



Trabajo Original

Otros

Evaluación del efecto *in vitro* de extractos intra y extracelulares de *Lactobacillus* contra la genotoxicidad y el estrés oxidativo causado por la acrilamida

Assessment of the in vitro effect of intra and extracellular extracts of Lactobacillus against genotoxicity and oxidative stress caused by acrylamide

María Goretti Reyes López, Adriana Cavazos Garduño, Nancy Elizabeth Franco Rodríguez, Jorge Manuel Silva Jara, Julio César Serrano Niño

Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. México

Resumen

Introducción: la acrilamida se forma mediante la reacción de Maillard, por lo que se encuentra en muchos productos alimenticios sometidos a procesos térmicos, generando genotoxicidad y daños al ADN. Los estudios han reportado que los lactobacilos tienen la capacidad de generar compuestos con actividad antioxidante, antígenotóxica y antimutagénica, y es por esto que el presente trabajo pretende evaluar el efecto de cepas de *Lactobacillus* y sus extractos intra y extracelulares contra la genotoxicidad y el estrés oxidativo causado por la acrilamida.

Métodos: se empleó una cepa de *Lactobacillus casei* Shirota y una cepa de *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171. Ambas fueron cultivadas en caldo MRS y sometidas a tratamientos mecánicos y enzimáticos para obtener los extractos extra e intracelulares. Los linfocitos fueron cultivados en medio RPMI, la peroxidación lipídica se evaluó por TBARS y la capacidad antioxidante se midió en los extractos extra e intracelulares con la técnica ABTS, empleando además una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* RC 212 como modelo. La reducción de la peroxidación lipídica en los linfocitos se midió por TBARS y la reducción de la genotoxicidad mediante la reducción de la formación de micronúcleos en los linfocitos.

Resultados: ambas cepas evaluadas, así como sus extractos intra y extracelulares, mostraron capacidad de contrarrestar el estrés oxidativo y la genotoxicidad causada por la acrilamida.

Conclusión: los resultados encontrados, sugieren que el empleo de extractos intra y extracelulares de ambas cepas podría ser una alternativa para reducir los efectos de genotoxicidad y estrés oxidativo causados por la acrilamida sin la necesidad de requerir una estructura viable..

Palabras clave:

Acrilamida. Extractos.
Lactobacilos. Antioxidante.

Abstract

Introduction: acrylamide is formed by the Maillard reaction and is found in many food products subjected to thermal processes, generating genotoxicity and DNA damage. Studies have reported that lactobacilli have the ability to generate compounds with antioxidant, antigenotoxic and antimutagenic activity, which is why the present work aims to evaluate the effect of *Lactobacillus* strains and their intra and extracellular extracts against genotoxicity and oxidative stress as caused by acrylamide.

Methods: a strain of *Lactobacillus casei* Shirota and a strain of *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 were used, both were cultured in MRS broth and subjected to mechanical and enzymatic treatments to obtain extra and intracellular extracts. Lymphocytes were cultured in RPMI medium. Lipid peroxidation was evaluated by TBARS and the antioxidant capacity was measured in the extra and intracellular extracts with the ABTS technique, also using a strain of *Saccharomyces cerevisiae* RC 212 as a model. The reduction of lipid peroxidation in lymphocytes was measured by TBARS and the reduction of genotoxicity by reducing the formation of micronuclei in lymphocytes.

Results: both strains evaluated, as well as their intra and extracellular extracts, showed the ability to counteract oxidative stress and genotoxicity caused by acrylamide.

Conclusion: the results found suggest that the use of intra and extracellular extracts of both strains could be an alternative to reduce the effects of genotoxicity and oxidative stress caused by acrylamide without the need for a viable structure.

Keywords:

Acrylamide. Extracts.
Lactobacillus. Antioxidant.

Recibido: 15/05/2022 • Aceptado: 05/11/2022

Conflictos de intereses: los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Agradecimientos: los autores agradecen al CONACyT de México la beca de posgrado de la alumna María Goretti Reyes López, autora principal de este artículo.

Reyes López MG, Cavazos Garduño A, Franco Rodríguez NE, Silva Jara JM, Serrano Niño JC. Evaluación del efecto *in vitro* de extractos intra y extracelulares de *Lactobacillus* contra la genotoxicidad y el estrés oxidativo causado por la acrilamida. Nutr Hosp 2023;40(4):811-818

DOI: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.04241>

Correspondencia:

Julio César Serrano Niño. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara. Blvd. Marcelino García Barragán, 1421, esq Calzada Olímpica. C.P. 44430 Guadalajara, Jalisco. México
e-mail: julio.serrano@academicos.udg.mx

INTRODUCCIÓN

La acrilamida es un compuesto tóxico que se forma durante el sometimiento de alimentos ricos en carbohidratos a temperaturas elevadas, mayores a 120 °C. Los productos alimenticios derivados de ingredientes vegetales como papas y cereales tienden a contener las mayores cantidades de acrilamida; esto se debe principalmente a la presencia natural de compuestos como glucosa, fructosa y asparagina, involucrados en la formación de acrilamida (1). Los efectos neurotóxicos de la acrilamida en humanos han sido bien documentados, sugiriendo la capacidad para causar mutaciones genéticas. Asimismo, la recombinación inducida por el ADN puede interferir en el proceso de replicación genética, lo que favorece la formación de tumores (2). Por otra parte, las bacterias acidolácticas constituyen un grupo de bacterias grampositivas que forman parte importante de la microbiota intestinal debido a que desempeñan un papel trascendente en el buen funcionamiento del organismo y el mantenimiento de la salud (3,4). Además se sabe que las bacterias acidolácticas generan compuestos con actividad antioxidante que neutralizan moléculas tóxicas a nivel intestinal y sistémico (5), además de haber demostrado tener actividades antígenotóxicas y antimutagénicas en modelos *in vitro* e *in vivo* (6,7). El uso de las células no viables de bacterias acidolácticas, o sus componentes y/o extractos, podría tener ventajas de seguridad sobre la utilización de las bacterias completas ya que en los consumidores con sistemas inmunes desequilibrados o comprometidos existe el riesgo de traslocación, infección o aumento de la respuesta inflamatoria, mostrado por algunas cepas de BAL con potencial probiótico. Es por esto que el presente trabajo pretende evaluar el efecto de cepas de *Lactobacillus* y sus extractos intra y extracelulares contra la genotoxicidad y el estrés oxidativo causados por la acrilamida.

METODOLOGÍA

SOLUCIÓN DE TRABAJO DE ACRILAMIDA

Se preparó una solución de acrilamida disolviendo esta en solución de *buffer* de fosfatos salino (0,9 % NaCl en PBS 10 mM, pH = 7,4) para alcanzar una concentración final de 100 mM.

CULTIVO BACTERIANO

Se empleó una cepa de *Lactobacillus casei* Shirota aislada de un producto lácteo fermentado comercial, y una cepa de *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 que pertenece a una colección de cultivos. Para cada cepa se realizaron dos subcultivos en caldo Man Rogosa y Sharpe (MRS) para obtener concentraciones celulares de 10⁹ UFC/mL previo a cada experimento.

PREPARACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE *L. CASEI* SHIROTA Y *L. REUTERI* ATCC 14171

En breve, se tomó una alícuota (10 ml) de bacterias suspendidas en PBS a la que se le añadió 1 mg/ml de lisozima y se incubó a 37 °C durante 2 h; posteriormente, las células tratadas fueron sometidas a ultrasonificación (70 W) y recuperadas por centrifugación (3600 g, 10 min, 4 °C); el sobrenadante se mantuvo en refrigeración y oscuridad hasta su uso y los restos de bacteria se emplearon para obtener los extractos extracelulares.

EXTRACCIÓN DE PARED CELULAR Y ÁCIDOS TEICOICOS DE *L. CASEI* SHIROTA Y *L. REUTERI* NRRL B-14171

Los restos de bacteria obtenidos después de la ruptura para obtener el líquido intracelular fueron tratados con proteinasa K y lisozima para romper la estructura bacteriana. Finalmente, los fragmentos se trataron con dodecilsulfato sódico (SDS) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Los fragmentos que se obtuvieron se mantuvieron en congelación hasta su uso para obtener ácidos teicoicos y para realizar los ensayos de micronúcleos y del grado de oxidación. Por otra parte, se tomaron 10 g de los fragmentos de la pared celular aislada de las cepas a evaluar y se incubaron durante 24 h a 37 °C en 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % sin agitación. Posteriormente, los ácidos teicoicos se recuperaron por precipitación con 5 mL de acetona fría durante 24 h a 4 °C y se recuperaron los ácidos teicoicos por centrifugación (3200 x g, 10 min, 4 °C).

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante se evaluó en los extractos extra e intracelulares de ambas cepas evaluadas mediante la técnica ABTS. En breve, se preparó una solución del radical ABTS (7 mM), la cual se dejó reaccionando con una solución de persulfato de potasio (2,45 mM) durante 16 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido el tiempo se almacenó a -80 °C en alícuotas de 1 mL hasta el momento de ser requerida. Una vez preparado el radical, se tomó una alícuota de la solución "stock" de ABTS y se ajustó la absorbancia a 0,07 ± 0,05 usando metanol absoluto, y se leyó a 750 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Multiskan Sky); adicionalmente, se preparó una curva de calibración a concentraciones de 5-300 µg/mL utilizando ácido ascórbico (1 mg/mL) como estándar para conocer las concentraciones de las muestras.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

La prueba de protección de la oxidación generada por H₂O₂ se evaluó empleando una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*

como modelo celular siguiendo el siguiente diseño experimental: 1) levadura + H₂O₂; 2) levadura; 3) bacteria completa + levadura + H₂O₂; 4) pared celular + levadura + H₂O₂; 5) líquido intracelular + levadura + H₂O₂; 6) ácidos teicoicos + levadura + H₂O₂. La metodología seguida fue la descrita por Oliveira y cols., 2021, en donde 0,1 g de *Saccharomyces cerevisiae* RC 212 (Lalvin bourgovinã) se colocaron en 5 mL de caldo YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose, Bioxonã) y se incubaron por 16 h a 28 °C con agitación a 180 rpm en agitador orbital. Transcurrido el tiempo se tomaron 100 µL, se pasaron a otro tubo con 5 mL de caldo YPD y se incubó el conjunto 16 h a 28 °C con agitación. De este último cultivo se colocaron 100 µL en tubos con 5 mL de caldo YPD y 100 µL de los extractos intra y extracelulares de ambas cepas de acuerdo con el diseño experimental descrito anteriormente, y se llevaron a incubación por 1 h; después se agregaron 7,5 µL de H₂O₂ y se incubaron por 1 hora más. De la mezcla anterior se prepararon diluciones seriadas en caldo YPD hasta 1 x 10⁻⁵ UFC y se sembraron por vaciado en placa de ágar YPD. Las placas se incubaron a 28 °C por 48 h; transcurrido el tiempo, se realizó el recuento en placa y los resultados se reportaron como UFC/mL de levaduras.

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIGENOTÓXICO DE *L. CASEI* SHIROTA Y *L. REUTERI* NRRL B-14171

La prueba de formación de micronúcleos en los linfocitos se realizó de acuerdo con lo propuesto por Zamani y cols. (8) siguiendo el siguiente diseño experimental: 1) control (acrilamida); 2) acrilamida + bacteria completa; 3) acrilamida + líquido intracelular; 4) acrilamida + ácidos teicoicos; 5) acrilamida + fragmentos de pared celular. En breve, 0,5 mL de sangre humana se mezclaron con 4,5 mL de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 suplementado con suero fetal de ternera al 20 %, penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 mg/mL, a lo cual se añadió fitohemaglutinina-M (1 mg/mL) para estimular el cultivo, incubándose la mezcla a 37 °C durante 72 h. A las 24 h del primer día, las células se trataron de acuerdo con el diseño experimental y, posteriormente, después de 20 h de exposición, se añadió citocalasina B (5 mg/mL) con el objetivo de bloquear la citocinesis celular; 28 h después se obtuvieron los linfocitos por centrifugación. Los linfocitos se sometieron a un tratamiento hipotónico suave con KCl (0,075 M) durante 5 minutos para luego fijarlos en un portaobjetos con una solución de metanol:ácido acético (3:1), repitiendo la fijación 2 veces. Finalmente, una vez fijada, la suspensión celular se tiñó con colorante de Giemsa al 10 % (pH = 6,8) durante 10 min. El porcentaje de micronúcleos se reportó por cada 1000 células observadas utilizando un microscopio de luz óptica.

MEDICIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN LINFOCITOS HUMANOS

La medición de la peroxidación lipídica se realizó en los linfocitos cultivados de acuerdo con el diseño experimental descrito en

la sección anterior. El contenido de malondialdehído (MDA) se determinó por las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBA), de acuerdo con lo descrito por Zamani y cols. (8), con algunas modificaciones. En breve, se añadieron 0,25 mL de ácido sulfúrico (0,05 M) a los linfocitos obtenidos de cada grupo para, posteriormente, adicionar 0,3 mL de TBA (0,2 %) y colocarlos en un baño de agua hirviendo durante 30 min. Al finalizar el tiempo, se llevaron los tubos a un baño de hielo, se añadieron 0,4 mL de n-butanol a cada uno y se centrifugaron a 3500 g durante 10 min. Finalmente, se midió la cantidad de 1,1,3,3,-tetraetoxipropano (TEP) formado en cada muestra, midiendo la absorbancia del sobrenadante a 532 nm con un lector de ELISA y expresándolo como mmol/L de TEP.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se presentan como media ± desviación estándar. La significancia estadística ($p < 0,05$) se determinó mediante la prueba estadística ANOVA de una cola con una prueba de Tukey, mediante la cual se buscaron diferencias significativas en la capacidad antioxidante y el número de micronúcleos formados por cada 1000 células observadas al microscopio de luz óptica entre los diferentes tratamientos evaluados. Para el análisis estadístico se empleó el software estadístico Minitab 16.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio se apegará a lo señalado por la Declaración de Helsinki y lo dispuesto en la Ley General de Salud en materia de investigación. En todo momento se protegió la confidencialidad de la información y se recabó el consentimiento informado de los participantes en la investigación.

RESULTADOS

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE *L. CASEI* SHIROTA Y *L. REUTERI* NRRL B-14171

En la figura 1 se muestran los resultados referentes a la capacidad antioxidante de los extractos intracelulares y extracelulares de *L. casei* Shirota y *L. reuteri* NRRL B-14171 obtenidos mediante la técnica ABTS. De ambas cepas se obtuvieron valores que oscilaron entre 15,99 y 63,77 µME AA (micromoles de equivalente de ácido ascórbico). Al comparar la capacidad antioxidante de los extractos de ambas cepas se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), siendo el extracto del líquido intracelular de la cepa *L. reuteri* NRRL B-14171 el que presentó la mayor capacidad antioxidante (63,77 µME AA), mientras que los que mostraron la menor capacidad antioxidante fueron los fragmentos de pared celular y los ácidos teicoicos de esta misma cepa con 16,14 y 15,99 µME AA, respectivamente.

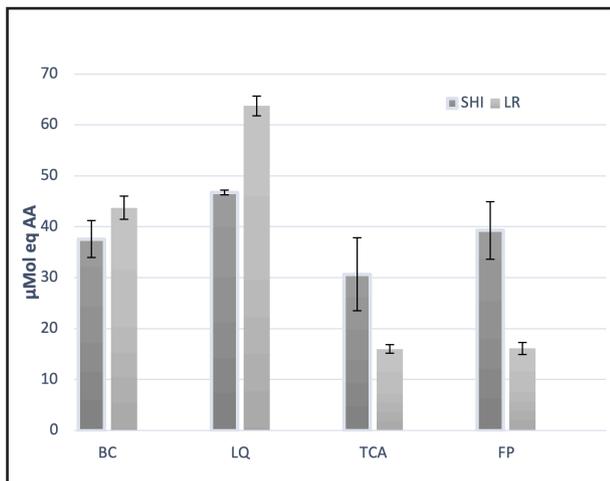


Figura 1. Capacidad antioxidante de extractos intra y extracelulares de *L. casei* Shirota y *L. reuteri* por la técnica ABTS (SHI: *L. casei* Shirota; LR: *L. reuteri*; BC: bacteria completa; LQ: líquido intracelular; TCA: ácidos teicoicos; FP: fragmentos de pared celular).

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE *L. CASEI* SHIROTA Y *L. REUTERI* NRRL B-14171 EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* RC 212

En la figura 2 se presentan los resultados referentes a la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos intra y extracelulares de *L. casei* Shirota y *L. reuteri* NRRL B-14171 en *Saccharomyces cerevisiae* RC 212, lo cual se demostró cuantificando un aumento en las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) de levadura en comparación con un control posi-

tivo expuesto a peróxido de hidrógeno. De acuerdo a los resultados obtenidos, *L. casei* Shirota mostró un mejor efecto antioxidante al propiciar un mayor crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* RC 212 en presencia de peróxido de hidrógeno; la bacteria completa, así como los fragmentos de pared celular y sus ácidos teicoicos, mostraron la mejor capacidad antioxidante ya que se contabilizó un crecimiento de $1,065 \times 10^7$ UFC/mL, $1,05 \times 10^7$ UFC/mL y $1,175 \times 10^7$ UFC/mL de *Saccharomyces cerevisiae* RC 212 en comparación con el control positivo de peróxido, en el cual se contabilizó un crecimiento de $2,04 \times 10^6$ UFC/mL de *Saccharomyces cerevisiae* RC 212; comparado con el tratamiento negativo, esto representó una reducción del crecimiento del 34, 35 y 27 %, respectivamente. Respecto a *L. reuteri* ATCC 14171, de forma general, este mostró la menor protección antioxidante frente al peróxido de hidrógeno y únicamente el líquido intracelular mostró la mejor capacidad antioxidante al contabilizarse un crecimiento de $9,4 \times 10^6$ UFC/mL de *Saccharomyces cerevisiae* RC 212 en comparación con el control positivo de peróxido; comparado con el tratamiento negativo, esto representa una reducción del 42,4 % en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* RC 212. Por otra parte, la bacteria completa, así como los fragmentos de pared celular y sus ácidos teicoicos, mostraron el menor aumento en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* RC 212 al contabilizarse crecimientos de $6,1 \times 10^6$ UFC/mL, $6,5 \times 10^6$ UFC/mL y $7,9 \times 10^6$ UFC/mL, respectivamente.

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIGENOTÓXICO DE *L. CASEI* SHIROTA Y *L. REUTERI* NRRL B-14171

La reducción en la cantidad de micronúcleos se muestra en la figura 3. Los extractos intra y extracelulares de ambas cepas eva-

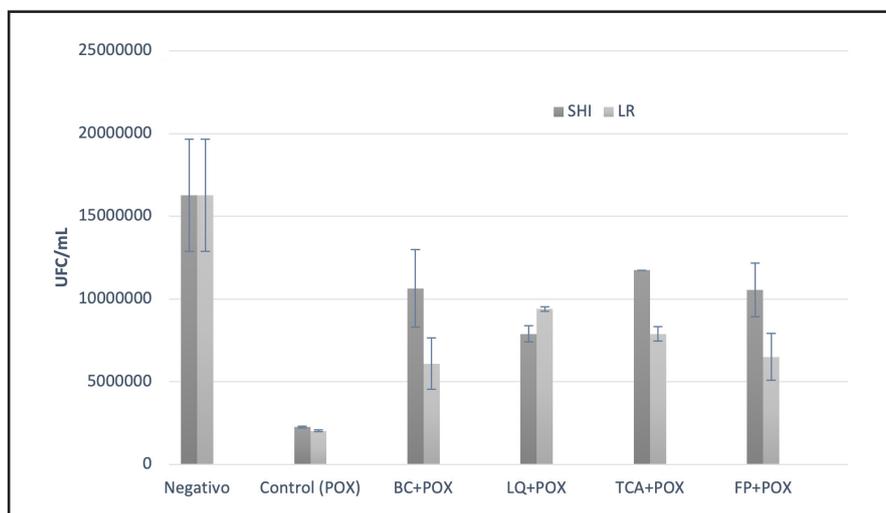


Figura 2. Capacidad antioxidante de extractos intra y extracelulares de *L. casei* Shirota y *L. reuteri* en *Saccharomyces cerevisiae* RC 212 (SHI: *L. casei* Shirota; LR: *L. reuteri*; BC: bacteria completa; LQ: líquido intracelular; TCA: ácidos teicoicos; FP: fragmentos de pared celular; POX: peróxido de hidrógeno).

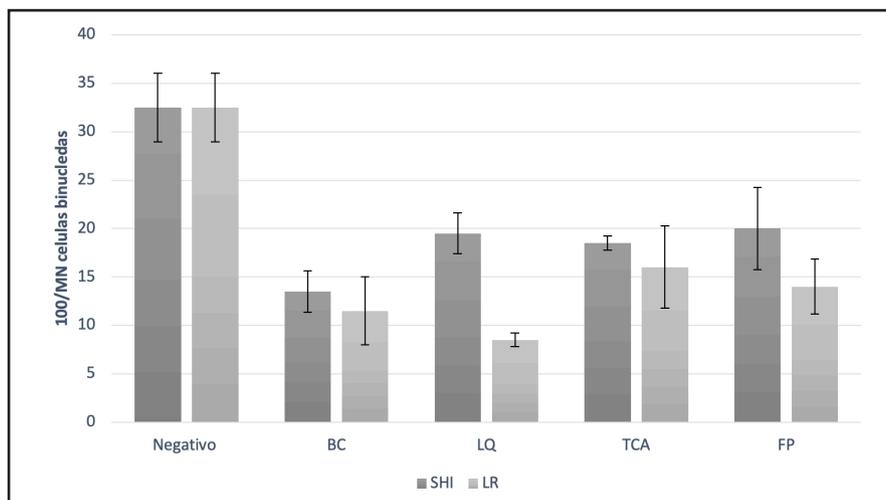


Figura 3.

Efecto antigenotóxico de extractos intra y extracelulares de *L. casei* Shirota y *L. reuteri* sobre la formación de micronúcleos (MN). SHI: *L. casei* Shirota, LR: *L. reuteri*, BC: Bacteria completa, LQ: Líquido intracelular, TCA: Ácidos teicoicos, FP: Fragmentos de pared celular.

luadas mostraron capacidad para reducir la genotoxicidad en los linfocitos causada por la acrilamida. En el líquido intracelular de *L. reuteri* NRRL B-14171 se contabilizaron solo 8,5 núcleos en promedio, comparados con 32,5 registrados en el control tratado con acrilamida, lo cual representa una reducción del 73,8 %; sin embargo, este caso fue estadísticamente similar a la bacteria completa, en la cual se registraron en promedio 11,5 núcleos, lo cual representa una reducción del 64,6 % frente al control. Con respecto a los ácidos teicoicos y la fracción de pared celular, a pesar de que mostraron ser similares estadísticamente, ambos tuvieron un efecto diferente, mostrando una reducción en la formación de mi-

cronúcleos de 16 y 14, respectivamente. Por otra parte, el líquido intracelular, los ácidos teicoicos y los fragmentos de pared celular de *L. casei* Shirota tuvieron un efecto similar en la formación de micronúcleos al contabilizarse 19,5, 18,5 y 20 micronúcleos en promedio, lo cual representa una reducción del 40 %, 43 % y 38,4 %, respectivamente, comparados con el control. Únicamente la bacteria completa de *L. reuteri* NRRL B-14171 mostró tener una mayor protección sobre la formación de micronúcleos al contabilizarse una reducción del 64,6 % comparada con el control positivo; sin embargo, esta no fue estadísticamente diferente de *L. casei* Shirota. En la figura 4 se pueden observar los distintos tipos de

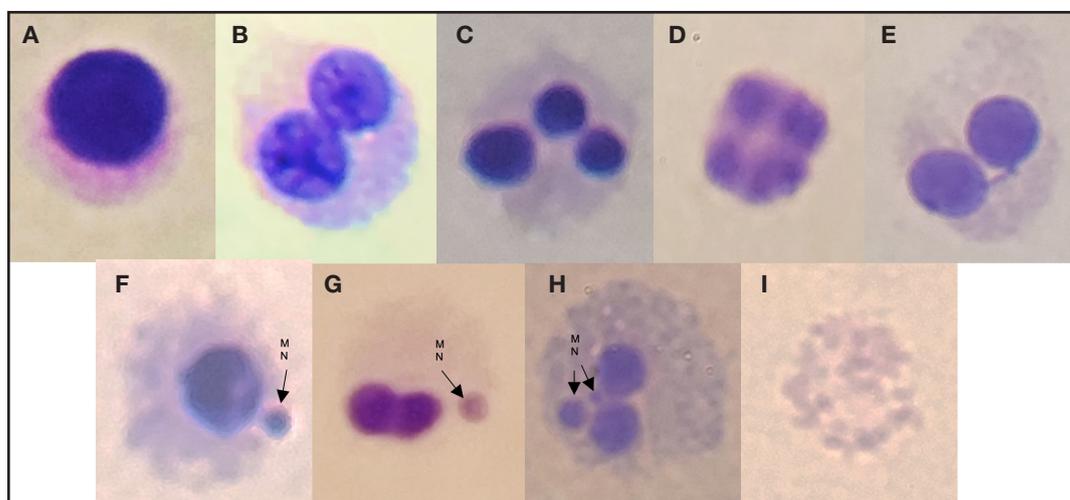


Figura 4.

Linfocitos humanos (A: célula normal (mononucleada); B: célula binucleada; C: célula trinucleada; D: célula multinucleada; E: célula binucleada con puente nucleoplasmático; F: célula mononuclear con micronúcleos (MN); G: célula binucleada con 1 MN; H: célula binucleada con 2 MN; I: célula necrótica).

linfocitos que se observaron en este trabajo, dentro de los cuales aparecen distintas morfologías, como células binucleadas con micronúcleos, células multinucleadas y apoptóticas.

REDUCCIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN LINFOCITOS HUMANOS

En la figura 5 se muestra la actividad antioxidante de los extractos intra y extracelulares de *L. casei* Shirota y *L. reuteri* NRRL B-14171 en linfocitos humanos. Los extractos intra y extracelulares de *L. casei* Shirota mostraron tener mayor efecto protector contra la oxidación comparados con los extractos intra y extracelulares de *L. reuteri* NRRL B-14171. La bacteria completa, así como los ácidos teicoicos de *L. casei* Shirota, mostró la mayor protección contra la peroxidación lipídica en los linfocitos ya que, en el caso de la bacteria completa, se registraron 0,0004 mMolTEP y en el caso de los ácidos teicoicos 0 mMolTEP, lo cual representa una reducción de la peroxidación de la membrana del eritrocito del 85 y el 100 %m respectivamente para estos extractos comparados con el control. Por otra parte, el líquido intracelular de esta cepa también mostró ser uno de los extractos que más protección mostró ante la peroxidación lipídica, al contabilizarse 0,00057 mMolTEP (80 % menos que el control). Respecto a *L. reuteri* NRRL B-14171, los ácidos teicoicos fueron los únicos extractos que mostraron la mayor reducción de la peroxidación lipídica, al contabilizarse 0,0008 mMolTEP, lo que representa un 70 % de reducción comparada con el control. Por su parte, los ácidos teicoicos de *L. casei* Shirota mostraron el mayor efecto antioxidante, siendo estos significativamente diferentes a los extractos de la pared celular, líquido intracelular

y bacteria completa. En el caso de la fracción de pared celular, esta mostró mayor efecto antioxidante que la misma bacteria completa, lo cual podría deberse a que, al estar fraccionada, presenta grupos funcionales o cargas que podrían estar influenciando el efecto antioxidante. Por otra parte, con respecto a *L. reuteri* NRRL B-14171, el extracto intracelular correspondiente al líquido intracelular fue el único que mostró un mayor efecto antioxidante, siendo estadísticamente diferente a los otros extractos. La pared celular presentó un efecto antioxidante similar estadísticamente al de la bacteria completa y los ácidos teicoicos al fragmento de la pared celular.

DISCUSIÓN

De acuerdo con nuestros resultados, las bacterias acidolácticas evaluadas mostraron que eran capaces de proteger contra la oxidación ocasionada por la acrilamida, variando la capacidad antioxidante significativamente en los extractos intra y extracelulares y mostrando una marcada diferencia entre las dos cepas evaluadas, lo cual indica que esta actividad depende de cada cepa. De acuerdo a nuestros resultados, los extractos intracelulares son los que mostraron mayor actividad antioxidante y, de estos, el extracto intracelular de *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 fue el que presentó mayor capacidad antioxidante (63,77 μ Molar de equivalentes de ácido ascórbico), lo cual representa un 45 % más que la bacteria completa, la pared celular y los ácidos teicoicos. Estos resultados son similares a lo reportado por Cuevas-González y cols. (9), que reportaron una alta capacidad antioxidante para el líquido intracelular de las bacterias acidolácticas evaluadas. Adicio-

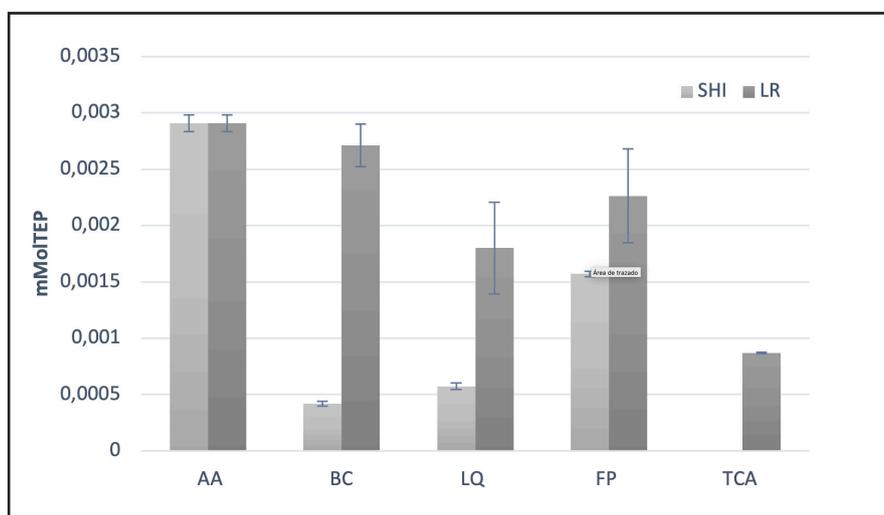


Figura 5.

Reducción de la peroxidación lipídica en linfocitos humanos por los extractos intra y extracelulares de *L. casei* Shirota y *L. reuteri* (SHI: *L. casei* Shirota; LR: *L. reuteri*; AA: acrilamida; BC: bacteria completa; LQ: líquido intracelular; TCA: ácidos teicoicos; FP: fragmentos de pared celular).

nalmente, Aguilar-Toala y cols. (10) reportaron que el líquido intracelular de trece cepas de lactobacilos mostró una mayor actividad antioxidante que la pared celular y que la bacteria completa y, de estas, *Lactobacillus casei* CRL431 presentó la mayor capacidad antioxidante seguida de las cepas *Lactobacillus fermentum* B1932 y *Lactobacillus casei* DCP3968. Estos resultados demuestran que ciertas cepas de lactobacilos podrían ser una buena fuente de posbióticos y una alternativa diferente como protección contra la oxidación causada por compuestos tóxicos adquiridos a través de la dieta.

Diversos autores indican que la actividad antioxidante de algunas cepas de lactobacilos podría atribuirse a la producción de compuestos ubicados en la superficie celular, como polisacáridos extracelulares, ácidos teicoicos y lipoteicoicos (11-13). Con respecto a la actividad antioxidante de los extractos intra y extracelulares de *L. casei* Shirota y *L. reuteri* NRRL B-14171 en los linfocitos humanos, los extractos intra y extracelulares de *L. casei* Shirota mostraron tener mayor efecto protector contra la oxidación comparados con los extractos intra y extracelulares de *L. reuteri* NRRL B-14171. Los ácidos teicoicos de *L. casei* Shirota mostraron mayor efecto antioxidante, siendo estos significativamente diferentes a los extractos de la pared celular, líquido intracelular y bacteria completa. En el caso de la fracción de pared celular, esta mostró mayor efecto antioxidante que la misma bacteria completa, lo cual podría deberse a que, al estar fraccionada, presenta grupos funcionales o cargas expuestas que podrían estar influenciando el efecto antioxidante. Por otra parte, con respecto a *L. reuteri* NRRL B-14171, el extracto intracelular correspondiente al líquido intracelular fue el único que mostró un mayor efecto antioxidante, siendo estadísticamente diferente a los otros extractos; de ellos, la pared celular presentó un efecto antioxidante estadísticamente similar al de la bacteria completa y los ácidos teicoicos al fragmento de la pared celular.

El uso de levaduras como modelo biológico para el estudio de antioxidantes es un modelo simple pero confiable que puede emplearse para evaluar la protección contra la oxidación a través de la reducción del crecimiento de una célula, además de que varias cepas de lactobacilos han demostrado ser resistentes al peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones (14,15). Al respecto de la capacidad antioxidante de los extractos intra y extracelulares de *L. casei* Shirota y *L. reuteri* NRRL B-14171 en *Saccharomyces cerevisiae* RC 212, *L. casei* Shirota mostró un mejor efecto antioxidante al propiciar un mayor crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* RC 212 en presencia de peróxido de hidrógeno. La bacteria completa, así como los fragmentos de pared celular y sus ácidos teicoicos, mostraron la mejor capacidad antioxidante al permitir solo una reducción del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* RC 212 del 34, 35 y 27 % para la bacteria completa, los fragmentos de pared celular y los ácidos teicoicos, respectivamente. Estos resultados coinciden con los resultados hallados sobre la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos, en donde la pared celular y los ácidos teicoicos de esta cepa fueron los que mostraron la mejor capacidad antioxidante. Adicionalmente, *L. reuteri* NRRL B-14171 mostró la

menor protección antioxidante frente al peróxido de hidrógeno y únicamente el líquido intracelular mostró la mejor capacidad antioxidante al permitir la reducción del 42,4 % del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* RC 212. Este resultado es consistente con los encontrados respecto a la capacidad antioxidante y la protección contra la oxidación evaluada en los linfocitos ya que, en ambos casos, el líquido intracelular de la misma cepa mostró la mejor capacidad antioxidante y protección contra la oxidación.

Respecto a la evaluación del efecto antigenotóxico de los extractos intra y extracelulares mediante la formación de micronúcleos, se observó que todos los extractos analizados presentaron efecto protector contra la genotoxicidad causada por la acrilamida. El análisis estadístico reveló que no hubo diferencias significativas entre los diferentes extractos extra e intracelulares y la bacteria completa con respecto a la cantidad de micronúcleos formados respecto al grupo negativo; sin embargo, el líquido intracelular de *L. reuteri* NRRL B-14171 presentó la menor formación de estructuras binucleadas con un promedio de 8,5 células, correspondiente a una reducción del 73,8 % respecto a las 32,5 células del grupo adicionado solo con acrilamida, lo que lo distingue como el extracto con mayor efecto antigenotóxico, mientras que el de menor protección corresponde al extracto de fragmentos de pared de *L. casei* Shirota, con un 38,4 % de inhibición en la formación de micronúcleos (20 MN). La acrilamida se ha visto involucrada en el desarrollo de múltiples afectaciones comprobadas a partir de análisis tanto *in vivo* como *in vitro*, en donde el daño al material genético es evidente; por ello se buscan alternativas que ayuden a atenuar dichos efectos, tal como lo hicieron Zamani y cols. (8), quienes, de forma similar a nuestra investigación, observaron una disminución de la formación de células binucleadas en los linfocitos de sangre humana, utilizando L-carnitina como agente antioxidante. Salimi y cols. (16), por su parte, utilizaron el ensayo de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) para evaluar la disminución del daño al ADN utilizando ácido elálgico, observando una disminución significativa en la formación de aductos con 8-OHdG al utilizar concentraciones de 25 y 50 μ M del ácido. Por otro lado, se cuenta con poca información sobre la capacidad que tienen los componentes extra e intracelulares de los lactobacilos para contrarrestar la genotoxicidad causada por la acrilamida y solo se ha comprobado que el uso de *Lactobacillus* y de componentes como los ácidos teicoicos puede generar una importante fijación con la acrilamida, favoreciendo su degradación y eliminación (17,18), lo que podría ser un factor clave en la disminución del daño genético.

Estudios previos han indicado que la acrilamida induce la formación de especies reactivas de oxígeno en los linfocitos humanos. La generación de estas es inducida por la acrilamida, pudiendo afectar a macromoléculas importantes, como son las proteínas y lípidos de membrana, e inducir la peroxidación de los lípidos en las células (16). En el presente trabajo, los ácidos teicoicos de ambas cepas evaluadas mostraron la mayor actividad antioxidante cuando se expusieron los linfocitos a la acrilamida. La bacteria completa y los ácidos teicoicos de *L. casei* Shirota mostraron la mayor protección contra la peroxidación lipídica en los linfocitos, al contabilizarse una reducción del 85 y el 100 %,

respectivamente, para estos extractos. Por otra parte, el líquido intracelular de esta cepa también mostró ser uno de los extractos de mayor protección ante la peroxidación lipídica, al contabilizarse una reducción del 80 %. Respecto a *L. reuteri* NRRL B-14171, los ácidos teicoicos fueron los únicos extractos que mostraron una mayor reducción de la peroxidación lipídica, al contabilizarse un 70 % de reducción.

CONCLUSIONES

Ambas cepas evaluadas, así como sus extractos intra y extracelulares, mostraron tener capacidad de contrarrestar el estrés oxidativo y la genotoxicidad causados por la acrilamida. Los fragmentos de pared celular de *L. casei* Shirota y *L. reuteri* NRRL B-14171, así como el líquido intracelular de esta última, mostraron la mayor capacidad antioxidante. Sin embargo, se encontraron marcadas diferencias respecto a esta propiedad en ambas cepas. Estas diferencias observadas podrían estar determinadas por la variación de la composición estructural de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos, además de la conformación de los peptidoglicanos y de elementos presentes en el líquido intracelular que podrían tener mejor respuesta al liberarse tras el rompimiento celular y que podrían neutralizar los radicales producidos por la acrilamida mediante la liberación de agentes reductores.

Los resultados encontrados sugieren que el empleo de extractos intra y extracelulares de *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 y *Lactobacillus casei* Shirota podría ser una alternativa para reducir los efectos de genotoxicidad y estrés oxidativo causados por la acrilamida, sin necesidad de requerir una estructura viable sin alteración de su estructura.

BIBLIOGRAFÍA

- Lineback DR, Coughlin JR, Standler RH. Acrylamide in Foods: A Review of the Science and Future Considerations. *Annu Rev Food Sci Technol* 2012;3(15):15-35. DOI: 10.1146/annurev-food-022811-101114
- García-López A, Alfaro-Macedo MP. Acrilamida en alimentos para consumo humano. *Rev Sanid Milit* 2007;61(6):384-38.
- Saucedo Briviesca N, Cuesta AI, Pérez Chabela MdL. Efecto de las bacterias lácticas termotolerantes probióticas sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales en batidos carnicos cocidos. *Nacameh* 2017;11(1):1-17.
- Petka K, Tarko T, Duda-Chodak A. Is Acrylamide as Harmful as We Think? A New Look at the Impact of Acrylamide on the Viability of Beneficial Intestinal Bacteria of the Genus *Lactobacillus*. *Nutrients* 2020;12(4). DOI: 10.3390/nu12041157
- Orrhage KM, Annas A, Nord CE, Brittebo EB, Rafter JJ. Effects of lactic acid bacteria on the uptake and distribution of the food mutagen Trp-P-2 in mice. *Scand J Gastroenterol* 2002;37(2):215-21. DOI: 10.1080/003655202753416902
- Cenci G, Rossi J, Trotta F, Giovanna C. Lactic Acid Bacteria Isolated from Dairy Products Inhibit Genotoxic Effect of 4-Nitroquinoline-1-oxide in SOS-Chromotest. *Syst Appl Microbiol* 2002;25(4):483-90. DOI: 10.1078/07232020260517607
- Villarini M, Caldini G, Moretti M, Trotta F, Pasquini R, Cenci G. Modulatory activity of a *Lactobacillus casei* strain on 1,2-dimethylhydrazine-induced genotoxicity in rats. *Environ Mol Mutagen* 2008;49(3):192-9. DOI: 10.1002/em.20367
- Zamani E, Shokrzadeh M, Modanloo M, Shaki F. *In Vitro* Study Towards Role of Acrylamide-Induced Genotoxicity in Human Lymphocytes and the Protective Effect of L-Carnitine. *Braz Arch Biol Technol* 2018;61. DOI:10.1590/1678-4324-20181600685
- Cuevas-González PF, Aguilar-Toalá JE, García HS, González-Córdova AF, Vallejo-Córdoba B, Hernández-Mendoza A. Protective Effect of the Intracellular Content from Potential Probiotic Bacteria against Oxidative Damage Induced by Acrylamide in Human Erythrocytes. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2020;12(4):1459-70. DOI: 10.1007/s12602-020-09636-9
- Aguilar-Toalá JE, Astiazarán-García H, Estrada-Montoya MC, García HS, Vallejo-Córdoba B, González-Córdova AF, et al. Modulatory Effect of the Intracellular Content of *Lactobacillus casei* CRL 431 Against the Aflatoxin B1-Induced Oxidative Stress in Rats. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2019;11(2):470-7. DOI: 10.1007/s12602-018-9433-8
- Yi ZJ, Fu YR, Li M, Gao KS, Zhang XG. Effect of LTA isolated from bifidobacteria on D-galactose-induced aging. *Exp Gerontol* 2009;44(12):760-5. DOI: 10.1016/j.exger.2009.08.011
- Guo Y, Pan D, Sun Y, Xin L, Li H, Zeng X. Antioxidant activity of phosphorylated exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Carbohydr Polym* 2013;97(2):849-54. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.06.024
- Xu R, Shen Q, Ding X, Gao W, Li P. Chemical characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide fraction isolated from *Bifidobacterium animalis* RH. *Eur Food Res Technol* 2011;232(2):231-40. DOI: 10.1007/s00217-010-1382-8
- Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, Vihalemm T, Annuk H, Kairane C, et al. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *Int J Food Microbiol* 2002;72(3):215-24. DOI: 10.1016/s0168-1605(01)00674-2
- Lin X, Xia Y, Wang G, Xiong Z, Zhang H, Lai F, et al. *Lactobacillus plantarum* AR501 Alleviates the Oxidative Stress of D-Galactose-Induced Aging Mice Liver by Upregulation of Nrf2-Mediated Antioxidant Enzyme Expression. *J Food Sci* 2018;83(7):1990-8. DOI: 10.1111/1750-3841.14200
- Salimi A, Baghal E, Ghobadi H, Hashemidanesh N, Khodaparast F, Seydi E. Mitochondrial, lysosomal and DNA damages induced by acrylamide attenuate by ellagic acid in human lymphocyte. *PLoS One* 2021;16(2):e0247776. DOI: 10.1371/journal.pone.0247776
- Serrano-Niño JC, Cavazos-Garduño A, González-Córdova AF, Vallejo-Córdoba B, Hernández-Mendoza A, García HS. In vitro Study of the Potential Protective Role of *Lactobacillus* Strains by Acrylamide Binding. *Journal of Food Safety* 2014;34(1):62-8. DOI: 10.1111/jfs.12096
- Rivas-Jimenez L, Ramirez-Ortiz K, González-Córdova AF, Vallejo-Córdoba B, García HS, Hernandez-Mendoza A. Evaluation of acrylamide-removing properties of two *Lactobacillus* strains under simulated gastrointestinal conditions using a dynamic system. *Microbiol Res* 2016;190:19-26. DOI: 10.1016/j.micres.2016.04.016