



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

**EFECTO PROTECTOR DEL CONTENIDO INTRACELULAR
DE BACTERIAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS CONTRA
EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR RADIACIÓN UV-C
EN ERITROCITOS HUMANOS.**

Por:

Jesús Adelmo Rosas Anaya

TESIS APROBADA POR LA:


COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

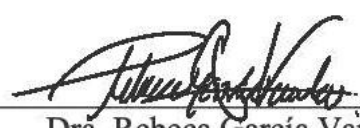
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Jesús Adelmo Rosas Anaya la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.




Dr. Adrián Hernández Mendoza
Director de tesis



Dra. Belinda Vallejo Galland
Integrante del comité de tesis



Dra. Rebeca García Varela
Integrante del comité de tesis



Dr. Aarón Fernando González Córdova
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Efecto Protector del Contenido Intracelular de Bacterias Potencialmente Probióticas Contra el Estrés Oxidativo Inducido por Radiación UV-C en Eritrocitos Humanos” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Jesús Adelmo Rosas Anaya, 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 manuscrito en cuestión 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 de manutención otorgada durante la realización mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.) por permitirme ser parte de su comunidad estudiantil, por el acceso y usos de sus instalaciones, materiales y equipos para realizar esta tesis de maestría.

Pero sobre todo agradezco a Dios por permitirme cumplir mis metas, darme fuerzas en momentos difíciles y nunca dejarme solo.

Agradezco al Dr. Adrián Hernández Mendoza por aceptar ser mi director de tesis aún sin conocerme, por su disposición y compromiso desde el primer hasta el último día de este posgrado, por su forma de trabajo y organización, es un gran asesor.

A los integrantes del comité de tesis, a la Dra. Belida Vallejo Galland, Dra. Rebeca García Varela, al Dr. Hugo Sergio García Galindo y Dr. Aarón Fernando González Córdoba por su asesoramiento, sugerencias, aportaciones y comentarios que estuvieron en todo momento dirigidos para la mejora de este trabajo.

Le agradezco enormemente a la Dra. Lourdes Santiago López por su profesionalismo, sus asesorías, su paciencia conmigo y por ser una guía desde el primer momento de mi ingreso al CIAD, para mí es un ejemplo por seguir y espero colaborar nuevamente con usted en un futuro.

A la Dra. Lilia Beltrán Barrientos, a la Dra. María de Jesús Torres Llañez, M.C. Ricardo Reyes Díaz y M.C. Carmen Estrada Montoya por el apoyo técnico.

Al personal docente y administrativo del CIAD por apoyar y guiar en todo momento a los estudiantes y brindar un servicio de calidad siempre que se requiere.

A mis compañeros de laboratorio Miriam Zambrano, Miguel Álvarez, Miguel Rendón, Wilver Vargas, Cecilia Castro, Ariana Domínguez Eduardo Rubio y Rodrigo Sigala, de la misma forma agradezco especialmente a quienes considero mis amigos, los cuales me apoyaron y motivaron en alguna parte de este trayecto, Olympia Domínguez, Carmen Manzanares, Arantxa Almada, Fernando Lizárraga, Isidro Méndez y José Teutle, los quiero.

A mis amigos que tuve la fortuna de conocer en este trayecto, con los cuales he compartido momentos alegres, risas, momentos difíciles, estrés, sin duda su apoyo y su amistad han sido muy

importantes para mí y han hecho mucho más ameno este paso por el CIAD, les agradezco enormemente a Adriana Bojórquez, Arely Flores, Paulina Galindo, Dina Torres, Carlos Coronado y Alejandro León. Recuerden chicos que, aunque después de esto la vida nos lleve por rumbos distintos, aquí tienen un amigo. Los recordaré con mucho cariño.

A mis amigas Edith Romero y Briseyda Enríquez con las cuales he compartido años de amistad, de alegrías y también de momentos difíciles, si bien, estuvimos lejos este tiempo, nunca hemos estado distanciados, les agradezco enormemente por siempre ser mi apoyo, por creer en mí y por motivarme para seguir con este proyecto, las quiero mucho.

DEDICATORIA

A mi madre Luz Elena Anaya Parra por todo el amor, el cariño y el apoyo que siempre me ha brindado, es usted mi ejemplo, mi motivación y mi motor para seguir adelante, me enseñó a creer en mí y una vez más ¡lo logramos mamá!

A mis hermanas Guadalupe, Yesenia, Eneida, Briseida y Sandra por el apoyo siempre que lo necesito. A mis queridos sobrinos Karely, Ricardo, Abelardo, Vianney, Lupita, Alejandra, Valeria y Yamileth.

LOS QUIERO MUCHO.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE CUADROS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	17
2.1. La radiación Ultravioleta y sus Implicaciones en la Salud.....	17
2.2. Implicaciones Benéficas	18
2.2.1. Síntesis de Vitamina D.....	18
2.2.2. Inmunoregulación	19
2.2.3. Otros Efectos	19
2.3. Implicaciones Patológicas	20
2.3.1. Eritema	20
2.3.2. Alteraciones en el ADN y Desarrollo de Cáncer.....	21
2.3.3. Fotoenvejecimiento.....	22
2.3.4. Inmunosupresión	22
2.3.5. Estrés Oxidativo	23
2.4. Efectos de la Radiación Ultravioleta Sobre Eritrocitos.....	24
2.4.1. Generación de Metahemoglobina y ROS.....	25
2.4.2. Peroxidación Lipídica y Daños en la Membrana.....	26
2.4.3. Inducción de eritrosis mediada por ROS.....	27
2.5. Estrategias Utilizadas Para Disminuir el Estrés Oxidativo en Eritrocitos.....	27
2.5.1. Estrategias Emergentes Utilizadas Para Disminuir el Daño por Estrés Oxidativo en Eritrocitos	29
2.5.2. Fitoextractos y Fitoquímicos.....	29
2.5.3. Bacterias Ácido-Lácticas Específicas y Postbióticos	29
3. HIPÓTESIS	32
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivo General.....	33
4.2. Objetivos Específicos.....	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Reactivos y Materiales	34
5.2. Cultivos Bacterianos	35

CONTENIDO (continuación)

5.3. Obtención del Contenido Intracelular	35
5.4. Determinación de Proteína	36
5.5. Determinación de Actividad Antioxidante	36
5.5.1. Neutralización del Radical Cation ABTS	37
5.5.2. Neutralización del Radical DPPH	37
5.5.3. Ensayo de Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC)	38
5.6. Ensayos con Eritrocitos	38
5.6.1. Consideraciones Bioéticas	38
5.6.2. Aislamiento y Separación de Eritrocitos.....	39
5.6.3. Inhibición de Oxidación de Hemoglobina	40
5.6.4. Inhibición de Oxidación Lipídica	40
5.6.5. Evaluación de Características Morfogeométricas	41
5.7. Ensayos con Radiación UV-C	42
5.7.1. Obtención del Contenido Intracelular Eritrocitario	43
5.8. Evaluación del Sistema Antioxidante de los Eritrocitos	43
5.8.1. Determinación de Niveles de Hemoglobina.....	43
5.8.2. Determinación de Niveles de Glutación.....	44
5.8.3. Determinación de Actividad Catalasa.....	44
5.8.4. Determinación de la Actividad de Superóxido Dismutasa	45
5.8.5. Determinación de la Actividad de Glutación Peroxidasa	46
5.9. Evaluación de Parámetros de Estrés Oxidativo	47
5.9.1. Ensayo de Inhibición de la Hemólisis Fotooxidativa	47
5.9.2. Determinación de Peroxidación Lipídica.....	47
5.9.3. Determinación de la Concentración de H ₂ O ₂	48
5.10. Análisis Estadístico	49
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
6.1. Determinación de Proteína	50
6.2. Determinación de Actividad Antioxidante	51
6.3. Inhibición de la Hemólisis oxidativa de Eritrocitos Expuestos a Estrés Oxidativo.....	53
6.4. Evaluación de las Características Morfogeométricas Celulares	56
6.5. Efecto Protector del Contenido Intracelular a Eritrocitos Expuestos a Radiación UV-C ..	59
7. CONCLUSIONES	65
8. RECOMENDACIONES	66
9. BIBLIOGRAFÍA	67
10. ANEXOS	75
10.1. Curva estándar de Determinación de Proteína Empleando el Método de Lowry.....	75
10.2. Curva estándar de Trolox para determinación de actividad antioxidante empleando el método del radical ABTS	76
10.3. Curva Estándar de Trolox para Determinación de la Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno	77
10.4. Carta de Aprobación de Protocolo Experimental por Parte del Comité ética	78

CONTENIDO (continuación)

10.5. Formulario de Información Clínica.....	80
10.6. Carta Consentimiento Informado.....	82
10.7. Curva Estándar de Determinación de la Concentración de Hemoglobina en Muestras de Eritrocitos Expuestos a Radiación UV-C.	85
10.8. Curva Estándar para Determinación de GSH	86
10.9. Curva Estándar de H ₂ O ₂	87

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Capacidad de penetración de la radiación UVA, UVB y UVC	25
2	Concentración de proteína (mg/mL de BSA) en el contenido intracelular de las bacterias empleadas en el estudio.....	50
3	Actividad antioxidante por los métodos de ORAC y ABTS expresado en μM de equivalentes de Trolox. Porcentaje de inhibición en la formación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (ITBARS) e inhibición en la oxidación de hemoglobina (IOHb).....	52
4	Evaluación de la inhibición del porcentaje de hemólisis oxidativa empleando AAPH (50 mM) como inductor químico de estrés oxidativo.....	54
5	Porcentaje de inhibición de hemólisis oxidativa empleando radiación UV-C como inductor físico de estrés oxidativo.....	55
6	Evaluación de las características morfogeométricas celulares de los eritrocitos expuestos a AAPH y adicionados con los CIs.....	57
7	Evaluación de las características morfogeométricas celulares de los eritrocitos expuestos durante 60 min expuestos a radiación UV-C acumulada de 30.5 mJ/cm^2 (testigo positivo), y los diferentes grupos tratados con el contenido intracelular.....	58
8	Determinación de índice de estrés oxidativo en muestras de eritrocitos después de 60 minutos de radiación UV-C.....	65

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Diseño de los grupos experimentales expuestos a radiación UV-C.....	42
2	Actividad de enzimas antioxidantes (U/g Hb) y niveles de antioxidantes endógenos no enzimáticos (μ moles/g Hb) en muestras de eritrocitos expuestos a radiación UV-C.....	61
3	Indicadores de estrés oxidativo celular y especies reactivas de oxígeno en muestras de eritrocitos irradiados. Los valores se expresan en (μ moles/g Hb.....	64

RESUMEN

La exposición prolongada a la radiación ultravioleta puede producir una respuesta fototóxica en la piel y los eritrocitos, ya que esta alcanza los capilares hipodérmicos ocasionando alteraciones estructurales y funcionales en las células, debido al estrés oxidativo promovido por la fotooxidación. Estudios previos evidenciaron el papel protector del contenido intracelular (CI) de cepas probióticas contra el estrés oxidativo, por lo que podría ser una alternativa contra el efecto fototóxico en la piel. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto protector del contenido intracelular de *Limosilactobacillus fermentum* J20 (CI-J20) y *Lactiplantibacillus plantarum* 22 y 39 (CI-LP22 y CI-LP39, respectivamente), contra el estrés oxidativo inducido por radiación UV-C en eritrocitos humanos. El contenido intracelular mostro mayor actividad antioxidante por el método de ORAC. En general, los tres CI mostraron inhibir el porcentaje de hemólisis oxidativa y variabilidad morfogeométrica de los eritrocitos expuestos al agente oxidante AAPH. No se registraron diferencias ($P > 0.05$) en la inhibición de hemólisis oxidativa entre los diferentes tratamientos. En los ensayos de eritrocitos expuestos a radiación UV-C, los contenidos intracelulares mostraron mayor actividad enzimática en los diferentes tiempos evaluados respecto al grupo positivo (radiación sin CI). En particular, se logró observar un efecto de protección de los CI de las tres cepas evaluadas al disminuir el porcentaje de hemólisis, daño celular a nivel estructural, y un aumento significativo en la actividad antioxidante enzimática (catalasa, superóxido dismutasa, GPx) y menor índice de estrés oxidativo. El CI de la cepa J20 presentó menor porcentaje de hemólisis y daños morfogeométricos y una mayor actividad enzimática de superóxido dismutasa ($P < 0.05$); mientras que el tratamiento con CI-LP39 mostró mayor actividad de catalasa, glutatión peroxidasa y una disminución de los niveles de MDA, mismo que se obtuvo al calcular el índice de estrés oxidativo. Estos datos evidencian el potencial efecto protector del CI contra estrés oxidativo inducido por fotooxidación.

Palabras clave: *Radiación ultravioleta, eritrocitos, postbióticos, antioxidantes*

ABSTRACT

Prolonged exposure to ultraviolet radiation can produce a phototoxic response in the skin and erythrocytes, since it reaches the hypodermic capillaries causing structural and functional alterations in the cells, due to oxidative stress promoted by photooxidation. Previous studies evidenced the protective role of the intracellular content (IC) of probiotic strains against oxidative stress, so it could be an alternative against the phototoxic effect on the skin. Therefore, the aim of this work was to evaluate the protective effect of the intracellular content of *Limosilactobacillus fermentum* J20 (IC-J20) and *Lactiplantibacillus plantarum* 22 and 39 (IC-LP22 and IC-LP39, respectively), against oxidative stress induced by UV-C radiation in human erythrocytes. The intracellular content showed higher antioxidant activity by ORAC method. Overall, the three ICs were shown to inhibit the percentage of oxidative hemolysis and morphogeometric variability of erythrocytes exposed to the oxidizing agent AAPH. There was no difference ($P > 0.05$) in the inhibition of oxidative hemolysis among the different treatments. In the assays of erythrocytes exposed to UV-C radiation, the IC showed higher enzymatic activity at the different times evaluated with respect to the positive group (radiation without IC). It was possible to observe a protective effect of the ICs of the three strains evaluated by decreasing the percentage of hemolysis, cell damage at the structural level, and a significant increase in enzymatic antioxidant activity (catalase, superoxide dismutase, GPx) and lower oxidative stress index. The IC of strain J20 presented lower percentage of hemolysis and morphogeometric damage and higher enzymatic activity of superoxide dismutase ($P < 0.05$); while the treatment with IC-LP39 showed higher catalase activity, glutathione peroxidase and a decrease in MDA levels, which was also obtained when calculating the oxidative stress index. These data show the potential protective effect of IC against oxidative stress induced by photooxidation.

Keywords: *UV radiation, erythrocytes, postbiotics, antioxidants*

1. INTRODUCCIÓN

La luz solar es esencial para el desarrollo y mantenimiento de la vida en el planeta Tierra, está relacionada con la salud del ser humano, ya que es necesaria para sintetizar vitamina D, regular el ritmo circadiano, aumentar los niveles de algunos neurotransmisores (p ej., serotonina) y además tiene aplicaciones terapéuticas en desórdenes cutáneos (Powers & Murphy, 2019). Sin embargo, estos efectos benéficos a la salud disminuyen a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz solar, un periodo prolongado y constante resulta desfavorable, ya que la radiación ultravioleta (UVR) emitida por el sol, puede ocasionar diversas patologías. Las complicaciones principales incluyen eritema, fotoenvejecimiento, inmunosupresión, hiperalgesia, mutagénesis y neoplasias (Lopes & McMahon, 2016).

Estos efectos patológicos se deben principalmente a reacciones fotoquímicas con macromoléculas, como el ADN, pero también a una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), las cuales disminuyen los niveles de componentes antioxidantes, alteran la actividad enzimática, y regulan la expresión génica (Martinez *et al.*, 2018). Lo anterior se refleja en el daño a componentes celulares como fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas, que afectan la estabilidad celular e incluso provocan mutaciones que pueden derivar en la formación de células cancerosas, principalmente en la piel, por ser el órgano más expuesto a la UVR (Lephart, 2016).

La UVR que llega a la piel es capaz de alcanzar las capas dérmicas superficiales y profundas, aunque esto depende de la longitud de onda, por ejemplo, la UV-B se absorbe mayormente en la epidermis, mientras que la UV-A puede penetrar capas profundas de la piel. Ambas son genotóxicas y fotoreactivas a moléculas celulares e inducen la producción de ROS (Garmyn *et al.*, 2018). Dentro de los límites entre la epidermis y la dermis se encuentran capilares sanguíneos superficiales que también reciben luz solar, por lo que la sangre y sus elementos celulares están expuestos a la UVR. De todas las células hematológicas los eritrocitos sufren en mayor medida los efectos adversos de la UVR cuando se exponen de forma prolongada (Agarwal, 2020)

La UVR ocasiona efectos adversos en los eritrocitos mediante diferentes mecanismos, entre los que destacan la elevada producción de ROS y la baja actividad de la respuesta de componentes antioxidantes. A nivel de membrana, interfiere en la función de la bomba Na^+K^+ ATPasa, aumenta la peroxidación lipídica e induce cambios en las propiedades morfogeométricas de los eritrocitos.

En el citoplasma afecta mecanismos antioxidantes, disminuye niveles de glutatión (GHS) y la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx), glutatión-S-transferasa (GST), glutatión reductasa (GR), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) (Misra *et al.*, 2005; Sekowski *et al.*, 2018). Además, la UVR incrementa la oxidación de oxihemoglobina hacia metahemoglobina generando ROS, que en ausencia de CAT y SOD pueden oxidar más hemoglobina, todos estos factores se traducen en un aumento de daños celulares, provocando fotohemólisis (Nabil *et al.*, 2013).

Para hacer frente al estrés oxidativo el ser humano posee componentes antioxidantes endógenos de diferentes tipos, enzimáticos, y no enzimáticos; no obstante, estos pueden ser insuficientes ante una exposición crónica a la UVR, por lo que se han explorado diferentes estrategias (tópicas e ingeridas) con la finalidad de prevenir o atenuar el estrés fotooxidativo inducido por la UVR. Por otro lado, la aplicación tópica de protectores solares es una medida profiláctica que reduce el ingreso de UVR a través de la piel, pero una desventaja es que estos disminuyen la síntesis de Vitamina D (Mancebo *et al.*, 2014). Además, algunos compuestos de la formulaciones (ej. oxibenzona) tienen la capacidad de bioacumularse causando efectos negativos como alergias y alteraciones hormonales. Otros suplementos alimentarios con antioxidantes sintéticos, como hidroxianisol e hidroxitolueno butilados, han sido relacionados con inducción de carcinomas y tumores gástricos (Vandghanooni *et al.*, 2013).

Por lo anterior, las nuevas opciones terapéuticas están dirigidas al uso de sustancias que sean seguras para la salud y de fácil obtención, tal es el caso de algunos fitoquímicos bioactivos de plantas y microalgas, que contienen compuestos como nicotinamida, resveratrol, polisacáridos y polifenoles, los cuales actúan como fotoprotectores celulares y aumentan los niveles de expresión génica de enzimas antioxidantes (Berthon *et al.*, 2017). Además, algunas bacterias ácido-lácticas específicas incluyendo probióticos viables, no viables y sus metabolitos han sido objeto de recientes investigaciones debido a que presentan propiedades eritroprotectoras, antioxidantes y antiinflamatorias en ensayos *in vivo* e *in vitro* (Cuevas-González *et al.*, 2020; Khmaladze *et al.*, 2019).

Es importante encontrar nuevas alternativas antioxidantes, conocer los mecanismos patológicos de la radiación ultravioleta sobre eritrocitos a nivel molecular, sus implicaciones sobre los componentes subcelulares y las vías de inducción de eritropoiesis mediada por ROS. De esta manera, será mucho más fácil analizar las estrategias actuales, sus efectos secundarios y las opciones

terapéuticas emergentes reportadas con el fin de disminuir el daño oxidativo por la exposición a radiación ultravioleta. Por lo que en esta investigación se propone evaluar el efecto citoprotector y antioxidante del contenido intracelular de bacterias potencialmente probióticas contra el estrés oxidativo inducido por radiación UV-C sobre eritrocitos humanos mediante la evaluación de parámetros bioquímicos, actividad enzimática, peroxidación lipídica y cambios morfogeométricos en las células.

2. ANTECEDENTES

2.1. La radiación Ultravioleta y sus Implicaciones en la Salud

La UVR es parte de la luz solar, está ubicada entre los 100 y 400 nm del espectro electromagnético, se encuentra entre las fracciones de luz visible y rayos X. Este tipo de energía es invisible para el ojo humano y se ha dividido en tres regiones respecto a su longitud de onda, la fracción UV-C comprendida entre los 100 y 280 nm, la fracción UV-B entre los 280 y 320 nm y la fracción UV-A de los 320 a los 400 nm (Coutinho *et al.*, 2019). Casi toda la UV-C, más del 90% de UV-B y cerca del 10% de UV-A son absorbidas en la capa de ozono, de tal manera que la UVR que alcanza la piel está conformada prácticamente por UV-A (90-95%) y UV-B (10-5%).

A pesar de los pocos estudios sobre las implicaciones clínicas de la UV-C sobre humanos, en las últimas décadas debido a la disminución del ozono atmosférico principalmente como consecuencia antropogénica, se han detectado sobre la superficie terrestre niveles inusualmente elevados de radiación ultravioleta entre los 200 y 400 nm que comprende las fracciones UV-C y UV-B, las implicaciones por el aumento de radiación en la Tierra representan un riesgo ambiental y de salud (Herndon *et al.*, 2018). La cantidad de UVR puede presentar variaciones que dependen principalmente de la altitud, la latitud, la hora del día, la estación del año y el estado de la capa de ozono. A pesar de la diferencia en cuanto al porcentaje entre las fracciones, está reportado que la UV-C y la UV-B poseen más energía por fotón y puede provocar un daño biológico mucho mayor que la UV-A (Jablonski & Chaplin, 2010; Izadi *et al.*, 2018).

Los impactos biológicos a nivel celular como la senescencia, la apoptosis o la necrosis inducidas por UV-C y UV-B son mayores a los de la UV-A, esto se explica principalmente porque por debajo de los 300 nm se encuentra el espectro de absorción de las principales biomoléculas que conforman a las células. El ADN, el ARN y las proteínas sufren efectos directos e indirectos por exposición a la UVR, muchos de los cuales son irreversibles, por lo tanto, esta fracción de la luz solar es de especial interés ya que impacta de forma positiva y negativa en la salud humana (Widel *et al.*, 2014).

2.2. Implicaciones Benéficas

La luz solar es la fuente primaria de UVR, y desde que fue descrita como el principal factor para el desarrollo de cáncer de piel se ha recomendado disminuir la frecuencia de exposición, sin embargo, los efectos patológicos que causa se relacionan mucho más con intervalos de tiempo prolongados que regulares (Van der Rhee *et al.*, 2016). Se ha reportado que la radiación UV-B interviene en numerosas vías fisiológicas como la síntesis de vitamina D, incremento de los niveles de melatonina, óxido nítrico y serotonina, además gracias al efecto inmunosupresor disminuye los síntomas de enfermedades como psoriasis y dermatitis atópica sobre todo en los primeros años de vida (Hart *et al.*, 2019).

2.2.1. Síntesis de Vitamina D

Cuando la UVR entra en contacto con la piel, esta es absorbida en la epidermis y la dermis por diversas moléculas entre ellas el 7-dehidrocolesterol (provitamina D3). Esto ocasiona la excitación de los dobles enlaces y, por consiguiente, un cambio estructural del esteroide para dar paso a la formación de previtamina D3, existe en isómeros *cis* y *trans* que posteriormente son convertidos a vitamina D3 (Holick, 2020). Una vez que se produce la previtamina D3 puede seguir absorbiendo UVR y dar lugar al menos a 6 fotoproductos conocidos como supraesteroles, sin actividad calcémica, pero con función regulatoria en el crecimiento de células epidérmicas y disminución del riesgo de cáncer de piel. Además, la vitamina D3 se metaboliza en el hígado y riñones a 1,25 dihidroxivitamina D3, la cual desempeña un rol esencial en muchas vías metabólicas e inmunológicas, así como en la regulación de niveles de calcio y fósforo para la salud del sistema esquelético y cardiovascular (Wacker & Holick, 2013).

2.2.2. Inmunoregulación

Otro efecto benéfico atribuible a la radiación UVR es la actividad inmunoreguladora, a través de la inhibición en la diferenciación de células Th17 y Th1 y el aumento de células T reguladoras (Linfocitos Treg), lo conlleva a una mayor tolerancia inmunitaria y menor riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes e inflamatorias. También se ha reportado el efecto hacia el sistema inmune innato ya que después de la fototerapia con UVR los queratinocitos liberan sustancias como péptidos antimicrobianos, defensinas, algunas ARNasas y proteínas que protegen de posibles infecciones bacterianas (Singer & Berneburg, 2018). Por lo tanto, la fototerapia con UVR es un auxiliar en enfermedades como psoriasis y dermatitis atópica, caracterizadas por altas poblaciones de linfocitos Th1/Th17 y sus principales citocinas IL-17, IL-22 e IL-23. Se ha propuesto que el mecanismo por el cual la UVR regula estas poblaciones celulares es mediante la inducción de apoptosis e inducción de inmunosupresión específica de antígeno, pero además aumenta la cantidad de linfocitos Treg circulantes lo que se traduce en la eficacia de la fototerapia (Morita, 2016).

2.2.3. Otros Efectos

Se ha reportado que la UVR incrementa la expresión de las enzimas óxido nítrico sintasa (NOS) productoras de óxido nítrico (NO), pero también promueve la síntesis y liberación no enzimática de NO, el cual, entre otras funciones actúa como vasodilatador y disminuye la presión sanguínea, por lo tanto, la UVR tiene efecto hipotensor a través del aumento en la producción de NO (Holliman *et al.*, 2017). Además, se han establecido fototerapias de luz, con efectos benéficos en enfermedades como eczema, vitíligo y psoriasis (Singer & Berneburg, 2018).

Aunque todavía no se conocen los mecanismos exactos acerca de cómo influye la UVR sobre el sistema neuroendócrino y el comportamiento estudios *in vivo* han evidenciado que la exposición a UV-B promueve la síntesis de ácido urocánico (UCA) en la piel, el cual sufre conversiones metabólicas a glutamato en las neuronas, funciona como neurotransmisor e interviene en procesos como aprendizaje motor y memoria a largo plazo (Grant, 2013). En la actualidad se siguen

investigando los potenciales beneficios de la radiación UV-B ya que se ha reportado que aumenta los niveles de β -endorfina, la cual regula el estado de ánimo, la sensación de placer y la analgesia (Ouchene *et al.*, 2020). Adicionalmente, ayuda a mejorar la cicatrización de heridas, al ser aplicada directamente sobre el tejido afectado ya que promueve la liberación de factores de crecimiento epidérmicos, y se ha utilizado la radiación UV-B extracorpórea de la sangre para estimular el sistema inmunológico (Gupta *et al.*, 2013).

2.3. Implicaciones Patológicas

Ha sido bien documentado que la exposición constante, de manera aguda o crónica a la UVR ocasiona patologías principalmente dérmicas, pero con efectos sistémicos, ya que los fotoproductos y las ROS pueden ingresar a circulación y promover el desarrollo de complicaciones en diferentes órganos (Young *et al.*, 2017). Actualmente la mayoría de los estudios clínico-patológicos, ensayos *in vivo* e *in vitro* están enfocados en elucidar los mecanismos que inducen efectos nocivos en la salud por las fracciones UV-A y UV-B, el principal uso de UV-C está relacionado a la inactivación de microorganismos superficiales patógenos o contaminantes, sin embargo, las consecuencias por exposición a la UV-C de fuente natural o artificial son de mayor impacto biológico (Forbes *et al.*, 2021)

La UVR es absorbida casi en su totalidad en la epidermis y la dermis por lo que una exposición aguda provoca efectos como eritema, inflamación, quemaduras solares, hiperlagesia, aumento en los niveles de ROS, daños al ADN y sensibilización de los nocireceptores. Por otro lado, la exposición crónica se relaciona principalmente con fotocarcinogénesis, fotoenvejecimiento, inmunosupresión y estrés oxidativo, todos estos efectos ocurren en mayor medida sobre la piel (Lopes & McMahon, 2016).

2.3.1. Eritema

Los efectos agudos dérmicos provocados por UVR se caracterizan por hiperlagesia, inflamación,

pérdida de función de la barrera cutánea, edemas y eritema, los mecanismos por los que se producen estas reacciones a corto plazo se relacionan con la fotoproducción aumentada de ROS que promueven activaciones transcripcionales, ocasionando un incremento en los niveles de expresión de ciclooxigenasas y de citocinas proinflamatorias como prostaglandina E2 (PGE2) e histamina (Krismayogi *et al.*, 2018). La PGE2 es una molécula clave en la progresión de la respuesta inflamatoria aguda inducida por UVR, aumenta la permeabilidad vascular al unirse a receptores 2 y 4 de prostaglandinas, lo que permite la infiltración de leucocitos en el área afectada provocando hinchazón y edema. La histamina, por su parte, aumenta la síntesis de PGE2 y la vasodilatación de la zona a través de vías asociadas al NO (Murata *et al.*, 2021).

2.3.2. Alteraciones en el ADN y Desarrollo de Cáncer

Se reconoce a UV-C y UV-B como estresores genotóxicos, el ADN puede absorberla directamente y alterar su estructura por lo que también se consideran agentes mutagénicos. Promueve la formación de fotoproductos como enlaces covalentes entre pirimidinas adyacentes para la formación de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPDs), fotoproductos de pirimidina (6-4) y pirimidona (6-4 PP), los dímeros pueden originarse en todos los sitios de dipirimidinas (CT, CC, TC, TT) (Drigeard Desgarnier & Rochette, 2018). Estas alteraciones detienen la transcripción y replicación de ADN. Para evitar mutaciones las células cuentan con sistemas de reparación de daños al ADN, pero su efectividad puede verse disminuida si existe una alta la tasa de formación y una baja frecuencia de reparación de CPDs (Budden *et al.*, 2016).

Además, si las mutaciones provocadas por UV-C se llevan a cabo en genes supresores de tumores, de inducción de apoptosis o de los sistemas de reparación como los genes TP53 o ATM, respectivamente, podrían dar lugar a la desregulación del ciclo celular y la proliferación de células con características neoplásicas (Shaj *et al.*, 2020). Aunado a esto, se han relacionado cambios epigenéticos en sitios ADN CpG inducidos por UV-B como la hipermetilación y desmetilación que suprimen y promueven la transcripción de genes relacionados a la regulación del ciclo celular, al crecimiento y a la apoptosis lo que podría derivar en el desarrollo de células cancerígenas (Yang *et al.*, 2019). La acumulación de mutaciones y los cambios epigenéticos evitan una replicación

correcta del ADN, un descontrol en la regulación del ciclo y la división celular por lo que se han relacionado directamente a UV-C y UV-B como agentes causales de cáncer de piel de tipo melanoma y no melanoma (D’Orazio *et al.*, 2013).

2.3.3. Fotoenvejecimiento

El fotoenvejecimiento se encuentra dentro del espectro de padecimientos originados por la UVR, se define como el cambio en las características normales de una piel joven, que paulatinamente pierde elasticidad, hidratación y células madre epidérmicas. Se traduce como problema de salud con una amplia proyección para líneas de investigación, por la variedad de vías patológicas involucradas (Singh *et al.*, 2018). El mecanismo por el cual se produce consta de una serie de eventos relacionados al daño en el ADN de células epiteliales, que ocasiona al mismo tiempo un incremento en la producción de ROS (Kober & Bowe, 2015).

Dicha producción de ROS desencadena la activación de proteínas de reparación de ácidos nucleicos, y detiene el subsiguiente ciclo celular, afectando la proliferación de fibroblastos y al nicho de células madre epiteliales. Todo esto tiene como resultado la incapacidad de recuperación cutánea y el fotoenvejecimiento (Panich *et al.*, 2016).

2.3.4. Inmunosupresión

Una de las consecuencias más graves de la exposición prolongada a la UVR es la inmunosupresión. Todas las líneas celulares inmunológicas se afectan y disminuyen su capacidad de respuesta contra microorganismos o antígenos patógenos y contra compuestos endógenos como las ROS. En algunos casos como en pacientes que presentan enfermedades autoinmunes, podría ser benéfico (Hart & Norval, 2018).

Existen diferentes vías por las cuales la UVR se considera inmunosupresora, el daño al ADN se produce cuando las bases pirimidínicas actúan como cromóforos y esto conlleva una diferenciación

desproporcionada de las células inmunológicas. Aumentan la cantidad de linfocitos T reguladores y disminuyen los linfocitos T efectoras. Se ha observado incluso una migración de los mastocitos y células de Langerhans a los nódulos linfáticos, donde aumentan la síntesis de IL-10, IL-4 y TNF (Stiefel & Schwack, 2015). Además, algunos compuestos como el ácido *cis*-urocánico, producidos por fotoisomerización se unen a receptores en mastocitos y aumentan la actividad de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX2) elevando los niveles PGE2, con actividad proinflamatoria (Bernard *et al.*, 2019).

2.3.5. Estrés Oxidativo

La radiación UVR es considerada un agente fotooxidativo ya que promueve la sobreproducción de ROS, que son compuestos de bajo peso molecular derivados del oxígeno, pueden ser compuestos radicales con átomos de oxígeno como anión superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH^\cdot), peróxido (ROO^\cdot) y alcóxido (RO^\cdot) o compuestos no radicales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO), ozono (O_3) y oxígeno singlete (1O_2). Una elevada concentración de éstos o una baja actividad de mecanismos antioxidantes propician un ambiente de estrés oxidativo, que ocasiona a largo plazo procesos inflamatorios, inducción de apoptosis, fotoenvejecimiento, daños sistémicos y cáncer. La fotooxidación aumenta proporcionalmente respecto al tiempo de exposición e intensidad de la UVR (Lephart, 2016).

Como se mencionó anteriormente, la sobreproducción de ROS ocasiona daños oxidativos en la estructura de la célula a nivel molecular, en lípidos de membranas celulares y mitocondriales, polisacáridos, ácidos nucleicos, enzimas y proteínas. La acumulación de estos compuestos proviene de la expresión de enzimas NADPH oxidasas como gp91_{PHOX} (NOX2), que cataliza una reacción de reducción del O_2 a O_2^- y/o H_2O_2 . Las ROS se comportan como segundos mensajeros promoviendo la síntesis de citocinas proinflamatorias (p ej., TNF- α e IL-6) y quimiotaxis de neutrófilos en el área afectada, estimulando los procesos inflamatorios (Martinez *et al.*, 2018). La producción de ROS inducida por UV-B activa vías de señalización como las de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), el factor nuclear κB (NF- κB) y la proteína activadora de factores de transcripción 1 (AP-1), induciendo inflamación y la apoptosis en las células y alterando también

la funcionalidad mitocondrial (Subedi *et al.*, 2017).

A pesar de que la UV-B se absorbe mayoritariamente en la epidermis, casi un 10% alcanza la dermis y puede afectar el ADN de células dérmicas residentes, de fibroblastos e incluso de células endoteliales (Olteanu *et al.*, 2014). Entre los límites de la epidermis y la dermis se encuentran vasos sanguíneos periféricos los cuales reciben UVR, por lo tanto, la sangre y sus elementos celulares también se encuentran expuestos. De hecho, se ha calculado que en adultos con un mínimo de 20 minutos de exposición a luz solar se puede irradiar el volumen total de sangre que circula por los capilares periféricos cutáneos (Agarwal, 2020). Además de eritema e inflamación la UVR propicia la extravasación de eritrocitos y puede reaccionar directamente con algunos componentes eritrocitarios, disminuye los niveles intracelulares de glutatión, favoreciendo una mayor oxidación lipídica de la membrana afectando su fluidez, sobreproducción de ROS y productos de hemoglobina fotosensibilizada que elevan la carga de radicales libres, lo que se manifiesta como en un efecto hemolítico (Carini *et al.*, 2000).

Los eritrocitos son las células principales del sistema circulatorio y debido a sus características químicas, metabólicas, funcionales y a su fácil aislamiento se consideran útiles en diferentes ensayos como cambios morfológicos e integridad de membrana, hemólisis, eritosis, estrés oxidativo y respuesta antioxidante (Podsiedlik *et al.*, 2020). En el caso del estrés oxidativo, los eritrocitos son un modelo muy completo ya que son vulnerables a la peroxidación de ácidos grasos de membrana por su alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados, posee hemoglobina con actividad redox que al oxidarse es una fuente de ROS, contiene mecanismo de respuesta antioxidante de tipo enzimático y no enzimático y su morfología puede ser alterada en casos de estrés oxidativo inducido por xenobióticos como la UVR (Frag & Alagawany, 2018).

2.4. Efectos de la Radiación Ultravioleta Sobre Eritrocitos

Las fracciones UVR que alcanzan la superficie terrestre penetran la piel de forma diferente (Figura 1), la UV-A llega hasta la hipodermis, aunque los efectos patológicos agudos son mínimos. La UV-B penetra la epidermis, tiene efectos agudos eritematosos, melanogénicos y llega a capilares sanguíneos superficiales donde circulan los eritrocitos (Polefka *et al.*, 2012). Ahí, la radiación UV-

A y UV-B interaccionan con cromóforos celulares como el grupo hem de la hemoglobina, dando lugar a formación de ROS y aumentando el estrés oxidativo (Garmyn *et al.*, 2018).

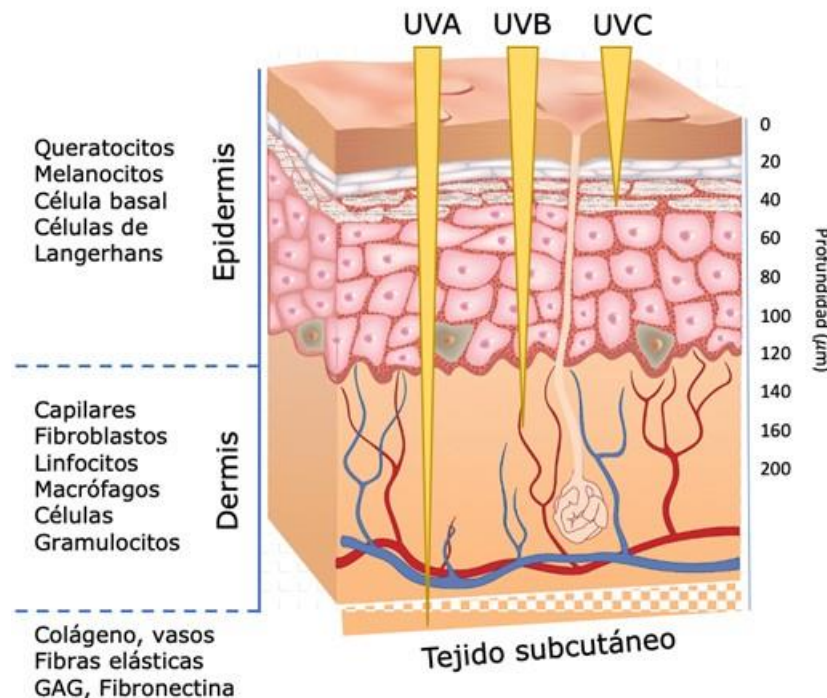


Figura 1. Capacidad de penetración de la radiación UVA, UVB y UVC en la piel

2.4.1. Generación de Metahemoglobina y ROS

Los eritrocitos son un modelo en el estudio del estrés oxidativo, no solo por la alta concentración de oxígeno que transportan, sino también porque son muy sensibles a ROS provocando su hemólisis (Dei Zotti *et al.*, 2020). Las ROS endógenas en el eritrocito provienen de autooxidación de hemoglobina y de glucólisis anaeróbica, específicamente de la enzima NADPH oxidasa, parte del metabolismo eritrocitario (Ho *et al.*, 2014). Sin embargo, la hemoglobina también actúa como cromóforo al absorber UVR, liberar esa energía y acelerar su oxidación desde oxihemoglobina afín al oxígeno (HbFe^{2+}), hacia metahemoglobina (metHbFe^{3+}) incapaz de realizar el intercambio gaseoso (Nabil *et al.*, 2013).

Al liberar la energía y oxidarse la hemoglobina no solo cambia el estado iónico del hierro, sino que

también genera ROS, primero el O_2^- , es dismutado por SOD a H_2O_2 y puede ser convertido a OH^- , que al reaccionar con los fosfolípidos de membrana generan radicales peroxil (LOO^\cdot) (Chisté *et al.*, 2014). La producción excesiva de radicales promueve el estrés oxidativo afectando componentes subcelulares de eritrocitos, ya que estas moléculas son reactivas e inestables. La alteración de lípidos de membrana, proteínas estructurales y enzimas antioxidantes finalmente conducen a hemólisis fotooxidativa (Pan *et al.*, 2012).

2.4.2. Peroxidación Lipídica y Daños en la Membrana

La membrana eritrocitaria es muy sensible a diferentes factores entre ellos el estrés oxidativo, por ello sirve como ejemplo para el estudio de la peroxidación lipídica y cambios citomorfológicos (Diederich *et al.*, 2018). Los efectos directos de la UVR a nivel de membrana plasmática se caracterizan por alteraciones superficiales, nanocavidades, nanoestructuras en forma de anillo y escisiones. La exposición de eritrocitos normocíticos a UV-B aumenta la dinámica de transformación hacia equinocitos y esferocitos (Kozlova *et al.*, 2016).

La UVR aumenta los enlaces C=C trans, las ROS generadas inhiben la actividad de Na^+K^+ ATPasa y Ca^{2+} ATPasa, atacan ácidos grasos insaturados de membrana aumentando el porcentaje de ácidos grasos saturados, ocasionan pérdida de fluidez y permeabilidad y generan desequilibrio iónico (Dai *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2012). La oxidación de proteínas estructurales de membrana promueve su entrecruzamiento y limita la deformabilidad eritrocitaria disminuyendo su funcionalidad y tiempo de vida (Misra *et al.*, 2005). La peroxidación lipídica de la membrana genera dos compuestos altamente reactivos, i.e., el 4-hidroxinonanal que se une a GHS reduciendo sus niveles intracelulares y afectado proteínas periféricas integrales y el malondialdehído (MDA), el cual provoca reticulación de proteínas y lípidos de membrana asociado a la disminución de la actividad de la SOD y la CAT e inducción de hemólisis (Frag & Alagawany, 2018).

2.4.3. Inducción de eriptosis mediada por ROS

La fotooxidación por UVR desencadena varios procesos fisiopatológicos, la sobreproducción de ROS satura el sistema antioxidante y se relaciona directamente con la inducción de muerte celular eritrocitaria o eriptosis, un proceso similar a la apoptosis en células nucleadas (Herlax *et al.*, 2011). En el estrés oxidativo celular caracterizado por niveles bajos de GHS, la eriptosis inicia con la apertura de canales de Ca^{2+} y K^+ (Lang *et al.*, 2014). Este intercambio iónico, junto con la presencia de ROS, incrementan la hiperpolarización de la membrana y la apertura de canales de Cl^- , produciendo una pérdida de KCl , una salida de agua mediada por un gradiente osmótico, lo que provoca una disminución del volumen intracelular y la deformación eritrocitaria (Lang & Lang, 2015).

Otras vías moleculares de eriptosis relacionadas con ROS incluyen la activación de caseína quinasa 1α , que permite y aumenta la entrada de Ca^{2+} . El estrés oxidativo activa el sistema de caspasas produciendo escisión del intercambiador iónico AE1, incrementando la velocidad de eriptosis y ocasionando que moléculas de fosfatidilcolina en superficie sean reconocidas por macrófagos para su fagocitosis. Los eritrocitos en sus primeros días de circulación o eritrocitos con más de 90 días de vida son más susceptibles a la inducción de eriptosis por estrés oxidativo (Repsold & Joubert, 2018; Lang *et al.*, 2012).

Aunque la UVR estimula la producción de ROS incrementando y acelerando la eriptosis, este tipo de muerte celular donde está involucrado el estrés oxidativo no es específica del fotodaño y, de hecho, también se presenta en pacientes con mutaciones en genes de enzimas antioxidantes, enfermedad renal terminal, diabetes mellitus tipo 2, algunos tipos de anemias hemolíticas y cáncer (Calderón-Salinas *et al.*, 2011; Abed *et al.*, 2014).

2.5. Estrategias Utilizadas Para Disminuir el Estrés Oxidativo en Eritrocitos

Un antioxidante es una sustancia reductora que evita y elimina el daño oxidativo sobre una molécula diana al contrarrestar los efectos negativos o neutralizar las ROS. Los productos de esta

reacción oxidativa son casi siempre químicamente estables y fáciles de reciclar o eliminar por el organismo. En general, los componentes antioxidantes se pueden clasificar de acuerdo con su procedencia, es decir, en endógenos o exógenos (Firuzi *et al.*, 2012).

Los eritrocitos cuentan con fuertes sistemas antioxidantes compuestos por una parte enzimática (SOD, CAT, GPx y GST) y una parte no enzimática conformada por GHS, vitaminas C, E, ubiquinol, ácido úrico y flavonoides (Baek & Lee, 2016). A pesar de ello, estudios en modelos *in vivo* e *in vitro* han evidenciado un claro déficit de los eritrocitos expuestos a la UVR para disminuir el estrés oxidativo, contrarrestar las ROS y evitar el fotodaño celular (Dunaway *et al.*, 2018). Actualmente se han implementado medidas profilácticas utilizando filtros solares sobre la piel para evitar el fotodaño, antioxidantes naturales exógenos por administración oral y tópica para reforzar el sistema antioxidante endógeno, además del uso de análogos sintéticos de antioxidantes (Pandel *et al.*, 2013).

Los filtros solares tópicos son una terapia preventiva ampliamente utilizada contra el fotodaño y el estrés oxidativo inducido por UVR. En su mayoría son productos que proveen una barrera física que dispersa y refleja la luz y componentes químicos que la absorben. Puede contener antioxidantes y osmolitos para disminuir el daño en la piel. Sin embargo, se han reportado efectos adversos, asociados a algunos componentes de los filtros solares como inhibición de precursores de vitamina D, reacciones alérgicas, fotoirritantes y algunos de los compuestos utilizados son bioacumulables (Gabros *et al.*, 2020).

Cuando un organismo es incapaz de neutralizar por completo las ROS, se requiere de fuentes exógenas (naturales o aditivos sintéticos) como suministro de antioxidantes, pudiéndose administrar por vía oral (efecto sistémico) o por vía tópica. Entre los más comunes se encuentran las vitaminas C, E y A, retinoides, polifenoles, β -carotenos, selenio y resveratrol. Sin embargo, el uso indiscriminado y la falta de dosis bien establecidas pueden provocar daños renales, citotóxicos, la inhibición de enzimas antioxidantes, y en el caso de aditivos sintéticos se relacionan con propiedades carcinogénicas, hepatotóxicas y de interrupción de apoptosis (Addor, 2017; Poljsak *et al.*, 2013).

2.5.1. Estrategias Emergentes Utilizadas Para Disminuir el Daño por Estrés Oxidativo en Eritrocitos

La búsqueda de nuevas opciones terapéuticas antioxidantes, con menores efectos secundarios y estabilidad prolongada se ha enfocado al estudio y evaluación de fitoextractos, fitoquímicos, así como microorganismos específicos y/o sus metabolitos. Debido a que presentan actividad antioxidante y anticancerígena en estudios *in vitro*. Aunque estos efectos no pueden ser extrapolados directamente a modelos *in vivo*, sirven como antecedente y punto de referencia para posibles y futuras evaluaciones clínicas (Nahhas *et al.*, 2019).

2.5.2. Fitoextractos y Fitoquímicos

Las plantas poseen una gran variedad de componentes antioxidantes principalmente no enzimáticos y productos de su metabolismo, aunque la mayoría se han limitado a evaluaciones *in vitro*. El primer fitoquímico antioxidante caracterizado fue la vitamina C, desde entonces existe un interés creciente, encontrándose numerosos agentes reductores y citoprotectores (Kasote *et al.*, 2015). Sustancias como epigallocatequina y polifenoles derivados del té verde han mostrado, en ensayos *in vivo*, la reducción del fotodaño por UVR a través de la disminución marcadores de inflamación y la producción de ROS. El resveratrol estimula la actividad de enzimas antioxidantes e inhibe inflamación y edemas *in vivo*. Otros compuestos con gran potencial son el honokiol, quercetina, sulforafano, apocinina, curcumina y extractos de aloe vera (Dunaway *et al.*, 2018).

2.5.3. Bacterias Ácido-Lácticas Específicas y Postbióticos

De acuerdo con la definición revisada de probióticos, estos se definen como "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del

hospedero" (Hill *et al.*, 2014). Las bacterias que comúnmente se han usado como probióticos corresponden a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, pero en algunos casos también son consideradas especies de los géneros *Streptococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus* e incluso levaduras como *Saccharomyces* (Sánchez *et al.*, 2017).

La investigación en el campo de la microbiología ha revelado la importancia de los probióticos y sus derivados para promover y mantener la salud, demostrando que los beneficios no se restringen únicamente al tracto gastrointestinal (Pandey *et al.*, 2015), ya que pueden ejercer efectos en tejidos y órganos distantes, debido a la capacidad de sintetizar y/o liberar compuestos que intervienen en diferentes procesos fisiológicos (p ej., ácidos grasos de cadena corta). Estas características particulares los han convertido en objeto de estudio en diferentes vertientes (Reid, 2016).

De particular interés son las propiedades antioxidantes dependiente de cepa de los probióticos, ya que estas les permiten modular los sistemas de defensa antioxidante en los organismos vivos, mediante el secuestro de iones metálicos que funcionan como catalizadores en reacciones de oxidación, contienen sus propios sistemas antioxidantes de tipo enzimático y no enzimático, producen metabolitos antioxidantes como glutatión, butirato y ácido fólico, participan en la modificación de la microbiota y modulan los niveles del factor de transcripción Nrf2 que es clave para la expresión de los genes de respuesta antioxidante (Wang *et al.*, 2017).

Por otra parte, recientemente se ha incrementado el interés por las investigaciones de metabolitos, células inactivadas o fracciones celulares llamados postbióticos. Estos compuestos son derivados de cepas probióticas y confieren beneficios a la salud de forma generalizada sin presentar riesgos sanitarios, con una estabilidad prolongada. Por lo tanto, su potencial terapéutico para prevenir y tratar algunas patologías es relevante, especialmente como alternativa para enfermedades de origen inflamatorio (Khmaladze *et al.*, 2019).

El término postbióticos refiere a factores solubles, productos o subproductos metabólicos, secretados por bacterias vivas o liberadas después de la lisis bacteriana. En general pueden ser clasificados dependiendo de su naturaleza química de origen peptídico, lipídico, derivados de carbohidratos y vitaminas, o de su función fisiológica inmunomoduladores, antiinflamatorios y antimicrobianos (Aguilar-Toalá *et al.*, 2018). Los postbióticos presentan ventajas respecto a los probióticos en términos de logística y manejo, su producción, transporte y almacenamiento (Aguilar-Toalá *et al.*, 2018). Además, pueden ser integrados en suplementos alimenticios, gracias a que son mucho más estables para el consumo en grupos vulnerables; se consideran seguros

porque no conllevan riesgo de translocación sanguínea, no transfieren genes de resistencia a antibióticos y las fracciones del contenido celular estimulan el mejoramiento de la función de barrera epitelial (Zakuan *et al.*, 2019).

Además, estudios *ex vivo* e *in vivo* han demostrado que el contenido intracelular y las fracciones celulares de algunas cepas probióticas tienen un enorme potencial citoprotector (Mishra *et al.*, 2015). Por ejemplo, se ha reportado que el contenido intracelular de *L. paracasei* CRL431 tiene la capacidad prevenir el daño oxidativo de proteínas y lípidos de membranas de eritrocito a través de la neutralización de radicales peroxilo derivados del AAPH, y radicales lipofílicos derivados de la peroxidación lipídica (Aguilar-Toalá *et al.*, 2019). Además, que el contenido intracelular de las cepas *L. fermentum* J10, *L. pentosus* J27 y *L. paracasei* CRL431, previenen y reducen el daño oxidativo en eritrocitos expuestos a acrilamida atenuando el desarrollo de eriptosis (Cuevas-González *et al.*, 2020).

3. HIPÓTESIS

El contenido intracelular de *Limosilactobacillus fermentum* J20, y *Lactiplantibacillus plantarum* 22 y 39 aumentan la actividad antioxidante, disminuyen los niveles de peroxidación lipídica y reducen el daño morfológico de eritrocitos humanos expuestos a radiación UV-C.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto protector del contenido intracelular de *Limosilactobacillus fermentum* J20, y *Lactiplantibacillus plantarum* 22 y 39 contra el estrés oxidativo inducido por radiación UV-C en eritrocitos humanos.

4.2. Objetivos Específicos

Determinar la capacidad de contenido intracelular de *Limosilactobacillus fermentum* J20, *Lactiplantibacillus plantarum* 22 y 39 para prevenir la alteración del sistema antioxidante y la peroxidación lipídica de eritrocitos humanos expuestos a radiación UV-C.

Evaluar el efecto del contenido intracelular de *Limosilactobacillus fermentum* J20, *Lactiplantibacillus plantarum* 22 y 39, sobre las propiedades morfogeométricas y la producción de especies reactivas de oxígeno en eritrocitos humanos expuestos a radiación UV-C.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos y Materiales

Los reactivos 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), lisozima de clara de huevo (CAS No. 12650-88-3, $\geq 40,000$ U), 2,2-azinobis-3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS; CAS No. 30931-67-0), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH; CAS No. 1898-66-4), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox; CAS No. 53188-07-1), persulfato de potasio (CAS No. 7727-21-1), fluoresceína sódica (CAS No. 518-47-8), 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH; CAS No. 2997-92-4), 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), hemoglobina humana (Hb; CAS No. 9008-02-0), peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 30%; CAS No. 7722-84-1), glutatión reductasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GR; CAS No. 9001-48-3), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH; CAS No. 2646-71-1), bicarbonato de sodio (CAS No. 144-55-8), terc-butilo hidroperóxido (70 %; CAS No. 75-91-2), nitro azul de tetrazolio (NBT; CAS No. 298-83-9), riboflavina (CAS No. 83-88-5), metionina (CAS No. 63-68-3), Yoduro de Potasio (KI; CAS No. 7681-11-0) fueron adquiridos en la empresa Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE. UU.) y o-ftalaldehido (OPA, CAS No. 643-79-8) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). El reactivo hidróxido de sodio (CAS No. 1310-73-2) fue obtenido de FERMONT (Hermosillo, Sonora, México). El metanol (CAS No. 67-56-1) de J.T. Baker® Chemicals (Phillipsburg, New Jersey, EE. UU.). Caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe) de BD Difco™ (Sparks, MD, EE. UU.). Los tubos con ácido etilendiaminotetraacético dipotásico (EDTA-K2: 7.2 mg) (75 unidades de USP) fueron adquiridos de BD Vacutainer® (Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). El kit DC Protein Assay fue obtenido de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EE. UU.). La lámpara UV-C 30W G30 T8 (Material No. 928039504005) fue adquirida de Phillips Lighting, (Eindhoven, BS, NL).

5.2. Cultivos Bacterianos

Las bacterias empleadas en el estudio fueron las cepas de *Limosilactobacillus fermentum* J20, *Lactiplantibacillus plantarum* 22 y *Lactiplantibacillus plantarum* 39, pertenecientes a la colección de cepas del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., (CIAD), Hermosillo, México. Las cepas fueron aisladas de un pseudocereal nativo de México (cepas 22 y 39) y de quesos artesanales (J20). Dichas cepas fueron seleccionadas por sus propiedades probióticas y antioxidantes *in vitro* (datos en proceso), y la capacidad de reducir mediadores de inflamación y citocinas proinflamatorias en un modelo murino con inflamación dérmica inducida por irradiación UV-B, respectivamente (Varela-Molina, 2019).

Los cultivos bacterianos fueron reactivados (1% v/v) en caldo MRS empleando tres subcultivos consecutivos de 24, 18 y 12 h a 37°C. El último subcultivo fue utilizado como el cultivo de trabajo, para lo cual las bacterias fueron recuperadas por centrifugación a 3600 x g, 4 °C, 10 min (Thermo Scientific Sorvall™ ST 16, Waltham, MA, EE. UU.), y el paquete celular fue lavado dos veces con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, 0.5 mM, pH 7.2) y resuspendidas en el mismo PBS hasta alcanzar una Densidad Óptica (DO)_{600nm} = 0.5 ± 0.02 (SpectraMax M3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU.), equivalente a una concentración aproximada de 1 x 10⁸ UFC/mL.

La cepa *Lacticaseibacillus casei* CRL431 (Chr. Hansen A/S, Boege Alle, Hoersholm, Dinamarca) fue utilizada como cepa testigo antioxidante para los ensayos de irradiación, debido a que en estudios previos se ha reportado sus propiedades antioxidantes *in vitro* (Aguilar Toalá *et al.*, 2019; Cuevas-González *et al.*, 2020), *in vivo* (Guerrero-Encinas *et al.*, 2020), y en un estudio clínico (González-González *et al.*, 2020).

5.3. Obtención del Contenido Intracelular

El contenido intracelular (CI) de cada cepa se obtuvo de acuerdo con la metodología reportada por Cuevas-González *et al.*, (2020). Para ello, 10 mL de cada cepa ajustada (1 x 10⁸ UFC/mL) se

centrifugó a 3600 x g, 4 °C, 10 min, y el paquete celular de cada una de las bacterias se resuspendieron en 1 mL de PBS adicionado con lisozima a una concentración de 1 mg/mL y se incubaron a 37 °C durante 150 min. Posteriormente, las células fueron sometidas a un proceso de sonicación a una intensidad de 9 (60 Hz) empleando un equipo Aquitaded 50D (Ultrasonic Cleaner, San Jose, CA, EE. UU.). El proceso de sonicación consistió en cinco ciclos de 1 min, y pausas de 1 min entre cada ciclo, y a una temperatura constante de 10 °C. Posteriormente, se adicionaron perlas de borosilicato (100 µM de diámetro; BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) en una proporción de 2:1 (p/v), y la mezcla se sometió a un proceso de agitación mecánica (VWR® Analog Vortex Mixer™, West Chester, PA, EE. UU.) que incluyó condiciones de 3500 x g, 1 min por 1 min de reposo a 10 °C. Las células lisadas se ajustaron al volumen inicial (10 mL) con PBS, y se centrifugaron (3600 x g, 4 °C, 10 min). El sobrenadante obtenido, considerado como el CI, se filtró utilizando una membrana de 0.22 µm (Corning Incorporated, Corning, NY, EE. UU.). Las muestras obtenidas se almacenaron en oscuridad a -20°C hasta su uso.

5.4. Determinación de Proteína

La concentración de proteína de los CI obtenidos se determinó 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 cinco puntos 0.2 - 1.5 mg proteína/mL (ANEXO 1).

5.5. Determinación de Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante de las muestras se determinó mediante tres pruebas diferentes, el radical catiónico ABTS, el radical DPPH y la capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés). Los resultados de capacidad antioxidante obtenidos por los diferentes métodos se expresaron como µM de Equivalente de Trolox, el cual se utilizó para crear una curva

estándar de siete puntos de 0 a 500 μM (ANEXO 2). Los ensayos se realizaron en condiciones de obscuridad.

5.5.1. Neutralización del Radical Cation ABTS

El ensayo de neutralización del radical cation ABTS se realizó siguiendo el procedimiento reportado por Aguilar-Toalá *et al.* (2017). Para la preparación del radical ABTS, éste se produjo mezclando 25 mL de ABTS (7 mM) con 440 μL de persulfato de potasio (140 mM) y se dejó reposar a 25 °C durante 16 h en oscuridad. Posteriormente, la solución de radical ABTS se diluyó con PBS (5 mM, pH 7.2) hasta una $\text{DO}_{734\text{nm}} = 0.70 \pm 0.02$ (SpectraMax M3). Posteriormente, se mezclaron 200 μL de solución ajustada de ABTS con 5 μL de muestra (CI, Trolox, o PBS como testigo), se agitaron durante 15 s y se incubaron durante 7 min a 30 °C en oscuridad. Finalmente, se registró la absorbancia a 734 nm utilizando un lector de microplaca (SpectraMax M3).

5.5.2. Neutralización del Radical DPPH

La determinación de la actividad de neutralización del radical DPPH se llevó a cabo de acuerdo con la metodología reportada por Herald *et al.* (2012). Para ello, se preparó una solución de DPPH (150 μM) en metanol al 80% (v/v). Posteriormente, 200 μL de la solución de DPPH se depositó en un pocillo de una microplaca, y se agregaron 25 μL de muestra (CI, Trolox, o PBS como testigo). La mezcla se agitó durante 15 s y se incubó 30 min a 22 °C, posteriormente, la absorbancia fue registrada 517 nm.

5.5.3. Ensayo de Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC)

El ensayo ORAC se realizó siguiendo la metodología reportada por Zulueta *et al.*, (2009). Para ello, se depositaron 50 μL de fluoresceína sódica (78 mM), utilizada como sonda fluorescente, en una microplaca de 96 pocillos, y se mezclaron con 50 μL de muestra (CI, Trolox, o PBS como testigo). y se pre-incubaron durante 15 min a 37 °C en oscuridad. Posteriormente, se agregaron 25 μL de AAPH (221 mM). A continuación, la microplaca se agitó durante 15 s y se registró la fluorescencia, a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm, cada 5 min durante 5 h a 37 °C en oscuridad. La recopilación de los datos y los cálculos se realizaron en una hoja de cálculo de Excel (Microsoft Corporation., Redmond, WA, EU.) para preparar las curvas de cada muestra, las cuales se normalizaron con respecto a la curva estándar (ANEXO 3). A partir de las curvas normalizadas, se calculó el área bajo la curva de disminución de la fluorescencia (AUC) de acuerdo con la ecuación 1:

$$AUC = 1 + \sum_{i=5}^{i=60} f_i / f_0 \quad (1)$$

Donde f_0 corresponde a la lectura de fluorescencia inicial a los 0 min y 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).

5.6. Ensayos con Eritrocitos

5.6.1. Consideraciones Bioéticas

Todos los procedimientos realizados en este apartado fueron acordes a los lineamientos

establecidos en la Declaración de Helsinki de 1975 (AMM, 2017) revisada en 2008, y la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012 (SSA, 2012), que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos. Adicionalmente, 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 CE/022/2019 y LCATA 107 2020 (ANEXO 4).

Para realizar los ensayos, se tomaron muestras de sangre de personas adultas que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: sujetos de entre 25 y 35 años, y que estuvieran libres de consumo de drogas, alcohol, cigarros, fármacos. Los participantes, de manera previa a su incursión dentro del estudio, respondieron un formulario (ANEXO 5) sobre información general y antecedentes de salud. Además, firmaron una carta de consentimiento informado para la obtención, procesamiento y análisis de la muestra (ANEXO 6).

5.6.2. Aislamiento y Separación de Eritrocitos

Para el aislamiento de eritrocitos, se obtuvieron 4 mL de sangre periférica, por venopunción en el área antecubital del brazo de cada persona. Para los ensayos de inhibición de oxidación de hemoglobina y oxidación lipídica, se obtuvieron muestras de tres personas sanas. Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos BD Vacutainer con EDTA-K2, siguiendo el protocolo indicado por la Organización Mundial de la Salud en la Carpeta de material sobre seguridad de las inyecciones y los procedimientos conexos en la sección 3, correspondiente a las practicas optimas en flebotomía y extracción sanguínea (OMS, 2011). Las muestras de sangre colectadas fueron centrifugadas a 1200 x g, 10 min, 4 °C, se descartó el plasma, la capa leucoplaquetaria y el 15% del concentrado superior de glóbulos rojos. Los eritrocitos se recuperaron y se lavaron dos veces con solución salina (NaCl; 0.9% p/v). A partir de los eritrocitos lavados se preparó una suspensión al 5% (v/v) suspendida en PBS a una concentración aproximada de 500×10^6 células/mL (Cuevas-González *et al.*, 2020). Esta última preparación se utilizó como solución de trabajo para los siguientes ensayos, considerando que para cada repetición del ensayo se preparó una solución nueva de eritrocitos, siguiendo el mismo protocolo de obtención.

5.6.3. Inhibición de Oxidación de Hemoglobina

La inhibición de la oxidación de la hemoglobina (IOHb) se evaluó monitoreando la capacidad del CI de cada cepa para disminuir la formación de metahemoglobina (methHb) después de la reacción entre AAPH y oxihemoglobina (HbO₂) (Chisté *et al.*, 2014). Para ello 200 µL de la solución al 5% de eritrocitos se mezclaron con 200 µL de CI, PBS (testigo) en microtubos cónicos de 1.5 mL y se incubaron en baño maría a 37 °C, durante 30 min, con agitación lenta (~50 rpm). Después de la incubación, se agregaron 200 µL de AAPH (50 mM, concentración final) y las mezclas se llevaron a incubación (37 °C, 50 rpm) durante 4 h. Al finalizar el periodo de incubación las muestras se centrifugaron (1500 x g, 5 min a 4 °C) y se tomaron 300 µL de los sobrenadantes para ser depositados en una microplaca. La absorbancia de las muestras registró a 630 nm. El porcentaje de IOHb fue calculado utilizando la ecuación 2:

$$\text{IOHb (\%)} = 100((\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco})/(\text{Abs testigo} - \text{Abs blanco})) \times 100 \quad (2)$$

Donde *Abs muestra* es la absorbancia de la muestra de la suspensión de eritrocitos que se incubaron con el CI más AAPH, *Abs blanco* es la absorbancia de la suspensión de eritrocitos sin AAPH y sin CI y, *Abs testigo* es la absorbancia de la suspensión de eritrocitos con adición de AAPH más PBS. Los ensayos se realizaron bajo condiciones de oscuridad.

5.6.4. Inhibición de Oxidación Lipídica

Para esta determinación se siguió la metodología reportada por Chisté *et al.*, (2014). El ensayo consistió en mezclar 500 µL de la suspensión de eritrocitos al 5% con 500 µL de CI o PBS (testigo) en microtubos cónicos de 1.5 mL y se incubaron en baño maría a 37 °C, durante 30 min, con agitación lenta (~50 rpm). Después de la incubación, se agregaron 500 µL de AAPH (50 mM,

concentración final) y las mezclas se llevaron a incubación a 37 °C, 50 rpm, durante 3 h adicionales. Posteriormente, 600 µL de cada muestra tratada se mezclaron con 250 µL de TCA (28%, p/v) para precipitar proteínas, posteriormente las muestras fueron centrifugadas (16,000 x g, 10 min, 18 °C). Para generar la reacción de malondialdehído (MDA) con TBA para la formación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBAR, por sus siglas en ingles), 500 µL del sobrenadante obtenido se mezcló con 125 µL de TBA (1%, p/v), y la mezcla se calentó durante 15 min a 93 °C. Al finalizar el tiempo de calentamiento, las muestras se dejaron enfriar a 25 °C y se centrifugaron (1500 x g, 5 min a 4°C). Del sobrenadante obtenido se depositaron 300 µL de cada muestra en pozos de microplacas de 96 pocillos y la absorbancia se registró a 532 nm y 453 nm para corregir los errores resultantes de la interferencia de otros compuestos durante la peroxidación lipídica (Gilbert *et al.*, 1984). Los valores de absorbancia corregidos se obtuvieron restando el 20% de la absorbancia a 453 nm a la absorbancia de 532 nm, y éstos se utilizaron para calcular el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica utilizando la ecuación 3 reportada por Chisté *et al.*, (2014):

$$\text{Inhibición de formación de TBARS(\%)} = 100 - ((\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco})/(\text{Abs testigo} - \text{Abs blanco})) \times 100 \quad (3)$$

Donde *Abs muestra* es el valor de absorbancia de los sobrenadantes de las muestras de eritrocitos que se incubaron con el CI más AAPH, *Abs blanco* es la absorbancia del sobrenadante de los eritrocitos sin exposición a AAPH y CI, y *Abs testigo* es la absorbancia del sobrenadante de la muestra de eritrocitos expuestos a AAPH. Los ensayos se realizaron bajo condiciones de oscuridad.

5.6.5. Evaluación de Características Morfogeométricas

Una alícuota (200 µL) de cada uno de los tratamientos (IOHb e inhibición de oxidación lipídica) fue retirada para visualizar cambios en las características morfogeométricas de los eritrocitos

provocados por la exposición a AAPH y observar el efecto protector del contenido intracelular de las cepas de estudio. Para ello se utilizó un microscopio ZEISS Axio ScopeA1 (Carl Zeiss, Jena, Alemania). La adquisición de imágenes para la determinación del área superficial, diámetro eritrocítico y el porcentaje de células dañadas (perdida de morfología al presentar células estrelladas) se realizó con el software Zeiss Axionvision 4.8.3 y con el objetivo de inmersión de 100x (NA 1.3, PlanNeoFluar, Carl Zeiss).

5.7. Ensayos con Radiación UV-C

Para realizar el ensayo de exposición de eritrocitos a radiación UV-C y evaluar el efecto protector de los CI, se obtuvieron muestras de sangre de cuatro personas sanas, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.6.2. Para la fuente de radiación se utilizó una lámpara UV-C 30W G30 T8 con un pico de irradiancia a 254 nm. Las muestras de sangre completa absorben significativamente la radiación ultravioleta a 254 nm (Kozlova *et al.*, 2016).

La distribución de los grupos y condiciones de los tratamientos se muestran en el Cuadro 1. Los grupos fueron distribuidos de la siguiente manera: testigo negativo: 1 mL de eritrocitos más 2 mL de PBS (5 mM, pH 7.2) y sin someter a radiación; testigo positivo: 1 mL de eritrocitos más 2 mL de PBS sometido a radiación; testigo antioxidante: 1 mL de eritrocitos más 1 mL de CI (CRL 431) y 1 mL de PBS; y los grupos experimentales (A-C): 1 mL de eritrocitos más 1 mL de CI de cada una de las cepas de estudio y 1 mL de PBS, todos sometidos a radiación.

Cuadro 1. Diseño de los grupos experimentales expuestos a radiación UV-C.

Grupo	Hto (μ L)	PBS (μ L)	CI de las cepas de trabajo (μ L)			CI de CRL 431 (μ L)	UV-C
			LFJ20	LP22	LP39		
Testigo negativo	1000	2000	-	-	-	-	-
Testigo positivo	1000	2000	-	-	-	-	+
Testigo antioxidante	1000	1000	-	-	-	1000	+
Grupo exp. A	1000	1000	1000	-	-	-	+
Grupo exp. B	1000	1000	-	1000	-	-	+
Grupo exp. C	1000	1000	-	-	1000	-	+

CI: Contenido Intracelular, Hto: Suspensión de eritrocitos 5%.

Los diferentes tratamientos evaluados se colocaron en una microplaca de poliestireno de 6 pocillos de fondo plano (Corning Costar, Madrid, ES) con un grosor de muestra de 2 mm para asegurar una irradiación homogénea. La distancia entre la lámpara de emisión de luz UV-C y las muestras fue de 20 cm. Las muestras fueron expuestas a irradiación durante 0, 40 y 60 min, para una dosis de radiación UV-C de aproximadamente 0, 21.0 y 31.5 mJ/cm², correspondientes a 0, 1.0 y 1.5 dosis mínima eritematogénica (Li *et al.*, 2012).

5.7.1. Obtención del Contenido Intracelular Eritrocitario

Posterior al proceso de radiación, se tomaron 200 µL de cada uno de los tratamientos para evaluar características morfogeométricas de los eritrocitos (sección 5.6.5) y, por separado 2 mL se centrifugaron (2500 x g, 10 min, 4°C) para recuperar el sobrenadante y determinar el grado de hemólisis. En paralelo, los eritrocitos fueron lavados tres veces con solución salina (NaCl 0.9% p/v) y resuspendidos al volumen inicial (2 mL) con esta misma solución. Seguido a esto, 1 mL de los eritrocitos fueron lisados al adicionar 10 mL de PBS (5 mM, pH 7.4) e incubados a 4 °C por 2 h. Esta mezcla fue centrifugada (3000 x g, 15 min, 4°C), y el sobrenadante resultante fue distribuido en alícuotas de 1.5 mL depositadas en microtubos ámbar de polipropileno (Eppendorf™, Eppendorf™, Fisher Scientific SL, Madrid, España) e inmediatamente congelados a -80°C hasta su uso en los ensayos que se describen a continuación.

5.8. Evaluación del Sistema Antioxidante de los Eritrocitos

5.8.1. Determinación de Niveles de Hemoglobina

Antes de determinar los niveles del sistema antioxidante e indicadores de oxidación en las muestras, se cuantificó la concentración de hemoglobina (Hb) de las muestras de eritrocitos

irradiados y lisadas, para expresar los resultados en U/g Hb para las enzimas antioxidantes, y en $\mu\text{moles/g Hb}$ para los parámetros de GSH, MDA y H_2O_2 . Para ello, 200 μL de cada muestra fueron depositados en una microplaca transparente de poliestireno de 96 pocillos para medir la absorbancia a 540 nm usando un lector de microplacas (SpectraMAX® M3). La concentración de Hb en las muestras se determinó usando una curva estándar de Hb nueve puntos desde 0.1 a 3.5 mg/mL (ANEXO 7).

5.8.2. Determinación de Niveles de Glutación

La concentración de GSH en las muestras irradiadas fue determinado siguiendo el método de OPA descrito por Aguilar-Toalá *et al.* (2019). Las muestras se mezclaron en una proporción 1:1 con TCA (10% p, v) y centrifugadas a 3600 x g por 5 min (Eppendorf™, Fisher Scientific SL, Madrid, España). Posteriormente, 50 μL de las muestras fueron colocadas en pozos de una microplaca negra de poliestireno de 96 y mezclados con 150 μL de reactivo de OPA. Esta mezcla fue incubada por 5 min a 25°C, en condiciones de oscuridad, e inmediatamente se registró la fluorescencia a 365 nm de excitación y 430 nm de emisión en un lector de microplacas. La concentración de GSH fue calculada usando una curva estándar de 0 a 50 μM de GSH (ANEXO 8).

5.8.3. Determinación de Actividad Catalasa

La actividad de la enzima catalasa (CAT), presente en la muestra estudiada, fue evaluada determinando la descomposición del H_2O_2 debido a la actividad de dicha enzima siguiendo la metodología descrita por Cuevas-González *et al.*, (2020). Para ello, una solución de H_2O_2 30 (mM) fue preparada el mismo día del análisis, aforando 340 μL de H_2O_2 al 30% a 100 mL con PBS (50 mM, pH 7.0). Posteriormente, 230 μL de la muestra y 470 μL de la solución de H_2O_2 fueron agregados a una celda de cuarzo de 10 mm de espesor (Hellma Analytics, Müllheim, Germany) y mezclados dos veces por inversión. Inmediatamente, la absorbancia de la reacción a 240 nm fue

registrada durante cada 30 s por 5 min a 37 °C (SpectraMAX® M3). Para determinar la concentración de H₂O₂ se utilizó la ecuación de Lambert-Beer y su coeficiente de extinción molar (39.4 mM⁻¹ cm⁻¹). Los resultados fueron expresados en U/g Hb considerando que una unidad de actividad enzimática de CAT fue definida como 1 μmol de H₂O₂ descompuestos por min como se indica en la ecuación 4.

$$U \text{ CAT/g Hb} = (\Delta \text{ Abs}/t)/(\epsilon) \quad (4)$$

Donde $\Delta \text{ Abs}$ es la diferencia de la absorbancia inicial menos la absorbancia final después de cinco min de reacción, t representa el tiempo en min, ϵ es coeficiente de extinción molar. Se consideró el factor de dilución de 3.04 para expresar los resultados.

5.8.4. Determinación de la Actividad de Superóxido Dismutasa

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) fue evaluada midiendo la capacidad de la muestra para inhibir la reducción fotoquímica del NBT, de acuerdo con el método reportado por Cuevas-González *et al.*, (2020). La mezcla para la reacción consistió en colocar en un tubo Eppendorf™ 2.525 mL de PBS (50 mM, pH 7.8), 670 μL de muestra, 20 μL de riboflavina (500 μM), 190 μL de NBT (2 mM,) 600 μL de metionina (100 mM) y 1 μL de EDTA (500 mM). La reacción se inició al exponer la mezcla bajo luz blanca emitida por una lámpara de luz blanca 23W (HEL-23W/65-T2, Tecnolite, Zapopan, México) y a temperatura de 25°C durante 15 min. Por último, 200 μL de la mezcla fueron depositados en una microplaca transparente de poliestireno de 96 pocillos para medir la absorbancia a 560 nm. Los resultados fueron expresados en U/g Hb considerando que una unidad de actividad enzimática de SOD fue definida como la cantidad de enzima necesaria para inhibir la reducción de NBT en un 50%. Los cálculos se realizaron utilizando la ecuación 5:

$$\text{Inhibición de reducción de NBT por } SOD_{560nm} (\%) = \frac{(\text{Abs muestra irradiada} - \text{Abs testigo}) \times 100}{\text{Abs testigo}} \times \frac{1}{50} \quad (5)$$

Donde el *control* fue la mezcla de reactivos sin NBT y muestra y, 1/50 representa el 50 % de inhibición igual a una unidad de actividad enzimática. Los resultados fueron ajustados al volumen final de la reacción y expresados como U/g de Hb.

5.8.5. Determinación de la Actividad de Glutación Peroxidasa

La actividad de la enzima glutación peroxidasa (GPx) fue evaluada determinando la oxidación de NADPH utilizando terc-butilo hidroperóxido como sustrato, de acuerdo con el método citado por Ansari *et al.* (2015). Para ello, se preparó una mezcla (5:1:1) compuesta por PBS (100 mM en EDTA 1 mM, pH 7.0), GSH (10 mM) y GR de *Sacharomoyces cerevisiae* (0.24 U/mL en PBS 100 mM, pH 7.0) y se tomaron 140 μL que fueron mezclados con 20 μL de la muestra de estudio y fueron colocados en una microplaca de poliestireno transparente de 96 pocillos. La mezcla fue incubada a 37 °C por 10 min. Posteriormente, 20 μL de NADPH (1.5 mM), preparado en una solución de bicarbonato de sodio al 0.1 % (p/v), se añadieron a la mezcla y se incubaron por 3 min a 37 °C. Finalmente, 20 μL de hidroperóxido de terbutilo (12 mM) fueron añadidos, e inmediatamente se registró la absorbancia a 340nm en un lector de microplacas, cada 30 s durante 5 min a 25 °C. Para determinar la concentración de NADPH se utilizó la ecuación de Lambert-Beer (citada en la sección 5.8.3) y se utilizó el coeficiente de extinción molar de GPx ($6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los resultados fueron expresados en U/g Hb considerando que una unidad de actividad enzimática de GPx fue definida como 1 μmol de NADPH oxidado por min.

5.9. Evaluación de Parámetros de Estrés Oxidativo

5.9.1. Ensayo de Inhibición de la Hemólisis Fotooxidativa

Para determinar la capacidad de inhibición de hemólisis de las muestras irradiadas, se tomaron 200 μL de los sobrenadantes obtenidos en la sección 5.7.1 y se colocaron en una microplaca transparente de 96 pocillos, y se registró la absorbancia a 524 nm. El porcentaje de inhibición oxidativa se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación 6:

$$\text{Inhibición (\%)} = (1 - ((A - B)/C)) \times 100 \quad (6)$$

Donde A es la absorbancia de las muestras irradiadas, B es la absorbancia del testigo negativo (muestra sin irradiar) y C es la absorbancia del hemolizado al 100%, compuesto por 500 μL de hematocrito al 5% y 1000 μL de agua miliQ.

5.9.2. Determinación de Peroxidación Lipídica

La peroxidación lipídica en los hemolizados fue determinada utilizando el método de sustancias reactivas con TBA descrito por Cuevas-González *et al.* (2020). La mezcla para la reacción consistió en 500 μL de muestra y 500 μL de TCA (20% p/v) que fueron incubadas por 5 min a 37 °C, después fueron centrifugadas a 2000 x g por 20 min. Del sobrenadante obtenido, 750 μL fueron mezclados con 750 μL de TBA al 0.67% y calentados por 1 h a 95°C en una placa de calentamiento (Eppendorf® Thermomixer confort, Hamburgo, Alemania). La mezcla fue enfriada a 25°C y aforada al volumen inicial (1.5 mL) con PBS (5 mM, pH 7.0), en caso de ser necesario debido a que puede ocurrir un proceso de evaporación durante el calentamiento. Para la determinación, 200

μL de la reacción aforada fueron depositados en una microplaca transparente de poliestireno de 96 pocillos para medir el desarrollo de color rosa a 532nm en un lector de microplacas. Los resultados se expresaron como concentración de MDA, el cual fue determinado utilizando la ecuación de Lambert-Beer (citada en la sección 5.8.3) y el coeficiente de extinción molar de MDA ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Por último, el índice de estrés oxidativo (OSi; por sus siglas en inglés) fue estimado con los valores obtenidos de la concentración de MDA, actividad de CAT y GPx (Aguilar-Toalá *et al.*, 2018) utilizando la ecuación 7:

$$Osi = (\text{niveles de MDA})/(\text{actividad CAT} + \text{Actividad GPx}) \quad (7)$$

5.9.3. Determinación de la Concentración de H_2O_2

De las especies reactivas de oxígeno, la concentración de H_2O_2 en las muestras irradiadas fueron determinadas espectrofotométricamente siguiendo la metodología reportada por (Caetano *et al.*, 2013). En breve, 500 μL de la muestra fueron colocados en un microtubo de polipropileno, seguido de 250 μL de TCA (0.1% p/v), 250 μL PBS (10 mM, pH 8.0) y 500 μL de KI (1 M). La reacción inició al agregar el KI e incubada a 4 °C durante 10 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12 000 x g, 15 min a 4 °C, seguido a esto, 200 μL de sobrenadante fueron depositados en una microplaca transparente de poliestireno de 96 pocillos e incubados a 25 °C por 20 min. Finalmente, la absorbancia fue registrada a 350 nm en un lector de microplacas. La concentración de H_2O_2 fue calculada usando una curva estándar con concentraciones conocidas de H_2O_2 (0-15 nM) (ANEXO 9).

5.10. Análisis Estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado y se empleó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) después de comprobar su normalidad con la prueba de D'Agostino Skewness. Las comparaciones de medias se realizaron con la prueba de Fisher con un nivel de significancia $P < 0.05$. Todos los datos se analizaron utilizando el software estadístico NCSS 2021 (Kaysville, UT, EE.UU.).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Determinación de Proteína

Se determinó la concentración de proteína de los diferentes CI. Los datos mostraron que el CI de *L. fermentum* J20 y *L. plantarum* 39 presentaron la mayor concentración de proteína (0.245 mg/mL y 0.240 mg/mL, respectivamente), siendo diferente ($P < 0.05$) al CI de *L. plantarum* 22 que fue de 0.206 mg/mL (Figura 2).

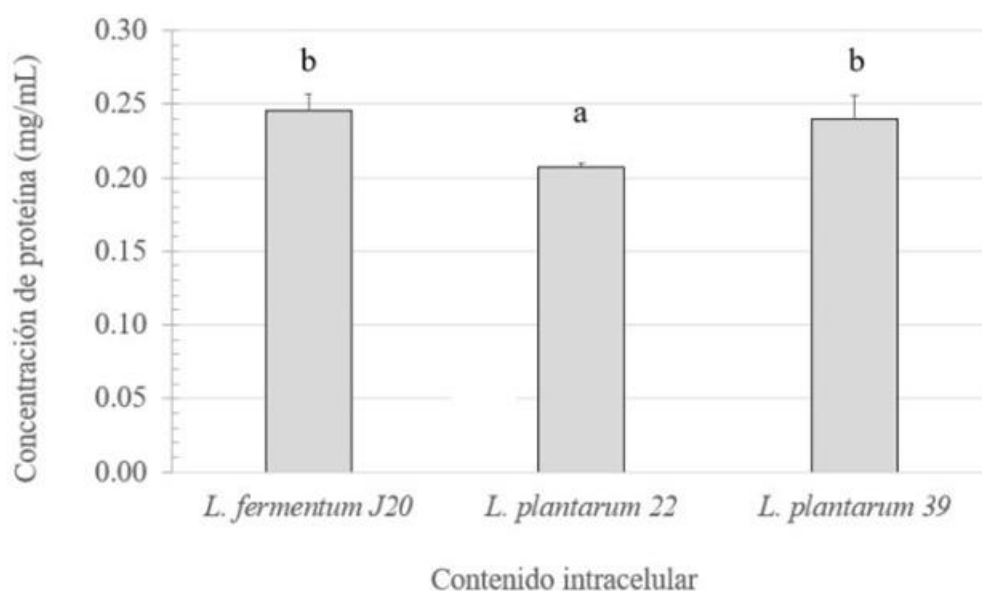


Figura 2. Concentración de proteína (mg/mL de BSA) en el contenido intracelular de las bacterias empleadas en el estudio. Los datos graficados representan la media \pm desviación estándar ($n = 4$). Literales distintas entre barras indican diferencias entre los CI de las cepas de estudio ($P < 0.05$).

Las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* poseen diferentes tipos de proteínas intracelulares, que pueden ser estructurales, enzimáticas o también péptidos, aunque pueden existir variaciones significativas dependientes de cepa. Tienen especial importancia porque son macromoléculas que intervienen en diversas funciones celulares, una de ellas es la respuesta a estresores como el choque térmico, cambios en el pH o estrés oxidativo (Mbye *et al.*, 2020).

En un estudio relacionado, Aguilar-Toalá y colaboradores (2019), reportaron el contenido de proteína (2.2 mg/mL) del CI de *L. casei* CRL 431, esta fracción mostró propiedades antioxidantes, contribuyendo con el 22% de la bioactividad, y participando con un efecto sinérgico con la fracción lipídica, con el que se observó un aumento hasta 48.1% de actividad antioxidante total. La correlación positiva entre la concentración de proteína y la actividad antioxidante del contenido intracelular puede ser debida a la presencia de enzimas como CAT y SOD, las cuales ya han sido anteriormente caracterizadas en otras bacterias como *L. casei* BL23 y *L. fermentum* E-3, E-18 (Wang *et al.*, 2017). Además gracias a la estructura de algunos aminoácidos, se ha demostrado que ciertos residuos o péptidos ricos en cisteína, glicina, metionina y tirosina presentan actividad antioxidante para neutralizar radicales ROO^- y ABTS^+ (Zheng *et al.*, 2016).

6.2. Determinación de Actividad Antioxidante

Los CI de las tres cepas de trabajo mostraron capacidad antioxidante con los diferentes métodos evaluados, saber, ORAC y ABTS, se reportan en la Figura 3. La actividad antioxidante reportada por el método de ORAC muestra que la mayor actividad corresponde al CI de *L. fermentum* J20 siendo 0.55 y 0.66 veces más alto que la actividad reportada por el CI de las cepas *L. plantarum* 22 y 39 ($P < 0.05$). En el ensayo de neutralización del radical de ABTS no se presentaron diferencias entre los CI de las cepas de estudio ($P > 0.05$). En este ensayo, los valores se encuentran en un rango de 61.87 a 69.82 μM de equivalentes de Trolox. Adicional a estos ensayos, se utilizaron dos métodos biológicos; (ITBARS y metHb) para evaluar la inhibición de componentes eritrocitarios expuestos a AAPH como inductor de estrés oxidativo (Figura 3). Los porcentajes de inhibición de los CI de cada una de las cepas inhibió entre un 47 y un 55% ($P > 0.05$) en la formación de TBARS, en restos de membrana celular. De la misma forma, los CI de las tres cepas inhibieron la formación de metHb, forma oxidada de la hemoglobina de 24 a 32%, siendo diferentes entre los CI de las cepas ($P < 0.05$), y mayor el porcentaje de inhibición del CI de *L. fermentum* J20.

Los resultados anteriores demuestran que los compuestos presentes en los CI poseen capacidad de absorber y neutralizar radicales del oxígeno y ABTS, posiblemente por mecanismos como la donación de electrones o la donación de átomos de hidrógeno, además tienen un efecto de

protección al inhibir parcialmente la oxidación de biomoléculas celulares como los lípidos de membrana y proteínas ya que mostraron disminuir la formación de ITBARS y metHb. Ninguno de los CI mostró actividad antioxidante por el método de DPPH.

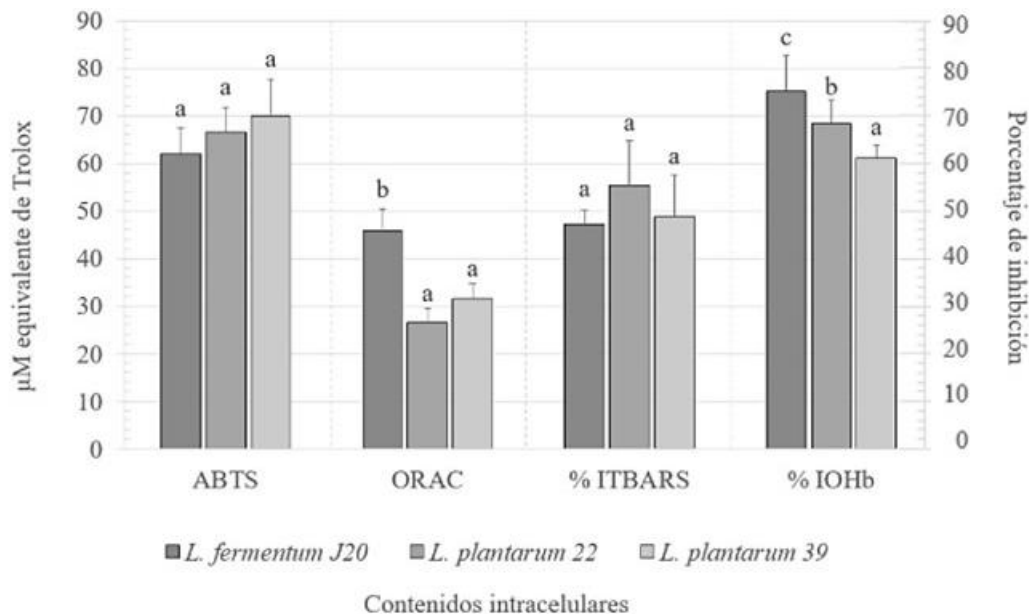


Figura 3. Actividad antioxidante por los métodos de ORAC y ABTS expresado en μM de equivalentes de Trolox. Porcentaje de inhibición en la formación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (ITBARS) e inhibición en la oxidación de hemoglobina (IOHb). Los datos graficados representan la media \pm desviación estándar ($n = 4$). Literales distintas entre barras indican diferencias ($P < 0.05$) entre los contenidos intracelulares de las cepas de estudio.

En un estudio realizado por Cuevas-González y colaboradores (2020), los autores observaron una tendencia similar en la actividad antioxidante por ORAC y ABTS para los CI de las cepas de *L. fermentum* J10 y J38 y *L. plantarum* J24, J26, J27 y J34, que la registrada en este trabajo, y menor actividad reportada por el método DPPH. Además, todos los CI mostraron capacidad de inhibición en la peroxidación lipídica con diferencias ($P < 0.05$) entre ellos. Aunado a esto, los tratamientos con CI de las cepas *L. fermentum* J10 y *L. plantarum* J24, J26, J27 mejoraron los mecanismos de respuesta antioxidante enzimática por SOD, CAT, GPx y no enzimática por GSH en los eritrocitos expuestos a acrilamida (0.1 mg/mL) como inductor de daño oxidativo.

Aunque previamente se han reportado las principales vías por las cuales los probióticos ejercen actividad antioxidante, aún existen distintos mecanismos que siguen sin ser completamente

elucidados. En este sentido, se ha encontrado que distintos componentes bioactivos como péptidos, Exopolisacáridos, ácidos grasos de cadena corta, producidos o liberados por las bacterias, se han asociado a sus propiedades antioxidantes (Aguilar-Toalá *et al.*, 2018). En el caso del contenido intracelular, la bioactividad antioxidante podría deberse a la presencia de enzimas como SOD, CAT, GPx, GR y GST, pero también a sustancias no enzimáticas como moléculas ricas en grupos tiol (-SH), iones de Mn^{2+} , GSH, o agentes quelantes de iones metálicos, estos componentes podrían funcionar de manera cooperativa atrapando radicales libres o neutralizando ROS (Tang *et al.*, 2017).

6.3. Inhibición de la Hemólisis oxidativa de Eritrocitos Expuestos a Estrés Oxidativo

Se evaluó la capacidad de los CI para inhibir o disminuir el porcentaje de hemólisis oxidativa y daño celular utilizando inductores químicos y físicos de estrés oxidativo (AAPH y radiación UV-C). Los resultados muestran que los eritrocitos expuestos a AAPH y CI, el porcentaje de hemólisis oxidativa fue $< 9\%$, inducida por AAPH (Figura 4). Dicha capacidad no fue diferente ($P > 0.05$) entre los CI con rangos de hemólisis entre 6.73 y 8.95 %; pero si fue menor el porcentaje con respecto al testigo positivo que solo fue expuesto a AAPH, el cual presentó un porcentaje de hemólisis de $20.95 \pm 2.75\%$. Estos resultados indican un efecto de protección de los CI a los eritrocitos expuestos a un inductor químico.

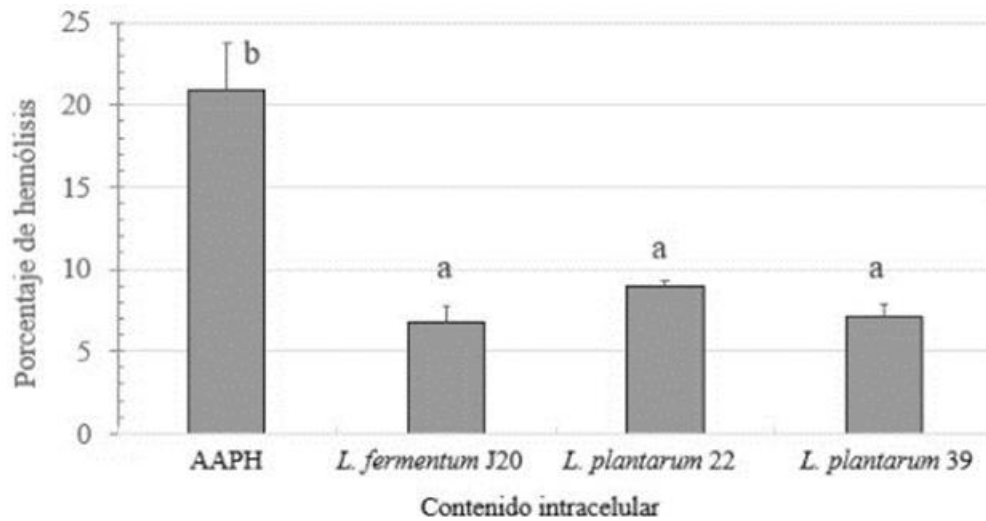


Figura 4. Evaluación de la inhibición del porcentaje de hemólisis oxidativa empleando AAPH (50 mM) como inductor químico de estrés oxidativo. Los datos graficados representan la media \pm desviación estándar ($n = 4$). Literales distintas entre barras indican diferencias ($P < 0.05$) entre los contenidos intracelulares de las cepas de estudio.

Por otro lado, en el ensayo que se utilizó la radiación UV-C como inductor de estrés oxidativo (Figura 5) muestra resultados similares, y al aumentar el tiempo de exposición a la radiación UV-C el porcentaje de hemólisis incrementa entre 0 y 40 min, en todos los casos ($P < 0.05$), pero menor para los tratamientos que tuvieron el CI, y fueron estadísticamente similar entre 40 y 60 min de exposición para los tratamientos con el CI de *L. fermentum* J20 y *L. plantarum* 22, a diferencia del grupo tratado con el CI de *L. plantarum* 39, que incremento el porcentaje a los 60 min de exposición a UV-C, pero en todos los casos, menor al testigo positivo (muestra irradiada) ($P < 0.05$). Estos resultados muestran de la misma forma, un efecto de protección de los CI para disminuir la hemólisis fototóxica.

Después de 60 minutos de irradiación todos los grupos tratados con el CI mostraron valores menores ($P < 0.05$) a los presentados por el testigo positivo con un promedio general de 17.89% menos de hemólisis fotooxidativa. De esta manera se puede demostrar que al recibir una dosis acumulada de 30.5 mJ/cm^2 (equivalente a 60 min de irradiación) los CI de las cepas presentaron mayor protección en el orden ascendente iniciando con *L. plantarum* 22, *L. plantarum* 39, *L. fermentum* J20, siendo esta última, un porcentaje similar al obtenido por el CI de la cepa testigo antioxidante (*L. casei* CRL 431).

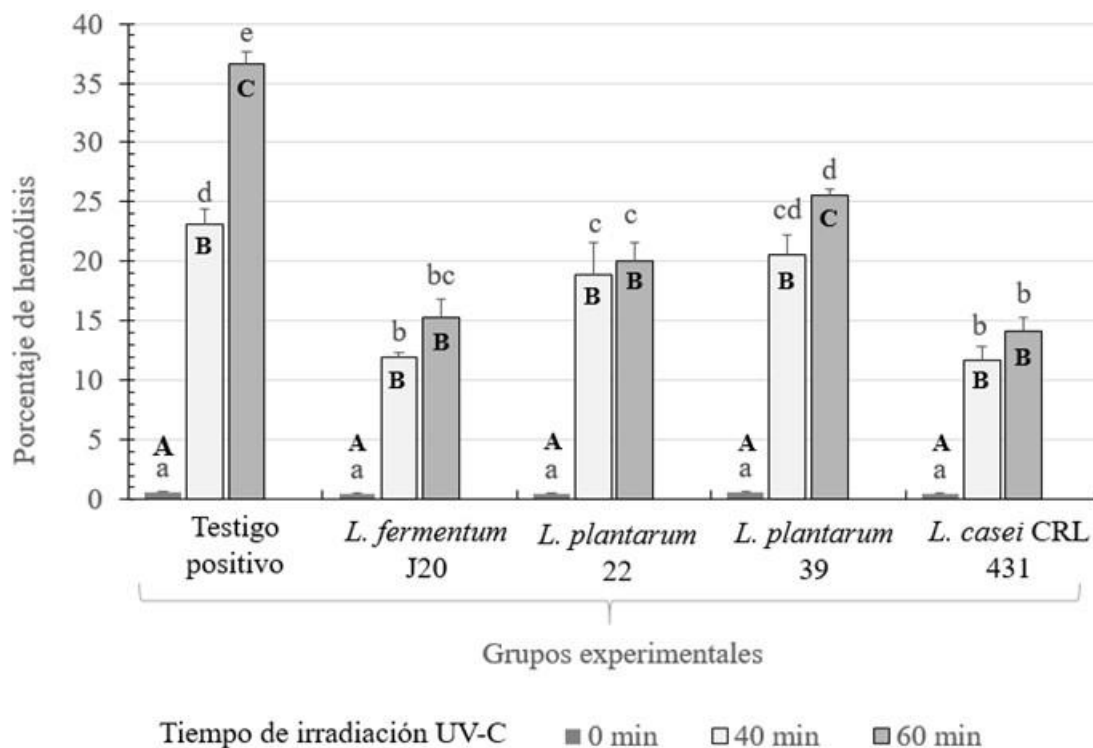


Figura 5. Porcentaje de inhibición de hemólisis oxidativa empleando radiación UV-C como inductor físico de estrés oxidativo. Los datos graficados representan la media \pm desviación estándar ($n = 3$). Literales minúsculas distintas entre barras indican diferencias entre los contenidos intracelulares de las cepas; mientras que literales mayúsculas distintas indican diferencia entre tiempos para un mismo grupo ($P < 0.05$).

En general, estos valores son similares a los obtenidos por Cuevas-González y colaboradores (2020), quienes emplearon CIs de las cepas *L. fermentum* J10 y *L. plantarum* J24, J26 y J27 para inhibir la hemólisis oxidativa inducida por AAPH obteniendo valores de hemólisis por debajo del 32%; mientras que en el estudio reportado por Aguilar-Toalá y colaboradores (2019) reportaron valores de inhibición de hemólisis oxidativa $> 50\%$ al utilizar el CI de *L. casei* CRL 431. Estos resultados sugieren que los compuestos que disminuyen la hemólisis oxidativa inducida por AAPH se encuentran presentes en el contenido intracelular de estas cepas, probablemente estas sustancias eliminan los radicales ROO^{\cdot} y evitan la formación de TBARS manteniendo la estabilidad eritrocitaria (Qin *et al.*, 2020).

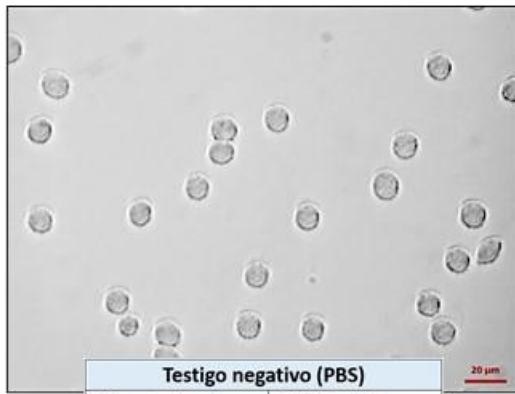
Estudios relacionados con la actividad antioxidante y antihemolítica de postbióticos han sido previamente reportados. En este sentido, los sobrenadantes que contienen metabolitos liberados por otras cepas probióticas como *Bacillus clausii* O/C han demostrado inhibir completamente la

hemólisis inducida por toxinas bacterianas (Ripert *et al.*, 2016). Además, otros postibióticos de naturaleza protéica derivados de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* DSM 2649 han presentado actividad antioxidante por ABTS y DPPH, con alta actividad de las enzimas CAT, SOD y GPx, lo que abre la posibilidad a estas moléculas presentes en los CI en un posible blanco terapéutico contra enfermedades relacionadas al estrés oxidativo (Osman *et al.*, 2021).

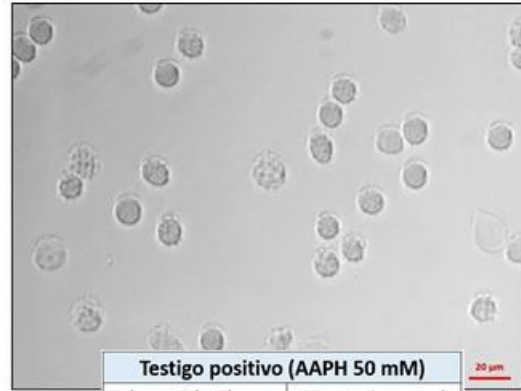
6.4. Evaluación de las Características Morfogeométricas Celulares

Las micrografías obtenidas de los diferentes ensayos evidenciaron el daño a la estructura celular de los eritrocitos provocado por el AAPH y radiación UV-C. Para esto, se tomaron en cuenta cuatro parámetros principales, a saber, diámetro, área superficial, porcentaje de células dañadas, y el cambio en la morfología normal del eritrocito (Figura 6). Los resultados de diámetro y área superficial mostraron mayor daño ocasionado por el estrés oxidativo del AAPH; mientras que el CI de *L. fermentum* J20 fue menor e igual ($P < 0.05$) a lo obtenido por el grupo testigo (PBS); mientras que los valores de los eritrocitos tratados con el CI de *L. plantarum* 22 y 39, fueron iguales ($P > 0.05$) a los del grupo tratado con el inductor AAPH.

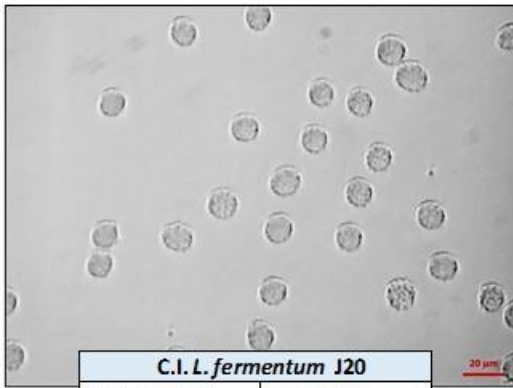
Adicionalmente, se determinó el porcentaje de células dañadas considerando como parámetros de daño ondulaciones en la membrana celular, y pérdida de la forma bicóncava del eritrocito (Figura 5). En general, todos los grupos tratados con el CI presentaron menor porcentaje de células dañadas ($P < 0.05$) en comparación con el grupo tratado con AAPH ($P < 0.05$), destacando los eritrocitos tratados con los CIs de *L. fermentum* J20 y *L. plantarum* 22 quienes presentaron menor porcentaje ($P < 0.05$) de células dañadas que los eritrocitos tratados con el CI de *L. plantarum* 39. (Figura 5).



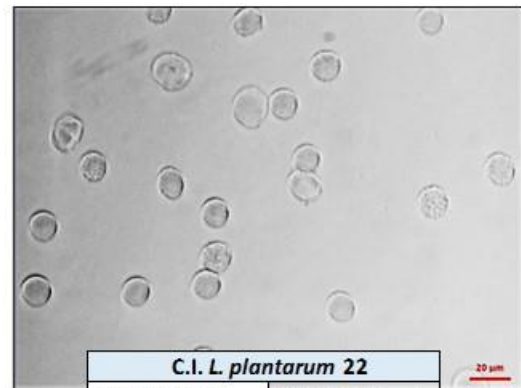
Testigo negativo (PBS)		
Diámetro (μm)	10.85 ± 0.26	a
Área (μm^2)	93.10 ± 4.60	a
Celulas dañadas (%)	11.82 ± 5.23	a



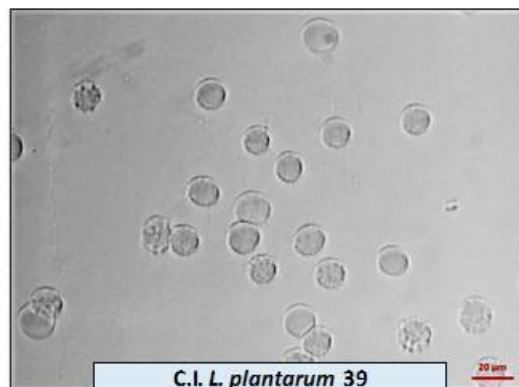
Testigo positivo (AAPH 50 mM)		
Diámetro (μm)	13.14 ± 0.44	b
Área (μm^2)	137.32 ± 9.43	b
Celulas dañadas (%)	80.73 ± 4.57	d



C.I. <i>L. fermentum</i> J20		
Diámetro (μm)	11.45 ± 0.39	a
Área (μm^2)	104.13 ± 7.59	a
Celulas dañadas (%)	31.58 ± 9.81	b



C.I. <i>L. plantarum</i> 22		
Diámetro (μm)	12.67 ± 0.50	b
Área (μm^2)	128.41 ± 10.8	b
Celulas dañadas (%)	39.44 ± 6.30	b



C.I. <i>L. plantarum</i> 39		
Diámetro (μm)	12.76 ± 0.41	b
Área (μm^2)	129.41 ± 8.77	b
Celulas dañadas (%)	63.95 ± 5.61	c

Figura 6. Evaluación de las características morfogeométricas celulares de los eritrocitos expuestos a AAPH y adicionados con los CIs. Los datos representan la media \pm desviación estándar ($n = 3$). Literales distintas entre cada parámetro determinado indica diferencias significativas entre los CI de las cepas de estudio ($P < 0.05$).

Por otro lado, al utilizar la radiación UV-C como agente inductor físico de estrés oxidativo y fotodaño celular se observó que después de 60 minutos las características de los eritrocitos en todos los tratamientos que recibieron irradiación presentaron resultados similares. En general, la mayor parte de las células presentaron modificaciones estructurales a nivel de membrana, un aumento del tamaño y un cambio de morfología a tipo equinocitos. Mientras tanto el control negativo (sin irradiación UV-C) mantuvo la forma circular, biconcava típica de éstas células (Figura 7).

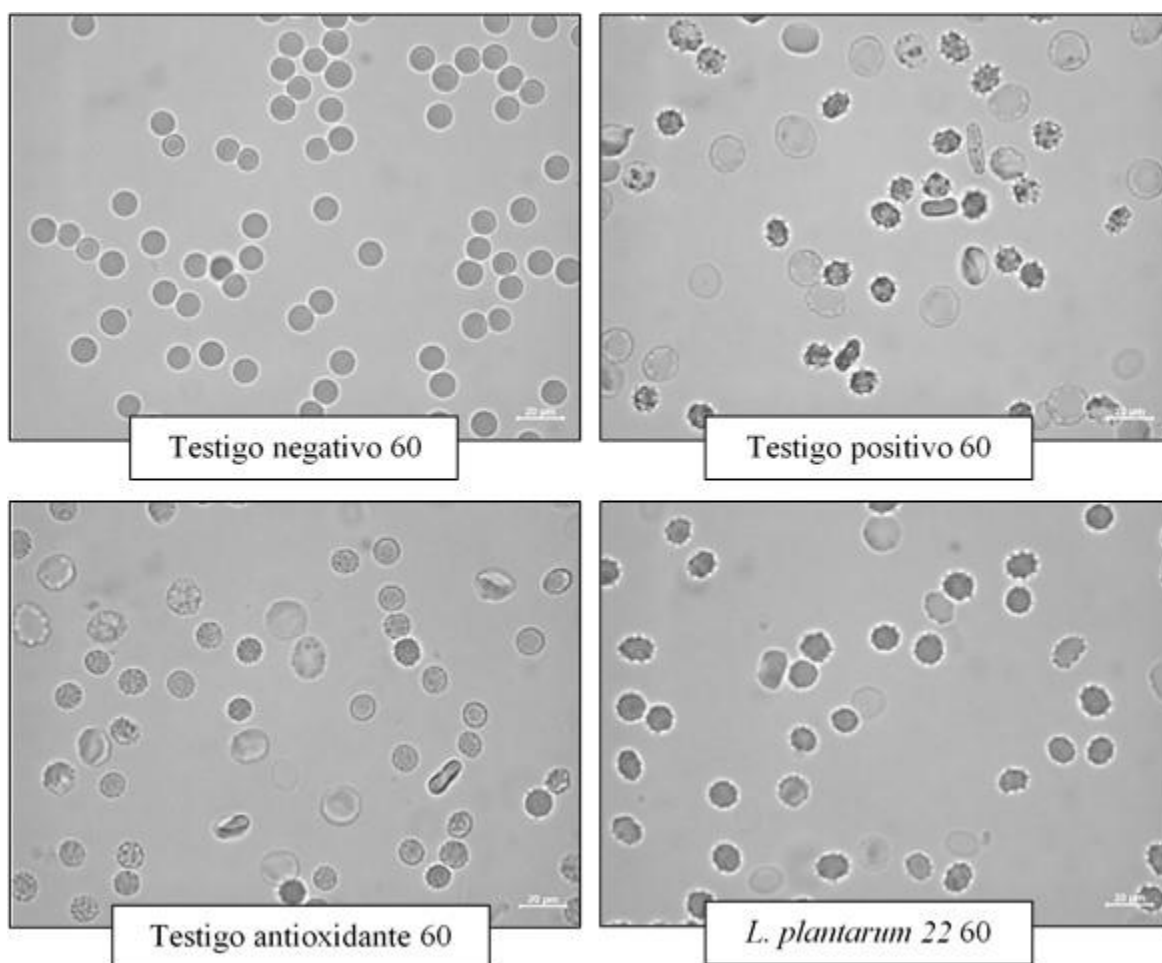


Figura 7. Evaluación de las características morfogeométricas celulares de los eritrocitos expuestos durante 60 min expuestos a radiación UV-C acumulada de 30.5 mJ/cm^2 (testigo positivo), y los diferentes grupos tratados con el contenido intracelular.

En un estudio previo reportado por Aguilar-Toalá y colaboradores (2019) demostraron que el CI de *L. casei* CRL 431 redujo la deformabilidad de la membrana de los eritrocitos, lo que sugiere una

disminución de la hemólisis oxidativa. Por lo que estos resultados previos y los obtenidos en el presente estudio muestran el efecto protector del CI que podría prevenir el daño oxidativo a proteínas y lípidos en sistemas biológicos a través de la transferencia del átomo de hidrógeno o la transferencia de un solo electrón.

El mecanismo por el cual el AAPH provoca daño eritrocítico, está asociado al estrés oxidativo mediante la generación de radicales ROO-, estos radicales pueden promover la formación de ROS y reaccionar con macromoléculas del eritrocito. En este sentido, se ha reportado que el AAPH induce un aumento en los niveles de MDA a través de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados de membrana debido a que el MDA es una molécula tóxica y altamente reactiva hacia proteínas y componentes celulares, además este inductor oxidativo disminuye los niveles intracelulares de GSH, debilitando la respuesta antioxidante (Sarkar *et al.*, 2017). El AAPH, además, se ha relacionado con la oxidación de la hemoglobina, la pérdida en la fluidez de la membrana, y el cambio en la morfología celular. Se ha reportado que el AAPH altera el patrón electroforético de proteínas bandas (1 y 2) y espectrinas (3, 4.1, 4.2 y 5), proteínas que forman parte del citoesqueleto de los eritrocitos. Todos los factores anteriores se ha reportado que provocan un aumento en la hemólisis fotooxidativa (Baccarin *et al.*, 2015).

6.5. Efecto Protector del Contenido Intracelular a Eritrocitos Expuestos a Radiación UV-C

En el Cuadro 2 se muestran los valores obtenidos de la actividad antioxidante enzimática (a saber, SOD, CAT y GPx), y no enzimática (GSH) de las muestras de eritrocitos irradiados. En el caso de la actividad de CAT, se evidenció la disminución de la actividad enzimática ($P < 0.05$) en 3.67 U/g Hb al aumentar el tiempo de irradiación de 40 a 60 min para el testigo positivo (irradiado sin CI); mientras que la actividad del testigo negativo se mantuvo constante entre 40 y 60 min ($P < 0.05$). Los grupos tratados con el CI de *L. fermentum* J20 y *L. plantarum* 39 evidenciaron mayor actividad enzimática con respecto al testigo positivo ($p < 0.05$) para un mismo tiempo, así como a través de los 40 y 60 min, destacando el CI de *L. plantarum* 39 y J20 con resultados similares ($p > 0.05$) al testigo antioxidante CI- CRL431.

En el caso particular de la actividad de SOD, se evidenció una disminución ($P < 0.05$) de la

actividad a los 40 y 60 min respecto al tiempo cero para el testigo positivo de 9.02 y 13.08 U/g Hb, respectivamente. Con los resultados de la actividad enzimática del testigo positivo, podemos mencionar que la actividad *per se* de los eritrocitos se ve afectada al momento de inducir la irradiación. Por el contrario, los grupos experimentales con el CI de *L. fermentum* J20 y *L. plantarum* 22, mostraron mayor actividad ($P < 0.05$) a los 40 min respecto al testigo positivo siendo la actividad de 3.10 y 1.99 veces más alto dicha actividad. A los 60 minutos de irradiación, las actividad SOD de los grupos experimentales y testigo antioxidante disminuyeron ($P < 0.05$) respecto a los 40 min de exposición a radiación UV-C, aunque la actividad de los grupos con el CI de *L. fermentum* J20, *L. plantarum* 39 fue mayor ($P < 0.05$) con respecto al testigo positivo con 12.41 y 5.72 U/g Hb, destacando con la mayor actividad el CI de *L. fermentum* J20, incluso que el testigo antioxidante, quien presento 8.66 U/g Hb.

La actividad enzimática para GPx en el tiempo cero, fue estadísticamente similar para todos los tratamientos, pero el testigo positivo presentó una disminución ($P < 0.05$) de 9.44 U/gHb y 12.93 U/gHb con respecto al testigo negativo a los 40 y 60 min de exposición a radiación UV-C, respectivamente. En general, los grupos experimentales con CI presentaron mayor actividad enzimática respecto al testigo positivo ($P < 0.05$), en los dos tiempos de exposición a radiación UV-C. En particular, el CI de J20 mostró mayor actividad de GPx (41.56 U/gHb), aunque no fue diferente ($P > 0.05$) con los CI de *L. plantarum* 22 y 39 quienes presentaron 37.25 y 40.18 U/gHb, a los 40 min de exposición a radiación. Únicamente el grupo experimental con el CI de *L. plantarum* 22 presentó menor actividad, pero estadísticamente similar al testigo positivo. En general, el grupo experimental con el CI de *L. plantarum* 39 y J20 fueron los que presentaron los valores más alto de actividad enzimática de GPx, cercanos a lo que presento el CI del testigo antioxidante respecto al control positivo.

La actividad no enzimática (GSH) mostro resultados estadísticamente iguales en los diferentes tiempos de exposición, y no se presentaron diferencias ($P > 0.05$) en los grupos experimentales, con respecto al grupo testigo y negativo. Este resultado podría sugerir que el efecto de la radiación se regula, principalmente por enzimas antioxidantes (*i.e.*, CAT, SOD, GPx) y la presencia de los CI favorece que dicha actividad enzimática se incremente.

Se ha reportado que postbióticos derivados las cepas de *L. fermentum* CCM 7158 y *L. plantarum* C88 poseen una concentración más elevadas de GPx, lo que les confiere mayor actividad antioxidante por esta vía (Aghebati *et al.*, 2021). Otros estudios indican que algunas cepas de

Lactobacillus y *Bifidobacterium* pueden secretar enzimas antioxidantes como MnSOD, y algunos antioxidantes no enzimáticos como GSH, además de participar en la neutralización de lípidos oxidados e hidropéroxidos, radicales hidroxilo y peroxinitrito principalmente mediante la cooperación con GPx dependiente de Se (Nowak *et al.*, 2019).

Otro estudio observó que el postbiótico derivado de *L. plantarum* RG14 mostró actividad antioxidante tanto en el ensayo DPPH como ABTS. En un estudio *in vivo*, se realizó la suplementación del postbiótico de *L. plantarum*, observando una mejora en la actividad antioxidante del grupo postbiótico reflejada en mayor actividad de GPx en suero y líquido ruminal y menor TBARS en suero. Los hallazgos se vieron reforzados por la regulación positiva de GPX1 hepático, GPX4 cobre, superóxido dismutasa de zinc (Cu / Zn SOD) en el grupo postbiótico. Este estudio demostró que los postbióticos dietéticos mejoraron la actividad antioxidante del suero y del líquido ruminal, reducen la peroxidación de lípidos séricos y aumentan las enzimas antioxidantes hepáticas (Izzudin *et al.*, 2020).

Cuadro 2. Actividad de enzimas antioxidantes (U/g Hb) y niveles de antioxidantes endógenos no enzimáticos (μ moles/g Hb) en muestras de eritrocitos expuestos a radiación UV-C.

	Tratamiento	0 min	40 min	60 min
CAT	T. negativo	18.35 \pm 0.75 ^{c,C}	8.81 \pm 0.22 ^{a,B}	7.59 \pm 0.58 ^{a^A}
	T. positivo	13.21 \pm 2.86 ^{a,B}	12.66 \pm 1.83 ^{b,^B}	8.99 \pm 1.16 ^{ab^A}
	CI-LFJ20	15.50 \pm 1.52 ^{abc,^A}	12.66 \pm 1.45 ^{b^A}	11.86 \pm 4.57 ^{b^A}
	CI-LP22	14.10 \pm 1.89 ^{ab,^B}	12.09 \pm 1.81 ^{b^B}	7.89 \pm 1.01 ^{a^A}
	CI-LP39	14.67 \pm 2.43 ^{ab,^A}	14.20 \pm 1.04 ^{bc^A}	14.12 \pm 1.39 ^{c^A}
	CI-LC431	17.54 \pm 1.73 ^{bc,^B}	15.52 \pm 0.18 ^{c^A}	14.34 \pm 1.90 ^{c^A}
SOD	T. negativo	15.25 \pm 4.26 ^{a,^A}	8.36 \pm 0.01 ^{a,^A}	10.37 \pm 3.08 ^{b,^A}
	T. positivo	16.65 \pm 2.13 ^{ab,^B}	7.63 \pm 1.90 ^{a,^A}	3.27 \pm 1.60 ^{a,^A}
	CI-LFJ20	13.09 \pm 1.86 ^{a,^A}	23.72 \pm 8.32 ^{b,^A}	12.41 \pm 1.88 ^{b,^A}
	CI-LP22	13.19 \pm 0.39 ^{a,^B}	15.24 \pm 0.95 ^{ab,^A}	2.26 \pm 2.88 ^{a,^A}
	CI-LP39	12.91 \pm 0.53 ^{a,^B}	6.46 \pm 0.425 ^{a,^B}	5.72 \pm 0.31 ^{ab,^A}
	CI-LC431	22.27 \pm 2.58 ^{b,^B}	8.11 \pm 2.19 ^{a,^{AB}}	8.66 \pm 2.40 ^{ab,^A}
GPx	T. negativo	61.80 \pm 2.71 ^{ab,^B}	39.74 \pm 4.30 ^{b,^A}	44.70 \pm 5.54 ^{cd,^A}
	T. positivo	58.83 \pm 7.65 ^{a,^B}	30.30 \pm 4.46 ^{a,^A}	31.77 \pm 2.86 ^{ab,^A}
	CI-LFJ20	61.76 \pm 4.88 ^{ab,^C}	41.56 \pm 4.06 ^{b,^A}	36.95 \pm 4.06 ^{abc,^B}
	CI-LP22	64.97 \pm 3.08 ^{ab,^B}	37.25 \pm 3.27 ^{ab,^A}	29.81 \pm 2.61 ^{a,^A}
	CI-LP39	72.35 \pm 2.72 ^{c,^C}	40.18 \pm 5.43 ^{b,^B}	40.34 \pm 3.06 ^{c,^A}
	CI-LC431	65.88 \pm 2.26 ^{b,^B}	35.30 \pm 4.66 ^{ab,^A}	50.86 \pm 3.19 ^{d,^A}

Cuadro 2 (Continuación). Actividad de enzimas antioxidantes (U/g Hb) y niveles de antioxidantes endógenos no enzimáticos ($\mu\text{moles/g Hb}$) en muestras de eritrocitos expuestos a radiación UVC.

	Tratamiento	0 min	40 min	60 min
GSH	T. negativo	$0.34 \pm 0.070^{a,A}$	$0.41 \pm 0.062^{a,A}$	$0.37 \pm 0.007^{a,A}$
	T. positivo	$0.40 \pm 0.017^{a,A}$	$0.41 \pm 0.123^{a,A}$	$0.45 \pm 0.095^{a,A}$
	CI-LFJ20	$0.42 \pm 0.033^{a,A}$	$0.36 \pm 0.040^{a,A}$	$0.45 \pm 0.176^{a,A}$
	CI-LP 22	$0.41 \pm 0.065^{a,A}$	$0.41 \pm 0.105^{a,A}$	$0.45 \pm 0.146^{a,A}$
	CI-LP 39	$0.35 \pm 0.007^{a,A}$	$0.41 \pm 0.065^{a,A}$	$0.42 \pm 0.124^{a,A}$
	CI-CRL 431	$0.37 \pm 0.005^{a,A}$	$0.44 \pm 0.111^{a,A}$	$0.34 \pm 0.048^{a,A}$

Los valores representan la media \pm desviación estándar ($n = 3$). Literales minúsculas distintas indican diferencias entre grupos a un mismo tiempo; mientras que literales mayúsculas distintas indican diferencia ($P < 0.05$) entre tiempos para un mismo grupo.

5.5. Cuantificación de Indicadores e Índice de Estrés Oxidativo

Las evaluaciones anteriores mostraron la capacidad de protección de los CI de las bacterias de estudio hacia las biomoléculas eritrocitarias contra inductores químicos y físicos de estrés oxidativo. Sin embargo, se deben tener en cuenta los niveles de sustancias producidas durante el daño oxidativo en las células, en este caso se determinaron los valores de H_2O_2 y de MDA.

Los resultados correspondientes al H_2O_2 no mostraron diferencias entre cepas ni entre tiempos de irradiación ($P > 0.05$), pero sí una menor tendencia en la producción de H_2O_2 principalmente en los grupos experimentales tratados con el CI de *J20* y *L. plantarum 39*. El estudio reportado por Gonzalez-Cuevas y colaboradores (2020), reportaron tendencias similares, lo cual atribuyen que la producción de H_2O_2 reacciona con componentes intracelulares de los eritrocitos como lípidos, proteínas, antioxidantes endógenos).

Con respecto a los niveles de MDA, en el tiempo cero no presento diferencias entre tratamientos ($P > 0.05$). Sin embargo, se observó un incremento significativo de $440.12 \mu\text{moles/g Hb}$ en los niveles de MDA en el testigo positivo de 40 a 60 min, indicativo de un proceso de oxidación de los lípidos de membrana celular, al exponer a los eritrocitos a radiación UV-C. Los grupos experimentales con los CI presentaron menor concentración ($p < 0.05$) con respecto al testigo positivo en el tiempo 40 y 60 de exposición, mismo comportamiento observado para el testigo antioxidante. En este sentido, los grupos experimentales con el CI de *L. plantarum 39* y *22* mostraron los valores más bajos de MDA, siendo aproximadamente $200 \mu\text{moles/g Hb}$ menor con

respecto al testigo positivo a los 40 min de exposición, y de 511.3 $\mu\text{moles/g Hb}$ y 304.81 $\mu\text{moles/g Hb}$ a los 60 min de exposición.

Los resultados anteriores sugieren que una dosis de 30.5 mJ/cm^2 de radiación UV-C promueve y aumenta de forma significativa ($P < 0.05$) la formación de MDA, mientras los CI de todas las cepas mostraron un efecto de protección hacia la radiación de UV-C.

Cuadro 3. Indicadores de estrés oxidativo celular y especies reactivas de oxígeno en muestras de eritrocitos irradiados. Los valores se expresan en ($\mu\text{moles/g Hb}$).

	Tratamiento	0 min	40 min	60 min
H ₂ O ₂	T. negativo	0.38 \pm 0.070 ^{a,A}	0.38 \pm 0.026 ^{a,A}	0.38 \pm 0.007 ^{a,A}
	T. positivo	0.40 \pm 0.017 ^{a,A}	0.41 \pm 0.123 ^{a,A}	0.45 \pm 0.095 ^{a,A}
	CI-LFJ20	0.41 \pm 0.040 ^{a,A}	0.34 \pm 0.060 ^{a,A}	0.35 \pm 0.025 ^{a,A}
	CI-LP22	0.41 \pm 0.405 ^{a,A}	0.41 \pm 0.146 ^{a,A}	0.45 \pm 0.007 ^{a,A}
	CI-LP39	0.35 \pm 0.007 ^{a,A}	0.34 \pm 0.029 ^{a,A}	0.42 \pm 0.124 ^{a,A}
	CI-LC431	0.37 \pm 0.005 ^{a,A}	0.44 \pm 0.111 ^{a,A}	0.33 \pm 0.040 ^{a,A}
MDA	T. negativo	377.90 \pm 52.47 ^{b,A}	369.54 \pm 78.07 ^{a,A}	724.73 \pm 58.84 ^{b,B}
	T. positivo	345.84 \pm 18.71 ^{b,A}	571.68 \pm 82.50 ^{b,B}	1011.8 \pm 68.06 ^{d,C}
	CI-LFJ20	269.53 \pm 15.25 ^{a,A}	488.35 \pm 44.51 ^{b,B}	759.35 \pm 86.50 ^{b,C}
	CI-LP22	280.26 \pm 15.86 ^{a,A}	368.94 \pm 46.76 ^{b,B}	706.54 \pm 87.50 ^{b,C}
	CI-LP39	235.25 \pm 37.14 ^{a,A}	336.23 \pm 17.09 ^{a,B}	500.05 \pm 61.23 ^{a,C}
	CI-LC431	236.65 \pm 17.31 ^{a,A}	320.02 \pm 44.31 ^{c,A}	887.04 \pm 39.71 ^{c,B}

Los valores representan la media \pm desviación estándar ($n = 3$). Literales minúsculas distintas indican diferencias entre grupos a un mismo tiempo; mientras que literales mayúsculas distintas indican diferencia ($P < 0.05$) entre tiempos para un mismo grupo.

Los valores de todos los parámetros previamente evaluados sugieren una disminución de los indicadores de estrés oxidativo en los grupos experimentales tratados con los diferentes CI al compararlos con el testigo positivo. En la figura 8 se presentan los valores del índice de estrés oxidativo (OSi) para cada tratamiento, producto de conjuntar los datos de los niveles de MDA, y las actividades enzimáticas de CAT y SOD, como se indica en la sección 5.13.2.

Los datos demuestran que el testigo positivo presentó 1.5 veces más alto el OSi con respecto al testigo negativo en ambos tiempos de exposición ($P < 0.05$). El OSi de los grupos experimentales de los CI de *L. plantarum* 22 y 39 evaluados y, el CI de *L. casei* CRL 431 fue 1.60, 1.33 y 1.75 veces menos al testigo positivo, respectivamente. El grupo experimental tratado con el CI de *L. plantarum* 39 presentó el OSi significativamente menor ($P < 0.05$) con hasta 2.72 veces menos al

control positivo. Estos resultados sugieren que los compuestos presentes en los CI de las cepas de trabajo tienen la capacidad de disminuir el OSi y que el efecto protector puede estar relacionado a más de una vía celular, es decir, que el contenido intracelular de las bacterias protege a lo eritrocitos de inductores de estrés oxidativo químicos y físicos a nivel enzimático, estructural y posiblemente metabólico.

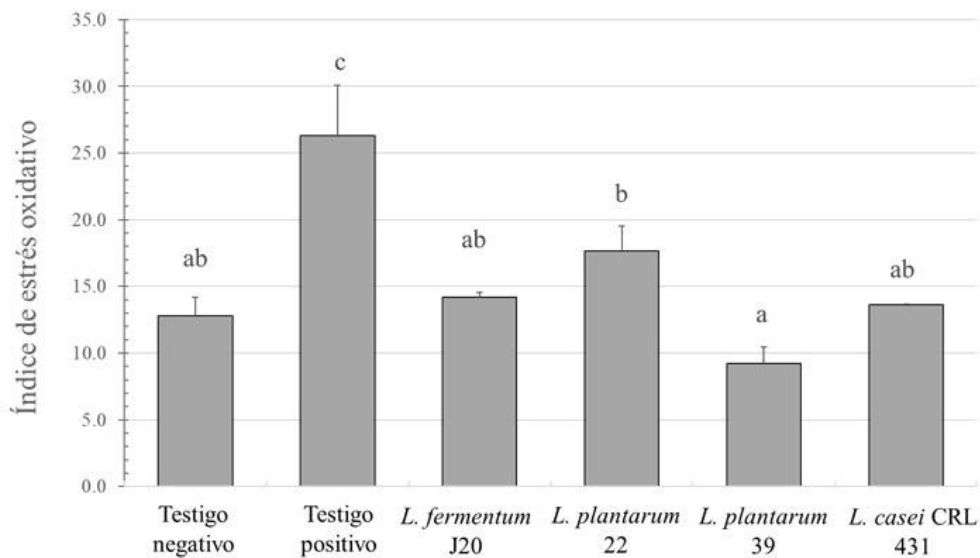


Figura 8. Determinación de índice de estrés oxidativo en muestras de eritrocitos después de 60 minutos de radiación UV-C. Los datos graficados representan la media \pm desviación estándar (n =3). Literales distintas entre barras indican diferencias entre tratamientos (P < 0.05).

Finalmente, los resultados obtenidos con actividad antioxidante enzimática, e índice de estrés oxidativo, sugieren que el contenido intracelular de *L. fermentum* J20, *L. plantarum* 22 y 39 ejercen un efecto de protección hacia los eritrocitos expuestos a radiación UV-C, el cual, considerando los resultados obtenidos puede estar mediado por enzimas antioxidantes, además de presentar menor peroxidación lipídica y oxidación de hemoglobina. Estos resultados pueden corroborarse con las micrografías adquiridas en las que se puede observar menor daño morfogeométricos en la membrana de los eritrocitos, y menor porcentaje de daño celular. Por lo tanto, las cepas evaluadas podrían ser una fuente de moléculas con actividad antioxidante, y potencialmente eritroprotectoras contra el estrés oxidativo inducido por fotooxidación.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el contenido intracelular de bacterias potencialmente probióticas contienen compuestos con actividad antioxidante *in vitro*, además de ensayos biológicos al presentar mayor porcentaje de inhibición en la formación de hemoglobina e inhibición y en la formación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en eritrocitos. Los resultados mostraron que la actividad del CI es dependiente de la cepa de estudio. En general el mayor efecto protector lo presentó el CI de *L. fermentum* J20, seguido por *L. plantarum* 39 y 22.

En el ensayo con eritrocitos expuestos a radiación UV-C, se logró observar un efecto de protección de los CI de las tres cepas evaluadas al disminuir el porcentaje de hemólisis, daño celular a nivel estructural, y un aumento significativo en la actividad antioxidante enzimática y menor índice de estrés oxidativo. De forma general, los CI que mostraron mayor efecto de protección son *L. fermentum* J20, *L. plantarum* 39 y la referencia antioxidante *L. casei* CRL 431.

Finalmente, los resultados en general de las tres cepas de estudio muestran el potencial del CI con moléculas antioxidantes, de cepas potencialmente probióticas para proteger a la piel contra la radiación.

8. RECOMENDACIONES

Los resultados de esta investigación apoyan la idea de que las bacterias probióticas, potencialmente probióticas y postbióticos tienen propiedades antioxidantes, con efectos positivos al hospedador. Sin embargo, aunque este estudio ha demostrado con éxito que el contenido intracelular bacteriano dependiente de cepa ejerce funciones contra estresores oxidativos, se necesitan más ensayos *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*, así como ensayos clínicos controlados en los que sea posible caracterizar, purificar y evaluar los compuestos responsables del efecto protector antioxidante, así como los mecanismos moleculares subyacentes. De la misma manera se sugiere el aprovechamiento de las nuevas tecnologías analíticas a través de ensayos *in silico* para determinar la farmacocinética, la farmacodinamia y garantizar la bioseguridad y especificidad de estas sustancias.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abed, M., Artunc, F., Alzoubi, K., Honisch, S., Baumann, D., Föller, M., & Lang, F. 2014. Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease. *Journal of Molecular Medicine*. 92(8): 871–879.
- Addor, F. A. S. 2017. Antioxidants in dermatology. *Anais Brasileiros de Dermatologia Sociedade Brasileira de Dermatologia*. 92(3): 356–362.
- Agarwal, N. 2020. UVR and role of pigmentation in skin aging and cancer. In *Skin Aging & Cancer*. 18(53): 59–69.
- Aghebati-Maleki, L., Hasannezhad, P., Abbasi, A., & Khani, N. 2021. Antibacterial, Antiviral, Antioxidant, and Anticancer Activities of Postbiotics: A review of Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Biointerface research*. 12(2): 2629 – 2645.
- Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., & Hernández-Mendoza, A. 2018. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*. 75: 105-114.
- Aguilar-Toalá, J. E., Estrada-Montoya, M. C., Liceaga, A. M., Garcia, H. S., González-Aguilar, G. A., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F., & Hernández-Mendoza, A. 2019. An insight on antioxidant properties of the intracellular content of *Lactobacillus casei* CRL-431. *LWT*. 102: 58–63.
- Aguilar-Toalá, J. E., Santiago-López, L., Peres, C. M., Peres, C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F., & Hernández-Mendoza, A. 2017. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*. 100(1): 65–75.
- Ansari, F. A., Ali, S. N., Mahmood, R. 2015. Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes. *Toxicology in vitro*. 29(7): 1878–1886.
- Asociación Médica Mundial (2017). Declaración de Helsinki de la AMM – Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Ferney-Voltaire, Francia: Asociación Médica Mundial. Recuperado de: <https://www.wma.net/es/politicas-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>
- Baccarin, T., Mitjans, M., Lemos-Senna, E., & Vinardell, M. P. 2015. Protection against oxidative damage in human erythrocytes and preliminary photosafety assessment of *Punica granatum* seed oil nanoemulsions entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction. *Toxicology in Vitro*. 30(1): 421–428.
- Baek, J., & Lee, M.-G. 2016. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. *Redox Report*. 21(4): 164–169.
- Bernard, J. J., Gallo, R. L., & Krutmann, J. 2019. Photoimmunology: how ultraviolet radiation affects the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 19(11): 688–701.
- Berthon, J. Y., Nachat-Kappes, R., Bey, M., Cadoret, J. P., Renimel, I., & Filaire, E. 2017. Marine algae as attractive source to skin care. *Free Radical Research*. 51(6): 555–567.

- Budden, T., Davey, R. J., Vilain, R. E., Ashton, K. A., Braye, S. G., Beveridge, N. J., & Bowden, N. A. 2016. Repair of UVB-induced DNA damage is reduced in melanoma due to low XPC and global genome repair. *Oncotarget*. 7(38): 60940–60953.
- Calderón-Salinas, J. V., Muñoz-Reyes, E. G., Guerrero-Romero, J. F., Rodríguez-Morán, M., Bracho-Riquelme, R. L., Carrera-Gracia, M. A., & Quintanar-Escorza, M. A. 2011. Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 357(1–2): 171–179.
- Carini, M., Aldini, G., Bombardelli, E., Morazzoni, P., & Maffei Facino, R. 2000. UVB-induced hemolysis of rat erythrocytes: Protective effect of procyanidins from grape seeds. *Life Sciences*. 67(15): 1799–1814.
- Chisté, R. C., Freitas, M., Mercadante, A. Z., & Fernandes, E. 2014. Carotenoids inhibit lipid peroxidation and hemoglobin oxidation, but not the depletion of glutathione induced by ROS in human erythrocytes. *Life Sciences*. 99(1–2): 52–60.
- Coutinho, R. C. S., Dos Santos, A. F., Da Costa, J. G., & Vanderlei, A. D. 2019. Sun exposure, skin lesions and vitamin D production: Evaluation in a population of fishermen. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 94(3): 279–286.
- Cuevas-González, P. F., Aguilar-Toalá, J. E., García, H. S., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., & 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(2020): 1459–1470.
- D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. 2013. UV radiation and the skin. In *International Journal of Molecular Sciences*. 14(6): 12222–12248.
- Dai, J., Cai, H., Li, H., Zhuang, Y., Min, H., Wen, Y., Yang, J., Gao, Q., Shi, Y., & Yi, L. 2015. Association between telomere length and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology*. 20(6): 947–952.
- Diederich, L., Suvorava, T., Sansone, R., Keller, T. C. S., Barbarino, F., Sutton, T. R., Kramer, C. M., Lückstädt, W., Isakson, B. E., Gohlke, H., Feelisch, M., Kelm, M., & Cortese-Krott, M. M. 2018. On the effects of reactive oxygen species and nitric oxide on red blood cell deformability. *Frontiers in Physiology*. 9(5): 332.
- Drigeard Desgarnier, M. C., & Rochette, P. J. 2018. Enhancement of UVB-induced DNA damage repair after a chronic low-dose UVB pre-stimulation. *DNA Repair*. 63: 56–62.
- Dunaway, S., Odin, R., Zhou, L., Ji, L., Zhang, Y., & Kadekaro, A. L. 2018. Natural antioxidants: Multiple mechanisms to protect skin from solar radiation. In *Frontiers in Pharmacology*. 9 (4): 392.
- Farag, M. R., & Alagawany, M. 2018. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. In *Chemico-Biological Interactions*. 279: 73–83.
- Firuzi, O., Miri, R., Tavakkoli, M., & Saso, L. 2012. Antioxidant Therapy: Current Status and Future Prospects. *Current Medicinal Chemistry*. 18(25): 3871–3888.
- Forbes, P. D., Cole, C. A., & deGruijl, F. 2021. Origins and evolution of photocarcinogenesis action spectra, including germicidal UVC. *Photochemistry and Photobiology*. 97(3): 477-484.

- Gabros, S., Nessel, T. A., & Zito, P. M. 2020. Sunscreens and Photoprotection. StatPearls Publishing. 16(24): 381–393.
- Garmyn, M., Young, A. R., & Miller, S. A. 2018. Mechanisms of and variables affecting UVR photoadaptation in human skin. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 17(12): 1932–1940.
- Gilbert, H. S., Stump, D. D., & Roth, E. F. 1984. A method to correct for errors caused by generation of interfering compounds during erythrocyte lipid peroxidation. *Analytical Biochemistry*. 137(2): 282–286.
- Ghorbel, I., Maktouf, S., Kallel, C., Ellouze, S., Boudawara, T., Zeghal, N. 2015. Disruption of erythrocyte antioxidant defense system, hematological parameters, induction of proinflammatory cytokines and DNA damage in liver of co-exposed rats to aluminium and acrylamide. *Chemico-Biological Interactions*. 236: 31–40.
- 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: 658-672.
- Grant, W. B. (2013). Benefits of ultraviolet-B irradiance and vitamin D in youth. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 136(1): 221–223.
- Guerrero-Encinas, I., González-González, J. N., Santiago-López, L., Muhlia-Almazán, A., Garcia, H. S., Mazorra-Manzano, M. A., ... & Hernández-Mendoza, A. 2021. Protective Effect of *Lactocaseibacillus casei* CRL 431 Postbiotics on Mitochondrial Function and Oxidative Status in Rats with Aflatoxin B 1–Induced Oxidative Stress. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 13 (2021): 1033–1043.
- Gupta, A., Avci, P., Dai, T., Huang, Y.-Y., & Hamblin, M. R. 2013. Ultraviolet Radiation in Wound Care: Sterilization and Stimulation. *Advances in Wound Care*. 2(8): 422–437.
- Hart, P. H., & Norval, M. 2018. Ultraviolet radiation-induced immunosuppression and its relevance for skin carcinogenesis. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 17(12): 1872–1884.
- Hart, P. H., Norval, M., Byrne, S. N., & Rhodes, L. E. 2019. Exposure to Ultraviolet Radiation in the Modulation of Human Diseases. In *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 14: 55–81.
- Herald, T. J., Gadgil, P., & Tilley, M. 2012. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(11): 2326–2331.
- Herlax, V., Vazquez, R., Mate, S., & Bakás, L. 2011. Bioquímica Clínica. In *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 45(2): 855–889
- Herndon, J. M., Hoisington, R. D., & Whiteside, M. 2018. Deadly ultraviolet UV-C and UV-B penetration to Earth's surface: Human and environmental health implications. *J Geog Environ Earth Sci Intn*. 14(2): 1-11.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. 2014. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on

the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 11(8): 506–514.

- Ho, H. Y., Cheng, M. L., & Chiu, D. T. Y. 2014. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-beyond the realm of red cell biology. *Free Radical Research*. 48(9): 1028–1048.
- Holick, M. F. 2020. Sunlight, uv radiation, vitamin d, and skin cancer: How much sunlight do we need? *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1268: 19–36.
- Holliman, G., Lowe, D., Cohen, H., Felton, S., & Raj, K. 2017. Ultraviolet Radiation-Induced Production of Nitric Oxide:A multi-cell and multi-donor analysis. *Scientific Reports*. 7(1): 1–11.
- Humam, AM, Loh, TC, Foo, HL, Izuddin, WI, Awad, EA, Idrus, Z., ... y Mustapha, NM. 2020. La suplementación dietética de postbióticos mitiga los impactos adversos del estrés por calor en la actividad de la enzima antioxidante, antioxidante total, peroxidación de lípidos, indicadores de estrés fisiológico, perfil de lípidos y calidad de la carne en pollos de engorde. *Animales*. 10 (6): 982.
- Hwang, J.-W., Kim, E.-K., Lee, S.-J., Kim, Y.-S., Choi, D.-K., Park, T.-K., Moon, S.-H., Jeon, B.-T., & Park, P.-J. 2012. Anthocyanin effectively scavenges free radicals and protects retinal cells from H₂O₂-triggered G2/M arrest. *European Food Research and Technology*. 234(3): 431–439.
- Ismail, N. A., Okasha, S. H., Dhawan, A., Rahman, A. M. O. A., Hamid, N. A., & Shaker, O. 2012. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in children with chronic hepatitis. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 03(07): 972–977.
- Izadi, M., Jonaidi-Jafari, N., Pourazizi, M., Alemzadeh-Ansari, M., & Hoseinpoufard, M. 2018. Photokeratitis induced by ultraviolet radiation in travelers: A major health problem. *Journal of Postgraduate Medicine*. 64(1): 40.
- Izuddin, W. I., Humam, A. M., Loh, T. C., Foo, H. L., & Samsudin, A. A. 2020. Dietary postbiotic *Lactobacillus plantarum* improves serum and ruminal antioxidant activity and upregulates hepatic antioxidant enzymes and ruminal barrier function in post-weaning lambs. *Antioxidants*. 9(3): 250.
- Jablonski, N. G., & Chaplin, G. 2010. Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(2): 8962–8968.
- Kasote, D. M., Katyare, S. S., Hegde, M. V., & Bae, H. 2015. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. In *International Journal of Biological Sciences*. 814: 982–991.
- Khmaladze, I., Butler, É., Fabre, S., & Gillbro, J. M. 2019. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938—A comparative study on the effect of probiotics and lysates on human skin. *Experimental Dermatology*. 28(7): 822–828.
- Kober, M. M., & Bowe, W. P. 2015. The effect of probiotics on immune regulation, acne, and photoaging. In *International Journal of Women’s Dermatology*. 1(2): 85–89.
- Kozlova, E. K., Sergunova, V. A., Krasavin, E. A., Boreyko, A. V., Zavalova, A. V., Kozlov, A. P., & Chernysh, A. M. 2016. Local defects in the nanostructure of the membrane of

- erythrocytes upon ionizing radiation of blood. *Physics of Particles and Nuclei Letters*. 13(1): 140–148.
- Krismayogi, G. A., Ratnayanti, I. D., Linawati, N. M., Wiryawan, I. S., Sugiritama, I. W., Wahyuniari, I. A. I., & Arijana, I. N. 2018. Purple cabbage extract cream effect on erythema score of male wistar rat's back skin exposed to UV-B Radiation. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 11(1): 343–351.
- Lang, E., & Lang, F. 2015. Triggers, inhibitors, mechanisms, and significance of eryptosis: The suicidal erythrocyte death. In *BioMed Research International*. 15 (2015): 155-189
- Lang, E., Qadri, S. M., & Lang, F. 2012. Killing me softly - Suicidal erythrocyte death. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 44(8): 1236–1243.
- Lang, F., Abed, M., Lang, E., & Föllner, M. 2014. Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. *Antioxidants and Redox Signaling*. 21(1): 138–153.
- Lephart, E. D. (2016). Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. In *Ageing Research Reviews*. 31(12): 36–54.
- Li, N., Li, S. X., Guo, Z. Y., Zhuang, Z. F., Li, R., Xiong, K., Chen, S. J., & Liu, S. H. 2012. Micro-Raman spectroscopy study of the effect of Mid-Ultraviolet radiation on erythrocyte membrane. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 112(15): 37–42.
- Lopes, D. M., & McMahon, S. B. 2016. Ultraviolet Radiation on the Skin: A Painful Experience? *CNS Neuroscience and Therapeutics*. 22(2): 118–126.
- Mancebo, S. E., Hu, J. Y., & Wang, S. Q. 2014. Sunscreens: A review of health benefits, regulations, and controversies. In *Dermatologic Clinics*. 32(3): 427–438.
- Martinez, R. M., Fattori, V., Saito, P., Melo, C. B. P., Borghi, S. M., Pinto, I. C., Bussmann, A. J. C., Baracat, M. M., Georgetti, S. R., Verri, W. A., & Casagrande, R. 2018. Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. *Journal of Dermatological Science*. 91(2): 164–174.
- Mbye, M., Baig, M. A., AbuQamar, S. F., El-Tarabily, K. A., Obaid, R. S., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Turner, M. S., Shah, N. P., & Ayyash, M. M. 2020. Updates on understanding of probiotic lactic acid bacteria responses to environmental stresses and highlights on proteomic analyses. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 19(3): 1110–1124
- Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H., & Prajapati, J. 2015. Probiotics as Potential Antioxidants: A Systematic Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63(14): 3615–3626.
- Misra, R. B., Ray, R. S., & Hans, R. K. 2005. Effect of UVB radiation on human erythrocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*. 19(3): 433–438.
- Morita, A. 2016. Photodermatology: Therapeutic photomedicine for skin diseases. In *Immunology of the Skin: Basic and Clinical Sciences in Skin Immune Responses*. 12(22): 85–89477–488.
- Murata, K., Oyama, M., Ogata, M., Fujita, N., & Takahashi, R. 2021. Oral administration of Jumihaidokuto inhibits UVB-induced skin damage and prostaglandin E2 production in HR-1 hairless mice. *Journal of Natural Medicines*. 75(1): 142–155.

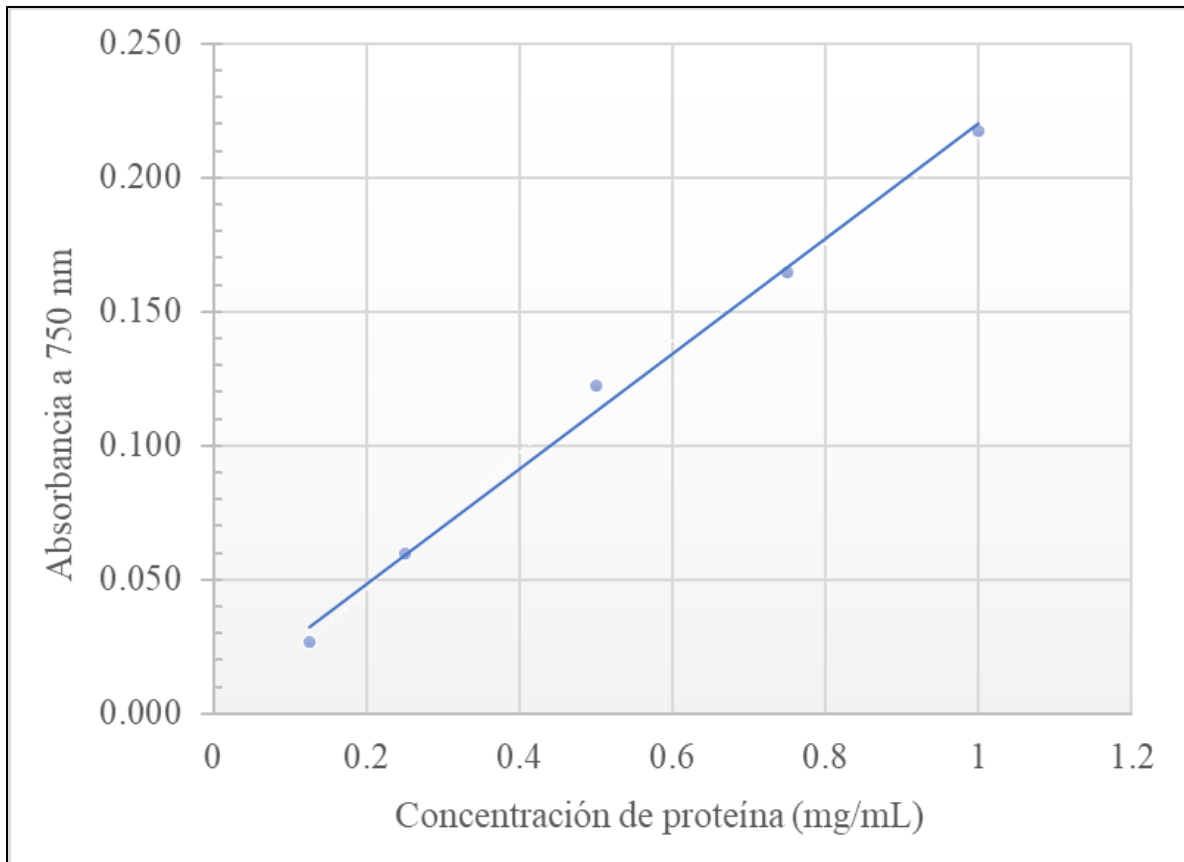
- Nabil, G. M., Salama, A. A., El-Baset, A., Sayed, M., Elsaied, A. A., & Elwan, A. M. 2013. Spectral Analysis for Rat's Hemoglobin Molecule. *Middle-East Journal of Scientific Research*. 17(1): 72–76.
- Nahas, A. F., Abdel-Malek, Z. A., Kohli, I., Braunberger, T. L., Lim, H. W., & Hamzavi, I. H. 2019. The potential role of antioxidants in mitigating skin hyperpigmentation resulting from ultraviolet and visible light-induced oxidative stress. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. 35(6): 420–428.
- Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos. México: Secretaría de Salud; 2012.
- Nowak, A., Paliwoda, A., & Błasiak, J. 2019. Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-oxidative activity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains: A review of mechanisms and therapeutic perspectives. *Critical reviews in food science and nutrition*. 59(21): 3456-3467.
- Olteanu, D., Baldea, I., Clichici, S., Bolfa, P., Cenariu, M., Schrepler-Perde, M., Alupeii, M., Muresan, A., & Filip, A. 2014. In vitro studies on the mechanisms involved in chemoprevention using *Calluna vulgaris* on vascular endothelial cells exposed to UVB. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 136(14): 54–61.
- OMS (2011). Carpeta de material sobre seguridad de las inyecciones y los procedimientos conexos. Disponible en:http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/75247/9789243599250_spa.pdf;jsessionid=F0976C25B7FB92FD9C0BE0A5E555EA2F?sequence=1.
- Osman, A., El-Gazzar, N., Almanaa, T. N., El-Hadary, A., & Sitohy, M. 2021. Lipolytic Postbiotic from *Lactobacillus paracasei* Manages Metabolic Syndrome in Albino Wistar Rats. *Molecules*. 26(2): 472.
- Ouchene, L., Muntyanu, A., & Netchiporouk, E. 2020. Ultraviolet Radiation Seeking Behavior, Mediated by Endogenous β -Endorphin, Has Addictive Features. In *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*. 24(4): 414–415.
- Pan, L., Wang, X., Yang, S., Wu, X., Lee, I., Zhang, X., Rupp, R. A., & Xu, J. (2012). Ultraviolet Irradiation-Dependent Fluorescence Enhancement of Hemoglobin Catalyzed by Reactive Oxygen Species. *PLoS ONE*. 7(8): 142-152.
- Pandel, R., Poljšak, B., Godic, A., & Dahmane, R. 2013. Skin Photoaging and the Role of Antioxidants in Its Prevention. *ISRN Dermatology*. 2013(4): 1–11.
- Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. In *Journal of Food Science and Technology*. 20(12): 7577–7587.
- Panich, U., Sittithumcharee, G., Rathviboon, N., & Jirawatnotai, S. 2016. Ultraviolet radiation-induced skin aging: The role of DNA damage and oxidative stress in epidermal stem cell damage mediated skin aging. *Stem Cells International*. 42(52): 712–732
- Podsiedlik, M., Markowicz-Piasecka, M., & Sikora, J. 2020. Erythrocytes as model cells for biocompatibility assessment, cytotoxicity screening of xenobiotics and drug delivery. In *Chemico-Biological Interactions*. 132(332): 289-305.
- Polefka, T. G., Meyer, T. A., Agin, P. P., & Bianchini, R. J. 2012. Effects of Solar Radiation on

- the Skin. In *Journal of Cosmetic Dermatology*. 11(2): 134–143.
- Poljsak, B., Šuput, D., & Milisav, I. 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013(24): 365-379.
- Powers, J. M., & Murphy, J. E. J. 2019. Sunlight radiation as a villain and hero: 60 years of illuminating research. In *International Journal of Radiation Biology*. 95(7) 1043–1049.
- Qin, B., Yang, K., & Cao, R. 2020. Synthesis, Radical-Scavenging Activities, and Protective Effects against AAPH-Induced Oxidative Damage in DNA and Erythrocytes of Piperine Derivatives. *Journal of Chemistry*. 2020 (14): 635-649.
- Reid, G. 2016. Probiotics: Definition, scope, and mechanisms of action. *Best Practice and Research. Clinical Gastroenterology*. 30(1): 17–25.
- Repsold, L., & Joubert, A. M. 2018. Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death. In *BioMed Research International*. 2018(21): 541-556.
- Richard, M. J., Guiraud, P., Meo, J., & Favier, A. 1992. High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 577(1): 9–18.
- Ripert, G., Racedo, S. M., Elie, A. M., Jacquot, C., Bressollier, P., & Urdaci, M. C. 2016. Secreted compounds of the probiotic *Bacillus clausii* strain O/C inhibit the cytotoxic effects induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* toxins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 60(6): 3445-3454.
- Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., & Margolles, A. 2017. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition and Food Research*. 61(1): 1–15.
- Sanford, K., Fisher, B., Fowler, E., Fowler, A., & Natarajan, R. 2017. Attenuation of Red Blood Cell Storage Lesions with Vitamin C. *Antioxidants*. 6(3): 55-72.
- Sarkar, R., Kumar, A., Divya, L., K. Samanta, S., Adhikari, D., Karmakar, S., & Sen, T. 2017. Antioxidant Properties of *Kalanchoe blossfeldiana* – A Focus on Erythrocyte Membrane Stability and Cytoprotection. *Current Traditional Medicine*. 3(1): 125-139.
- Sekowski, S., Terebka, M., Veiko, A., Lapshina, E., Sulkowska, U., Zavodnik, I. B., Abdulladjanova, N., Mavlyanov, S., Roszkowska, A., & Zamaraeva, M. 2018. Epigallocatechin gallate (EGCG) activity against UV light-induced photo damages in erythrocytes and serum albumin—theoretical and experimental studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 356(15): 379–388.
- Selvaag, E. 1996. Inhibition of thiazide photohemolysis in vitro by antioxidants and a nitrogen atmosphere. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*. 12(5): 211–215.
- Shaj, K., Hutcherson, R. J., & Kemp, M. G. 2020. ATR Kinase Activity Limits Mutagenesis and Promotes the Clonogenic Survival of Quiescent Human Keratinocytes Exposed to UVB Radiation. *Photochemistry and Photobiology*. 96(1): 105–112.
- Singer, S., & Berneburg, M. 2018. Phototherapy. *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*. 16(9): 1120–1131.

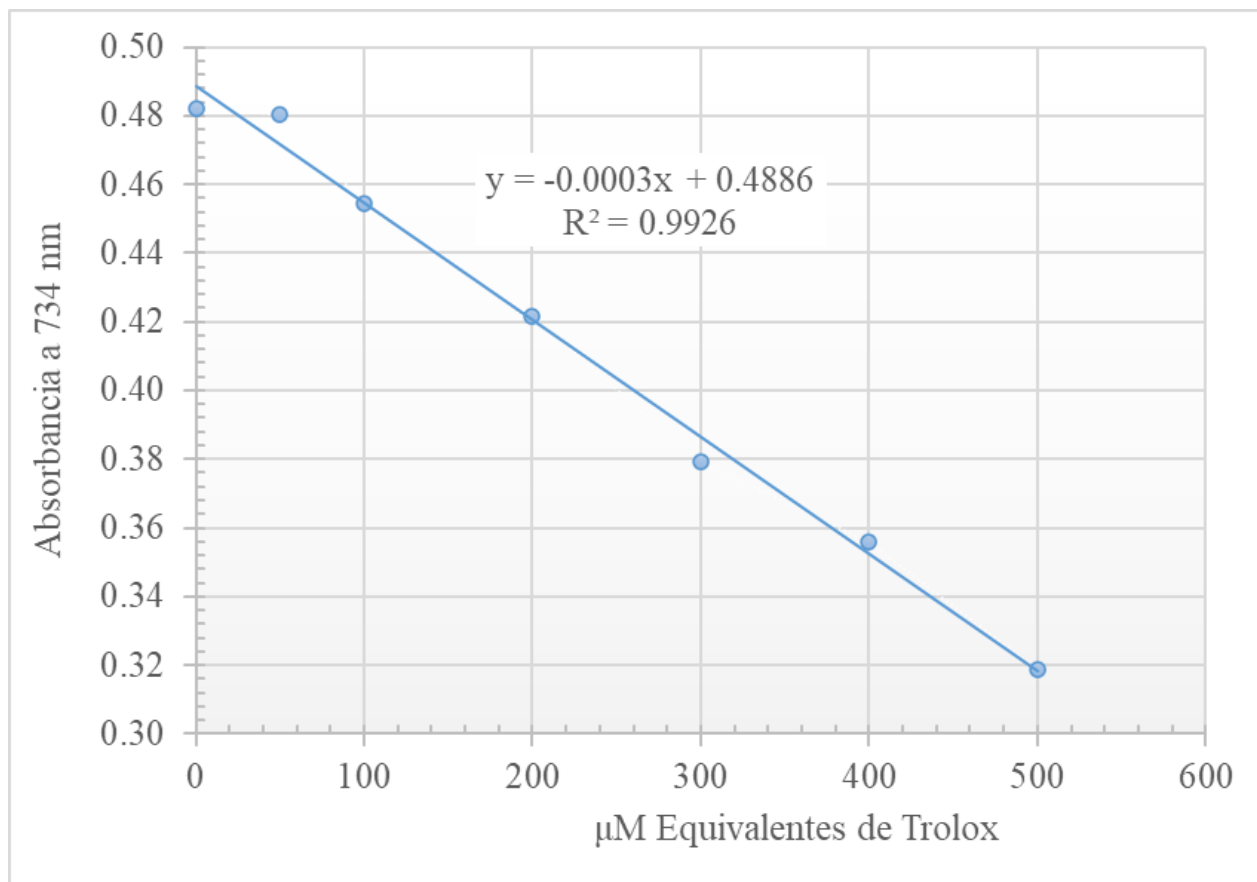
- Singh, J., Chopra, D., Dwivedi, A., & Ray, R. S. (2018). Photoaging. In *Photocarcinogenesis and Photoprotection*. 23(14): 65–75.
- Stiefel, C., & Schwack, W. 2015. Photoprotection in changing times - UV filter efficacy and safety, sensitization processes and regulatory aspects. *International Journal of Cosmetic Science*. 37(1): 2–30.
- Subedi, L., Lee, T. H., Wahedi, H. M., Baek, S. H., & Kim, S. Y. 2017. Resveratrol-Enriched Rice Attenuates UVB-ROS-Induced Skin Aging via Downregulation of Inflammatory Cascades. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017(13): 185-204.
- Tang, W., Xing, Z., Li, C., Wang, J., & Wang, Y. 2017. Molecular mechanisms and in vitro antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* MA2. *Food Chemistry*. 221: 1642–1649.
- van der Rhee, H. J., de Vries, E., & Coebergh, J. W. 2016. Regular sun exposure benefits health. *Medical Hypotheses*. 97(45): 34–37.
- Vandghanooni, S., Forouharmehr, A., Eskandani, M., Barzegari, A., Kafil, V., Kashanian, S., & Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. 2013. Cytotoxicity and DNA Fragmentation Properties of Butylated Hydroxyanisole. *DNA and Cell Biology*. 32(3): 98–103.
- Wacker, M., & Holick, M. F. 2013. Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. In *Dermato-Endocrinology*. 5(1): 51–108.
- Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., Wang, Y., & Li, W. 2017. Antioxidant properties of probiotic bacteria. In *Nutrients*. 9(5): 510-521.
- Widel, M., Krzywon, A., Gajda, K., Skonieczna, M., & Rzeszowska-Wolny, J. 2014. Induction of bystander effects by UVA, UVB, and UVC radiation in human fibroblasts and the implication of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 68(5): 278–287.
- Yang, S., Jensen, M. K., Rimm, E. B., Willett, W., & Wu, T. 2014. Erythrocyte Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Catalase Activities and Risk of Coronary Heart Disease in Generally Healthy Women: A Prospective Study. *American Journal of Epidemiology*. 180(9): 901–908.
- Yang, Y., Wu, R., Sargsyan, D., Yin, R., Kuo, H. C., Yang, I., Wang, L., Cheng, D., Wang, C., Li, S., Hudlikar, R., Lu, Y., & Kong, A. N. 2019. UVB drives different stages of epigenome alterations during progression of skin cancer. *Cancer Letters*. 449(12): 20–30.
- Young, A. R., Claveau, J., & Rossi, A. B. 2017. Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 76(3): 100–109.
- Zheng, L., Dong, H., Su, G., Zhao, Q., & Zhao, M. 2016. Radical scavenging activities of Tyr-, Trp-, Cys- and Met-Gly and their protective effects against AAPH-induced oxidative damage in human erythrocytes. *Food Chemistry*. 197: 807–813.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*. 114(1): 310–316.

10. ANEXOS

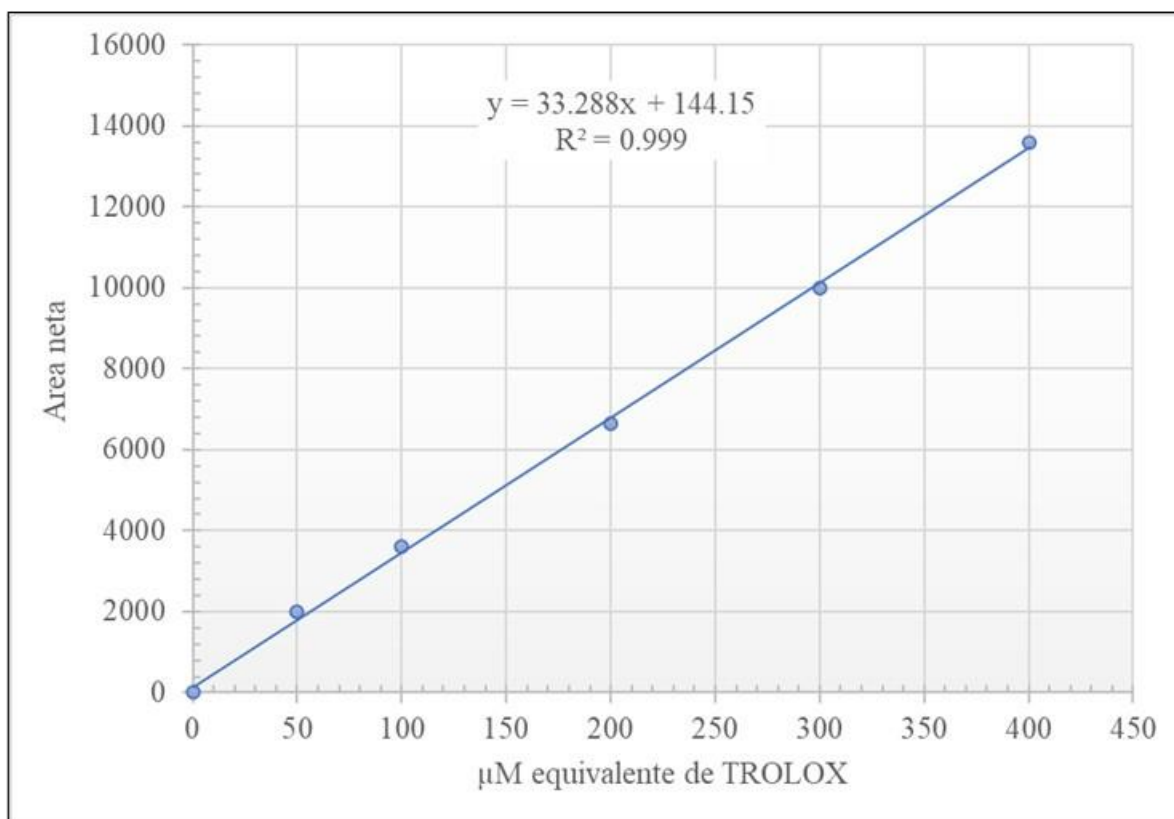
10.1. Curva estándar de Determinación de Proteína Empleando el Método de Lowry




10.2. Curva estándar de Trolox para determinación de actividad antioxidante empleando el método del radical ABTS



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



10.4. Carta de Aprobación de Protocolo Experimental por Parte del Comité ética

	CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.	CIAD
<small>SEP-CONACYT-UNAM-IPN-GOBIERNO DE SONORA-GOBIERNO DE SINALOA-GOBIERNO DE CHIHUAHUA</small>		COMITÉ DE ÉTICA
<small>COMITE DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN</small>		CE/022/2019
		Hermosillo, Sonora. Diciembre 16, 2019
Dr. Aarón F. González Córdova Investigador Titular Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal CIAD Presente		
Estimado Dr. González:		
Me permito comunicarle que el Comité de Ética de nuestro centro ha revisado cuidadosamente la propuesta de investigación "Dilucidando los componentes y/o metabolitos secundarios de la fermentación involucrados en el efecto antiinflamatorio de las leches fermentadas con bacterias ácido lácticas específicas", del cual usted es el responsable técnico.		
El Comité de Ética realizó las siguientes recomendaciones:		
<ol style="list-style-type: none">1. Es necesario mencionar que se usará protección durante el bioensayo que son considerados como primera barrera de precaución (bata, guantes, cubre boca y cofia). Es necesario considerar la Norma Oficial Mexicana, para asegurar la conducción apropiada del estudio, aunque los <i>Lactobacillus</i> spp. no sean patógenos para el hombre.2. Se recomienda tener un botiquín de primeros auxilios para tratar heridas por mordeduras y rasguños por exposición al manejo de animales.3. La persona que manejará los animales debe recibir entrenamiento y capacitación antes de iniciar el bioensayo, particularmente cuando se aplican fluidos vía peritoneo, intramuscular, dérmica, o por cánula.4. Debe considerarse el control de los ciclos luz-oscuridad, temperatura, humedad para el bienestar del animal en el experimento.5. Se considera que el número de ratones que serán usados durante este estudio es muy alto. Se recomienda reducir de 10 a 5 ratones por tratamiento (7 como máximo) para obedecer el criterio de las tres R establecido por Russel y Burch.6. Por otro lado, en el caso de los participantes humanos donadores de sangre (n=6), se observa que en la Carta de Consentimiento Informado existe una declaratoria antes de la firma del participante. Recomendamos remover el ultimo párrafo de la misma ("También otorgo.....en el futuro"). Además, debe incluirse la firma de dos testigos.		
Por lo anterior y a reserva de la atención que reciban las recomendaciones anteriores, el CEI de CIAD ha aprobado la realización del estudio en los términos planteados, para lo cual le desea el mejor de los éxitos.		
Atentamente		
Dr. Luis Quihui Cota Presidente del Comité de Ética en Investigación de CIAD		
		
C.c.p. Archivo		
<small>KM. 0.6 Carretera a la Victoria Apartado Postal No. 1735 Hermosillo, Sonora, Méx. C.P. 83304</small>		<small>TEL. (662) 289-24-00 FAX (662) 280-00-94</small>



Centro de Investigación
en Alimentación y Desarrollo

OFICIO LCATA 107 2020

Asunto: Notificación al comité de Ética en Investigación
Hermosillo, Sonora, 29 de octubre de 2020.

Dr. Luis Quihui Cota
Presidente del Comité de Ética en Investigación
PRESENTE

Hago referencia a su atento oficio número **CE/022/2019**, referente a la aprobación por parte del comité de Ética en Investigación institucional del protocolo de investigación intitulado: **"Dilucidando los componentes y/o metabolitos secundarios de la fermentación involucrados en el efecto antiinflamatorio de las leches fermentadas con bacterias ácido lácticas específicas"**. Al particular, me permito informar al comité nuestro interés para emplear parte, remanente no utilizado, de las muestras de sangre donadas por los sujetos de estudio, para realizar ensayos complementarios asociados a nuestra investigación, lo cual será bajo el conocimiento de cada uno de los participantes a través de la carta de consentimiento informado, y considerando todas las recomendaciones previamente sugeridas por el comité al trabajo.

Dichos ensayos complementarios están dirigidos a evaluar *in vitro* el efecto protector de los metabolitos bacterianos en constituyentes sanguíneos. Para ello, las muestras remanentes, serán inducidos a estrés oxidativo, y utilizados para evaluar la capacidad de los metabolitos bacterianos para prevenir alteraciones del sistema antioxidante de los componentes sanguíneos. Los datos obtenidos permitirán complementar los resultados del efecto antiinflamatorio asociado a las leches fermentadas y/o las bacterias utilizadas para su elaboración.

Se adjunta al presente documento la carta de consentimiento informado, que previamente ha sido aprobada, en la cual se incluye el texto aclaratorio sobre la intención de uso de las muestras remanentes no utilizadas, para el conocimiento de los participantes.

Atentamente

Dr. Aaron F. Gonzalez Cordova
Profesor Investigador Titular
Investigador Titular Responsable del Proyecto

Carretera Gustavo Enrique Astizarán Rosas No. 46, Col. La Victoria, C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México.
Tel: (662) 289 2400 / www.ciad.mx



2020
LEONA VICARIO

10.5. Formulario de Información Clínica



Centro de Investigación
en Alimentación y Desarrollo

Formulario:

El presente formulario tiene como objetivo determinar si usted es apto para participar como voluntario en el proyecto de investigación "Dilucidando los componentes y/o metabolitos secundarios de la fermentación involucrados en el efecto antiinflamatorio de leches fermentadas con bacterias ácido lácticas específicas". Favor de contestar las siguientes preguntas:

- Información general:

Nombre completo: _____ Edad: _____ años

Sexo: _____ Altura: _____ Peso: _____ Nacionalidad: _____.

- Hábitos recreativos/personales/alimenticios:

¿Consumes tabaco? _____. En caso de responder Sí, ¿Desde hace cuánto tiempo? _____. ¿Número de cigarrillos que consumes por semana? _____. ¿Última vez que lo hizo? _____.

¿Consumes bebidas alcohólicas? _____. En caso de responder Sí, ¿Desde hace cuánto tiempo? _____. ¿Número de bebidas alcohólicas que consumes por semana? _____ latas o vasos. ¿Última vez que lo hizo? _____.

¿Practica ejercicio o algún deporte? _____. En caso de responder Sí, ¿Desde hace cuánto tiempo? _____. ¿Número de horas que practica por semana? _____. ¿Última vez que lo hizo? _____.

¿Consumes probióticos o alimentos que los contengan? _____. En caso de responder Sí, ¿Desde hace cuánto tiempo? _____. ¿Número de veces que los consumes por semana? _____. ¿Última vez que lo hizo? _____. Mencione la marca o nombre del producto que consumes: _____.

¿Consumes algún fármaco o droga recreativa? _____. En caso de responder Sí, ¿Desde hace cuánto tiempo? _____. ¿Número de veces que los consumes por semana? _____. ¿Última vez que lo hizo? _____.

Carretera Gustavo Enrique Astizarán Rosas No. 46, Col. La Victoria, C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México.
Tel (662) 289 2400 / www.ciad.mx



2020
LEONA VICARIO



Centro de Investigación
en Alimentación y Desarrollo

_____ Mencione la marca o nombre del producto que consume:

- Historial clínico:

¿Ha padecido o padece alguna enfermedad renal, cardiovascular, hepática, sanguínea, inmune, metabólica o de otro tipo? _____. En caso de responder Sí, ¿Desde hace cuánto tiempo? _____. ¿Cuál(es)? _____ ¿Está bajo algún tratamiento farmacológico? _____. En caso de responder Sí, Mencione la marca/ nombre del producto que consume:

¿Actualmente sufre alguna enfermedad infectocontagiosa? _____. En caso de responder Sí, ¿Desde hace cuánto tiempo? _____. ¿Cuál(es)? _____ ¿Está bajo algún tratamiento farmacológico? _____. En caso de responder Sí, Mencione la marca/nombre del producto que consume:

Declaro que toda la información vertida en el presente formulario es verdadera, y en caso de haber mentido intencional o deliberadamente me hago responsable de cualquier suceso desfavorable que esto ocasione, ya sea para mi persona o el personal involucrado en la toma y procesamiento de muestras.

Nombre del participante

Firma

Fecha (día/mes/año)

Carretera Gustavo Enrique Astizarán Rosas No. 46, Col. La Victoria, C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México.
Tel. (662) 289 2400 / www.ciad.mx



2020
LEONA VICARIO

10.6. Carta Consentimiento Informado



Centro de Investigación
en Alimentación y Desarrollo

Hermosillo, Sonora ____ de _____ de 2020.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto:

“Dilucidando los componentes y/o metabolitos secundarios de la fermentación involucrados en el efecto antiinflamatorio de leches fermentadas con bacterias ácido lácticas específicas”

Director del proyecto: Dr. Aarón F. González Córdova

Sitio de investigación: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Dirección: Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, No. 46 Col. La Victoria, CP, 83304, Hermosillo, Sonora, México.

Introducción

A través de este documento la invitamos a participar voluntariamente en un estudio de investigación. Antes de que usted acepte participar, es importante que lea cuidadosamente este documento, el cual tiene como objetivo comunicarle el propósito del estudio y los posibles riesgos y beneficios para que usted pueda tomar una decisión informada. Si tiene alguna(s) pregunta(s) puede hacerla(s) directamente al personal del estudio quienes le ayudarán a resolver cualquier inquietud.

Propósito del Estudio

Dilucidar los componentes y/o metabolitos secundarios de la fermentación involucrados en el efecto antiinflamatorio y protector de células del sistema inmune (leucocitos), de leches fermentadas con bacterias ácido lácticas específicas.

Procedimientos del Estudio

La participación consistirá en:

1. Responder un formulario sobre información general y antecedentes de salud (anexo).
2. Presentarse en el Laboratorio de Química y Bioquímica de Productos Lácteos en la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal para la toma de una muestra de sangre (5 mL) por la técnica de

Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46, Col. La Victoria, C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México.
Tel: (662) 289 2400 / www.ciad.mx



2020
LEONORA VICARIO



Centro de Investigación
en Alimentación y Desarrollo

venopunción, en el horario, fecha y condiciones indicadas, los cuales serán notificados de manera previa. La toma de muestras se realizará esporádicamente de acuerdo a las necesidades del presente proyecto de investigación.

Riesgos y molestias

En caso de presentar alguna molestia durante o inmediatamente después de la toma de muestra de sangre, notificar al personal responsable para suspender el procedimiento o tomar las precauciones necesarias en la siguiente toma.

Confidencialidad

La información que se reúna para este proyecto de investigación será completamente confidencial. Dicha información será guardada en un archivo en el que no figurará su nombre sino un código.

Participación voluntaria

Usted no está obligado a participar en este estudio si no lo desea. La decisión de no participar no afectará en modo alguno la relación que usted pudiera tener con el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Usted puede decidir dejar de participar en cualquier momento que lo desee.

Costo de participación

Este estudio es totalmente gratuito, incluyendo los procedimientos relacionados con el estudio. Usted será responsable por el costo de su atención médica habitual, incluidos los procedimientos y/o medicamentos no relacionados con el presente proyecto. Asimismo, no recibirá ningún pago por participar.

Información de Contacto

Si tiene alguna preocupación o queja acerca de este estudio o sobre cómo se está realizando, puede ponerse en contacto con el Dr. Aarón F. González Córdova, investigador titular del centro y responsable del proyecto. Teléfono: 662-2892400 Ext. 700, aaronglz@ciad.mx.

He leído atentamente la información precedente o me ha sido leída. Se me ha dado la posibilidad de formular preguntas sobre esta información y todas las preguntas que he formulado han sido respondidas de forma satisfactoria. Por lo tanto, con la firma de la presente carta otorgo mi consentimiento voluntario para participar como sujeto de estudio y comprendo que tengo derecho a retirarme del estudio en cualquier momento

Carretera Gustavo Enrique Astizarán Rosas No. 46, Col. La Victoria, C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México.
Tel. (662) 289 2400 / www.ciad.mx



2020
LEONA VICARIO





Centro de Investigación
en Alimentación y Desarrollo

que lo desee, sin que esto afecte de manera alguna mi relación con el Centro de Investigación. También otorgo mi consentimiento para que el remanente de muestra de sangre no utilizado pueda ser guardado y empleado para estudios relacionados a este proyecto que se realicen en el futuro.

Nombre del participante

Firma

Fecha (día/mes/año)

Testigos

Nombre del testigo 1

Firma

Fecha (día/mes/año)

Nombre del testigo 2

Firma

Fecha (día/mes/año)

Persona que obtiene el Consentimiento

Nombre del Investigador

Firma

Fecha (día/mes/año)

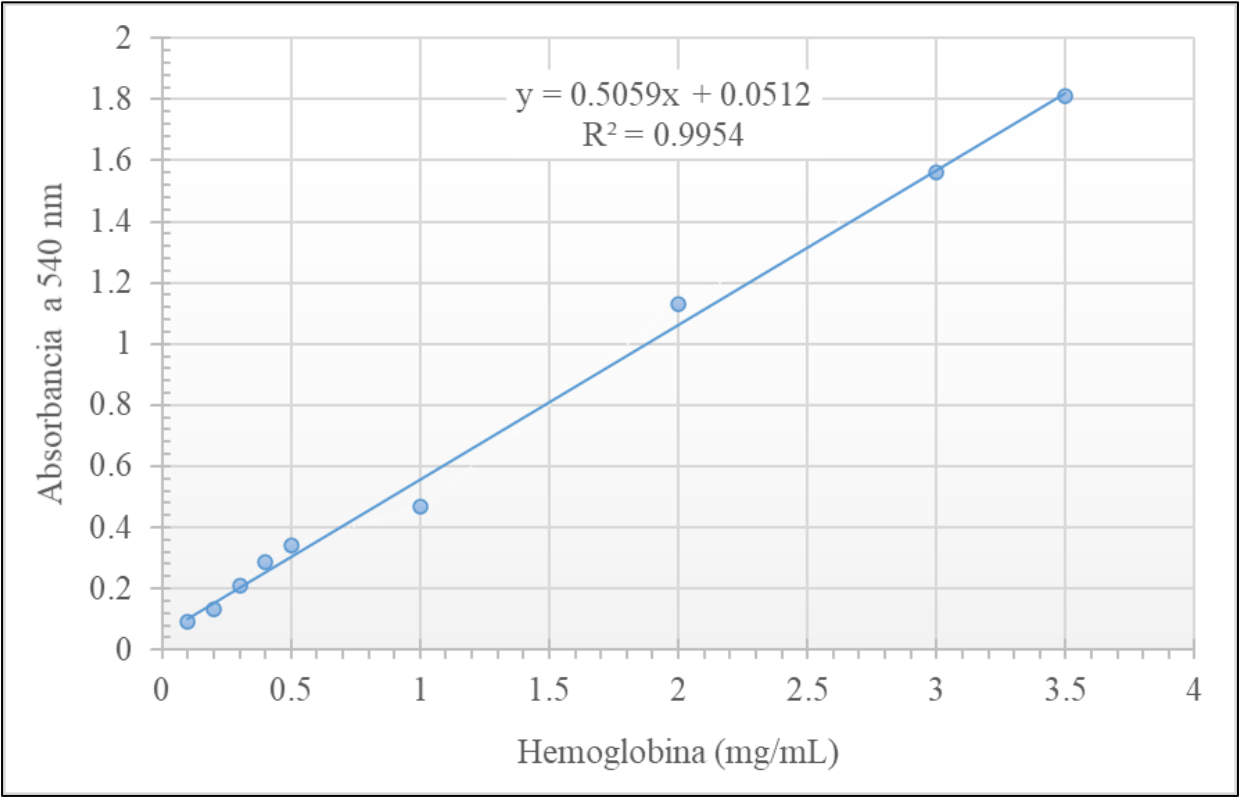
Carretera Gustavo Enrique Atlazarán Rosas No. 46, Col. La Victoria, C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México.
Tel: (662) 289 2400 / www.ciad.mx



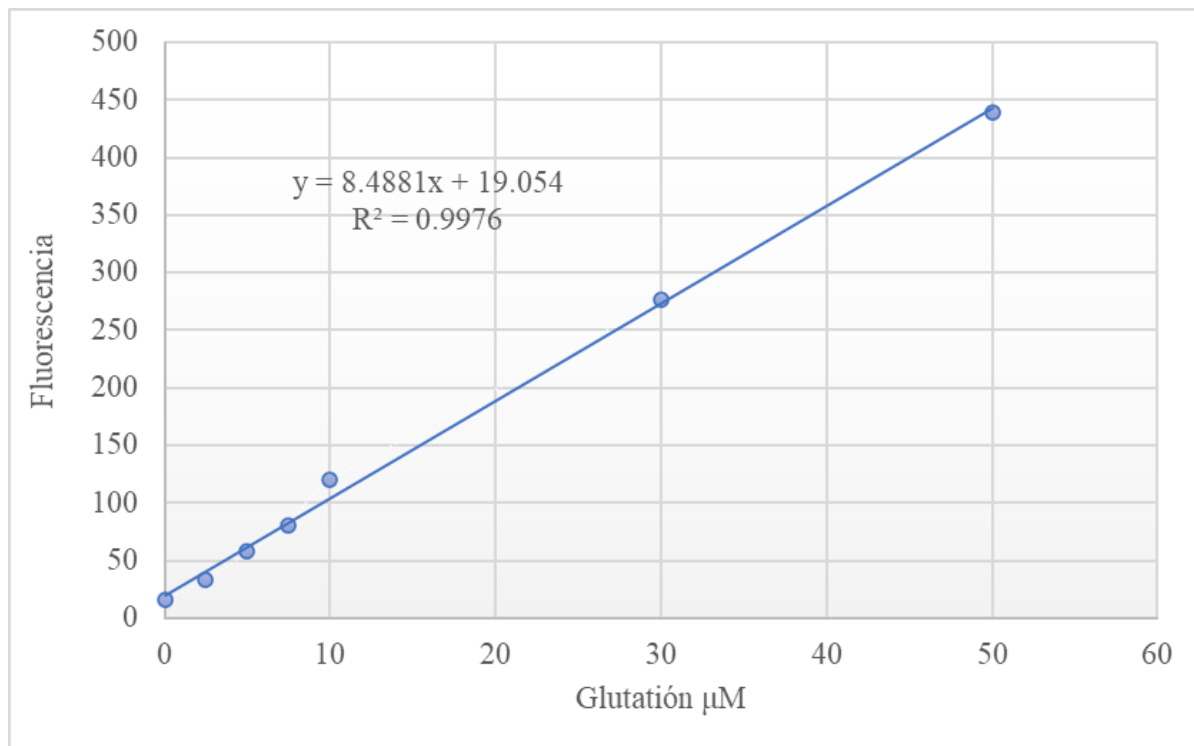
2020
LEONA VICARIO



10.7. Curva Estándar de Determinación de la Concentración de Hemoglobina en Muestras de Eritrocitos Expuestos a Radiación UV-C.



10.8. Curva Estándar para Determinación de GSH



10.9. Curva Estándar de H2O2

