



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

**EVALUACIÓN *In vivo* DEL POTENCIAL EFECTO
PROTECTOR DE *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus
casei* Shirota CONTRA EL EFECTO TÓXICO DE
ACRILAMIDA**

Por:

Karen del Rosario Ramírez Ortiz

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Karen del Rosario Ramírez Ortiz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



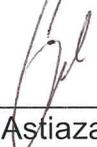
Dr. Adrián Hernández Mendoza
Director de Tesis



Dra. Belinda Vallejo Galland
Asesor



Dr. Aarón F. González Córdova
Asesor



Dr. Humberto Astiazarán García
Asesor

Dr. Gustavo A. González Aguilar
Asesor



Dr. Hugo S. García Galindo
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis 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, 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 del Director General del CIAD.

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



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo de tesis fue posible gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), por darme la formación académica necesaria para desarrollar este trabajo, a través del proyecto 6502 y al Laboratorio de Calidad, Autenticidad y Trazabilidad de los Alimentos y de Química y Biotecnología de Productos Lácteos por facilitarme las herramientas necesarias para la realización de este trabajo.

Principalmente agradezco a DIOS por todos los medios, herramientas y personas de gran calidad humana que puso en mi camino para hacer posible la culminación de éste proyecto de tesis.

Le doy gracias a mi familia, a mi madre *Imelda Ortiz* y a mi padre *José Ramírez* por apoyarme e inculcar en mí la sed de superación y todos los valores que me hacen ser la persona de hoy. Gracias hermano *Giordani Ramírez* por todo tu apoyo a lo largo de mi vida, por creer en mí e impulsar mis sueños y alas para alcanzar todo lo que me proponga.

Gracias a mi novio *Edgar Vega* por apoyar siempre mis decisiones, animarme a salir adelante, por tu comprensión, tolerancia, por levantarme el ánimo cuando sentía que ya no podía más y por esperarme estos dos años que han sido muy difíciles, pero fortalecieron nuestra relación.

Así mismo agradezco a mi director de tesis *Dr. Adrián Hernández Mendoza*, por el apoyo, confianza, consejos y conocimientos transmitidos a lo largo de la realización de este trabajo.

Agradezco también al *Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar*, quien de primera instancia me recibió para mi formación como Maestra en Ciencias y me impulsó para desarrollarme y seguir mi pasión como investigadora en el lugar que sea, pero siempre esforzándome y dando lo mejor de mí.

A mi comité de tesis, integrado por la *Dra. Belinda Vallejo Galland*, *Dr. Aarón Fernando González Córdova*, *Dr. Humberto Astiazarán García*, *Dr. Gustavo Adolfo Gonzáles Aguilar* y *Dr. Hugo Sergio García Galindo*, gracias por todos los consejos, apoyo y críticas hacia mi trabajo, fueron de gran utilidad para la culminación de éste.

Gracias a todos mis compañeros del Laboratorio de Antioxidantes y Alimentos Funcionales, *Tavo*, *Maribel*, *Elena*, *Ramón*, *Ceci*, *Gaby* y *Ale*, quienes además de transmitirme sus conocimientos y apoyarme, pasaron a ser grandes amigos. También agradezco a mis compañeros y amigos del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos *Lulú*, *Ele*, *Alex*, *Carmen*, *Glen*, *Lilia*, *Aline*, *Migue*, *José*, *Ale*, *Magy*, *Wendy*, *Angy*, *Oscar*, *Isidro*, *Roselia*, *Chío* y los últimos que llegaron de estancia, pero no menos importantes y que en poco tiempo se convirtieron en buenos amigos, *Martín*, *Maggie* y *Libier*, gracias a todos por su compañerismo, por los conocimientos transmitidos y por hacer de todo este tiempo que compartimos, una experiencia maravillosa.

Especialmente quiero agradecer a *Lulú*, quien se convirtió en una gran amiga y a quien le debo gran parte de mis conocimientos de microbiología, gracias *Lulú* fuiste parte fundamental para la culminación de este trabajo. Gracias también a *Eleazar*, fuiste gran amigo y apoyo para mi formación académica. Gracias *Alex* por todo el apoyo que me diste, hasta en mis más mínimas dudas.

También agradezco especialmente a *Alejandra Preciado*, quien me acompañó a lo largo de estos dos años de Maestría, gracias por escucharme, apoyarme, darme consejos y tolerarme, eres una gran amiga.

Finalmente gracias a todas aquellas personas que de alguna u otra forma fueron importantes en la realización de éste trabajo.

¡¡A todos mil GRACIAS!!

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a un gran hombre que siempre será mi ejemplo de vida, por la fortaleza, inteligencia y calidad humana que lo caracterizaron, mi padre *José Ramírez Ramírez*, quien en este proceso de mi formación académica como Maestra en Ciencias, lamentablemente ya no pudo seguir a mi lado físicamente, pero dejó en mí, valores, principios, moral, consejos, conocimientos, experiencias, recuerdos y amor que me llevaron a lograr la culminación de éste trabajo y que me acompañarán por el resto de mi vida para seguir cosechando triunfos y donde quiera que estés sigas estando orgulloso de mí.

A mi madre *Imelda Ortiz Ortiz* que ha sido una guerrera desde que tengo memoria y siempre se ha esforzado por sacar adelante a sus hijos para convertirnos en personas exitosas, pero siempre humildes para nunca olvidar nuestros orígenes y tener los pies bien plantados en la tierra. ¡¡Gracias por todo mamá!!

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
I.-INTRODUCCIÓN	1
II.-ANTECEDENTES	4
2.1-Generalidades de la Acrilamida (AA)	4
2.2.-Formación de Acrilamida en los Alimentos	7
2.3.-Factores que Afectan la Formación de Acrilamida	9
2.3.1.-Factores Exógenos	9
2.3.2.-Factores Endógenos	10
2.4.-Metabolismo de la Acrilamida	10
2.4.1.-Factores que Afectan el Metabolismo de la Acrilamida	11
2.5.-Efectos Tóxicos de la Acrilamida	12
2.6.-Estrategias para la Reducción de Acrilamida Dietaria	13
2.6.1.-Métodos Físicos	13
2.6.2.-Métodos Químicos	14
2.6.3.-Métodos Biológicos	15
2.7.-Mecanismo de Acción de las BAL	17
III.-HIPÓTESIS	20
IV.-OBJETIVOS	221
4.1.-General	221
4.2.-Específicos	221
V.-MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1.-Cultivos bacterianos y propagación	22
5.2.-Solución de Trabajo de Acrilamida	23
5.3.-Evaluación del Efecto de la Fijación de AA sobre las Propiedades de Agregación e Hidrofobicidad de las Bacterias	23

5.3.1.-Evaluación de la Habilidad de Autoagregación y Coagregación de las Bacterias Lácticas.....	24
5.3.2.-Determinación de la Hidrofobicidad de la Superficie Celular	25
5.4.-Efecto sobre la Capacidad de Adhesión de las Bacterias a Mucosa Intestinal	25
5.4.1.-Obtención de Mucosa Intestinal.....	25
5.4.2.-Ensayo de Adhesión a la Mucosa Intestinal	26
5.4.3.- Cuantificación de Acrilamida fijada <i>in vitro</i> por las bacterias	27
5.5.- Efecto de las Bacterias Ácido Lácticas sobre la Absorción Intestinal de la Acrilamida, el Porcentaje Basal de Lipo-peroxidación Plasmática y Niveles de Glutación y Glutación-S-Transferasa en un modelo murino	28
5.5.1.-Determinación de Glutación en Tejido Hepático.....	30
5.5.2.-Determinación de Acrilamida y Glicidamina por HPLC en Plasma Sanguíneo	331
5.5.2.1.-Preparación de la Muestra.....	31
5.5.2.2.-Determinación Cromatográfica.....	31
5.5.3-Determinación de Peroxidación Lipídica en Plasma y Homogenizados de Tejido Hepático.....	331
5.5.4.-Determinación de la Actividad de Glutación-S-Transferasa (GTS) en Tejido Hepático.....	32
5.6.-Análisis Estadístico	32
VI.-RESULTADOS	33
VII.-DISCUSIÓN	43
VIII.-CONCLUSIÓN	48
IX.-REFERENCIAS	49

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química de la acrilamida.....	4
2	Vía de mayor formación de acrilamida.....	8
3	Vía de menor formación de acrilamida.....	9
4	Calendario experimental.....	29
5	Diagrama de flujo del experimento.....	30

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Valores indicativos de acrilamida con base a los datos de seguimiento de la EFSA 2007-2012.....	6
2	Remoción de compuestos toxigénicos por bacterias ácido lácticas (BAL).....	19
3	Porcentaje de autoagregación de BAL con y sin acrilamida.....	33
4	Porcentaje de coagregación de BAL con y sin acrilamida....	35
5	Porcentaje de coagregación de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota con bacterias patógenas, con y sin acrilamida.....	35
6	Porcentaje de coagregación de <i>Lactobacillus reuteri</i> con bacterias patógenas con y sin acrilamida.....	36
7	Porcentaje de hidrofobicidad de la superficie celular de BAL con y sin acrilamida.....	37
8	Porcentaje de adhesión de las BAL a mucosa intestinal.....	38
9	Porcentaje de Fijación de AA.....	38
10	Registro de Peso y Consumo de Alimento durante el Experimento.....	39
11	Determinación de Peroxidación Lipídica.....	40
12	Contenido de Glutación y Glutación-S-Transferasa.....	40
13	Concentraciones de Acrilamida y Glicidamida en Hígado....	41
14	Concentración de Acrilamida en Plasma.....	42
15	Concentración de Glicidamida en Plasma.....	42

RESUMEN

Los procesos térmicos empleados durante la fabricación de alimentos pueden generar compuestos tóxicos como la acrilamida (AA), la cual es un potente agente neurotóxico y probable carcinógeno. Estudios *in vitro* han evidenciado que ciertas bacterias ácido lácticas presentan la capacidad de remover AA en solución acuosa, así como reducir su disponibilidad bajo condiciones gástricas simuladas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de *Lactobacillus reuteri* NRRL14171 y *Lactobacillus casei* Shirota para reducir la absorción intestinal de acrilamida y reducir los efectos tóxicos *in vivo* en un modelo murino. Como parte de la estrategia experimental, primero se evaluó *in vitro* el efecto de la fijación de AA sobre las propiedades de agregación, hidrofobicidad y adhesión a mucosa intestinal de las bacterias probióticas. Para ello se emplearon diferentes concentraciones de AA y diferentes tiempos de incubación. Para el modelo murino se usaron 25 ratas distribuidas en cinco grupos experimentales a los cuales se les administró el compuesto tóxico (AA) y las bacterias anteriormente mencionadas, durante un período de 20 días. Las cepas mostraron porcentajes de autoagregación en un rango de 11 a 83%, de co-agregación de 39 a 51% e hidrofobicidad de 10 a 44%. Por otra parte, las bacterias presentaron porcentajes de adhesión a la mucosa intestinal de rata en un rango de 63 a 78%, siendo *L. casei*, no solo la bacteria con el mayor porcentaje de adhesión, sino también la de valores más altos de agregación. En general, dichos porcentajes no fueron afectados significativamente ($p \leq 0.05$) cuando las cepas fijaron previamente AA en su superficie celular. En cuanto a los resultados obtenidos del modelo murino se observó que el grupo que solamente se le administró AA, presentó 2 veces más altos los niveles de ésta sustancia tóxica en hígado, comparado con el resto de los grupos experimentales, sin embargo, los niveles de su metabolito glicidamida, se mostraron en la misma cantidad, en todos los grupos experimentales, excepto el grupo control, en el cual no se detectó la presencia de éste compuesto. Estos hallazgos sugieren que las cepas aún en presencia de AA presentan alto potencial para adherirse y colonizar el

intestino, formando una barrera biológica, por lo cual evitan la absorción de una porción de la acrilamida administrada a las ratas bajo estudio en el modelo murino.

Palabras clave: Acrilamida, glicidamida, probióticos, modelo murino

ABSTRACT

Thermal processes during the manufacture of food, in combination with other external factors, can generate toxic compounds such acrylamide (AA), which is considered a powerful neurotoxic agent for humans and animals. Besides, it has been classified to probable human carcinogen. *In vitro* studies have shown that specific strains of lactic acid bacteria (LAB) have the ability to remove AA from aqueous solution, and even reduce its availability under simulated gastric conditions. The aim of this study was to evaluate the ability of *Lactobacillus reuteri* NRRL14171 and *Lactobacillus casei* Shirota to prevent the intestinal absorption of acrylamide and reduce its possible toxic effects *in vivo* in a rat model. Bacteria were exposed to different concentrations of Acrylamide (AA) during different periods. Then, bacterial surface (hydrophobicity), aggregation (auto- and co-aggregation) and mucosal adhesion properties were assessed. Bacteria without AA exposure were included as control groups. For the murine model 25 rats were distributed in five experimental groups to which the toxin was administered and the bacteria above mentioned were used for a 20-day period. Overall, results evidenced no significant differences ($p>0.05$) on aggregation properties, as well as on hydrophobicity percentage for bacteria with and without bound AA, except for *L. casei* Shirota which showed higher auto-aggregation after 4 h of incubation. Moreover, both bacteria showed high rates of adhesion to rats intestinal mucosa (from 63 to 78%). Data showed no significant differences ($p>0.05$) on bacterial intestinal mucosa adhesion for bacteria with and without bound AA. Acrylamide bound to bacterial cell surface did not affect aggregation and adhesion properties of specific *Lactobacillus* strains. As for the results of the mouse model, it was observed that the group that was only administered with AA, produced 2-fold higher levels of this toxic substance in the liver compared to other experimental groups; however, concentrations of its metabolite, glycidamide, were similar in all experimental groups, except the control group, in which the presence of this compound was not detected. Aggregation and hydrophobicity properties seem to play a key role on adhesion to the intestinal epithelium; hence,

these findings suggest that the assessed bacterial strains exhibited potential to adhere and colonize the intestine in the presence of AA, thereby forming a biological barrier that prevented the absorption of a portion of the acrylamide groups administered to murine model.

Key words: Acrylamide, glycidamide, probiotic, murine model

I.-INTRODUCCIÓN

Los procesos térmicos empleados durante la fabricación de alimentos permiten obtener productos seguros y con una vida útil prolongada (De Vleeschouwer *et al.*, 2010). Dichos procesos pueden mejorar las propiedades sensoriales de los alimentos, como la palatabilidad, además de que amplían la gama de colores, sabores, aromas y texturas en los alimentos (Capuano y Fogliano, 2011). Sin embargo, el empleo de dichos procesos térmicos, en combinación con otros factores externos al alimento, pueden dar lugar a la formación de algunos compuestos tóxicos que además de reducir su valor biológico, comprometen la seguridad del mismo. Estas sustancias químicas son compuestos que no estaban presentes de forma natural en el alimento, y cuya génesis está directamente relacionada con el proceso tecnológico y/o culinario aplicado. Dentro de estos contaminantes se incluyen a las aminas heterocíclicas, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las nitrosaminas y recientemente, la acrilamida (Hariri *et al.*, 2015).

La acrilamida (AA) se considera un constituyente común en la fabricación de determinados productos ricos en almidón como papas fritas, cereales, galletas, café y churros, entre otros alimentos, que son sometidos a elevadas temperaturas de cocción (Scholten, 2010). Se ha reportado que la AA es un potente agente neurotóxico para los seres humanos y animales de laboratorio debido a los efectos tóxicos que tiene sobre el sistema nervioso central y periférico. Además, también se ha demostrado que la AA ejerce efectos genotóxicos, anti-reproductivos y ha sido clasificado por la Agencia Internacional

de Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) dentro del grupo 2A, como probable carcinógeno para el humano (Mei *et al.*, 2008).

Debido al problema de salud pública que representa la AA dietaria, se han desarrollado diversas estrategias para disminuir su contenido en los alimentos incluyendo la modificación de prácticas agronómicas (*p.e.*, el uso de diferentes cultivares y condiciones de almacenamiento), la disminución en los alimentos de la concentración inicial de sus compuestos precursores (azúcares reductores y el aminoácido asparagina), la modificación de las condiciones de procesamiento (*p.e.*, temperatura y ciclos de freído), o el uso de aditivos como sales ácidas o cationes divalentes (Taeymans *et al.*, 2004).

Ninguna de las estrategias antes mencionadas ha demostrado ser completamente efectiva; además, su implementación a nivel industrial plantea un gasto que muy probablemente es transferido a los consumidores (Varzakas, 2015). Es por esta razón que actualmente se siguen buscando métodos alternativos para disminuir o minimizar los efectos tóxicos de alimentos contaminados con AA. En este sentido, estudios *in vitro* han evidenciado que cepas específicas de bacterias ácido lácticas (BAL) presentan la capacidad de remover la AA en solución acuosa (Serrano-Niño *et al.*, 2014), e incluso reducir su disponibilidad bajo condiciones gástricas simuladas (Rivas *et al.*, 2015).

Los mecanismos precisos por los cuales dichas BAL tiene la capacidad de remover la AA son aún desconocidos. Sin embargo, se ha sugerido que los ácidos teicoicos (ATs) de la pared celular bacteriana podrían participar de forma activa en dicho proceso de remoción (Serrano-Niño *et al.*, 2014). De hecho, a partir del análisis composicional de los ATs de diferentes cepas de BAL se ha planteado la hipótesis de que el oxígeno del grupo carboxilo de la AA, podría estar involucrado en las interacciones entre este compuesto y los grupos hidroxilo de glucosa o glicerol de los ATs (Serrano-Niño *et al.*, 2015).

A pesar de los resultados prometedores de los estudios antes mencionados, aún son necesarios más estudios que superen la limitación de los métodos *in vitro* empleados y que permitan comprender plenamente el potencial de las BAL para reducir la absorción de AA *in vivo* bajo exposición crónica a la AA. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de *Lactobacillus reuteri* NRRL14171 y *Lactobacillus casei* Shirota para reducir la absorción intestinal de acrilamida y reducir los efectos tóxicos *in vivo* en un modelo murino.

II.-ANTECEDENTES

2.1-Generalidades de la Acrilamida (AA)

La acrilamida es un compuesto orgánico de tipo amida (Figura 1) de color blanco y soluble en agua que tiene diferentes aplicaciones en los procesos industriales. Se encuentra en alimentos ricos en hidratos de carbono que se cocinan a alta temperaturas (Mehri *et al.*, 2014). La exposición humana a acrilamida se ha atribuido a lo largo de los años a la exposición ocupacional y al humo del tabaco, afectando tanto al fumador activo como al pasivo. Sin embargo, en Abril del 2002, la Administración Nacional de Alimentos de Suecia (NFA, por sus siglas en inglés) e investigadores de la Universidad de Estocolmo anunciaron el descubrimiento de que, esta sustancia química, altamente reactiva, tóxica y potencialmente cancerígena se forma en muchos tipos de alimentos preparados/cocidos a temperaturas elevadas (>120°C), excediéndose los niveles recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el agua como bebida (0.5 µg/kg) así como la legislación europea sobre migración química en envolturas plásticas (10 µg/kg) (Jin *et al.*, 2014).

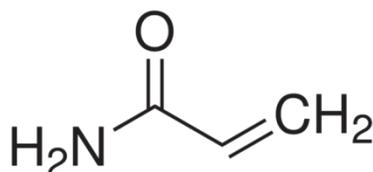


Figura 1. Estructura química de la acrilamida

Según la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés), las papas procesadas junto con café y cereales alimentarios (galletas, cereales de desayuno y pan tostado) son las principales fuentes de exposición a la acrilamida en la dieta (EFSA, 2014). La ingesta diaria de acrilamida varía con la edad y los hábitos de alimentación. Sin embargo, estimaciones de la OMS han indicado que la ingesta diaria promedio de AA se encuentra en el rango de 0.31-1.1 $\mu\text{g}/\text{kg-día}$ para los adultos, 0.43 a 1.4 $\mu\text{g}/\text{kg-día}$ para los adolescentes y 0.7-2.05 $\mu\text{g}/\text{kg-día}$ para los niños en Europa (Luo *et al.*, 2015).

En noviembre de 2013, la FDA (agencia de Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos) y la EFSA publicaron informes actualizados sobre la presencia de acrilamida en los alimentos y bebidas. La FDA emitió directrices destinadas a los fabricantes de alimentos y bebidas para mejorar las prácticas y reducir la presencia de acrilamida en sus productos (Burel *et al.*, 2012). Por otra parte, en Europa, la organización de la industria Food Drink Europe ha desarrollado la acción "caja de herramientas" (*toolbox*), la cual consiste en un conjunto de técnicas y estrategias (*v.g.*, reducir azúcares y asparagina en el alimento, adición de agentes gasificantes, levaduras o asparaginasa), para uso de los fabricantes de alimentos y bebidas, para garantizar que los niveles de acrilamida en sus productos no superan la media del sector (EFSA, 2015).

Actualmente no hay límites máximos reglamentarios para la acrilamida en los alimentos. Sin embargo, la Comisión Europea (CE) ha introducido "valores indicativos" para esos grupos de alimentos considerados que pueden superar el valor máximo a la exposición alimentaria de acrilamida por los consumidores. Los valores indicativos (Tabla 1) no son límites máximos y sólo pretenden ser una guía para impulsar la investigación cuando se producen niveles más altos, para que las autoridades policiales puedan obtener más datos para entender dónde pueden presentarse problemas (European Union, 2013).

La acrilamida es un agente neurotóxico para los seres humanos y animales de laboratorio debido a sus efectos sobre los sistemas nerviosos central y periférico (Hariri *et al.*, 2015). Animales expuestos a la acrilamida, manifiestan síntomas tales como ataxia, debilidad muscular, pérdida de sensibilidad y disminución de los reflejos. Así como tumores en varias glándulas, incluyendo tiroides, mama, pituitaria, entre otras (Keramat *et al.*, 2011). La inhibición de la neurotransmisión presináptica de señalización mediante la interrupción de óxido nítrico (ON), la degeneración nervio-terminal y axonal, el incremento de la peroxidación lipídica, la reducción de la capacidad antioxidante del sistema nervioso así como la inducción de la señalización de apoptosis son diversos mecanismos que están mediados por la acrilamida (Mehri *et al.*, 2014).

Tabla 1. Valores indicativos de acrilamida en base a los datos de seguimiento de la EFSA 2007-2012

Clasificación de alimentos	Valor indicativo ($\mu\text{g}/\text{k}$)
Papas a la francesa para consumo	600
Papas en rebanadas	1000
Pan blando	150
Cereales para desayuno	400
Galleta, crackers, pan crujiente y similar	500
Café tostado	450
Café instantáneo (soluble)	900
Comida para bebés (a base de cereales)	80
Galletas para bebés y niños pequeños	200
Otros alimentos elaborados a base de cereales para bebé y niños pequeños	50

2.2.-Formación de Acrilamida en los Alimentos

Los azúcares reductores, tales como glucosa y fructosa, reaccionan con los aminoácidos libres durante altas temperaturas de cocción y procesamiento (freído, horneado y tostado, pero no hervido), en una serie de reacciones no enzimáticas conocidas como la reacción de Maillard (Halford *et al.*, 2012). La reacción de Maillard da lugar a la formación de una gran cantidad de productos, muchos de los cuales imparten color, aroma y sabor en los alimentos. Sin embargo, también puedan dar lugar a la formación de algunos contaminantes indeseables, incluyendo la acrilamida (Muttucumaru *et al.*, 2014). En esta ruta, N-glucósidos junto con asparagina se convierten en acrilamida a través de la descarboxilación y desaminación térmica, que necesariamente necesita la presencia de un compuesto carboxilo (tal como un azúcar reductor). En estudios modelo, se ha demostrado que un hidroxí-carbonilo es más eficaz que el di-carbonilo en la conversión de la asparagina a acrilamida, y la fructosa, que contiene dos grupos carbonilo α -hidroxí, aumenta 2 veces la formación de acrilamida en comparación de otros azúcares reductores tales como glucosa (Lineback *et al.*, 2012).

La reacción entre la asparagina y un azúcar reductor produce una base de Schiff descarboxilada, N-glicosilasparagina, que conduce directamente a acrilamida y a una imina después de la descomposición. Además, descarboxilasas presente en las materias primas podrían generar la amina biogéna 3-APA a partir de asparagina, que está entonces térmicamente desaminada en acrilamida (Figura 2). Este proceso prosigue sin la participación de la reducción de los hidratos de carbono. La degradación de Strecker de aminoácidos (metionina y asparagina) en la presencia de productos de di-carbonilo reactivos a aldehídos, se ha sugerido como una forma alternativa de la formación de acrilamida a través de la reacción de Maillard.

Por otra parte, la acrilamida también puede ser formada a partir de lípidos a través de los compuestos de la unidad de tres carbonos (ácido acrílico) producido a partir de lípidos a temperaturas elevadas (Figura 3) (Sisnaiske *et al.*, 2014). Adicionalmente, pequeñas moléculas (tales como acetaldehído, formaldehído) producidas durante el calentamiento, forman acroleína bajo condiciones adecuadas y posteriormente se convierten en acrilamida. Además, las vías de metabolismo de las proteínas y el ácido orgánico (e.g. ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico) también generan acroleína y ácido acrílico, que resultan en la formación de acrilamida. Sin embargo, la acrilamida formada por estas vías podría ser marginal debido a que compuestos de carbonilo tales como azúcares reductores son más activos con asparagina que estos (Xu *et al.*, 2014).

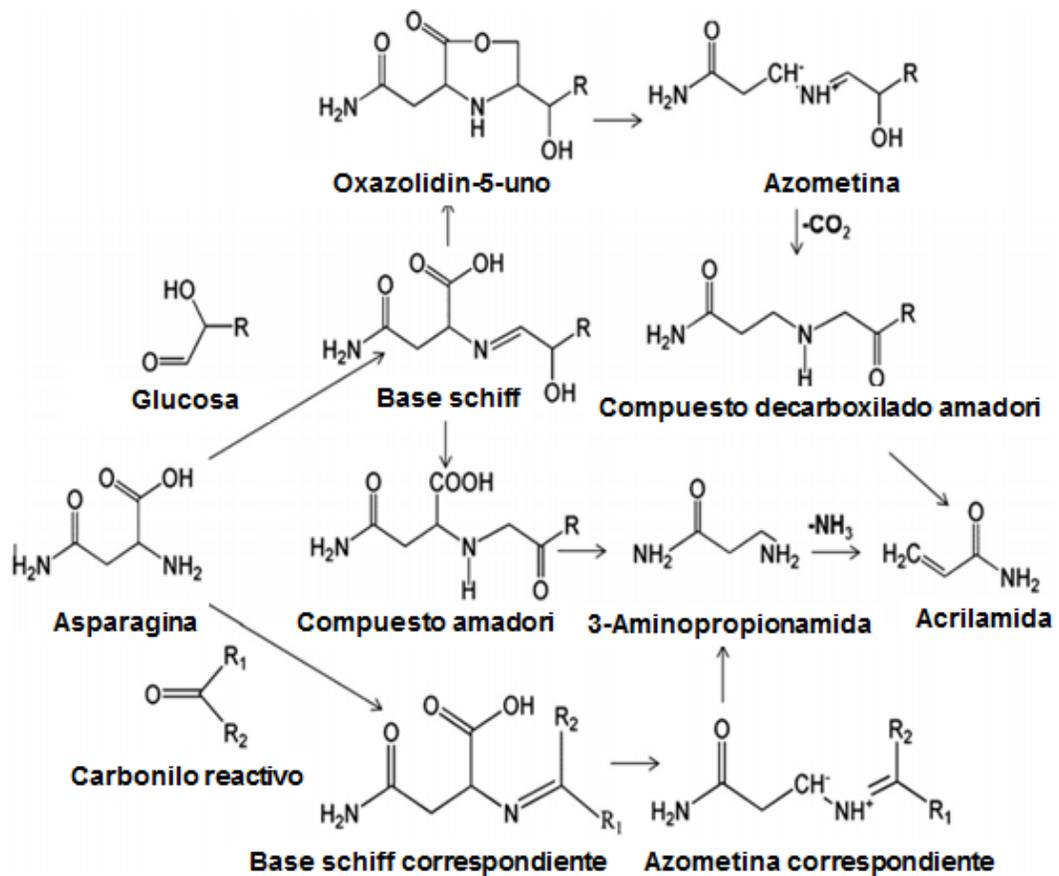


Figura 2. Vía de mayor formación de acrilamida (Capuano, 2011)

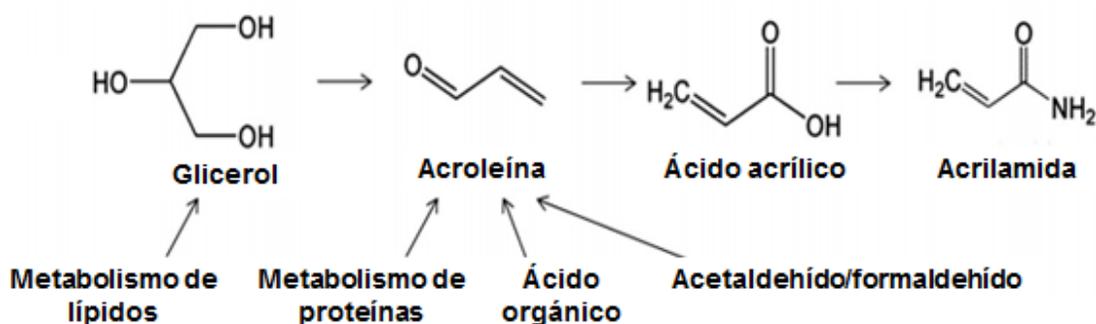


Figura 3. Vía de menor formación de acrilamida (Capuano, 2011)

2.3.-Factores que Afectan la Formación de Acrilamida

2.3.1.-Factores Exógenos

Existen varios parámetros que influyen en la formación de AA en los alimentos, entre ellos los factores exógenos tales como, temperatura y duración de calentamiento, el pH, así como las concentraciones y la reactividad de los componentes presentes. Desde el descubrimiento de la AA en los alimentos, estos factores han sido ampliamente investigados (Varzakas, 2015).

En general, la formación de AA aumenta con el aumento de la temperatura y el tiempo de calentamiento, de forma individual o conjunta. La formación de AA alcanza un máximo cuando la temperatura es arriba de 190 °C, que exhibe una curva en forma de U invertida de las concentraciones de AA en las papas fritas. El rendimiento de AA aumenta con un incremento en el pH, así como con el contenido de agua. La AA no se encuentra en alimentos que no han recibido cocción o han sido hervidos, pero si hay producción de AA cuando el almidón del alimento se somete a ebullición o autoclave (Bonazzi y Dumoulin, 2011).

2.3.2.-Factores Endógenos

Además de los factores exógenos que afectan la formación de AA, existen factores endógenos, como la presencia de precursores en los alimentos, el cual es el factor principal para la formación de AA. Estos precursores incluyen aminoácidos (tales como la asparagina libre, alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, metionina, treonina y valina) y mono o disacáridos (como los azúcares reductores, glucosa y fructosa y el azúcar no reductor, sacarosa). Los niveles de los que depende en gran medida son factores genéticos y ambientales. Por lo tanto, las especies y cultivares de materias primas alimentarias, los sistemas de cultivo, el tiempo de la cosecha, el tiempo de almacenamiento y la temperatura, pueden afectar en algún grado los niveles finales de los precursores de AA (Pedreschi *et al.*, 2014).

2.4.-Metabolismo de la Acrilamida

El metabolismo de la acrilamida se ha investigado a fondo por medio de estudios toxicocinéticos en los seres humanos, ratas y ratones (Katen y Roman, 2015). Después de la ingestión, la acrilamida se absorbe y distribuye en animales y seres humanos en el cuerpo rápidamente. Se puede encontrar en muchos órganos, como el timo, el hígado, el corazón, el cerebro, los riñones, así como en la placenta humana y la leche materna, siendo así fácilmente transferibles al feto o recién nacidos (Capuano y Fogliano, 2011).

Tras la absorción, la AA puede ser metabólicamente activada por el citocromo P450 2E1 (CYP2E1) para glicidamida (GA), el cual es una sustancia tóxica crítica para la genotoxicidad de AA. La GA puede ser espontánea o enzimáticamente hidrolizada para gliceramida (Zödl *et al.*, 2007). Tanto la AA y GA pueden ser destoxificados a través de reacciones enzimáticas (por la

glutación-S-transferasa, GST) o vías no enzimáticas para formar AA y GA-glutación conjugado (AA-GSH, GA2 y GA3 GSH-GSH), respectivamente. La AA y GA-GSH se metabolizan adicionalmente por c-glutamyl-transpeptidasa, dipeptidasas, y N-acetiltransferasa a N-acetil-S- (acetato de 2-carbamoil) -cisteina (AAMA) y N-acetil-S- (Thyl) -cisteina 2-hidroxi-2-carbamoil (GAMA) y se excreta por la orina.

Estos ácidos mercaptúricos han sido bien estudiados para servir como biomarcadores de exposición AA actuales y dar a entender el metabolismo de AA *in vivo*. Los estudios toxicocinéticos en humanos muestran que casi el 60% de acrilamida absorbida, en su mayoría (86%) es excretada en la orina como GSH conjugado y la AA no conjugada, constituye el 4.4% de la dosis tomada. Sólo cantidades marginales de glicidamida sin conjugarse se podrían encontrar en la orina humana (Luo *et al.*, 2015).

2.4.1.-Factores que Afectan el Metabolismo de la Acrilamida

La absorción de acrilamida en el tracto gastrointestinal (GI) es un proceso complejo influenciado por muchos factores que pueden clasificarse como factores fisicoquímicos y biológicos incluyendo propiedades intrínsecas de la AA tales como pKa, tamaño molecular, lipofilia, solubilidad, así como, tiempo de tránsito intestinal, permeabilidad de la membrana, pH del lumen, la tasa de flujo de sangre y el metabolismo de primer paso (Mehta *et al.*, 2011). Otros factores que podrían influir en la absorción intestinal de AA incluyen la dieta, edad, y los cambios en la motilidad del tracto intestinal. Además, la evidencia emergente de los efectos directos e indirectos de la microbiota intestinal humana sobre la absorción y el metabolismo de AA se ha discutido (Haiser y Turnbaugh, 2013).

2.5.-Efectos Tóxicos de la Acrilamida

El hallazgo de acrilamida como un tóxico generado en el proceso de calentamiento de los alimentos ricos en carbohidratos tomó la comunidad científica por sorpresa. Las lagunas en los datos obstaculizaron la evaluación del riesgo para esta nueva fuente de exposición (Parzefall, 2008). La información sobre los niveles en los alimentos, la biodisponibilidad, la ingesta alimentaria, los biomarcadores de exposición y los puntos finales toxicológicos en cohortes epidemiológicos internacionales existentes eran escasas si no completamente ausente. Por esta razón, en Junio y Julio de 2002 la FAO/OMS y la UE, respectivamente, pidieron una investigación para analizar los riesgos para la salud que plantea la acrilamida en los alimentos y promovió una red de investigación internacional (OMS, 2002; Comité Científico de la Comisión Europea sobre la Alimentación , 2002) (Aureli *et al.*, 2007).

Según estudios toxicológicos, la AA es neurotóxico para los animales y humanos. Además, el IARC lo ha clasificado como 2A, un probable carcinógeno humano. La AA también es genotóxico en células somáticas y germinales *in vitro* e *in vivo*. La GA puede ser más tóxica que la AA, ya que reacciona rápidamente con el ADN y otras macromoléculas biológicas y es positiva en la mayoría de pruebas de genotoxicidad. La AA, por otro lado, es inactiva en bacterias y algunos mamíferos en cuanto a mutación de genes, pero induce intercambios de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas *in vitro* e *in vivo*. La AA puede tener mecanismos genotóxicos indirectos, como la unión de proteínas o desequilibrio hormonal, lo que podría dar lugar a tumores. Así, el mecanismo genotóxico de AA no está claro todavía (Mei *et al.*, 2008).

Los principales efectos tóxicos de AA que se conocen son la neurotoxicidad en humanos y animales, así como la toxicidad para el desarrollo y reproductiva en los roedores y la genotoxicidad y carcinogenicidad en roedores. La neurotoxicidad de AA se conoce de intoxicaciones accidentales y de las

exposiciones ocupacionales crónicas (LoPachin y Gavin, 2012). Aunque principalmente se informaron neuropatías periféricas, existen otras partes del sistema nervioso que también se ven afectados, como el daño cerebral de las células de Purkinje y la degradación de los axones distales en el sistema nervioso central y sistema nervioso periférico. La degradación de los nervios terminales se ha informado que conduce a un deterioro de las funciones cognitivas y daños a la corteza cerebral, el tálamo y el hipocampo. La mayoría de los efectos neurotóxicos pueden ser reproducidos en estudios con animales (Parzefall, 2008).

2.6.-Estrategias para la Reducción de Acrilamida Dietaria

La producción de AA es el subproducto de la reacción de Maillard que es esencial para el color, el sabor, la textura y sabor de los alimentos (Ayvaz y Rodriguez-Saona, 2015). Por lo tanto, el gran reto es reducir AA en los alimentos tanto como sea posible sin perder sus rasgos de calidad o reducir su biodisponibilidad. Estudios previos han encontrado que muchos factores exógenos y endógenos juegan un papel importante en la formación de AA, por lo tanto, diferentes estrategias y métodos han sido desarrollados para mitigar AA en los alimentos con éxito que se resumen brevemente a continuación (Zhang y Zhang, 2007).

2.6.1.-Métodos Físicos

Los métodos físicos se desarrollan a través de cambios de parámetros de procesamiento de alimentos, centrándose principalmente en la temperatura, control de tiempo y el ajuste de humedad. Existe una relación temperatura-tiempo para la formación de AA en los alimentos, cambiando así la temperatura o la duración, afecta a la formación de AA (Gratz *et al.*, 2006). En la mayoría de los casos, al aumentar la temperatura, aumenta la formación de AA. Por lo tanto, la

reducción de la temperatura o la duración en el proceso de freído de las papas fritas reduce significativamente los niveles de AA en alrededor de 90%. Sin embargo, la formación de AA alcanza su nivel más alto antes de que el café alcance la temperatura a la que se tuesta, por lo tanto, los niveles de AA en el café tostado oscuro son menos que el café tostado medio, debido al proceso de eliminación de AA por evaporación o degradación a alta temperatura, combinada con una condición prolongada de tiempo de calentamiento (Doroshenko *et al.*, 2009). Por lo tanto la capacidad de reducir los niveles de AA a través del control de la temperatura y la duración del procesamiento de alimentos depende en gran medida de las especies de alimentos (Friedman y Levin, 2008).

Por otro lado, Capuano y Fogliano (2011) encontraron que en los alimentos ricos en grasas, el contenido inicial de agua es un factor decisivo para determinar la formación de AA final porque el perfil de tiempo-temperatura durante el calentamiento, se puede cambiar notablemente cuando está presente una cantidad de agua diferente. Estos resultados indicaron efectos diferentes de la actividad de agua en la formación de productos de Maillard y AA. Por lo tanto, la reducción del contenido de agua inicial puede ayudar a reducir la formación de AA en los alimentos ricos en grasas, mientras que el mantenimiento de un cierto nivel de humedad sería bueno para la reducción de AA en los alimentos secos (De Vleeschouwer *et al.*, 2010).

2.6.2.-Métodos Químicos

Existen varios tratamientos previos que extraen aminoácidos libres y azúcares que participan en la formación de AA, y por lo tanto, contribuyen a la reducción de los niveles de AA en los alimentos. Uno de los métodos químicos más exitosos para la reducción de AA es la adición de aminoácidos distintos a asparagina, tales como glutamina, alanina, lisina, glicina, cisteína. Probablemente la reducción de AA se debe al consumo competitivo de precursores y/o aumento de la eliminación/degradación. El remojo (inmersión) de

masa de harina de trigo y de patatas rebanadas, antes del procesamiento en soluciones de glicina o lisina reduce significativamente el nivel de AA en el alimento elaborado (Gökmen *et al.*, 2009).

Además, la inmersión de tiras de patata en una solución de asparagina se ha utilizado con éxito para reducir la formación de AA hasta en un 60-90%. El pH interno de un alimento gobierna la formación de AA, por lo tanto, el aumento de acidez por debajo de pH 6 mediante la inmersión de patatas fritas en tampones ácidos, tales como tampones de fosfato y citrato, se puede utilizar para disminuir la formación de AA en los alimentos (Lipworth *et al.*, 2013).

2.6.3.-Métodos Biológicos

Estudios previos han encontrado que los niveles de aminoácidos libres y azúcares reductores están bajo control genético, por lo tanto, existen variaciones naturales en los niveles de azúcares y aminoácidos libres entre diferentes especies de alimentos y dentro de incluso los diferentes cultivares de la misma especie de alimentos (Halford *et al.*, 2012). Por lo tanto, tratar el cultivo genéticamente, puede servir para lograr concentraciones más bajas de asparagina libre y azúcares reductores, lo cual llevaría a contribuir de manera significativa a la mitigación de AA en los alimentos.

Esto se puede hacer a través de técnicas de ingeniería genética, ya que se han identificado y especificado los genes que participan en la formación y degradación de asparagina, y aquellos implicados en el metabolismo de los hidratos de carbono (Bhaskar *et al.*, 2010).

En los últimos años, se ha estudiado el uso de microorganismos como estrategia para la reducción de acrilamida dietaria. Por lo que se han explorado diferentes cepas específicas de BAL (Tabla 2) que poseen la propiedad de

eliminar en medio acuoso algunos contaminantes toxigénicos presentes en los alimentos a través de mecanismos físicos (Iamanaka *et al.*, 2007).

Serrano-Niño *et al.* (2014) realizaron un estudio *in vitro*, en el cual evaluó la capacidad de diferentes cepas de *Lactobacillus* para remover AA (5 µg/mL), y por lo tanto determinar la factibilidad de bacterias lácticas para ejercer un potencial papel protector contra la AA contaminante de los alimentos. Los autores evaluaron catorce cepas (*Lactobacillus casei* Shirota (SHI), *Lactobacillus reuteri* (LR), *Lactobacillus johnsonii* ATCC 3200 (JH), *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4796 (AC), *Lactobacillus fermentum* ATCC 11976 (FER), *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 13075 (RHA), *Lactobacillus helveticus* ATCC 27558 (HL), *Lactobacillus casei* ATCC 334 (L334), *Lactobacillus casei* L9 (L9), *Lactobacillus casei* L30 (L30), *Lactobacillus casei* 12A (12A), *Lactobacillus casei* 21/1 (L21/1), *Lactobacillus casei* 7R1 (7R1), y *Lactobacillus casei* DPC 3968 (DPC)). Los resultados mostraron que *Lactobacillus reuteri* NRRL 14171 y *Lactobacillus casei* Shirota, exhibieron la mayor capacidad de remover AA, con 13.38 y 16.19%, respectivamente.

Por otra parte, Rivas *et al.* (2015) evaluaron la capacidad de *Lactobacillus reuteri* NRRL14171 y *Lactobacillus casei* Shirota para remover acrilamida bajo condiciones gastrointestinales simuladas en un sistema dinámico. Los resultados del trabajo permitieron concluir que ambas bacterias removieron AA bajo las diferentes condiciones gastrointestinales simuladas, siendo *Lactobacillus casei* Shirota la más efectiva (ca. 70 %). Además se determinó que $\geq 10^6$ UFC/mL son suficientes para la remoción de AA. La cepa de *Lactobacillus reuteri* mostró ser la bacteria más sensible al proceso digestivo con una pérdida de viabilidad de entre 3-5 ciclos logarítmicos. En general ambas bacterias perdieron mayor viabilidad en condiciones de ayuno; sin embargo, al final de ambos procesos las bacterias sobrevivieron en concentraciones suficientes para remover la AA.

En general todas las bacterias probadas demostraron tener una rápida y eficaz unión a AA. Por lo tanto, estas bacterias podrían ser un mecanismo eficaz de descontaminación transmitida por AA a los alimentos a lo largo del tracto gastrointestinal. Sin embargo, se requieren estudios adicionales en matrices alimentarias y modelos animales que permitan comprender plenamente el potencial de las BAL para reducir la absorción de AA *in vivo* bajo exposición crónica a la AA.

2.7.-Mecanismo de Acción de las BAL

Cepas específicas de bacterias ácido lácticas (BAL), se han sugerido como un medio para la eliminación de contaminantes de los alimentos mutagénicos a través de mecanismos físicos. Otros estudios han informado que ciertos lactobacilos y las bifidobacterias son capaces de eliminar sustancias tóxicas de soluciones líquidas mediante la unión de la AA (Corthier, 2004).

Algunos autores han sugerido que la sustancia tóxica se une predominantemente a los polisacáridos y peptidoglicanos de la pared celular bacteriana. Otros investigadores han demostrado la unión efectiva de mutágenos por las células intactas o por fracciones del esqueleto de la pared celular (Lahtinen *et al.*, 2004). Sin embargo, nueva evidencia sugiere que los ácidos teicoicos (ATs) podrían ser componentes importantes que intervienen en la unión de las sustancias tóxicas. La estructura y la composición de ATs de la pared bacteriana, a menudo tienen estructuras muy variables (polímeros de ribitol o glicerol unidos por enlaces fosfodiéster con sustituciones de aminoácidos o azúcares), contribuyen a la carga negativa de la pared celular y pueden proporcionar soporte estructural. Además desempeñan un papel clave en los procesos de adhesión a las células del huésped (Weidenmaier y Peschel, 2008).

Serrano-Niño *et al.* (2015) realizó un estudio para evaluar la capacidad de catorce cepas de *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus johnsonii*) para remover acrilamida y determinar la composición de los ácidos teicoicos, con el fin de proponer las posibles interacciones moleculares entre la AA y los ATs.

Los resultados obtenidos demostraron que la remoción de AA fue cepa-dependiente. Además, se encontró una correlación significativa ($p < 0,05$) entre el porcentaje de remoción de AA y el contenido de algunos componentes de los ATs. También se demostró que la glucosa, D-alanina y el ácido teicoico tienen afinidad hacia la acrilamida. Los autores plantearon la hipótesis de que el oxígeno del grupo carboxilo de la AA, podría estar involucrado en las interacciones entre la AA y los grupos hidroxilo de glucosa o glicerol de los ATs.

Tabla 2. Remoción de compuestos toxigénicos por bacterias ácido lácticas (BAL)

Bacteria	Condiciones	Resultados	Referencia
<i>L. casei</i> Shirota <i>L. reuteri</i> <i>L. johnsonii</i> ATCC 3200 <i>L. acidophilus</i> ATCC 4796 <i>L. fermentum</i> ATCC 11976 <i>L. rhamnosus</i> ATCC 13075 <i>L. helveticus</i> ATCC 27558 <i>L. casei</i> ATCC 334, L9, L30, 12A, 21/1, 7R1 y DPC 3968	Conc. Celular: 1– 2×10 ⁹ CFU/mL. AA (5 y 10 µg/mL) Incubación: 0, 4 y 12 h a 37°C	Capacidad de fijación fue de 11.89-29.12%. Concentración y cepa dependiente <i>Lactobacillus reuteri</i> y <i>Lactobacillus casei</i> Shirota fueron las más eficientes (24,01 y 24,95%, respectivamente) después de 12 h de incubación utilizando una concentración de acrilamida de 5 mg / ml.	Serrano-Niño, et al. (2014)
<i>L. casei</i> ATCC334	Conc. celular: 3-5x10 ⁹ UFC/mL Óxidos de colesterol (0.148-0.204 µg/mL) Incubación: 20h, 37°C	30-60 % fijación 7-KC > 7a-OH/7b- OH > triol > 5,6b-EP > 5,6a-EP > 25- OH Fijación parcialmente reversible Fijación a la pared celular y/o incorporación a la membrana	Machorro- Mendez et al. (2013)
<i>L. reuteri</i> NRRL14171	Conc. celular: 5x10 ⁸ UFC/mL x día x 7 días AFB ₁ (0.14 mg/ cada 3 días x 21 días Ratas macho Wistas; administración oral	La cepa fue capaz de ligar la AA, principalmente en el duodeno Se redujeron significativamente los niveles de AFB ₁ en sangre, lo que evidencia reducción de la bioaccesibilidad de la AA.	Hernandez- Mendoza, et al. (2011)
<i>L. casei</i> spp.	Conc. celular: 2-3 x10 ⁹ UFC/mL AFB ₁ (4.6 µg/mL) Tratamiento con Sales biliares: 0.05%, 0.10%, 0.15%, 20 h a 37°C Incubación: 4 h, 37 °C	14- 49% de fijación (<i>L. casei</i> L 30 > %) La exposición a sales biliares (0.05%) aumento la capacidad de fijación de todas las cepas. Los resultados sugieren que estas cepas podrían reducir la biodisponibilidad de AFB ₁ en condiciones intestinales.	Hernández- Mendoza et al. (2009)

UFC: Unidades formadoras de colonia

III.-HIPÓTESIS

Cepas específicas del género *Lactobacillus* pueden ejercer un efecto protector contra los efectos tóxicos de la acrilamida al reducir su biodisponibilidad en un modelo murino.

IV.-OBJETIVOS

4.1.-General

Evaluar la capacidad de *Lactobacillus reuteri* NRRL14171 y *Lactobacillus casei* Shirota para reducir la absorción intestinal de acrilamida y reducir los efectos tóxicos *in vivo* en un modelo murino.

4.2.-Específicos

1. Evaluar el efecto de fijación de acrilamida, sobre las propiedades de agregación e hidrofobicidad de *L. reuteri* y *L. casei* Shirota.
2. Evaluar el efecto de fijación de acrilamida, sobre la capacidad de adhesión de *L. reuteri* y *L. casei* Shirota a mucosa intestinal de rata.
3. Evaluar el efecto de *L. reuteri* y *L. casei* Shirota sobre la absorción intestinal de la acrilamida en un modelo murino.
4. Determinar la capacidad de *L. reuteri* y *L. casei* Shirota para reducir el porcentaje basal de lipo-peroxidación plasmática inducida por la acrilamida. Así como aumentar el nivel de glutatión y la actividad de la glutatión peroxidasa en plasma e hígado.

V.-MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo experimental del presente estudio fue aprobado por el comité de ética del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.), en Hermosillo, Sonora (ANEXO 1).

Como medidas de bioseguridad y salud ocupacional para el cuidado y uso de los animales de laboratorio, se tomaron sesiones de capacitación sobre los procedimientos rutinarios de trabajo de acuerdo a lo especificado en la NOM-062-ZOO (1999). Así mismo, se tomaron las medidas necesarias para conocer los riesgos a los que se estaría expuesto, y las salvaguardas requeridas para la respectiva protección, manejo de productos de desecho, higiene personal y medicina preventiva en el área de trabajo. Se implementaron rutinas de lavado de manos y cambio de ropa con la frecuencia necesaria para mantener constante la limpieza e higiene personal. La ropa de trabajo fue específica para su uso en el área de los animales. Cuando fue necesario se realizó la descontaminación de la ropa utilizada antes de someterla a lavado. Además, se utilizó el equipo de protección personal apropiado como guantes desechables y batas (NOM-062-ZOO, 1999).

5.1.-Cultivos bacterianos y propagación

Las cepas de *Lactobacillus reuteri* NRRL14171 y *Lactobacillus casei* Shirota que se emplearon en este trabajo pertenecen a la colección de bacterias ácido

lácticas del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, Hermosillo, México).

Para cada bacteria se realizaron dos sub-cultivos con el fin de obtener concentraciones celulares apropiadas previo a cada experimento. Ambos sub-cultivos involucraron un inóculo del 1% incubados a 37 °C durante 12 y 8 h, respectivamente. Del segundo sub-cultivo, se tomó una alícuota (1%) y se adicionó en 500 mL de medio MRS (pH 6) contenido en un frasco de policarbonato (Pyrex®), se dejó incubar durante 20 h a 37°C sin agitación. Las bacterias fueron recuperadas por centrifugación (3600 g, 10 min, 10°C), y el paquete bacteriano obtenido se lavó dos veces con una solución amortiguadora de fosfato salino (PBS, pH 7.2). Finalmente, el paquete bacteriano (10^9 UFC/mL) fue resuspendido en 20 mL de PBS estéril. Un mililitro de esta suspensión se utilizó para llevar a cabo el experimento con el modelo murino.

5.2.-Solución de Trabajo de Acrilamida

Una solución madre de acrilamida (AA) fue preparada disolviendo 0.05 g de AA grado electroforesis (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) en 100mL de agua mili-Q. Posteriormente, se prepararon diferentes soluciones de trabajo (5,10,80 mg/mL) diluyendo la solución madre de acuerdo a lo propuesto por Serrano-Niño *et al.* (2015).

5.3.-Evaluación del Efecto de la Fijación de AA sobre las Propiedades de Agregación e Hidrofobicidad de las Bacterias

El ensayo de fijación de AA por las bacterias se llevó a cabo siguiendo el procedimiento reportado por Serrano-Niño *et al.* (2014) con ligeras modificaciones. Un mL de cada cultivo activo preparado como se describió anteriormente se centrifugaron (3600 g, 10min, 10°C), los paquetes bacterianos

se lavaron dos veces con 1 mL de agua bidestilada estéril y luego se suspendieron en PBS (5 mM, pH 7.2) hasta llegar a una $DO_{600nm} = 0.8$. Una alícuota (1 mL) de la suspensión ajustada se centrifugó; se recuperaron células las cuales fueron resuspendidas en el mismo volumen de la solución de trabajo y se incubaron durante 4 h a 37°C. Para cada cepa, se incubó también un control de bacterias (bacterias suspendidas en PBS sin AA). Después de la incubación, las células se separaron por centrifugación y luego se resuspendieron en el mismo volumen de PBS para la evaluación de las propiedades de agregación e hidrofobicidad como se describe a continuación.

5.3.1.-Evaluación de la Habilidad de Autoagregación y Coagregación de las Bacterias Lácticas

Los ensayos de autoagregación y coagregación se realizaron usando bacterias con y sin AA fijada, siguiendo los métodos reportados por Reniero *et al.* (1992) y Collado *et al.* (2007a), respectivamente.

Las propiedades de agregación se determinaron después de 2 y 4 h de incubación a 37°C. El porcentaje de autoagregación (%A) se expresó como $(\%A) = 1 - (ATF/A0) \times 100$, donde ATF representa la absorbancia en el tiempo t (2 o 4 h) y A0 la absorbancia a t = 0.

El ensayo de coagregación se realizó entre *L. casei* Shirota y *L. reuteri*. El porcentaje de coagregación (%CoA) se calculó de acuerdo a la ecuación descrita por Cheng *et al.* (2014), a saber, $\%CoA = ((A + B) / 2 - C) / ((A + B) / 2) \times 100$, donde la cepa control representa la $DO_{600 nm}$ de la bacteria *L. casei* Shirota medida en el tiempo t. B representa la $DO_{600 nm}$ medida al mismo tiempo t que la cepa control de la *L. reuteri*. C representa la $DO_{600 nm}$ medida para la mezcla de suspensión de ambas cepas después del mismo período.

5.3.2.-Determinación de la Hidrofobicidad de la Superficie Celular

Los cultivos de células con y sin AA se prepararon como se ha descrito anteriormente. Posteriormente las cepas se centrifugaron, se lavaron dos veces y se resuspendieron a una $DO_{600nm} = 0.8$ (A0) con PBS. Una parte de la alícuota (3 mL) de las suspensiones bacterianas se transfirió a otro tubo y se añadió 0.4 mL de xileno. Los tubos se mezclaron durante 2 min, y la fase de hidrocarburos se dejó separar incubando 2 ó 4 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la fase acuosa fue cuidadosamente retirada y se registró su DO_{600nm} (A1). El porcentaje de hidrofobicidad (H%) se calculó como $H\% = [(A0-A1 / A0)] \times 100$. El xileno fue elegido como un disolvente no polar, ya que refleja la hidrofobicidad de la superficie celular y de hidrofiliidad (Kos *et al.*, 2003).

5.4.-Efecto sobre la Capacidad de Adhesión de las Bacterias a Mucosa Intestinal

5.4.1.-Obtención de Mucosa Intestinal

Con el fin de obtener una cantidad suficiente y homogénea de mucosa intestinal se utilizaron 6 ratas macho Wistar (250 ± 20 g) que se adquirieron en la empresa BioInvert®, México. Los animales fueron alojados individualmente en jaulas de acero inoxidable bajo condiciones estándar de humedad (40-50%), temperatura (21 ± 2 °C) y ciclos de 12 h luz/oscuridad. Los animales fueron alimentados con una dieta convencional en pellets (Rodent Laboratory Chow 5001, PMI Nutrition International LLC, MO, USA) y agua *ad libitum*. Después de 5 días de adaptación, las ratas fueron eutanizadas e inmediatamente después se recuperó la porción del intestino delgado comprendida por el duodeno, yeyuno e íleon. Para obtener la mucosa, se utilizó la técnica de raspado intestinal reportada por Pedroso *et al.* (2006). Para ello, primero se realizó un lavado del lumen intestinal con PBS estéril frío (pH 7.3) con la finalidad de eliminar cualquier

residuo alimenticio. Posteriormente, se realizó una incisión longitudinal del segmento intestinal y se raspó la superficie epitelial con una micro-espátula estéril. El raspado intestinal colectado de las 6 ratas fue suspendido con PBS estéril frío (pH 7.3) y se homogeneizó (200 rpm) durante 30 s. Posteriormente, el homogeneizado fue centrifugado (12,000 g, 30 min, 4 °C) y la materia insoluble fue descartada. La mucosa fue precipitada a partir del sobrenadante con etanol frío, esta operación se repitió dos veces. La mucosa precipitada fue recuperada por centrifugación y resuspendida en agua ultra pura para posteriormente ser liofilizada (Sun *et al.*, 2007).

5.4.2.-Ensayo de Adhesión a la Mucosa Intestinal

La mucosa intestinal obtenida previamente, fue utilizada para recubrir la superficie de placa de poliestireno para microensayos (96 pozos). Para ello, una porción del liofilizado fue disuelto con una solución amortiguadora de carbonato de sodio estéril (50mM, pH 9.7). Después, se dispensaron 150 µL de la solución en los micropozos y se incubó durante 12 h a 4°C. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se vació la placa por inversión y se adicionaron 200 µL de PBS estéril suplementado con Tween 20 preparado al 1 % (PBST). La placa se dejó reposar durante 1 h y posteriormente fue lavó con PBST y se dejó secar (Roos y Jonsson, 2002).

Posteriormente, 200 µL de la suspensión de bacterias con y sin AA fijada (preparadas en la sección 5.3) se adicionaron a los pozos de la microplaca y se incubaron durante 12 h a 4°C. Una vez transcurrido el periodo de incubación, las bacterias no adheridas a la mucosa fueron retiradas con 2 lavados con PBS, mientras que las bacterias que permanecieron adheridas a la mucosa de la microplaca fueron cuantificadas mediante la técnica de vaciado en placa. La adhesión de las bacterias con y sin AA a la mucosa intestinal fue expresada como porcentaje de la cuenta viable después de 12 h (UFC/mL₁₂) comparado con su

concentración en la suspensión inicial (UFC/mL₀), de acuerdo a lo reportado por Botes et al. (2008):

$$\% \text{ Adhesión} = [(UFC/mL_{12}) / (UFC/mL_0)] \times 100.$$

5.4.3.- Cuantificación de Acrilamida fijada *in vitro* por las bacterias

Una alícuota (1 mL) de los cultivos bacterianos suspendidos en PBS (sección 5.1) fueron recuperados por centrifugación (3600 g, 10 min, 10 °C) y se lavaron dos veces. Posteriormente se resuspendieron a una DO_{600nm} = 0.8 con PBS. El cultivo suspendido fue centrifugado (3600 g, 10 min, 10 °C). El paquete celular obtenido se resuspendió en 1.5 mL de las diferentes soluciones de trabajo de acrilamida y se incubó durante 4 h a 37 °C. Una vez transcurrido el respectivo periodo de incubación, las bacterias fueron separadas por centrifugación (5000 g, 10°C, 10 min) y una muestra del sobrenadante libre de células conteniendo la acrilamida no fijada fue recolectada y almacenada para su posterior análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El sistema cromatográfico utilizando consistió de una bomba desgasificadora en línea, un automuestreador y detector de arreglo de diodos (1100 series, Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Una alícuota (20 µL) de muestra fue inyectada y la separación se llevó a cabo en una columna analítica C18, 3 x 250-mm, tamaño de partícula de 5 µm (Waters®). Las muestras fueron eluidas con una fase móvil de ácido heptano sulfónico 5 mM en agua:metanol (99:1) a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. La detección se realizó ajustando a una longitud de onda de 200±8nm (referencia de 360±8nm). El área del pico fue determinada por integración y fue utilizada para calcular las concentraciones de la muestra por interpolación a partir de una curva estándar. La curva fue preparada utilizando estándares de acrilamida y glicidamida a diferentes concentraciones (0.1–100 µg/mL).

5.5.- Efecto de las Bacterias Ácido Lácticas sobre la Absorción Intestinal de la Acrilamida, el Porcentaje Basal de Lipo-peroxidación Plasmática y Niveles de Glutación y Glutación-S-Transferasa en un modelo murino

El modelo experimental se realizó utilizando 25 ratas macho Wistar con un peso de 100 ± 20 g (BioInvert®, México). Los animales fueron mantenidos bajo las siguientes condiciones: agua y alimento *ad libitum*, ciclos programados de 12 h luz/12 h oscuridad a una temperatura de 21 ± 2 °C y una humedad relativa de 50 ± 5 %.

Los animales permanecieron una semana sin manipulación para su aclimatación, posteriormente, las 25 ratas fueron divididas aleatoriamente en 5 grupos (n=5) como se muestra a continuación.

Grupo 1. Testigo negativo: dieta estándar (DIE) + Buffer de Fosfato Salino (PBS)

Grupo 2. Testigo positivo: DIE + Acrilamida

Grupo 3. DIE + Acrilamida + *Lactobacillus reuteri* NRRL14171

Grupo 4. DIE + Acrilamida + *Lactobacillus casei* Shirota

Grupo 5. DIE + Acrilamida + Glutación reducido (GSH)

El protocolo de inducción de toxicidad se realizó de acuerdo a la metodología descrita por (Janakat y Al-Merie, 2002). La administración de la acrilamida (50 mg/mL) y de las bacterias fue vía cánula orogástrica.

El grupo 1 (testigo) no recibió ningún tratamiento. Las ratas de los grupos 3 y 4 fueron implantadas con las respectivas bacterias 7 días previo al experimento (semana de implantación) administrando diariamente 1 mL de bacterias suspendidas en PBS (10^9 UFC/mL). Posterior a la semana de implantación, los grupos 3 y 4 fueron administrados con la acrilamida en subdosis, repartidas estratégicamente durante los días que duro el experimento. Así mismo, se

administró 1 mL de la suspensión de bacterias en días específicos durante el periodo experimental (Figura 4) con el objeto de que la concentración celular previamente implantada durante la semana de adaptación no disminuyera. El grupo 2 fue tratado administrando la AA en el número de subdosis descritos previamente para los grupos 3 y 4. Adicionalmente, el grupo 5 fue administrado con la AA y glutatión reducido (50 µg/kg de peso) (Figura 4).

Al inicio del experimento y cada tercer día, se registró el consumo de agua y de alimento, así como el peso corporal de cada rata. Además, a lo largo del periodo experimental se tomaron muestras sanguíneas por el método de corte de cola. El procedimiento consistió en limpiar la cola con etanol al 75 % y hacer un corte de 1-2 mm en la punta de la cola con unas tijeras quirúrgicas en ángulo perpendicular a la superficie de trabajo. Una vez colectado el volumen apropiado de muestra, se detuvo el sangrado aplicando un algodón con peróxido de hidrógeno sobre la herida. Al final del periodo experimental, los animales fueron eutanizados mediante cámara con cloroformo y se obtuvieron muestras de sangre e hígado.

Semana	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
1	← Adaptación →						
2	← Implantación (SI) →						
3	Muestra Dosis		Dosis		Dosis		Dosis
4		Dosis	Muestra	Dosis		Dosis	
5	Dosis		Dosis		Sacrificio Muestra		

SI = Semana de Implantación

Figura 4. Calendario experimental

A partir de las muestras de sangre y órganos se determinaron biomarcadores de exposición (acrilamida y glicidamina) por HPLC, y biomarcadores de susceptibilidad (daño de peroxidación lipídica, contenido de

glutación, glutación-S-transferasa y peroxidasa) por métodos espectrofotométricos (Figura 5).

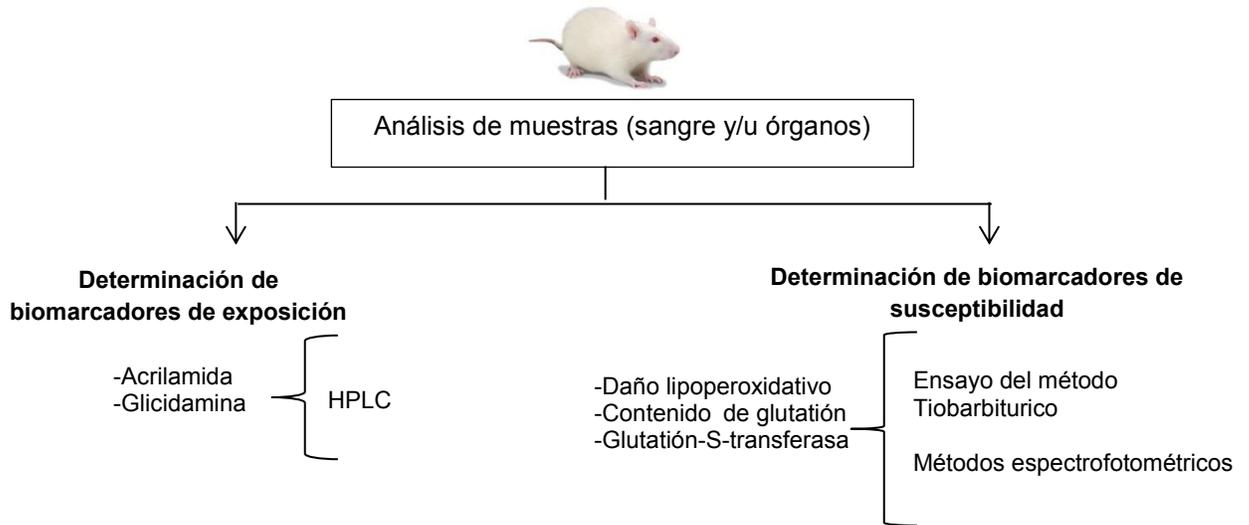


Figura 5. Diagrama de flujo del experimento

5.5.1.-Determinación de Glutación en Tejido Hepático

Los hígados fueron extirpados de los animales y se almacenaron en congelación (-80 °C) hasta su análisis. Muestras hepáticas (50 mg de tejido congelado) se descongelaron a 4 °C y se mezclaron 60 s con homogeneizador (Osterizer modelo 450-10, Sunbeam Mexicana, S.A. de CV, Mexico) agregando 10 mL/g de PBS (pH 7.2). Las mezclas se centrifugaron a 3600 g, durante 25 min a 4°C. El sobrenadante (homogeneizado) fue recuperado y procesado para su posterior determinación de glutación por espectrofotometría (Bouligand *et al.*, 2006).

5.5.2.-Determinación de Acrilamida y Glicidamina por HPLC en Plasma Sanguíneo

5.5.2.1.-Preparación de la muestra. Inmediatamente después de separar el plasma, se adicionan 300 μ L de acetonitrilo a 100 μ L de plasma y se mezclarán por 30 s con un vortex para precipitar las proteínas en la muestra. Después de la precipitación, las muestras fueron centrifugadas por 5 min a 12000 g y el sobrenadante fue removido. Los pellets resultantes fueron disociados y lavados adicionando 300 μ L de acetonitrilo, mezclando por 30 s, centrifugando por 2 min a 12000 g y colectando el sobrenadante. Los pellets fueron lavados dos veces de la misma manera. Los sobrenadantes reunidos se secaron al vacío a temperatura ambiente. Las muestras concentradas fueron reconstituidas con 100 μ L de agua destilada. Las muestras reconstituidas fueron filtradas a través de microfiltros de politetrafluoroetileno (0.22- μ m) y analizada por HPLC (Da Silva-Marinel et al., 2015).

5.5.2.2.- Determinación Cromatográfica. Los niveles de AA y glicidamina en las muestras obtenidas se determinó por HPLC bajo las condiciones descritas anteriormente. El área del pico fue determinado por integración y utilizado para calcular las concentraciones de la muestra por interpolación a partir de una curva estándar. La curva fue preparada utilizando estándares de acrilamida y glicidamida a diferentes concentraciones (0.1–100 μ g/mL). La recuperación de los valores se promedió en toda la concentración estándar. Los coeficientes de variación (C.V.) inter- e intra- ensayos se determinaron a partir de concentraciones medias calculadas y desviación estándar de cada estándar de diferentes días y dentro de un día, respectivamente.

5.5.3-Determinación de Peroxidación Lipídica en Plasma y Homogenizados de Tejido Hepático

Se mezclarán 0.5 mL de suero u homogenizado de hígado con 0.5 mL de solución salina y 0.5 mL de ácido tricloroacético al 25%. Posteriormente se centrifugaron a 2000 g por 20 min. Posteriormente, se tomó 1 mL del sobrenadante y se mezcló con 0.25 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA, 0.5%), y se calentó a 95°C por 1 h. Después de enfriarse la reacción, se determinó la

intensidad del color rosa del producto final a 532 nm. La concentración de malondialdehído (MDA) fue calculado de acuerdo a la siguiente formula:

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

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

5.5.4.-Determinación de la Actividad de Glutación-S-Transferasa (GTS) en Tejido Hepático

La actividad de la GST fue determinada espectrofotométricamente, mediante un kit comercial (Glutathione S-Transferase Assay Kit, Sigma-Aldrich). El kit utiliza 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB), el cual es adecuado para una amplia variedad de isoenzimas. Por la conjugación del grupo tiol del glutatión con el sustrato CDNB, hay un aumento en la absorbancia a 340 nm (Haghani *et al.*, 2016).

5.6.-Análisis Estadístico

Para las pruebas *in vitro* (autoagregación, hidrofobicidad, coagregación y adhesión a mucosa intestinal), se realizó un diseño completamente al azar y una ANOVA multifactorial con un arreglo factorial $3 \times 2 \times 2$ y para determinar diferencias significativas, se utilizó la comparación de medias de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$). Para los ensayos de modelo murino se realizó un diseño completamente al azar y una ANOVA de una vía y para la comparación de medias se utilizó LSD de Fisher ($p \leq 0.05$). El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico NCSS, 2007.

VI.-RESULTADOS

Los resultados de autoagregación mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las cepas sin AA con respecto a los diferentes períodos de incubación (Tabla 3). *L. casei* Shirota mostró el porcentaje más alto de autoagregación, tanto a las 2 como a las 4h (38.39 y 83.4%, respectivamente) de incubación. En general los resultados de autoagregación de las BAL en presencia de AA a las 4h de incubación, incrementaron 3 veces con respecto a las 2h, con excepción de *L. casei* Shirota con concentración de AA de 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que aumentó el doble; sin embargo, este fue el % más alto de autoagregación de las BAL con AA (Tabla 3). En cuanto a *L. reuteri* se observó que la presencia de AA no alteró su capacidad de autoagregación, ya que mantuvo un promedio de ca. 40% tanto en presencia como en ausencia de AA. Caso contrario ocurrió con *L. casei* Shirota, debido a que presentó una reducción en el % de autoagregación en presencia de AA. En general, *L. casei* Shirota mostró el mayor porcentaje de autoagregación (ca. 83%) después de ambos períodos de incubación. Además, se observó un efecto dependiente de la concentración, así como un efecto de interacción entre el tiempo de incubación y el tipo de bacteria ($p < 0.05$). Por lo que se puede decir que el mayor % de autoagregación se obtiene con *L. casei* Shirota a las 4h de incubación.

Tabla 3. Porcentaje de Autoagregación de BAL con y sin Acrilamida

Bacteria	Concentración AA (µg/mL)	A%	
		2h	4h
<i>L. reuteri</i>	5	12.62 ± 0.77 ^{Aa}	44.75 ± 6.89 ^{Ab}
	10	11.53 ± 0.35 ^{Aa}	40.23 ± 1.63 ^{Ab}
	80	17.83 ± 2.68 ^{Aa}	39.13 ± 0.76 ^{Ab}
<i>L. casei</i> Shirota	5	13.64 ± 3.41 ^{Aa}	52.73 ± 6.88 ^{Ab}
	10	13.49 ± 0.54 ^{Aa}	71.55 ± 15.38 ^{Ab}
	80	35.69 ± 9.05 ^{Aa}	67.55 ± 16.39 ^{Aa}
<i>L. reuteri</i>	-	17.31 ± 8.47 ^{Aa}	41.87 ± 8.65 ^{Ab}
<i>L. casei</i> Shirota	-	38.39 ± 9.35 ^{Aa}	83.40 ± 16.7 ^{Bb}

Los resultados se expresan en media y DE

AA: Acrilamida

A: Autoagregación

Literales mayúsculas indican diferencia significativa (<0.05) entre bacterias en un mismo

Literales minúsculas indican diferencia significativa (P<0.05) para una misma bacteria en los diferentes tiempos de incubación.

Por otro lado, los resultados de coagregación de BAL, no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) cuando los agregados bacterianos sin acrilamida fueron incubados 2 ó 4 h (Tabla 4). Adicionalmente, no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los agregados bacterianos con y sin acrilamida unida después de 2 h de incubación. Sin embargo, se observó un incremento (1.3 veces) cuando el agregado bacteriano fue expuesto a 10 mg/mL de AA, después de 4 h de incubación. En cuanto a la coagregación con bacterias patógenas, *L. casei* Shirota mostró los rangos más altos (con y sin AA fijada), con respecto a *L. reuteri*. Además, ambas bacterias, presentaron mayor porcentaje de coagregación con *Staphylococcus aureus* y menor % con *E. coli* y *Listeria monocytogenes* (Tablas 5 y 6).

Tabla 4. Porcentaje de Coagregación de BAL con y sin Acrilamida

Agregado bacteriano	Concentración AA (µg/mL)	CoA%	
		2h	4h
<i>L. reuteri</i> + <i>L. casei</i> Shirota	5	42.87 ± 2.78 ^{Aa}	43.39 ± 6.3 ^{Aa}
	10	42.28 ± 2.27 ^{Aa}	51.26 ± 2.32 ^{Aa}
	80	40.55 ± 4.73 ^{Aa}	39.07 ± 2.9 ^{Aa}
<i>L. reuteri</i> + <i>L. casei</i> Shirota	-	43.13 ± 2.71 ^{Aa}	39.52 ± 2.12 ^{Aa}

Los resultados se expresan en media ± DE. AA: Acrilamida; CoA: Coagregación.

Literales mayúsculas indican diferencia significativa (<0.05) entre bacterias en un mismo tiempo

Literales minúsculas indican diferencia significativa (P<0.05) para una misma bacteria en los diferentes tiempos de incubación.

Tabla 5. Porcentaje de Coagregación de *Lactobacillus casei* Shirota con Bacterias Patógenas, con y sin Acrilamida

<i>L. casei</i> Shirota sin AA	Rango (%)
S.a * > S.t > <i>E. coli</i> * > <i>Listeria</i> *	61 – 73
Bacteria + AA 5 µg/mL	
S.a * > S.t > <i>Listeria</i> * > <i>E. coli</i>	70 – 82
Bacteria+ AA 10 µg/mL	
S.a > S.t > <i>E. coli</i> * > <i>Listeria</i>	70 – 77
Bacteria + AA 80 µg/mL	
S.a * > <i>Listeria</i> * > <i>E. coli</i> * > S.t *	70 – 75

S.a: *Staphylococcus aureus*

S.t: *Salmonella* Typhimurium

Listeria: *Listeria monocytogenes*

E. coli: *Escherichia coli*

* Indica diferencia significativa entre bacterias (P <0.05)

Tabla 6. Porcentaje de Coagregación de *Lactobacillus reuteri* con Bacterias Patógenas, con y sin Acrilamida

<i>L. reuteri</i> sin AA	Rango (%)
S.t* > S.a*> <i>E. coli</i> *> <i>Listeria</i> *	40 – 53
Bacteria + AA 5 µg/mL	
S.a > S.t* > <i>E. coli</i> *> <i>Listeria</i> *	37 – 51
Bacteria + AA 10 µg/mL	
S.a* > S.t > <i>Listeria</i> * > <i>E. coli</i> *	42 – 54
Bacteria + AA 80 µg/mL	
S.t* > S.a> <i>E. coli</i> *> <i>Listeria</i> *	39 – 53

S.a: *Staphylococcus aureus*

S.t: *Salmonella* Typhimurium

Listeria: *Listeria monocytogenes*

E. coli:

* Indica diferencia significativa entre bacterias (P <0.50)

En cuanto a la evaluación de la hidrofobicidad de la superficie celular, los resultados mostraron que *L. reuteri* fue ca. 1.5 veces más hidrófoba que *L. casei* Shirota después de 2 h de incubación. Mientras que *L. casei* Shirota fue ca. 2 veces más hidrófoba que *L. reuteri* después de 4 h de incubación (Tabla 7). En cuanto a las bacterias con AA previamente fijada, ambas bacterias mostraron comportamientos similares a las diferentes concentraciones, presentando *L. casei* Shirota el menor %H, a las 2h y una concentración de AA de 10 µg/mL. Sin embargo, esta misma bacteria mostró el %H más alto, a las 4h de incubación y concentración de AA de 5 µg/mL. En ambas bacterias el % de hidrofobicidad (H) no fue afectado por las concentraciones de AA.

Tabla 7. Porcentaje de Hidrofobicidad de la Superficie Celular de BAL con y sin Acrilamida

Bacteria	Concentración AA ($\mu\text{g/mL}$)	H%	
		2h	4h
<i>L. reuteri</i>	5	14.67 \pm 1.95 ^{Aa}	36.05 \pm 0.06 ^{Ab}
	10	15.87 \pm 3.06 ^{Aa}	41.10 \pm 4.40 ^{Ab}
	80	15.91 \pm 10.82 ^{Aa}	40.42 \pm 3.07 ^{Aa}
<i>L. casei</i> Shirota	5	15.17 \pm 0.06 ^{Aa}	43.19 \pm 7.79 ^{Ab*}
	10	10.24 \pm 2.5 ^{Aa}	25.81 \pm 3.81 ^{Ab}
	80	19.93 \pm 1.22 ^{Aa}	34.26 \pm 4.20 ^{Ab}
<i>L. reuteri</i>	-	56.21 \pm 1.7 ^{Aa}	44.42 \pm 1.97 ^{Ab}
<i>L. casei</i> Shirota	-	38.60 \pm 1.69 ^{Aa}	55.37 \pm 0.28 ^{Ab}

AA: Acrilamida

H: Hidrofobicidad

Los resultados se expresan en media \pm DE

Literales mayúsculas indican diferencia significativa (<0.05) entre bacterias en un mismo tiempo

Literales minúsculas indican diferencia significativa (P<0.05) para una misma bacteria en los diferentes tiempos de incubación.

*Indica diferencia entre una misma bacteria con y sin acrilamida en un mismo tiempo (P < 0.05)

Con respecto al % de adhesión de las BAL a mucosa intestinal, ambas bacterias mostraron comportamientos similares, con y sin AA fijada, obteniendo *L. reuteri* el menor % de adhesión (62.8%), con una concentración de AA de 5 $\mu\text{g/mL}$; mientras que el % de adhesión más alto lo mostró *L. casei* Shirota (78%), en ausencia de AA (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de Adhesión de las BAL a Mucosa Intestinal

Bacteria	Concentración AA ($\mu\text{g/mL}$)	A%
		12h
<i>L. reuteri</i>	5	62.88 \pm 21.74
	10	73.17 \pm 10.75
	80	73.19 \pm 15.05
<i>L. casei</i> Shirota	5	73.39 \pm 10.59
	10	77.68 \pm 11.75
	80	72.61 \pm 15.31
<i>L. reuteri</i>	-	70.75 \pm 11.06
<i>L. casei</i> Shirota	-	78.03 \pm 13.12

Los resultados se expresan en medias \pm DE

No se encontraron diferencias significativas entre concentraciones en la misma bacteria, ni entre bacterias ($P > 0.05$)

AA: Acrilamida

A: Adhesión

Al evaluar el porcentaje de fijación de AA para *L. casei* Shirota y *L. reuteri*, mediante HPLC, se observó que ambas bacterias mostraron valores similares de fijación a la misma concentración de AA, así como una tendencia de disminución de la fijación a medida que incrementó la concentración de AA.

Tabla 9. Porcentaje de Fijación de AA

	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		
	5	10	80
<i>L. casei</i> Shirota	36.48 \pm 0.01	27.87 \pm 0.01	6.45 \pm 0.27
<i>L. reuteri</i>	35.35 \pm 0	27.14 \pm 0.01	6.29 \pm 1.15

Los resultados se expresan en % \pm DE

No se encontraron diferencias significativas entre concentraciones en la misma bacteria, ni entre bacterias ($P > 0.05$)

AA: Acrilamida

En cuanto al experimento en modelo murino, durante el periodo experimental, el grupo que presentó mayor aumento de peso ($p < 0.05$) fue el grupo control, seguido del grupo administrado con AA, sin embargo, los grupos restantes, no mostraron diferencia significativa entre ellos, ni con respecto al grupo experimental de AA. De igual manera el consumo de alimento fue mayor en el grupo control, así como en los grupos experimentales de AA + *L. casei* Shirota, AA + *L. reuteri* y AA + Glutación, siendo el grupo de AA, el que presentó menor consumo de alimento (Tabla 10).

Tabla 10. Registro de Peso y Consumo de Alimento durante el Experimento

	Control	AA	AA + <i>L. casei</i> Shirota	AA + <i>L. reuteri</i>	AA + Glutación
Peso corporal (g)	106.25 ± 8.12 ^a	80.03 ± 1.9 ^b	57.13 ± 13.01 ^b	44.8 ± 21.96 ^b	43.47 ± 11.2 ^b
Consumo de alimento (g)	454.36 ± 26.3 ^a	337.7 ± 20.15 ^b	346.67 ± 36.36 ^{ab}	322.35 ± 37.49 ^{ab}	367.16 ± 26.19 ^{ab}

Los resultados se expresan en medias ± DE
 Literales diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$)
 AA: Acrilamida

En cuanto a la peroxidación lipídica evaluada en plasma y tejido hepático, no se encontraron diferencias significativas entre grupos en los tres periodos evaluados en plasma (día 1, 10 y 20) e hígado (día 20), además los valores obtenidos fueron constantes desde el inicio al final del experimento, así como en plasma y tejido hepático (Tabla 11).

Tabla 11. Determinación de Peroxidación Lipídica

	Plasma ($\mu\text{g MDA/mL plasma}$)			Tejido hepático ($\mu\text{g MDA/g proteína}$)
	Inicial	Día 10	Día 20	Día 20
Control	1.71 \pm 0.03	1.79 \pm 0.05	1.30 \pm 0.09	1.26 \pm 0.02
AA	1.99 \pm 0.04	1.80 \pm 0.01	1.29 \pm 0.02	1.41 \pm 0.01
AA + <i>L. casei</i> Shirota	1.39 \pm 0.01	1.81 \pm 0.04	1.61 \pm 0.02	1.21 \pm 0.01
AA + <i>L. reuteri</i>	1.67 \pm 0.05	1.68 \pm 0.07	1.53 \pm 0.02	1.59 \pm 0.01
AA + Glutación	1.75 \pm 0.01	1.78 \pm 0.02	1.15 \pm 0.21	1.33 \pm 0.02

Los resultados se expresan en medias \pm DE

No se encontraron diferencias significativas entre grupos ($P>0.05$)

AA: Acrilamida

MDA: Malondialdehído

Al evaluar la actividad de glutación en hígado (día 20), se encontraron niveles bajos en todos los grupos de estudio no encontrándose diferencias significativas entre estos (Tabla 12).

Los resultados obtenidos evidenciaron que los grupos de las bacterias probióticas administradas (*L. casei* Shirota y *L. reuteri*) no mostraron mayor actividad de Glutación-S-Transferasa respecto al grupo control; además, no se mostró diferencia significativa al compararlo con los grupos de AA y AA + glutación (Tabla 12).

Tabla 12. Actividad de Glutación y Glutación-S-Transferasa

	Control	AA	AA + <i>L. casei</i> Shirota	AA + <i>L. reuteri</i>	AA + Glutación
Actividad de glutación ($\mu\text{g/g proteína}$)	0.015 \pm 0	0.017 \pm 0	0.015 \pm 0	0.015 \pm 0	0.016 \pm 0
Actividad de glutación-s-transferasa ($\mu\text{g/g proteína}$)	19.81 \pm 0.08 ^a	21.38 \pm 1.35 ^{ab}	23.81 \pm 1.29 ^b	23.70 \pm 0.85 ^b	22.95 \pm 0.88 ^{ab}

Los resultados se expresan en medias \pm Desviación Estándar

Literales diferentes indican diferencia significativa ($P<0.05$)

AA: Acrilamida

Al evaluar las concentraciones de acrilamida presentes en tejido hepático, no se encontró presencia de éste compuesto en el grupo control; en contraste, se encontraron las concentraciones más altas en el grupo de exposición a acrilamida, superando 2 veces al resto de los grupos experimentales, los cuales no mostraron diferencias significativas entre ellos. De igual manera, no se detectó la presencia de glicidamida en el grupo control; sin embargo, en el resto de grupos experimentales se observó la presencia de altas concentraciones de glicidamida, no presentando diferencias significativas entre grupos (Tabla 13).

Tabla 13. Concentraciones de Acrilamida y Glicidamida en Hígado

Hígado	Control	AA	AA + <i>L. casei</i> Shirtoa	AA + <i>L. reuteri</i>	AA + Glutación
Acrilamida (µg/g hígado)	-	3.03 ± 0.33 ^a	1.3 ± 0.07 ^b	1.36 ± 0.02 ^b	1.30±0.03 ^b
Glicidamida (µg/g hígado)	-	3.24 ± 0.19	3.40 ± 0.49	4.06 ± 0.38	3.40±0.22

Los resultados se expresan en medias ± Desviación Estándar

Literales diferentes indican diferencia significativa (P<0.05)

AA: Acrilamida

En cuanto a la presencia de acrilamida en plasma sanguíneo, no se detectó la presencia de ésta sustancia en ninguno de los grupos al inicio del experimento, de igual manera sucedió a lo largo del experimento en el grupo control. En el resto de los grupos experimentales, al día 10 se encontró la presencia de acrilamida, obteniendo las concentraciones más altas los grupos de AA + *L. reuteri* y AA + Glutación, no obstante, al final del experimento (día 20) estas concentraciones disminuyeron a la par del resto de los grupos, no encontrándose diferencia significativa entre ellos (Tabla 14). En el caso de glicidamida no se detectó al inicio del experimento y de igual manera el grupo control continuó con esta tendencia hasta el final del ensayo, sin embargo, en el día 10 se observó la presencia de éste compuesto en los cuatro grupos experimentales restantes, principalmente en los grupos de AA + *L. reuteri* y AA + glutación, aumentando ca.

40% con respecto al resto de grupos administrados con AA. Sin embargo, al final del experimento, éstas concentraciones disminuyeron, igualando al resto de los grupos experimentales (Tabla 15).

Tabla 14. Concentración de Acrilamida en Plasma

	Plasma ($\mu\text{g AA/mL plasma}$)		
	Inicial	Día 10	Día 20
Control	-	-	-
AA	-	1.87 \pm 0.02 ^a	1.95 \pm 0.01
AA + <i>L. casei</i> Shirota	-	1.86 \pm 0.01 ^a	1.93 \pm 0.01
AA + <i>L. reuteri</i>	-	3.11 \pm 0.42 ^b	1.89 \pm 0.01
AA + Glutación	-	3.07 \pm 0.13 ^b	1.93 \pm 0.01

Los resultados se expresan en medias \pm DE

Literales diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$)

AA: Acrilamida

Tabla 15. Concentración de Glicidamida en Plasma

	Plasma ($\mu\text{g GA/mL plasma}$)		
	Inicial	Día 10	Día 20
Control	-	-	-
AA	-	1.77 \pm 0.01 ^a	1.78 \pm 0.01
AA + <i>L. casei</i> Shirota	-	1.76 \pm 0.01 ^a	1.78 \pm 0.01
AA + <i>L. reuteri</i>	-	2.83 \pm 0.12 ^b	1.78 \pm 0.01
AA + Glutación	-	2.73 \pm 0.33 ^b	1.78 \pm 0.01

Los resultados se expresan en medias \pm DE

Literales diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$)

AA: Acrilamida

GA: Glicidamida

VII.-DISCUSIÓN

La agregación bacteriana se ha correlacionado con la adhesión, la cual se sabe es un requisito previo para la colonización de bacterias probióticas. Particularmente, la autoagregación parece ser necesaria para la adherencia a las células epiteliales intestinales, mientras que la coagregación con otras bacterias permite desplazar patógenos, interrumpe la formación de biopelículas y reduce la viabilidad del patógeno (Collado *et al.*, 2007b). Por lo tanto, la capacidad de autoagregación y coagregación, son propiedades deseables de los probióticos asociadas a sus efectos beneficiosos para la salud (García *et al.*, 2013). En el presente estudio se evaluó la autoagregación de cepas probióticas y parece desempeñar un papel fundamental en la adhesión al epitelio intestinal. La bacteria que mostró mejores resultados de esta propiedad en la presencia de acrilamida fue *L. casei* Shirota, lo que sugiere que esta bacteria tiene la capacidad de adherirse al epitelio intestinal y prevenir la absorción de la AA.

Por otro lado, la capacidad de coagregación entre las dos bacterias mostró porcentajes constantes entre las concentraciones de acrilamida y los tiempos de incubación. Por lo tanto, se puede sugerir que el consorcio formado por *L. casei* Shirota y *L. reuteri* puede desarrollar una barrera biológica y así reducir la absorción de este compuesto tóxico (Pizzolitto *et al.*, 2011). Además, estas bacterias mostraron altos porcentajes de coagregación con bacterias patógenas aún en presencia de AA. Esta característica de las bacterias es muy importante, ya que se sugiere que la capacidad de coagregación de las cepas de lactobacilos, podrían interferir con la capacidad de las especies patógenas para infectar al huésped, por lo cual pueden prevenir la colonización de estos patógenos. Además, durante la coagregación, cepas de lactobacilos pueden controlar el

microambiente alrededor de los patógenos e incrementar la concentración de sustancias inhibidoras excretadas (Kaewnopparat *et al.*, 2013).

Características de la superficie celular bacteriana como hidrofobicidad pueden afectar a las propiedades de agregación de bacterias (Vinderola y Reinheimer, 2003). Los resultados mostraron que el mayor porcentaje de hidrofobicidad se observó en bacterias sin acrilamida, esto puede ser debido a que esta sustancia tóxica es hidrofílica y el disolvente xileno que se utilizó refleja la hidrofobicidad de la superficie celular, por lo tanto, las bacterias al tener la presencia de acrilamida, disminuyen su hidrofobicidad (Masson *et al.*, 2007). De esta manera la AA puede influir en las propiedades de adhesión de las BAL; sin embargo, aún en presencia de AA, las bacterias son capaces de secuestrar la sustancia tóxica, por lo que pueden reducir la acumulación de dicha AA en el intestino, a través del aumento de la excreción de un complejo de acrilamida-bacterias. Se ha reportado que *L. casei* Shirota y *L. reuteri* tienen la capacidad de fijar AA a su pared celular, Serrano-Niño *et al.* (2014) reportó de un 11.89 - 29.12 % de fijación de AA en las bacterias ya mencionadas, valores muy parecidos a los encontrados en este estudio (6.29 – 36.48%). Por lo tanto, se puede deducir que la AA fijada a la bacteria, no afecta sus capacidades de agregación y adhesión a mucosa intestinal.

La acrilamida es un compuesto tóxico que al ser metabolizado a su epóxido glicidamida por medio del CYP2E1 hepático, causan efectos de tipo neurotóxico, carcinogénico, anti-reproductivo y genotóxico (Alkarim *et al.*, 2015). Esto ocasiona un desbalance en el estado redox, el cual es un mecanismo importante para la detoxificación de epóxidos. Por lo que antioxidantes como el glutatión y la enzima glutatión-S-Transferasa, juegan un papel muy importante para la eliminación de sustancias tóxicas como la acrilamida (Sen *et al.*, 2012).

El glutatión reducido es un antioxidante importante en plantas y animales mediante el mantenimiento de la reducción celular, debido a su fuerte capacidad

para donar electrones (Kaur y Bhatla, 2016). El glutatión se encuentra presente en todos los tipos de células vivas. El nivel intracelular de éste tripéptido varía en el crecimiento, estado nutricional y balance hormonal del organismo. Los tejidos como el hígado, normalmente contienen altos niveles de glutatión reducido. Sin embargo, en este ensayo los niveles de glutatión en hígado se mostraron disminuidos. Esto puede deberse a que el glutatión al conjugarse con acrilamida, la cual es una vía de detoxificación de éste compuesto (Sen *et al.*, 2012), se transforma en ácido mercaptúrico, el cual es excretado por la orina (Zhang *et al.*, 2015) y por lo tanto se detectaron bajas concentraciones en tejido hepático.

Lo anterior se puede reiterar ya que se observó mayor actividad (en todos los grupos excepto el control) de la enzima Glutatión-S-Transferasa, la cual participa en la conjugación del glutatión con la acrilamida. Además, la AA puede inducir una disminución de los niveles de glutatión en las células del hígado, que potencialmente puede dar lugar a estrés oxidativo, lo que lleva a una pérdida de la viabilidad celular, apoptosis o necrosis (Kovac *et al.*, 2015). Veenapani *et al.* (2010), sugirieron que después de una exposición aguda a AA, los hepatocitos son capaces de dañarse a partir de 24 mg de AA en adelante, mientras que Rawi *et al.* (2012), informaron de la degeneración y apoptosis, incluso en algunos hepatocitos después de la administración de 28 días de 15 mg/kg de peso corporal de AA. Esto junto con nuestros resultados, indica posibles efectos citotóxicos de AA en el hígado de ratas.

En cuanto a los niveles de acrilamida, la cual es metabolizada principalmente en el hígado, el grupo al cual se le administró exclusivamente AA, presentó las concentraciones más elevadas, ya que el resto de grupos, excepto el grupo control (PBS), recibieron glutatión, el cual como se mencionó anteriormente es un antioxidante que elimina sustancias tóxicas, y bacterias probióticas (*L. casei* Shirota y *L. reuteri*), las cuales de acuerdo a Serrano-Niño *et al.* (2014) tienen un efecto de fijación de AA con un % que va de 11.89 – 29.12, mediante el mecanismo de acción de los ácidos teicoicos, los cuales se

encuentran en la pared celular de las bacterias y se sugiere que el oxígeno del grupo carboxilo de la AA, podría estar involucrado en las interacciones entre la AA y los grupos hidroxilo de la glucosa o glicerol de los ácidos teicoicos, formando un enlace de tipo covalente. Lo cual es importante debido a que al ser un enlace fuerte, la AA queda fijada a la bacteria, siendo eliminada cuando ésta muera y sea excretada, evitando así su absorción y metabolización a glicidamida.

En este estudio la AA se encontró en niveles semejantes en todos los grupos experimentales, lo que indica que un porcentaje de AA fue absorbida y por tanto metabolizada en el hígado. Sin embargo, al haberse encontrado una mayor cantidad en el grupo experimental que sólo recibió AA, se sugiere que ésta AA que se encuentra en hígado, será metabolizada posteriormente a glicidamida, aumentando su concentración. Caso contrario sucederá en los grupos administrados con las bacterias probióticas y el glutatión, los cuales mostraron niveles menores de AA y por tanto no se incrementará la concentración de glicidamida, evitando así los efectos tóxicos de estos compuestos. En cuanto a los niveles de AA y glicidamida en plasma, los valores obtenidos fueron concentraciones muy bajas, esto se explica ya que la absorción o excreción de AA es muy rápida (2h) y es excretada en forma de ácidos mercaptúricos conjugados, por lo cual en este estudio no pudo ser detectada, ya que las tomas de sangre, no se hicieron inmediatamente después de la administración de AA (Kocadağlı y Gökmen, 2016). Por lo cual se sugiere que, en estudios futuros, se tomen consideraciones como esta, para obtener mejores resultados.

Los hallazgos encontrados sobre la influencia de la AA en hígado, son apoyados por la pérdida de peso total detectado en todas las ratas que recibieron esta sustancia. Las medidas del peso corporal mostraron que todas las ratas que recibieron AA, fueron perdiendo peso continuamente, acentuándose ésta pérdida en el grupo que sólo recibió AA, caso contrario sucedió con el grupo control que continuamente incrementó su peso. Estos resultados coinciden con estudios previos que reportan que la AA induce pérdida de peso tanto en ratas macho

como hembra (Park *et al.*, 2010; Raju *et al.*, 2011; Sharma y Jain, 2008). Así mismo Wang *et al.* (2010), relaciona la AA con efectos perturbadores en el crecimiento y desarrollo de ratas macho.

VIII.-CONCLUSIÓN

Los hallazgos reportados en este estudio en los ensayos *in vitro*, sugieren que las cepas de *L. casei* Shirota y *L. reuteri*, aún en presencia de acrilamida, poseen alto potencial para adherirse y colonizar el intestino, formando una barrera biológica. Gracias a estas propiedades, se sugiere que una vez adheridas al intestino, podrían reducir la absorción de AA, al fijar esta sustancia en su pared celular, mediante interacción con los ácidos teicoicos. Por lo tanto, se podría evitar la metabolización a su epóxido glicidamida y consecuentemente reducir los efectos tóxicos que se le atribuyen a la acrilamida.

Sin embargo en modelo murino, las BAL no presentaron efectos tan significativos en cuanto a la inhibición de la absorción de acrilamida, por lo que se sugiere realizar otros estudios probando diferentes concentraciones de acrilamida, evaluando otros biomarcadores toxicológicos, aumentando el número de animales por tratamiento, así como el tiempo de exposición a esta sustancia tóxica y posteriormente realizar un estudio en humanos, para así poder confirmar o rechazar la teoría del efecto de inhibición de la absorción de acrilamida de las bacterias probióticas.

IX.-REFERENCIAS

- Alkarim, S., ElAssouli, S., Ali, S., Ayuob, N., y ElAssouli, Z. (2015). Effects of low dose acrylamide on the rat reproductive organs structure, fertility and gene integrity. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(3), 179-187.
- Aureli, F., Di Pasquale, M., Lucchetti, D., Aureli, P., y Coni, E. (2007). An absorption study of dietary administered acrylamide in swine. *Food and Chemical Toxicology*, 45(7), 1202-1209.
- Ayvaz, H., y Rodriguez-Saona, L. E. (2015). Application of handheld and portable spectrometers for screening acrylamide content in commercial potato chips. *Food Chemistry*, 174, 154-162.
- Bhaskar, P. B., Wu, L., Busse, J. S., Whitty, B. R., Hamernik, A. J., Jansky, S. H., Buell, C. R., Bethke, P. C., y Jiang, J. (2010). Suppression of the vacuolar invertase gene prevents cold-induced sweetening in potato. *Plant Physiology*, 154(2), 939-948.
- Bonazzi, C., y Dumoulin, E. (2011). *Modern Drying technology* Vol. 3. E. Tsotsas y A. Mujumdar (Eds.), *Quality changes in food materials as influenced by drying processes* (pp. 430).
- Bouligand, J., Deroussent, A., Paci, A., Morizet, J., y Vassal, G. (2006). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay of reduced and oxidized glutathione and main precursors in mice liver. *Journal of Chromatography B*, 832(1), 67-74.
- Burel, S. D., Favrot, M. C., Fremy, J. M., Massimi, C., Prigent, P., Debongnie, L. P., y Morgavi, D. (2012). Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. *EFSA Journal*, 10(10), 2938-2976.

- Capuano, E., y Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 44(4), 793-810.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., y Salminen, S. (2007a). Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: in vitro evaluation of different methods. *Journal of microbiological methods*, 71(1), 71-74.
- Collado, M. C., Surono, I., Meriluoto, J., y Salminen, S. (2007b). Indigenous Dadih Lactic Acid Bacteria: Cell-Surface Properties and Interactions with Pathogens. *Journal of food science*, 72(3), M89-M93.
- Corthier, G. (2004). The health benefits of probiotics. *Danone Nutritopics*, 29, 1-18.
- Cheng, Z., Meng, X., Wang, H., Chen, M., y Li, M. (2014). Isolation and characterization of broad spectrum coaggregating bacteria from different water systems for potential use in bioaugmentation. *PloS one*, 9(4).
- Da Silva-Marineli, R., Lenquiste, S. A., Moraes, É. A., y Maróstica, M. R. (2015). Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in diet-induced obese rats. *Food Research International*, 76, 666-674.
- De Vleeschouwer, K., Van der Plancken, I., Van Loey, A., y Hendrickx, M. E. (2010). The effect of high pressure– high temperature processing conditions on acrylamide formation and other maillard reaction compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(22), 11740-11748.
- Doroshenko, O., Fuhr, U., Kunz, D., Frank, D., Kinzig, M., Jetter, A., Reith, Y., Lazar, A., Taubert, D., y Kirchheiner, J. (2009). In vivo role of cytochrome P450 2E1 and glutathione-S-transferase activity for acrylamide toxicokinetics in humans. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(2), 433-443.
- Friedman, M., y Levin, C. E. (2008). Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6113-6140.

- García, C., Tomás, Korany, A. M., Bustos, I., Peláez, C., Requena, T., y Martínez, C., M Carmen. (2013). Capacidad de adhesión de cepas de *Lactobacillus plantarum* con fenotipo de agregación. Available at: <http://hdl.handle.net/10261/114964>.
- Gökmen, V., Morales, F. J., Ataç, B., Serpen, A., y Arribas-Lorenzo, G. (2009). Multiple-stage extraction strategy for the determination of acrylamide in foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(2), 142-147.
- Gratz, S., Täubel, M., Juvonen, R., Viluksela, M., Turner, P., Mykkänen, H., y El-Nezami, H. (2006). *Lactobacillus rhamnosus* strain GG modulates intestinal absorption, fecal excretion, and toxicity of aflatoxin B1 in rats. *Applied and environmental microbiology*, 72(11), 7398-7400.
- Haghani, K., Bakhtiyari, S., y Mohammadpour, J. D. (2016). Alterations in Plasma Glucose and Cardiac Antioxidant Enzymes Activity in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Effects of *Trigonella foenum-graecum* Extract and Swimming Training. *Canadian journal of diabetes*, 40(2), 135-142.
- Haiser, H. J., y Turnbaugh, P. J. (2013). Developing a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Pharmacological Research*, 69(1), 21-31.
- Halford, N. G., Curtis, T. Y., Muttucumar, N., Postles, J., Elmore, J. S., y Mottram, D. S. (2012). The acrylamide problem: a plant and agronomic science issue. *Journal of experimental botany*, 63(8), 2841-2851.
- Hariri, E., Abboud, M. I., Demirdjian, S., Korfali, S., Mroueh, M., y Taleb, R. I. (2015). Carcinogenic and neurotoxic risks of acrylamide and heavy metals from potato and corn chips consumed by the Lebanese population. *Journal of Food Composition and Analysis*, 42, 91-97.
- Iamanaka, B. T., de Menezes, H. C., Vicente, E., Leite, R. S., y Taniwaki, M. H. (2007). Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. *Food Control*, 18(5), 454-457.
- Janakat, S., y Al-Merie, H. (2002). Optimization of the dose and route of injection, and characterisation of the time course of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 48(1), 41-44.

- Jin, F., LIANG, C. L., JIA, X. D., y Ning, L. (2014). Immunotoxicity of Acrylamide in Female BALB/c Mice. *Biomedical and Environmental Sciences*, 27(6), 401-409.
- Kaewnopparat, S., Dangmanee, N., Kaewnopparat, N., Srichana, T., Chulasiri, M., y Settharaksa, S. (2013). In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Anaerobe*, 22, 6-13.
- Katen, A. L., y Roman, S. D. (2015). The genetic consequences of paternal acrylamide exposure and potential for amelioration. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 777, 91-100.
- Kaur, H., y Bhatla, S. C. (2016). Melatonin and nitric oxide modulate glutathione content and glutathione reductase activity in sunflower seedling cotyledons accompanying salt stress. *Nitric Oxide*, 59, 42-53.
- Keramat, J., LeBail, A., Prost, C., y Soltanizadeh, N. (2011). Acrylamide in foods: chemistry and analysis. A review. *Food and bioprocess technology*, 4(3), 340-363.
- Kocadağlı, T., y Gökmen, V. (2016). Chapter 6 - Metabolism of Acrylamide in Humans and Biomarkers of Exposure to Acrylamide *Acrylamide in Food* (pp. 109-128): Academic Press.
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., y Matošić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of applied microbiology*, 94(6), 981-987.
- Kovac, R., Rajkovic, V., Koledin, I., y Matavulj, M. (2015). Acrylamide alters glycogen content and enzyme activities in the liver of juvenile rat. *Acta histochemica*, 117(8), 712-717.
- Lahtinen, S., Haskard, C., Ouwehand, A., Salminen, S., y Ahokas, J. (2004). Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food additives and contaminants*, 21(2), 158-164.

- Lineback, D. R., Coughlin, J. R., y Stadler, R. H. (2012). Acrylamide in foods: a review of the science and future considerations. *Annual review of food science and technology*, 3, 15-35.
- Lipworth, L., Sonderman, J. S., Tarone, R. E., y McLaughlin, J. K. (2013). Acrylamide: a human cancer risk? *European Journal of Cancer Prevention*, 22(2), 193-194.
- LoPachin, R. M., y Gavin, T. (2012). Molecular mechanism of acrylamide neurotoxicity: lessons learned from organic chemistry. *Environmental health perspectives*, 120(2), 1650-1657.
- Luo, Y.-S., Long, T.-Y., Shen, L.-C., Huang, S.-L., Chiang, S.-Y., y Wu, K.-Y. (2015). Synthesis, Characterization and Analysis of the Acrylamide-and Glycidamide-Glutathione Conjugates. *Chemico-biological interactions*.
- Masson, L., Muñoz, J. R., Romero, N., y Camilo, C. (2007). Acrilamida en patatas fritas: Revisión actualizada. *Grasas y aceites*, 58(2), 185-193.
- Mehri, S., Shahi, M., Razavi, B. M., Hassani, F. V., y Hosseinzadeh, H. (2014). Neuroprotective effect of thymoquinone in acrylamide-induced neurotoxicity in Wistar rats. *Iranian journal of basic medical sciences*, 17(12), 1007.
- Mehta, H. R., Patel, P. B., y Galani, V. J. (2011). Factors Affecting Pharmacokinetic Disposition of Drugs. *International Research Journal of Pharmacy*.
- Mei, N., Hu, J., Churchwell, M. I., Guo, L., Moore, M. M., Doerge, D. R., y Chen, T. (2008). Genotoxic effects of acrylamide and glycidamide in mouse lymphoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 628-636.
- Muttucumaru, N., Powers, S., Elmore, J., Briddon, A., Mottram, D., y Halford, N. (2014). Evidence for the complex relationship between free amino acid and sugar concentrations and acrylamide-forming potential in potato. *Annals of Applied Biology*, 164(2), 286-300.
- NOM-062-ZOO. (1999). NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

- Park, H. R., Kim, M.-S., Kim, S. J., Park, M., Kong, K. H., Kim, H. S., Kwack, S. J., Kang, T. S., Kim, S. H., y Kim, H. S. (2010). Acrylamide induces cell death in neural progenitor cells and impairs hippocampal neurogenesis. *Toxicology letters*, 193(1), 86-93.
- Parzefall, W. (2008). Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. *Food and Chemical Toxicology*, 46(4), 1360-1364.
- Pedreschi, F., Mariotti, M. S., y Granby, K. (2014). Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(1), 9-20.
- Pedroso, W. H., Godínez, A. R., Hernández, R. N., Sánchez, A. P., y Moreno, E. D. A. (2006). Resistencia bacteriana en las bacterias productoras de betalactamasas extendidas (BLEE). *Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias*, 5(1), 1.
- Pizzolitto, R. P., Dalcero, A. M., Bueno, D. J., Cavaglieri, L., Armando, M. R., y Salvano, M. A. (2011). Binding of aflatoxin B1 to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: a useful model to determine the most efficient microorganism *Biochemistry and Molecular Biology* (pp. pp. 323-346). Croatia: Intech Publications.
- Raju, J., Sondagar, C., Roberts, J., Aziz, S. A., Caldwell, D., Vavasour, E., y Mehta, R. (2011). Dietary acrylamide does not increase colon aberrant crypt foci formation in male F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1373-1380.
- Rawi, S. M., Marie, M.-A. S., Fahmy, S. R., y El-Abied, S. A. (2012). Hazardous effects of acrylamide on immature male and female rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(18), 1367-1386.
- Reniero, R., Cocconcelli, P., Bottazzi, V., y Morelli, L. (1992). High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. *Journal of General Microbiology*, 138(4), 763-768.
- Roos, S., y Jonsson, H. (2002). A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology*, 148(2), 433-442.

- Sen, A., Ozgun, O., Arinç, E., y Arslan, S. (2012). Diverse action of acrylamide on cytochrome P450 and glutathione S-transferase isozyme activities, mRNA levels and protein levels in human hepatocarcinoma cells. *Cell biology and toxicology*, 28(3), 175-186.
- Serrano-Niño, J., Cavazos, G., A, Cantú, C., F, González, C., AF, Vallejo, C., B, Hernández, M., A, y García, H. (2015). In vitro reduced availability of aflatoxin B 1 and acrylamide by bonding interactions with teichoic acids from lactobacillus strains. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1334-1341.
- Serrano-Niño, J., Cavazos, G., A, González, C., A F, Vallejo, C., B, Hernández, M., A, y García, H. (2014). In vitro study of the potential protective role of Lactobacillus strains by acrylamide binding. *Journal of Food Safety*, 34(1), 62-68.
- Sharma, A., y Jain, J. (2008). Effects of oral exposure of acrylamide on plasma levels of thyroid hormones and haematological parameters in the Swiss albino mice. *Asian J. Exp. Sci*, 22(3), 317-324.
- Sisnaiske, J., Hausherr, V., Krug, A. K., Zimmer, B., Hengstler, J. G., Leist, M., y van Thriel, C. (2014). Acrylamide alters neurotransmitter induced calcium responses in murine ESC-derived and primary neurons. *Neurotoxicology*, 43, 117-126.
- Sun, C.-M., Hall, J. A., Blank, R. B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J. R., y Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of experimental medicine*, 204(8), 1775-1785.
- Taeymans, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., y Studer, A. (2004). A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(5), 323-347.
- Todorova, I., Simeonova, G., Kyuchukova, D., Dinev, D., y Gadjeva, V. (2005). Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats. *Comparative Clinical Pathology*, 13(4), 190-194.

- Varzakas, T. (2015). *Handbook of Food Processing: Food Safety, Quality and Manufacturing Processes*: CRC Press.
- Veenapani, S., MEENA, B., Uma, A., Venkatasubbaiah, K., Rao, K., y Thyagaraju, K. (2010). Glutathione-s-transferase protein, nucleic acid, chromatin, cell nuclei and structural variation analysis of erythrocyte, bone marrow cell and hepatocytes of rats under the influence of acrylamide. *Bioscan*, 5, 477-481.
- Vinderola, C., y Reinheimer, J. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9), 895-904.
- Wang, H., Huang, P., Lie, T., Li, J., Hutz, R. J., Li, K., y Shi, F. (2010). Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats. *Reproductive Toxicology*, 29(2), 225-230.
- Weidenmaier, C., y Peschel, A. (2008). Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 276-287.
- Xu, Y., Cui, B., Ran, R., Liu, Y., Chen, H., Kai, G., y Shi, J. (2014). Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: Current status and future prospects. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 1-12.
- Zhang, Y., Wang, Q., Cheng, J., Zhang, J., Xu, J., y Ren, Y. (2015). Comprehensive profiling of mercapturic acid metabolites from dietary acrylamide as short-term exposure biomarkers for evaluation of toxicokinetics in rats and daily internal exposure in humans using isotope dilution ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 894, 54-64.
- Zhang, Y., y Zhang, Y. (2007). Formation and reduction of acrylamide in Maillard reaction: a review based on the current state of knowledge. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(5), 521-542.
- Zödl, B., Schmid, D., Wassler, G., Gundacker, C., Leibetseder, V., Thalhammer, T., y Ekmekcioglu, C. (2007). Intestinal transport and metabolism of acrylamide. *Toxicology*, 232(1), 99-108.

ANEXO 1

Carta del Comité de Ética



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.

CIAD

SEP-CONACYT-UNAM-IPN-GOBIERNO DE SONORA-GOBIERNO DE SINALOA-GOBIERNO DE CHIHUAHUA-SAGARPA
COMITE DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

COMITÉ DE ÉTICA

CE/003/2016

Hermosillo, Sonora. Mayo 30, 2016

Dr. Adrián Hernández Mendoza
Profesor-Investigador Titular
Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal
CIAD
Presente

Estimada Dr. Hernández:

Me permito comunicarle que el Comité de Ética de nuestro centro ha revisado cuidadosamente la propuesta de investigación "Evaluación in vivo del potencial efecto protector de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus casei* Shirota contra el efecto tóxico de acrilamida" y del cual usted es el responsable técnico. Con base a lo estipulado por los documentos y guías nacionales e internacionales de bioética nuestro comité ha recomendado lo siguiente:

1. Sobre la obtención de sangre en el modelo animal (punto 11, formato de ética), no se aconseja la obtención de volúmenes propuestos (2ml/cada tercer día). La punción cardiaca repetida debe justificarse debido a los efectos adversos que pueden generarse. La punción cardiaca se recomienda para obtener muestras únicas y debe usarse en especies particulares. Las punciones cardiacas repetidas tienen riesgo de sangrado intenso, el animal entra en shock hipovolémico de corta duración pudiendo morir o bien a largo plazo puede sufrir de anemia. Por otra parte, la punción cardiaca debe realizarse con la aplicación de anestésicos los cuales pueden tener efectos adversos (ver <http://sea.umh.es/files/2011/07/Refinamiento-extracci%C3%B3n-sangre.pdf>). Por lo tanto se recomienda volúmenes menores por lo que las técnicas debería de adecuarse y obtener sangre por corte de cola a intervalos cortos (1 vez a la semana) permitiendo un flujo de manera aceptable en cada sesión (<https://www.youtube.com/watch?v=cf2rWokIKCM>).
2. En relación al protocolo de investigación específicamente en la sección "efecto sobre la capacidad de adhesión de las bacterias a mucosa intestinal" es importante mencionar y recomendar que se consideren otros aspectos complementarios de higiene y seguridad de acuerdo a la norma mencionada en el apartado (NOM 062-ZOO-1999).
3. La obtención de sangre por corte de cola de acuerdo al protocolo del proyecto (página 20), se contradice con la técnica que se propone en el formato de ética para la aprobación del proyecto, porque se menciona punción cardiaca con un volumen de 2 ml/cada tercer día.
4. En base a lo anterior, se enfatiza al responsable realizar las correcciones de acuerdo a lo recomendado para el protocolo revisado.

A reserva de la atención que se exige prestarse a las recomendaciones anteriores, el Comité de Ética de CIAD otorga la aprobación correspondiente al presente estudio, para el cual se le desea el mejor de los éxitos.

Sin más, en representación de los miembros de nuestro comité, le deseo el mayor de los éxitos

Atentamente

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

C.c.p. Archivo

