

Artículo de investigación

Capacidad antioxidante de bacterias con potencial probiótico del genero *Lactobacillus* spp aisladas a partir de heces y contenido duodenal de perros y gatos

Antioxidant capacity of *Lactobacillus* spp bacteria with probiotic potential isolated from feces and duodenal content of dogs and cats

Cortez R^{*1}, Meléndez C¹, Perazzo Y², Márquez Y¹, Flores C¹, López Ortega A¹.

¹Unidad de Investigación en Ciencias Funcionales Dr. Haity Moussatché (UNIHM), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA), Barquisimeto (Lara, Venezuela). ²Laboratorio de Microbiología, Departamento de Salud Pública. Telf. 0251-2592409. e-mail: caf06@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar si las bacterias ácido láctico (BAL) aisladas de heces y de contenido duodenal de gatos y perros adultos, difieren en cuanto a la capacidad antioxidante. La toma de muestras de heces se realizó directamente del ano, con hisopo estéril y el contenido duodenal (CD) por aspirado a nivel de duodeno mediante laparotomía bajo anestesia general del paciente. Las muestras fueron colocadas en tubo de vidrio que contenía 4,5 ml de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (Himedia[®]) para luego ser cultivadas por agotamiento en placas con agar MRS (Himedia[®]) y aisladas e identificadas mediante el kit de identificación API50CH. Una vez identificadas las cepas, se determinó dienos conjugados (DC) mediante extracción con isopropanol, malondialdehído (MDA) por el test para sustancias reaccionantes con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión (GSH) mediante kit comercial. Las bacterias aisladas tanto en heces como en CD fueron *L. leuconostoc*, *L. plantarum* y *L. paracasei* y los resultados obtenidos en las bacterias aisladas de heces fueron los siguientes: DC 0,00174± 0,00005 mol/mg PT, MDA 0,36± 0,037 nmol/mg PT; GSH 7,7± 0,6 U/g PT; SOD 22,0± 1,5 U/g PT mientras que para las bacterias aisladas de CD fue de DC 0,00172± 0,00003; MDA 0,40± 0,27; GSH 8,9± 0,4; SOD 22,1± 2,3; sin presentar diferencias significativas entre la ubicación de la extracción de la muestra en ninguno de los parámetros. Conclusión: las bacterias aisladas presentaron alta actividad antioxidante la cual no es afectada por la ubicación anatómica.

Palabras clave: *Lactobacillus* spp, antioxidantes, heces, contenido duodenal.

ABSTRACT

The objective of this investigation was to determine whether lactic acid bacteria (BAL) isolated from faeces and duodenal content of cats and adult dogs, differ in terms of antioxidant capacity. The stool samples were taken directly from the anus, with sterile swab and duodenal contents (CD) by aspirate at the duodenum level by laparotomy under general anesthesia of the patient, the samples were placed in a glass tube containing 4.5 ml of Man Rogosa Sharpe broth (MRS) (Himedia[®]) to then be cultivated by depletion in plates with MRS agar (Himedia[®]) and isolated and identified by the API50CH identification kit. Once the strains were identified, conjugated dienes (DC) were determined by extraction with isopropanol, malondialdehyde (MDA) by the test for reactants with 2-thiobarbituric acid (TBARS), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) by means of a kit. commercial. The bacteria isolated in both feces and CD were *L. leuconostoc*, *L. plantarum* and *L. paracasei* and the results obtained in the bacteria isolated from faeces were as follows: DC 0.00174 ± 0.00005 mol / mg PT, MDA 0,36 ± 0.037 nmol / mg PT; GSH 7.7 ± 0.6 U / g PT; SOD 22.0 ± 1.5 U / g PT while for bacteria isolated from CD was 0.00172 ± 0.00003 DC; MDA 0.40 ± 0.27; GSH 8.9 ± 0.4; SOD 22.1 ± 2.3; without presenting significant differences between the location of the extraction of the sample in any of the parameters. Conclusion: the isolated bacteria showed high antioxidant activity which is not affected by the anatomical location.

Key words: *Lactobacillus* spp, antioxidants, feces, duodenal content.

INTRODUCCIÓN

Los probióticos constituyen una serie de microorganismos vivos que coexisten en equilibrio en diversos ambientes dentro de un hospedador sano, que ingeridos en cierta cantidad se integran a la microbiota del intestino para tener efectos benéficos sobre la salud del hospedero [1]; tienen la capacidad de adherirse a las células epiteliales del tracto gastrointestinal sin desplazar a su flora nativa, producir sustancias antimicrobianas y tener la capacidad de aumentar la respuesta inmune y el metabolismo del hospedero [2].

Los probióticos constituyen una serie de microorganismos y están constituidos principalmente por bacterias ácido láctico (BAL) del género: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, y *Saccharomyces* [2], estas bacterias conviven principalmente en el sistema digestivo de la mayoría de las especies animales superiores y corresponden a más del 90 % de la flora Bacteriana anaerobia estricta del intestino delgado y está constituida principalmente por bacterias del género *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* [3].

La microflora intestinal en los caninos y felinos es diversa y mantiene una estrecha relación simbiótica con el hospedero durante toda la vida y varía de acuerdo a la porción del intestino, edad del hospedero [4] y alimentación [5, 6]. Algunas de las BAL tienen la capacidad de producir factores importantes sobre la alimentación, salud del hospedero y están relacionadas directamente con estructuras linfoides organizadas en la mucosa del intestino delgado (placas de Peyer) lo que sugiere que las BAL modulan la respuesta inmunitaria gracias a la señalización química [7].

Otro de los efectos protectores asociados a las BAL constituye la capacidad antioxidante la cual fue demostrada en bacterias ácido láctico del género *Lactobacillus* aisladas de heces [8], esta capacidad antioxidante permite a la bacteria sobrevivir en ambientes adversos y además ofrece una resistencia adquirida para el hospedero ante el ataque de radicales libres provenientes de los estados inflamatorios e infecciosos [9]. Rodríguez y col., [10] demostraron la capacidad de las BAL de producir enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), como una forma de defensa ante la producción de Especies reactivas de oxígeno (ROS) presente en estados seniles y enfermedades. De igual manera Tang y col., [11] demostraron la capacidad de cepas de *Lactobacillus plantarum* ante la agresión de especies reactivas como el peróxido de hidrógeno, y concluyeron que sus principales mecanismos de defensa antioxidante estaban constituidos por la enzima SOD y glutatión peroxidasa

Existen varios estudios relacionados con la capacidad antioxidante de las BAL, pero pocos lo han determinado tomando en cuenta la regiones del

sistema digestivo de donde son aisladas, por tales motivos en esta investigación se planteó determinar si las BAL aisladas de contenido duodenal y de heces difieren en cuanto a la capacidad antioxidante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio fue realizado en el hospital Veterinario Dr. "Humberto Ramírez Daza", en el laboratorio de Microbiología y en la Unidad de Investigación en Ciencias Funcionales "Dr. Haity Moussachet" (UNIHM) del decanato de Ciencias Veterinarias, de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA).

Población y Muestra

Se escogieron al azar 15 caninos mestizos de 1-3 años de edad y 10 gatos mestizos de 2-3 años de edad, de los cuales se tomaron muestras tanto de heces como del contenido duodenal.

Recolección de muestra de Heces

Se recolectaron las muestras de heces directamente en el ano, con hisopo estéril que fue colocado en un tubo de vidrio con caldo de cultivo De Man Rogosa Sharpe (MRS) (Himedia®). El material se llevó a incubación a 37 °C por 48 horas en un equipo Precision Scientific Co., United States of America (USA)

Toma de muestra de Contenido Duodenal por aspiración

Los animales del estudio fueron sometidos a anestesia general con Isoflurano y se utilizó acepromazina (Promace®) y propofol (Propofol Spiva®) como inductor anestésico. Se realizó laparotomía exploratoria para ubicar la primera porción duodeno y realizar el aspirado del contenido intestinal con una inyectora estéril de 10 ml, el aspirado se colocó en un tubo de vidrio que contenía 4,5 ml de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (Himedia®). El material se llevó a incubación a 37 °C por 48 horas en un equipo Precision Scientific Co., United States of America (USA).

Cultivo de colonias bacterianas

Para el cultivo se extrajo mediante hisopo y se realizó siembra por agotamiento, directamente en placas con agar MRS (Himedia®). Se colocó cada una de las placas invertidas en una jarra de anaerobiosis (jarra de Dewards con vela) y se llevó a incubación a una temperatura de 37 °C por 48 horas (Precision Scientific Co., USA). También se tomó con un asa de platino 10 ml de la suspensión bacteriana del contenido duodenal

y se repitió el procedimiento de siembra e incubación, indicado arriba para el hisopo.

Aislamiento e identificación de las colonias bacterianas del género *Lactobacillus* spp.

Finalizada la incubación de 48 horas, mediante lupa estereoscópica se seleccionaron las colonias con las características del género para posteriormente realizar la prueba de la catalasa, en las que resultaron negativas a la prueba se procedió a realizar frotis y teñirlas con Gram para ser observadas con objetivo de inmersión de 100X en un microscopio Lieder Serie MC-300 (Portland, OR, EE.UU.). Para la identificación del género bacteriano se utilizó el kit de identificación API50CH. La lectura de las galerías del sistema API50CH se realizó a las 24 y 48 horas, de incubación a una temperatura de 37°C por 48 horas, en un equipo Precision Scientific (Co., EE.UU.).

Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo en el sobrenadante de células bacterianas del género *Lactobacillus* spp.

En el caso de los dienos conjugados (DC), éstos fueron extraídos con isopropanol y mediante el coeficiente de extinción molar 27000 M-1/L y fue calculada su concentración en moles/l para luego expresarlos en moles de DC/mg de proteínas [12]. El malondialdehído (MDA), producto final del proceso de lipoperoxidación, se determinó mediante el test para sustancias reaccionantes con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) [13]. Los resultados se expresaron en nmoles de MDA /mg de proteínas.

Las proteínas totales en el sobrenadante de células bacterianas del género *Lactobacillus* spp. fueron determinadas mediante el Kit Pierce modificado (Rockford, IL, EE.UU.) basado en la técnica de Bradford (1976). Para ello el reactivo de color reacciona con la proteína en medio ácido, simultáneamente ocurre un cambio de color de marrón a azul en la muestra, cuya absorbancia fue leída a 595 nm en un espectrofotómetro Genesys 5 (Rochester, NY, EE.UU.). El cálculo de la concentración de proteínas se realizó mediante una curva estándar obtenida con diluciones de una solución patrón de 2 mg/ml de albúmina sérica bovina, en un rango de 2,5 a 10 µg de proteínas.

Tabla 1.- Media y desviación estándar de niveles de DC, MDA, GHS y actividad de SOD de bacterias *Lactobacillus* spp aisladas de heces y contenido intestinal.

Grupo	DC (mol/mg PT)	MDA (nmol/mg PT)	GHS (U/g PT)	SOD (U/g PT)
Heces (n=10)	0,00174± 0,00005	0,36± ,037	7,7± 0,6	22,0± 1,5
CD (n=10)	0,00172± 0,00003	0,40± 027	8,9± 0,4	22,1± 2,3

Las bacterias de heces y contenido duodenal (CD) no presentaron diferencias significativas. Prueba t (p>0,05).

Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

Para la preparación de la muestra, dos asadas del cultivo fueron tomadas y colocadas en un tubo Eppendorf con 0,5 ml de buffer de lisis (20 mM de tris base, 1 mM de EDTA, 210 mM de manitol y 70 mM sacarosa a pH 7,2) frío y se mezcló en un vortex Thermoline® modelo 376000 por dos minutos, para luego ser centrifugada a 1500 X g por 10 minutos a 4°C en la microcentrifuga para tomar el sobrenadante de células bacterianas del género *Lactobacillus* spp. para la determinación de la SOD mediante el kit comercial (Cayman, EE.UU.).

Determinación de la concentración de Glutación Reducido en el sobrenadante de células bacterianas del género *Lactobacillus* spp.

Se tomó dos asadas del cultivo y se colocaron en un tubo Eppendorf con 0,5 ml de buffer de lisis (20 mM de tris base, 1 mM de EDTA, 210 mM de manitol y 70 mM sacarosa a pH 7,2) frío y mezclado en un vortex Thermoline® modelo 376000 por dos minutos, la muestra fué centrifugada a 1500 X g por 10 minutos a 4°C en la microcentrifuga y el sobrenadante de células bacterianas del género *Lactobacillus* spp. se utilizó para la determinación del glutación mediante el Kit para determinación de GSH (Calbiochem, EE.UU.).

Análisis de los resultados

Los datos fueron transcritos en el computador utilizando el paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows y analizados mediante Prueba t de Student (p<0,05).

RESULTADOS

Al realizar el estudio se pudo aislar *L. leuconostoc*, *L. plantarum* y *L. paracasei* tanto en heces como en contenido intestinal. En la tabla 1 se puede observar los niveles de dienos conjugados (DC), malondialdehído (MDA), actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) y glutación reducido (GHS) en bacterias *Lactobacillus* spp. aisladas de las heces y contenido intestinal, las cuales no presentaron diferencias significativas (p>0,05) en ninguno de los parámetros analizados.

DISCUSIÓN

Las BAL específicamente del género *Lactobacillus* spp han sido aisladas en diferentes hábitats, y requieren factores importantes para su crecimiento, tales como azúcares fermentables, productos hidrolizados de proteínas, vitaminas, baja tensión de oxígeno, entre otros [14]. Además, muestran características únicas que les permiten colonizar y sobrevivir en el tracto gastrointestinal de diferentes especies animales [15]. A pesar de que son microorganismos específicos de cada especie animal, en la actualidad se ha demostrado su utilización en diferentes animales y se ha hecho habitual su uso en diversas enfermedades infecciosas y en cuadros crónicos intestinales, inmunomodulación, biodisponibilidad de nutrientes, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, entre otras [16].

En esta investigación se aisló bacteria del género *Lactobacillus* spp. identificadas como de las especies de *L. leuconostoc*, *L. plantarum* y *L. paracasei* tanto en heces como en contenido intestinal. De igual manera, se ha aislado en perros adultos, bacterias con capacidad probiótica pertenecientes al género *Lactobacillus* spp. a partir de heces de perros adultos [17, 18] y las principales especies encontradas fueron: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus reuteri* [17]. Y en otras especies animales en heces (ternero, pato, pollo y cerdo), se aislaron y caracterizaron 14 cepas correspondientes al Género *Lactobacillus* spp, predominando los *L. acidophilus*, *L. delbrueki* y *L. rhamnosus* [19]. Por su parte, Kim y col. [17], que trabajaron con cerdos, reportaron que las principales BAL aisladas en heces fueron de las cepas *L. salivarius*, *Bifidobacterium thermacidophilum*, *L. reuteri* y *L. amylovorus*.

En cuanto los parámetros de estrés oxidativo no hubo diferencias significativas entre las dos cepas de *Lactobacillus*, lo que indica que no existe un aumento significativo de las concentraciones de DC y MDA que son factores importantes presentes en estados inflamatorios del intestino delgado, hallazgos similares encontraron Fabian y Elmalfa [20] en el uso de probióticos y cepas de *lactobacillus casei*, lo que sugiere que existe una red antioxidante importante que evita la formación de ROS y protege a la célula del ataque de los mismos.

En esta investigación se determinó que las bacterias aisladas del género *Lactobacillus* spp presentan actividad de la enzima antioxidante SOD, tal como han sido reportado por diferentes investigadores, con el fin de neutralizar los radicales libres (RL) [21]. Saide y Gilliland, elemento que le permite su supervivencia en el tracto digestivo [22]. La actividad enzimática de la SOD tanto en heces (22,0 U/g PT \pm 1,5) como contenido duodenal (22,1 \pm 2,3 U/g PT) presentó mayor actividad a la reportada por Kullisaar y col. [23] con niveles de 0,854 \pm 0,309 y 0,761 \pm 0,014 U/mg de

proteína, pero en otro tipo de cepa bacteriana (*Lactobacillus fermentum*), lo que pudiera inferir que las especies aisladas en esta investigación (*L. leuconostoc*, *L. plantarum* y *L. paracasei*) poseen mayor capacidad antioxidante, tal como fue observado con el *L. plantarum*, el cual puede tolerar peróxido de hidrógeno hasta 2,0 mM in vitro con capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica [11, 24].

En esta investigación se determinó la presencia de glutatión (GSH) en las cepas aisladas (*L. leuconostoc*, *L. plantarum* y *L. paracasei*) tanto en heces como en contenido duodenal, al igual que lo reportado por Yoon y Byun, [25] (2004). Elemento importante debido a que estudios realizados en *L. fermentum*, muestran que son capaces de sintetizar GSH, incluso con un sistema completo de glutatión: síntesis, absorción y capacidad de rotación redox; esta característica hace que *L. fermentum* tenga efecto protector contra el estrés oxidativo [23], lo cual se demostró al administrar *L. fermentum* como probiótico al modelo de colitis en rata, facilitando la recuperación del tejido inflamado, efecto que ha sido asociado por incremento de los niveles de glutatión [26].

CONCLUSIÓN

Las bacterias aisladas presentaron alta actividad antioxidante la cual no es afectada por la ubicación anatómica.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" bajo el código N° 010-VE-2012.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Metchnikoff E. 1908. The prolongation of life; optimistic stu dies. Editorial Putnams Sons. New York/Londres. páginas
- [2] Castro, L. A.; De Rovetto, C.. Probióticos: Utilidad Clínica. Colombia Med 2006; 37 (4):308-314.
- [3] Tournut J,. Perspective de Developpement des Probiotiques Á Base e Bactéries Lactiques: Bactéries lactiques. Fondamentaux et Technologiques 1994; 2:471-488. Francia.
- [4] Wu G, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y, Keilbaugh S. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. Science 2011; 334:105–8.
- [5] Benno Y, Nakao H, Uchida K, Mitsuoka T. 1992. Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs. J Vet Med Sci 1992; 54(4):703-6.

- [6] Yatsunenkov, T; Rey F; Manary, M; Trehan, I; Dominguez-Bello, M; Contreras, M. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature. Nature Publishing Group, a division of Macmillan. Publishers Limited. All Rights Reserved 2012; 486: 222–7.
- [7] Guarner F, Khan A, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, Krabshuis J, Lemair T. 2011. Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-spanish-2011.pdf>
- [8] Duwat, P.. Stress responses pathways in *Lactococcus lactis*. Recent Res devel Microbiol 1999; 3:335-348.
- [9] Bengmark S. y. Gil Á. Control bioecológico y nutricional de la enfermedad: prebióticos, probióticos y simbióticos. Nutr. Hosp. 2006; 21:(2):73-86.
- [10] Yeimy Alejandra Rodríguez R, Andrés Felipe Rojas G, Sneyder Rodríguez B. Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias. Revista Biosalud 2016; 15(2): 106-115
- [11] Tang W, Xing Z, Li C, Wang J, Wang Y. 2017. Molecular mechanisms and in vitro antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* MA2. Food Chem. 2017 15;221:1642-1649. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.124. Epub 2016 Oct 27.
- [12] Wallin B, Rosengren B, Shertzer H, Camejo G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. Anal Biochem 1993; 208: 10-15.
- [13] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95: 351-358.
- [14] Dellaglio, F; De Roissart, H; Torriani, S; Curk, M; Janssens, C. 1994. Caractéristiques Générales des Bactéries lactiques. En: Bactéries Lactiques. Vol. I. Loric. 25-116 pp.
- [15] Gaschen, F. 2007. Bacteria and the Canine and Feline Gut: The Good, the Bad, and the Ugly. School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA. NAVC Proceedings. URL :<http://www.ivis.org>. (Consulta: Diciembre de 2010).
- [16] Marteau, P; Vrese, CJ; Cellier; Schrezenmeir, J.. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics.. Am J Clin Nut 2001;73: 430-436.
- [17] Kim, S; Owaga, Y; Adachi Y. Canine Intestinal Lactic Acid Bacteria Agglutinated with Concanavalin., J.Vet. Med. Sci. 2006; 68 (12): 1351-1354.
- [18] Perelmutter K, Fraga M, Zunino P. In vitro activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. Journal of Applied Microbiology. 2008; 104(6):1718–1725.
- [19] Avila, J, Avila M, Tovar B, Perazzo Y, Brizuela M, Hernadez H. Capacidad Probiótica de Cepas Del Género *Lactobacillus* Extraídas Del Tracto Intestinal de Animales de Granja. Revista Científica, FCV-LUZ. 2010. XX(2) 161 –169.
- [20] Fabian E, Elmadfa I. The effect of daily consumption of probiotic and conventional yoghurt on oxidant and anti-oxidant parameters in plasma of young healthy women. Int J Vitam Nutr Res. 2007; 77 (2): 79-88.
- [21] Gaschen, F. 2007. Bacteria and the Canine and Feline Gut: The Good, the Bad, and the Ugly. School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA. NAVC Proceedings. URL :<http://www.ivis.org>. (Consulta: Diciembre de 2010).
- [22] Saide J, Gilliland S. Antioxidative Activity of lactobacilli Measured by Oxygen Radical Adsorbance Capacity.1: J Dairy Sci 2005; 88(4):1352-7.
- [23] Kullisaar, T; Songisepp E; Aunapuu, M; Kilk, K; Arend, A; Mikelsaar, M; Rehema, M; Zilmer, M. 2010. Complete glutathione system in probiotic *Lactobacillus fermentum* ME3. Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia 2010;46(5):527–531.
- [24] Tang W, Xing Z, Hu H, Li C, Wang J, Wang Y. 2016. Antioxidative effects in vivo and colonization of *Lactobacillus plantarum* MA2 in the murine intestinal tract. Apply Microbial Biotechnology. 2016;100(16):7193-202.
- [25] Yoon Yung H; Byun Jung R. 2004. Occurrence of Glutathione Sulphydryl (GSH) and Antioxidant Activities in Probiotic *Lactobacillus* spp. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2004; 17(11):1582-1585.
- [26] Peran L, Sierra S, Comalada M, Lara-Villoslada F, Bailón E, Nieto A, Concha A, Olivares M, Zarzuelo A, Xaus J, Gálvez J. A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis.Br J Nutr. 2007;97(1):96-103.