0.002 ^{ab}
Tanto	0.069 \pm 0.003 ^{ab}
LF	0.076 \pm 0.005 ^a

Los valores representan la media \pm SEM (n=5). Literales distintas indican diferencias entre grupos (P < 0.05).

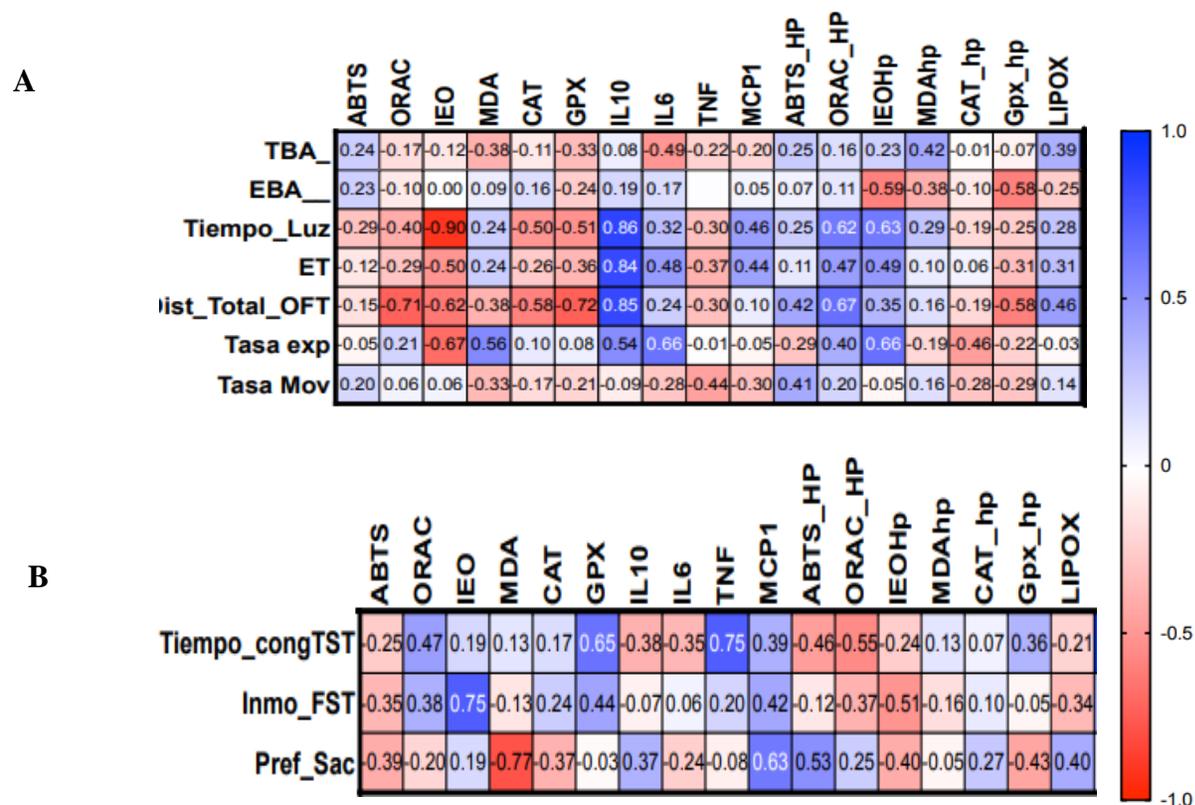
6.13 Análisis de Correlación

Se puede observar para el caso de las pruebas de ansiedad (Figura 30A), como existe una correlación fuerte y positiva por parte del parámetro Tiempo en Luz en la prueba de Luz-Oscuridad (0.86) y distancia total recorrida en la prueba OFT (0.85) con el marcador de inflamación IL-10. Esto nos indica que a mayor distancia recorrida en el campo abierto y mayor tiempo en la parte iluminada de la caja de LO, la citocina antiinflamatoria IL-10 aumenta. Lo cual concuerda con lo reportado por Huang *et al.*, 2018, por qué al recorrer una distancia mayor nos indica un menor índice de ansiedad (Gould *et al.*, 2009) y pasar más tiempo en el área iluminada (la cual no es el comportamiento normal) muestra que el ratón, debido a la inducción de IL-10, mantiene la función cerebral al reducir los niveles de inflamación, lo cual podría disminuir el posible desarrollo de ansiedad.

Por otra parte la misma prueba de distancia total se correlacionó de manera negativa con ORAC (-0.71) y con GPx (-0.72), mostrando una relación inversamente proporcional, es decir que cuando aumenta la distancia recorrida en OFT disminuye la actividad antioxidante por ORAC y la enzima GPx. Por último se observó que el tiempo en luz también correlacionó fuertemente con el OSi (-0.90) revelando que al pasar mayor tiempo en el área iluminada de la caja su OSi disminuye, ya que si pasa más tiempo en esta área no representa para el animal un estrés (como podría pensarse). Por otra parte en las pruebas de depresión (Figura 30B), se observó como el tiempo de inmovilidad en la prueba de FST correlacionó positivamente con el OSi (0.75), demostrando que un aumento en la inmovilidad del roedor es debido a un estrés oxidativo en él, lo cual ya ha sido demostrado por Kataoka y col., 2020. Además, el tiempo de congelación en la prueba TST se correlacionó con TNF (0.75), por lo que un aumento en el tiempo inmóvil del ratón puede deberse a una alta concentración de la citocina TNF. Esto concuerda con estudios previos que utilizaron esta prueba conductual, donde mencionan como las citocinas proinflamatorias, incluido el TNF- α , son importantes mediadores de aspectos conductuales, neuroendocrinos y neuroquímicos en los trastornos depresivos. Donde específicamente, TNF- α , se ha encontrado elevada en muestras de plasma de pacientes deprimidos (Budni *et al.*, 2021).

Por último la prueba de % de preferencia a sacarosa correlacionó de manera negativa con MDA (-0.77), por lo que un aumento en la preferencia por la bebida azucarada disminuye la concentración de MDA. Esto probablemente se debe a que la preferencia por la solución, nos muestra que el

tratamiento logró disminuir la depresión (Sección 6.8.2). Dado a que el malondialdehído es conocido como uno de los últimos productos de la peroxidación lipídica (asociado directamente asociada con el aumento de radicales libres), una disminución en el mismo nos puede conducir a una disminución en el daño oxidativo en el cerebro (Kosari-Nasab *et al.*, 2018).



C

Prueba de comportamiento	Antioxidantes			Antiinflamatorios		
	ORAC	IEO	GPx	MDA	IL-10	TNF
Ansiedad OFT – Distancia Total	-0.71	-	-0.72	-	0.85	-
LO – Tiempo en Luz	-	0.90	-	-	0.86	-
Depresión FST – Tiempo de inmovilidad	-	0.75	-	-	-	-
TST – Tiempo de congelamiento	-	-	-	-	-	0.75
Preferencia a Sacarosa	-	-	-	-0.77	-	-

Figura 30. Análisis de correlación entre parámetros antioxidantes y antiinflamatorios con pruebas de comportamiento. A) Correlación de Spearman para pruebas de ansiedad. B) Correlación de Spearman para pruebas de depresión. C) Cuadro con correlaciones $\geq \pm 0.7$

7. CONCLUSIONES

Las leches fermentadas durante 24 h con las cepas de *L. plantarum* Lp22, Lp24 y Lp39 y en fase estacionaria, fueron seleccionadas al mostrar los mejores resultados en términos de acidez, pH, proteólisis, concentración celular, actividad antioxidante y antiinflamatoria, destacando la leche fermentada con la cepa Lp39. Aunque la leche fermentada con el multicultivo presentó mejores propiedades tecnológicas, la actividad antioxidante del monocultivo de Lp39 exhibió mayor actividad antioxidante por el método de ORAC, y la actividad antiinflamatoria no mostró diferencia significativa entre mono y multicultivo.

En general, la leche fermentada con *L. plantarum* Lp39, presentó un efecto ansiolítico y antidepresivo. los parámetros bioquímicos evaluadas sugieren que dicha actividad se ve regulada por la disminución de estrés oxidativo y por acción de la actividad de lipoxigenasa. Esta última siendo de mayor impacto en hipocampo, región donde se ven reguladas las pruebas de comportamiento.

8. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos de la presente investigación respaldan el uso de leches fermentadas como posibles coadyuvantes para el manejo de depresión y ansiedad. Sin embargo, algunas de las variables asociadas a depresión y ansiedad no mostraron diferencia significativa, pero sí una tendencia a mejorar el estatus antioxidante y antiinflamatorio. Por lo que se podría considerar un mayor tiempo de administración de la leche fermentada o un aumento en las unidades experimentales, para confirmar dichos efectos. Además, son necesarios más estudios que permitan elucidar los mecanismos asociados con depresión y ansiedad y buscar cuáles son los metabolitos responsables de generar dicho efecto, además de buscar que otros marcadores podrían considerarse como importantes para evaluar la depresión y ansiedad. Por lo que el uso de nuevas técnicas analíticas y ensayos *in silico* podrían ayudar a complementar la información obtenida hasta el momento en los diferentes ensayos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adibhatla RM. y Hatcher JF. 2007. Role of lipids in brain injury and diseases. *Future Lipidol*, 2, 403–422.
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- Aguilar-Toalá J., 2014. Determinación de la capacidad antioxidante de péptidos bioactivos aislados de queso crema de Chiapas (maestría de ciencias). Noviembre 2014. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora.
- Aguilar-Toalá, J. E., Estrada-Montoya, M. C., Liceaga, A. M., García, H. S., González-Aguilar, G. A., Vallejo-Cordoba, B., y Hernández-Mendoza, A. 2019. An insight on antioxidant properties of the intracellular content of *Lactobacillus casei* CRL-431. *LWT-Food Science and Technology*, 102, 58-63.
- Ait-Belgnaoui, A., Colom, A., Braniste, V., Ramalho, L., Marrot, A., Cartier, C., Houdeau, E., Theodorou, V., y Tompkins, T. 2014. Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Neurogastroenterology and Motility*. 26 (4), 510–520.
- Ait-Belgnaoui, A., Durand, H., Cartier, C., Chaumaz, G., Eutamene, H., Ferrier, L. y Theodorou, V. 2012. Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 37(11), 1885–1895.
- Akkasheh, G., Kashani-Poor, Z., Tajabadi-Ebrahimi, M., Jafari, P., Akbari, H., Taghizadeh, M., Memarzadeh, M. R., Asemi, Z. y Esmailzadeh, A. 2016. Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition*, 32(3), 315–320.
- Armario, A. 2021. The forced swim test: Historical, conceptual and methodological considerations and its relationship with individual behavioral traits. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 128, 74–86.
- Ashaolu, T. J., y Fernández-Tomé, S. 2021. Gut mucosal and adipose tissues as health targets of the immunomodulatory mechanisms of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 112, 764–779.
- Aslam, H., Green, J., Jacka, F. N., Collier, F., Berk, M., Pasco, J. y Dawson, S. L. 2020. Fermented foods, the gut and mental health: a mechanistic overview with implications for depression and anxiety. *Nutritional Neuroscience*, 23(9), 659-671.
- Association of Official Analytical Chemists International (AOAC) 2000. *Official Methods of Analysis of A.O.A.C. international; agricultural chemicals, contaminants, drugs*, 17a Edición. MD, EEUU.
- Bailey, K. R., & Crawley, J. N. (2009). Anxiety-related behaviors in mice.
- Bauer K., Huus K., y Finlay B. 2016. Microbes and the mind: emerging hallmarks of the gut microbiota–brain axis. *Cellular Microbiology*, 18(5), 632-644.

- Bautista M. 2020. Aprovechamiento de lactosuero de la empresa Ecolac en la elaboración de postres lácteos (Tesis de maestría). Junio 2020. Universidad Técnica particular de Loja. Loja, Ecuador.
- Belovicova, K., Bogi, E., Csatlosova, K. y Dubovicky, M. 2017. Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. *Interdisciplinary Toxicology*, 10(1), 40-43.
- Beltrán-Barrientos L., 2010. Evaluación in vitro de la actividad antioxidante en leche fermentadas por *Lactococcus lactis* (tesis de licenciatura). Junio 2010. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Querétaro.
- Bhatt, S., Nagappa, A. N., y Patil, C. R. 2020. Role of oxidative stress in depression. *Drug Discovery Today*, 25(7), 1270-1276.
- Black, C. N., Bot, M., Scheffer, P. G., Cuijpers, P., & Penninx, B. W. J. H. 2015. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 51, 164–175.
- Bouayed, J., Rammal, H., y Soulimani, R. 2009. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(2), 63-67.
- Bravo, J.A., Forsythe, P., Chew, M.V., Escaravage, E., Savignac, H.M., Dinan, T.G., Bienenstock, J. y Cryan, J. 2011 Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 108, 16050–16055.
- Budni, J., Moretti, M., Freitas, A. E., Neis, V. B., Ribeiro, C. M., de Oliveira Balen, G., & Rodrigues, A. L. S. 2021. Behavioral and neurochemical effects of folic acid in a mouse model of depression induced by TNF- α . *Behavioural Brain Research*, 414, 113512.
- Burokas, A., Moloney, R., Dinan, T., y Cryan, J. 2015. Microbiota regulation of the mammalian gut–brain axis. *Advances in Applied Microbiology*, 91, 1-62.
- Caetano, A. C., da Veiga, L. F., Capaldi, F. R., de Alencar, S. M., Azevedo, R. A., & Bezerra, R. M. 2013. The antioxidant response of the liver of male Swiss mice raised on a AIN 93 or commercial diet. *BMC Physiology*, 13, 3.
- Capuco, A., Urits, I., Hasoon, J., Chun, R., Gerald, B., Wang, J. y Viswanath, O. 2020. Gut Microbiome Dysbiosis and Depression: a Comprehensive Review. *Current Pain and Headache Reports*, 24(7), 36.
- CDC - Centros para el Control y Prevención de Enfermedades. 2020. Afecciones mentales: Depresión y Ansiedad. Consultado el 15 de marzo de 2021 en: <https://www.cdc.gov/tobacco/campaign/tips/spanish/enfermedades/tabaquismo-afecciones-mentales-depression-ansiedad.html>
- Cénat J., Blais-Rochette C., Kokou-Kpolou C., Noorishad P., Mukunzi J., McIntee S., Dalexis R., Goulet M. y Labelle P. 2020. Prevalence of symptoms of depression, anxiety, insomnia, posttraumatic stress disorder, and psychological distress among populations affected by the COVID-19 pandemic: A systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Research*, 295,113599.
- Chang, H. Y., Chen, J. H., Chang, J. H., Lin, H. C., Lin, C. Y. y Peng, C. C. 2017. Multiple strains probiotics appear to be the most effective probiotics in the prevention of necrotizing

enterocolitis and mortality: An updated meta-analysis. *PloS one*, 12(2), e0171579.

- Chao L., Liu C., Sutthawongwadee S., Li Y., Lv W., Chen W., Yu L., Zhou J., Guo A., Li Z. y Guo, S. 2020. Effects of probiotics on depressive or anxiety variables in healthy participants under stress conditions or with a depressive or anxiety diagnosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Frontiers in Neurology*, 11, 421.
- Chapman, C. M., Gibson, G. R., y Rowland, I. 2011. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *European Journal of Nutrition*, 50(1), 1-17.
- Charan, J. y Kantharia, N. D. 2013. How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 4(4), 303–306.
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H. y Catignani, G. L. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66(6), 1219–1227.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., y Salminen, S. 2007. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: in vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods*, 71(1), 71-74.
- Cryan, J.F., Markou, A. y Lucki, I. 2002. Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs. *Pharmacology Sciences*, 23, 238–245.
- Cryan J. y Dinan T. 2012. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 13, 701–712.
- Cuevas-González P.F., Aguilar-Toalá J.E., García H.S., González-Córdova A.F., Vallejo-Cordoba B., y Hernández-Mendoza A. 2020. Protective Effect of the Intracellular Content from Potential Probiotic Bacteria against Oxidative Damage Induced by Acrylamide in Human Erythrocytes. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 12, 1459–1470.
- Daugé, V., Philippe, C., Mariadassou, M., Rué, O., Martin, J. C., Rossignol, M. N. y Naudon, L. 2020. A probiotic mixture induces anxiolytic-and antidepressive-like effects in Fischer and maternally deprived Long Evans rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14, 581296.
- Dávalos A., Gómez-Cordovés C. y Bartolomé B. 2004. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 48-54.
- de la Gándara Martín J. 1997. Manejo de depresión y ansiedad en atención primaria. *Atención primaria: Publicación oficial de la Sociedad Española de Familia y Comunitaria*, 20(7), 389-394.
- Desbonnet L., Garrett L., Clarke G., Bienenstock J. y Dinan T. 2008. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: an assessment of potential antidepressant properties in the rat. *Journal of Psychiatric Research*, 43(2), 164-174.
- Dhabhar, F. S., Burke, H. M., Epel, E. S., Mellon, S. H., Rosser, R., Reus, V. I., y Wolkowitz, O. M. (2009). Low serum IL-10 concentrations and loss of regulatory association between IL-6 and IL-10 in adults with major depression. *Journal of psychiatric research*, 43(11), 962-969.
- Dinan, T.G., Stanton, C. y Cryan, J.F. 2013. Psychobiotics: A novel class of psychotropic. *Biology Psychiatry*, 74, 720–726.

- Donkor, O. N., Henriksson, A., Singh, T. K., Vasiljevic, T. y Shah, N. P. 2007. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, 17(11), 1321–1331.
- Duman, R. S., Sanacora, G., y Krystal, J. H. 2019. Altered connectivity in depression: GABA and glutamate neurotransmitter deficits and reversal by novel treatments. *Neuron*, 102(1), 75-90.
- Ellenbroek, B. y Youn, J. 2016. Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Disease Models & Mechanisms*, 9(10), 1079-1087.
- Fasick, V., Spengler, R. N., Samankan, S., Nader, N. D., & Ignatowski, T. A. 2015. The hippocampus and TNF: Common links between chronic pain and depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 53, 139-159.
- Feyissa, D. D., Aher, Y. D., Engidawork, E., Höger, H., Lubec, G. y Korz, V. 2017. Individual differences in male rats in a behavioral test battery: a multivariate statistical approach. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11, 26.
- Filella, X., Molina, R., & Ballesta, A. M. 2002. Estructura y función de las citocinas. *Med. integral* (Ed. impr.), 39(2), 63-71.
- Flohé, L. y Günzler, W. A. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105, 114-120.
- Flores-Ramos, M., Salinas, M., Carvajal-Lohr, A. y Rodríguez-Bores, L. 2017. El papel del ácido gamma-aminobutírico en la depresión de la mujer. *Gaceta Médica de México*, 153(4), 488-497.
- García, C., Bautista, L., Rendueles, M., & Díaz, M. 2019. A new synbiotic dairy food containing lactobionic acid and *Lactobacillus casei*. *International Journal of Dairy Technology*, 72(1), 47-56.
- Gayathri, D., y Rashmi, B. S. 2017. Mechanism of development of depression and probiotics as adjuvant therapy for its prevention and management. *Mental Health and Prevention*, 5, 40–51.
- Gómez J. 2013. Caracterización del crecimiento de bacterias probióticas en alimentos fermentados elaborados con cereales. (Tesis de pregrado). Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Chiapas, México.
- González-Córdova, A. F., Torres-Llenez, M. J., Rodríguez-Figueroa, J. C., Espinosa-De-los-Monteros, J. J., García, H. S., & Vallejo-Cordoba, B. 2011. Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina en leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus*. *CyTA-Journal of Food*, 9(2), 146-151.
- González-González, J. N., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F., Beltrán-Barrientos, L. M., García, H. S., & Hernández-Mendoza, A. 2020. Effect of the intracellular content from *Lactobacillus casei* CRL-431 on the antioxidant properties of breast milk: Randomized double-blind controlled trial. *LWT*, 130, 109672.
- Gould T., Dao D. & Kovacsics C. 2009. The Open Field Test. In: Gould T. (Ed.), *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice*. *Neuromethods*, vol 42.
- Guerrero-Encinas, I., González-González, J. N., Santiago-López, L., Muhlia-Almazán, A., Garcia, H. S., Mazorra-Manzano, M. A. y Hernández-Mendoza, A. 2021. Protective Effect of *Lactobacillus casei* CRL 431 Postbiotics on Mitochondrial Function and Oxidative

- Status in Rats with Aflatoxin B 1–Induced Oxidative Stress. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13, 1033-1044.
- Gunathilake K., Ranaweera K. y Rupasinghe, H. 2018b. In Vitro Anti-Inflammatory Properties of Selected Green Leafy Vegetables. *Biomedicines*, 6, 107.
- Hernández H., Coronel, P., Aguilar J. y Rodríguez E. 2016. Neurobiología de la depresión mayor y de su tratamiento farmacológico. *Salud Mental*, 39(1), 47-58.
- Hodes, G. E., Hill-Smith, T. E., & Lucki, I. 2010. Fluoxetine treatment induces dose dependent alterations in depression associated behavior and neural plasticity in female mice. *Neuroscience letters*, 484(1), 12-16.
- Hovatta, I., Juhila, J., y Donner, J. 2010. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neuroscience Research*, 68(4), 261-275.
- Huang, S. Y., Chen, L. H., Wang, M. F., Hsu, C. C., Chan, C. H., Li, J. X., & Huang, H. Y. 2018. *Lactobacillus paracasei* PS23 delays progression of age-related cognitive decline in senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice. *Nutrients*, 10(7), 894.
- Hyland, N., y Stanton, C. 2016. The gut-brain axis: dietary, probiotic, and prebiotic interventions on the microbiota. Academic Press. Primera Edición. Londres. 34 pp.
- Ildfonso, B. C. 2017. Generalidades de la neurobiología de la ansiedad. *Revista Electrónica de Psicología Iztacala*, 20(1), 239-251.
- Irarrázaval, M., Prieto, F., y Armijo, J. 2016. Prevención e intervenciones tempranas en salud mental: una perspectiva internacional. *Acta Bioethica*, 22(1), 37-50.
- Ivanovs, R., Kivite, A., Ziedonis, D., Mintale, I., Vrublevska, J., & Rancans, E. 2018. Association of depression and anxiety with cardiovascular co-morbidity in a primary care population in Latvia: a cross-sectional study. *BMC Public Health*, 18(1), 1-14.
- Jaishankar, J., & Srivastava, P. 2017. Molecular basis of stationary phase survival and applications. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2000.
- Janhavi, P., Divyashree, S., Sanjailal, K. P. y Muthukumar, S. P. 2019. DoseCal: a virtual calculator for dosage conversion between human and different animal species. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1-5.
- Janković, T., Frece, J., Abram, M., y Gobin, I. 2012. Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Sanitary Engineering Research*, 6(1), 19-24.
- Jiménez-Fernández S., Gurpegui M., Díaz-Atienza F., Pérez-Costillas L., Gerstenberg M., y Correll C. 2015. Oxidative stress and antioxidant parameters in patients with major depressive disorder compared to healthy controls before and after antidepressant treatment: results from a meta-analysis. *Journal of Clinical Psychiatry*, 76(12), 1658-1667.
- Kappelmann, N.; Lewis, G.; Dantzer, R.; Jones, P.B.; Khandaker, G.M. 2018. Antidepressant activity of anti-cytokine treatment: A systematic review and meta-analysis of clinical trials of chronic inflammatory conditions. *Mol. Psychiatry*. 23, 335–343.
- Kara, N. Z., Stukalin, Y., y Einat, H. 2018. Revisiting the validity of the mouse forced swim test: Systematic review and meta-analysis of the effects of prototypic antidepressants.

Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 84, 1-11.

- Kataoka, T., Shuto, H., Yano, J., Naoe, S., Ishida, T., Nakada, T., & Yamaoka, K. 2020. X-irradiation at 0.5 Gy after the forced swim test reduces forced swimming-induced immobility in mice. *Journal of radiation research*, 61(4), 517-523.
- Kim, J., y Shin, W. 2014. How to do random allocation (randomization). *Clinics in Orthopedic Surgery*, 6(1), 103.
- Kolar, D. 2018. Addictive potential of novel treatments for refractory depression and anxiety. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 14, 1513–1519.
- Kosari-Nasab, M., Shokouhi, G., Ghorbanihaghjo, A., Abbasi, M. M., & Salari, A. A. 2018. Hesperidin attenuates depression-related symptoms in mice with mild traumatic brain injury. *Life sciences*, 213, 198-205.
- Lee S.B., Cosmas B., & Park H.D. 2020. The Antimutagenic and Antioxidant Activity of Fermented Milk Supplemented with *Cudrania tricuspidata* Powder. *Foods*, 9(12), 1762.
- Li, N., Wang, Q., Wang, Y., Sun, A., Lin, Y., Jin, Y., & Li, X. 2018. Oral probiotics ameliorate the behavioral deficits induced by chronic mild stress in mice via the gut microbiota-inflammation axis. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 12, 266.
- Liang, S., Wang, T., Hu, X., Luo, J., Li, W., Wu, X. y Jin, F. 2015. Administration of *Lactobacillus helveticus* NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. *Neuroscience*, 310, 561-577.
- Liu, M.-Y., Yin, C.-Y., Zhu, L.-J., Zhu, X.-H., Xu, C., Luo, C.-X., Zhou, Q.-G. 2018. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nature Protocols*, 13(7), 1686–1698.
- Liu, Y. W., Liu, W. H., Wu, C. C., Juan, Y. C., Wu, Y. C., Tsai, H. P. y Tsai, Y. C. 2016. Psychotropic effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 in early life-stressed and naïve adult mice. *Brain Research*, 1631, 1-12.
- Liu, X. L., Luo, L., Mu, R. H., Liu, B. B., Geng, D., Liu, Q., & Yi, L. T. 2015. Fluoxetine regulates mTOR signalling in a region-dependent manner in depression-like mice. *Scientific reports*, 5(1), 1-11.
- Luang-In, V., Katisart, T., Konsue, A., Nudmamud-Thanoi, S., Narbad, A., Saengha, W. y Ma, N. L. 2020. Psychobiotic Effects of Multi-Strain Probiotics Originated from Thai Fermented Foods in a Rat Model. *Food Science of Animal Resources*, 40(6), 1014.
- Luna M., Hamana L., Colmenares Y. y Maestre C. 2001. Ansiedad y depresión. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 20(2), 111-122.
- Mallén M. y Garza D. 2017. Trastornos de ansiedad. *Neurología, Neurocirugía y Psiquiatría*, 44(3), 101-107.
- Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., De Vuyst, L. y Hutkins, R. 2021. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 18(3), 196–208.
- Mayer, E., Knight, R., Mazmanian, S., Cryan, J. y Tillisch, K. 2014. Gut microbes and the brain:

- paradigm shift in neuroscience. *Journal of Neuroscience*, 34(46), 15490-15496.
- Mehrabadi, S. y Sadr, S. 2020. Assessment of Probiotics Mixture on Memory Function, Inflammation Markers, and Oxidative Stress in an Alzheimer's Disease Model of Rats. *Iranian Biomedical Journal*, 24(4), 220.
- Misra, S., y Mohanty, D. 2017. Psychobiotics: A new approach for treating mental illness? *Critical Reviews Food Science Nature*, 59(8), 1–7.
- Murti, T. 2021. Fermentation of Bovine, Non-Bovine and Vegetable Milk. *Fermentation: Processes, Benefits and Risks*, 83.
- Mörkl, S., Butler, M. I., Holl, A., Cryan, J. F., y Dinan, T. G. 2020. Probiotics and the Microbiota-Gut-Brain Axis: Focus on Psychiatry. *Current Nutrition Reports*, 9(3), 171–182.
- Negri M. L. 2005. Manual de Referencias técnicas para el logro de leche de calidad. INTA. Segunda edición., 155-161
- Nile, S. y Park, S. 2014. HPTLC analysis, antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative activities of *Arisaema tortuosum* tuber extract. *Pharmaceutical Biology*, 52(2), 221–227.
- Núñez, V. 2019. Leches fermentadas: tradición e innovación (Tesis de pregrado). Universidad Complutense, Madrid, España.
- O'Mahony S., Clarke G., Borre Y., Dinan T., y Cryan J. 2015. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behavioural Brain Research*, 277, 32-48.
- OMS – Organización Mundial de la Salud. 2016. Centro de Prensa. Consultado el 15 de marzo de 2021 en: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/depression-anxiety-treatment/es/>
- OMS - Organización Mundial de la Salud. 2017. Salud Mental. Consultado el 08 de febrero de 2021 en: https://www.who.int/mental_health/es/#:~:text=M%C3%A1s%20de%20300%20millones%20de,en%20el%20lugar%20de%20trabajo.
- OMS - Organización Mundial de la Salud. 2019. Salud Mental. Consultado el 08 de febrero de 2021 en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>
- OMS- Organización Mundial de la Salud. 2022. Mental health and COVID-19: early evidence of the pandemic's impact: scientific brief. Consultado el 30 de marzo de 2022 en: https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Sci_Brief-Mental_health-2022.1
- ONU- Organización de las Naciones Unidas. México. 2022. La pandemia de COVID-19 desencadena un aumento del 25 % en la prevalencia de la ansiedad y la depresión en todo el mundo. Consultado el 30 de marzo de 2022 en: <https://coronavirus.onu.org.mx/la-pandemia-de-covid-19-desencadena-un-aumento-del-25-en-la-prevalencia-de-la-ansiedad-y-la-depresion-en-todo-el-mundo>
- Ouwehand, A. C., Invernici, M. M., Furlaneto, F. A., y Messori, M. R. 2018. Effectiveness of multi-strain versus single-strain probiotics: current status and recommendations for the future. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 52, S35-S40.
- Pace, T. W., Mletzko, T. C., Alagbe, O., Musselman, D. L., Nemeroff, C. B., Miller, A. H., y Heim,

- C. M. 2006. Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress. *American Journal of Psychiatry*, 163(9), 1630-1633.
- Pae, C. U. 2014. The potential role of monocyte chemoattractant protein-1 for major depressive disorder. *Psychiatry Investigation*, 11(3), 217.
- Palta, P., Samuel, L. J., Miller III, E. R., & Szanton, S. L. 2014. Depression and oxidative stress: results from a meta-analysis of observational studies. *Psychosomatic medicine*, 76(1), 12.
- Panahipour L., Nasserzare S., Amer Z., Brücke F., Stähli A., Kreissl A., y Gruber, R. 2019. The anti-inflammatory effect of milk and dairy products on periodontal cells: an *in vitro* approach. *Clinical Oral Investigations*, 23(4), 1959-1966.
- Parasuraman, S., Raveendran, R. y Kesavan, R. 2010. Blood sample collection in small laboratory animals. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 1, 87-93
- Park C., Brietzke E., Rosenblat J., Musial N., Zuckerman H., Ragguett R.-M., Pan Z., Rong C., Fus D. y McIntyre R. 2018. Probiotics for the treatment of depressive symptoms: an anti-inflammatory mechanism? *Brain Behavior and Immunity*, 73, 115-124.
- Parker, C. C., Chen, H., Flagel, S. B., Geurts, A. M., Richards, J. B., Robinson, T. E. y Palmer, A. A. 2014. Rats are the smart choice: rationale for a renewed focus on rats in behavioral genetics. *Neuropharmacology*, 76, 250-258.
- Patel S. y Zaveri M. 2014. Trypsin and protein denaturation inhibitory activity of different fractionation and isolated compound of leaf and root of *justicia gendarussa*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5, 5564–71.
- Pavón RL, Hernández ME, Loría SF y Sandoval LG 2004. Interacciones neuroendocrinoinmunológicas. *Salud Mental*, 27(3), 19-25.
- Pereira, A. C., Oliveira, J., Silva, S., Madeira, N., Pereira, C. M., & Cruz, M. T. 2020. Inflammation in Bipolar Disorder (BD): Identification of New Therapeutic Targets. *Pharmacological Research*, 105325.
- Polanco, L., Vargas-Irwin, C. y Góngora, M. E. 2011. Modelos animales: una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. *Suma Psicológica*, 18(2), 141-148.
- Ramalho J., Soares M., Spiazzi C., Bicca D., Soares V., Pereira J., Da Silva W., Sehn C. y Cibin F. 2019. *In vitro* probiotic and antioxidant potential of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LL95 and Its effect in mice behaviour. *Nutrients*, 11(4), 901.
- Richter F., 2021. Pandemic Causes Spike in Anxiety & Depression. Statista. Consultado el 24 de abril de 2021 en: <https://www.statista.com/chart/21878/impact-of-coronavirus-pandemic-on-mental-health/>
- Roddy, D. W., Farrell, C., Doolin, K., Roman, E., Tozzi, L., Frodl, T., y O’Hanlon, E. 2019. The hippocampus in depression: more than the sum of its parts? Advanced hippocampal substructure segmentation in depression. *Biological Psychiatry*, 85(6), 487-497.
- Rodriguez, A., Zhang, H., Klaminder, J., Brodin, T., Andersson, P. L. and Andersson, M. 2018. ToxTrac: a fast and robust software for tracking organisms. *Methods in Ecology and Evolution*. 9(3):460–464

- Rodriguez, A., Zhang, H., Klaminder, J., Brodin, T., and Andersson, M. 2017. ToxId: an algorithm to track the identity of multiple animals. *Scientific Reports*, 7(1):14774.
- Rogers, J. P., Chesney, E., Oliver, D., Pollak, T. A., McGuire, P., Fusar-Poli, P. y David, A. 2020. Psychiatric and neuropsychiatric presentations associated with severe coronavirus infections: a systematic review and meta-analysis with comparison to the COVID-19 pandemic. *The Lancet Psychiatry*, 7(7), 611-627.
- Rosas J. 2021. Efecto protector del contenido intracelular de bacterias potencialmente probióticas contra el estrés oxidativo inducido por radiación UV-C en eritrocitos humanos (tesis de maestría). Septiembre 2021. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora.
- Ruiz, N. A. L., Del Ángel, D. S., Olguín, H. J., y Silva, M. L. 2018. Neuroprogression: the hidden mechanism of depression. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 14, 2837.
- 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. y Baldisserotto, B. 2014. The essential oil from *Lippia alba* induces biochemical stress in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transportation. *Neotropical Ichthyology*, 12, 811-818.
- Salim, S. 2014. Oxidative stress and psychological disorders. *Current Neuropharmacology*, 12(2), 140-147.
- Sanders, E. R. 2012. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *Jove Journal of Visualized Experiments*, 63, e3064.
- Santiago-López, L., Hernández-Mendoza, A., Mata-Haro, V., Vallejo-Cordoba, B., y González-Córdova, A. F. 2018. Immune response induced by fermented milk with potential probiotic strains isolated from artisanal Cocido cheese. *Food and Agricultural Immunology*, 29(1), 911-929.
- Santiago-López, L., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Mata-Haro, V., Wall-Medrano, A., & González-Córdova, A. F. 2019. Milk fermented with *Lactobacillus fermentum* ameliorates indomethacin-induced intestinal inflammation: An exploratory study. *Nutrients*, 11(7), 1610.
- Santos, M. A. O., Bezerra, L. S., Carvalho, A. R. M. R., & Brainer-Lima, A. M. 2018. Global hippocampal atrophy in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Trends in Psychiatry and Psychotherapy*, 40, 369-378.
- Savage, K., Firth, J., Stough, C., y Sarris, J. 2018. GABA-modulating phytochemicals for anxiety: A systematic review of preclinical and clinical evidence. *Phytotherapy Research*, 32(1), 3-18.
- Savignac, H. M., Kiely, B., Dinan, T. y Cryan, J. F. 2014. *Bifidobacteria* exert strain-specific effects on stress-related behavior and physiology in BALB/c mice. *Neurogastroenterology and Motility*, 26(11), 1615-1627.
- Schiavone, S., Colaianna, M., & Curtis, L. 2015. Impact of early life stress on the pathogenesis of mental disorders: relation to brain oxidative stress. *Current pharmaceutical design*, 21(11), 1404-1412.
- Scorza C., Piccini C. y Zunino P. 2019. Microbiota intestinal, probióticos y salud mental. *Revista*

de Psiquiatría del Uruguay, 83(1), 33-42.

- Seibenhener, M.L., Wooten, M.C. 2015. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *Journal of Visualized. Experiments*, 10, e52434.
- Selhub E., Logan A. y Bsted A. 2014. Fermented foods, microbiota, and mental health: ancient practice meets nutritional psychiatry. *Journal of Physiological Anthropology*, 33(1), 1-12.
- Senft, A. P., Dalton, T. P. y Shertzer, H. G. 2000. Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde. *Analytical Biochemistry*, 280, 80–86.
- Sequeira Cordero A. y Fornaguera Trías J. 2009. Neurobiología de la depresión. *Revista Mexicana de Neurociencias*, 10 (6), 462-478
- Sharma, R., Gupta, D., Mehrotra, R. y Mago, P. 2021. Psychobiotics: The Next-Generation Probiotics for the Brain. *Current Microbiology*, 78, 449-463.
- Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. y Van Sinderen, D. 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), 198-203.
- Stenman, L. K., Patterson, E., Meunier, J., Roman, F. J. y Lehtinen, M. J. 2020. Strain specific stress-modulating effects of candidate probiotics: a systematic screening in a mouse model of chronic restraint stress. *Behavioural Brain Research*, 379, 112376.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., y Simon, P. 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367-370.
- Stukalin, Y., Lan, A., y Einat, H. 2020. Revisiting the validity of the mouse tail suspension test: systematic review and meta-analysis of the effects of prototypic antidepressants. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 112, 39-47.
- Sturman, O., Germain, P. L., & Bohacek, J. 2018. Exploratory rearing: a context-and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress*, 21(5), 443-452.
- Sukoff Rizzo, S. y Crawley, J. 2017. Behavioral phenotyping assays for genetic mouse models of neurodevelopmental, neurodegenerative, and psychiatric disorders. *Annual Review of Animal Biosciences*, 5, 371-389.
- Takao, K., y Miyakawa, T. 2006. Light/dark Transition Test for Mice. *JoVE*. 1(104), 10-3791
- Tian, P., O'Riordan, K. J., Lee, Y. K., Wang, G., Zhao, J., Zhang, H. y Chen, W. 2020. Towards a psychobiotic therapy for depression: *Bifidobacterium breve* CCFM1025 reverses chronic stress-induced depressive symptoms and gut microbial abnormalities in mice. *Neurobiology of Stress*, 12, 100216.
- Tillisch, K., Labus, J., Kilpatrick, L., Jiang, Z., Stains, J., Ebrat, B. y Mayer, E. A. 2013. Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology*, 144(7), 1394-1401.
- Timmerman, H. M., Koning, C. J., Mulder, L., Rombouts, F. M., y Beynen, A. C. 2004). Monostrain, multistrain and multispecies probiotics—a comparison of functionality and efficacy. *International journal of food microbiology*, 96(3), 219-233.
- Todorova, I., Simeonova, G., Kyuchukova, D., Dinev, D. y Gadjeva, V. 2005. Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats. *Comparative Clinical*

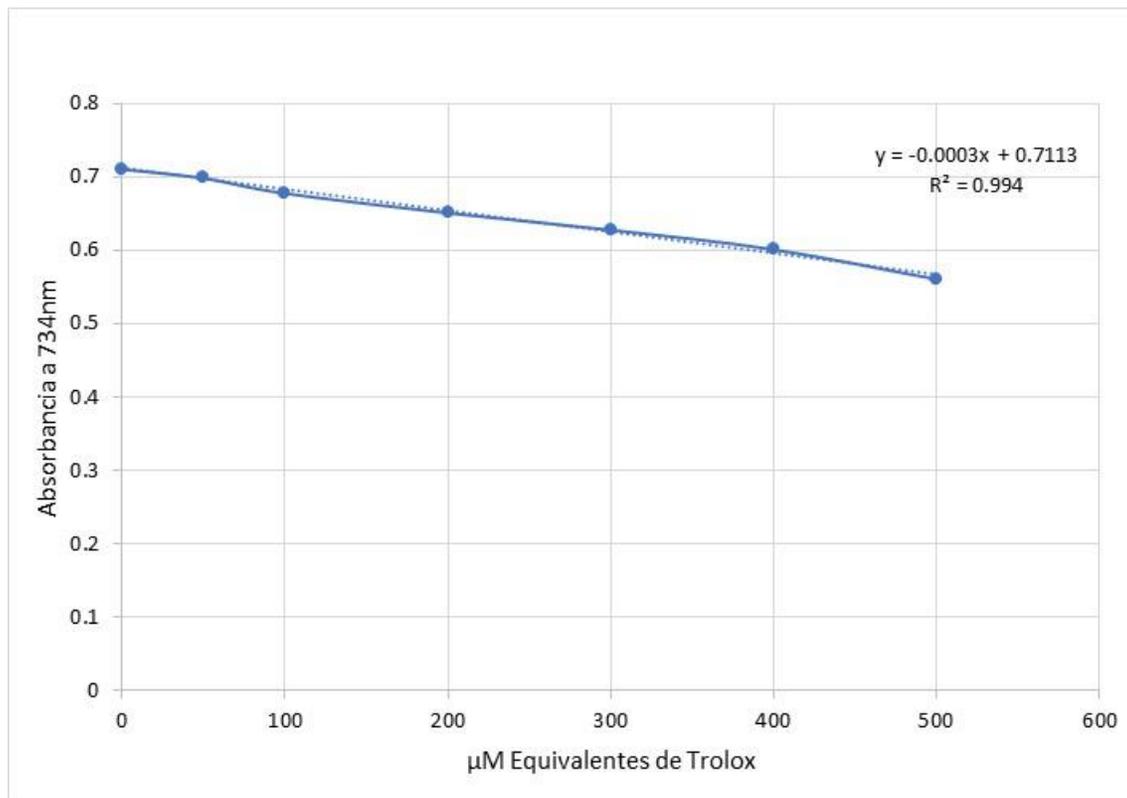
Pathology, 13(4), 190-194.

- Tyagi P., Tasleem M., Prakash S. y Chouhan G. 2020. Intermingling of gut microbiota with brain: Exploring the role of probiotics in battle against depressive disorders. *Food Research International*, 137, 109489.
- Uzzan, S., & Azab, A. N. 2021. Anti-TNF- α Compounds as a Treatment for Depression. *Molecules*, 26(8), 2368.
- Valera-Molina L. 2019. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de sistemas nanoestructurados formulados con postbióticos obtenidos de bacterias ácido-lácticas específicas utilizando un modelo de inflamación (tesis de maestría) Diciembre 2019. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, Veracruz.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2007, 39: 44-84.
- Van de Bunt, B., Bron, P. A., Sijtsma, L., de Vos, W. M., y Hugenholtz, J. 2014. Use of non-growing *Lactococcus lactis* cell suspensions for production of volatile metabolites with direct relevance for flavour formation during dairy fermentations. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1-9.
- Villa B., y González, C. 2012. Actualidades en neurobiología de la depresión. *Revista Latinoamericana de Psiquiatría*, 11(3), 106-115.
- Villadóniga, C., Vairo C. S. E., Morcelle del Valle, S. R., Errasti, M. A., Bruno, M. A., Barros, M. y Cantera, A. M. B. 2009. Productos bioactivos obtenidos por proteólisis (nutracéuticos y alimentos funcionales). En: *Enzimas proteolíticas de vegetales superiores: Aplicaciones industriales*. CYTED, Buenos Aires, pp. 273-297.
- Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., y Korhonen, H. 2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 106-115.
- Wahlsten, D. 2010. Mouse Behavioral testing. In: *How to use mice in behavioral neuroscience*. 1st edition. Academic Press. Pp. 304.
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*, 2(2), 322-328.
- Wallace, C. y Milev, R. 2017. The effects of probiotics on depressive symptoms in humans: a systematic review. *Annals of General Psychiatry*, 16(1), 14.
- Wang, H., Sun, Y., Xin, J., Zhang, T., Sun, N., Ni, X., & Bai, Y. 2020. *Lactobacillus johnsonii* BS15 prevents psychological stress-induced memory dysfunction in mice by modulating the Gut-Brain Axis. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1941.
- Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D. y Li, W. 2017. Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 9(5), 521.
- Westfall, S., Lomis, N., Kahouli, I., Dia, S., Singh, S. y Prakash, S. 2017. Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(20), 3769-3787.

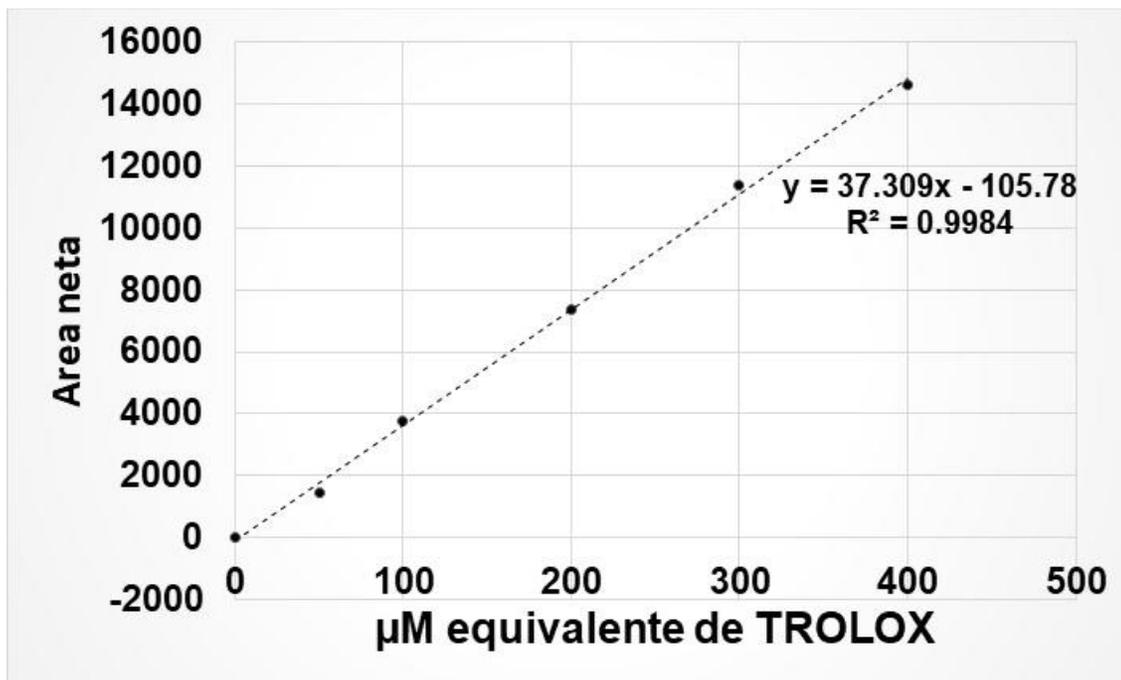
- Wisastra, R., y Dekker, F. 2014. Inflammation, cancer and oxidative lipoxygenase activity are intimately linked. *Cancers*, 6(3), 1500–1521.
- Young, J. J., Bruno, D., & Pomara, N. 2014. A review of the relationship between proinflammatory cytokines and major depressive disorder. *Journal of affective disorders*, 169, 15-20.
- Yunes R., Poluektova E., Vasileva E., Odorskaya M., Marsova M., Kovalev G., & Danilenko V. 2020. A multi-strain potential probiotic formulation of GABA-producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with antidepressant effects. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(3), 973-979.
- Zhang Y, Wang Y, Lei H, Wang L, Xue L, Wang X, Zhu X. 2017. Optimized animal model to mimic the reality of stress-induced depression in the clinic. *BMC Psychiatry* 17:171.
- Zhou Y., Cao Z., Yang M., Xi X., Guo Y., Fang M., Cheng L. y Du Y. 2017. Comorbid generalized anxiety disorder and its association with quality of life in patients with major depressive disorder. *Scientific Reports*, 7(1), 1-8.
- Zulueta A., Esteve M.J. y Frígola A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114, 310-316.

10. ANEXOS

10.1. Curva Estándar de Trolox para Determinación de Actividad Antioxidante Empleando el Método del Radical ABTS



10.2. Curva Estándar de Trolox para Determinación de la Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno



10.3. Carta de Aprobación de Protocolo Experimental por Parte del Comité de Ética



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Centro de Investigación
en Alimentación y Desarrollo

Comité de Ética en Investigación del CIAD
Hermosillo, Sonora, de 1 octubre de 2021
Registro: CONBIOÉTICA-26-CEI-001-20200122
CEI/017-1/2021

Dr. Adrián Hernández Mendoza
Investigador Titular
Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal
Laboratorio de Productos Lácteos.
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C
PRESENTE

Estimado Dr. Hernández:

Me permito comunicarle que el Comité de Ética de Investigación de nuestro centro (CEI-CIAD) ha revisado de nuevo *el formato para la aprobación del proyecto para la revisión ética de las actividades que involucren riesgos a personas (o animales) en estudio y la propuesta de investigación "Evaluación de la potencial funcionalidad antidepresiva y ansiolítica de bacterias ácido lácticas específicas y sus productos de fermentación"* de la cual usted es el responsable técnico.

Con base en la información proporcionada y con fundamento actualmente vigente en el marco jurídico mexicano, este Comité expide el siguiente:

Dictamen: Aprobado

Cualquier **modificación o suspensión** del protocolo **aprobado**, deberá notificarlo al CEI-CIAD. Además, durante el mes de diciembre 2021, solicitaremos el estatus de avance que guarda el protocolo, información de relevancia para la conservación del Registro de este CEI-CIAD ante la CONBIOÉTICA, por lo que le pedimos amablemente responder a la brevedad la información que sea requerida.

Atentamente





**GOBIERNO DE
MÉXICO**



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Centro de Investigación
en Alimentación y Desarrollo
CIAD

Dr. Luis Quihui Cota
Presidente del CEI-CIAD
c.c.p Archivo



Carretera Gustavo Enrique Astizarán Rosas, No. 46, Col. La Victoria, CP. 83304, Hermosillo, Sonora, México
Tel. 662 289 2400 www.ciad.mx



10.4. Curva Estándar de Determinación de Proteína Empleando el Método de Lowry

