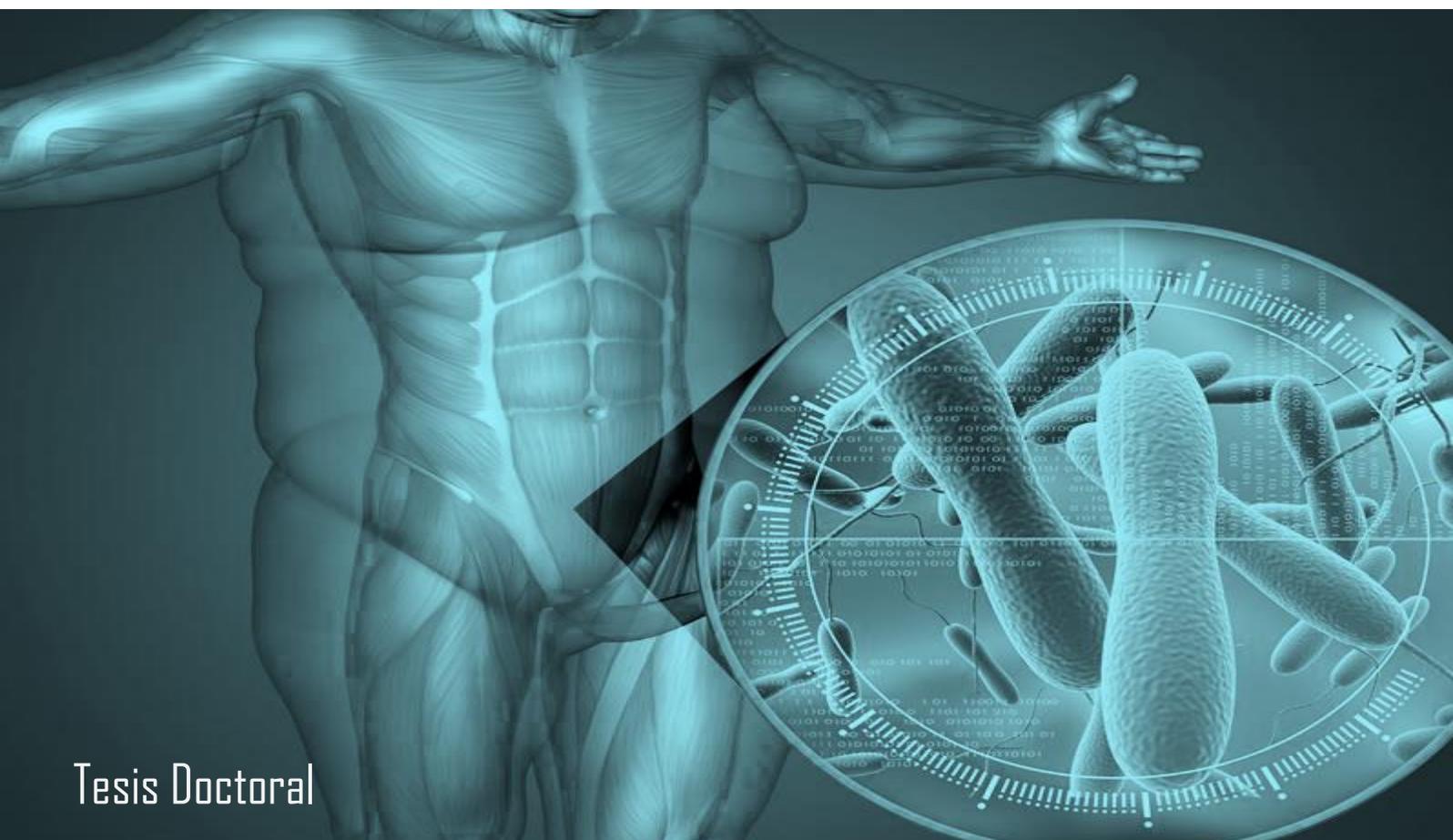


# “EMPLEO DE BACTERIAS LÁCTICAS CON ACTIVIDAD CINAMIL ESTERASA COMO ESTRATEGIA NUTRICIONAL PARA LA PREVENCIÓN DEL SÍNDROME METABÓLICO”



Tesis Doctoral

Lic. Matias Irineo Russo



2018



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN**  
**FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA**  
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169 T4000CAN  
San Miguel de Tucumán – República Argentina



## HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Mg. Marta Adriana Correa Zeballos  
Dr. Manuel Javier Aybar  
Dra. Viviana Andrea Rapisarda  
BQ. Esp. Ana Verónica Oldano  
Dra. Ana Lucrecia Iruzubieta Villagra  
Dra. María Antonieta Gordillo  
BQ. Vanesa Estela Quiroga  
Sr. Mario Luis Rodriguez  
Sr. Joaquin Hernán Vargas  
Sra. Elizabeth Abigail Gutierrez  
Sra. Karen Nahir Rios

## DECANO

Dr. Edgardo Hugo Cutin

## VICE-DECANO

Dra. Inés del Carmen Ramos

## SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS

Dra. Marta Elena Cecilia de Castillo

## JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Marta Quinteros



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN  
**FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA**  
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169 T4000CAN  
San Miguel de Tucumán – República Argentina



## DEPARTAMENTO DE POSGRADO

### AUTORIDADES

#### DIRECTOR

Dr. Sergio Enrique Pasteris

#### CONSEJO TITULAR

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. María Carolina Navarro

Dra. María Cristina Gaudioso

Dra. Paula Andrea Vincent

Dra. María Cristina Rubio

#### CONSEJO SUPLENTE

MG María Graciela Benzal

Dra. Clara del Valle Silva de Ruiz

Dra. María Inés Nieva Moreno

Dra. Claudia Alejandra Crespo

Dra. María Angélica Veliz

#### REPRESENTANTE DE POSGRADO ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dra. Paula Andrea Vincent



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN  
**FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA**  
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169 T4000CAN  
San Miguel de Tucumán – República Argentina



TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO  
SUPERIOR DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

**CARRERA DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA**

Acreditado y Categorizado A ante la  
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)  
Resolución nº: 732/00

Acreditado y Categorizado A ante la  
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)  
Resolución nº: 489-CONEAU-12

**DIRECTOR**

Dr. Manuel Javier Aybar

**COMITÉ ACADÉMICO**

Dra. Aida Ben Altabef

Dra. Gladis Susana Álvarez

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. Roxana Beatriz Medina

Dr. Raúl Armando Salomón



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN  
**FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA**  
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169 T4000CAN  
San Miguel de Tucumán – República Argentina



TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

**“EMPLEO DE BACTERIAS LÁCTICAS CON ACTIVIDAD CINAMIL ESTERASA COMO  
ESTRATEGIA NUTRICIONAL PARA LA PREVENCIÓN DEL SÍNDROME METABÓLICO”**

**TESISTA**

Lic. Matias Irineo Russo

**DIRECTORA**

Dra. Roxana Beatriz Medina

**CO-DIRECTORA**

Dra. María Paola Gauffin Cano

**COMISIÓN DE SUPERVISIÓN**

Dra. María Claudia Abejón Mukdsi

Dra. Stella Maris Honoré

Esta Tesis Doctoral se desarrolló en el **Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)**, dependiente de CONICET, de la Fundación Miguel Lillo y de la Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura (FECIC).



El presente trabajo de investigación contó con el apoyo financiero a través de subsidios y becas provistos por las siguientes instituciones:

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica a través del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT) (ANPCYT)

Universidad del Norte Santo Tomás de Aquino (UNSTA)

Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT)

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral dieron lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones científicas:

### Artículos en revistas científicas con referato

-*Lactobacillus fermentum* CRL1446 ameliorates oxidative and metabolic parameters by increasing intestinal feruloyl esterase activity and modulating microbiota in caloric-restricted mice. *Nutrients*, 8 (7), 415. **Russo, M.**, Fabersani, E., Abeijón-Mukdsi, M. C., Ross, R., Fontana, C., Benítez-Páez, A., & Medina, R. B. (2016).

-Modulation of intestinal microbiota and IMMUNO-metabolic parameters by caloric restriction and lactic acid bacteria. *Food Research International*. Fabersani, E., **Russo, M.**, Marquez, A., Abeijón-Mukdsi, C., Medina, R., & Gauffin-Cano, P. (2018).

-Microencapsulated feruloyl esterase producing lactobacilli ameliorate lipid profile and glycemia in high fat diet-induced obese mice. *Beneficial Microbes*. **Russo, M.**, Marquez, A., Abeijón-Mukdsi, M. C., Santacruz, A., López-Malo A., Gauffin-Cano, P., & Medina, R., (2018).

### Comunicaciones científicas

-Antioxidant compound release by cinnamoyl esterases of probiotic lactic acid bacteria. **M. I. RUSSO**, L. SAAVEDRA, C. ABEIJÓN MUKDSI, P. GAUFFIN CANO, R. MEDINA. Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE. Córdoba. Argentina. (05 - 07/08/2015)

-Effect of probiotic administration on biochemical parameters and intestinal microbiota in caloric restriction. FABERSANI E., **RUSSO M.**, ROSS R., MEDINA, R., GAUFFIN CANO P. 51° Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Mar del Plata, República Argentina (03 - 06/11/2015)

-Effect of oral administration of microencapsulated lactic acid bacteria in a metabolic syndrome murine model. **M. RUSSO**, A. MARQUEZ, M.C. ABEIJÓN MUKDSI, A. SANTACRUZ, A. LÓPEZ-MALO, P. GAUFFIN CANO, R. MEDINA. V International Symposium on Lactic Acid Bacteria. CERELA – CONICET. Tucumán, Argentina (19 - 21/10/2016).

-Efecto de la administración oral de lactobacillus fermentum CRL1446 en un modelo murino de síndrome metabólico. **RUSSO M.**, MARQUEZ A., GAUFFIN CANO P., MEDINA R. VI Congreso de Alimentos, Nutrición y Salud. XXXIX Reunión del Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (CASLAN). Tucumán, Argentina (20 -22/10/2016).

-Determinación de actividad esterasa de quesos de cabra fabricados con fermentos lácticos autóctonos adjuntos. GUZMÁN F, **RUSSO M**, CISINT JC, MEDINA R, OLISZEWSKI R. VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Córdoba, Argentina (02 - 05 de Noviembre de 2016).

-Evaluation of Antiradical Capacity of Feruloyl Esterase- Producing Lactobacillus Strains and Maintenance of Enzymatic Activity After Exposure To Gastrointestinal Tract Conditions. **MATIAS I RUSSO**, CLAUDIA ABEIJÓN MUKDSI, ADRIANA PEREZ CHAIA, PAOLA GAUFFIN CANO, ROXANA MEDINA. XII Congreso Argentino De Microbiología General – SAMIGE. Tucumán, Argentina (02 - 04/08/2017).

-Safety Characterization of Lactobacillus Strains. EMANUEL FABERSANI, **MATIAS I RUSSO**, ROXANA MEDINA, CLAUDIA ABEIJÓN MUKDSI, PAOLA GAUFFIN CANO. XII Congreso Argentino De Microbiología General – SAMIGE. Tucumán, Argentina (02 - 04/08/2017).

-Effect Of Different Carbon Sources On Growth And Feruloyl Esterase Activity of Probiotic Lactobacilli. ABEIJÓN MUKDSI,M.C.; **RUSSO,M.I.**; GAUFFIN CANO,M.P.; PEREZ CHAIA, A.; MEDINA, R.B. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos-12º SLACA. Campinas- SP, Brasil (04 – 07/11/2017).

-Modulation of Gut Microbiota by Caloric Restriction and Lactic Acid Bacteria. FABERSANI, E.; **RUSSO, M.**; MARQUEZ, A.; ROSS, R.; ABEIJÓN-MUKDSI, C., MEDINA, R. AND GAUFFIN-CANO, P. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos-12º SLACA. Campinas- SP, Brasil (04 – 07/11/2017).

-Efecto hipoglucemiante e hipolipemiante de bacterias lácticas con actividad feruloil esterasa en un modelo murino de síndrome metabólico. **M. RUSSO**, M.C. ABEIJÓN MUKDSI, A. MÁRQUEZ, P. GAUFFIN CANO, R.B. MEDINA. 12ª REUNIÓN DE LA RED ESPAÑOLA DE BACTERIAS LÁCTICAS. Participación de las bacterias lácticas en la salud humana y en la calidad y seguridad alimentaria. Sevilla -España (17 - 18/05/2018)

*“Nada en la vida es para ser temido, es solo para ser  
comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo  
que podamos temer menos”*

*Marie Curie (1867 - 1934)*

*A Mirta y Carlos, mis raíces.*

*A Valentino, mi fruto.*

## AGRADECIMIENTOS

A mi directora: *Dra. Roxana Medina*, por haberme acompañado, dirigido y aconsejado, enseñándome con sus acciones que lo verdaderamente profesional en esta vida es el respeto, la paciencia y la humildad.

A mi codirectora: *Dra. Paola Gauffin Cano*, por apoyar cada etapa de este trabajo con optimismo; por su generosidad, confianza y amabilidad.

A la *Dra. Claudia Abejón Mukdsi*, por su enorme colaboración; por su calidez humana que me han transmitido confianza y serenidad, alentándome a continuar.

A la *Dra. Stella Honoré*, por su compromiso, disponibilidad, buena predisposición y acertadas sugerencias.

A la directora de CERELA, *Dra. Pérez Chaia*, por su apoyo y colaboración.

Al *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)*, por los aportes económicos recibidos que posibilitaron el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

A la *Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia* de la *Universidad Nacional de Tucumán*, por brindarme formación académica y la posibilidad de realizar el Doctorado.

Al *Departamento de Posgrado* de la *Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia* de la *Universidad Nacional de Tucumán*; muy especialmente a la *Lic. Marta Quinteros*, por su gentileza; a *Carlos Puig*, por su permanente atención; y al director, *Dr. Sergio Pasteris*, por su cordialidad.

A los *Dres. Jean Guy Le Blanc, Alejandra de Moreno, Lucila Saavedra y Elvira Hebert*, por su ayuda, amabilidad y generosidad.

A la *Dra. Pía Taranto*, por su calidez y empatía.

A los *Dres. Aurelio López Malo y Arlette Santacruz*, por abrirme las puertas de la UDLAP y de su laboratorio, haciéndome sentir como en casa.

A la *Lic. Antonela Márquez*, por trabajar lado a lado desde el primer día; por su compañerismo, solidaridad, y complicidad.

A los *Dres. Raúl Raya, Virginia Rodríguez, Marisa Garro, Vicky Martos, Carolina Maldonado, Silvia Cazorla, Silvina Fadda, y Jorge Palacios*, por su buen trato.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Ecofisiología Tecnológica P.A. (128): *Gabriel, Estefanía, Agustina, Antonela y Sofía*; por hacer que mi lugar de trabajo sea también un lugar de disfrute diario; por escucharme, contenerme, y alentarme.

A *Emanuel Fabersani, Victoria Terán y Romina Ross*, por inspirarme confianza y enseñarme a transitar este camino con actitud positiva, sin temores y aceptando los desafíos.

A *Alejandra Orihuel*, por su amistad y genuinidad; por entender cada uno de mis gestos y mostrarme que la sencillez es algo grandioso.

A *Alejandra Correa Deza, Romina Levit, Patricia Clúa, Lucrecia Terán y Luciana Ruiz Rodríguez*, por los momentos compartidos, la buena onda y el afecto.

A *Antonieta Rodríguez de Olmos*, por su tiempo y ayuda desinteresada en reiteradas ocasiones.

A mis queridas compañeras: *Mile., Magui, Anto, Jessi, Emi, Flor, Dai, Caro, Barby y Majo*, por los lindos momentos, las risas y el apoyo.

A *Verónica Molina, José Luis Alvarado y Eduardo Álvarez*, por su buena voluntad y todas las atenciones en las tareas del bioterio.

A *Carolina Paz*, por su cariño y amabilidad.

A *Mabel Taljuk*, por su colaboración y por su hermosa energía.

A todo el *personal de CERELA*, por haberme tendido una mano en tantas oportunidades y por los momentos compartidos.

A *mis amigos*, por la paciencia, el estímulo, la comprensión y el afecto.

A *Yoli y Emilio*, por sus palabras que equilibran y amansan.

A *Soledad*, por su apoyo incondicional que trasciende tiempo y espacio.

A *Oscar*, por infundirme aliento.

A *mis padres y mi hermano*, por no soltarme.

A *mi hijo*, por impulsarme.

A *Dios*, por cobijarme.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN/ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
Resumen.....	2
Abstract.....	4
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>1- SÍNDROME METABÓLICO.....</b>	<b>7</b>
1.1- Antecedentes.....	7
1.2- Definición del SM.....	10
1.2.1- Obesidad central.....	15
1.2.2- Resistencia a la insulina (RI).....	16
1.2.3- Dislipidemia.....	16
1.2.4- Hipertensión.....	17
1.2.5- Estado proinflamatorio y protrombótico.....	17
1.3- Microbiota intestinal y SM.....	18
1.4- Probióticos y SM.....	19
<b>2- BACTERIAS LÁCTICAS.....</b>	<b>20</b>
<b>3- CINAMIL ESTERASAS.....</b>	<b>22</b>
<b>4- ÁCIDO FERÚLICO.....</b>	<b>26</b>
4.1- Actividad antioxidante del AF.....	29
4.2- Actividad antiinflamatoria del AF.....	31
4.3- Actividad antimicrobiana del AF.....	31
4.4- AF como agente anticancerígeno.....	32
4.5- AF como agente antidiabético.....	32
4.6- AF como agente hipocolesterolémico.....	32
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
Objetivo General.....	35
Objetivos Específicos.....	35
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....</b>	<b>37</b>
1- Microorganismos.....	37
2- Medio y condiciones de cultivo.....	39
3- Conservación de los cultivos.....	40
4- Esterilización de los medios de cultivo.....	40
5- Análisis estadístico.....	40

<b>MATERIALES Y MÉTODOS - CAPÍTULO I.....</b>	<b>41</b>
I.1- Selección de BL con actividad feruloil esterasa (FE) mediante ensayos in vitro.....	41
I.1.1- Evaluación cualitativa de la actividad FE.....	41
I.1.2- Evaluación cuantitativa de la actividad FE.....	41
I.1.3- Determinación de ácido ferúlico (AF) y sus ésteres.....	42
I.1.4- Evaluación del crecimiento bacteriano.....	42
I.2- Influencia de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento de BL.....	42
I.3- Influencia de diferentes fuentes de carbono sobre la actividad FE de BL.....	43
I.3.1- Obtención de suspensiones celulares.....	43
I.3.2- Determinación de actividad FE.....	43
I.4- Resistencia de las BL a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.....	43
I.5- Hidrólisis de la fibra de salvado de trigo.....	44
I.5.1- Liberación de AF a partir de salvado pre-tratado con xilanasa.....	44
<b>MATERIALES Y MÉTODOS - CAPÍTULO II.....</b>	<b>46</b>
II.1- Análisis composicional de dietas comerciales para ratones.....	46
II.2- Formulación de DRG suplementada con salvado de trigo.....	47
II.3- Estandarización de un modelo experimental de Síndrome Metabólico (SM).....	47
II.3.1- Animales y dieta.....	47
II.3.2- Peso Corporal.....	48
II.3.3- Glucemia.....	48
II.3.4- Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG).....	48
II.3.5- Sacrificio y obtención de plasma.....	49
II.3.6- Perfil Lipídico.....	49
<b>MATERIALES Y MÉTODOS - CAPÍTULO III.....</b>	<b>50</b>
III.1- Administración oral de las BL seleccionadas.....	50
III.1.1- Preparación de las suspensiones de BL.....	50
III.1.2- Animales, dieta y administración de las BL.....	50
III.2- Ganancia de peso corporal y Eficiencia alimentaria.....	51
III.3- Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG).....	52
III.4- Prueba de Tolerancia Oral a la Sacarosa (PTOS).....	52
III.4.1- Inhibición de la actividad $\alpha$ -glucosidasa.....	52
III.5- Sacrificio y obtención de plasma.....	53
III.6- Recolección de órganos.....	53
III.7- Preparación de extractos de hígado.....	53
III.7.1- Determinación de actividad Glutación Peroxidasa (GPx).....	53
III.7.2- Determinación de actividad Glutación Reductasa (GR).....	54
III.8- Determinación de lipoperoxidación en plasma.....	54
III.8.1- Determinación de proteínas en plasma.....	55

III.9- Obtención de contenido de colon.....	55
III.9.1- Determinación de actividad Feruloil Esterasa (FE) intestinal.....	55
III.9.2- Producción de ácidos grasos de cadena corta en contenidos de colon.....	56
III.9.3- Detección de metabolitos de AF en contenidos de colon.....	56
III.10- Ensayos bioquímicos.....	57
III.11- Índices de riesgo cardiovascular.....	57
III.12- Índice HOMA de resistencia a la insulina (HOMA-IR).....	57
III.13- Evaluación del estado inflamatorio.....	58
III.14- Análisis histopatológico.....	58
III.14.1- Evaluación del tamaño de adipocitos.....	58
III.15- Evaluación de la microbiota intestinal por qPCR.....	59
III.16- Ensayo de translocación bacteriana.....	60
<b>MATERIALES Y MÉTODOS - CAPÍTULO IV.....</b>	<b>61</b>
IV.1- Microencapsulación de BL con actividad FE.....	61
IV.1.1- Microorganismos.....	61
IV.1.2- Método de microencapsulación.....	61
IV.2- Evaluación de la viabilidad de las BL.....	62
IV.2.1- Viabilidad de las cepas antes y después del secado.....	62
IV.2.2- Viabilidad durante el almacenamiento de las microcápsulas.....	62
IV.3- Evaluación de la actividad FE.....	62
IV.3.1- Detección de actividad FE de BL antes y después del secado.....	62
IV.3.2- Determinación de actividad FE en microcápsulas almacenadas a 4°C.....	63
IV.4- Resistencia de las microcápsulas a las condiciones simuladas del TGI.....	63
IV.5- Administración de las microcápsulas en un modelo experimental de SM en ratón.....	63
IV.5.1- Animales, dieta y administración de las microcápsulas.....	63
IV.5.2- Sacrificio y obtención de plasma.....	64
IV.5.3- Recolección de órganos.....	65
IV.5.4- Preparación de extractos de hígado.....	65
IV.5.5- Actividad Glutación Peroxidasa (GPx) y Glutación Reductasa (GR).....	65
IV.5.6- Actividad FE intestinal.....	65
IV.5.7- Ensayos bioquímicos .....	65
IV.5.8- Análisis histopatológico.....	66
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>BACTERIAS LÁCTICAS CON ACTIVIDAD FERULOIL ESTERASA .....</b>	<b>67</b>
I.1- Selección de BL con actividad feruloil esterasa (FE) mediante ensayos in vitro.....	69
I.1.1- Evaluación cualitativa de la actividad FE.....	69
I.1.2- Evaluación cuantitativa de la actividad FE.....	70
I.1.3- Evaluación del crecimiento bacteriano en presencia de EtF.....	73

1.1.4- Evaluación de la capacidad de hidrólisis de hidroxycinamatos del salvado de trigo.....	74
I.2- Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre las BL con actividad FE.....	75
I.2.1- Influencia de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento de BL.....	75
I.2.2- Influencia de diferentes fuentes de carbono sobre la actividad FE de BL.....	76
I.3- Resistencia de las BL a condiciones del tracto gastrointestinal (TGI).....	78
I.3.1- Efecto de las condiciones del TGI sobre la viabilidad de las BL.....	78
I.3.2- Efecto de las condiciones del TGI sobre la actividad FE de las BL.....	79
I.4- Discusión.....	81

## **CAPÍTULO II**

<b>ESTANDARIZACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICO .....</b>	<b>87</b>
II.1- Dietas para ratones.....	89
II.2- Estandarización del modelo experimental de SM.....	90
II.2.1- Peso Corporal.....	91
II.2.2- Glucemia en ayunas.....	92
II.2.3- Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG).....	94
II.2.4- Perfil Lipídico.....	95
II.3- Discusión.....	97

## **CAPÍTULO III**

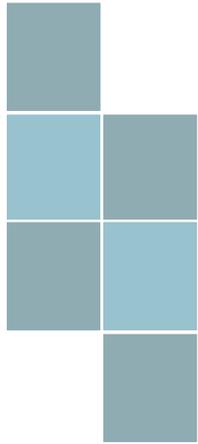
<b>ADMINISTRACIÓN ORAL DE BACTERIAS LÁCTICAS CON ACTIVIDAD FE EN UN MODELO MURINO DE SINDROME METABÓLICO.....</b>	<b>103</b>
III.1- Ensayo de translocación bacteriana a las 14 semanas.....	105
III.2- Efecto de la administración de BL con actividad FE sobre la ganancia de peso corporal (GPC).....	105
III.3- Efecto de la administración de BL con actividad FE sobre el índice de eficiencia alimentaria (EA).....	107
III.4- Efecto sobre el índice de adiposidad y tamaño de los adipocitos.....	107
III.5- Efecto sobre los niveles de leptina.....	111
III.6- Efecto de la DRG+s y de la administración de BL con actividad FE sobre el estado inflamatorio de los ratones.....	111
III.7- Efecto de la administración de BL con actividad FE sobre la acumulación de grasa en el hígado y actividades de transaminasas.....	112
III.8- Perfil lipídico e indicadores de riesgo cardiovascular.....	115
III.9- Prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG).....	117
III.10- Efecto de la administración de BL con actividad FE sobre los niveles de glucosa e insulina en ayunas.....	119
III.11- Evaluación del efecto antihiper glucémico de las BL con actividad FE.....	120
III.11.1- Prueba de tolerancia oral a la sacarosa (PTOS).....	120
III.11.2- Prueba de inhibición de la actividad $\alpha$ -glucosidasa por las cepas seleccionadas.....	121

III.12- Efecto de la administración de las BL sobre la actividad FE intestinal .....	122
III.13- Detección de metabolitos derivados del AF en contenidos de colon .....	123
III.14- Producción de ácidos grasos de cadena corta en contenidos de colon.....	125
III.15- Evaluación de la microbiota intestinal mediante PCR en tiempo real (qPCR).....	126
III.16- Efecto de la administración oral de las BL con actividad FE sobre el estado oxidativo de los ratones con SM.....	127
III.17- Discusión.....	129
-Efecto sobre GPC, EA y adiposidad.....	130
-Niveles de adipoquinas y estado inflamatorio.....	132
-Histología hepática y transaminasas.....	133
-Perfil lipídico e indicadores de riesgo cardiovascular.....	134
-Metabolismo de la glucosa e inhibición de la actividad $\alpha$ -glucosidasa.....	135
-Actividad FE y liberación de AF .....	136
-Metabolitos del AF.....	138
-Producción de AGCC.....	139
-Microbiota intestinal (MI).....	140
-Estado oxidativo.....	143

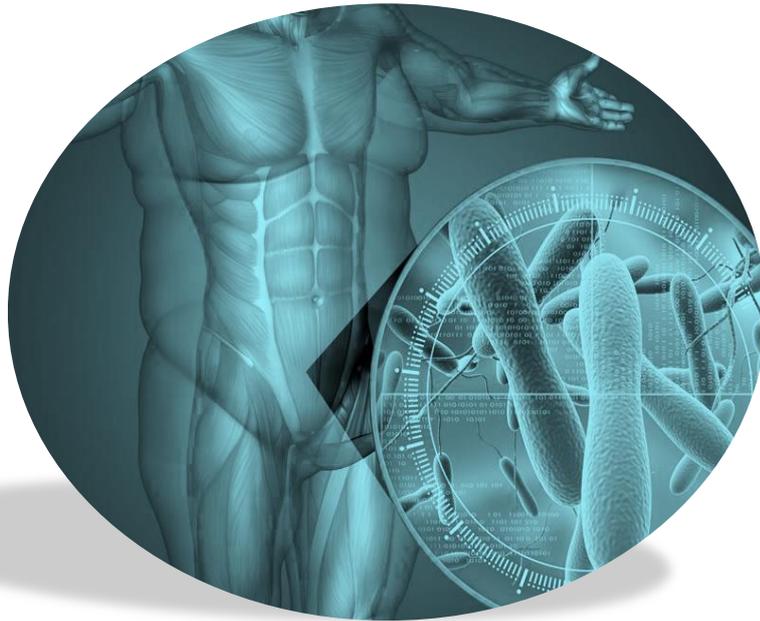
## CAPÍTULO IV

<b>ESTUDIOS TECNOLÓGICOS PRELIMINARES: MICROENCAPSULACIÓN.....</b>	<b>146</b>
IV.1- Microencapsulación de bacterias lácticas con actividad FE.....	148
IV.2- Evaluación de la viabilidad de las BL.....	149
IV.2.1- Viabilidad de las cepas antes y después del secado.....	149
IV.2.2- Viabilidad durante el almacenamiento de las microcápsulas.....	149
IV.3- Evaluación de la actividad FE.....	150
IV.3.1- Detección de actividad FE de BL antes y después del secado.....	150
IV.3.2- Determinación de actividad FE en microcápsulas almacenadas a 4°C.....	151
IV.4- Resistencia de las bacterias microencapsuladas a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal (TGI).....	152
IV.5- Administración oral de las microcápsulas en un modelo experimental de SM.....	155
IV.5.1- Efecto de la administración de BL microencapsuladas sobre la ganancia de peso corporal (GPC) y eficiencia alimentaria (EA).....	155
IV.5.2- Efecto de la administración de BL microencapsuladas sobre el índice de adiposidad y los niveles de leptina.....	156
IV.5.3- Efecto de la administración de BL microencapsuladas sobre la acumulación de grasa en el hígado.....	157
IV.5.4- Efecto de la administración de BL microencapsuladas sobre el perfil lipídico e índices de riesgo cardiovascular.....	158
IV.5.5- Prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG).....	160
IV.5.6- Efecto de la administración de BL microencapsuladas sobre los niveles de glucosa e insulina en ayunas.....	161

IV.5.7- Efecto de la administración de BL microencapsuladas sobre la actividad feruloil esterasa (FE) intestinal.....	162
IV.5.8- Efecto de la administración de BL microencapsuladas sobre el estado oxidativo de los ratones.....	163
IV.6- Discusión.....	164
CONCLUSIONES.....	173
PROYECCIONES.....	176
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	178
BIBLIOGRAFÍA.....	183



# RESUMEN ABSTRACT



## RESUMEN

Las cinamil esterasas (CE) son enzimas responsables de la liberación de ácidos hidroxicinámicos a partir de sus formas esterificadas presentes en la pared celular de cereales, frutas y verduras. Entre éstos ácidos, se encuentra el ácido ferúlico (AF), el cual es un compuesto fenólico con demostrada actividad antioxidante, hipoglucemiante e hipolipemiante, que puede ser empleado en diferentes enfermedades metabólicas. El Síndrome Metabólico (SM) es un conjunto de alteraciones metabólicas caracterizado principalmente por la presencia de obesidad abdominal, aumento de las concentraciones de triglicéridos, disminución de las concentraciones de HDL-colesterol, hipertensión arterial e hiperglucemia. El SM incrementa el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y diabetes tipo 2, de manera que se ha convertido en un problema de salud pública importante en todo el mundo. El objetivo de este trabajo de tesis doctoral fue evaluar el empleo de bacterias lácticas (BL) con actividad CE en un modelo murino de SM. Se estudiaron 40 cepas de BL de las cuales se seleccionaron *Lactobacillus fermentum* CRL1446 (Lf CRL1446) y *Lactobacillus johnsonii* CRL1231 (Lj CRL1231) por su capacidad de liberar AF a partir de sustratos sintéticos y de salvado trigo, presentando alta actividad feruloil esterasa (FE). Estas bacterias resistieron las condiciones del tracto gastrointestinal manteniendo tanto la viabilidad como su actividad FE, por lo cual fueron elegidas para realizar los estudios *in vivo*. Para ello se utilizaron ratones Albinos Suizos machos de 6 semanas de edad, los cuales fueron divididos en 4 grupos y alimentados diariamente durante un período de 14 semanas con una dieta convencional (grupo control) y una dieta rica en grasa suplementada con de salvado de trigo (3 grupos SM). Los ratones recibieron mediante gavage: agua (grupo control y grupo SM), Lf CRL1446 (grupo SM+Lf) y Lj CRL1231 (grupo SM+Lj). La dosis de administración fue de  $10^8$  UFC/día/ratón. En los 4 grupos de estudio se determinaron: ganancia de peso corporal (GPC), índice de adiposidad (IAd), eficiencia alimentaria (EA), actividad FE intestinal y parámetros metabólicos (niveles

plasmáticos de glucosa, insulina, leptina, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol y triglicéridos). Además se realizó la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) y se determinó en contenidos de intestino grueso la producción de ácidos orgánicos y de metabolitos derivados del AF. Los resultados mostraron que la GPC, el IAd, la EA, los niveles plasmáticos de colesterol total, LDL-colesterol, triglicéridos, glucosa, insulina y leptina, como así también el área bajo la curva en la PTOG, tuvieron un aumento significativo en el grupo SM con respecto al grupo control. En los grupos SM que recibieron las cepas probióticas se observó para todas las determinaciones anteriores una reducción con respecto al grupo SM. La actividad FE intestinal, los niveles plasmáticos de HDL-colesterol, así como la producción de ácidos orgánicos y los metabolitos del AF en el colon, mostraron un aumento en los ratones SM+Lf y SM+Lj, respecto al grupo SM. De acuerdo a los resultados obtenidos, la administración oral de las cepas Lf CRL1446 y Lj CRL1231 aumenta la actividad FE intestinal, mejorando los marcadores bioquímicos del SM, por lo cual podría emplearse como una estrategia nutricional en la prevención de esta patología.

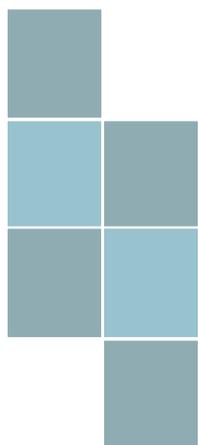
**Palabras claves:** Síndrome Metabólico, Bacterias Lácticas, Feruloil Esterasas.

## ABSTRACT

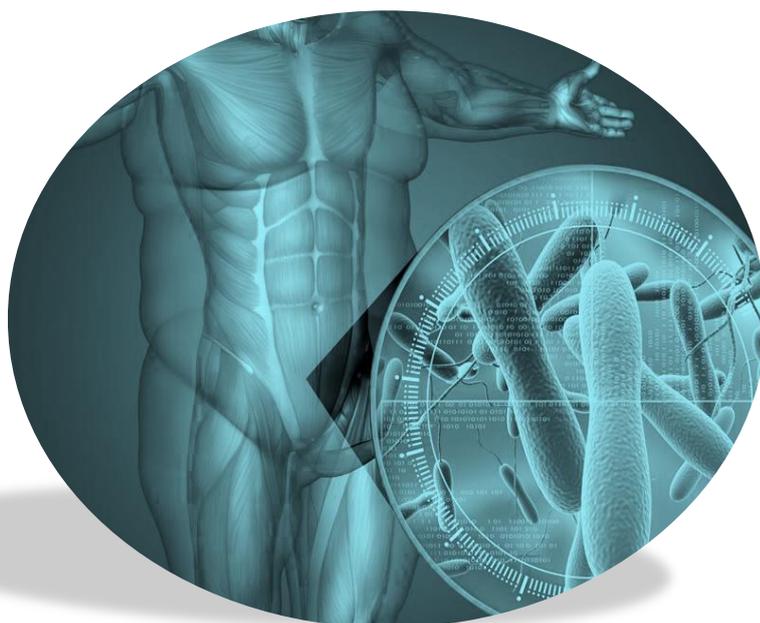
Cinnamoyl esterases (CE) are enzymes responsible for the release of hydroxycinnamic acids from their esterified forms present in the cell wall of cereals, fruits and vegetables. Among these acids, ferulic acid (FA) is found, which is a phenolic compound with proven antioxidant, hypoglycemic and lipid-lowering activity, which can be used in different metabolic diseases. The Metabolic Syndrome (MS) is a group of metabolic disorders characterized mainly by the presence of abdominal obesity, increased triglyceride concentrations, decreased HDL-cholesterol levels, high blood pressure and hyperglycemia. The MS increases the risk of developing cardiovascular disease and type 2 diabetes, so that it has become a major public health problem throughout the world. The objective of this doctoral thesis was to evaluate the use of lactic acid bacteria (LAB) with CE activity in a murine model of MS. We studied 40 strains of LAB from which *Lactobacillus fermentum* CRL1446 (Lf CRL1446) and *Lactobacillus johnsonii* CRL1231 (Lj CRL1231) were selected for their ability to release FA from synthetic substrates and from wheat bran, presenting high activity feruloyl esterase (FE). These bacteria withstood the conditions of the gastrointestinal tract maintaining both the viability and their FE activity, for which they were chosen to carry out the studies *in vivo*. To this end, male Swiss albino mice of 6 weeks of age were used, which were divided into 4 groups and fed daily for a period of 14 weeks with a conventional diet (control group) and a diet rich in fat supplemented with wheat bran (3 SM groups). The mice received by gavage: water (control group and SM group), Lf CRL1446 (group SM+Lf) and Lj CRL1231 (group SM+Lj). The administration dose was  $10^8$  CFU/day/mouse. In the 4 study groups were determined: body weight gain (BWG), adiposity index (AI), food efficiency (FEF), intestinal FE activity and metabolic parameters (plasma levels of glucose, insulin, leptin, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides). In addition, the oral glucose tolerance test (PTGO) was performed and the production of organic acids and metabolites derived from AF was determined in

large intestine contents. The results showed that BWG, AI, FEF, the plasma levels of total cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, glucose, insulin and leptin, as well as the area under the curve in the PTGO, had a significant increase in the SM group with respect to the control group. In the SM groups that received the probiotic strains, a reduction was observed for all the previous determinations with respect to the SM group. Intestinal FE activity, plasma levels of HDL-cholesterol, as well as the production of organic acids and FA metabolites in the colon, showed an increase in the SM+Lf and SM+Lj mice, with respect to the SM group. According to the results obtained, the oral administration of the strains Lf CRL1446 and Lj CRL1231 increases the intestinal FE activity, improving the biochemical markers of the MS, so it could be used as a nutritional strategy in the prevention of this pathology.

**Key words:** Metabolic Syndrome, Lactic Acid Bacteria, Feruloyl Esterases.



# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

### 1- SÍNDROME METABÓLICO

#### 1.1- Antecedentes

El síndrome metabólico (SM) constituye uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI. Se trata de una entidad clínica compleja y heterogénea, cuya expresión está influida por factores genéticos, ambientales, sociales, culturales y económicos, entre otros. Como su nombre lo indica, el SM es un conjunto de desórdenes metabólicos que se encuentra asociado a un incremento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (ECV) y diabetes mellitus tipo 2 (DT2), las cuales son dos de las principales causas de muerte en el mundo (Zimmet y col., 2005).

Mucho se ha discutido acerca de la existencia real de este cuadro, que asocia a la hipertensión arterial, la hiperglucemia y la dislipidemia aterogénica con la obesidad central. Para algunos autores, se trata simplemente de una asociación casual de distintos factores de riesgo, sin la correspondiente potenciación del riesgo cardiovascular. Otros, en cambio, consideran a este síndrome como la expresión concomitante y simultánea de las distintas anomalías metabólicas, con un elevado perfil de riesgo.

El SM no representa un concepto nuevo, ya que desde hace muchos años existen publicaciones que mencionan la coexistencia de dos o más factores de riesgo. Su primera descripción tuvo lugar hace casi un siglo por parte de Kylin, un médico sueco que definió la asociación entre hipertensión, hiperglucemia y gota (Kylin, 1923). Marañón, el fundador de la endocrinología moderna en España, señaló en esa misma época de manera explícita que: «la hipertensión arterial es un estado prediabético [...] este concepto también se aplica a la obesidad [...] y debe haber alguna forma de predisposición de carácter general para la asociación de la diabetes del adulto con la hipertensión arterial, la obesidad y quizá también con la gota [...]

de manera que la dieta es esencial para la prevención y el tratamiento de todas estas alteraciones» (Marañón, 1927). En 1947, Vague publicó un artículo en el que se llamaba la atención sobre el hecho de que el fenotipo de obesidad con acumulación excesiva de tejido adiposo en la parte superior del cuerpo (obesidad de tipo androide o masculino) se asociaba con las alteraciones metabólicas que se observaban en la DT2 y las ECV (Vague, 1947). Veinte años después, Avogaro y col. (1967) documentaron la aparición simultánea de obesidad, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipertensión. Finalmente fue en 1988 que el mundo científico centró su interés en la importancia clínica del SM, luego de que Gerald Reaven describiera la presencia de un conjunto de alteraciones metabólicas cuyo rasgo fisiopatológico central era la resistencia a la insulina (Reaven, 1988). Reaven denominó a este cuadro «síndrome X» pero, de manera sorprendente, no implicó la obesidad en él; sin embargo, la obesidad se ha incluido en el concepto de SM en todas las definiciones posteriores.

En las últimas décadas, la ganancia de masa corporal se ha convertido en un tema de gran preocupación en el mundo. Los inadecuados estilos de vida, en especial el sedentarismo y la alimentación rica en grasas e hidratos de carbono, han ocasionado el aumento de peso en la población, con incremento notable del acúmulo central o visceral de grasa. En vista de la epidemia actual de ECV, DT2 y obesidad, y considerando la estrecha relación de estas enfermedades con los factores de riesgo que integran el SM, resulta fácil entender la importancia que tiene el estudio de esta entidad clínica.

El incremento de la prevalencia del SM es un fenómeno global. Según datos de la *American Heart Association*, el SM afecta aproximadamente al 25% de la población de adultos en el mundo; el 98% de los que lo sufren vive en países industrializados y el 87% de ellos tiene obesidad (<https://www.heart.org>). Estudios realizados por el *National Heart, Lung and Blood Institute* del departamento *Health & Human Services* de los Estados Unidos comprobaron que el riesgo de padecerlo aumenta con la edad (un 24% corresponde a individuos de 20 años, un 35% a

mayores de 50 años y más del 40% en adultos mayores de 60 años). Por otra parte, se sabe que la prevalencia de este síndrome depende también de la raza y del género; en este sentido los países latinoamericanos poco a poco están alcanzando niveles alarmantes de SM y el escenario en Argentina no es la excepción. Un estudio realizado por el *Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud - CONICET*, indicó que el 27,5% de los argentinos con una edad promedio de 45 años padece SM, siendo la prevalencia más elevada en varones que en mujeres (29,4% vs 27,4%, respectivamente). Este estudio reveló que, en orden de frecuencia, los componentes más comunes del SM son la dislipidemia (38,3%), la presión arterial elevada (33,4%), la obesidad (32,1%) y la diabetes (7,5%) (Diaz y col. 2018).

En términos generales, puede afirmarse que en Latinoamérica una de cada tres o cuatro personas mayores de 20 años, cumple los criterios para el diagnóstico de SM. La prevalencia aumenta con la edad, es un poco más frecuente en mujeres y se ha incrementado en las últimas décadas (Cárdenas Quintana y col., 2009). Tal comportamiento epidémico puede ser explicado por la participación de diversos factores como son la reducción de las horas de sueño, los cambios en el estilo de vida incluyendo el proceso de urbanización, el envejecimiento de la población y la malnutrición materno-infantil (Aschner, 2002). En Argentina, la población total según el último censo realizado en 2010 es de 40.091.359 habitantes. Con estos datos, existirían en nuestro país unos 13.300.000 de afectados por el SM. Según este censo, el total de habitantes mayores de 60 años es de 5.813.247 (el 14,5% de la población). Puede estimarse que para el 2050 uno de cada tres argentinos tendrá más de 60 años, y por lo tanto aumentará más aun la incidencia del SM. Organismos como la *Organización Mundial de la Salud (OMS)* ya han alertado sobre las posibles consecuencias de este hecho, de manera que urge a los gobiernos tomar medidas que reduzcan el impacto socio-sanitario de esta situación. Estos datos remarcan la enorme importancia que en el sector socio-económico y productivo tienen el diagnóstico y prevención adecuados del SM y sus comorbilidades.

## 1.2- Definición del SM

La primera definición oficial de SM fue realizada por el *Grupo de Trabajo de la OMS* en 1999. Desde entonces se han propuesto diversas definiciones alternativas. Las más aceptadas han sido las elaboradas por el *European Group for the Study of Insulin Resistance* (EGIR) y por el *Adult Treatment Panel III* (ATP-III) del *National Cholesterol Education Program* (NCEP) (Tabla 1).

Un aspecto central en la definición de SM propuesta por la OMS era la descripción biológica y fisiológica de la resistencia a la insulina. Sin embargo, posteriormente se identificaron varias limitaciones a la definición propuesta por la OMS, la más importante de las cuales se refería a la necesidad de la técnica del «pinzamiento» euglucémico para determinar la sensibilidad frente a la insulina. Esta complicada técnica hizo que fuera prácticamente imposible el uso de esta definición, tanto en la práctica clínica como en los estudios epidemiológicos.

Considerando que la definición de la OMS podría ser demasiado compleja para su aplicación en múltiples contextos, dado que se basaba principalmente en la resistencia frente a la insulina, el EGIR desarrolló una versión modificada de esta definición para que se pudiera utilizar con mayor facilidad. Esta nueva versión se basaba en las concentraciones de insulina en ayunas en lugar de la técnica del pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico para determinar la resistencia a la insulina (Tabla 1). La definición del EGIR todavía mantenía la resistencia frente a la insulina como un componente esencial, dado que se consideraba que dicha resistencia constituía el principal determinante etiológico del SM. No obstante, estos investigadores limitaron el uso de la definición del SM a los casos en que se pudiera cuantificar, de manera sencilla y fiable, la resistencia frente a la insulina. Por tanto, los pacientes con diabetes fueron excluidos de esta definición, dado que la disfunción de las células  $\beta$  del páncreas que caracteriza a la DT2 hace que las estimaciones de la sensibilidad a la insulina carezcan de fiabilidad. La definición del EGIR también introdujo el perímetro de la cintura como medida de la adiposidad.

Dos años después, el NCEP introdujo la definición ATP-III (Tabla 1). Propuesta para su aplicación en la práctica clínica, esta definición no incluía una cuantificación específica de la sensibilidad a la insulina y adoptó un abordaje menos «glucocéntrico», considerando por igual todos los componentes del SM. El parámetro de cuantificación de la obesidad seguía siendo el perímetro de la cintura, aunque con valores umbrales superiores a los utilizados en la definición del EGIR. La definición ATP-III alcanzó una gran popularidad debido a su sencillez. Sus componentes se pueden determinar fácilmente y de manera sistemática en la mayor parte de los contextos clínicos y de investigación.

Tornando la situación un poco más compleja, la *American Association of Clinical Endocrinologists* (AACE) efectuó una modificación de la definición ATP-III. Esta nueva definición estaba basada en la consideración de que la resistencia frente a la insulina constituía el problema básico. La AACE recogió cuatro factores como «alteraciones identificativas» del SM: elevación de la concentración de triglicéridos, disminución de la concentración de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL-col), incremento de la presión arterial (PA) y aumento de las concentraciones de glucosa, tanto en ayunas como después de la administración de glucosa. Diversos factores como la obesidad, el diagnóstico de hipertensión, la diabetes gestacional, las ECV, los antecedentes familiares de diabetes, el origen racial extraeuropeo, la edad superior a 40 años y el estilo de vida sedentario fueron considerados elementos que incrementan la probabilidad de padecer el síndrome, más que factores de riesgo identificativos básicos. La AACE excluyó la obesidad como componente del SM debido a que consideró que la obesidad central era un factor que contribuye a la aparición de resistencia a la insulina, más que una consecuencia de ésta. Al excluir la obesidad como un componente básico del SM, la definición de la AACE generó numerosas críticas, dada la gran cantidad de datos que sugieren que la obesidad es un factor de riesgo importante para la DT2 y las ECV (Eckel y col., 2005; Alberti y col., 2005).

Tabla 1: Definiciones del SM propuestas por la OMS, el EGIR y el ATP-III

OMS, 1999	EGIR, 1999	ATP-III, 2001
<p>-Diabetes o alteración de la tolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina<sup>a</sup>; más dos de los factores siguientes:</p> <p>-Obesidad: IMC&gt;30 o CCC &gt;0,9 en varones o &gt;0,85 en mujeres.</p> <p>-Dislipidemia: triglicéridos &gt;1,7 mmol/L o HDL-col &lt;0,9 en varones y &lt;1 en mujeres.</p> <p>-Hipertensión: presión arterial <math>\geq</math>140/90 mmHg.</p> <p>-Microalbuminuria: excreción de albúmina <math>\geq</math>20 <math>\mu</math>g/min.</p>	<p>-Resistencia a la insulina o hiperinsulinemia (únicamente personas no diabéticas); más dos o más de los factores siguientes:</p> <p>-Obesidad central: PC <math>\geq</math>94 cm en los varones o <math>\geq</math>80 cm en las mujeres.</p> <p>-Dislipidemia: triglicéridos &gt;2 mmol/L o HDL-col &lt;1</p> <p>-Hipertensión: presión arterial <math>\geq</math> 140/90 mmHg.</p> <p>-Glucemia en ayunas <math>\geq</math>6,1 mmol/L.</p>	<p>Tres o más de los factores siguientes:</p> <p>-Obesidad central PC &gt;102 cm en los varones o &gt;88 cm en las mujeres</p> <p>-Hipertrigliceridemia: triglicéridos <math>\geq</math>1,7 mmol/L</p> <p>-Disminución de HDL-col &lt;1 mmol/L en los varones o &lt;1,3 mmol/L en las mujeres.</p> <p>-Hipertensión: presión arterial <math>\geq</math>130/85 mmHg.</p> <p>-Glucemia en ayunas <math>\geq</math>6,1 mmol/L.</p>

IMC: índice de masa corporal; CCC: cociente entre el perímetro de la cintura y el perímetro de la cadera; PC: perímetro de la cintura.

<sup>a</sup>Definida como el cuartil superior de la concentración de insulina en ayunas en personas no diabéticas.  
Fuente: Zimmet y col, 2005.

Estas distintas definiciones no solo han presentado diferencias en los componentes propuestos, sino también en los valores umbrales utilizados para definir cada uno de los componentes, todo lo cual ha generado una confusión considerable. La *International Diabetes Federation* (IDF) consideró que había necesidad urgente de la creación de una herramienta diagnóstica sencilla y universalmente aceptada, cuya aplicación en la práctica clínica fuera suficientemente fácil y que no dependiera de parámetros que solo se pueden aplicar en los contextos de investigación. Por ello, solicitó a su Grupo de Trabajo Epidemiológico la creación de un equipo de expertos de las distintas regiones del mundo para

establecer una nueva definición universal del SM, en la que la obesidad central representa un requisito necesario (Tabla 2).

*“Se denomina síndrome metabólico (SM) al conjunto de alteraciones metabólicas constituido por la obesidad de distribución central, la disminución de las concentraciones del colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad (HDL-col), la elevación de las concentraciones de triglicéridos, el aumento de la presión arterial (PA) y la hiperglucemia” (Zimmet y col., 2005).*

Tabla 2: Definición del SM propuesta por la International Diabetes Federation (IDF)	
Obesidad central	Índice de masa corporal (IMC) > 30 o aumento en perímetro de cintura (según grupo étnico)
Más dos cualquiera de los factores siguientes:	
Aumento de los triglicéridos	≥ 1,7 mmol/l (150 mg/dL)
Disminución de HDL-col	< 1,03 mmol/l (40 mg/dL) en los varones < 1,29 mmol/l (50 mg/dL) en las mujeres
Aumento de la presión arterial	Sistólica: ≥ 130 mmHg, o bien Diastólica: ≥ 85 mmHg
Incremento de la glucemia*	Glucemia en ayunas ≥ 5,6 mmol/L (100 mg/dL)

\* Si la glucemia en ayunas es >5,6 mmol/L o >100 mg/dL, se recomienda la realización de una prueba de tolerancia oral a la glucosa, aunque no es necesaria para definir la presencia del síndrome.  
*Fuente: Zimmet y col, 2005.*

Uno de los sustentos de la existencia del SM como entidad clínica es una patogenia común para la mayoría de los casos. Actualmente, la visión fisiopatológica del SM incluye dos conceptos claves:

- Considerar a la obesidad como el eje central patogénico del SM y a la resistencia a la insulina (RI) como una consecuencia de ésta.
- Reconocer al adipocito como una célula inflamatoria y directamente contribuyente a la génesis del SM.

El SM se presenta como un estado de inflamación crónica de bajo grado inducido por hiperplasia e hipertrofia del tejido adiposo, lo que causa RI y, en consecuencia hiperglucemia, dislipidemia aterogénica, presión sanguínea elevada, estado hipercoagulable y disfunción endotelial. Los eventos más sobresalientes del SM se ilustran en la Figura 1.

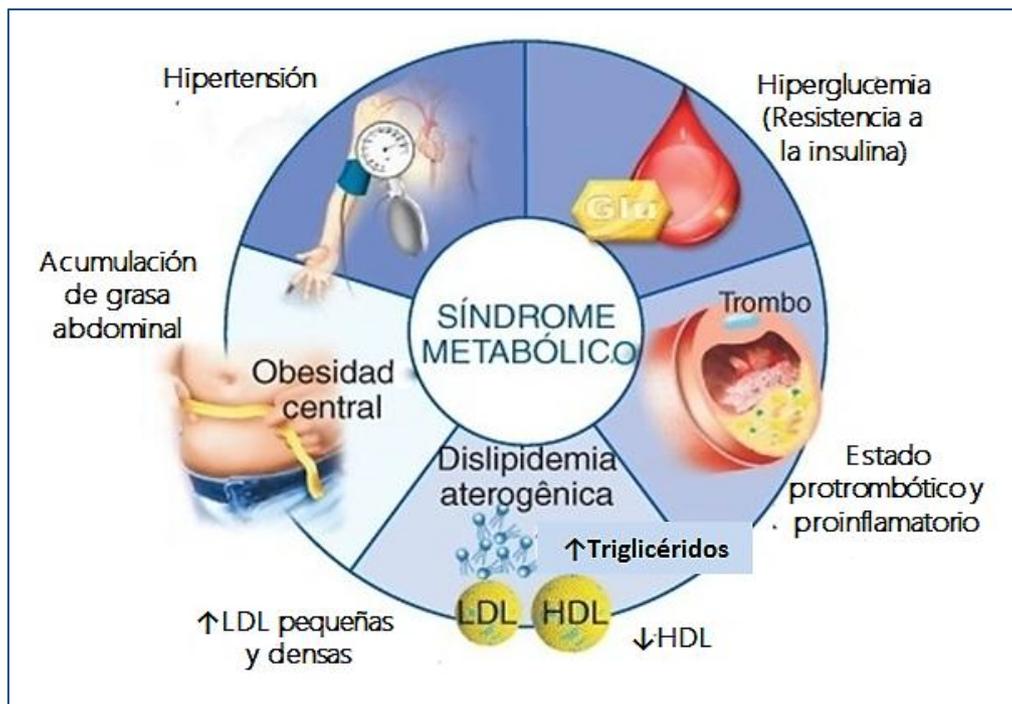
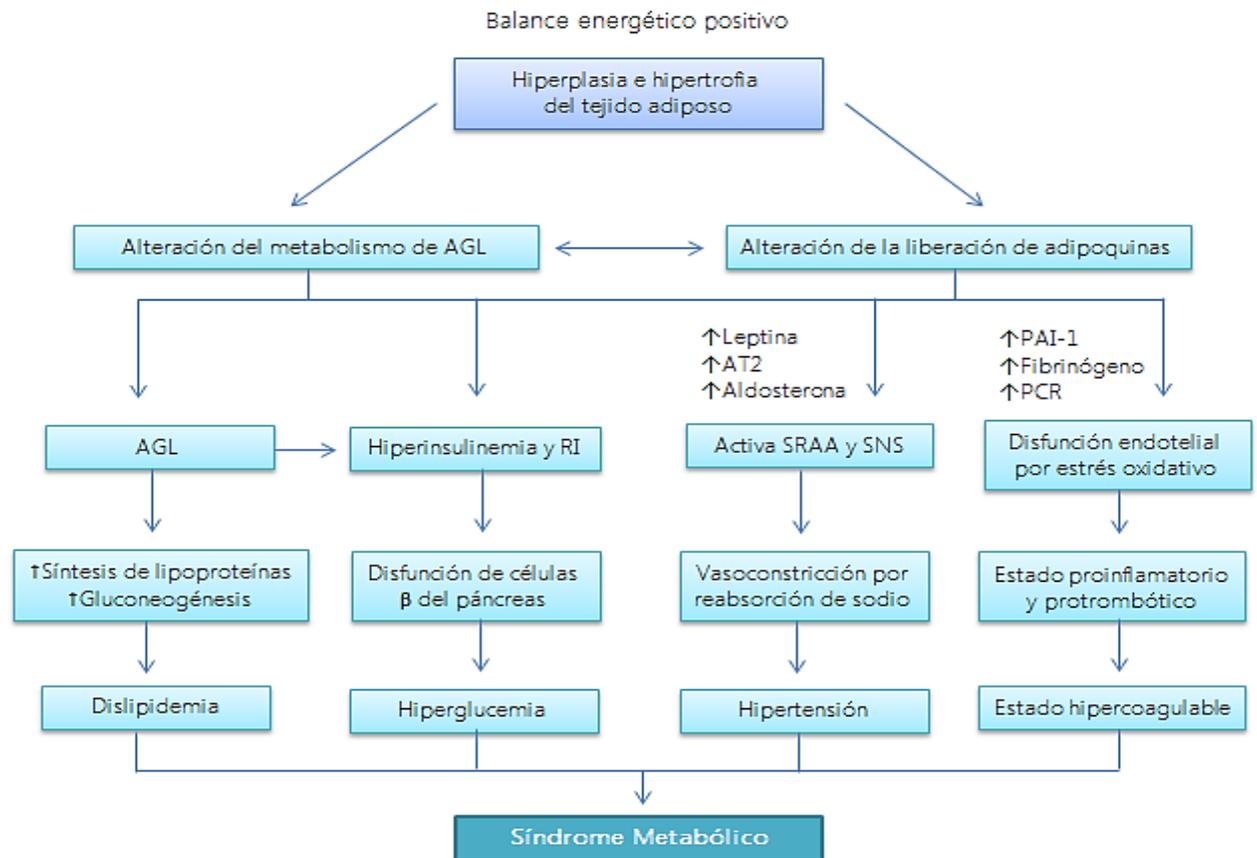


Figura 1: Componentes del Síndrome Metabólico

*Fuente: Federación Mexicana de Diabetes (<http://fmdiabetes.org/sindrome-metabolico>)*

De modo breve, la fisiopatología del SM puede explicarse de acuerdo a lo detallado en la Figura 2. Los adipocitos generan ácidos grasos libres (AGL), lo cual aumenta la síntesis de las lipoproteínas, gluconeogénesis y dislipidemia. Además, este hecho provoca RI y perjudica la función de las células  $\beta$  del páncreas, desencadenando hiperglucemia y DT2. Por otra parte, la liberación alterada de las adipocinas activa el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), provocando hipertensión. También existe estrés oxidativo en el tejido endotelial, y un estado proinflamatorio e hipercoagulabilidad, aumentando el riesgo de ECV (Kaur, 2014).

Figura 2: Representación esquemática de la fisiopatología del SM



AGL: Ácidos grasos libres; AT2: Angiotensina 2; PAI-1: Inhibidor del activador de plasminógeno 1; PCR: Proteína C reactiva; SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona; y SNS: Sistema Nervioso Simpático. *Fuente: Kaur, 2014.*

### 1.2.1- Obesidad central

La obesidad central es un factor de alto riesgo cardiovascular y se ha sugerido que precede al desarrollo de los otros componentes del SM (Thaman y col., 2013). Inicialmente, un estado crónico de equilibrio energético positivo, causa la formación de nuevos adipocitos e hipertrofia (Monteiro y col., 2009). Luego de la expansión del tejido adiposo, puede reducirse el flujo sanguíneo en los adipocitos originándose hipoxia, lo que ha sido propuesto como una etiología que conlleva a necrosis e infiltración de macrófagos en el tejido adiposo. Esto conduce a un aumento de AGL y de metabolitos biológicamente activos conocidos como adipocinas, que incluyen factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleuquina 6 (IL-6), leptina, inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1), y proteína C

reactiva (PCR), las cuales tienen la capacidad de modular reacciones inflamatorias, trombóticas y vasoactivas (Lau y col., 2005).

En los pacientes con SM el tejido adiposo es de predominio central, asociado a mayor cantidad de grasa visceral comparado con la distribución periférica de ésta (Johnson y col., 2006). Los adipocitos de la grasa visceral son metabólicamente más activos, liberando mayor cantidad de AGL y citoquinas inflamatorias que drenan directamente al hígado a través de la circulación portal (Guo y col., 1999; Appel y col., 2005). El hígado graso no alcohólico (HGNA) es una consecuencia frecuente de estas desregulaciones metabólicas, y afecta la sensibilidad a la insulina (Monteiro y col., 2009).

### **1.2.2- Resistencia a la insulina (RI)**

El principal contribuyente al desarrollo de RI es el exceso de AGL circulantes, que derivan tanto de las reservas de triglicéridos (TG) del tejido adiposo sometido a la lipasa hormono sensible, como de la lipólisis de lipoproteínas ricas en TG por acción de la lipasa lipoproteica en los tejidos. Cabe destacar que la inhibición de la lipólisis en el tejido adiposo constituye la vía más sensible de acción de la insulina. De este modo, al surgir RI, el incremento de la lipólisis genera más AGL y ello a su vez disminuye el efecto antilipolítico de la insulina. Por otro lado, los AGL suponen un exceso de sustrato para los tejidos sensibles a la insulina y provocan alteraciones del sistema de señales que regulan el metabolismo de la glucosa. Los AGL disminuyen la captación de glucosa mediada por insulina y se acumulan en la forma de TG en músculos de fibra estriada y miocardio, en tanto que en el hígado aumenta la producción de glucosa y la acumulación de TG (Esposito y col., 2007; Aschner, 2010).

### **1.2.3- Dislipidemia**

La dislipidemia en el SM se caracteriza por un espectro de anomalías lipídicas que incluye el aumento en los niveles de TG y de lipoproteínas aterogénicas de baja

densidad (LDL) y de muy baja densidad (VLDL), como así también la disminución en los niveles de HDL-col antiaterógeno (Kaur, 2014).

Inicialmente, la lipólisis en el tejido adiposo se ve aumentada por la alteración de la señalización de insulina, dando como resultado un aumento de los niveles de AGL. En el hígado, los AGL son la fuente para la síntesis de TG, y también estabilizan la producción de apo B, la apolipoproteína que compone las partículas de VLDL, resultando en una mayor producción de las mismas. A continuación, en presencia de RI, continúa incrementándose la producción de VLDL. Éstas últimas se metabolizan a lipoproteínas remanentes y LDL más pequeñas y densas, las cuales pueden promover la formación de ateroma (Gimeno y col., 2015).

#### 1.2.4- Hipertensión

La hipertensión se ha asociado con anomalías metabólicas: obesidad, intolerancia a la glucosa y dislipidemia (Ferranini y col., 1991). Algunos estudios han puesto de manifiesto que la hiperglucemia y la hiperinsulinemia son capaces de activar el SRAA mediante angiotensinógeno y angiotensina 2 (AT2), contribuyendo al desarrollo de la hipertensión en individuos con RI (Malhotra y col., 2001). Además, tanto la RI como la hiperinsulinemia estimulan el Sistema Nervioso Simpático (SNS) y, en consecuencia, los riñones aumentan la reabsorción de sodio, el corazón aumenta el gasto cardíaco y las arterias responden con vasoconstricción e hipertensión (Morse y col., 2005; Kaur, 2014).

#### 1.2.5- Estado proinflamatorio y protrombótico

El estado proinflamatorio se sobreañade y contribuye a la RI. La mayor secreción de IL-6 y TNF- $\alpha$  generados por adipocitos y macrófagos derivados de monocitos intensifican la RI, así como la lipólisis de los depósitos de TG en el tejido adiposo, que se transforman en AGL circulantes. La IL-6 y otras citoquinas proinflamatorias también intensifican la producción de glucosa por el hígado, la producción de LDL y la RI en los músculos. En adición, las citoquinas y los AGL

aumentan la producción de fibrinógeno por el hígado y de PAI-1 por adipocitos, todo lo cual origina un estado protrombótico. Los niveles mayores de citoquinas circulantes también estimulan la producción de PCR por el hígado. La menor producción de adiponectina, un producto del tejido adiposo de acción antiinflamatoria y sensibilizante a la insulina, también es parte del SM (Pattison y col., 2009; Moschen y col., 2010; Lumeng y col., 2011).

### 1.3- Microbiota intestinal y SM

Los factores genéticos y ambientales (estilo de vida) están bien caracterizados en el desarrollo de la obesidad y las alteraciones metabólicas relacionadas, pero ambos no llegarían a explicar la alta prevalencia de esta patología. En este aspecto, la microbiota intestinal (MI) ha sido propuesta como un nuevo factor que contribuye en el desarrollo de aumento de peso, RI, alteraciones del metabolismo de glucosa y otros riesgos cardiometabólicos entre los individuos. La MI es esencial en la obtención de energía «extra» procedente de la dieta, en la producción de vitaminas y otros componentes nutricionales esenciales. Regula muchos aspectos de la inmunidad innata y adquirida, y protege al hospedador de la invasión de patógenos e inflamación crónica. Algunos investigadores relacionan los desequilibrios en la MI con la susceptibilidad a infecciones, desórdenes inmunológicos, obesidad y RI (Diamant y col., 2011).

Existe una relación recíproca entre el hospedador y su MI. Las modificaciones en la alimentación provocan cambios en el número de bacterias, en la proporción de ciertos filotipos y en la transcripción de sus genes, jugando un papel importante en el desarrollo de factores asociados al SM.

Algunos autores han señalado un aumento en la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* en la MI como biomarcador de la predisposición a la obesidad y DT2. Sin embargo, otros estudios no revelan diferencias significativas de esta relación entre obesos y normopesos tanto en modelos animales como en humanos (Roberfroid y col., 2010). A nivel de género y/o especie varios estudios han

encontrado diferencias significativas comparando sujetos sanos con obesos y diabéticos. En mujeres embarazadas las investigaciones de Collado y col. (2008) y Santa Cruz y col. (2010) relacionan el sobrepeso con un aumento en la población de patógenos oportunistas como *S. aureus* (*Firmicutes*) y *E. coli* (*γ-Proteobacteria*). Fei y col. (2013) informan un aumento de la abundancia de *Enterobacterias* y *Enterobacter* en sujetos con obesidad mórbida; Cani y col. (2007) muestran además, que se produce una reducción en las poblaciones de *Bifidobacterium*; y Zhang y col. (2010) un enriquecimiento de las poblaciones sulfato-reductoras como *Desulfovibrio*. También se ha informado en obesos una mayor concentración de *Prevotella* (*Bacteroidetes*) y descenso en el género *Bacteroides* (*Bacteroidetes*) (Angelakis y col., 2012).

Las modificaciones de los hábitos alimentarios podrían explicar hasta el 57% de la variación en la composición de la MI. Esto indica que la dieta juega un papel importante en el cambio de poblaciones de la MI, pudiendo transformar el fenotipo saludable en una entidad inductora de SM o viceversa (Brown y col., 2012).

#### 1.4- Probióticos y SM

Datos experimentales apuntan al uso de probióticos como elementos esenciales en la prevención y tratamiento de patologías relacionadas con la obesidad y el SM, mejorando el equilibrio de la MI, disminuyendo la sensación de hambre y la adiposidad central, y mejorando el perfil lipídico y la integridad de la mucosa intestinal con descenso del grado inflamatorio (Diamant y col., 2011).

La *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura* (FAO) y la OMS han definido a los *probióticos* como "*microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio en la salud del hospedador*". Esta definición es ampliamente aceptada y adoptada por la *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) (Hill y col., 2014). Como microorganismos probióticos se utilizan sobre todo (aunque no exclusivamente) bacterias lácticas, principalmente de los géneros *Lactobacillus* y

*Bifidobacterium* (Consulta de Expertos FAO, 2006). El estudio de los probióticos puede parecer complejo por el hecho de que la eficacia de los mismos es específica de cepa. Además los resultados obtenidos para una misma cepa y/o especie dependen en muchos casos de la dosis y el tiempo de administración (Marik, 2012). Entre los beneficios de su consumo se incluyen la inmunomodulación, actividad antagonista frente a patógenos gastrointestinales, efectos en el metabolismo lipídico y de la lactosa, y propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas (Cho y col., 2009).

Los probióticos representan una estrategia nutricional prometedora para el tratamiento de diversas enfermedades metabólicas, entre ellas la obesidad, DT2 y ECV, caracterizadas por un desequilibrio (disbiosis) en la composición bacteriana de la MI en comparación con el patrón considerado normal. El impacto que ejerce el consumo de probióticos sobre diferentes parámetros relacionados con la obesidad ha sido estudiado administrando distintas cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* a ratones. Numerosos estudios han demostrado reducción de peso corporal en ratones alimentados con dietas ricas en grasa a los que, además de la dieta, se les suplementaba una o varias cepas probióticas. En general, estos ensayos mostraron también un menor peso del tejido graso de diversas localizaciones abdominales. Sin embargo, estos estudios han puesto de manifiesto diferencias entre especies y cepas en cuanto a su efecto anti-obesidad, así como en cuanto a los posibles mecanismos implicados en los hallazgos descritos. Estos mecanismos incluyen la modulación de la absorción y excreción de grasa, la reducción de la endotoxemia y la inflamación, y la modulación de numerosos genes implicados en la lipogénesis hepática y/o la lipólisis del tejido adiposo (Prados-Bo y col., 2015).

## 2- BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas (BL) son, tanto desde un punto de vista filogenético como fenotípico y ecológico, un grupo heterogéneo de microorganismos que tienen en común la capacidad de generar ácido láctico como principal producto de

la fermentación de carbohidratos. Las BL se han venido utilizando inadvertidamente durante miles de años para la producción de alimentos tales como queso y yogur. Sin embargo, fue recién en 1857 cuando Louis Pasteur demostró que la producción de ácido láctico en las fermentaciones se debía a la acción de microorganismos. Años más tarde, en 1873, Joseph Lister aisló de leche un microorganismo al que denominó *Bacterium lactis*, marcando así el inicio del estudio microbiológico de las BL (Stiles y col., 1997).

Las BL se encuentran en muy diferentes hábitats, todos ellos ricos en nutrientes. Se hallan presentes en alimentos de origen animal y vegetal, entre los que cabe destacar la leche, la carne y los cereales, y juegan un papel primordial en la obtención de sus derivados fermentados, razón por la cual son el grupo bacteriano con mayor importancia industrial (Caplice y col., 1999). También se encuentran con frecuencia en el ambiente, principalmente en el suelo y las aguas residuales (Holzapfel y col., 2001). Además, forman parte de la microbiota asociada a las mucosas en el hombre y otras especies animales (Kostic y col., 2013).

En general, son microorganismos Gram-positivos y anaerobios facultativos, que no forman esporas y son tolerantes al ácido. Un rasgo clave de las BL es su incapacidad de sintetizar porfirinas y, por lo tanto, grupos hemo, por lo que carecen de citocromos. Al no existir un sistema de cadena de transporte de electrones, la generación de la energía tiene lugar mediante fermentación, es decir, fosforilaciones a nivel de sustrato (Khalid, 2011). Las BL carecen de una verdadera catalasa, aunque algunos lactobacilos descomponen el peróxido mediante una pseudocatalasa que no contiene un grupo hemo (Beyer y col., 1985). La mayoría de las BL son anaerobias pero, a diferencia de muchos microorganismos anaerobios, pueden crecer en presencia de oxígeno como anaerobios aerotolerantes gracias a la posesión de peroxidasas y superóxido dismutasas (Saminen y col., 2004; Khalid, 2011; Doyle y col., 2013).

El grupo de las BL es conocido por sus complejos requerimientos nutritivos probablemente como consecuencia de su adaptación a ambientes ricos en

nutrientes. Debido a su escasa capacidad biosintética dependen de un aporte exógeno y variable, en función de la especie, de carbohidratos fermentables, proteínas, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y/o nucleótidos, que precisamente pueden encontrar en nichos ecológicos ricos en nutrientes, como es el caso de la leche o el tracto gastrointestinal (Khalid, 2011; Douillar y col., 2014).

Una importante cualidad de las BL, que ha ganado gran protagonismo en los últimos años, es su «potencial probiótico». Es importante remarcar que no todas las BL exhiben propiedades probióticas. En efecto, frecuentemente se han observado importantes variaciones entre especies y cepas. Además, puede ocurrir que cepas con características requeridas para producir efectos beneficiosos sobre la salud, sean inviables desde el punto de vista tecnológico.

Diversos estudios demuestran la incidencia positiva de las BL en la prevención de infecciones gastrointestinales, intolerancia a la lactosa, alergias, así como en la modulación del sistema inmunitario (Dicks y col., 2010). A los múltiples efectos informados por varios autores sobre el sistema inmune, hay que sumarle la capacidad de regular el peso corporal y controlar las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta. En particular, los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* han demostrado mejorar la obesidad, la inflamación y las complicaciones metabólicas asociadas a través de varios mecanismos, incluyendo la inhibición de la adhesión de patógenos a la mucosa intestinal, la «estabilización» de la MI, mejoras en la integridad de la mucosa y la función de barrera comprometidas por enfermedad o estrés, producción de ácidos grasos de cadena corta o vitaminas, presencia de actividades enzimáticas y actividad antioxidante, entre otras (Cani y col., 2007; Ewaschuk y col., 2007; Amar y col., 2011; Lakhan y col., 2011; Abejón Mukdsi y col., 2012; Moya-Pérez y col., 2015).

### 3- CINAMIL ESTERASAS

Diferentes cepas de BL pueden ejercer efectos beneficiosos basados en actividades enzimáticas específicas. La presencia de actividad cinamil esterasa (CE)

bacteriana permite la liberación de compuestos antioxidantes absorbibles y podría aplicarse como «criterio de selección» de microorganismos probióticos.

Desde hace un tiempo ha surgido el interés de dilucidar el papel beneficioso de las esterasas en salud humana y animal como generadoras de compuestos antioxidantes (Couteau y col., 2001; Bhathena y col., 2008, Abeijón Mukdsi y col., 2012). Así, resulta relevante el estudio de las cinamil esterasas (CE), y entre ellas principalmente las feruloil esterasas.

Las CE son un grupo de enzimas que hidrolizan ésteres conjugados de ácidos hidroxicinámicos (AH), tales como el ácido cafeico, ferúlico, sinápico y *p*-cumárico, los cuales se encuentran comúnmente en cereales, frutas y verduras (Figura 4) (Fazary y Ju, 2007).

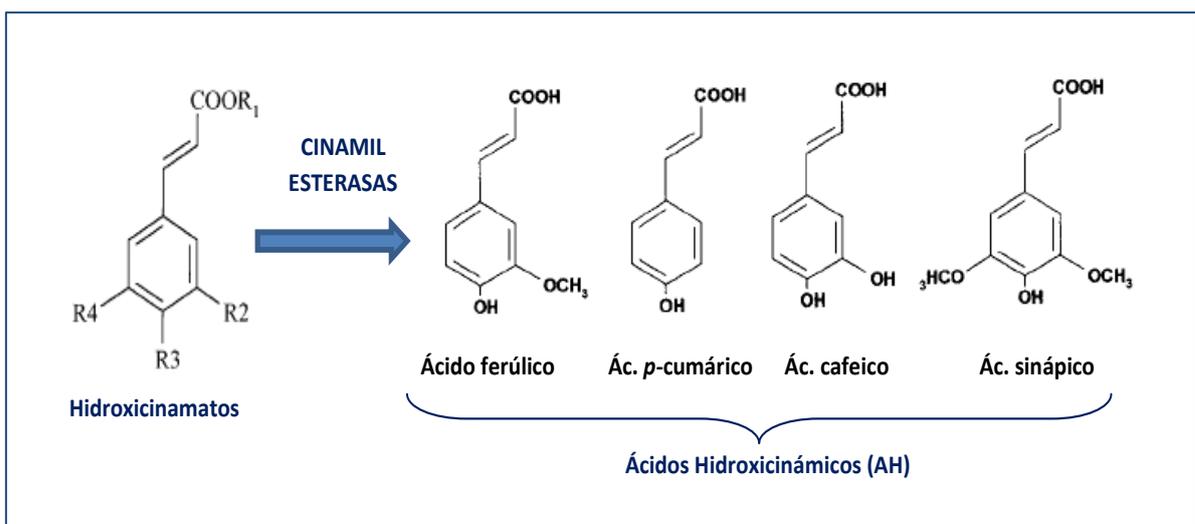


Figura 4: Hidrólisis de hidroxicinamatos por acción de cinamil esterasas. Los hidroxicinamatos no pueden ser absorbidos como tales, por lo que la hidrólisis de las uniones ésteres y la posterior liberación de los AH constituyen el primer paso requerido para la biodisponibilidad y metabolismo de los mismos

Los AH son compuestos fenólicos presentes en varios alimentos y bebidas de origen vegetal, que rara vez se encuentran en forma libre, debido a la presencia de enlaces ésteres que los unen con otros AH (por ejemplo, ácido clorogénico en el café), con cadenas laterales pécticas (por ejemplo, ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico en espinacas), o con azúcares como xilosa, arabinosa o galactosa en la pared celular

(Fry, 1982; Smith y Hartley, 1983). La liberación de los AH es de gran importancia, ya que estudios recientes demostraron los efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antidiabéticos de los AH libres y sus derivados (Clifford, 2000; Faulds, 2010; Oboh y col, 2015).

La forma libre de estos ácidos se puede absorber fácilmente en el tracto digestivo superior de los humanos, mientras que los ácidos fenólicos esterificados no se absorben de manera eficiente (Olthof y col., 2001; Konishi, y Kobayashi, 2005). Se sabe que una amplia gama de bacterias y hongos pueden hidrolizar los ésteres hidroxycinamatos (Faulds, y Williamson, 1991; Castanares y col., 1992; Donaghy y col., 1998). Las enzimas responsables de esta hidrólisis son las CE, entre las que se destacan las **feruloil esterasas (FE)** [E.C. 3.1.1.73] capaces de liberar preferentemente ácido ferúlico (AF) (Kroon, y Williamson, 1999; Fritsch y col, 2007). La aplicación de estas enzimas en la producción de alimentos puede llevar a una mejora en el valor nutricional, la calidad del producto o la composición del aroma (Mathew, y Abraham, 2004). Por otro lado, se sabe que las bacterias son capaces de incrementar la biodisponibilidad de AH en los alimentos y en el intestino humano (Kroon y col., 1997; Couteau y col., 2001). Por lo tanto, la actividad CE de bacterias que forman parte de la microbiota colónica humana, ya sea de forma natural o como probióticos ha despertado gran interés.

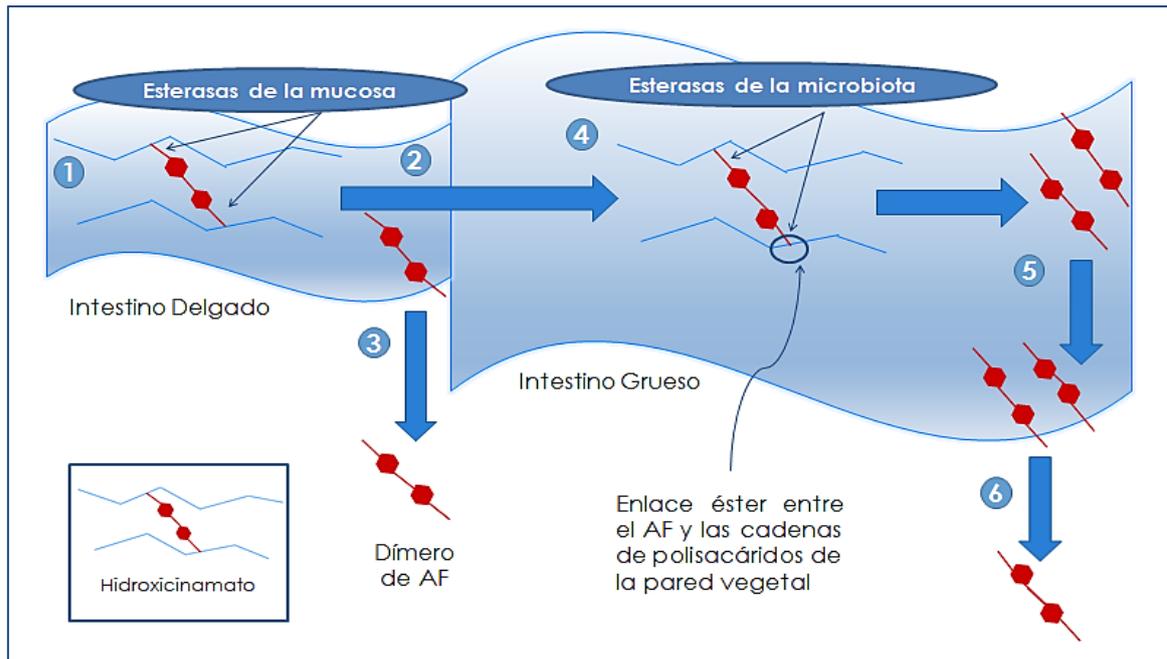
Estudios anteriores se han centrado en la purificación y caracterización de las esterasas fúngicas (Brezillon y col., 1996; Panagiotou y col., 2007; Kanauchi y col., 2008; Mandalari y col., 2008) mientras que estudios más recientes investigaron las esterasas de BL (Lai y col., 2009; Bel-Rhliid y col., 2012; Esteban-Torres y col., 2013; Raimondi y col., 2015).

El consumo regular de salvado de cereal y/o productos enriquecidos con salvado, resulta en la ingestión de grandes cantidades de hidroxycinamatos (García-Conesa y col., 1997). El AF es el AH más abundante en los cereales (Andreasen y col., 2000) y se cree que contribuye en gran medida a los efectos benéficos que proporciona una dieta rica en salvado (Slavin y col., 1997). Se ha observado que una

baja dosis de AH (especialmente AF) estimula la secreción de insulina (Balasubashini y col., 2003, 2004; Adisakwattana y col., 2008), previene el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica (Srinivasan y col., 2007) e inhibe la progresión de la nefropatía diabética (Fujita y col., 2008).

La liberación enzimática de AH a partir de las fibras presentes en los alimentos de origen vegetal tiene lugar en los intestinos de mamíferos (Figura 5). Si bien se ha detectado actividad FE en las células epiteliales del intestino delgado, el mayor nivel de actividad FE se encontró en muestras de contenido intestinal (Andreasen y col., 2001a, 2001b). Esto sugiere que «la actividad FE de las bacterias que componen la MI es un factor clave en la liberación y asimilación de estos compuestos fenólicos esterificados» (Kroon y col., 1997; Couteau y col., 2001).

La presencia de actividad CE ha sido demostrada en la microbiota del intestino de roedores y humanos (Buchanan y col., 1996; Kroon y col., 1997; Andreasen y col., 2001b; Couteau y col., 2001; Wang y col., 2004; Lai y col., 2009; Abeijón Mukdsi y col. 2012 y 2013). Se ha informado que las esterasas intestinales son capaces de hidrolizar hidroxycinamatos (ésteres ferulato y *p*-cumarato) liberando así los AH que quedan disponibles para ser absorbidos y pasar al sistema circulatorio (Figura 5) (Buchanan y col., 1996; Bourne y col., 1999).



**Figura 5: Liberación y absorción de AH a nivel intestinal:** (1): El salvado conteniendo los ésteres hidroxicinamatos llega al intestino delgado; (2): Las esterazas de la mucosa intestinal pueden hidrolizar algunos de los enlaces ésteres que unen los AH a los polímeros de la pared vegetal; (3): Algunos ácidos libres pueden ser absorbidos; (4): El salvado sin digerir llega al intestino grueso; (5) Las enzimas microbianas hidrolizan los ésteres y liberan los ácidos que son posteriormente absorbidos; (6) Los ácidos son metabolizados.

En ratas, la actividad CE del intestino delgado deriva principalmente de la mucosa, mientras que en el intestino grueso, se encuentra predominantemente en el contenido intestinal (microbiota del lumen) (Andreasen y col., 2001a). Debido a la gran importancia de las CE de la microbiota intestinal en la liberación de AH *in vivo*, los niveles de estas enzimas representan un factor crítico que influye sobre la biodisponibilidad de estos compuestos antioxidantes, entre los cuales el AF es de especial interés por los múltiples beneficios que se le atribuyen.

#### 4- ÁCIDO FERÚLICO

El ácido ferúlico (AF) o ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico (Figura 6) es uno de los AH más abundantes en la naturaleza. Este ácido fenólico se encuentra principalmente en las paredes celulares de las plantas; por lo tanto, está ampliamente presente en productos alimenticios como salvado, granos enteros,

frutas, verduras, y también en bebidas como el té, café y cerveza (Srinivasan y col., 2007; Zhao, y Moghadasian, 2008; Bathena y col., 2012).

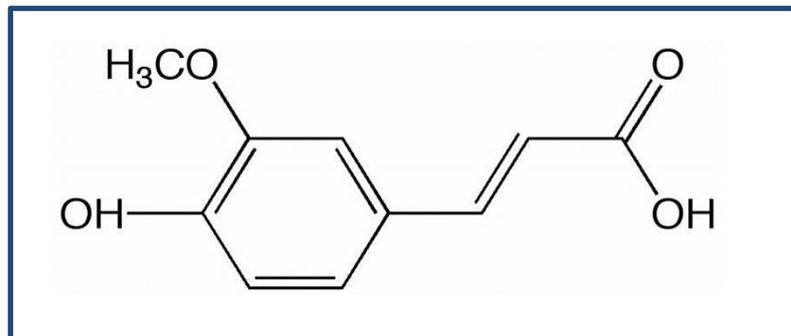
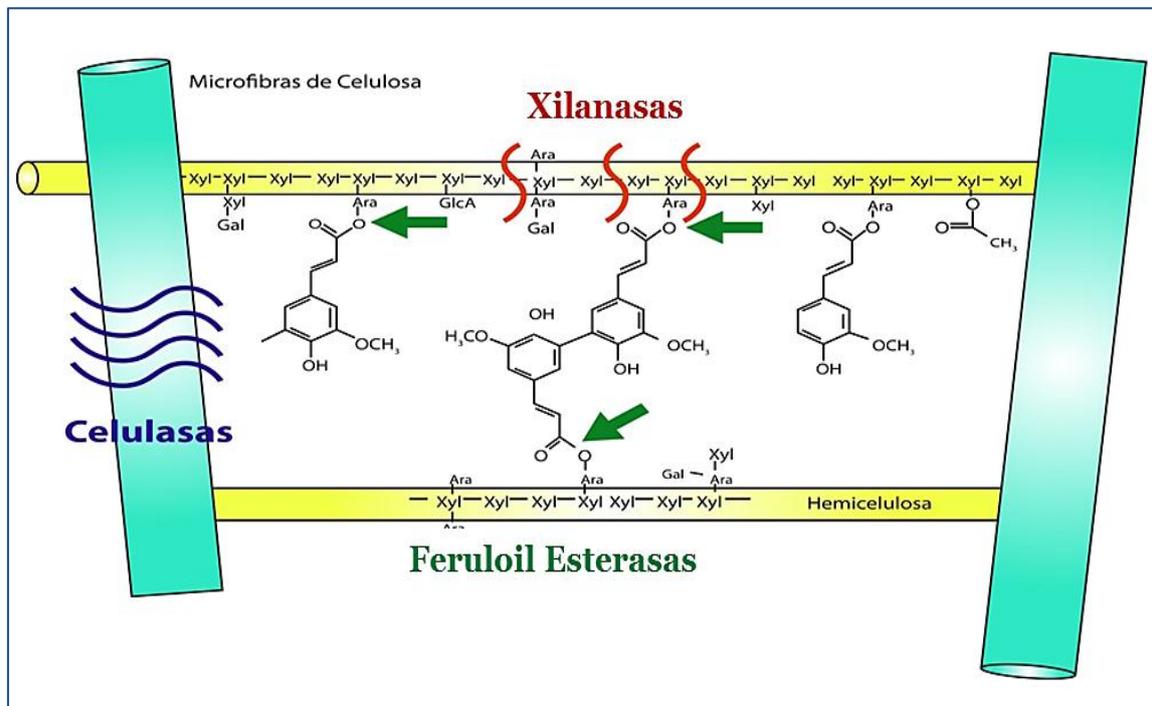


Figura 6: Estructura del ácido ferúlico

En la pared celular vegetal, el AF se halla generalmente como dihidrodímeros, cuya función es formar puentes entre los polímeros de xilano o pectina. Esta estructura entrelazada aumenta la rigidez, y también se ha sugerido que puede prevenir la biodegradabilidad de la pared celular por microorganismos (Iiyama y col., 1994; García-Conesa y col., 1997; Grabber y col., 1998). Se ha reportado que el 90% del AF presente en los cereales se encuentra unido a los arabinoxilanos por medio de enlaces ésteres (Scalbert y Williamson, 2000, Nackz y Shahidi, 2006). El salvado de cereal es particularmente rico en AF. El AF constituye cerca del 0,60% (p/p, peso seco) en salvado de trigo; 3,1% en salvado de maíz; 0,29% en salvado de centeno; 0,03% en salvado de avena y 0,9% en la pared celular del endospermo del arroz, (Faulds y Williamson, 1999; Topakas y col., 2007; Zhao y Moghadasian, 2008).

Las FE rompen la unión éster de los polisacáridos con el AF, liberando dímeros o monómeros del mismo, a partir de la hemicelulosa de la pared vegetal. Estas enzimas son secretadas por algunas bacterias y hongos que parasitan las plantas, ya sea para ingresar a la célula vegetal o para utilizar el material de la pared celular como recurso nutricional. Por lo general, las FE no son capaces de liberar por sí solas el AF a partir del material polimérico de la pared celular, de modo que

actúan sinérgicamente con otras enzimas hidrolíticas (celulasas, xilanasas, pectinasas) (Figura 7) (Kroon y col., 1999; McAuley y col., 2004).



**Figura 7: Acción de enzimas hidrolíticas en la pared celular vegetal.** El AF es liberado por acción de las FE. El acceso de estas enzimas a los enlaces ésteres se ve facilitado por celulasas y xilanasas, capaces de degradar las microfibrillas de celulosa y las cadenas de xilano de la estructura hemicelulósica de la pared, respectivamente. *Fuente: Hermoso y col., 2004*

El AF es un potente antioxidante capaz de neutralizar radicales libres, como las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen substances*) (Rice-Evans y col., 1996) que han sido implicadas en el daño al ADN (Lombard y col., 2005), el cáncer (Hu y col., 2011), el envejecimiento celular acelerado (Ishii y col., 1998), obesidad (Sonta y col., 2004) y DT2 (Donath y Shoelson, 2011). La importancia fisiológica del AF y en particular, su función como antioxidante, depende de la disponibilidad para ser absorbido y posteriormente interactuar con los tejidos diana (Srinivasan y col., 2007). El AF ha demostrado un enorme potencial como agente antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano y reductor del colesterol, entre otros, por lo que incrementar su liberación a partir de fuentes

naturales, mediante el empleo de BL, resulta una estrategia bioterapéutica promisoría en diversas patologías asociadas al SM (Figura 8).

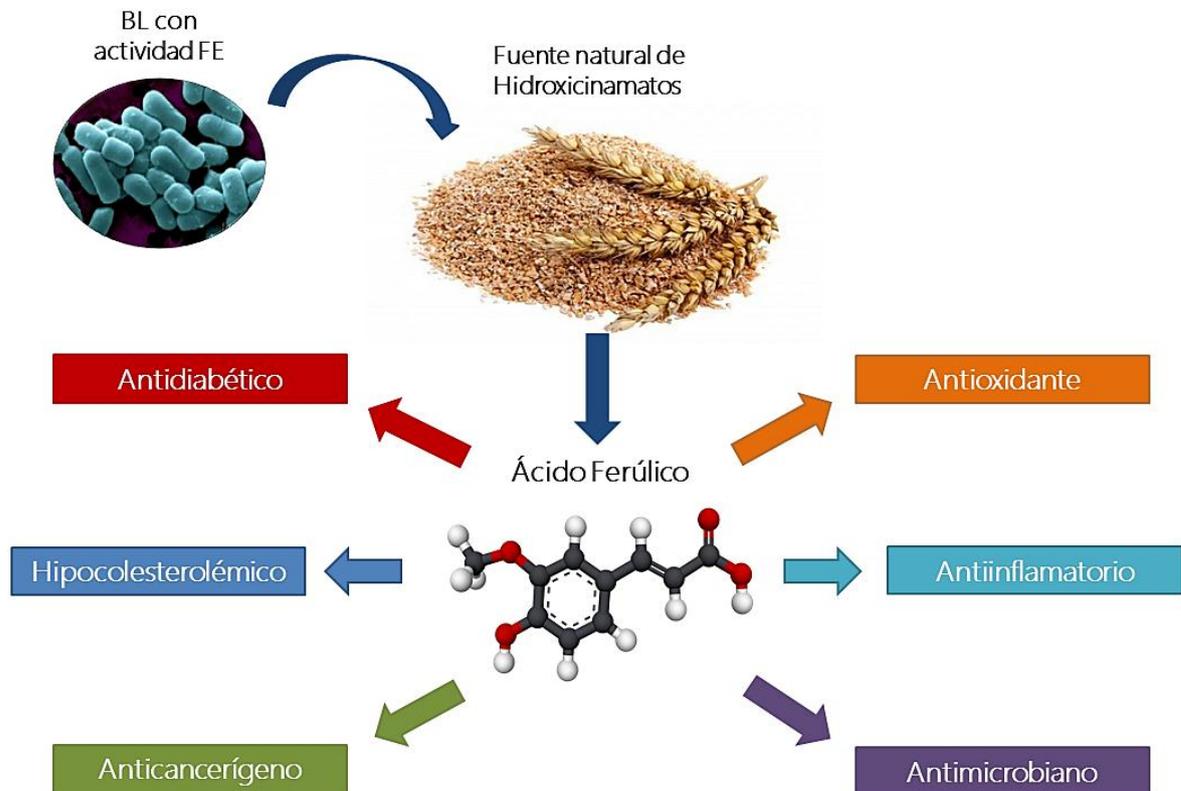


Figura 8: Bioactividad del AF liberado a partir de fibras naturales por acción de BL con actividad FE

#### 4.1- Actividad antioxidante del AF

Los seres humanos son susceptibles a la acción de radicales libres y ROS, como el anión superóxido y radicales hidroxilo. Altas concentraciones de estas moléculas producen estrés oxidativo (EO), ya que pueden atacar y dañar biomoléculas como las proteínas y el ADN, lo que causa enfermedad y muerte celular. Los factores que influyen en la formación de ROS pueden ser endógenos (metabolismo oxidativo mitocondrial e inflamación) y exógenos (dieta, luz UV, tabaquismo, consumo de fármacos). Se ha observado que elevados niveles de ROS

están involucrados en varias patologías, como ECV, obesidad, DT2 y aterosclerosis (Hulsmans y col., 2012).

Los antioxidantes reducen el riesgo de enfermedades degenerativas asociadas a EO (Shahidi y Chandrasekara, 2015). El AF actúa como agente antioxidante mediante diferentes mecanismos: eliminando radicales libres, absorbiendo la luz UV, regulando sistemas antioxidantes e inhibiendo ciertas enzimas oxidativas. Además, es capaz de anclarse en las bicapas lipídicas de las células con el extremo del ácido carboxílico, y de esta manera puede prevenir la peroxidación lipídica (Ghosh y col., 2017). Se ha demostrado que el AF elimina radicales como el peróxido de hidrógeno, superóxido, hidroxilo y dióxido de nitrógeno (Zhouen y col., 1998; Ou y col., 1999; Kayahara y col., 1999; Ketsawatsakul y col., 2000). La actividad antioxidante del AF en términos de eliminación de radicales libres se atribuye en gran medida a sus características estructurales. El núcleo fenólico y la cadena lateral insaturada permiten la formación de un radical fenoxi estabilizado por resonancia. Este radical fenoxi resultante impide que se propague una reacción en cadena de radicales, y a menudo colisiona y se condensa con otro radical formando un dímero conocido como curcumina (Srinivasan y col., 2007). Cabe destacar que gracias a la presencia de enlaces insaturados conjugados, el AF es capaz de absorber la luz UV, protegiendo así de la oxidación a los compuestos sensibles a la luz (de Oliveira Silva y Batista, 2017).

Por otro lado, el AF ayuda de forma sinérgica a la acción de otros sistemas antioxidantes. Se ha demostrado que el AF aumenta la actividad de enzimas capaces de neutralizar los radicales libres, como ser la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión S-transferasa hepática y quinona reductasa hepática y colónica. A la inversa, el AF y sus derivados también pueden inhibir la acción de enzimas generadoras de ROS, como la tirosinasa, y regular de forma negativa otras vías involucradas en la muerte celular, como es el caso de la óxido nítrico sintasa inducible (Kawabata y col., 2000; Ou y Kwok, 2004; Mancuso y Santangelo, 2014; Ghosh y col., 2017). Estos mecanismos antioxidantes aclaran el potencial uso del AF

en varias aplicaciones (industria alimenticia, farmacéutica o cosmética) y son responsables, en parte, de muchas de las actividades terapéuticas del mismo.

#### 4.2- Actividad antiinflamatoria del AF

Varios estudios han demostrado que el AF puede actuar como un agente antiinflamatorio. Este ácido puede inhibir la producción y regular la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias, respectivamente (Ou y Kwok, 2004; Ghosh y col., 2017). Los macrófagos desempeñan un papel central en la inflamación crónica y aguda, produciendo grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias y mediadores inflamatorios, como ROS, óxido nítrico (NO), TNF- $\alpha$  y prostaglandina E2. Se ha demostrado que el AF disminuye los niveles de prostaglandina E2, NO, proteína inflamatoria de macrófagos 2 (MIP-2) y TNF- $\alpha$  (Ou y col., 2003). También se demostró que el AF reduce la producción de interleuquina 8 (IL-8), un factor quimiotáctico de neutrófilos, *in vitro* e *in vivo*, en respuesta a infecciones por el virus de la influenza (Hirabayashi y col., 1995).

#### 4.3- Actividad antimicrobiana del AF

El AF ha demostrado importantes efectos antimicrobianos contra levaduras, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Cho y col., 2000). También ha demostrado inhibir a varios microorganismos residentes del tracto gastrointestinal humano, entre ellos *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Shigella sonnei* (Lo y Chung, 1999; Tsou y col., 2000). La actividad antimicrobiana del AF se ha correlacionado con la inhibición de la arilamina N-acetiltransferasa bacteriana (Lo y Chung 1999). En términos de actividad antiviral, Edeas y col. (1995) demostraron la inhibición *in vitro* del virus del SIDA por AF usando una línea celular infectada.

#### 4.4- AF como agente anticancerígeno

La capacidad antioxidante del AF es responsable de una serie de efectos citoprotectores contra el cáncer. Al neutralizar ROS e inducir la actividad de enzimas citoprotectoras tales como SOD, CAT, vitaminas A, C y E, el AF ayuda a prevenir la peroxidación de lípidos y el daño al ADN, las proteínas y las membranas celulares. Este efecto se demostró en linfocitos de rata, células HeLa (cáncer de cuello de útero) y células NCI-H460 (cáncer de pulmón). También se ha informado que el AF puede inhibir la actividad telomerasa en células de adenocarcinoma (Kumar y Pruthi, 2014; Mancuso y col., 2014; Ghosh y col., 2017).

#### 4.5- AF como agente antidiabético

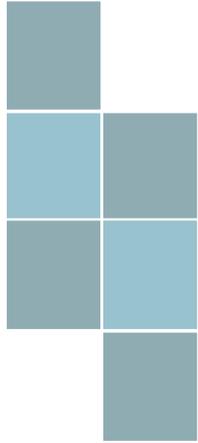
El AF también ha demostrado efectos antidiabéticos. Se ha informado que una dosis de 10-40 mg/kg de masa corporal, reduce los niveles de glucosa en sangre en ratas hembras con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) (Balasubashini y col., 2004). Además, la administración de AF conduce a una expansión de los islotes pancreáticos, aumentando la masa de células  $\beta$ , promoviendo así la secreción de insulina y la utilización de sacarosa en estos animales (Balasubashini y col., 2004). De hecho, Prabhakar y col. (2013) propusieron que el AF podría actuar de forma sinérgica con los fármacos antidiabéticos disponibles actualmente, para controlar la diabetes y sus complicaciones asociadas.

#### 4.6- AF como agente hipocolesterolémico

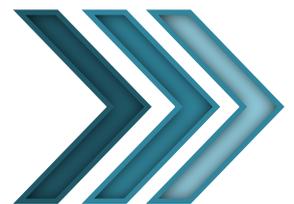
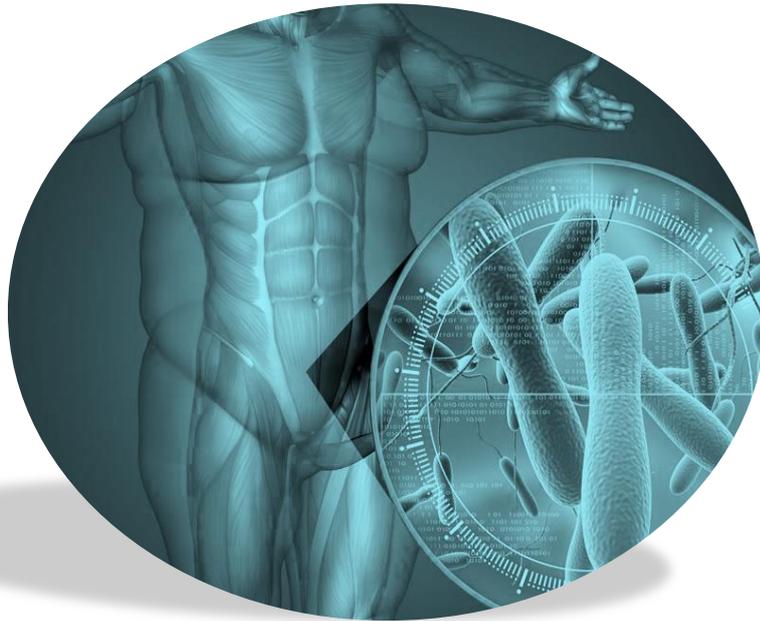
Se ha demostrado que el AF es capaz de reducir el colesterol. Cuando se administró por vía oral a ratas, redujo significativamente las concentraciones de colesterol unido a las lipoproteínas LDL y VLDL, mientras que también aumentó los niveles de HDL-col (Kamal-Eldin y col., 2000; Kim y col., 2003). Además, Son y col., (2010) demostraron que la administración de AF a ratones alimentados con una dieta con alto contenido de grasa, tuvo un efecto hipolipidémico, promoviendo un aumento de la excreción fecal de colesterol y triglicéridos, así como inhibiendo la

biosíntesis de ácidos grasos. La capacidad del AF para reducir los niveles de colesterol en plasma de ratones se comparó incluso con la del clofibrato, un fármaco empleado para reducir el colesterol y los triglicéridos en sangre (Paiva y col., 2013).

*Ante las limitaciones y deficiencias que se presentan actualmente en lo referente a la prevención y tratamiento del SM, está claro que existe la necesidad de desarrollar nuevas estrategias que permitan contrarrestar sus múltiples efectos perjudiciales. En este sentido, las bacterias probióticas constituyen una alternativa segura y natural. Las BL con actividad FE permiten aumentar la biodisponibilidad de AF a nivel intestinal, lo cual podría inducir cambios metabólicos que resulten beneficiosos en individuos que desarrollan SM.*



# OBJETIVOS

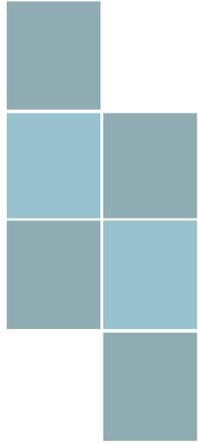


## OBJETIVO GENERAL

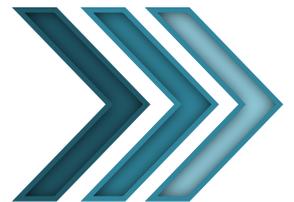
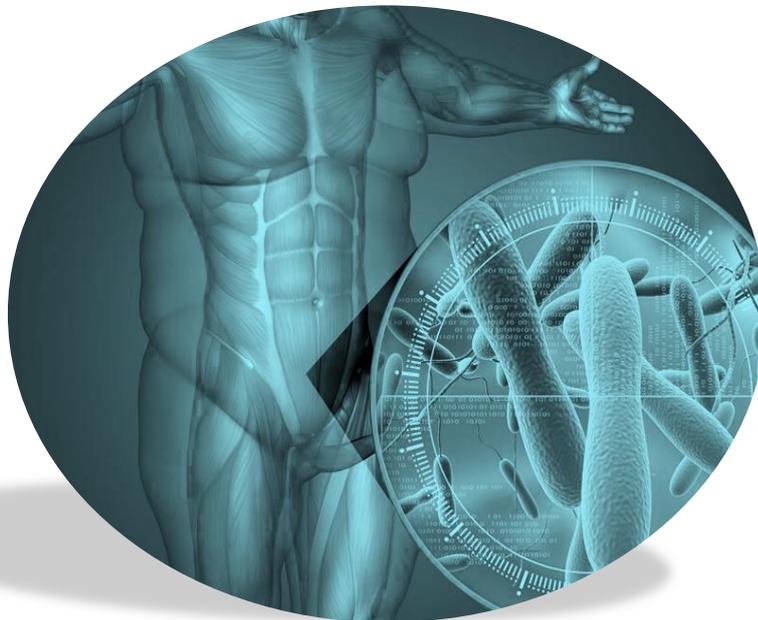
Evaluar el empleo de bacterias lácticas (BL) con actividad cinamil esterasa (CE) en un modelo murino de síndrome metabólico (SM), como una posible estrategia nutricional para la prevención de esta patología.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE)

- **OE1-** Seleccionar BL de origen alimentario o intestinal humano con actividad FE generadoras de ácidos hidroxicinámicos.
- **OE2-** Estudiar el efecto de diferentes fuentes de carbono y de las condiciones del tracto gastrointestinal sobre la actividad FE de las BL seleccionadas.
- **OE3-** Estandarizar un modelo experimental de SM inducido por una dieta rica en grasa en ratones.
- **OE4-** Evaluar el efecto de la administración oral de la/s bacteria/s seleccionada/s sobre la actividad CE intestinal y biomarcadores en el modelo experimental de SM.
- **OE5-** Realizar estudios tecnológicos preliminares: Optimizar el diseño de microcápsulas con la/s bacteria/s seleccionadas y evaluar su funcionalidad *in vivo*.



# MATERIALES Y MÉTODOS



## MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

## 1- Microorganismos

Las cepas de bacterias lácticas (BL) utilizadas en este trabajo de tesis se detallan en la [Tabla 3](#). Las mismas fueron obtenidas de la Colección de Cultivos del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), Tucumán, Argentina.

Tabla 3: Cepas de bacterias lácticas estudiadas		
Género y Especie	Código CRL	Origen
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CRL43	Queso regional
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CRL644	Producto lácteo
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CRL1014	Heces de infantes
<i>Lactobacillus coryniformis subsp. torquens</i>	CRL999	Establo lechero
<i>Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis</i>	CRL1001	Ensilado
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CRL574	Heces
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CRL722	Desconocido
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CRL944	Boca humana
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CRL955	Boca humana
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CRL973	Remolacha fermentada
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CRL1408	Saliva humana
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CRL1446	Queso de Cabra

Continúa en página siguiente

Tabla 3: Cepas de bacterias lácticas estudiadas

Género y Especie	Código CRL	Origen
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	CRL941	Desconocido
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	CRL977	Sake
<i>Lactobacillus helveticus</i>	CRL974	Queso Suizo
<i>Lactobacillus helveticus</i>	CRL1062	Queso Gruyere
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	CRL1231	Heces de adulto
<i>Lactobacillus mucosae</i>	CRL573	Heces
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CRL41	Quesos
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CRL46	Quesos
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CRL350	Suelo de alta montaña
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CRL352	Suelo de alta montaña
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CRL353	Suelo de alta montaña
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CRL382	Suelo de alta montaña
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CRL681	Embutidos
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CRL725	Bagazo
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CRL759	Harina
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CRL936	Harina

Continúa en página siguiente

Tabla 3: Cepas de bacterias lácticas estudiadas		
Género y Especie	Código CRL	Origen
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CRL1449	Leche de oveja
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CRL1471	Leche de cabra
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CRL1614	Embutidos
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CRL1101	Intestino humano
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CRL1097	Desconocido
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CRL1099	Desconocido
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CRL1098	Desconocido
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CRL1100	Desconocido
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CRL1101	Desconocido
<i>Pedicoccus pentosaseus</i>	CRL761	Harina
<i>Pedicoccus pentosaseus</i>	CRL764	Harina
<i>Weisella confusa</i>	CRL570	Heces

## 2- Medio y condiciones de cultivo

Las BL se cultivaron en medio Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (De Man y col., 1960). La activación se realizó mediante tres pases sucesivos en caldo MRS. Las células fueron inoculadas al 2% (v/v) en el medio elegido e incubadas a 37°C sin agitación durante 16 horas.

Medio MRS: Peptona 10 g; extracto de levadura 5 g; extracto de carne 5 g; glucosa 20 g; tween 80 1 mL; acetato de sodio 5 g; citrato de amonio 2 g; sulfato de magnesio 0,1 g; sulfato de manganeso 0,05 g; agua destilada 1 L; pH 6,5.

### 3- Conservación de los cultivos

A corto plazo: Los cultivos *overnight* (fase exponencial tardía de crecimiento) fueron inoculados al 2% (v/v) en caldo MRS o en leche descremada reconstituida (LDR) 10% (p/v) y conservados a 4°C. Esto permitió conservar las cepas por períodos de aproximadamente 1-3 meses.

A largo plazo: Se colocó en viales estériles 1 mL del cultivo activo + 1 mL de glicerol 20% (v/v) estéril y se conservó a -20°C. También se optó por cosechar células a partir de un cultivo *overnight*, lavarlas con solución fisiológica (SF) estéril, resuspenderlas en 3 mL de LDR 10% (p/v) + extracto de levadura 0,5% (p/v) + glicerol y conservarlas a -80°C.

### 4- Esterilización de los medios de cultivo

Salvo en casos en que se indique otro método, los medios de cultivo empleados fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

### 5- Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism versión 6.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Los resultados son medias de dos o tres experimentos independientes  $\pm$  error estándar (ES). Las diferencias entre grupos consideradas estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) fueron determinadas con el Student's t-test (múltiple test -t). Las correcciones para múltiples comparaciones fueron corregidas con el método de Sidak-Bonferroni.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CAPÍTULO I

#### BACTERIAS LÁCTICAS CON ACTIVIDAD FERULOIL ESTERASA

##### I.1- Selección de BL con actividad feruloil esterasa (FE) mediante ensayos *in vitro*

###### I.1.1- Evaluación cualitativa de la actividad FE

La capacidad de hidrolizar etil ferulato (actividad FE) se evaluó en todas las cepas de BL mencionadas en la [Tabla 3](#), de acuerdo a la metodología descrita por [Abeijón Mukdsi y col. \(2012\)](#). Se empleó como sustrato etil ferulato (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) al 1% (p/v) en metanol, el cual se adicionó en una concentración de 1 g/L (4,5 mM) a un medio de cultivo MRS agar sin glucosa. Se practicaron pocillos de aproximadamente 0,5 cm de diámetro donde se sembraron 50 µL de las suspensiones bacterianas en solución fisiológica (SF). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 a 72 h, hasta evidenciar la formación de un halo claro alrededor de los pocillos indicando la hidrólisis del etil ferulato (EtF). Se utilizó como control positivo la cepa *L. fermentum* ATCC14932 (aislada de saliva humana) ([Donaghy y col., 1998](#)).

###### I.1.2- Evaluación cuantitativa de la actividad FE

Las cepas que mostraron la aparición de halos claros en el medio agarizado en un menor tiempo de incubación (24 h o menos), se activaron en medio MRS, se lavaron dos veces con buffer fosfato salino (PBS) pH 7, y se resuspendieron en el mismo buffer hasta alcanzar una DO ~1,0. Posteriormente se inocularon (2%, v/v) en caldo MRS sin glucosa suplementado con EtF (1,5 mM) y se incubaron a 37°C. Se tomaron alícuotas de 1 mL a las 0, 3, 6, 9, 12 y 24 h. Las células se cosecharon por centrifugación (10000 rpm, 10 min, 4°C) y las cantidades de EtF consumido y ácido ferúlico liberado se determinaron en los sobrenadantes por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

### **I.1.3- Determinación de ácido ferúlico (AF) y sus ésteres**

Las muestras se analizaron por HPLC en fase reversa en un cromatógrafo con detector UV (Knauer, Berlin, Alemania). La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna C18 (Reprosil-Pur ODS 250 mm largo, 4,6 mm d.i., 3,5 µm espesor, Dr Maisch GmbH, Ammerbuch, Alemania). Se inyectaron 20 µL de muestra y se eluyó en condiciones isocráticas con 1 mL/min de la fase móvil compuesta por agua, acetonitrilo y ácido acético (en proporción 69%, 30% y 1%, v/v, respectivamente). Los compuestos de interés se detectaron a 320 nm y sus concentraciones se calcularon a partir de curvas de calibración estándar.

### **I.1.4- Evaluación del crecimiento bacteriano**

La viabilidad celular se determinó a las 0, 3, 6, 9, 12 y 24 h de cultivo en medio MRS sin glucosa suplementado con EtF (1,5 mM). Se sembraron las diluciones seriadas apropiadas sobre MRS agar y los resultados se expresaron como Log UFC/mL luego de 48-72 h de incubación a 37°C. Como control se emplearon las cepas inoculadas en medio MRS sin glucosa y sin el agregado de EtF.

### **I.2- Influencia de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento de BL**

Las cepas de BL seleccionadas (previamente activadas, lavadas con PBS pH 7 y resuspendidas en el volumen original) se inocularon (2% v/v) en un medio mínimo (MM) suplementado con diferentes fuentes de carbono (0,5% p/v): Glucosa, Xilosa, Arabinosa, Fructosa, EtF y Ácido clorogénico. El crecimiento bacteriano se evaluó en cada uno de estos seis medios por turbidimetría, midiendo la densidad óptica a 560 nm (DO<sub>560</sub>) con un lector de microplacas (Versamax<sup>TM</sup>, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.). Se realizaron mediciones a las 0, 6, 12, 24 y 30 h de incubación (37°C) y se graficaron las curvas de crecimiento correspondientes (DO<sub>560</sub> vs tiempo). Como control se emplearon las cepas inoculadas en MM sin el agregado de fuente de carbono

Medio Mínimo (MM): Peptona de carne 5 g; extracto de levadura 5 g; sulfato de magnesio 1 g; tween 80 0,5 mL; agua destilada 1 L.

### I.3- Influencia de diferentes fuentes de carbono sobre la actividad FE de BL

#### I.3.1- Obtención de suspensiones celulares

Las BL seleccionadas se cultivaron durante 6 horas (fase logarítmica de crecimiento) en los medios de cultivos mencionados en el ítem I.2: (MM, MM+Glucosa, MM+Xilosa, MM+Arabinosa, MM+Fructosa, MM+EtF, MM+Ácido clorogénico). Las células se cosecharon por centrifugación (10000 rpm, 10 min), se lavaron y se resuspendieron (30% p/v) en PBS pH 7 obteniéndose las diferentes suspensiones celulares.

#### I.3.2- Determinación de actividad FE

La actividad FE se determinó por incubación de las distintas suspensiones celulares en buffer PBS pH 7 adicionado con metil ferulato (1 mM) como sustrato. Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 3 h y las reacciones enzimáticas se detuvieron por la adición de ácido acético glacial (2 mM, pH 2,5). Las muestras se filtraron y el AF liberado se determinó por HPLC según lo descrito anteriormente en el ítem I.1.3.

**Actividad FE:** Se define una unidad (U) de actividad enzimática como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de AF por hora.

**Actividad específica:** U/miligramo de células (peso seco)

### I.4- Resistencia de las BL a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal (TGI)

Las células cosechadas a partir de un cultivo activo de 16 h se lavaron con buffer PBS pH 7 y se resuspendieron en jugo gástrico artificial de pH 3 y pH 4, por separado. Ambas suspensiones se incubaron a 37°C durante 2 h con agitación.

Posteriormente, estas suspensiones celulares se centrifugaron (8000 rpm, 15 min) y las células se resuspendieron en jugo intestinal artificial de pH 8. Se incubó nuevamente a 37°C durante 2 h con agitación (Zárate y col., 2000). Se tomaron muestras (1 mL) antes y después de cada una de las incubaciones y las mismas se sembraron en medio MRS agar. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h y se realizó el recuento de las células viables. Los resultados fueron expresados como Log UFC/mL.

Además de la viabilidad, se evaluó paralelamente la actividad FE de las BL antes (tiempo inicial) y después (tiempo final) del pasaje simulado por el TGI, según la metodología descrita en el ítem I.3.2.

Composición del jugo gástrico artificial: NaCl 125 mM, KCl 7 mM, NaHCO<sub>3</sub> 45 mM, pepsina 3 g/L, HCl en concentración variable entre 80 a 100 mM para ajustar a pH.

Composición del jugo intestinal artificial: Sales biliares (Oxgall, Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) 0,3% (p/v) y pancreatina (ICN Biomedicals, OH, EE.UU.) 0,1% (p/v). El pH se ajustó a 8 con NaOH 5 M.

## I.5- Hidrólisis de la fibra de salvado de trigo

### I.5.1- Liberación de AF a partir de salvado pre-tratado con xilanasas

En diferentes tubos se pre-incubaron 100 mg de salvado de trigo estéril con 750 µL de xilanasas (5U) durante 18 h a 37°C. Luego se añadieron 750 µL de:

- a) Suspensiones bacterianas de *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 (por separado).
- b) NaOH 1M (hidrólisis alcalina).
- c) PBS pH 7 (control).

Las muestras se incubaron a 37°C durante 18 h, se centrifugaron (8000 rpm, 10 min) y se recuperaron los sobrenadantes. Se adicionó HCl (37%) hasta llegar a un

pH final de 2 y se determinó la cantidad de AF liberado por HPLC. Estos mismos sobrenadantes se utilizaron también para determinar la capacidad antioxidante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CAPÍTULO II

#### ESTANDARIZACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICO

##### II.1- Análisis composicional de dietas comerciales para ratones

Se utilizaron dos dietas comerciales para ratones: dieta balanceada convencional [DC] (Asociación de Cooperativas Argentinas, División Nutrición Animal, San Nicolás, Buenos Aires, Argentina) y dieta rica en grasa [DRG] (Dyets Version of the AIN-93G Based Induced Obesity - Diet with 60% Fat Dervied Calories - EE.UU.).

Ambos alimentos fueron analizados química y nutricionalmente en el Laboratorio de Evaluación de Alimentos del Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), Tucumán, Argentina. Se aplicó la metodología [AOAC \(2000\)](#) para realizar las siguientes determinaciones:

Humedad: Se determinó por secado hasta peso constante a 100°C según método AOAC 925.09.

Cenizas: Se determinaron en mufla a 500-550°C hasta peso constante según método AOAC 923.03.

Proteínas: Se utilizó el método de Kjeldahl (AOAC 984.13).

Lípidos: Se aplicó el método de extracción por Soxhlet utilizando éter de petróleo (AOAC 920.39).

Fibra dietaria total: Se trabajó por duplicado aplicando el método enzimático-gravimétrico (AOAC 985.29). Se utilizó el kit comercial de Megazyme® que contiene las enzimas  $\alpha$ -amilasa termoestable, proteasa y amiloglucosidasa. Luego de una serie de tres digestiones enzimáticas al pH especificado, en baño termostatzado con agitación, se precipitó la fibra soluble con etanol 96°. Las muestras se filtraron al vacío en un filtro Duran-Schott® N° 3 con celite®, se lavaron con ácido, se secaron hasta peso constante en estufa a 100°C y se pesaron. El porcentaje de fibra dietaria

total se obtuvo corrigiendo el peso del residuo seco luego de restar el porcentaje de proteína y cenizas determinados en los duplicados.

Carbohidratos disponibles (CH): Se calculó por diferencia según:

$$\%CH = 100 - (\%Humedad + \%Cenizas + \%Proteínas + \%Grasas + \%Fibra Total)$$

Los datos analíticos se expresaron en g por 100 g de muestra (base húmeda). Los resultados fueron expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar de 3 determinaciones independientes.

## II.2- Formulación de DRG suplementada con salvado de trigo

El alimento comercial rico en grasa (Dyets Version of the AIN-93G) se trituró y se suplementó con 7% (p/p) de salvado de trigo (de manera tal que el contenido de fibra resultara similar al del alimento convencional). La mezcla se amasó manualmente y posteriormente se modelaron los pellets. Los mismos se conservaron en heladera a una temperatura de 4°C hasta su utilización.

## II.3- Estandarización de un modelo experimental de Síndrome Metabólico (SM)

### II.3.1- Animales y dieta

Se trabajó con ratones machos de dos cepas presentes en el bioterio de CERELA (BALB/c y Albinos Suizos) y de dos edades: recién destetados (3 semanas) y adultos (6 semanas). Los mismos fueron mantenidos en jaulas a una temperatura de  $22\pm 2^\circ\text{C}$  con ciclos de luz-oscuridad de 12 h y se les administró alimento y agua de bebida *ad libitum* durante 14 semanas.

Un grupo de animales fue alimentado con dieta convencional [DC] (grupo Control) y otro grupo recibió la dieta rica en grasa suplementada con 7% (p/p) de salvado de trigo [DRG+s] (Grupo SM). Los grupos experimentales fueron en total ocho (n=6 por grupo): Control BALB/c destete, SM BALB/c destete, Control BALB/c adulto, SM BALB/c adulto, Control Suizo destete, SM Suizo destete, Control Suizo adulto y SM Suizo adulto (Tabla 4).

Tabla 4: Grupos experimentales de ratones

Ratón	BALB/c				Suizo			
Edad	Destete		Adulto		Destete		Adulto	
Alimento	DC	DRG+s	DC	DRG+s	DC	DRG+s	DC	DRG+s
Grupo	Control	SM	Control	SM	Control	SM	Control	SM

DC: Dieta convencional DRG+s: Dieta rica en grasa suplementada con 7% (p/p) de salvado de trigo

### II.3.2- Peso Corporal

Los 8 grupos de ratones fueron pesados diariamente durante un período de 14 semanas utilizando una balanza electrónica (ACCULAB, EE.UU.) con una sensibilidad de 0,01 g. El peso (g) para cada grupo, se expresó como un promedio de los valores obtenidos.

### II.3.3- Glucemia

Cada dos semanas se determinaron los niveles de glucosa en sangre. Para ello, los animales fueron sometidos a un ayuno de 12 h y las muestras de sangre se obtuvieron del ápice de la cola de los ratones, practicando un ligero corte con bisturí. La concentración de glucosa sanguínea se midió utilizando un glucómetro (ACCU-CHEK Active de Laboratorios Roche, Argentina).

### II.3.4- Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG)

La PTOG se realizó de acuerdo al metodología descrita por [Gauffin-Cano y col. \(2013\)](#). A las 14 semanas, y previo ayuno de 12 h, los ratones recibieron por vía oral (gavage) una solución de glucosa 60% (p/v). La dosis de administración fue de 2g/kg de peso corporal. Las mediciones de glucemia se realizaron cada 30 minutos,

durante un período de 2 horas (0, 30, 60, 90 y 120 min) según las indicaciones del apartado II.3.3.

### **II.3.5- Sacrificio y obtención de plasma**

Los animales fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina-xilacina [ketamina (100 mg/kg) + xilacina (5 mg/kg)]; Richmond División Veterinaria S.A., Bs. As., Argentina]. Posteriormente se realizó una punción cardíaca para extraer sangre, la cual fue colectada en tubos conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Wiener Lab., Rosario, Argentina) como anticoagulante. Las muestras fueron centrifugadas (2500 rpm, 10 min) y el plasma fue recuperado de la capa superior y almacenado a -20°C hasta su procesamiento.

Los experimentos se llevaron a cabo en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del bioterio de CERELA y siguiendo el protocolo experimental (CRL-BIOT-EF-2012/1A) aprobado por el Comité de Ética de la institución.

### **II.3.6- Perfil Lipídico**

A las 14 semanas, se determinaron en plasma: Colesterol Total, HDL-Colesterol, LDL-Colesterol y Triglicéridos. Las determinaciones se realizaron mediante métodos enzimáticos, utilizando kits comerciales (Wiener Lab, Rosario, Argentina).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CAPÍTULO III

#### ADMINISTRACIÓN ORAL DE BACTERIAS LÁCTICAS CON ACTIVIDAD FE EN UN MODELO MURINO DE SÍNDROME METABÓLICO

##### III.1- Administración oral de las BL seleccionadas

###### III.1.1- Preparación de las suspensiones de BL

Las cepas *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 fueron inoculadas al 2% (v/v) en 50 mL de caldo MRS e incubadas a 37°C durante 12 h. Se cosecharon por centrifugación (10000 rpm, 10 min) y se lavaron 2 veces con SF estéril. Las células se resuspendieron en agua de bebida estéril y se realizaron las diluciones necesarias para obtener suspensiones bacterianas en el orden de 10<sup>9</sup> UFC/mL.

###### III.1.2- Animales, dieta y administración de las BL

Se utilizaron ratones Albinos Suizos machos de 6 semanas de edad. Los mismos fueron divididos en 8 grupos experimentales (n=8 por grupo) y se les suministró alimento y agua de bebida *ad libitum*, siguiendo las indicaciones del apartado II.3.1. Los tiempos de alimentación evaluados fueron 7 semanas (1° sacrificio) y 14 semanas (2° sacrificio).

En los dos períodos estudiados los animales fueron alimentados con DC (grupo Control) y DRG+S (3 grupos SM). Además, recibieron diariamente por vía oral (gavage) un volumen de 100 µL de agua (grupo Control y grupo SM) o de suspensiones bacterianas (10<sup>9</sup> UFC/mL) de *L. fermentum* CRL1446 (grupo SM+Lf) y *L. johnsonii* CRL1231 (grupo SM+Lj). La dosis de administración de las cepas fue de 10<sup>8</sup> UFC/día/ratón (Tabla 5 y Figura 9).

Tabla 5: Grupos experimentales evaluados a las 7 y 14 semanas de alimentación

Grupo	Alimento	Gavage
Control	DC	Agua
SM	DRG+s	Agua
SM+Lf	DRG+s	<i>L. fermentum</i> CRL1446
SM+Lj	DRG+s	<i>L. johnsonii</i> CRL1231

DC: Dieta convencional DRG+S: Dieta rica en grasa suplementada con 7% (p/p) de salvado de trigo

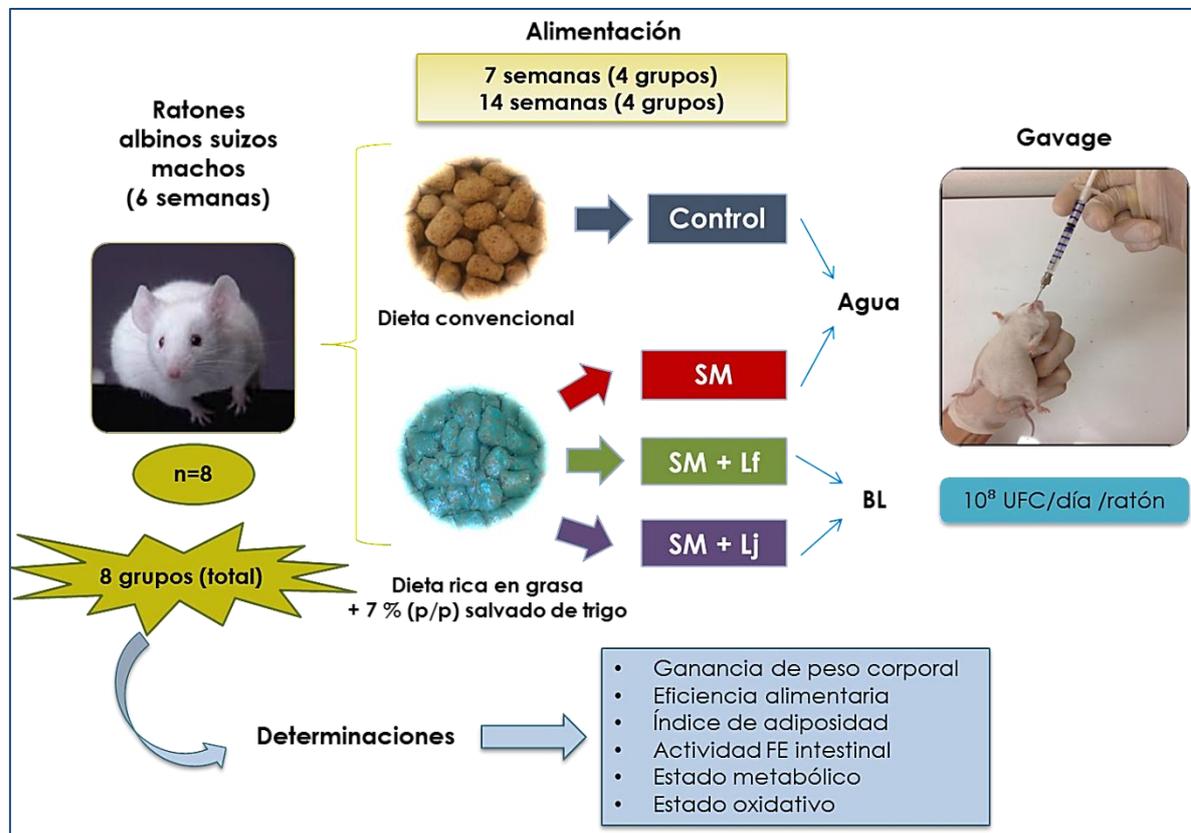


Figura 9: Grupos experimentales y protocolo de alimentación

### III.2- Ganancia de peso corporal y Eficiencia alimentaria

Para evaluar la ganancia de peso corporal los ratones fueron pesados al inicio de la experiencia y al cabo de las 7 y 14 semanas. Además, se monitoreó

diariamente la cantidad de alimento ingerido por los animales. Se utilizó una balanza electrónica (ACCULAB, EE.UU.) con una sensibilidad de 0,01 g.

La ganancia de peso corporal (GPC) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{GPC (g)} = \text{Peso corporal final (g)} - \text{Peso corporal inicial (g)}.$$

El índice de eficiencia alimentaria (EA) se expresó de la siguiente manera:

$$\text{EA} = \text{GPC (g)} / \text{Cantidad de alimento consumido (g)}$$

### III.3- Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG)

Se realizó la PTOG según lo descrito en el apartado II.3.4. Se graficaron las correspondientes curvas de tolerancia (concentración de glucosa vs tiempo) y se determinaron las áreas bajo la curva de los diferentes grupos experimentales a las 7 y 14 semanas.

### III.4- Prueba de Tolerancia Oral a la Sacarosa (PTOS)

A las 14 semanas, y previo ayuno de 12 h, los ratones recibieron por vía oral (gavage) una solución de sacarosa 60% (p/v). La dosis de administración fue de 2g/kg de peso corporal. Las mediciones de glucemia se realizaron cada 30 minutos, durante un período de 2 horas (0, 30, 60, 90 y 120 min) según las indicaciones del apartado II.3.3 (Tomaro-Duchesneau y col., 2014).

#### III.4.1- Inhibición de la actividad $\alpha$ -glucosidasa

La capacidad inhibitoria de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa se determinó en *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 empleando *p*-nitrofenil  $\alpha$ -D-glucopiranosido (*p*-NPG) como sustrato. La mezcla de reacción conteniendo PBS pH 6,5 estéril (200  $\mu$ L), *p*-NPG (8  $\mu$ L), suspensión bacteriana (10  $\mu$ L) y  $\alpha$ -glucosidasa (0,17 U/mL, Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) se incubó a 37°C durante 20 min. La cantidad de *p*-nitrofenol liberado fue cuantificado por medición de la absorbancia

inicial y final a 405 nm utilizando un lector de microplacas (Versamax™, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.) (Li y col., 2016).

### III.5- Sacrificio y obtención de plasma

Los animales fueron sacrificados al final de las semanas 7 y 14, y se obtuvo el plasma según el procedimiento descrito en el apartado II.3.5.

### III.6- Recolección de órganos

Luego del sacrificio se procedió a la extracción de diferentes órganos: hígado, intestino grueso, tejido adiposo mesentérico (TAM) y tejido adiposo epididimal (TAE).

Se pesaron las muestras de TAM y TAE y el índice de adiposidad (IAd) fue calculado utilizando la ecuación:

$$\text{IAd} = [(\text{Peso de TAM} + \text{Peso de TAE}) / \text{Peso corporal}] \times 100$$

### III.7- Preparación de extractos de hígado

Los extractos de hígado fueron obtenidos según la metodología descrita por Caetano y col. (2013). El hígado de cada ratón fue disgregado y homogenizado a 4°C con buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7,5 suplementado con EDTA 1 mM y ditiotreitól 3 mM; para ello se utilizó una relación volumen de buffer/peso de hígado de 5/1. Los homogenatos fueron centrifugados (8000 rpm, 30 min, 4°C) y los sobrenadantes fueron empleados para la determinación de las actividades enzimáticas.

#### III.7.1- Determinación de actividad Glutatión Peroxidasa (GPx)

La actividad GPx fue determinada según el protocolo descrito por Flohé y Günzler (1984), midiendo la velocidad de oxidación del NADPH a 340 nm.

**Actividad GPx:** Se definió una unidad (U) de actividad enzimática como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de NADP oxidado por minuto.

**Actividad específica:** U/g de hígado.

### III.7.2- Determinación de actividad Glutati6n Reductasa (GR)

La actividad GR fue determinada por el método de [Esterbauer y Grill \(1978\)](#). Se midió la velocidad de oxidaci6n del NADPH (disminuci6n de la absorbancia a 340 nm).

**Actividad GR:** Se defini6 una unidad (U) de actividad enzimática como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de NADP oxidado por minuto.

**Actividad específica:** U/g de hígado.

### III.8- Determinaci6n de lipoperoxidaci6n en plasma

Se determin6 la concentraci6n de derivados de lipoper6xidos (TBARS) en el plasma de los animales empleando la metodología del ácido tiobarbitúrico (TBA) ([Ohkawa y col., 1979](#)). En un tubo de vidrio se coloc6 0,5 mL de plasma, se agreg6 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (p/v), se tap6 y coloc6 a baño maría hirviente durante 10 minutos. A continuaci6n se enfri6 con agua helada y se agreg6 1 mL de TBA 0,67 % (p/v) en HCl 0,25 N. Se mezcl6 y se coloc6 a baño maría hirviente por 30 minutos. Se enfri6 rÁpidamente, se centrifug6 a 4000 rpm y se midió la absorbancia del sobrenadante a 535 nm en espectrof6t6metro. El coeficiente de extinci6n molar del TBA a 535 nm fue utilizado para realizar los cÁlculos ( $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Los resultados se expresaron en nmoles/g de proteÍnas.

### III.8.1- Determinación de proteínas en plasma

Las concentraciones de proteínas se determinaron por el método de Bradford (1976), usando un kit comercial de Bio-Rad (CA, EE.UU.) y albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) como estándar.

### III.9- Obtención de contenido de colon

Luego del sacrificio, el intestino grueso de cada animal fue diseccionado, colocado en una caja de petri conteniendo PBS pH 7 estéril y se mantuvo a 4°C. La extracción del contenido intestinal se realizó ejerciendo presión mecánica con pinza Adson sin dientes, se recogió en tubos eppendorfs de 2 mL y se pesó en balanza analítica.

#### III.9.1- Determinación de actividad Feruloil Esterasa (FE) intestinal

La actividad FE intestinal se determinó empleando la metodología descrita por Abejón Mukdsi y col. (2012). Al contenido de intestino grueso se añadió 1 mL de buffer PBS pH 7 estéril, se homogeneizó en vórtex y luego se centrifugó (5000 rpm, 4°C, 5 min). Los sobrenadantes se conservaron en baño de hielo hasta su utilización. La actividad FE se determinó por incubación del sobrenadante de contenido intestinal en buffer PBS pH 7 adicionado con metil ferulato (1 mM) como sustrato. Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 18 h y las reacciones enzimáticas se detuvieron por adición de ácido acético glacial (2 mM, pH 2,5). Las muestras se filtraron y el ácido ferúlico (AF) liberado se determinó por HPLC según lo descrito en el apartado I.1.3.

**Actividad FE intestinal:** Se define una unidad (U) de actividad enzimática como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de AF por hora.

**Actividad específica:** U/gramo de contenido intestinal.

### III.9.2- Producción de ácidos grasos de cadena corta en contenidos de colon

Se evaluó la producción de ácidos acético, propiónico y butírico en el contenido intestinal a las 14 semanas de acuerdo a la metodología descrita por Argañaraz-Martínez y col., (2013). Para ello se preparó una solución 5% (p/v) de contenido de colon con agua destilada estéril. Las muestras se desproteinizaron mediante la adición de  $H_2SO_4$  (concentración final 0,1 M). Luego, se mantuvieron a 4°C durante 15 min, se centrifugaron (7000 rpm, 10 min) y los ácidos orgánicos fueron detectados y cuantificados en el sobrenadante por HPLC.

Se inyectaron 20  $\mu$ L de sobrenadante en un sistema de HPLC (Knauer) equipado con una bomba Smartline pump 100, un detector de índice de refracción (Knauer, K-2301), un muestreador automático AS3800 y una columna de intercambio iónico (BIO-RAD Aminex HPX-87H; 300  $\times$  7,8 mm). Los diferentes componentes fueron eluidos con  $H_2SO_4$  5 mM a una velocidad de flujo de 0,6 mL  $min^{-1}$ .

### III.9.3- Detección de metabolitos de AF en contenidos de colon

Se determinó la presencia de metabolitos derivados del AF en los contenidos de intestino grueso de ratones alimentados durante 14 semanas. Para ello se prepararon homogenatos de contenido intestinal al 30% (p/v) en PBS pH 7 y se realizó la extracción. Alícuotas de 500  $\mu$ L de homogenato se acidificaron con 10  $\mu$ L de HCl (37%) y a continuación se adicionaron 2 mL de acetato de etilo. Se centrifugaron las muestras (8000 rpm, 10 min) y se recuperó la fase orgánica. Posteriormente se evaporó hasta sequedad en baño de agua a 40°C bajo una corriente de  $N_2$  y las muestras residuales se resuspendieron en 100  $\mu$ L de metanol.

Se inyectaron 20  $\mu$ L de cada muestra en un equipo de HPLC-UV-MS (InMet S. A., Rosario, Argentina) para detectar los diferentes compuestos fenólicos derivados del AF. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes:

Fase móvil: A:  $H_2O$  MQ / 0,1% de Ác. fórmico; B: Acetonitrilo / 0,1% de Ác. fórmico;

Flujo: 0,2 mL/min; Columna: C18 Hypersil-GOLD, Thermo Scientific (50 x 2,1 mm; 1,9 µm de tamaño de partícula); Temperatura de columna: 25°C; Temperatura de auto-sampler: 20°C; Detección: UV 320 nm, 265 nm +MS; Tiempo de corrida: 21 minutos.

### III.10- Ensayos bioquímicos

Se evaluaron los niveles plasmáticos de Glucosa, el perfil lipídico (Colesterol Total, HDL-Colesterol, LDL-Colesterol y Triglicéridos), y las Transaminasas Glutámico Oxalacética (GOT o AST) y Glutámico Pirúvica (GPT o ALT) mediante métodos enzimáticos, utilizando kits comerciales (Wiener Lab, Rosario, Argentina). Además se determinaron los niveles plasmáticos de leptina (Mouse/Rat Leptin Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, EE.UU.) e insulina (ALPCO Mouse Insulin ELISA, NH, EE.UU.) por inmunoensayo.

### III.11- Índices de riesgo cardiovascular

Para el cálculo de estos índices se emplearon los valores de lípidos en plasma obtenidos a las 7 y 14 semanas del ensayo experimental. Se utilizaron las ecuaciones sugeridas por Millán y col. (2009) y Vega y col. (2014):

- Índice de aterogenicidad (IA) = (Colesterol total – HDL)/ HDL
- LDL/HDL
- Triglicéridos/HDL
- Índice de aterogenicidad de plasma (IAP) = Log (TG/HDL)

### III.12- Índice HOMA de resistencia a la insulina (HOMA-IR)

Se calculó empleando los valores plasmáticos de insulina y glucosa en ayunas obtenidos a las 7 y 14 semanas del ensayo experimental. Se utilizó el modelo de homeostasis para la resistencia a la insulina (Matthews y col., 1985).

$$\text{HOMA-IR} = (\text{Glucosa en ayunas} \times \text{Insulina en ayunas}) / 22,5$$

### III.13- Evaluación del estado inflamatorio

El estado inflamatorio de los animales se evaluó a las 14 semanas. Se realizó la determinación de los niveles plasmáticos de citoquinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10) por citometría de flujo, empleando el kit CBA Mouse Soluble Protein Flex Set, (BD CA, EE.UU).

### III.14- Análisis histopatológico

Las muestras de hígado y tejido adiposo epididimal de cada grupo experimental fueron fijadas en paraformaldehído al 10% (v/v) en PBS pH 7, y posteriormente incluidas en parafina. Los bloques de parafina fueron cortados con micrótopo en láminas de 3-5  $\mu\text{m}$  y se colocaron en portaobjetos de vidrio. Los cortes histológicos fueron teñidos utilizando una mezcla de hematoxilina-eosina y se observaron al microscopio óptico (Carl Zeiss - Axio Scope.A1).

#### III.14.1- Evaluación del tamaño de adipocitos

Se determinó el tamaño de los adipocitos de cada grupo experimental de acuerdo a la metodología descrita por [Gauffin Cano y col. \(2013\)](#), utilizando el software Carl Zeiss – Axio Vision Release 4.8. Se tomaron microfotografías de cortes de tejido adiposo de cada grupo con un objetivo de 40x. Se determinó el área ( $\mu\text{m}^2$ ) de cada adipocito de un total de 100 adipocitos en dos cortes histológicos por ratón de cada grupo. A continuación, los adipocitos fueron agrupados por rangos de tamaño según sus áreas de la siguiente manera:

A: 500-1000  $\mu\text{m}^2$ ;

B: 1001-2000  $\mu\text{m}^2$ ;

C: 2001-3000  $\mu\text{m}^2$ ;

D: 3001-4000  $\mu\text{m}^2$ ;

E: 4001-8000  $\mu\text{m}^2$

### III.15- Evaluación de la microbiota intestinal por PCR en tiempo real (qPCR)

Al final de las 14 semanas de alimentación y antes del sacrificio de los animales, se tomaron muestras de heces de los ratones de cada grupo; las mismas se colectaron en tubos eppendorfs estériles y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La extracción de ADN se realizó utilizando un kit comercial específico para muestras fecales (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Hilden, Alemania). El procedimiento comprendió pasos de lisis de muestras de heces, adsorción de impurezas y purificación de ADN en columnas QIAamp Mini spin.

Se emplearon cebadores específicos dirigidos a distintos géneros bacterianos (Tabla 5) para caracterizar la composición de la microbiota mediante qPCR usando LightCyclerH 480 SYBR Green I Master (Roche, EE. UU.) con un sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7000-PCR (Applied Biosystems, Reino Unido) (Santacruz y col., 2010; Gauffin Cano, 2012).

Tabla 5: Cebadores de oligonucleótidos utilizados

Grupos bacterianos	Cebadores	Secuencia (5'-3')	(pb)	Temp. de hibridación (°C)
Bacterias totales	HDA 1, HDA 2	TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGC CCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	200	59
<i>Bifidobacterium</i>	BiFid F, BiFid R	CTCCTGGAAACGGGTGG GGTGTCTTCCCGATATCTACA	550	55
<i>Enterobacteriaceae</i>	Entero 1, Entero 2	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	195	63
<i>Lactobacillus</i>	Lac 1, Lac 2	AGCAGTAGGGAATCTTCCA ATTYCACCGCTACACATG	340	61

### III.16- Ensayo de translocación bacteriana

Este ensayo se realizó con la finalidad de determinar la inocuidad de las cepas seleccionadas, el hígado y el bazo de cada animal (grupos SM+Lf y SM+Lj) se removieron asépticamente a las 14 semanas post-administración y se disgregaron en 5 mL de SF en condiciones de esterilidad. Los órganos fueron homogenizados en SF y sembrados en 3 medios de cultivo agarizados diferentes: MRS, Mac Conkey y BHI. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 48 h en anaerobiosis.

Mac Conkey agar: Peptona 20 g; lactosa 10 g; bilis de buey desecada 5 g; púrpura de bromocresol 0,01 g; agar 15 g; agua destilada 1 L; pH 7,1.

BHI agar: Sustrato nutritivo (extracto de cerebro-corazón y peptona) 27,5 g; D (+) glucosa 2 g; cloruro de sodio 5 g; fosfato disódico 2,5 g; agar 15 g; agua destilada 1 L.; pH 7,4 ± 0,2.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CAPÍTULO IV

#### ESTUDIOS TECNOLÓGICOS PRELIMINARES: MICROENCAPSULACIÓN

##### IV.1- Microencapsulación de BL con actividad FE

###### IV.1.1- Microorganismos

Se trabajó inicialmente con las 3 cepas de BL previamente seleccionadas por su elevada actividad FE *in vitro*: *L. fermentum* CRL1446, *L. johnsonii* CRL1231, *L. acidophilus* CRL1014.

###### IV.1.2- Método de microencapsulación

El método de microencapsulación empleado fue el secado por atomización (*Spray Drying*). Se utilizó como material cobertor de las BL una matriz compuesta por alginato de sodio, inulina y maltodextrina (1, 15, 10% p/v, respectivamente). La mezcla se esterilizó en autoclave (121°C, 20 min) previo al proceso de secado. Los parámetros de operación del secador por spray (Buchi Mini Spray Dryer B280, Suiza) fueron los siguientes: Temperatura del aire de entrada (T° inlet): 130°C; Temperatura del aire de salida (T° outlet): 79-80°C; Flujo de alimentación: 5 mL/min; Flujo de aire: 50 m<sup>3</sup>/min; Agitación constante.

Las 3 cepas de BL fueron secadas en las condiciones mencionadas; para ello 600 mL de caldo MRS se inocularon con 25 mL de los cultivos activos (inóculos al 4 % v/v). Al cabo de 16 h de incubación a 37°C, las células se cosecharon por centrifugación (7000 rpm, 10 min, 4°C), se lavaron dos veces con buffer PBS pH 7 estéril y se resuspendieron en un volumen final de 30 mL. Las suspensiones bacterianas se incorporaron en 250 mL de la mezcla alginato-inulina-maltodextrina con agitación a 30°C. Se tomaron alícuotas (1 mL) inmediatamente para hacer los recuentos de UFC/mL y el dosaje de la actividad FE inicial (antes del secado). Los

polvos obtenidos después del proceso de secado (microcápsulas) se colocaron dentro de tubos Falcon estériles, se sellaron las tapas con parafilm para evitar la humidificación, y se guardaron en recipientes herméticos a 4°C. La mezcla cobertora sin inocular también fue secada y el polvo obtenido fue utilizado como control.

El contenido de humedad de los polvos se determinó mediante el método de Karl Fischer, basado en la oxidación del dióxido de azufre por yodo (AOAC, 2005; método 2001.12).

## IV.2- Evaluación de la viabilidad de las BL

### IV.2.1- Viabilidad de las cepas antes y después del secado

Para evaluar la resistencia de las cepas al proceso de secado por spray, se tomaron muestras de las matrices inoculadas con las 3 BL (antes del secado) y de los polvos obtenidos tras el proceso de secado. Se efectuaron diluciones seriadas de las muestras en PBS pH 7 estéril y se sembró en placas de MRS agar. Se incubó a 37°C durante 48-72 h en microaerofilia y se calculó UFC/mL y UFC/g de polvo.

### IV.2.2- Viabilidad durante el almacenamiento de las microcápsulas

Se evaluó la viabilidad de las cepas microencapsuladas almacenadas a 4°C. Se tomaron muestras a los 0, 1, 2, 4, 7 y 9 meses, y se realizaron los recuentos en placas de MRS agar determinándose UFC/g de polvo.

## IV.3- Evaluación de la actividad FE

### IV.3.1- Detección de actividad FE de BL antes y después del secado

La presencia de actividad FE de las cepas se determinó antes y después del proceso de secado. Se usó medio MRS agar sin glucosa adicionado de etil ferulato (1% v/v). Se realizaron pocillos de aproximadamente 1 cm de diámetro, en donde se sembraron las suspensiones bacterianas en la mezcla cobertora (antes del secado) y los respectivos polvos reconstituidos en PBS (después del secado). Tras 24-72 h de

incubación a 37°C, la aparición de halos de aclaramiento alrededor de los pocillos, indicaron la presencia de actividad FE.

#### **IV.3.2- Determinación de actividad FE en microcápsulas almacenadas a 4°C**

La actividad FE se determinó a los 0, 1, 2, 4, 7 y 9 meses de almacenamiento. Los polvos reconstituidos se incubaron (37°C, 24 h) en buffer PBS pH 7, adicionado con metil ferulato (1 mM) como sustrato. Las reacciones enzimáticas se detuvieron por adición de ácido acético glacial (2 mM, pH 2,5), las muestras se filtraron y el AF liberado se determinó por HPLC según lo descrito en el apartado I.1.3.

La actividad específica se expresó como U/Log UFC, en donde U =  $\mu\text{mol}$  de AF liberado por hora.

#### **IV.4- Resistencia de las microcápsulas a las condiciones simuladas del TGI**

Se evaluó *in vitro* la resistencia de las 3 cepas de BL microencapsuladas a las condiciones presentes en el TGI. La metodología empleada fue la misma que en el caso de las cepas libres, descrita en el apartado I.4. Después de las incubaciones secuenciales en los jugos gástrico e intestinal artificiales, se sembró en medio MRS agar y el recuento de las células viables fue expresado como Log UFC/g de polvo.

#### **IV.5- Administración de las microcápsulas en un modelo experimental de SM en ratón**

##### **IV.5.1- Animales, dieta y administración de las microcápsulas**

Se utilizaron ratones Albinos Suizos machos de 6 semanas de edad. Los mismos fueron divididos en 4 grupos experimentales (n=12) y mantenidos en jaulas a una temperatura de  $22\pm 2^\circ\text{C}$  con ciclos de luz-oscuridad de 12 h. Los animales recibieron alimento y agua de bebida *ad libitum* durante un período de 7 semanas. Los ratones fueron alimentados con dieta convencional [DC] (grupo Control) y dieta rica en grasa suplementada con salvado de trigo [DRG+s] (3 grupos SM). Además,

recibieron diariamente mediante gavage suspensiones de las microcápsulas en agua de bebida (10% p/v). Se administraron microcápsulas vacías (grupos Control y SM) y microcápsulas conteniendo *L. fermentum* CRL1446 (grupo SM+Lf) y *L. johnsonii* CRL1231 (grupo SM+Lj). La dosis de administración fue de  $10^7$  UFC/día/ratón. En la Tabla 6 se detallan los grupos experimentales evaluados.

Tabla 6: Grupos experimentales evaluados a las 7 semanas de alimentación

Grupo	Alimento	Microcápsulas
Control	DC	Vacías
SM	DRG+s	Vacías
SM+Lf	DRG+s	<i>L. fermentum</i> CRL1446
SM+Lj	DRG+s	<i>L. johnsonii</i> CRL1231

<sup>1</sup> DC: Dieta convencional DRG+s: Dieta rica en grasa suplementada con 7% (p/p) de salvado de trigo

Para evaluar la ganancia de peso corporal, los ratones fueron pesados al inicio de la experiencia y al cabo de 7 semanas. Además, se monitoreó diariamente la cantidad de alimento ingerido por los animales.

La ganancia de peso corporal (GPC) y el índice de eficiencia alimentaria (EA) se calcularon de acuerdo a las ecuaciones detalladas en el apartado III.2

Se realizó además la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) en todos los grupos de animales siguiendo las indicaciones del apartado II.3.4.

#### IV.5.2- Sacrificio y obtención de plasma

Los animales fueron sacrificados al final de las 7 semanas y se obtuvo el plasma según el procedimiento descrito en el apartado II.3.5.

#### IV.5.3- Recolección de órganos

Luego del sacrificio se procedió a la extracción de diferentes órganos: hígado, intestino grueso, tejido adiposo mesentérico (TAM) y tejido adiposo epididimal (TAE).

El índice de adiposidad (IAd) se expresó utilizando la fórmula detallada en el apartado III.6.

#### IV.5.4- Preparación de extractos de hígado

Los extractos de hígado fueron obtenidos según la metodología descrita en el apartado III.7.

#### IV.5.5- Actividad Glutati6n Peroxidasa (GPx) y Glutati6n Reductasa (GR)

Las actividades GPx y GR fueron determinadas en extractos de hígado, de acuerdo a lo descrito en los apartados III.7.1 y III.7.2, respectivamente.

#### IV.5.6- Actividad FE intestinal

Se determin6 la actividad FE en contenidos de intestino grueso seg6n lo indicado en el apartado II.9.1.

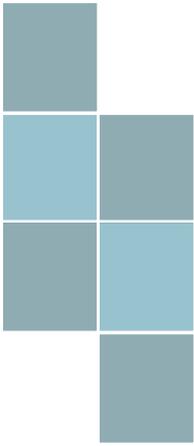
#### IV.5.7- Ensayos bioquímicos

Se evaluaron los niveles plasmáticos de Glucosa, Colesterol Total, HDL-Colesterol, LDL-Colesterol y Triglicéridos mediante métodos enzimáticos, utilizando kits comerciales (Wiener Lab, Rosario, Argentina). Además, se determinaron por inmunoensayo los niveles plasmáticos de leptina (Mouse/Rat Leptin Quantikine ELISA Kit, R&D Systems) e insulina (ALPCO Mouse Insulin ELISA).

Se calcularon índices de riesgo cardiovascular e índice HOMA-IR aplicando las ecuaciones detalladas en los apartados III.11 y III.12, respectivamente.

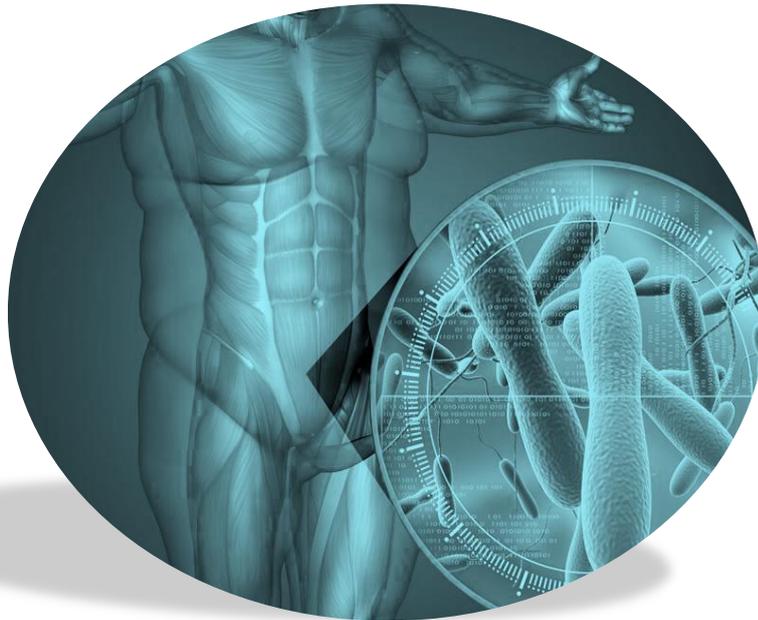
#### IV.5.8- Análisis histopatológico

Las muestras de hígado de cada grupo experimental fueron procesadas para su evaluación histopatológica según lo especificado en el apartado III.14.



# CAPÍTULO I

## BACTERIAS LÁCTICAS CON ACTIVIDAD FERULOIL ESTERASA



En el presente capítulo se realizó el abordaje de los siguientes objetivos específicos:

- **OE1-** Seleccionar BL de origen alimentario o intestinal humano con actividad FE generadoras de ácidos hidroxicinámicos.
- **OE2-** Estudiar el efecto de diferentes fuentes de carbono y de las condiciones del tracto gastrointestinal sobre la actividad FE de las BL seleccionadas

## CAPÍTULO I

### BACTERIAS LÁCTICAS CON ACTIVIDAD FERULOIL ESTERASA

#### I.1- Selección de BL con actividad feruloil esterasa (FE) mediante ensayos *in vitro*

##### I.1.1- Evaluación cualitativa de la actividad FE

Se determinó la capacidad de hidrólisis de etil ferulato (EtF) en las cepas de BL detalladas en la [Tabla 3](#) (ver Materiales y Métodos).

De las 40 cepas evaluadas solo 12 mostraron halos de hidrólisis en el medio agarizado (MRS sin glucosa + EtF), indicando la presencia de actividad FE ([Figura 10](#) y [Tabla 7](#)). Las cepas FE positivas pertenecieron al género *Lactobacillus* (*L.*), detectándose actividad en las especies *acidophilus* (2 positivas), *fermentum* (4 positivas), *helveticus* (1 positiva), *johnsonii* (1 positiva), *mucosae* (1 positiva), *plantarum* (2 positivas) y *reuteri* (1 positiva). El aclaramiento del medio fue más rápido (menos de 24 h) en 4 de estas cepas: *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446, *L. johnsonii* CRL1231 y *L. plantarum* CRL46.



Figura 10: Detección de actividad FE en medio MRS sin glucosa + EtF agarizado. Los halos claros indican presencia de actividad FE

Tabla 7: Cepas de BL con actividad FE

Microorganismos	Tiempo de aparición del halo de hidrólisis*
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL1014	< de 24 h
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL644	> de 24 h
<i>Lactobacillus fermentum</i> CRL574	> de 24 h
<i>Lactobacillus fermentum</i> CRL973	> de 24 h
<i>Lactobacillus fermentum</i> CRL1408	> de 24 h
<i>Lactobacillus fermentum</i> CRL1446	< de 24 h
<i>Lactobacillus helveticus</i> CRL1062	> de 24 h
<i>Lactobacillus johnsonii</i> CRL1231	< de 24 h
<i>Lactobacillus mucosae</i> CRL573	> de 24 h
<i>Lactobacillus plantarum</i> CRL46	< de 24 h
<i>Lactobacillus plantarum</i> CRL41	> de 24 h
<i>Lactobacillus reuteri</i> CRL1099	> de 24 h

\*En gris se encuentran resaltadas aquellas cepas de BL que hidrolizaron el EtF del medio agarizado más rápidamente.

### I.1.2- Evaluación cuantitativa de la actividad FE

Para el estudio cuantitativo se trabajó con las 4 cepas de BL que mostraron mayor rapidez de hidrólisis de EtF en el medio agarizado. Las cepas fueron inoculadas en caldo MRS sin glucosa + EtF e incubadas a 37°C. Se determinaron las concentraciones de EtF y AF en los sobrenadantes de cultivos hasta las 24 h de incubación.

La Figura 11 muestra ejemplos de perfiles cromatográficos con los picos correspondientes a EtF y AF a las 3 h (A) y 24 h (B) de incubación, cuando *L. fermentum* CRL1446 fue inoculado en caldo MRS sin glucosa + EtF.

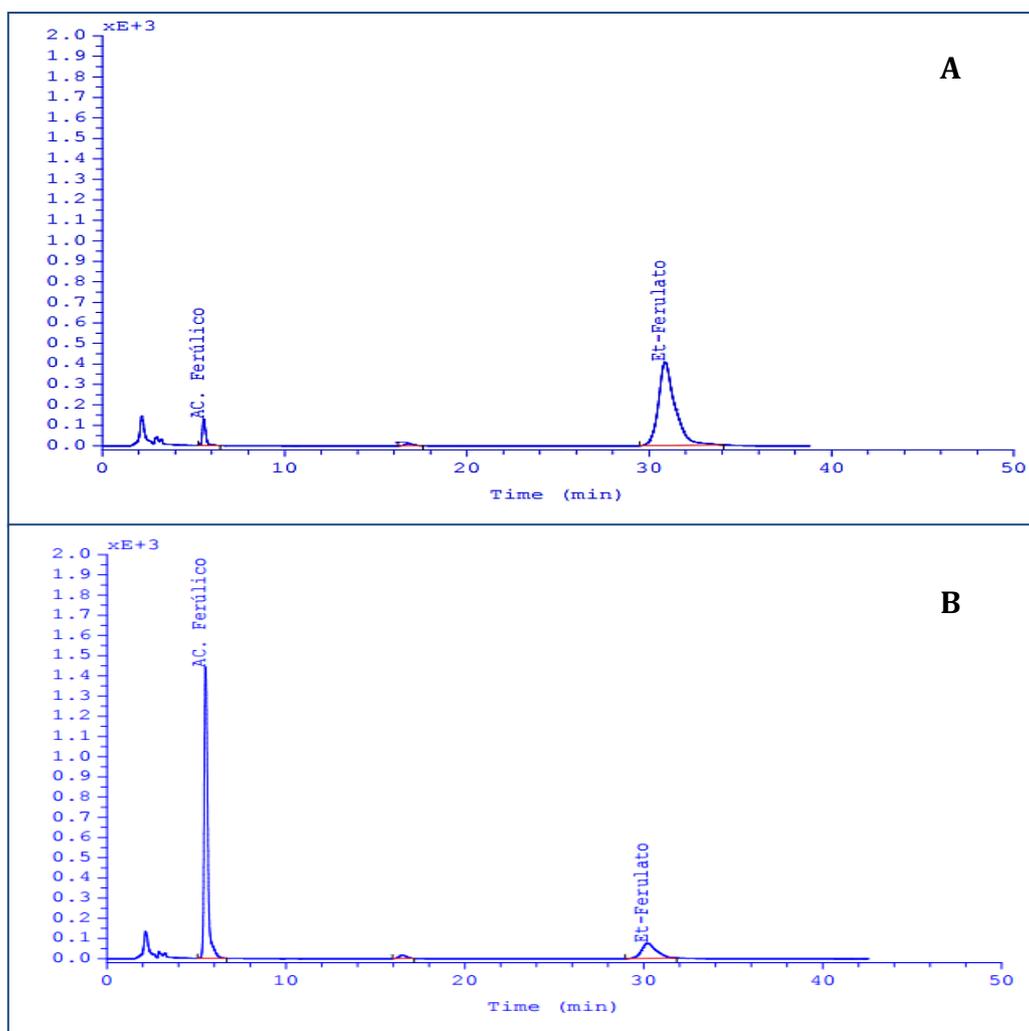


Figura 11: Perfil cromatográfico de EtF y AF en sobrenadantes del medio de cultivo de *L. fermentum* CRL1446. (A): 3 h de incubación, (B): 24 h de incubación).

Se observó que durante las 24 h de incubación la concentración de EtF disminuía en el medio, mientras aumentaba la concentración de AF liberado (Figuras 11 y 12). Los resultados mostraron que al final del período de incubación, *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 fueron capaces de hidrolizar más del 80% del EtF presente en el medio (Tabla 8). *L. acidophilus* CRL1014 hidrolizó el 96,67% del EtF, no observándose diferencias estadísticas

significativas entre *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 (91,33 y 88,67%, respectivamente). Por otra parte, *L. plantarum* CRL46 solo fue capaz de hidrolizar un 43,33% del EtF.

Con respecto al AF liberado por hidrólisis del EtF, se detectaron las mayores concentraciones para *L. johnsonii* y *L. fermentum* (1,97 mM y 1,72 mM, respectivamente). Para *L. plantarum* se detectaron niveles muy bajos de AF a las 24 h de incubación (0,05 mM); sin embargo, a las 9 h la concentración de AF para esta cepa fue de 0,59 mM, disminuyendo posteriormente (Figura 12 y Tabla 8).

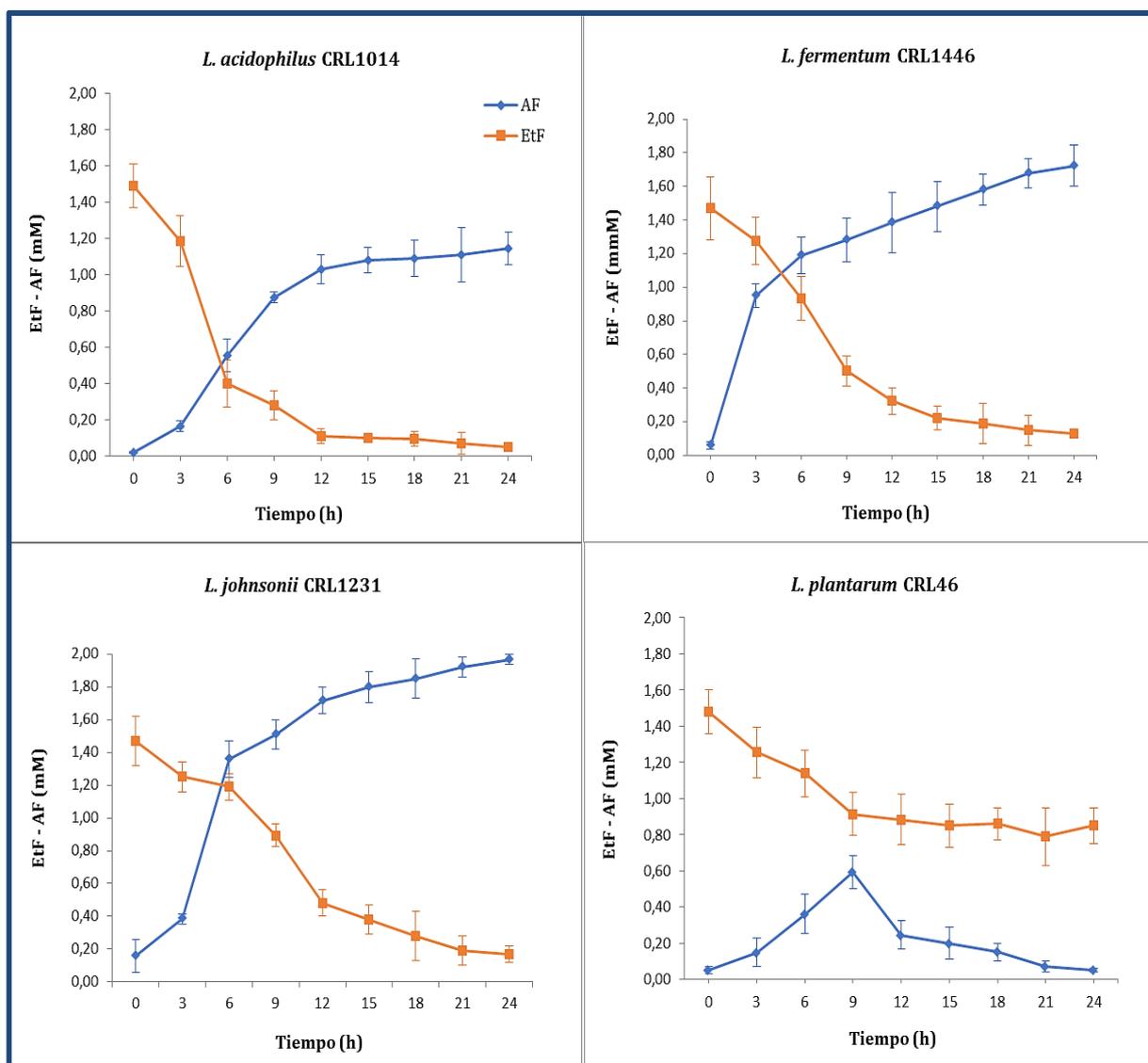


Figura 12: Cinéticas de hidrólisis de Etilferulato y liberación de Ácido ferúlico  
 (■) Concentración de EtF (mM), (◆) Concentración de AF (mM)

Tabla 8: Hidrólisis de EtF y liberación de AF a las 24 h

CEPAS	EtF residual (mM)*	%EtF hidrolizado	Ácido ferúlico liberado (mM)*
<i>L. acidophilus</i> CRL1014	0,05 ± 0,01 <sup>a</sup>	96,67 ± 1,9 <sup>a</sup>	1,15 ± 0,09 <sup>a</sup>
<i>L. fermentum</i> CRL 1446	0,13 ± 0,03 <sup>b</sup>	91,33 ± 1.2 <sup>b</sup>	1,72 ± 0,13 <sup>b</sup>
<i>L. johnsonii</i> CRL 1231	0,17 ± 0,05 <sup>b</sup>	88,67 ± 1.8 <sup>b</sup>	1,97 ± 0,15 <sup>b</sup>
<i>L. plantarum</i> CRL46	0,85 ± 0,09 <sup>c</sup>	43,33 ± 0.9 <sup>c</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>c</sup>

\*Las concentraciones de EtF residual y de AF liberado se determinaron a las 24 h de incubación. Los datos representan la media ± DS (desvío estándar). La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores en la misma columna con letras distintas en superíndice difieren significativamente.

### I.1.3- Evaluación del crecimiento bacteriano en presencia de EtF

Paralelamente al estudio de hidrólisis de EtF y liberación de AF, se evaluó el crecimiento de las 4 cepas seleccionadas en el medio MRS sin glucosa + EtF determinando el número de células viables (Log UFC/mL). Se utilizaron como controles de crecimiento las cepas inoculadas en el mismo medio sin el agregado del éster (Figura 13).

Los resultados mostraron que el crecimiento de las cepas no fue afectado por el agregado de EtF en el medio, lo cual indica que dichas cepas no utilizan el hidroxicinamato como fuente de carbono y energía, y que el AF liberado no inhibe el crecimiento de las mismas. En general, las cepas llegaron a la fase estacionaria entre las 9 y 12 h de incubación.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta etapa, se decidió continuar el estudio empleando las 3 cepas de BL que mostraron una mayor liberación de AF: *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231.

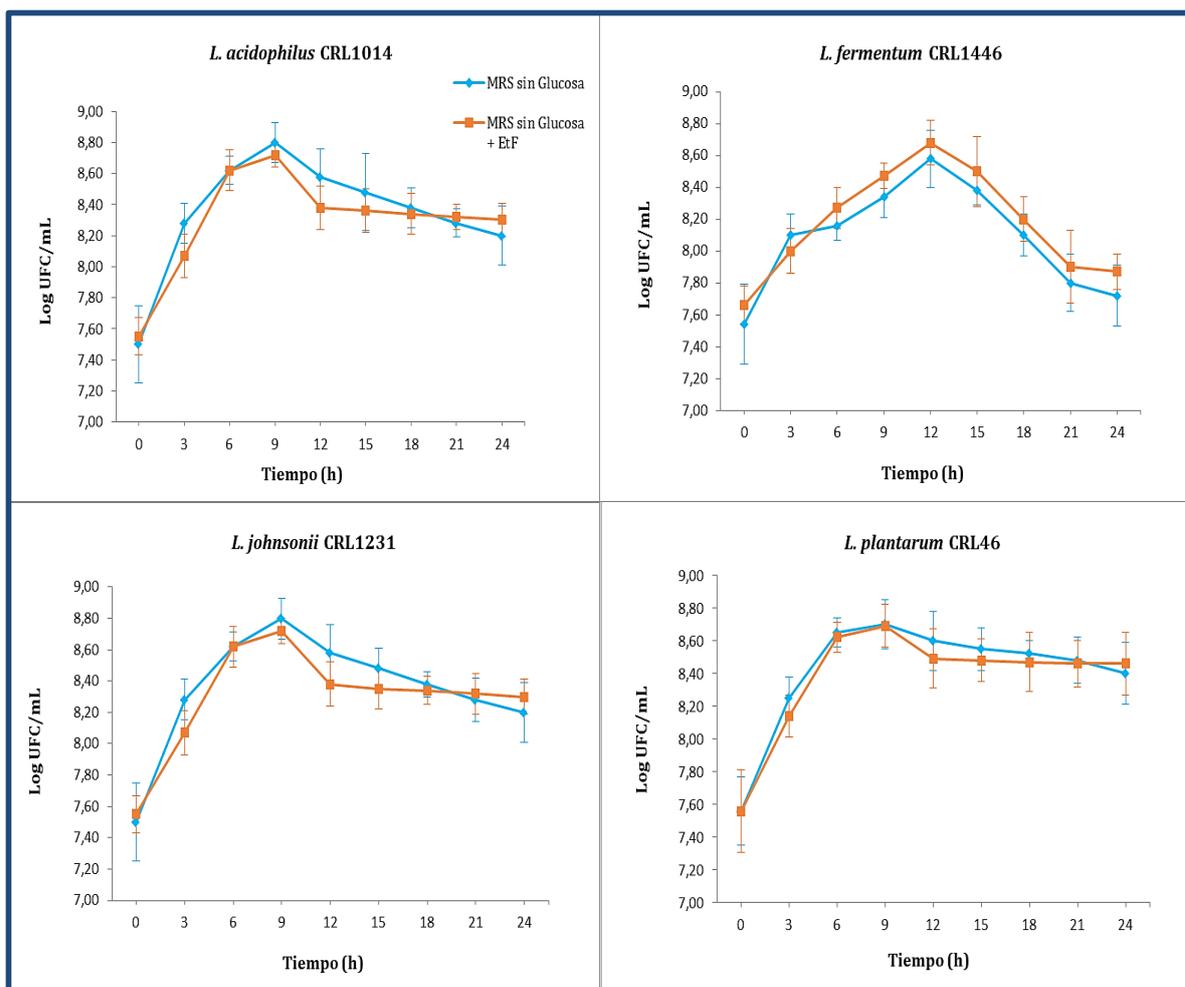


Figura 13: Curvas de crecimiento de las bacterias lácticas seleccionadas  
 (♦) Crecimiento en MRS sin glucosa, (■) Crecimiento en MRS sin glucosa y con Eterferato.

#### 1.1.4- Evaluación de la capacidad de hidrólisis de hidroxicinamatos del salvado de trigo

Con la finalidad de evaluar si las cepas con actividad FE *in vitro* son capaces de hidrolizar los hidroxicinamatos presentes en el salvado de trigo, se incubaron suspensiones celulares de las mismas en presencia de salvado previamente tratado con xilanas. La concentración de AF total se determinó sometiendo el salvado a una hidrólisis alcalina, para liberar todo el ácido esterificado en la fibra (Hole y col., 2012). Luego de esta hidrólisis se detectó una concentración de  $44,73 \pm 2,34 \mu\text{mol}$  AF/g de trigo. *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 liberaron mayores

concentraciones de AF que *L. acidophilus* CRL1014 luego de 18 h de incubación (Tabla 9). Estos resultados evidenciaron que las cepas seleccionadas son capaces de hidrolizar los hidroxicinamatos del salvado de trigo, liberando AF.

Tabla 9: Liberación de AF a partir de los hidroxicinamatos del salvado de trigo

CEPA	ÁCIDO FERÚLICO LIBERADO μmol/g de salvado
<i>L. acidophilus</i> CRL1014	2,31 ± 0,29 <sup>a</sup>
<i>L. fermentum</i> CRL1446	3,96 ± 0,10 <sup>b</sup>
<i>L. johnsonii</i> CRL1231	5,16 ± 0,45 <sup>c</sup>
Control negativo*	0,21 ± 0,03 <sup>d</sup>

\* Se usó como control negativo fibra incubada sin bacteria (con PBS pH7). Los datos representan la media ± DS (desvío estándar). La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores con letras distintas en superíndice difieren significativamente.

## I.2- Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre las BL con actividad FE

### I.2.1- Influencia de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento de BL

Se evaluó el crecimiento bacteriano de *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 en un medio mínimo (MM) [control, sin adición de hidratos de carbono] y MM suplementados con distintas fuentes de carbono (Glucosa, Xilosa, Arabinosa, Fructosa, EtF y Ácido Clorogénico, 0,5% p/v). En la Figura 14 se muestran las curvas de crecimiento de cada una de estas cepas en los diferentes medios evaluados (DO<sub>560</sub> vs tiempo).

Se observó que en los medios suplementados con glucosa y fructosa el crecimiento de las 3 cepas resultó mayor con respecto al control, mientras que con EtF y ácido clorogénico (hidroxicinamatos) no hubo diferencias. En general, las 3 cepas permanecieron en fase exponencial y metabólicamente activas hasta las 6 h

de incubación en los distintos medios; por ello, para continuar con los estudios de inducción de actividad FE se decidió cosechar las células a las 6 h.

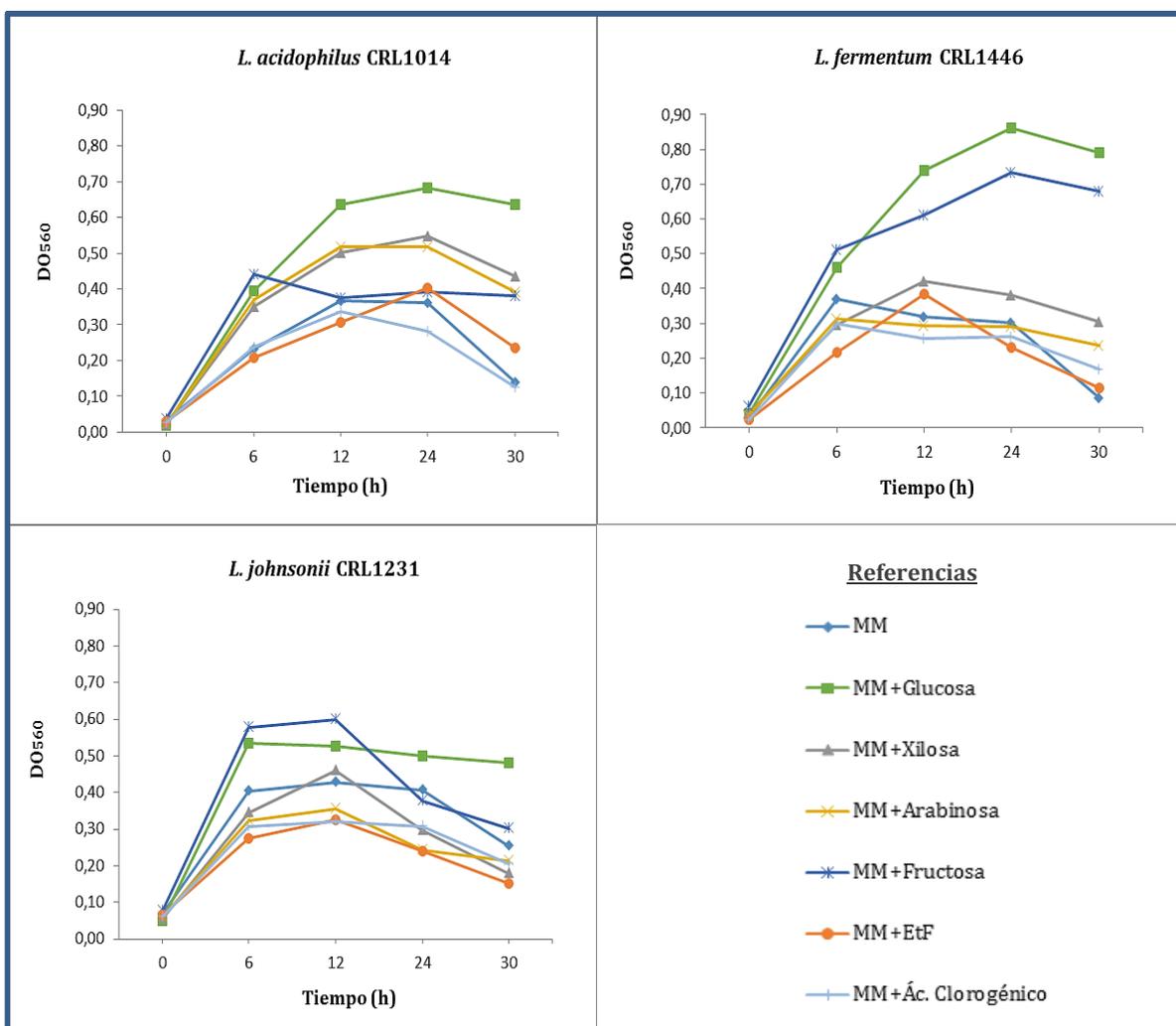


Figura 14: Influencia de diferentes fuentes de Carbono sobre el crecimiento de BL. El crecimiento bacteriano fue determinado midiendo la densidad óptica a 560 nm.

### I.2.2- Influencia de diferentes fuentes de carbono sobre la actividad FE de BL

La actividad FE de *L. acidophilus* CRL1014 (La CRL1014), *L. fermentum* CRL1446 (Lf CRL1446) y *L. johnsonii* CRL1231 (Lj CRL1231) fue determinada después de 6 h de cultivo en los 7 medios evaluados (MM, MM+Glucosa, MM+Xilosa, MM+Arabinosa, MM+Fructosa, MM+EtF, MM+Ácido Clorogénico) (Figura 15). Este estudio permitió conocer si la presencia de algunas de estas fuentes de carbono

(monosacáridos o hidroxicinamatos) en el medio inducía la actividad FE de las cepas, comparado con el control MM.

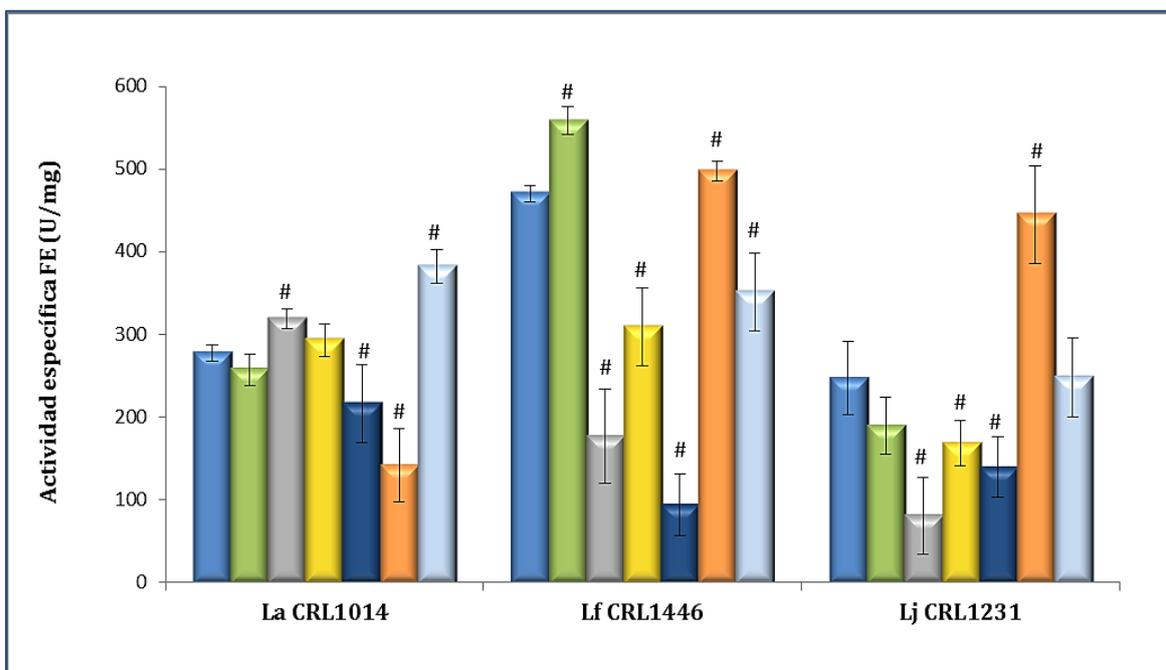


Figura 15: Actividad FE de BL crecidas en medios con distintas fuentes de carbono

Medio mínimo (MM) (●), MM con Glucosa (●), MM con Xilosa (●), MM con arabinosa (●), MM con fructosa (●), MM con EtF (●) y MM con ácido clorogénico (●). Los datos representan la media  $\pm$  DS (desvío estándar). La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . (#) Valores de actividades específicas significativamente diferentes con respecto al medio mínimo.

Con respecto a los hidroxicinamatos, la actividad FE en *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 incrementó en las células crecidas en presencia de EtF (20 y 80%, respectivamente), respecto al medio MM. En *L. acidophilus* CRL1014 se observó que la actividad fue estimulada solo por el ácido clorogénico (38%).

En cuanto al efecto de los monosacáridos sobre la actividad FE, se observó inducción por glucosa en *L. fermentum* CRL1446, y por xilosa en *L. acidophilus* CRL1014 (30 y 15%, respectivamente).

### I.3- Resistencia de las BL a condiciones del tracto gastrointestinal (TGI)

#### I.3.1- Efecto de las condiciones del TGI sobre la viabilidad de las BL

En una primera instancia se evaluó la viabilidad de *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 luego de atravesar un sistema que simula las condiciones presentes en el TGI. La resistencia de cada una de las cepas se determinó mediante recuento de las células viables (Log UFC/mL) antes y después de la exposición a los jugos gástrico (JG) e intestinal (JI) simulados (Tabla 10).

Tabla 10: Resistencia de las cepas con actividad FE a las condiciones del TGI

Condiciones		Tiempo de incubación (h)	Log UFC/mL		
			La CRL1014	Lf CRL1446	Lj CRL1231
Jugo Gástrico (JG)	pH3	0	9,13±0,03 <sup>a</sup>	9,28±0,06 <sup>a</sup>	9,20±0,01 <sup>a</sup>
		2	3,69±0,13 <sup>b</sup>	7,15±0,05 <sup>b</sup>	5,12±0,03 <sup>b</sup>
	pH4	0	9,13±0,03 <sup>a</sup>	9,28±0,06 <sup>a</sup>	9,20±0,01 <sup>a</sup>
		2	4,78±0,01 <sup>b</sup>	8,85±0,01 <sup>b</sup>	6,89±0,05 <sup>b</sup>
Jugo Intestinal (JI)	desde JG pH 3	0	3,69±0,13 <sup>a</sup>	7,15±0,05 <sup>a</sup>	5,12±0,03 <sup>a</sup>
		2	2,31±0,01 <sup>b</sup>	7,10±0,02 <sup>a</sup>	4,49±0,01 <sup>b</sup>
	desde JG pH 4	0	4,78±0,01 <sup>a</sup>	8,85±0,01 <sup>a</sup>	6,89±0,05 <sup>a</sup>
		2	3,87±0,04 <sup>b</sup>	8,24±0,61 <sup>a</sup>	6,63±0,21 <sup>a</sup>

Los datos representan la media ± DS (desvío estándar) n=3. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . (a-b): Valores en la misma columna (para una misma condición) con superíndices distintos son significativamente diferentes.

Cuando las cepas se incubaron en presencia de JG simulado pH 2 se observó una disminución de más de 5 unidades logarítmicas para las tres cepas. En presencia de JG pH 3 y pH 4 (Tabla 10), se observó que *L. fermentum* CRL1446 fue la cepa

que más resistió (disminución de recuentos de 2 y 0,5 unidades logarítmicas a pH 3 y pH 4, respectivamente). La mayor pérdida de viabilidad fue observada en *L. acidophilus* CRL1014 (disminución de 5 y 4 unidades logarítmicas a pH 3 y pH 4, respectivamente). *L. johnsonii* CRL1231, por su parte, mostró mayor resistencia que *L. acidophilus* CRL1014 (disminución de 4 y 2 unidades logarítmicas a pH 3 y pH 4, respectivamente).

Para los estudios del efecto del JI solo se consideraron las células provenientes de JG a pH 3 y pH 4, ya que el pH 2 afectó considerablemente la viabilidad de las tres cepas.

Cuando las células sometidas al JG pH 3 fueron expuestas al JI simulado por 2 h, se observó una disminución de aproximadamente 1 orden logarítmico de los recuentos de células viables de *L. acidophilus* CRL1014 y *L. johnsonii* CRL1231. La viabilidad de *L. fermentum* CRL1446 no fue afectada por la incubación en JI, siendo el recuento final de  $10^7$  UFC/mL.

En cuanto a las células sometidas previamente a JG pH 4, se vio que después de la incubación en JI simulado solo fue afectada la viabilidad de *L. acidophilus* CRL1014 (disminución de 1 orden logarítmico). Los recuentos de células viables de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 no se vieron alterados en este caso, siendo de  $10^8$  y  $10^6$  UFC/mL, respectivamente.

### I.3.2- Efecto de las condiciones del TGI sobre la actividad FE de las BL

Además de evaluar si *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 eran capaces de mantenerse viables tras la exposición a las condiciones simuladas del TGI, se determinó si su actividad FE se veía afectada por dichas condiciones (Figura 16).

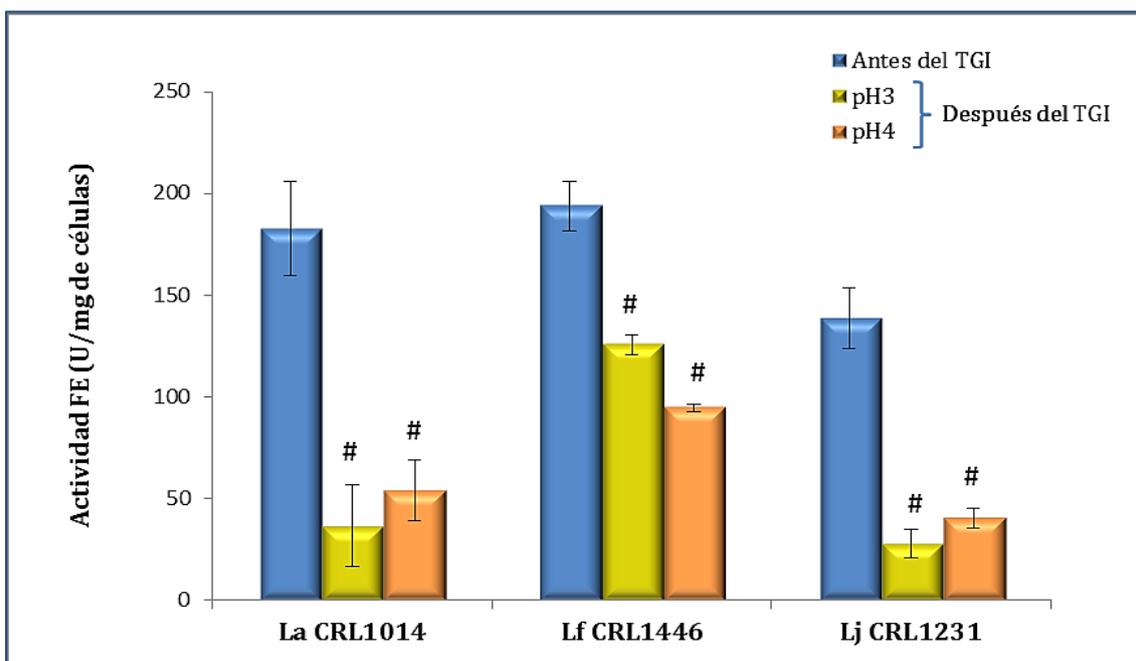


Figura 16: Actividad FE antes y después de la exposición a las condiciones del TGI

Los datos representan la media  $\pm$  DS (desvío estándar). La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . (#) Valores de actividades específicas significativamente diferentes con respecto a las células antes de ser sometidas a las condiciones simuladas del TGI.

De las 3 cepas evaluadas, *L. fermentum* CRL1446 mostró mayor capacidad para mantener la actividad FE después de la exposición a las condiciones del TGI (alrededor de 65 y 50% de actividad residual a pH 3 y pH 4, respectivamente). *L. johnsonii* CRL1231 y *L. acidophilus* CRL1014 sufrieron una mayor pérdida de actividad FE después del pasaje simulado por el TGI, manteniendo alrededor de 20 y 30% de la actividad inicial a pH 3 y pH 4, respectivamente.

#### I.4- Discusión

La actividad FE es responsable de la liberación de AF a partir de hidroxicinamatos sintéticos (como el EtF) o naturales, los cuales se encuentran en la pared celular de frutas, verduras, granos y cereales. El AF es un compuesto de gran importancia, no solo por su amplio uso industrial, sino también por sus efectos beneficiosos en la salud humana y animal (Govindaswamy, 2015).

Se evaluó cualitativamente la presencia de actividad FE en 40 cepas de BL pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* (37 cepas), *Weisella* (1 cepa) y *Pediococcus* (2 cepas) en medio agarizado (MRS sin glucosa + EtF). Solo se detectó actividad en 12 cepas, todas ellas pertenecientes al género *Lactobacillus*. La presencia de actividad FE fue dependiente de cepa, encontrándose con mayor frecuencia en *Lactobacillus fermentum* (4 positivas de 7 cepas evaluadas). Donaghy y col. (1998) informaron la presencia de actividad FE en medio MRS sin glucosa + EtF en cepas de *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. leichmanni* y *L. farciminis*, siendo las 2 primeras especies frecuentemente aisladas de heces humanas y animales. Guglielmetti y col. (2008) encontraron de un total de 100 cepas aisladas de alimentos y de intestino humano, 12 cepas de lactobacilos pertenecientes a las especies *L. helveticus*, *L. acidophilus* y *L. fermentum*, que presentaron actividad frente a EtF y ácido clorogénico. Otros autores informaron la presencia de actividad CE en BL de origen intestinal humano y de rata (Couteau y col., 2001; Lai y col., 2009).

De las 12 cepas FE positivas detectadas en este estudio, solo 4 evidenciaron actividad en menos de 24 h (*L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446, *L. johnsonii* CRL1231 y *L. plantarum* CRL46). De estas cepas, las que liberaron mayores niveles de AF fueron *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231.

*L. plantarum* CRL46 liberó AF hasta las 9 h de incubación, observándose luego una disminución de la concentración de este ácido. Algunas BL metabolizan el

AF a otros compuestos como por ejemplo ácido dihidroferúlico, ácido vanílico y vainillina (Filannino y col., 2014). En *L. plantarum* se informó la presencia de la enzima descarboxilasa de ácidos fenólicos (PAD), que metaboliza el AF a 4-vinilfenol y/o 4-vinilguaiacol (Van Beek y Priest, 2000).

Los resultados preliminares obtenidos permitieron seleccionar las cepas: *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 por su capacidad de liberar altas concentraciones de AF a partir de su forma esterificada (EtF) y por no metabolizarlo a otros compuestos.

Muchas BL con actividad FE frente a sustratos sintéticos como el EtF, pueden no ser capaces de hidrolizar los hidroxicinamatos presentes en las paredes celulares de los vegetales. Debido a que el salvado de trigo es una de las fuentes naturales más ricas en ésteres de AF (ferulatos) (Andreasen y col., 2001a), se decidió evaluar si las cepas seleccionadas eran capaces de hidrolizar estos compuestos presentes en el salvado, liberando AF. Se incubaron suspensiones celulares de las bacterias en presencia de salvado previamente tratado con xilanasas. Se sabe que las xilanasas y las FE bacterianas actúan de manera sinérgica, siendo las primeras responsables de fragmentar la cadena de xilano a oligosacáridos más pequeños y solubles, exponiendo los ferulatos de la pared celular vegetal a la hidrólisis por parte de las esterasas bacterianas (Kroon y col., 1997; Nishizawa y col. 1998).

Los resultados mostraron que luego de la hidrólisis alcalina del salvado de trigo se liberó 44,73  $\mu\text{mol}$  de AF/g de salvado, lo que corresponde a 0,86 mg de AF/100 g de salvado de trigo. Los valores encontrados son cercanos a los informados por otros autores (Andreasen y col., 2001a). Además se vio que las cepas seleccionadas eran capaces de liberar AF a partir del salvado de trigo pretratado con xilanasas en el siguiente orden: *L. johnsonii* CRL1231 > *L. fermentum* CRL1446 > *L. acidophilus* CRL1014 (Tabla 9).

Hole y col. (2012) evaluaron en 7 cepas probióticas con actividad FE (detectada en medio MRS sin glucosa + EtF agarizado) la capacidad de liberar AF a

partir de harinas provenientes de granos enteros de avena y cebada. Las cepas evaluadas fueron *L. johnsonii* LA1, *L. reuteri* SD2112, *L. acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* BB-12, *L. fermentum* NCDO 1750, *L. plantarum/pentosus* AD2 y *L. plantarum* NC8. De ellas, solo *L. johnsonii* LA1, *L. reuteri* SD2112 y *L. acidophilus* LA-5 fueron capaces de liberar AF de las harinas, incrementando aproximadamente 20 veces la concentración de AF.

Cuando *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 fueron incubadas durante 18 h con el salvado de trigo, se observó un incremento entre 11 - 24 veces en la concentración de AF liberado (respecto al control sin bacterias) (Tabla 9). Estos resultados demuestran que las 3 cepas de BL seleccionadas por su elevada actividad FE frente a sustratos sintéticos, también son eficientes en la liberación de AF a partir de fuentes naturales como el salvado de trigo.

Las FE de los microorganismos son generalmente inducibles y pueden ser extracelulares, estar unidas a la pared o membrana celular o ser intracelulares. Las variaciones en la actividad catalítica y especificidad de sustrato pueden diversificar su aplicación en el procesamiento de alimentos, no solo para mejorar el contenido de AF, sino también para la síntesis de nuevos compuestos fenólicos bioactivos como aditivos alimentarios hacia el desarrollo de alimentos funcionales (Fazary y Ju, 2007).

Se evaluó la actividad FE de las 3 cepas seleccionadas, crecidas en medios de cultivos con diferentes fuentes de carbono. Las mismas se cultivaron en un MM adicionado de monosacáridos (glucosa, fructosa, xilosa, arabinosa) y de hidroxicinamatos (EtF y ácido clorogénico). El EtF indujo la actividad FE de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 aproximadamente un 20 y 80%, respectivamente. El ácido clorogénico indujo un 38% la actividad FE de *L. acidophilus* CRL1014. En cuanto a los monosacáridos, la glucosa incrementó un 30% la actividad FE de *L. fermentum* CRL1446, mientras que la xilosa estimuló la actividad de *L. acidophilus* CRL1014 un 15%.

Kroon y col. (1997) sugirieron que la actividad FE de la microbiota colónica es inducida por el salvado de los cereales. Por otra parte, Wang y col. (2004) demostraron que la actividad FE de *L. acidophilus* IFO 13951, cepa de origen intestinal humano, fue fuertemente inducida por sustratos hemicelulósicos, como el salvado de trigo.

La actividad FE de las cepas *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 es inducida principalmente por hidroxicinamatos, por lo cual estas cepas podrían ser empleadas en el desarrollo de alimentos funcionales contribuyendo a una mayor biodisponibilidad de AH a nivel intestinal. Por otra parte, dado que la glucosa no afectó la actividad FE de *L. acidophilus* CRL1014 y *L. johnsonii* CRL1231, e incluso estimuló la actividad de *L. fermentum* CRL1446, este azúcar podría ser empleado en medios de cultivos como fuente de carbono y energía, a fin de obtener la biomasa necesaria para llevar a cabo los estudios *in vivo*.

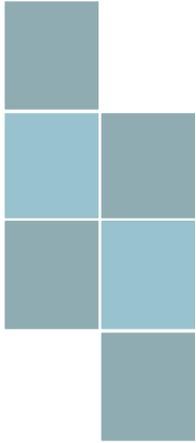
Para ejercer su potencial efecto benéfico a nivel intestinal del hospedador, las bacterias probióticas deben resistir el pasaje por el TGI, en el cual las condiciones adversas de pH y la presencia de sales biliares pueden afectar su viabilidad. Con la finalidad de evaluar si las cepas *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 eran capaces de resistir estas condiciones, las mismas fueron sometidas a incubaciones en medios gástrico e intestinal simulados en forma secuencial y se determinó la viabilidad de las mismas. En el estómago se liberan 2,5 L de JG a un pH aproximado de 2, lo cual produce la muerte de la mayoría de los microorganismos (Charteris y col., 1998; Kimoto y col., 2000). Sin embargo, el pH final del contenido gástrico y la velocidad de tránsito en el estómago dependen del tipo de alimento consumido. Conway y col. (1987) informaron que la adición de leche descremada (250 mL) en el estómago humano eleva el pH en 4 - 5 unidades, prolongando el tiempo de supervivencia de bacterias probióticas. Por lo anteriormente mencionado, en este trabajo de tesis se evaluó en primera instancia la resistencia de *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL 1446 y *L. johnsonii*

CRL1231 a las condiciones del JG simulado a pH 2, 3 y 4. Los resultados mostraron que las cepas fueron sensibles al pH 2, disminuyendo el recuento de células viables en más de 5 unidades logarítmicas. A pH 3 y 4 se observó que *L. acidophilus* CRL1014 fue la cepa más sensible, mientras que *L. fermentum* CRL1446 fue la cepa más resistente (disminución de 2 y 0,5 unidades logarítmicas a pH 3 y pH 4, respectivamente). Por su parte la viabilidad de *L. johnsonii* CRL1231 sufrió una disminución de 4 y 2 unidades logarítmicas a pH 3 y pH 4, respectivamente. Cuando las células de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 expuestas previamente al JG fueron incubadas en JI, no se observaron modificaciones significativas en su viabilidad. La concentración fisiológica de bilis en el contenido intestinal humano se encuentra en un rango de 0,3 a 0,5% (Zavaglia y col., 1998; Dunne y col., 1999). Los resultados obtenidos demostraron que *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 son capaces de resistir los efectos de las sales biliares, alcanzando un orden de  $10^8$  y  $10^6$  UFC/ml, respectivamente. Estos valores revisten gran importancia debido a que se hallan comprendidos dentro del rango fijado en el Código Alimentario Argentino, en el Artículo 1389 para alimentos probióticos, donde se establece que el alimento probiótico deberá contener "una carga de células viables comprendida entre  $10^6$  y  $10^9$  UFC/g durante su período de duración mínima" (Reyes y col., 2017). Guglielmetti y col. (2008) informaron que *L. helveticus* MIMLh5, cepa con elevada actividad CE, pudo sobrevivir en presencia de JG simulado (pH 2 y 3) y bilis, sin embargo este autor no evaluó si la actividad FE podría ser afectada por las condiciones presentes en el TGI.

Los estudios llevados a cabo en esta tesis permitieron evidenciar que la enzima FE de *L. fermentum* CRL1446 fue más estable frente a las condiciones adversas del TGI (conservando aproximadamente 65 y 50% de la actividad inicial a pH 3 y pH 4, respectivamente). *L. johnsonii* CRL1231 y *L. acidophilus* CRL1014 sufrieron una mayor pérdida de actividad FE después del pasaje simulado por el TGI,

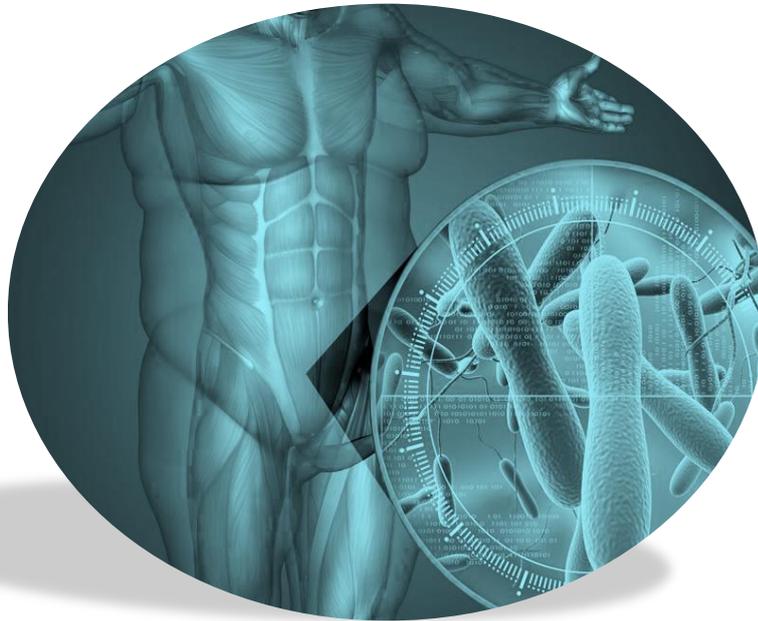
manteniéndose en ambos casos alrededor de 10 y 30% de la actividad inicial a pH 3 y pH 4, respectivamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionaron para realizar los estudios *in vivo* las cepas *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231, por ser las que presentaron mayor resistencia a las condiciones presentes en el TGI, conservando la actividad FE.



# CAPÍTULO II

## ESTANDARIZACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICO



En el presente capítulo se realizó el abordaje del siguiente objetivo específico:

- OE3- Estandarizar un modelo experimental de SM inducido por una dieta rica en grasa en ratones.

## CAPÍTULO II

### ESTANDARIZACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICO

#### II.1- Dietas para ratones

En primer lugar se realizó un análisis de composición proximal y fibra de dos dietas comerciales para ratones: dieta balanceada convencional (DC) y dieta rica en grasa (DRG) (Tabla 11). El contenido de humedad, cenizas, proteínas e hidratos de carbono de estos dos alimentos resultó similar. La DRG mostró un contenido de lípidos totales 2 veces mayor y un contenido de fibra total 0,7 veces menor que la DC.

A continuación, de acuerdo a los resultados obtenidos para la DC y con el propósito de administrar a los ratones alimentos con el mismo contenido de fibra, se formuló una nueva dieta rica en grasa suplementada con 7% (p/p) salvado de trigo (DRG+s). La composición de esta dieta se detalla en la Tabla 11. Resulta necesario que las dietas utilizadas contengan proporciones similares de fibra, para después poder comparar la actividad FE intestinal de los animales asegurando que las diferencias observadas no se deban a una mayor o menor exposición a la fuente de hidroxicinamatos.

Los ensayos *in vivo* realizados en el presente trabajo de tesis se llevaron a cabo utilizando DC y DRG+s.

Tabla 11: Composición Proximal y Fibra de dietas para ratones (cada 100g)

NUTRIENTES	DC	DRG	DRG+s
Humedad (g)	9,89 ± 0,14 <sup>a</sup>	6,34 ± 0,11 <sup>b</sup>	5,95 ± 0,13 <sup>b</sup>
Cenizas (g)	4,57 ± 0,20 <sup>a</sup>	3,48 ± 0,04 <sup>b</sup>	3,04 ± 0,19 <sup>b</sup>
Proteínas (g)	23,50 ± 0,06 <sup>a</sup>	24,20 ± 0,12 <sup>a</sup>	22,15 ± 0,08 <sup>b</sup>
Lípidos Totales (g)	7,89 ± 0,19 <sup>a</sup>	14,5 ± 0,48 <sup>b</sup>	13,20 ± 0,17 <sup>b</sup>
Hidratos de Carbono (g)	38,00	42,00	40,00
Fibra Total (g)	16,10 ± 0,50 <sup>a</sup>	9,49 ± 0,21 <sup>b</sup>	15,68 ± 0,52 <sup>a</sup>
- Fibra Insoluble (g)	14,50 ± 0,54 <sup>a</sup>	7,48 ± 0,19 <sup>b</sup>	13,49 ± 0,54 <sup>a</sup>
- Fibra Soluble (g)	1,76 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,91 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,19 ± 0,01 <sup>c</sup>
Kcal/g	3,00	4,00	4,00

Los datos representan la media ± DS (desvío estándar). La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores en la misma fila con letras distintas en superíndice difieren significativamente.

## II.2- Estandarización del modelo experimental de SM

Para la estandarización de este modelo se tuvo en cuenta la cepa de ratón utilizada (BALB/c o Albino Suizo) y la edad (recién destetado de 3 semanas o adulto de 6 semanas). Los animales fueron alimentados con DC (grupos Controles) o con DRG+s (Grupos SM).

Los grupos experimentales evaluados fueron: Control BALB/c destete, SM BALB/c destete, Control BALB/c adulto, SM BALB/c adulto, Control Suizo destete, SM Suizo destete, Control Suizo adulto y SM Suizo adulto (ver Materiales y Métodos - Tabla 4). En todos los grupos se realizaron las siguientes determinaciones:

- Peso corporal
- Glucemia en ayunas
- Prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG)
- Perfil Lipídico: colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol y triglicéridos (TG).

### II.2.1- Peso Corporal

En la [Figura 17](#) se puede observar la variación de peso corporal (g) durante las 14 semanas de alimentación con DC y DRG+s en todos los grupos de ratones evaluados.

En ratones **recién destetados**, se observó a lo largo de las 14 semanas un paulatino pero marcado incremento del peso corporal, el cual podría deberse a que los animales se encuentran en plena etapa de crecimiento. La alimentación con dieta DRG+s mostró efectos significativos en el grupo SM con respecto al grupo control a partir del día 42 en ratones BALB/c y desde el día 32 en ratones Suizos. Al final de las 14 semanas, el peso corporal de los ratones SM recién destetados fue 35,18% (BALB/c) y 30,8% (Suizos) mayor que los controles ([Figura 17 A y B](#)).

En **ratones adultos** el incremento de peso corporal a lo largo del período de estudio fue menor que el observado en los ratones recién destetados. La alimentación con DRG+s no tuvo efecto sobre el peso corporal de ratones BALB/c; pero en ratones Suizos, a partir del día 74 se observaron diferencias significativas entre el grupo SM y el grupo control. Al finalizar las 14 semanas, el peso corporal de los ratones Suizos adultos que recibieron DRG+s fue un 23,4% mayor con respecto al control ([Figura 17 C y D](#)).

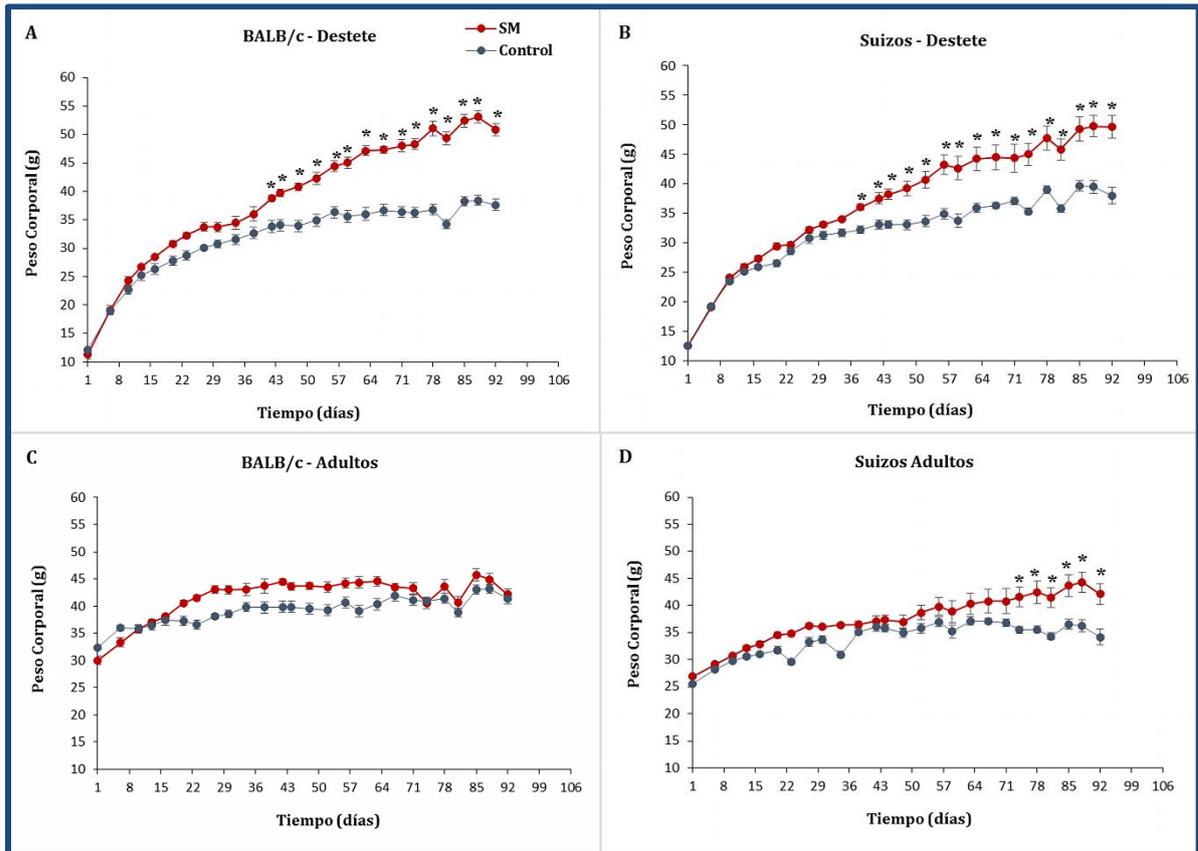


Figura 17: Variación del peso corporal (g) durante las 14 semanas de alimentación. Grupos de ratones evaluados: (A) BALB/c-Destete, (B) Suizos-Destete, (C) BALB/c-Adultos, (D) Suizos-Adultos. Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de  $n=6$  ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con el método Holm-Sidak con  $p < 0,05$ . (\*) Estadísticamente diferente al grupo control.

### II.2.2- Glucemia en ayunas

Los niveles de glucosa en sangre de los diferentes grupos experimentales fueron determinados cada dos semanas durante todo el período de estudio (Figura 18).

Los resultados mostraron que la administración de DRG+s solo tuvo un efecto significativo sobre los niveles de glucosa de ratones adultos (Figura 18 C y D). Cuando se comparó con el control, el grupo SM de ratones BALB/c adultos mostró un aumento significativo de la glucemia en las semanas 2 y 4; posteriormente estos valores se normalizaron y un nuevo aumento se observó en la semana 14 (Figura 18 C). El grupo SM de ratones Suizos adultos experimentó un incremento significativo

de los niveles de glucosa en la semana 6, luego se observó una reducción en la semana 8 (reestableciéndose valores similares al control) y a partir de la semana 10 ocurrió un nuevo aumento, el cual se mantuvo hasta la semana 14 (Figura 18 D).

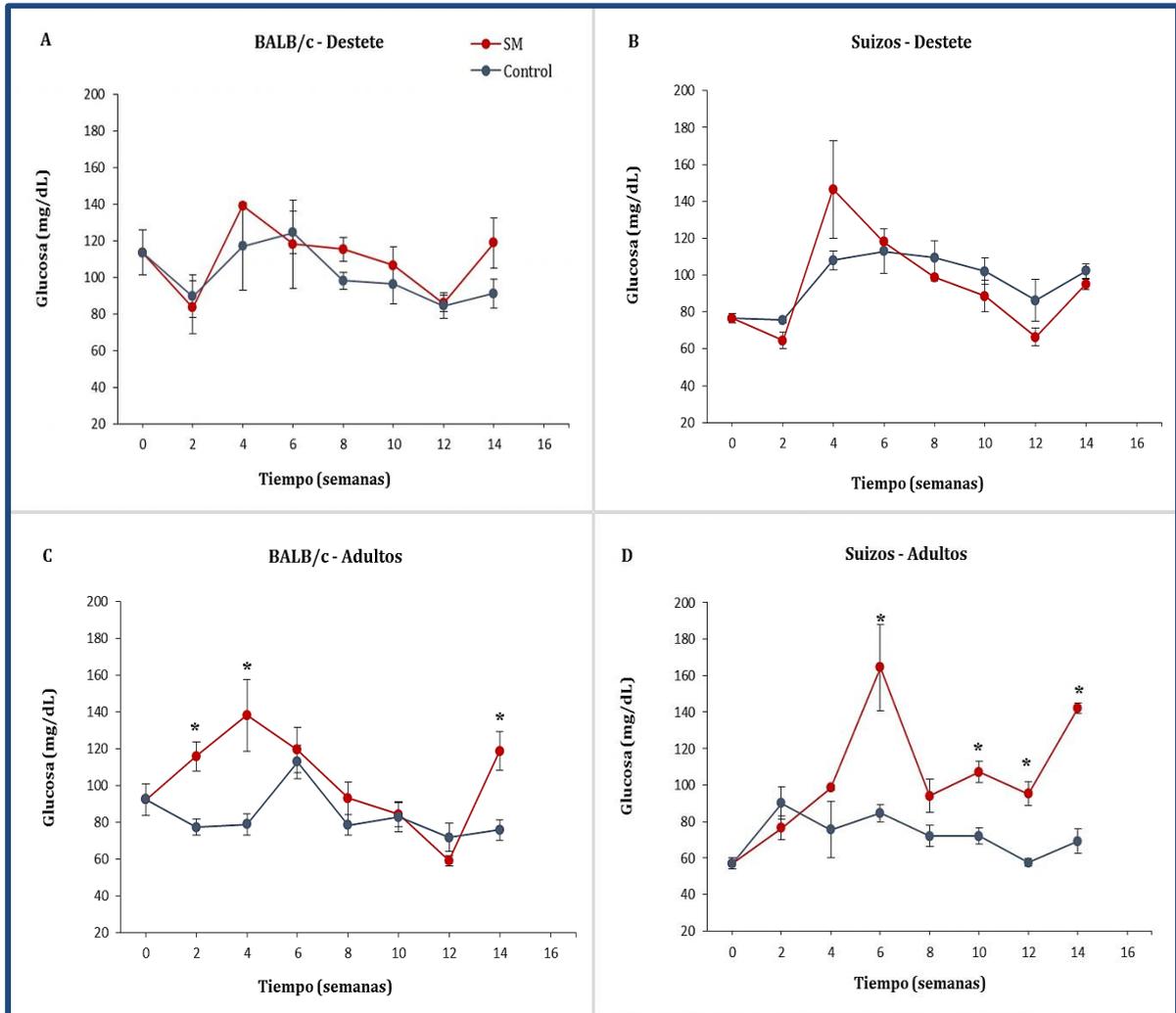


Figura 18: Niveles de glucemia en ayunas durante las 14 semanas de alimentación. Grupos de ratones evaluados: (A) BALB/c-Destete, (B) Suizos-Destete, (C) BALB/c-Adultos, (D) Suizos-Adultos. Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de  $n=6$  ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con el método Holm-Sidak con  $p < 0,05$ . (\*) Estadísticamente diferente al grupo control.

En el período estudiado, los valores de glucemia de ratones recién destetados no mostraron diferencias significativas con respecto al control cuando fueron alimentados con DRG+s, por tal motivo los siguientes ensayos se realizaron utilizando **ratones adultos** (en donde este parámetro se vio incrementado).

### II.2.3- Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG)

La PTOG se realizó en los grupos de ratones adultos al finalizar las 14 semanas (Figura 19). Esta prueba permite evaluar si un organismo es capaz de restaurar la glucemia a los valores basales después de la ingesta de una sobrecarga de glucosa.

En ratones BALB/c adultos se observó que las curvas de tolerancia de los grupos SM y control no presentaron diferencias significativas y los valores basales de glucosa se reestablecieron después de transcurridos los 120 minutos (Figura 19 A). Por el contrario, en ratones Suizos adultos, el grupo SM mostró niveles de glucemia más elevados que el grupo control, siendo incapaz de reestablecer los niveles de glucosa basales en el tiempo evaluado (Figura 19 B). Cuando se compararon las áreas bajo las curvas, solo los ratones Suizos mostraron un aumento significativo con respecto al control (Figura 19 C).

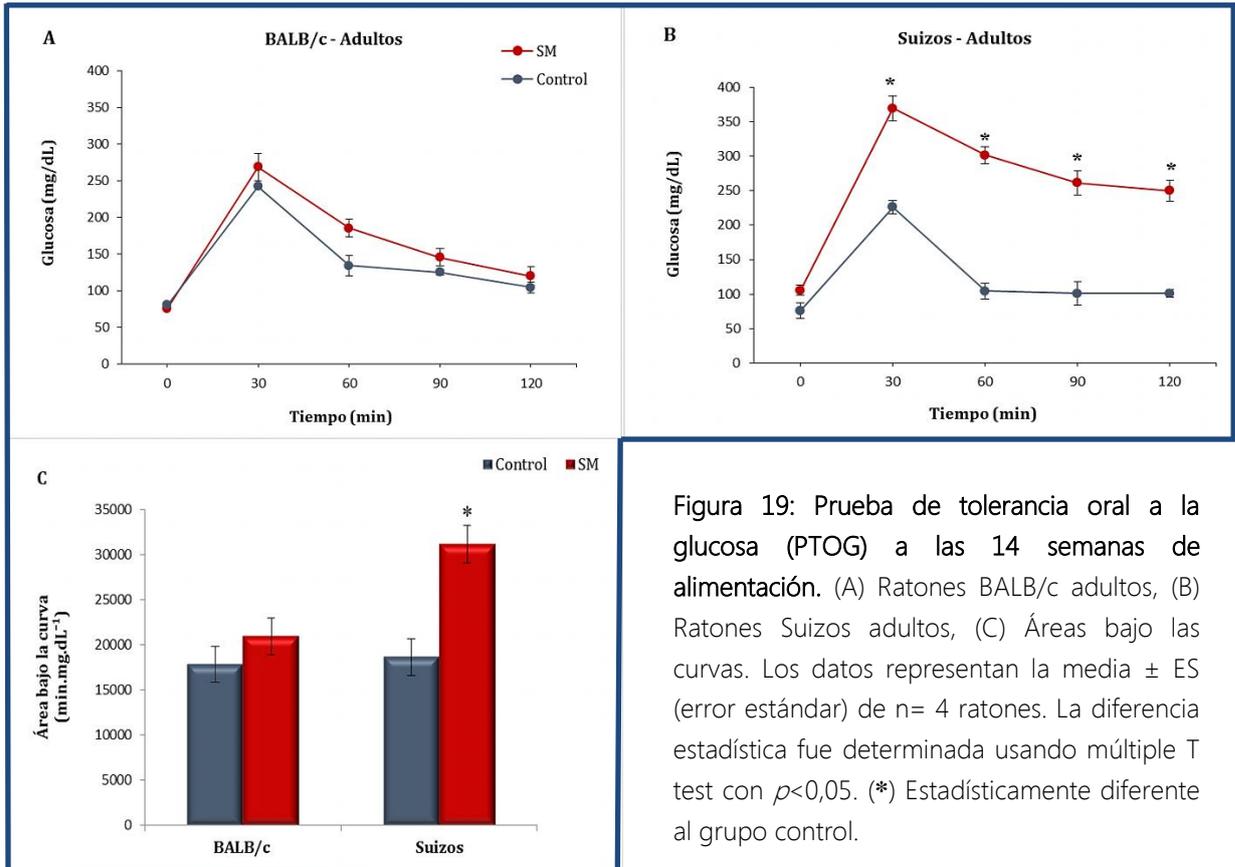


Figura 19: Prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) a las 14 semanas de alimentación. (A) Ratones BALB/c adultos, (B) Ratones Suizos adultos, (C) Áreas bajo las curvas. Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de  $n = 4$  ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . (\*) Estadísticamente diferente al grupo control.

#### II.2.4- Perfil Lipídico

Debido a que uno de los componentes principales del SM es la dislipidemia aterogénica, se evaluaron en plasma de ratones adultos los niveles de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol y TG (Figura 20).

Los resultados mostraron que el colesterol total solo aumentó significativamente en el grupo SM de ratones Suizos cuando se comparó con el control (Figura 20 A). En esta cepa de ratones también se observaron modificaciones significativas de las concentraciones de lipoproteínas unidas a colesterol cuando se administró DRG+s (aumento de LDL-colesterol y disminución de HDL-colesterol en el grupo SM con respecto al control). Mientras tanto, los ratones BALB/c solo mostraron diferencias significativas en los niveles de LDL-colesterol (Figura 20 B y C). En cuanto a las concentraciones de TG, se observó un incremento en el grupo SM de ratones Suizos adultos (Figura 20 D).

Los resultados obtenidos demuestran que los **ratones Suizos adultos** son los más adecuados para establecer el modelo experimental de SM, de acuerdo a las especificaciones de la Tabla 12.

Tabla 12: Modelo experimental de SM	
Ratones	Albinos Suizos
Edad	Adultos (6 semanas)
Alimentación	DRG+s
Período de administración	14 semanas

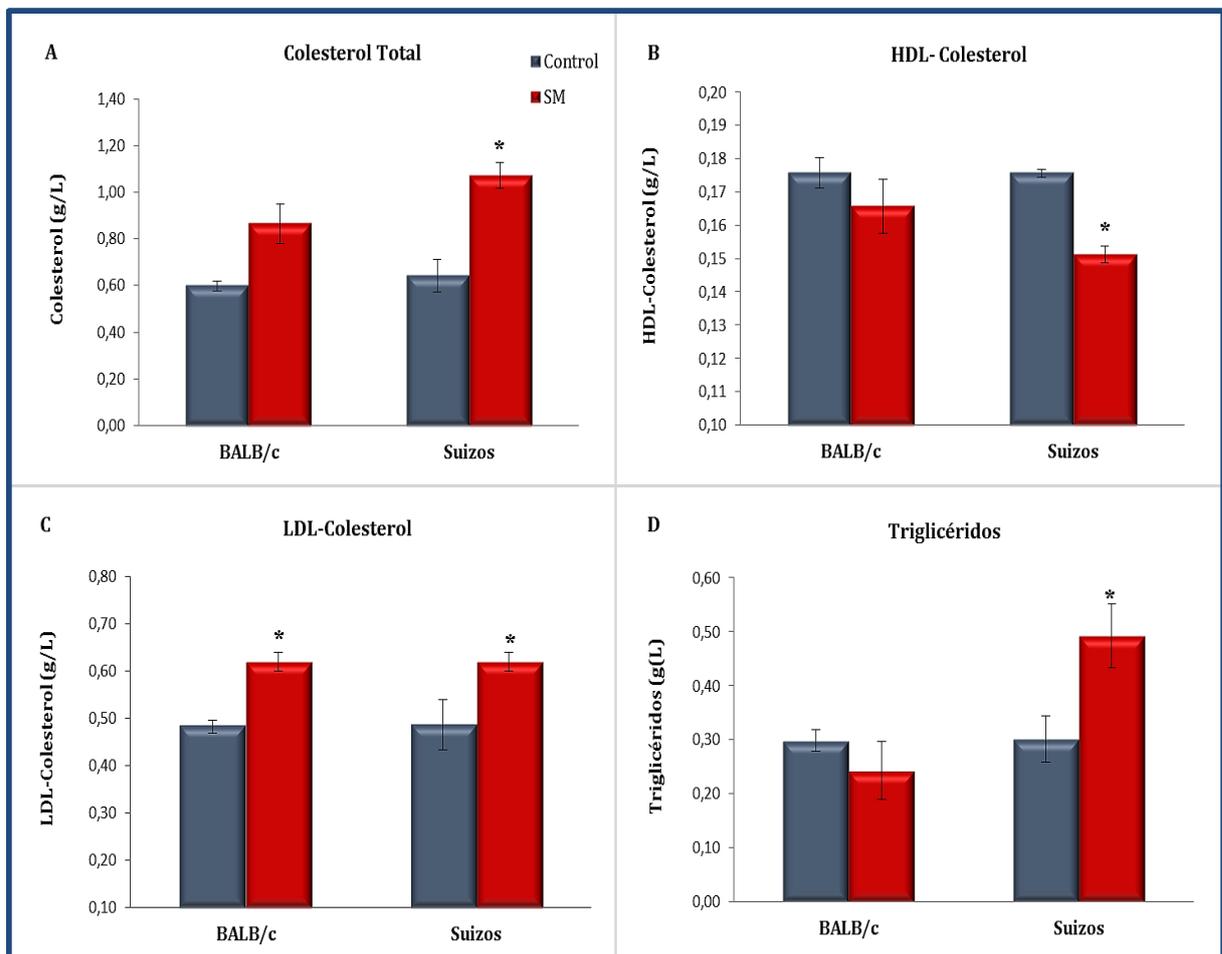


Figura 20: Perfil lipídico de ratones adultos a las 14 semanas de alimentación. (A) Niveles plasmáticos de colesterol total (g/L), (B) Niveles plasmáticos de HDL-colesterol (g/L), (C) Niveles plasmáticos de LDL-colesterol (g/L), (D) Niveles plasmáticos de triglicéridos (g/L). Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de  $n = 6$  ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . (\*) Estadísticamente diferente al grupo control.

Debido a la alta prevalencia del SM, el estudio mediante modelos experimentales que permitan evaluar potenciales métodos de tratamiento y/o prevención representa un gran desafío para la comunidad científica actual. Se requieren modelos animales viables que desarrollen los principales signos clínicos de esta entidad multifactorial, especialmente obesidad, diabetes, dislipidemia, hipertensión y posiblemente enfermedad del hígado graso (Panchal y Brown, 2010).

Los modelos con roedores son los más utilizados en la investigación del SM (Doggrell y Brown, 1998; Chen y Wang, 2005; Speakman, 2007; Gauffin Cano y col., 2013). Se han empleado modelos con animales modificados genéticamente (generalmente monogénicos, es decir, con mutación ligada a un solo gen), pero también se han desarrollado modelos de obesidad inducida por la dieta (OID) (Fuchs y col., 2018). Las cepas de roedores más utilizadas en modelos de SM inducido por la dieta incluyen ratas Sprague-Dawley, ratas Wistar, ratones C57BL/6 y hámsteres sirios dorados (Wong y col., 2016). Ratones BALB/c también han sido utilizados para desarrollar modelos de OID (Núñez y col., 2014 y 2015). Así mismo, se han empleado ratones Albinos Suizos para este tipo de estudios. Carvalho y col. (2012) mostraron que la administración de una DRG a ratones Albinos Suizos de 6 semanas de edad provocó en los mismos un incremento de peso y aumento de los niveles de glucosa e insulina en ayunas. En base a estos antecedentes, y teniendo en cuenta la disponibilidad de ratones en el bioterio de CERELA, en la presente tesis doctoral se emplearon para la estandarización del modelo de SM las cepas BALB/c y Albinos Suizos.

La edad de los ratones al comienzo de la experiencia es un factor determinante para establecer el modelo de SM. Los animales jóvenes poseen un metabolismo diferente a los adultos, esto se ve reflejado en la mayor ganancia de peso de tejido magro en los primeros, siendo aconsejable utilizar ratones de mayor edad (Tschöp y Heiman, 2001). Sin embargo, existen estudios en los que se han utilizado animales jóvenes alimentados con dietas hipercalóricas para inducir la

obesidad (Nascimento y col., 2008). Para la estandarización del modelo de SM se decidió evaluar ratones de dos edades diferentes: recién destetados (3 semanas) y adultos (6 semanas).

La dieta es otro de los factores determinantes al momento de establecer un modelo de SM. Se ha observado que animales con peso y edades similares al inicio del protocolo experimental, mostraron diferentes resultados con respecto al aumento de peso corporal según el tipo de dieta que recibieron, lo cual refleja la importancia de la alimentación en la génesis de la obesidad (Rosini y col., 2012).

La dieta juega un papel esencial en el crecimiento y desarrollo de un individuo; su composición determina el estado nutricional, afecta el metabolismo de la glucosa y de los lípidos, ejerce influencia sobre determinadas hormonas y también altera el estado oxidativo. Los modelos animales de OID se han convertido en la piedra angular para la investigación del SM. Estos modelos se utilizan generalmente para estudiar el papel de la dieta, así como la fisiopatología y etiología de la enfermedad. Sin embargo, los resultados de los estudios pueden llegar a ser discrepantes, principalmente en relación con la composición de las dietas y el efecto de las mismas (Nilsson y col., 2012). La dieta moderna, sobre todo en los países occidentales, es rica en carbohidratos como fructosa y sacarosa, así como en grasas saturadas. Este tipo de ingesta calórica se ha asociado con el SM, enfermedades cardiovasculares e hígado graso no alcohólico (Lim y col., 2010; Massiera y col., 2010). Por tal motivo, las DRG son ampliamente utilizadas en estudios de SM, mostrando gran eficiencia para inducir obesidad. Se han empleado diferentes tipos de DRG que aportan entre 20 y 60% de la energía total del alimento. Las fuentes del componente nutricional graso de la dieta pueden ser aceites derivados de plantas (por ejemplo, maíz, cártamo o aceite de oliva) o grasas derivadas de animales (por ejemplo, sebo vacuno o manteca de cerdo) (Wong y col., 2016). Numerosos trabajos han demostrado que las DRG son eficaces en promover la hiperglucemia, RI y dislipidemia (Zivkovic y col., 2007). El alimento rico en grasa utilizado en el

presente trabajo de investigación (DRG+s) fue formulado con una dieta comercial a base de manteca de cerdo y salvado de trigo como fuente de hidroxicinamatos. La cantidad de salvado utilizada (7% p/p) fue la necesaria para que el contenido de fibra resultara el mismo que en el alimento convencional (DC). Este hecho reviste importancia al momento de evaluar la actividad FE intestinal (capítulo IV).

Los resultados mostraron que la administración de la DRG+s durante 14 semanas indujo una mayor ganancia de peso corporal con respecto a la DC en todos los grupos de ratones evaluados, excepto en BALB/c adultos. Al final del período de estudio el peso corporal fue mayor en los grupos SM de ratones BALB/c recién destetados (35,18%), Suizos recién destetados (30,8%) y Suizos adultos (23,4%) con respecto a los controles normales.

Otro de los parámetros afectados en individuos con SM es la glucosa en ayunas. Se observó que a las 14 semanas, los ratones adultos que recibieron DRG+s (grupo SM) presentaron niveles de glucosa en sangre más elevados que los respectivos controles, mientras que en ratones recién destetados no hubo diferencias. En el caso de los ratones Suizos adultos el aumento de la glucemia fue evidente desde la semana 6. Al final del período de estudio, la concentración de glucosa en ayunas de los ratones adultos del grupo SM fue de 120 mg/dL en BALB/c y 142 mg/dL en Suizos. De acuerdo con la [American Diabetes Association \(2010\)](#) y la OMS, algunos de los criterios para el diagnóstico de la DT2 en humanos son: concentración de glucosa en ayunas superior a 126 mg/dL (7 mmol/L) y concentraciones de glucosa por encima de 200 mg/dL (11,1 mmol/L) en un análisis de 2 h posterior a una sobrecarga oral de glucosa. Cabe aclarar que el hallazgo aislado de cualquiera de estos criterios no es suficiente para establecer el diagnóstico de DT2. Se ha descrito que antes del desarrollo de una DT2 los pacientes suelen presentar un SM caracterizado por sobrepeso, intolerancia a la glucosa y alteración del metabolismo de los lípidos ([Druker, 2007](#)).

La PTOG es una prueba simple, ampliamente utilizada en la práctica médica para el diagnóstico de la RI, intolerancia a la glucosa y DT2 (American Diabetes Association, 2010). En esta prueba la glucosa es «aclarada» después de una sobrecarga oral por un proceso complejo y dinámico que incluye la absorción, la actividad neurohormonal (adrenalina y glucagón), la acción de la incretina, la secreción de insulina y acciones metabólicas de la insulina que primariamente determinan el balance entre la utilización periférica de la glucosa y la producción hepática de la misma. Por lo tanto, esta prueba indirecta que depende del tiempo, es controlada por los estados de ayuno, la dinámica de sobrecarga de glucosa y por los niveles de insulina (Muniyappa y col., 2009). La intolerancia a la glucosa, también conocida como prediabetes, es una consecuencia de la RI y se refiere a una etapa en donde la insulina que produce el páncreas es insuficiente para metabolizar el azúcar de la sangre, lo que hace que los niveles de glucosa se mantengan elevados, sin embargo, aunque los niveles de glucosa se encuentren por encima de lo normal, no puede clasificarse como diabetes. Se ha informado que una alimentación a largo plazo con dietas enriquecidas en grasas conduce a una moderada hiperglucemia e intolerancia a la glucosa en la mayoría de las cepas de ratas y ratones (Sweazea y col., 2010).

La PTOG fue realizada en ratones adultos al finalizar las 14 semanas de alimentación. Los resultados mostraron que los ratones Suizos que recibieron DRG+s fueron incapaces de reestablecer los niveles basales de glucosa en sangre; observándose en este grupo después de 2 h de la sobrecarga oral una concentración de glucosa de 250 mg/dL. Este hecho es un indicador de RI en el grupo SM de ratones Suizos adultos.

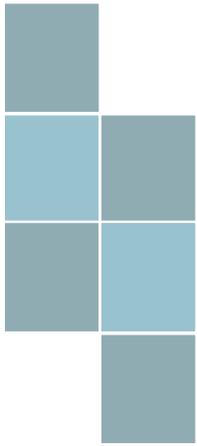
La insulina, además de regular la utilización de glucosa, está implicada en la regulación del metabolismo lipídico (almacenamiento, movilización y utilización de TG). La dislipidemia en el SM se caracteriza por elevación de la concentración de TG y VLDL, disminución de HDL-colesterol y aumento en el número de LDL pequeñas y

densas, lo que se ha denominado fenotipo lipoproteínico aterogénico (Ginsberg, 2000). Existe una estrecha correlación entre la obesidad abdominal y los factores de riesgo que definen el SM, especialmente la hipertrigliceridemia (Okosun y col., 2000).

Los resultados mostraron que la DRG+s solo alteró de manera significativa el perfil lipídico de ratones Suizos adultos a las 14 semanas de administración, destacándose en el grupo SM un aumento de las concentraciones de colesterol y TG, y una disminución en los niveles de HDL-colesterol con respecto al grupo control.

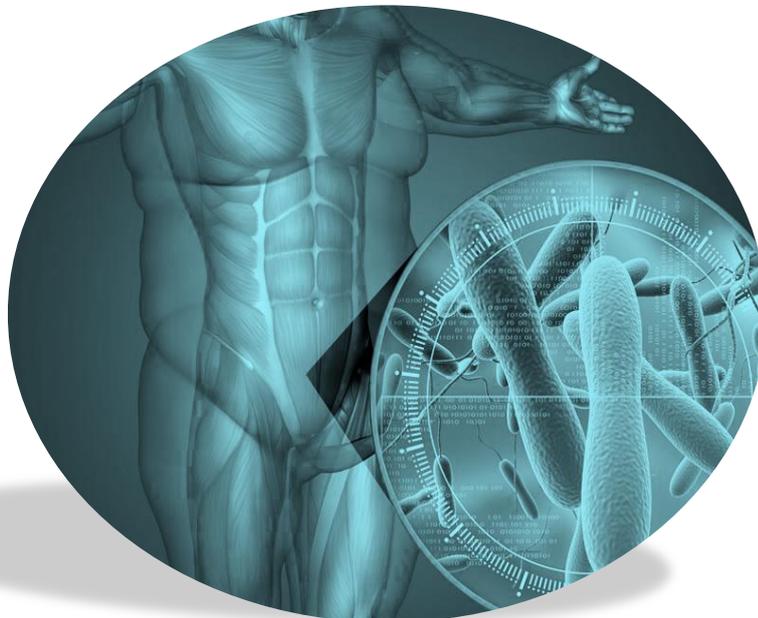
El SM se halla caracterizado por un aumento del tejido graso. Esta anomalía de la composición corporal se acompaña de variadas manifestaciones patológicas, entre ellas la dislipidemia aterogénica. Entre las causas más frecuentes de dislipidemias destaca la obesidad. Ello se asocia al síndrome de resistencia insulínica frecuentemente observado con el exceso de tejido graso, más aun cuando hay una distribución toracoabdominal o visceral. Lo más frecuente de observar es una hipertrigliceridemia, con aumento leve del colesterol total, pero con una notoria disminución de HDL-colesterol. El incremento de TG se debe a una mayor síntesis hepática (proveniente de un aumento de la oferta de AGL en un estado de hiperinsulinemia por RI). Aumenta la secreción de VLDL y por ello lo destacable es la hipertrigliceridemia. La reducción de HDL-colesterol es explicable por la hipertrigliceridemia, ya que en estas circunstancias, y por transferencia intravascular de lípidos, las HDL reciben TG y aceleran su catabolismo a través de una mayor actividad de la lipasa hepática. Por otra parte, algo similar sucede con las LDL, que reciben TG, son metabolizados parcialmente por la lipasa hepática y se transforman en LDL pequeñas y densas, que tienen un mayor potencial aterogénico (Cuevas y Alonso, 2016).

En vista de lo expuesto en el presente capítulo, los ratones Albinos Suizos adultos de 6 semanas de edad alimentados durante 14 semanas con DRG+s fueron elegidos como el modelo experimental de SM. Estos animales presentaron la mayoría de los componentes que caracterizan al SM (obesidad, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, hipertrigliceridemia y disminución de los niveles de HDL-colesterol) en el período evaluado, siendo los más adecuados para llevar a cabo los estudios subsiguientes.



# CAPÍTULO III

## ADMINISTRACIÓN ORAL DE BACTERIAS LÁCTICAS CON ACTIVIDAD FERULOIL ESTERASA EN UN MODELO MURINO DE SÍNDROME METABÓLICO



En el presente capítulo se realizó el abordaje del siguiente objetivo específico:

- **OE4-** Evaluar el efecto de la administración oral de la/s bacteria/s seleccionada/s sobre la actividad CE intestinal y biomarcadores en el modelo experimental de SM.

## CAPÍTULO III

### ADMINISTRACIÓN ORAL DE BACTERIAS LÁCTICAS CON ACTIVIDAD FE EN UN MODELO MURINO DE SÍNDROME METABÓLICO

Con la finalidad de evaluar si las cepas de BL con actividad FE seleccionadas en el Capítulo I son capaces de mejorar los componentes del SM, se administró oralmente *L. fermentum* CRL1446 (Lf CRL1446) y *L. johnsonii* CRL1231 (Lj CRL1231) a ratones alimentados con DRG+s (modelo murino optimizado en el Capítulo II). Los estudios se realizaron a las 7 y 14 semanas, determinándose los cambios fisiológicos y bioquímicos ocurridos durante este período de alimentación.

#### III.1- Ensayo de translocación bacteriana a las 14 semanas

Para determinar la inocuidad de las cepas en estudio se realizó un ensayo de translocación bacteriana. No se observó crecimiento microbiano en las placas sembradas con los homogenatos de hígado y bazo de los ratones que recibieron estas BL durante 14 semanas, por lo que se consideró que con la dosis ensayada ( $10^8$  UFC/día/ratón) tanto *L. fermentum* CRL1446 como *L. johnsonii* CRL1231 son seguras para los animales alimentados con DRG+s.

#### III.2- Efecto de la administración de BL con actividad FE sobre la ganancia de peso corporal (GPC)

La GPC se vio incrementada por el consumo de DRG+s, observándose en ratones del grupo SM, un aumento de 40% y 63% a las 7 y 14 semanas de alimentación, respectivamente, en comparación con el grupo control.

La suplementación con *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 tuvo influencia sobre este parámetro en los ratones alimentados con DRG+s. Se observó tanto a las 7 como a las 14 semanas, una reducción significativa de la GPC de los grupos SM+Lf y SM+Lj con respecto al grupo SM, alcanzando valores similares al control (Figura 21A).

La diferencia de tamaño corporal de los ratones de los grupos SM y control puede apreciarse en la Figura 21B.

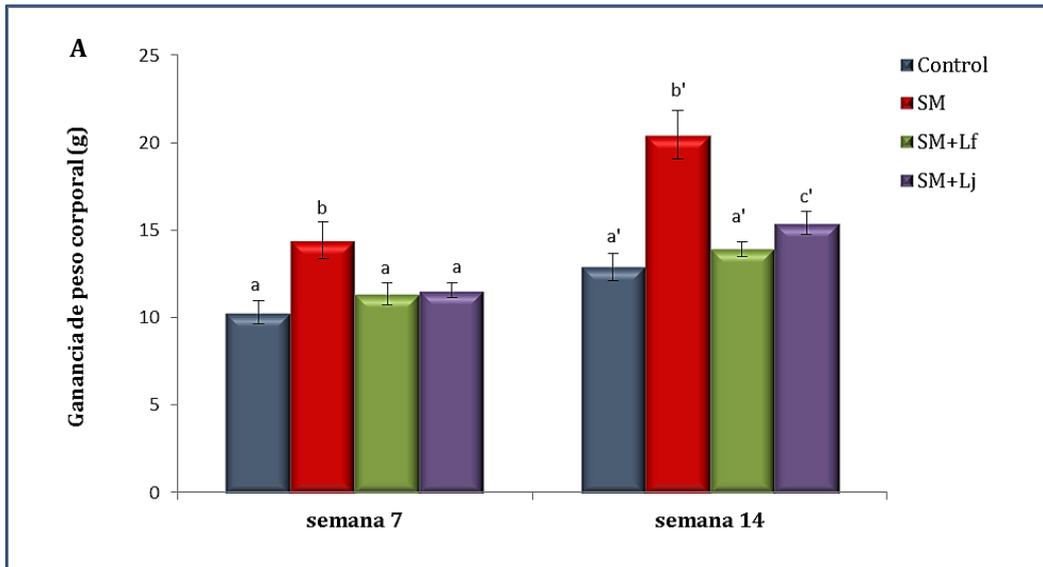


Figura 21: Efecto de las dietas y de la administración de BL con actividad FE sobre la ganancia de peso corporal. (A) Ganancia de peso corporal (g). Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de  $n=8$  ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p<0,05$ . Valores con letras distintas difieren significativamente. (B) Diferencia de tamaño corporal de ratones alimentados con dieta rica en grasa (SM) y dieta convencional (Control).

### III.3- Efecto de la administración de BL con actividad FE sobre el índice de eficiencia alimentaria (EA)

Luego de las distintas intervenciones dietéticas (suministro de DC o DRG+s con y sin BL), se calculó la EA a las 7 y 14 semanas como el cociente entre la GPC (g) y la cantidad de alimento consumido (g) (Figura 22). Los resultados mostraron que la alimentación con DRG+s provocó un aumento de la EA en el grupo SM de 54% y 86% a las 7 y 14 semanas, respectivamente, en comparación con el grupo control. La administración de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 conjuntamente con DRG+s disminuyó la EA, resultando en valores similares a los observados en el grupo control.

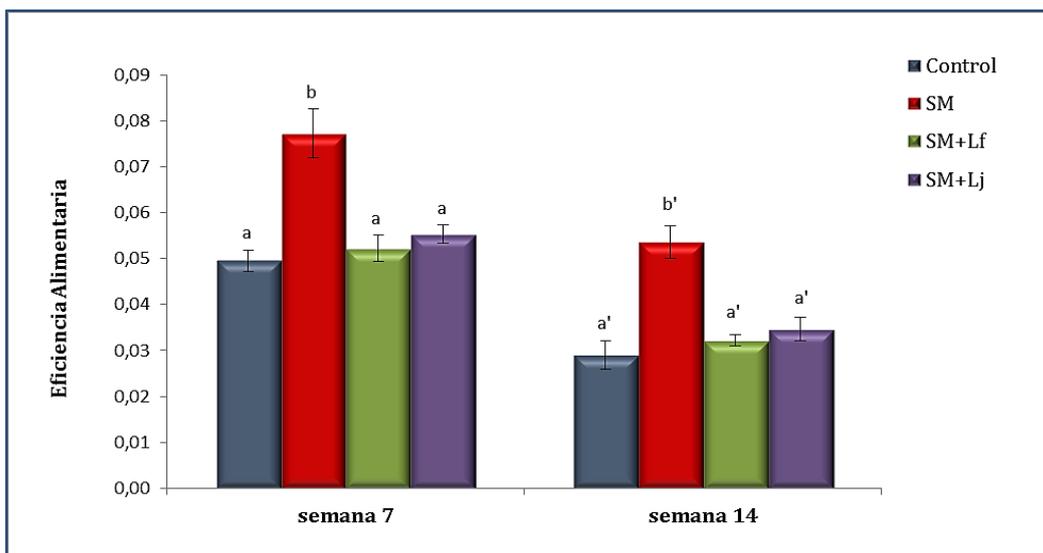


Figura 22: Índice de eficiencia alimentaria (EA). Este índice fue calculado como  $EA = GPC (g) / \text{Cantidad de alimento consumido (g)}$ . Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de  $n = 8$  ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores con letras distintas difieren significativamente.

### III.4- Efecto sobre el índice de adiposidad y tamaño de los adipocitos

Los ratones que recibieron DRG+s, sin suplementación de BL desarrollaron obesidad caracterizada por un aumento de la masa de tejido adiposo mesentérico y epididimal, lo cual se vio reflejado en los valores del índice de adiposidad del grupo

SM, observándose un incremento de 76% y 99% en comparación con el grupo control, a las 7 y 14 semanas de alimentación, respectivamente, (Figura 23). El grupo SM+Lf, mostró una disminución en el índice de adiposidad de 30% y 39% comparado con el grupo SM, a las 7 y 14 semanas, respectivamente. En el grupo SM+Lj también se observaron descensos de este índice con respecto al grupo SM (22 y 26% a las 7 y 14 semanas, respectivamente) (Figura 23).

En la Figura 24 se puede apreciar la menor acumulación de tejido adiposo epididimal en los animales que recibieron *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 cuando fueron alimentados con DRG+s durante 14 semanas.

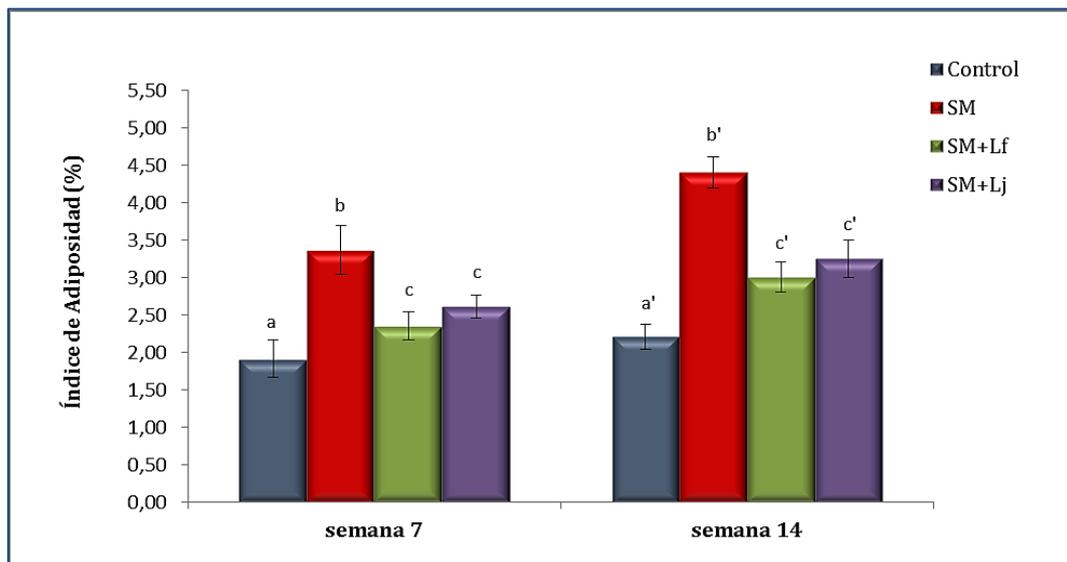


Figura 23: Efecto de la administración de BL con actividad FE sobre el índice de adiposidad. Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de  $n= 8$  ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p<0,05$ . Valores con letras distintas difieren significativamente.

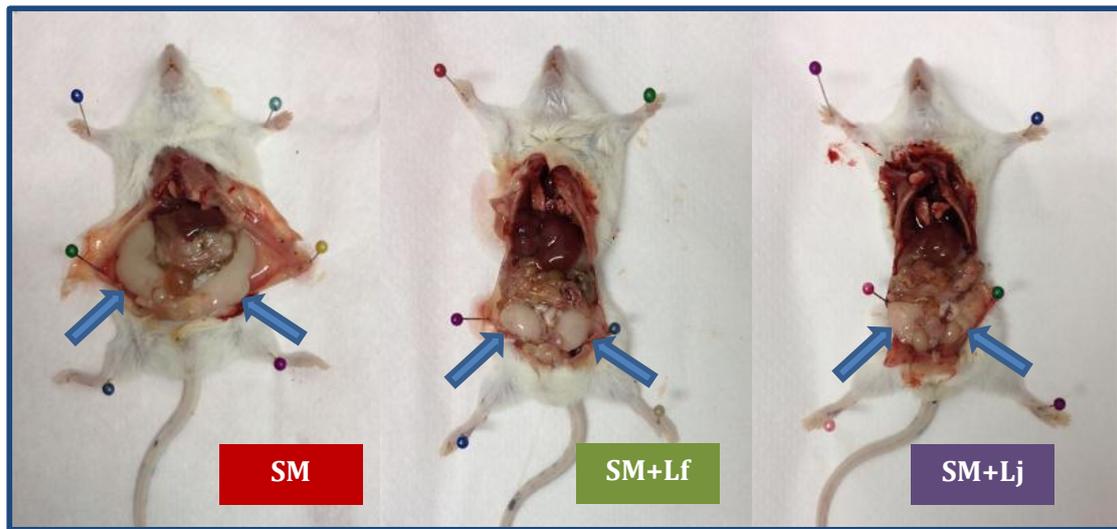


Figura 24: Acumulación de grasa epididimal en ratones alimentados con DRG+s durante 14 semanas. Las flechas señalan el tejido adiposo de cada animal.

Los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina revelaron cambios en la estructura del tejido adiposo epididimal cuando los ratones fueron alimentados con DRG+s durante 14 semanas (Figura 25). En el grupo SM se encontró mayor abundancia (57%) de adipocitos de gran tamaño ( $4001-8000 \mu\text{m}^2$ ), mientras que en el grupo control solo el 9% de los adipocitos estuvo comprendido dentro de este rango. Además, se observó en el grupo SM una disminución significativa de la cantidad de adipocitos de tamaño pequeño (rangos comprendidos entre  $500$  y  $3000 \mu\text{m}^2$ ) con respecto al grupo control. La administración de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 conjuntamente con la DRG+s evitó la hipertrofia del tejido adiposo, de manera que los adipocitos de los grupos SM+Lf y SM+Lj mostraron tamaños similares a los observados en el grupo control (mayor frecuencia de áreas comprendidas entre  $1001$  y  $4000 \mu\text{m}^2$ ). Si bien, en el grupo SM+Lf se vio un aumento en el número de adipocitos de mayor tamaño ( $4001-8000 \mu\text{m}^2$ ) en comparación con el grupo control, estos representaron solo el 20% del total (3 veces menos que en el grupo SM) (Figura 26).

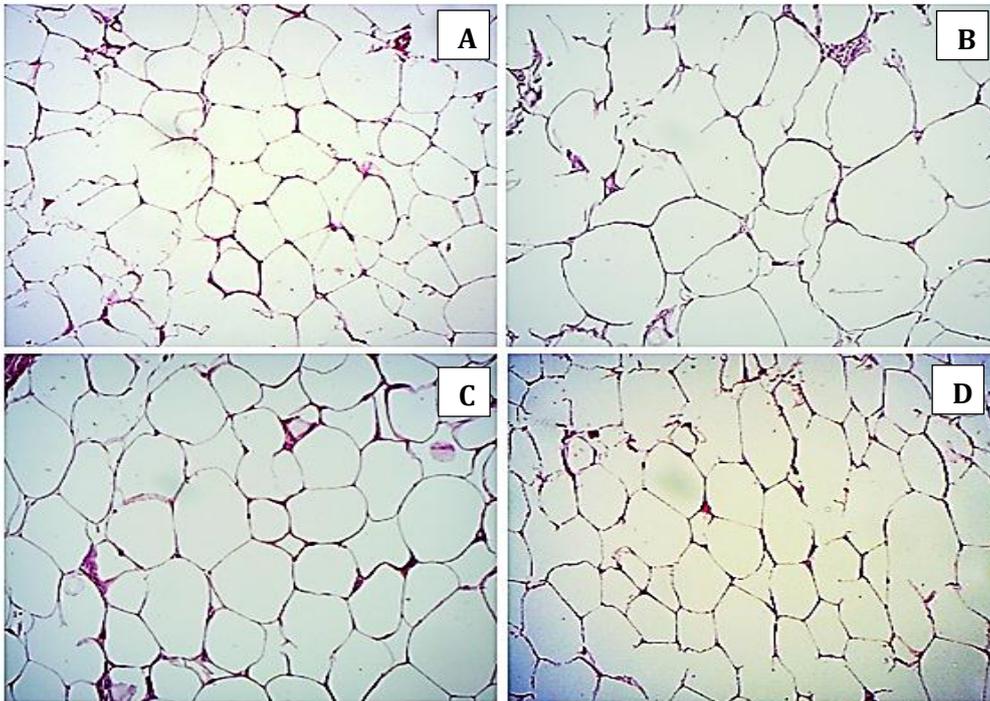


Figura 25: Fotomicrografías representativas del tejido adiposo epididimal a las 14 semanas. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina y las imágenes fueron capturadas con microscopio Carl ZEISS con magnificación 40x. (A) Grupo control (B): Grupo SM (C): Grupo SM+Lf (D): Grupo SM+Lj

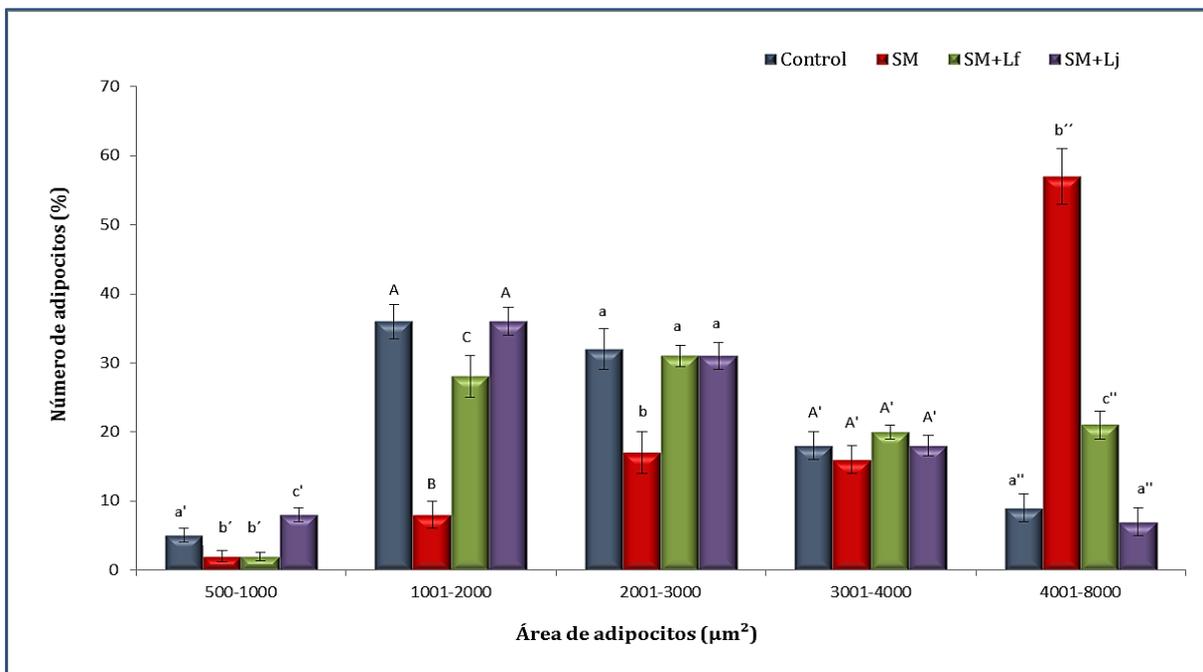


Figura 26: Abundancia de adipocitos (%) de acuerdo a su tamaño (µm<sup>2</sup>) en ratones alimentados durante 14 semanas. Los datos representan la media ± ES (error estándar) de n= 8 ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores con letras distintas difieren significativamente.

### III.5- Efecto sobre los niveles de leptina

Dado que el tejido adiposo es el principal responsable de la síntesis y secreción de leptina, se dosaron los niveles plasmáticos de esta hormona en los ratones de todos los grupos (Tabla 13). Los mismos fueron 10 y 7 veces mayores en los animales con SM a las 7 y 14 semanas, respectivamente, en comparación con el grupo control. En los ratones del grupo SM+Lf se observó una disminución de 5,5 y 3,5 veces de los valores de leptina a las 7 y 14 semanas, respectivamente, comparados con el grupo SM. En el grupo SM+Lj se detectó en la semana 7 concentraciones similares al grupo control y, en la semana 14, los valores de leptina fueron la mitad de los observados en el grupo SM.

Tabla 13: Niveles plasmáticos de leptina (ng/mL)

	Control	SM	SM+Lf	SM+Lj
Semana 7	0,46±0,06 <sup>a</sup>	4,70±0,09 <sup>b</sup>	0,85±0,03 <sup>c</sup>	0,50±0,07 <sup>a</sup>
Semana 14	0,98±0,17 <sup>a</sup>	6,65±1,07 <sup>b</sup>	1,87±0,16 <sup>c</sup>	3,36±0,95 <sup>d</sup>

Los datos representan la media ± ES (error estándar) de n= 8 ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores con letras distintas difieren significativamente.

### III.6- Efecto de la DRG+s y de la administración de BL con actividad FE sobre el estado inflamatorio de los ratones

El estado inflamatorio de los animales se evaluó a las 14 semanas determinando los niveles plasmáticos de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10 por citometría de flujo (Figura 27). En el caso de las citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6) se evidenció un aumento significativo en el grupo SM comparado con el grupo control. Cuando se administraron las BL junto con la DRG+s, se vio que en los grupos SM+Lf y SM+Lj los niveles de estas citoquinas se redujeron significativamente con respecto al grupo SM, siendo mayor el efecto en el

grupo SM+Lj. En cuanto a los niveles de IL-10 (citoquina antiinflamatoria), se observó una disminución en el grupo SM comparado con el control; y los grupos que recibieron las cepas (SM+Lf y SM+Lj) mostraron un incremento con respecto al grupo SM.

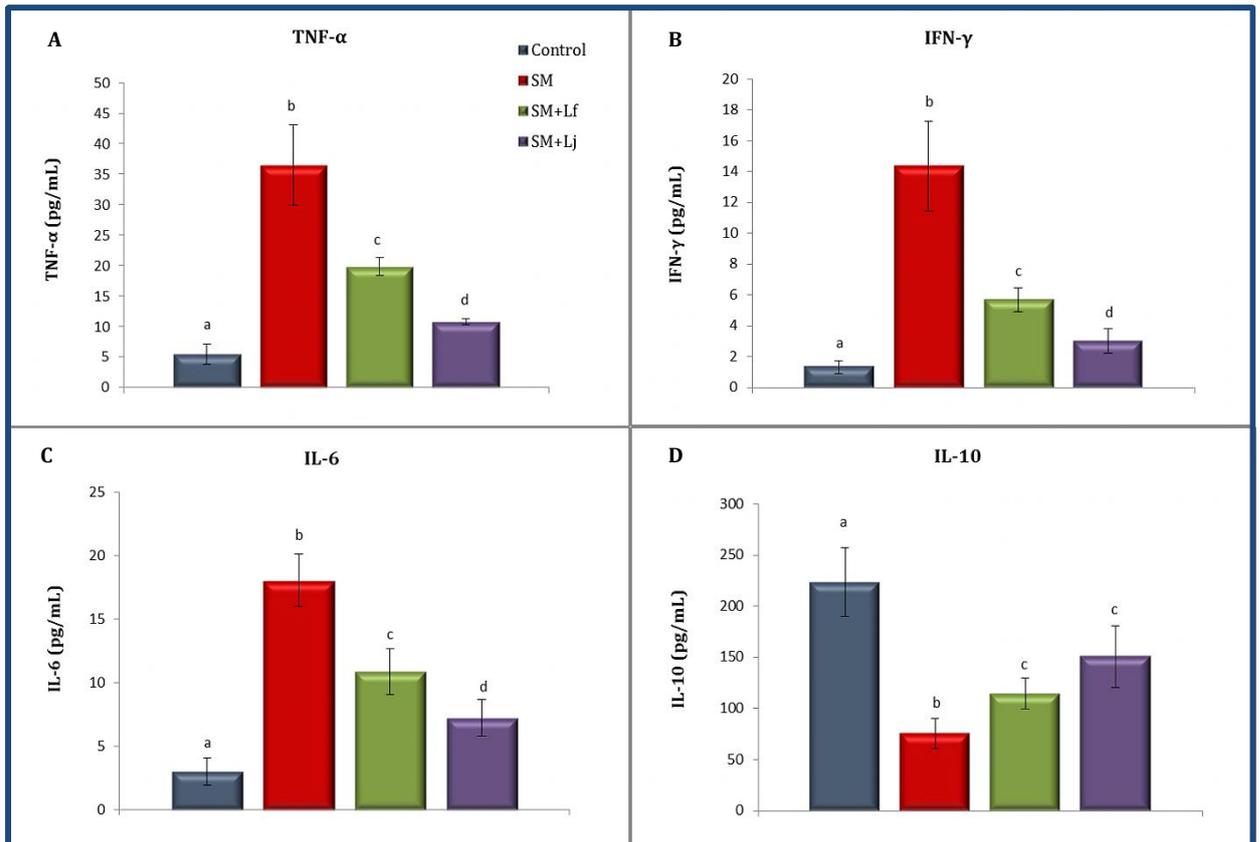


Figura 27: Niveles plasmáticos de citoquinas a las 14 semanas de alimentación. (A) TNF- $\alpha$ , (B) IFN- $\gamma$ , (C) IL-6, (D) IL-10 Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de n= 8 ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores con letras distintas difieren significativamente.

### III.7- Efecto de la administración de BL con actividad FE sobre la acumulación de grasa en el hígado y actividades de transaminasas

Una patología que suele estar asociada al SM es la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA); por ello, se llevó a cabo un análisis de la histología

hepática de los animales de cada grupo a las 14 semanas de alimentación (Figura 28).

Los resultados mostraron que los ratones que recibieron DRG+s sin la suplementación de BL (grupo SM) exhibieron esteatosis caracterizada por la presencia de abundantes vacuolas o gotas lipídicas de distintos tamaños, así como granularidad citoplasmática de los hepatocitos. También pudo apreciarse la balonización y binucleación hepatocelular. Cuando se administraron las cepas *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 junto con la DRG+s, los grupos de ratones SM+Lf y SM+Lj mostraron una reducción de la infiltración grasa en los hepatocitos.

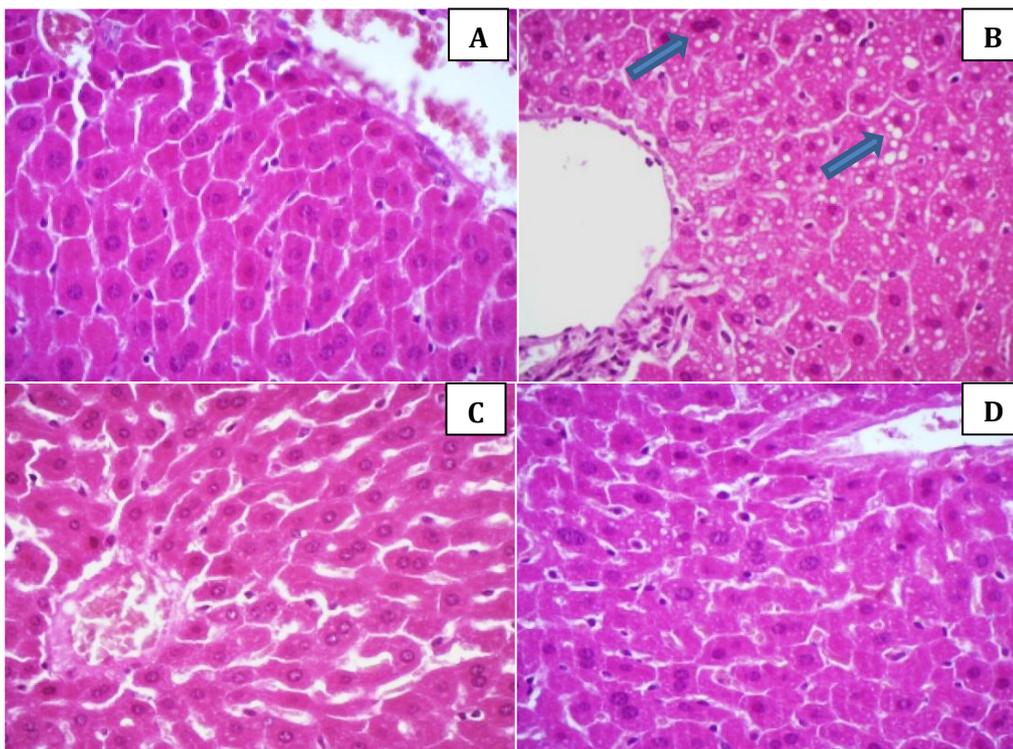


Figura 28: Fotomicrografías representativas de hígado de ratones a las 14 semanas. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina y las imágenes fueron capturadas con microscopio Carl ZEISS con magnificación 200x. (A) Grupo control, (B) Grupo SM, (C) Grupo SM+Lf, (D) Grupo SM+Lj. Las flechas señalan algunas alteraciones del grupo SM (gotas lipídicas y binucleación).

El incremento de las actividades alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) suele asociarse a daños hepáticos. Cuando se evaluaron los niveles de estas transaminasas en sangre, se observó un incremento significativo en el grupo SM con respecto al control, tanto a las 7 como a las 14 semanas. La administración de BL con actividad FE permitió mantener los valores de ALT y AST cercanos a los observados en el grupo control (Figura 29).

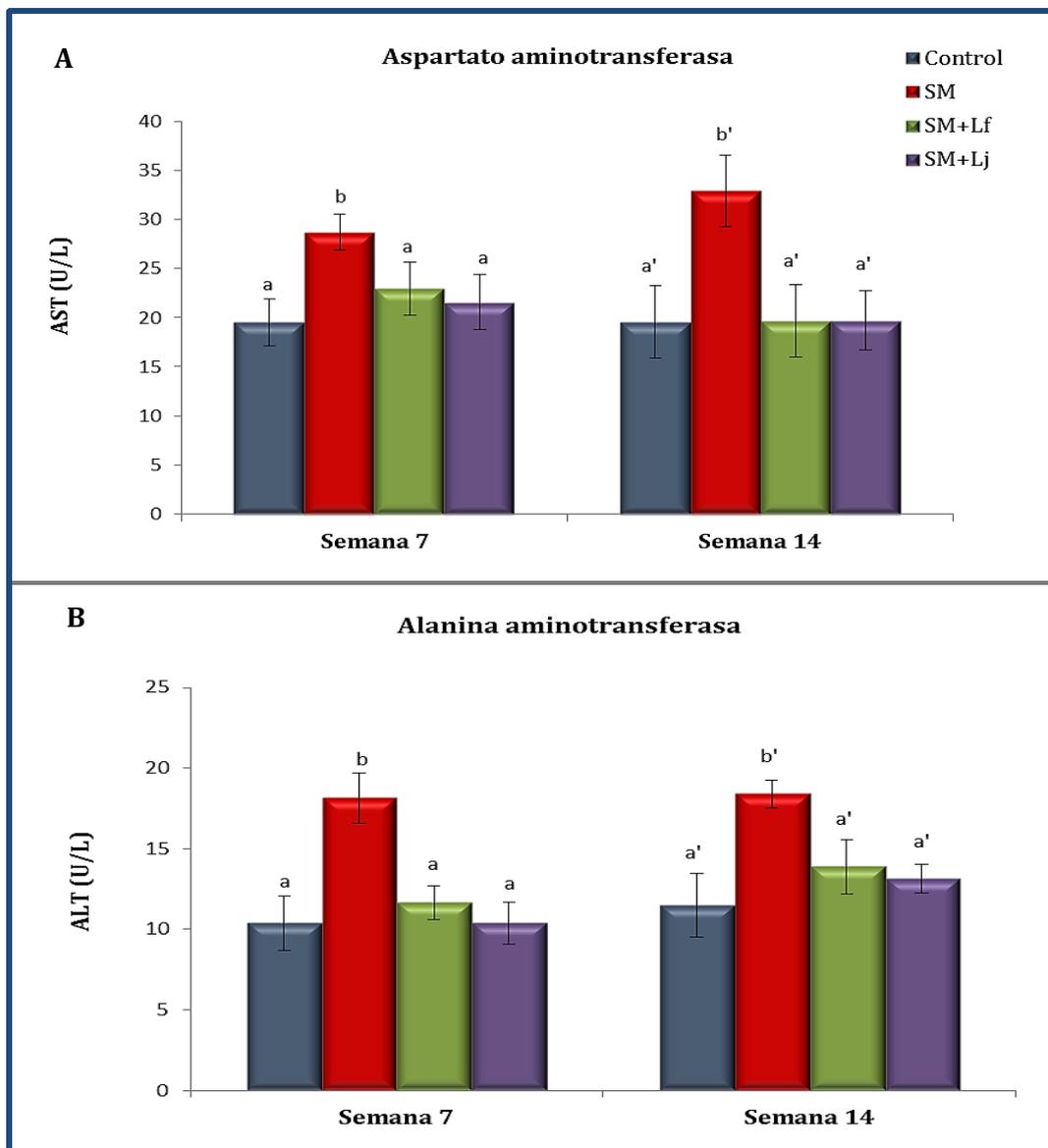


Figura 29: Concentraciones de transaminasas (U/L). (A) Aspartato aminotransferasa, (B) Alanina aminotransferasa. Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de  $n = 8$  ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores con letras distintas difieren significativamente.

### III.8- Perfil lipídico e indicadores de riesgo cardiovascular

Se evaluó el efecto de la dieta y la influencia de la administración de BL con actividad FE sobre los niveles plasmáticos de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol y triglicéridos (Figura 30).

Colesterol total: Se observó un incremento de 13% y 33% en los niveles de colesterol total en los ratones del grupo SM a las 7 y 14 semanas, respectivamente, en comparación con el grupo control. La administración de los lactobacilos redujo los valores a las 7 semanas, resultando los mismos similares a los observados en el grupo control. A las 14 semanas, el grupo SM+Lj mostró una disminución de 13% en los niveles de colesterol con respecto al grupo SM, pero los valores fueron mayores que los detectados en el grupo control, mientras que el grupo SM+Lf no mostró diferencias significativas con los animales controles (Figura 30A).

HDL-colesterol (HDL-col): Los valores plasmáticos de HDL-col del grupo SM disminuyeron un 16% y 22% con respecto al grupo control a las 7 y 14 semanas, respectivamente. La administración de *L. fermentum* CRL1446 (grupo SM+Lf) permitió mantener niveles similares a los encontrados en el grupo control, tanto a las 7 como a las 14 semanas. La administración de *L. johnsonii* CRL1231 (grupo SM+Lj) provocó un aumento de los niveles de HDL-col con respecto al grupo SM, alcanzándose valores similares al grupo control en la semana 7, mientras que a las 14 semanas los valores fueron menores que en el control pero un 13% más altos que en el grupo SM (Figura 30B).

LDL-colesterol (LDL-col): A las 7 semanas, ninguno de los grupos evaluados mostró diferencias significativas en los niveles de LDL-col con respecto al grupo control. A las 14 semanas, se observó en el grupo SM un aumento de 26% en los niveles de esta lipoproteína comparado con el grupo control, mientras que la administración de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 redujo los niveles

de LDL-col con respecto al grupo SM, resultando similares a los detectados en el grupo control (Figura 30C).

Triglicéridos (TG): El grupo SM mostró un incremento de 46% y 56% en los niveles de TG, a las 7 y 14 semanas, respectivamente. La administración de BL con actividad FE a los ratones alimentados con DRG+s (grupos SM+Lf y SM+Lj) redujo la hipertrigliceridemia característica del SM a las 7 y 14 semanas, sin que los valores de TG en plasma alcancen los niveles observados en el grupo control (Figura 30D).

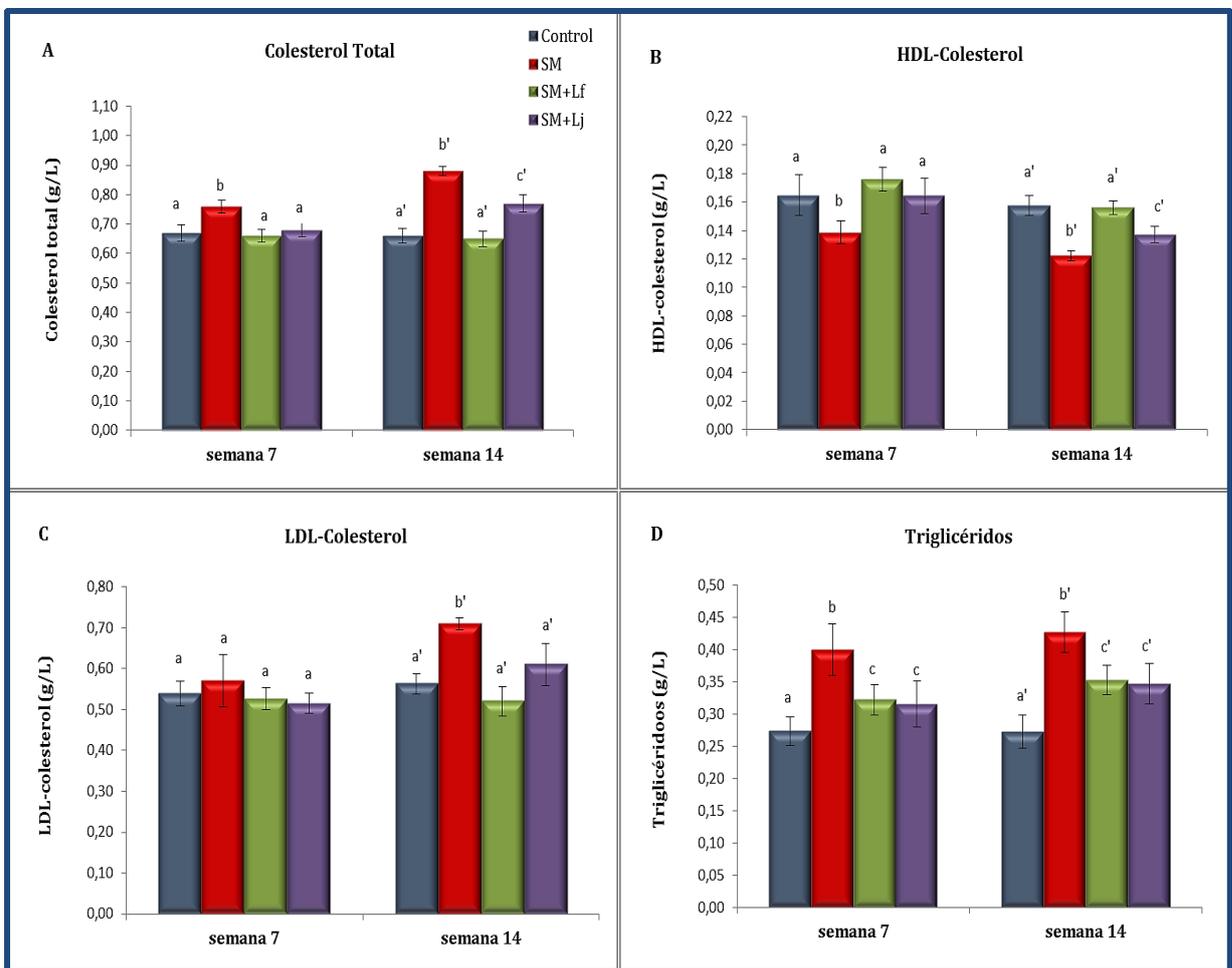


Figura 30: Perfil lipídico de ratones. (A) Niveles plasmáticos de colesterol total (g/L), (B) Niveles plasmáticos de HDL-colesterol (g/L), (C) Niveles plasmáticos de LDL-colesterol (g/L), (D) Niveles plasmáticos de triglicéridos (g/L). Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de  $n = 8$  ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores con letras distintas difieren significativamente.

Los valores del perfil lipídico fueron utilizados para calcular los distintos índices de riesgo cardiovascular que se encuentran detallados en la Tabla 14. Los resultados mostraron un aumento de los índices de riesgo cardíaco en el grupo SM con respecto al grupo control, a las 7 y 14 semanas de alimentación. En los grupos que recibieron las cepas de BL con actividad FE (SM+Lf y SM+Lj) se observaron siempre valores menores a los del grupo SM, y en la mayoría de los casos no se encontraron diferencias estadísticas con el grupo control.

Tabla14: Índices de riesgo cardiovascular a las 7 y 14 semanas

Grupo	*IA		LDL/HDL		Triglicéridos/HDL		**IAP	
	semana 7	semana 14						
Control	3,06±0,53 <sup>a</sup>	3,18±0,43 <sup>a</sup>	3,27±0,62 <sup>a</sup>	3,57±0,34 <sup>a</sup>	1,66±0,18 <sup>a</sup>	1,73±0,11 <sup>a</sup>	0,22±0,03 <sup>a</sup>	0,24±0,04 <sup>a</sup>
SM	4,48±0,20 <sup>b</sup>	6,19±0,52 <sup>b</sup>	4,11±0,11 <sup>b</sup>	5,81±0,25 <sup>b</sup>	2,88±0,09 <sup>b</sup>	3,49±0,15 <sup>b</sup>	0,46±0,05 <sup>b</sup>	0,54±0,06 <sup>b</sup>
SM+Lf	2,75±0,54 <sup>a</sup>	3,16±0,64 <sup>a</sup>	2,99±0,37 <sup>a</sup>	3,34±0,22 <sup>a</sup>	1,83±0,27 <sup>a</sup>	2,26±0,21 <sup>c</sup>	0,26±0,02 <sup>a</sup>	0,35±0,06 <sup>c</sup>
SM+Lj	3,14±0,32 <sup>a</sup>	4,61±0,53 <sup>c</sup>	3,14±0,41 <sup>a</sup>	4,45±0,40 <sup>a</sup>	1,92±0,31 <sup>a</sup>	2,53±0,16 <sup>c</sup>	0,28±0,03 <sup>a</sup>	0,40±0,05 <sup>c</sup>

Los datos representan la media ± ES (error estándar) de n= 8 ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . En cada columna, valores con letras superíndice distintas difieren significativamente. \*IA: índice de aterogenicidad = (Colesterol total – HDL)/ HDL. \*\*IAP: índice de aterogenicidad de plasma = Log (TG/HDL).

### III.9- Prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG)

La tolerancia a la glucosa fue evaluada a las 7 y 14 semanas (Figura 31). Los resultados obtenidos mostraron que en ambos períodos evaluados, los animales alimentados con DRG+s que no recibieron lactobacilos (grupo SM) presentaron niveles de glucosa en sangre significativamente más elevados en todos los puntos

de las curvas con respecto al grupo control, pero solo a las 14 semanas se observaron valores superiores a 200 mg/dL después de 2 h de la sobrecarga oral, indicando una RI en este tiempo de administración. La suplementación de la DRG+s con *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 redujo los niveles de glucosa postprandial de los grupos SM+Lf y SM+Lj en comparación con el grupo SM, pero solo se alcanzaron niveles similares al grupo control a las 14 semanas, lo cual se vio reflejado en las áreas bajo las curvas.

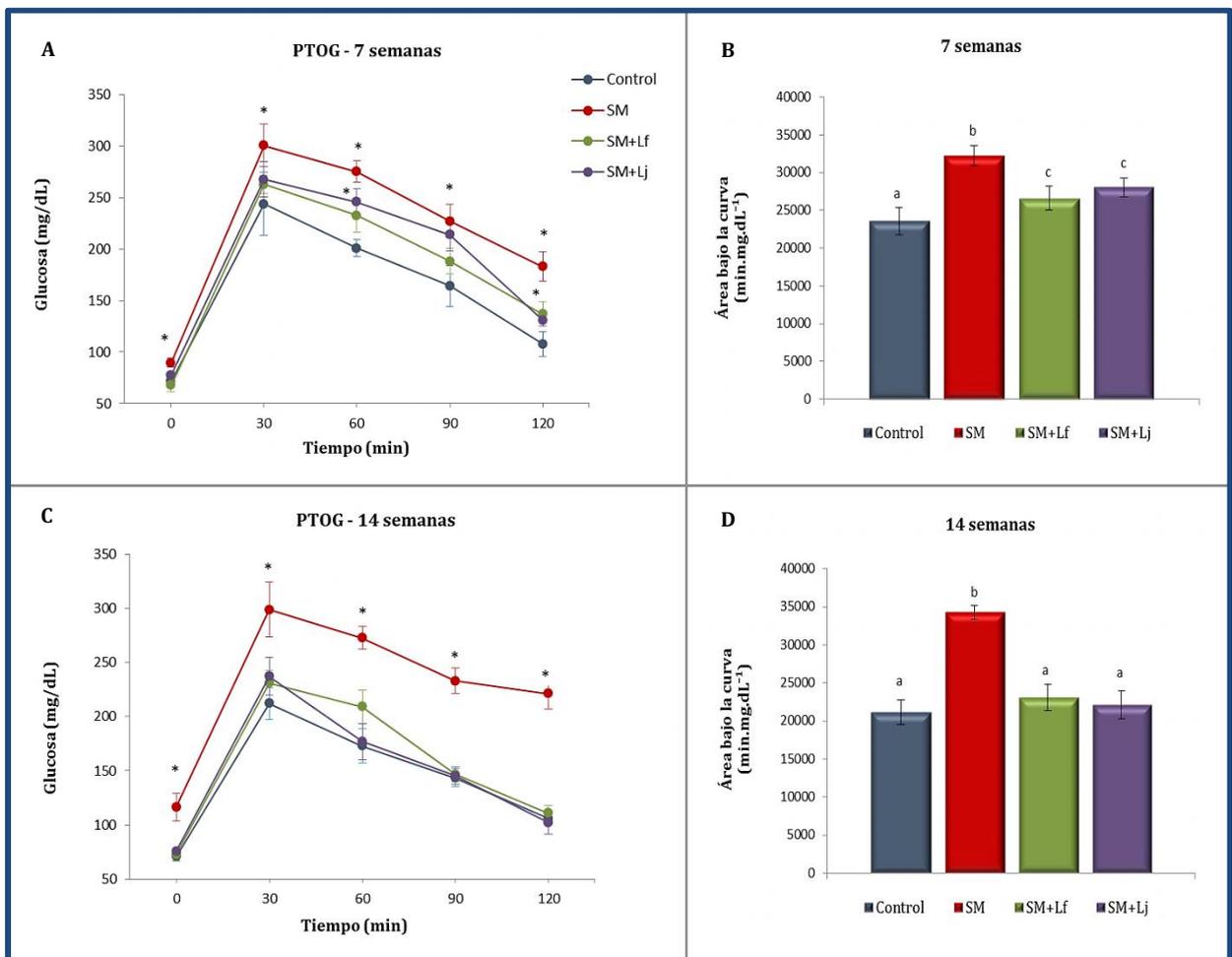


Figura 31: Curvas de tolerancia a la glucosa y áreas bajo la curva. (A) Curvas de tolerancia a la glucosa a las 7 semanas, (B) Áreas bajo la curva a las 7 semanas, (C) Curvas de tolerancia a la glucosa a las 14 semanas, (D) Áreas bajo la curva a las 14 semanas. Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de  $n = 8$  ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . En las figuras de la izquierda, los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticas con respecto al grupo control. En las figuras de la derecha, valores con letras distintas difieren significativamente.

### III.10- Efecto de la administración de BL con actividad FE sobre los niveles de glucosa e insulina en ayunas

Los niveles plasmáticos de glucosa en ayunas en el grupo SM incrementaron un 45% y 96% a las 7 y 14 semanas de alimentación, respectivamente, en comparación con el grupo control. Los ratones que recibieron las BL con actividad FE (grupos SM+Lf y SM+Lj) presentaron valores de glucemia similares al grupo control a las 7 semanas de estudio. A las 14 semanas, la administración de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 redujo los valores de glucosa en sangre con respecto al grupo SM, siendo este efecto mayor en el grupo SM+Lf, el cual no mostró diferencias significativas con el grupo control (Tabla 15).

Los niveles de insulina en el grupo SM aumentaron un 34% y 45% comparado al grupo control, a las 7 y 14 semanas, respectivamente. La administración de las BL disminuyó la concentración de insulina en los grupos SM+Lf y SM+Lj, alcanzando valores similares al grupo control en ambos períodos evaluados (Tabla 15).

El modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina (HOMA-IR) mostró un aumento de los valores en los ratones del grupo SM a las 7 semanas y 14 semanas de alimentación con respecto al grupo control. La administración de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 disminuyó el índice HOMA en los animales alimentados con DRG+s, observándose valores similares al grupo control (Tabla 15).

Tabla 15: Glucemia, Insulina e Índice HOMA

	Semana 7				Semana 14			
	Control	SM	SM+Lf	SM+Lj	Control	SM	SM+Lf	SM+Lj
Glucosa (mmol/L)	4,02±0,33 <sup>a</sup>	5,86±0,51 <sup>b</sup>	4,11±0,27 <sup>a</sup>	4,10±0,71 <sup>a</sup>	3,96±0,46 <sup>a</sup>	7,79±0,91 <sup>b</sup>	4,12±0,23 <sup>a</sup>	5,33±0,54 <sup>c</sup>
Insulina (μU/mL)	9,06±1,05 <sup>a</sup>	12,20±1,02 <sup>b</sup>	9,36±0,79 <sup>a</sup>	9,93±1,25 <sup>a</sup>	8,69±0,69 <sup>a</sup>	12,59±0,85 <sup>b</sup>	8,84±0,75 <sup>a</sup>	8,95±0,96 <sup>a</sup>
HOMA-IR	1,62±0,54 <sup>a</sup>	3,18±0,64 <sup>b</sup>	1,71±0,67 <sup>a</sup>	1,81±0,52 <sup>a</sup>	1,53±0,27 <sup>a</sup>	4,36±0,41 <sup>b</sup>	1,62±0,29 <sup>a</sup>	2,12±0,76 <sup>a</sup>

Los datos representan la media ± ES (error estándar) de n= 8 ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Para cada período, valores en la misma fila con letras superíndice distintas difieren significativamente.

### III.11- Evaluación del efecto antihiper glucémico de las BL con actividad FE

#### III.11.1- Prueba de tolerancia oral a la sacarosa (PTOS)

La PTOS se realizó a las 14 semanas para determinar si *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 eran capaces de modificar los niveles de glucemia postprandial después del consumo de sacarosa (disacárido formado por glucosa y fructosa). La prueba consistió en aplicar a los animales una sobrecarga oral de sacarosa y se midieron los niveles de glucosa en sangre cada 30 min durante 2 h. Con los datos obtenidos se construyeron curvas y se calcularon las áreas bajo las mismas para cada grupo (Figura 32).

Los resultados mostraron un aumento significativo de los niveles de glucosa en sangre para el grupo SM en todos los puntos de la curva; mientras que para los grupos SM+Lf y SM+Lj no se observaron diferencias con respecto al grupo control; es decir, que la administración de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231

redujo los picos glucémicos postprandiales en los animales alimentados con DRG+s durante 14 semanas.

El área bajo la curva del grupo SM sufrió un incremento (36%) con respecto al grupo control, mientras que los grupos SM+Lf y SM+Lj mantuvieron valores similares al control.

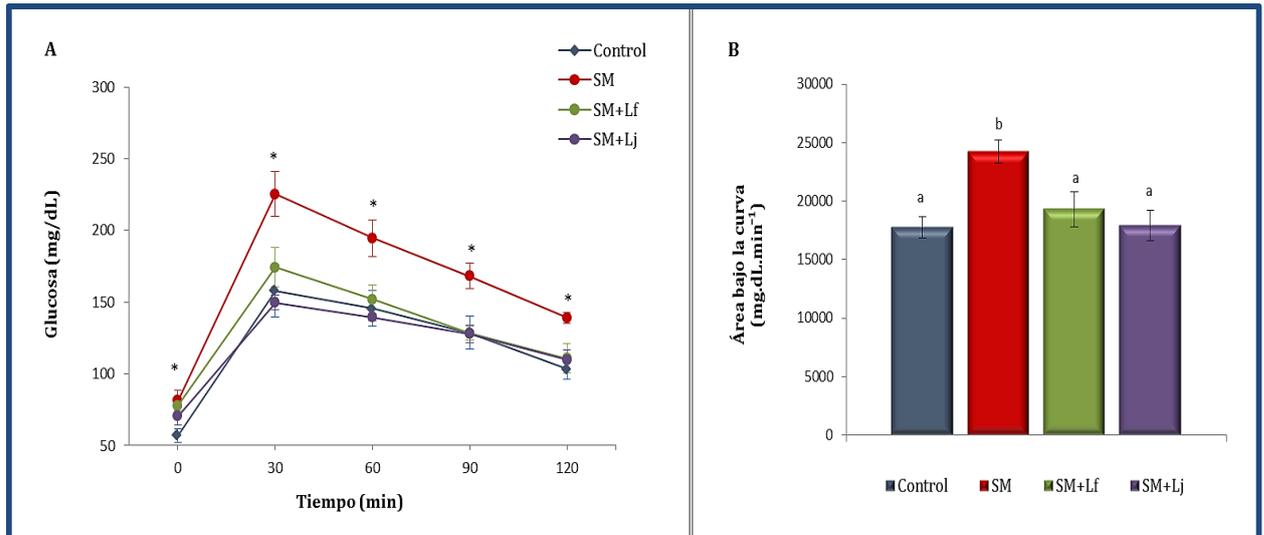


Figura 32: (A) Curvas de tolerancia oral a la sacarosa a las 14 semanas de alimentación, (B) Áreas bajo la curva. Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de  $n=8$  ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p<0,05$ . En la figura A los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticas con respecto al grupo control. En la figura B valores con letras distintas difieren significativamente.

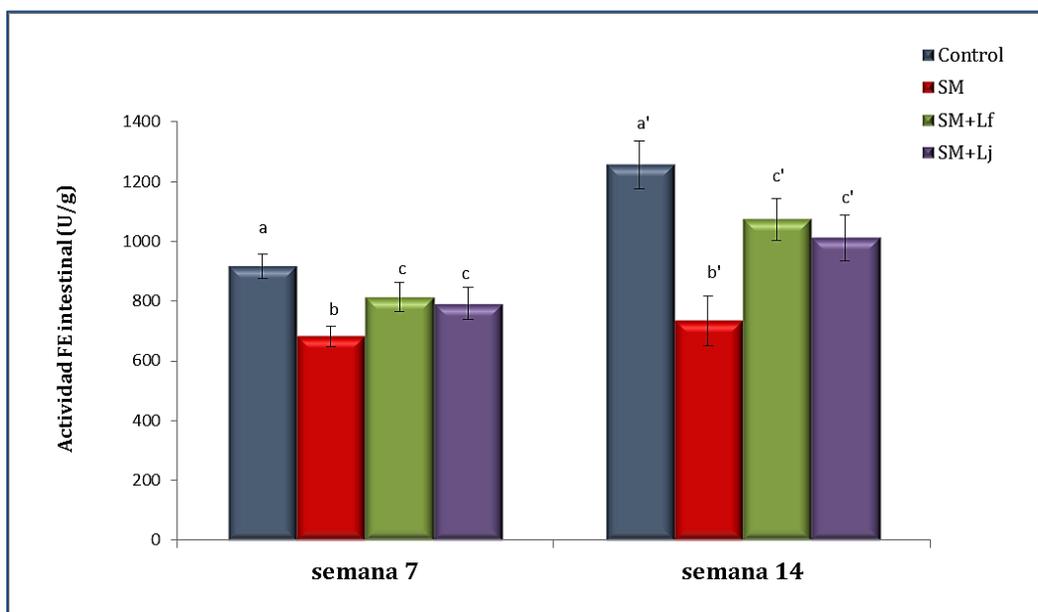
### III.11.2- Prueba de inhibición de la actividad $\alpha$ -glucosidasa por las cepas seleccionadas

Con la finalidad de comprobar si el efecto sobre la glucemia observado en el ensayo *in vivo* anteriormente descrito era atribuible a las cepas administradas, se realizó un estudio *in vitro* para evaluar la capacidad de estas BL de inhibir la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. Los resultados mostraron porcentajes de inhibición de 90,41% para *L. fermentum* CRL1446 y 75,67% para *L. johnsonii* CRL1231..

### III.12- Efecto de la administración de las BL sobre la actividad FE intestinal

Se determinó la actividad específica FE en contenidos de intestino grueso utilizando metil ferulato como sustrato. Los valores de la actividad enzimática para cada grupo de ratones se muestran en la [Figura 33](#).

La actividad FE intestinal se redujo significativamente en los ratones del grupo SM con respecto al grupo control, tanto a las 7 como a las 14 semanas de alimentación con DRG+s. La suplementación de la DRG+s con BL que poseen actividad FE incrementó esta actividad enzimática a nivel intestinal en ambos períodos evaluados. A las 7 semanas, se observó que el aumento de actividad FE intestinal en los grupos SM+Lf y SM+Lj fue más leve, mientras que a las 14 semanas los incrementos fueron de 46% y 37%, respectivamente, en comparación con el grupo SM.



**Figura 33:** Actividad específica FE en contenidos de intestino grueso. Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de  $n=8$  ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p<0,05$ . Valores con letras distintas difieren significativamente.

### III.13- Detección de metabolitos derivados del AF en contenidos de colon

Se determinó la presencia de metabolitos derivados del AF en los contenidos de intestino grueso de ratones alimentados durante 14 semanas. La detección fue realizada mediante espectrometría de masas, obteniéndose perfiles cromatográficos como los observados en la [Figura 34](#).

Luego de la sintonización previa del equipo de HPLC-MS con AF, se pudo reconocer varias especies derivadas del mismo, según las relaciones masa/carga (m/z) de los iones “padres” y los tiempos de retención (RT) observados. La búsqueda de estos compuestos provenientes del metabolismo del AF se realizó en los contenidos de colon de los 4 grupos de ratones estudiados. La determinación fue semicuantitativa y se estimó la abundancia de cada metabolito según el tamaño de los picos a partir de la línea de base del espectro ([Tabla 16](#)).

En todos los grupos de animales (Control, SM, SM+Lf y SM+Lj) se detectó la presencia de ácido dihidroferúlico (DHF), ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico (DHPPA) y ácido 3-hidroxifenilpropiónico (HPPA). Se observó en general una menor abundancia de estos compuestos en el grupo SM con respecto al control y un aumento cuando se administraron las cepas *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231.

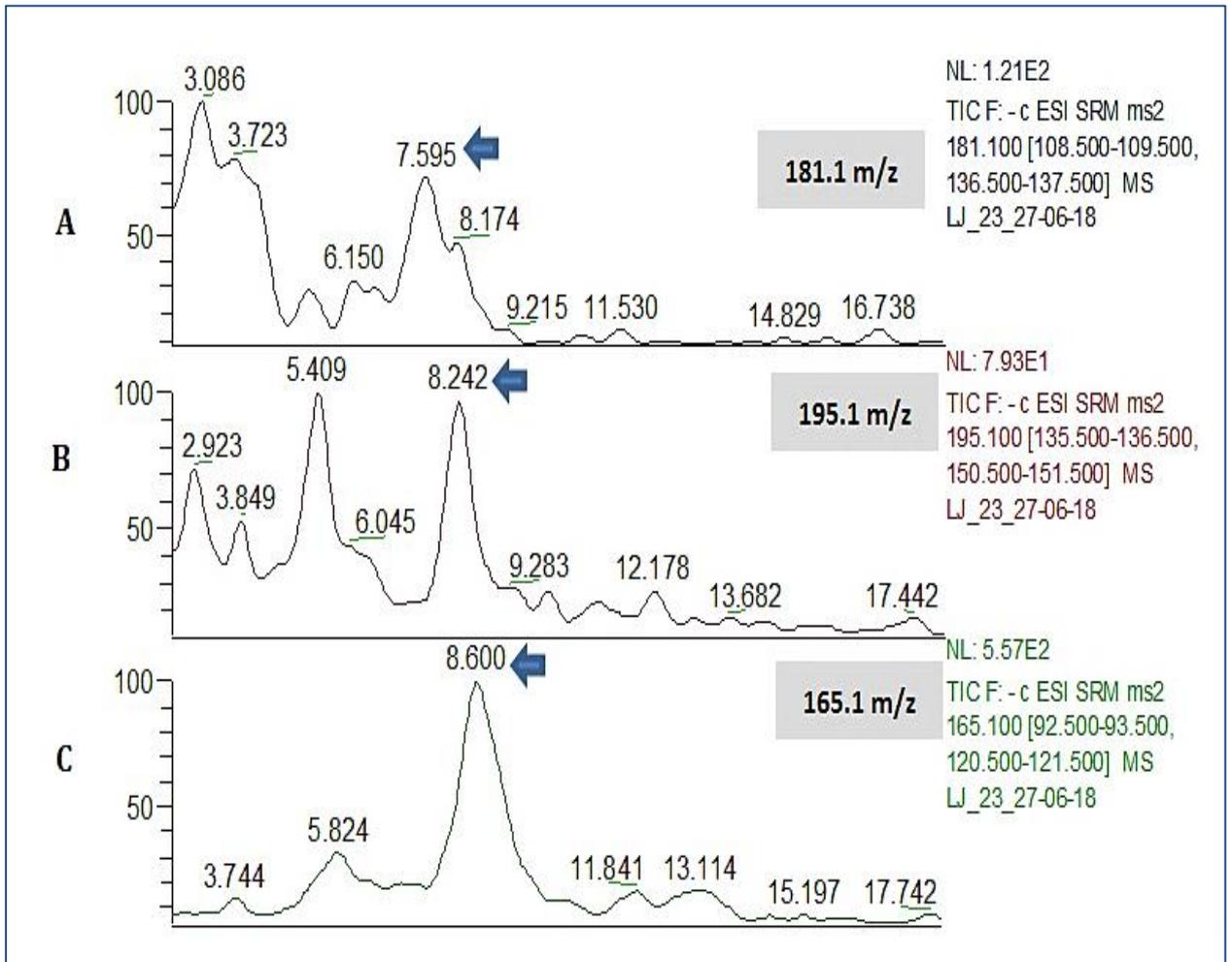


Figura 34: Cromatogramas obtenidos mediante HPLC-MS después de la inyección de una muestra del grupo SM+Lj. De acuerdo a la relación masa/carga [m/z] de las especies iónicas detectadas y a los tiempos de retención [RT] (flechas azules) se confirmó la presencia de los siguientes metabolitos derivados del ácido ferúlico: (A) ácido dihidroxifenilpropiónico [DHPPA]; (B) ácido dihidroferúlico [DHF] y (C) ácido hidroxifenilpropiónico [HPPA].

Compuesto	Ion "Padre"	RT (min)	Grupos animales												
			Ctrol 1	Ctrol 2	Ctrol 3	SM 1	SM 2	SM 3	SM+Lf 1	SM+Lf 2	SM+Lf 3	SM+Lj 1	SM+Lj 2	SM+Lj 3	
AF	193.0 m/z	12.55'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DHF	195.1 m/z	8.26'	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	
DHPPA	181.1 m/z	7.36'	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	
HPPA	165.1 m/z	8.56'	++	++	++	+	+	+	++	++	++	++	+++	++	
AB	121.0 m/z	13.2'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabla 16: Detección de metabolitos derivados del AF en contenidos de colon de ratones alimentados durante 14 semanas por HPLC-MS. Se asignaron las relaciones masa/carga (m/z) y los tiempos de retención (RT) para cada compuesto. **AF**: ácido ferúlico; **DHF**: ácido dihidroferúlico; **DHPPA**: ácido dihidroxifenilpropiónico, **HPPA**: ácido hidroxifenilpropiónico y **AB**: ácido benzoico. Los metabolitos detectados se muestran para cada individuo de los 4 grupos de ratones ensayados (n=3). (-): metabolito no detectado (+): metabolito detectado. Mayor cantidad de signos (++ o +++) indican mayor área de los picos en el espectro.

### III.14- Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en contenidos de colon

Los AGCC se producen cuando la fibra alimentaria es fermentada por las bacterias presentes en el colon. A las 14 semanas se determinaron las concentraciones de ácidos acético, propiónico y butírico en los contenidos de intestino grueso de los ratones de todos los grupos (Figura 35).

Los resultados mostraron una reducción significativa de los niveles de todos los AGCC en el grupo SM con respecto al control. El grupo SM+Lf no mostró diferencias en las concentraciones de ácidos acético y propiónico con respecto al grupo SM; pero se observó un aumento en la concentración de ácido butírico. El grupo SM+Lj exhibió un incremento en los niveles de todos los ácidos (acético, propiónico y butírico) en comparación con el grupo SM.

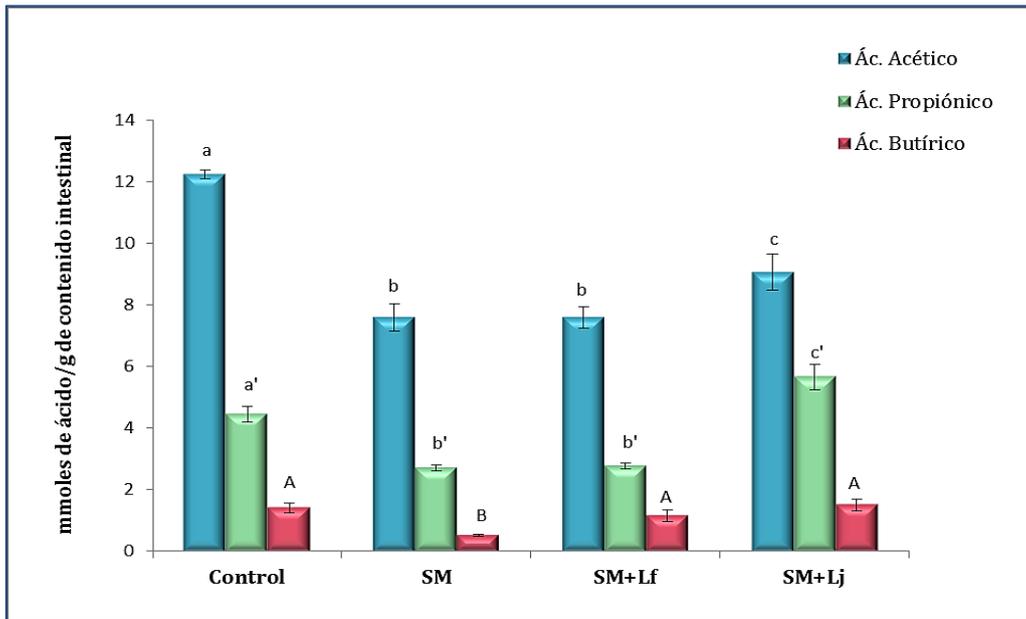


Figura 35: Concentración de AGCC producidos en contenidos de colon a las 14 semanas de alimentación. Los ratones recibieron dieta convencional [DC] (grupo Control), dieta rica en grasa conteniendo salvado de trigo [DRG+s] (grupo SM), DRG+s suplementada con *L. fermentum* CRL1446 (grupo SM+Lf) y DRG+s suplementada con *L. johnsonii* CRL1231 (grupo SM+Lj). La dosis de administración de las cepas fue  $10^8$  UFC/día/ratón. Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de n= 8 ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores con letras distintas difieren significativamente para cada ácido evaluado.

### III.15- Evaluación de la microbiota intestinal mediante PCR en tiempo real (qPCR)

La Tabla 17 muestra la abundancia de los siguientes géneros bacterianos: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterobacter*; los mismos fueron determinados por qPCR en las heces de ratones de los 4 grupos estudiados a las 14 semanas de alimentación. Los resultados fueron expresados en Log UFC/g de materia fecal.

En el grupo SM se observó un incremento significativo de Lactobacilos y Enterobacterias en comparación con el grupo control. Cuando se analizó la abundancia de estos dos géneros en los grupos SM+Lf y SM+Lj se vio que solo el grupo que recibió *L. fermentum* CRL1446 logró normalizar la abundancia de Lactobacilos y Enterobacterias detectándose valores similares al grupo control.

Respecto a las Bifidobacterias, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de ratones ensayados.

Microbiota	Control	SM		SM+Lf			SM+Lj		
	Log UFC/g heces	Log UFC/g heces	<i>p</i>	Log UFC/g heces	<i>p</i>		Log UFC/g heces	<i>p</i>	
			vs Control		vs Control	vs SM		vs Control	vs SM
Bacterias totales	5,73±0,39	6,39±0,19	ns	5,51±0,04	ns	ns	5,57±0,01	ns	ns
Lactobacilos	7,65±0,13	8,29±0,25	0,0030	7,14±0,07	ns	0,0239	9,21±0,32	0,0052	ns
Bifidobacterias	4,71±0,22	5,40±0,01	ns	4,68±0,44	ns	ns	4,58±0,25	ns	ns
Enterobacterias	5,44±0,17	7,08±0,12	0,0039	5,26±0,43	ns	0,0020	7,15±0,65	0,0030	ns

Tabla 17: Análisis cuantitativo de diferentes géneros bacterianos en la materia fecal de ratones determinados por qPCR a las 14 semanas de alimentación. La abundancia de cada género fue expresada como Log UFC/g de heces. Los datos representan la media ± ES (error estándar) de n= 3 ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . El grupo SM fue comparado con el grupo control, mientras que los grupos SM+Lf y SM+Lj fueron comparados con los grupos control y SM. [ns]: no significativo.

### III.16- Efecto de la administración oral de las BL con actividad FE sobre el estado oxidativo de los ratones con SM

El estado oxidativo de los ratones se evaluó a las 7 y 14 semanas de alimentación determinando las actividades glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) en hígado y la concentración de lipoperóxidos plasmáticos (TBARS) en plasma (Figura 36).

A las 7 semanas de ensayo, no se observaron diferencias significativas entre los 4 grupos de animales en ninguno de los parámetros oxidativos evaluados.

A las 14 de alimentación, se observó en el grupo SM una disminución de las actividades GPx y GR (11% y 15%, respectivamente) y un gran incremento en las concentraciones de TBARS (48%) en comparación con el grupo control. La

administración de las cepas *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 mejoró el estado oxidativo de los ratones alimentados con DRG+s. En los grupos SM+Lf y SM+Lj se observó un incremento de la actividad GPx (37% y 11%, respectivamente) y GR (64% y 54%, respectivamente) en comparación con el grupo SM. Además, los niveles plasmáticos de TBARS en los grupos de ratones que recibieron ambas cepas de BL mostraron una reducción significativa con respecto al grupo SM, manteniendo valores similares al grupo control.

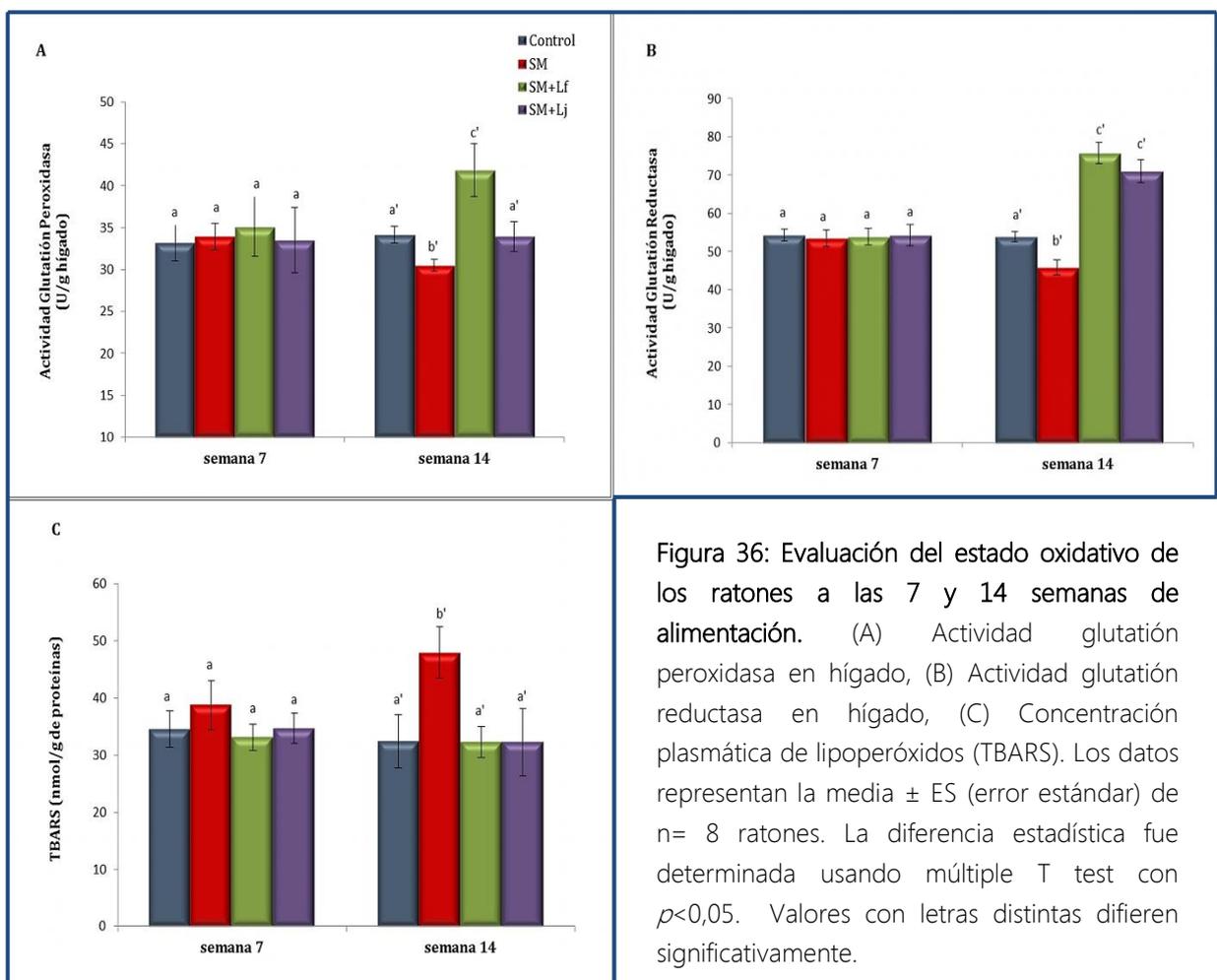


Figura 36: Evaluación del estado oxidativo de los ratones a las 7 y 14 semanas de alimentación. (A) Actividad glutación peroxidasa en hígado, (B) Actividad glutación reductasa en hígado, (C) Concentración plasmática de lipoperóxidos (TBARS). Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de  $n= 8$  ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p<0,05$ . Valores con letras distintas difieren significativamente.

### III.17- Discusión

El síndrome metabólico (SM) se caracteriza por la presencia de al menos 3 de los siguientes factores de riesgo: obesidad central, hiperglucemia, dislipidemia aterogénica e hipertensión. Su prevalencia en los últimos años ha aumentado debido principalmente a cambios en el estilo de vida, que incluyen un mayor sedentarismo y el consumo de dietas ricas en grasas y azúcares (dieta occidental). Se ha demostrado, además, que el SM está asociado con una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 (DT2), incrementado notablemente las tasas de morbilidad y mortalidad en la población (He y Shi, 2017).

En lo que respecta a la salud pública, los costos médicos debido a enfermedades relacionadas con el SM aumentan día tras día, y el esfuerzo requerido para disminuir el porcentaje de grasa corporal en los individuos se ha convertido en una preocupación a nivel mundial (Finkelstein y col., 2014). Existen diversas estrategias para disminuir el peso corporal, como ser actividad física, dietas restringidas en calorías, empleo de medicamentos, cirugías, etc., pero la mayoría de ellas implican elevados costos de tratamiento y en algunos casos pueden generar efectos secundarios adversos. Es por ello, que el desarrollo de estrategias dietarias que incluyan productos alimenticios naturales con probióticos y/o prebióticos ha surgido como una alternativa que ayudaría a disminuir los factores de riesgo asociados al SM, sin generar efectos secundarios perjudiciales para la salud (Mallappa y col., 2012). El consumo de bacterias probióticas tiene un gran impacto en el metabolismo debido a que modulan la microbiota intestinal, pudiendo afectar el apetito, la ingesta de alimentos y el peso corporal (Kobyliak y col., 2016).

En el presente capítulo se estudió el efecto de la administración oral de BL con actividad FE en un modelo murino de SM alimentado con una dieta rica en grasa suplementada con salvado de trigo como fuente de AF esterificado [DRG+s].

-Efecto sobre GPC, EA y adiposidad

La alimentación con DRG+s durante 14 semanas incrementó la GPC, la EA, el índice de adiposidad y los niveles de leptina en los animales del grupo SM en comparación con el grupo control. Cuando se administraron las BL conjuntamente con la DRG+s se observó una disminución de todos los parámetros anteriormente mencionados.

La GPC es un parámetro fundamental en los modelos nutricionales, ya que refleja cambios macroscópicos inducidos por la dieta en un determinado organismo. Junto a la ingesta de alimentos, la GPC permite evaluar la capacidad de un organismo para transformar gramos de alimentos consumidos en gramos de masa corporal, lo que se conoce como EA. Estos dos parámetros están estrechamente relacionados a la composición de la microbiota intestinal y la dieta (Raoult, 2009).

En este trabajo se evaluó la EA con el fin de determinar si la administración de BL con actividad FE ejercía algún efecto sobre el aumento de peso corporal. La EA fue significativamente mayor en el grupo SM (86%) con respecto al grupo control a las 14 semanas de alimentación. Esto indica que la DRG+s provoca mayor GPC que la dieta convencional [DC]. La suplementación de la DRG+s con las BL seleccionadas provocó una reducción significativa de la EA con respecto al grupo SM, resultando los valores similares a los observados en el grupo control. Los menores valores de EA en ratones alimentados con DRG+s que recibieron *L. fermentum* CRL1446 o *L. johnsonii* CRL1231 indican que estos animales tuvieron una menor GPC al consumir la misma cantidad y tipo de alimento que los ratones del grupo SM. Similares resultados fueron informados por Park y col. (2013), quienes observaron una disminución de la EA al administrar una combinación de dos cepas probióticas (*L. curvatus* HY7601 y *L. plantarum* KY1032) durante 8 semanas a ratones alimentados con una DRG suplementada con colesterol. Dos interesantes revisiones que analizan la influencia de *Lactobacillus* spp. sobre la GPC mostraron que los efectos no pueden ser generalizados, indicando que dicha influencia es dependiente

de cada cepa; mientras algunas especies inducen un descenso de peso, otras no tienen efecto o inducen incrementos (Crovesy y col., 2017; Drissi y col., 2017).

Cuando se evaluó el índice de adiposidad del grupo SM, se observó que el mismo fue un 99% mayor con respecto al grupo control a las 14 semanas de alimentación, mostrando una correlación con la GPC. Cuando los ratones alimentados con DRG+s recibieron *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 se observó una reducción significativa del índice de adiposidad en comparación con el grupo SM (39% y 26%, respectivamente, a las 14 semanas). Los resultados concuerdan con lo informado por Bhatena y col. (2012), quienes observaron una reducción del índice de adiposidad al administrar *L. fermentum* ATCC11976 con actividad FE a hámsteres con SM.

La histología del tejido adiposo epididimal reveló la presencia de adipocitos de gran tamaño en ratones del grupo SM, mientras que los animales que recibieron *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 mostraron una estructura que se asemejó más al grupo control, evidenciando que ambas cepas lograron prevenir la hipertrofia del tejido adiposo en animales alimentados con DRG+s. Varios autores han informado efectos similares al administrar cepas de *L. gasseri* en diferentes modelos de obesidad inducido por la dieta en roedores, indicando una influencia tanto en el peso del tejido adiposo como en el área de los adipocitos (Hamad y col., 2008; Kang y col., 2013; Kawano y col., 2016). El mecanismo por el cual el tejido adiposo se expande es considerado un determinante crítico de la obesidad. En principio, esta expansión puede ocurrir a través del aumento del tamaño de los adipocitos (hipertrofia) o por el incremento del número de adipocitos (hiperplasia) (Wang y col., 2013). El efecto de microorganismos probióticos sobre el tamaño de los adipocitos fue investigado también por otros autores (Hamad y col., 2008; Gauffin Cano y col., 2013).

-Niveles de adipoquinas y estado inflamatorio

Es importante destacar la participación del tejido adiposo como un órgano endócrino clave, ya que libera múltiples sustancias bioactivas, conocidas como adipoquinas. La producción desregulada de estas adipoquinas debido a la disfunción del tejido adiposo puede contribuir a la patogénesis de las complicaciones relacionadas con la obesidad (Ouchi y col., 2011). Se ha informado que en individuos obesos, algunas citoquinas son secretadas en mayor cantidad promoviendo la respuesta inflamatoria (leptina, TNF- $\alpha$ , IL-6). Además, se ha sugerido un rol proactivo de los probióticos en la modulación de estos componentes bioactivos secretados por el tejido adiposo (Torres y col., 2018).

En esta tesis se demostró que la DRG+s indujo un incremento significativo de los niveles de leptina plasmática en los ratones del grupo SM a las 14 semanas, comparados con el control. La leptina secretada por los adipocitos se encuentra en niveles proporcionales a la cantidad de grasa corporal, y constituye una señal periférica clave que indica el estado de las reservas de energía corporal (Torres y col., 2018). Los resultados obtenidos reflejaron un estado de hiperleptinemia en los ratones del grupo SM, el cual fue informado por otros autores como una característica de la obesidad, en donde los pacientes obesos responden pobremente a las señales anorexigénicas, lo cual se traduce en un estado de resistencia a la leptina (Coppari y Bjørnbæk, 2012). Se demostró además, que ciertos nutrientes, especialmente los lípidos, inducen el estado de leptino-resistencia (Shapiro y col., 2008; Vasselli, 2012). La leptina, además de correlacionarse positivamente con diferentes parámetros del SM, participa en la promoción, reclutamiento y proliferación de células inmunes pro-inflamatorias (Torres y col., 2018). En los grupos de ratones SM+Lf y SM+Lj se evidenció una disminución significativa de la concentración de leptina (3,5 y 2 veces, respectivamente, a las 14 semanas) cuando fueron comparados con el grupo SM. Los resultados demostraron que la administración oral de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 permitió disminuir el estado de hiperleptinemia en los animales alimentados con DRG+s. La

reducción de los niveles de leptina plasmática como consecuencia de la administración de microorganismos probióticos en modelos de obesidad inducida por la dieta ha sido informada por otros autores (Gauffin Cano y col., 2012 y 2013). Se ha sugerido una restauración de la funcionalidad de esta hormona, lo cual permitiría una mejor distribución del tejido adiposo, como así también la prevención de la acumulación de triglicéridos en tejidos periféricos (Gauffin Cano y col., 2013).

Los mayores niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 reflejaron un estado inflamatorio crónico característico de la obesidad en ratones del grupo SM. Estos resultados concuerdan con los informados por otros autores en modelos animales alimentados con DRG (Núñez y col., 2015). Asimismo, se observó una menor concentración de IL-10 (citoquina antiinflamatoria) en los ratones del grupo SM. Trabajos previos han demostrado que existe una relación negativa entre la obesidad y los niveles de IL-10 (Blüher y col., 2005; Jung y col., 2008). La administración de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 mejoró el perfil inflamatorio de los animales que recibieron DRG+s. durante 14 semanas, observándose una reducción de las citoquinas proinflamatorias y un incremento de IL-10.

#### -Histología hepática y transaminasas

La EHGNA es una enfermedad inflamatoria de carácter crónico, de gran relevancia en la actualidad por su fuerte asociación con patologías de incidencia creciente como la obesidad y la DT2. Se efectuó un estudio histológico del hígado de los 4 grupos de ratones evaluados y se determinaron los niveles de transaminasas en sangre. En el grupo SM, se observó un abundante depósito de gotas de lípidos, mientras que en los grupos suplementados con las BL, se redujo la infiltración grasa. Además de la esteatosis hepática, los ratones del grupo SM mostraron altos niveles plasmáticos de transaminasas ALT y AST, los cuales se vieron disminuidos en los grupos SM+Lf y SM+Lj. La acumulación de grasa en el hígado es un signo del desarrollo temprano de la EHGNA, y está asociada con la desregulación del metabolismo de los lípidos y la glucosa (Preiss y Sattar, 2008). Las transaminasas

(ALT y AST) son consideradas biomarcadores clínicos de la funcionalidad hepática y su enfermedad. Además, se ha encontrado que la elevación de ALT y AST se asocia con un mayor índice de masa corporal y obesidad abdominal, aun en ausencia de enfermedad hepática (Marchesini y col., 2003).

Otros estudios han informado una mejora del hígado graso cuando se administró un mix de probióticos a ratas con esteatosis, asociando la menor acumulación de grasa con la modulación del perfil lipídico, leptina y biomarcadores inflamatorios (Al-muzafar y Amin, 2017). Bhatena y col. (2012), por su parte, han demostrado el efecto benéfico que tiene la administración de un microorganismo con actividad FE (*L. fermentum* ATCC 11976) en un modelo de EHGNA en hámsteres sirios dorados.

#### -Perfil lipídico e indicadores de riesgo cardiovascular

Cuando se evaluó el perfil lipídico en plasma a las 14 semanas, se observó que la administración de BL con actividad FE redujo los niveles de colesterol total, LDL-colesterol y triglicéridos, y provocó asimismo un aumento de HDL-colesterol con respecto al grupo SM. Estos resultados fueron similares a los observados por Bhatena y col. (2012) en hámsteres con SM tratados con *L. fermentum* ATCC11976 con actividad FE.

Adicionalmente a la cuantificación rutinaria del perfil lipídico, se han propuesto diversos indicadores de riesgo cardiovascular (IRCV), basados en simples cálculos aritméticos entre las fracciones de dicho perfil. Estos IRCV han demostrado tener mayor valor predictivo que las propias fracciones por separado (Millán y col., 2009). Son varios los estudios que han evaluado la asociación y capacidad predictiva de estos indicadores en diferentes grupos de individuos, particularmente en aquellos que presentan obesidad, RI, SM y DT2, condiciones todas vinculadas al desarrollo de enfermedad cardiovascular de tipo aterogénico (Múscolo y col., 2004; Cordero y col., 2009, Hadaegh y col., 2009; Acevedo y col., 2012; González Roca, 2016).

Los resultados mostraron un aumento de los IRCV en el grupo SM con respecto al control. Los grupos SM+Lf y SM+Lj presentaron siempre menores valores que el grupo SM. Se observó que los IRCV de ratones que recibieron *L. fermentum* CRL1446 fueron más bajos comparados con aquellos que recibieron *L. johnsonii* CRL1231, pero la diferencia solo fue significativa en el índice de aterogenicidad (IA= Colesterol total – HDL)/ HDL). Tomaro- Duchesneau y col. (2014) observaron similares resultados en ratas con SM tratadas con *L. fermentum* NCIMB 5221 con actividad FE.

Naowaboot y col. (2016) demostraron que la administración de AF en ratones obesos alimentados con DRG mejoró la homeostasis lipídica, probablemente a través de la modulación de la expresión de genes lipogénicos (SREBP1c, FAS, ACC) y estimulación de genes de la  $\beta$ -oxidación (CPT1A, PPAR $\gamma$ ).

#### -Metabolismo de la glucosa e inhibición de la actividad $\alpha$ -glucosidasa

Cuando se analizó el metabolismo de la glucosa, se vio que la administración de las BL con actividad FE redujo la glucemia en ayunas y mejoró la tolerancia a la glucosa a las 14 semanas de alimentación con DRG+s. También se observó disminución de la RI (HOMA-IR), lo que sugiere que estos lactobacilos pueden mejorar la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina y prevenir eficazmente el desarrollo de hiperglucemia en individuos obesos. Naowaboot y col. (2016) han sugerido que el AF podría actuar disminuyendo la expresión de enzimas hepáticas de la gluconeogénesis, (fosfoenolpiruvato carboxilasa y glucosa-6-fosfatasa), reduciendo así los niveles de glucosa en sangre. Bhathena y col. (2012), informaron que la administración de *L. fermentum* ATCC11976 (cepa con actividad FE) a hámsteres con SM, disminuyó los niveles séricos de insulina y glucosa. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan además con lo informado por Lim y col. (2016), quienes demostraron que la administración de *L. sakei* OK67 a ratones obesos inducidos por DRG mejora la tolerancia a la glucosa.

La medición de los niveles de glucemia después de una ingesta de sacarosa es una forma indirecta de evaluar el efecto inhibitorio de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa por parte de las cepas de BL administradas. Las  $\alpha$ -glucosidasas participan en el desdoblamiento de la sacarosa liberando glucosa, y su inhibición permitiría mantener concentraciones de glucosa en sangre más bajas. Los resultados mostraron que tanto *L. fermentum* CRL1446 como *L. johnsonii* CRL1231 fueron capaces de reducir los niveles de glucosa postprandial en ratones alimentados con DRG+s que recibieron una sobrecarga de sacarosa. Se realizaron además ensayos *in vitro* de inhibición de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa por los lactobacilos y se demostró que ambas cepas tenían capacidad de inhibir esta enzima. Li y col. (2016) informaron que la administración de *L. plantarum* X1 con capacidad inhibitoria de la  $\alpha$ -glucosidasa, mejoró los marcadores de riesgo en ratas con DT2. Asimismo, Malunga y col. (2016) informaron que el AF y los mono y oligosacáridos de arabinoxilano ferulados inhiben la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. Esto último sugiere que el efecto antihiper glucémico de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 en ratones alimentados con DRG+s podría estar potenciado por la presencia de AF en las fibras de salvado de la dieta.

#### -Actividad FE y liberación de AF

El consumo de AF ha sido asociado a la reducción de varios factores de riesgo presentes en enfermedades crónicas no transmisibles como ser las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, DT2, etc. (Pérez-Jiménez y col., 2010). Sus propiedades beneficiosas son atribuidas a múltiples funciones bioactivas (antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, etc.), las cuales dependen de la cantidad de compuesto consumido. Sin embargo, la bioaccesibilidad y biodisponibilidad del AF presente en forma esterificada en las matrices vegetales, regulan su bioeficacia (Goderska y col., 2008).

La biodisponibilidad se refiere a la proporción de un compuesto ingerido, que puede ser digerido, absorbido y metabolizado, alcanzando la circulación

sistémica y ejerciendo el efecto que le sea propio (Holst, y Williamson, 2008). En este sentido, las FE juegan un importante rol en la hidrólisis de las uniones ésteres y la posterior liberación del AF, constituyendo así un paso fundamental requerido para la biodisponibilidad y metabolismo del mismo.

En roedores, la actividad FE total del intestino está dada por la actividad de la microbiota y también por la actividad de las células epiteliales (Andreasen y col., 2001a, Abeijón Mukdsi y col., 2012). A pesar de ello, Filannino y col. (2018) afirman que las FE bacterianas presentes en el colon son las principales responsables de incrementar la biodisponibilidad de los AH en humanos.

Cuando el AF es ingerido en la dieta como fibra, el 90% del mismo alcanza el colon en forma de hidroxicinamatos (ferulatos). La microbiota colónica es el principal responsable de la liberación de AH a partir de sus formas conjugadas, como consecuencia de la ruptura de los enlaces ésteres por acción de las FE (Couteau y col., 2001).

En estudios previos realizados por Abeijón Mukdsi y col., (2012) se evaluó la actividad FE en mucosa y contenidos de intestino delgado y grueso de ratones alimentados con DC y suplementados con BL con actividad FE. Entre todas las fracciones intestinales evaluadas, el mayor incremento de actividad FE se detectó en contenido de intestino grueso. Por tal motivo, en la presente tesis se decidió evaluar la actividad FE en contenidos de colon.

La administración de las BL a los ratones alimentados con DRG+s (grupos SM+Lf y SM+Lj) provocó un aumento significativo de la actividad FE del contenido de intestino grueso en comparación con el grupo SM, sin alcanzar los valores del control. Estos resultados indicarían que *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 podrían incrementar la biodisponibilidad de AF a partir del salvado de trigo de la dieta a nivel del colon, para ser posteriormente metabolizado y absorbido, ejerciendo así sus efectos beneficiosos.

*-Metabolitos del AF*

El metabolismo del AF por las enzimas de la microbiota intestinal resulta en la producción de compuestos bioactivos que pueden ser absorbidos y vehiculizados al hígado (Pekkinen y col., 2014). En un principio el AF es reducido a ácido dihidroferúlico (DHF), el cual es posteriormente desmetilado, transformándose en ácido dihidroxifenilpropiónico (DHPPA). El DHPPA sufre una deshidroxilación generando ácido hidroxifenilpropiónico (HPPA), y finalmente después de otra etapa de deshidroxilación y  $\beta$ -oxidación se transforma en ácido benzoico (AB). Estos metabolitos intermediarios pueden ser absorbidos y pasar al torrente sanguíneo, o parte de ellos pueden ser excretados en las heces. Se ha demostrado que los compuestos fenólicos bioactivos alcanzan bajas concentraciones en el plasma (en el orden de los  $\mu\text{g}$ ), por lo que se destaca el papel de la microbiota en el metabolismo de los mismos (Williamson, 2013). Además, los compuestos absorbidos pueden metabolizarse en el hígado a través de la fase I del metabolismo de los xenobióticos o conjugarse directamente con sulfato, ácido glucurónico o aminoácidos como la glicina para ser excretados en la orina (fase II) (Pekkinen y col., 2014).

Con la finalidad de corroborar si la administración de las BL tiene efecto sobre la liberación de AF y la producción de sus metabolitos, se decidió evaluar la presencia de estos compuestos en contenidos de colon. En los 4 grupos de ratones no se detectó AF ni AB. En cambio, sí se detectó DHF, DHPPA y HPPA. El HPPA fue el más abundante, principalmente en ratones de los grupos control, SM+Lf y SM+Lj. Estos resultados indicarían que el AF estuvo disponible y fue metabolizado, transformándose en cada uno de los compuestos mencionados, lo cual tiene concordancia con la mayor actividad FE intestinal observada en los grupos control, SM+Lf y SM+Lj. Similarmente, Duncan y col. (2016) encontraron HPPA como el principal metabolito derivado del AF al evaluar la fermentación de salvado de trigo por heces humanas. Estos autores, basados en estudios metagenómicos, informaron que el salvado de trigo promueve un enriquecimiento en bacterias productoras de ácido butírico con capacidad de liberar AF de la fibra (es decir, con actividad FE). De

esta manera, postularon que el incremento de bacterias productoras de ácido butírico y liberadoras de AF durante la degradación del salvado de trigo podría explicar los efectos beneficiosos para la salud atribuidos a las fibras de este cereal.

#### -Producción de AGCC

Los AGCC son producidos por la microbiota en el colon a partir de la fibra dietaria por un proceso de fermentación. Por lo tanto, la composición de AGCC depende de la composición de la microbiota intestinal y del tipo de sustrato fermentado (Nishitsuji y col., 2017).

Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron en el grupo SM una disminución de la concentración de los AGCC con respecto al grupo control, lo cual indicaría una menor actividad metabólica en los animales con SM. La administración de las BL a los ratones alimentados con DRG+s (grupos SM+Lf y SM+Lj) incrementó la producción de AGCC. La suplementación con *L. fermentum* CRL1446 provocó un aumento de la concentración de ácido butírico con respecto al grupo SM, mientras que los animales que recibieron *L. johnsonii* CRL1231 mostraron un incremento de los tres AGCC evaluados.

El tipo y concentración de AGCC producido por la microbiota intestinal es importante para el desarrollo o prevención de la obesidad y el SM (David y col., 2014; Zhang y col., 2010). Los AGCC más abundantes en el colon son los ácidos acético, propiónico y butírico, los cuales se encuentran normalmente en una relación molar que puede ir desde 3:1:1 hasta 10:2:1 (Rowland y col., 2018). Estos tres AGCC juegan un importante rol en el organismo. El acetato es utilizado para el crecimiento de algunas bacterias, para la síntesis de colesterol y en la lipogénesis; recientes estudios realizados en ratones informaron que interviene en la regulación del apetito (Frost y col., 2014). El propionato es una fuente de energía para las células epiteliales e interviene directamente en la gluconeogénesis intestinal, promueve la homeostasis energética reduciendo la producción de la glucosa hepática, y en consecuencia reduce la adiposidad (De Vadder y col., 2014). El

butirato constituye una fuente de energía clave para los colonocitos humanos; también hay evidencia de que el butirato puede activar la gluconeogénesis intestinal a través de un mecanismo dependiente de AMPc con efectos beneficiosos sobre el control de la glucosa y la homeostasis energética (De Vadder y col., 2014). Asimismo, se informó que el butirato y el acetato protegen contra la obesidad inducida por la dieta sin suprimir la ingesta de alimento (Yamashita y col., 2007; Gao y col., 2009). Se ha demostrado que la suplementación con butirato previene y revierte la RI en ratones obesos alimentados con dietas altas en grasas (Gao y col., 2009). En un estudio clínico, Vrieze y col. (2012) mostraron que el trasplante de microbiota intestinal de donantes normopesos sanos a recipientes con SM mediante sonda naso-duodenal mejoró la sensibilidad a la insulina. Los autores asocian este mejoramiento al aumento de las concentraciones intestinales de bacterias productoras de butirato y de este AGCC, el cual podría regular el metabolismo glucídico y lipídico estimulando el eje intestino-cerebro-hígado a través del sistema nervioso entérico. Brinkworth y col. (2009) informaron una disminución del volumen de heces y de AGCC (sobre todo butirato) en sujetos obesos que consumieron una dieta rica en grasas y baja en carbohidratos comparados con sujetos obesos que consumieron dieta baja en grasas y enriquecida en carbohidratos y fibras.

#### -Microbiota intestinal (MI)

El complejo y dinámico ecosistema microbiano intestinal contribuye al metabolismo de diversos compuestos provenientes de la dieta, produciendo numerosos metabolitos. Como se ha mencionado anteriormente, la producción de metabolitos específicos, como los AGCC, guarda un estrecho vínculo con la homeostasis energética del hospedador (Bäckhed y col., 2004; Turnbaugh y col., 2006). Por tal motivo, se ha sugerido que la modificación de la microbiota intestinal por la administración de BL específicas podría tener influencia sobre parámetros metabólicos, ya sea para contrarrestar o favorecer los efectos de la dieta.

En los mamíferos, los organismos que componen la microbiota son determinados por los tipos de fuentes nutricionales, siendo diferentes los perfiles de omnívoros, carnívoros y herbívoros (Ley y col., 2008). Las características de la dieta, junto con los factores genéticos, influyen en el predominio de unos microorganismos sobre otros (Duncan y col., 2008). Después de tan solo un día de dieta de tipo occidental (alta en grasa y azúcar y baja en polisacáridos de las plantas), los ratones muestran cambios en su composición microbiana y en sus vías metabólicas, y en 2 semanas desarrollan mayor adiposidad (Turnbaugh y col., 2009). La abundancia o escasez de alimento determinaría la presencia o no de ciertas especies bacterianas que se reproducen cuando hay disponibilidad ilimitada de alimentos, o de especies más eficientes cuando los nutrientes son escasos (Mai, 2004; Duncan y col., 2008). Los ratones sometidos a dietas de tipo occidental ricas en grasas, muestran un incremento de *Firmicutes* y una disminución de *Bacteroidetes* (Turnbaugh y col., 2009).

El empleo de bacterias probióticas para modular la MI de ratones obesos es una estrategia usada en investigaciones durante las últimas décadas (Sanz y col., 2010 y 2014).

Los estudios iniciales realizados en este trabajo de tesis sobre algunos de los principales géneros bacterianos en heces de ratones, mostraron que los lactobacilos y enterobacterias fueron afectados por la administración de DRG+s, observándose incrementos significativos de ambos géneros en el grupo SM con respecto al control. La administración de *L. fermentum* CRL1446 modificó la abundancia de lactobacilos y enterobacterias en comparación con el grupo SM, viéndose restaurados los valores del control; entre tanto, la administración de *L. johnsonii* CRL1231 no indujo cambios significativos en los animales con respecto al grupo SM. En cuanto a las bifidobacterias, no se observaron variaciones estadísticamente significativas en ninguno de los grupos evaluados.

Numerosos estudios realizados en los últimos años han tratado de dilucidar la compleja interrelación entre MI y obesidad en el ser humano. Si bien estos

estudios han confirmado la existencia de disbiosis (alteración de la MI) en los obesos, aún no existe un consenso acerca de las poblaciones bacterianas responsables del desarrollo de la obesidad (Neish, 2009; Morales y col., 2010; Shen y col., 2013).

Se ha descrito una microbiota de «tipo obeso», asociada al exceso de peso y al SM, con un incremento de la razón Firmicutes/Bacteroidetes (Raoult, 2008). Además se ha sugerido que las bifidobacterias y los bacteroides parecen ser protectores contra el desarrollo de la obesidad (Ley y col., 2006). Otros autores han encontrado aumento de *Lactobacillus* en ratones obesos/diabéticos (Nishitsuji y col., 2017).

Aunque son numerosos los trabajos que indican que la obesidad está asociada con un descenso de bifidobacterias (Duncan y col., 2007; Brinkworth y col., 2009; Cani y Delzenne, 2011), otras investigaciones han mostrado que la administración dietaria de prebióticos como la oligofructosa, estimula el crecimiento de las poblaciones gram-positivas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en el colon de ratones obesos (Cani y col., 2009; Gotteland, 2013). En el presente trabajo, la administración de DRG+s no mostró influencia significativa sobre la población de bifidobacterias; sin embargo, puede destacarse en el grupo SM una tendencia a mayores proporciones de este género. La administración de BL con actividad FE no indujo modificaciones en este modelo; no obstante, estudios previos han informado un efecto bifidogénico de *L. fermentum* CRL1446 en modelos animales normales (Abeijón Mukdsi y col., 2012) y de restricción calórica (Russo y col., 2016; Fabersani y col., 2018).

El impacto del contenido en grasa de la dieta sobre la MI y el desarrollo de inflamación de bajo grado ha sido estudiado en profundidad por Cani y col. (2007). Estos autores demostraron que la administración de una dieta alta en grasas a ratones durante 14 semanas altera su MI, aumentando las bacterias Gram-negativas a expensas de las Gram-positivas. Kim y col. (2012) observaron un aumento de las enterobacterias en la MI de ratones alimentados con una dieta hipergrasa. Estos

resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo, donde se observó un incremento de enterobacterias en el grupo SM.

Karlsson y col. (2013) caracterizaron el metagenoma bacteriano fecal en mujeres diabéticas y encontraron que la menor abundancia de Clostridia productoras de butirato (*Roseburia intestinalis* y *Faecalibacterium prausnitzii*) era altamente discriminante de DT2, destacando además un enriquecimiento en *Lactobacillus gasseri*. Si bien en el presente trabajo de investigación no se determinó la proporción de *Clostridium*, se pudo observar una disminución de butirato en los contenidos intestinales del grupo SM, y un incremento en los grupos que recibieron las cepas (SM+Lf y SM+Lj).

Existe una estrecha relación entre la composición de la microbiota, la actividad FE intestinal, los metabolitos derivados del AF, los AGCC y la hidrólisis de la fibra contenida en el alimento. Los resultados obtenidos sugieren que los animales alimentados con DRG+s que recibieron conjuntamente *L. fermentum* CRL1446 o *L. johnsonii* CRL1231 hidrolizaron de manera más eficiente la fibra de salvado, de manera que el estado metabólico de estos ratones mejoró con respecto a sus pares con SM que no recibieron las cepas de BL.

#### -Estado oxidativo

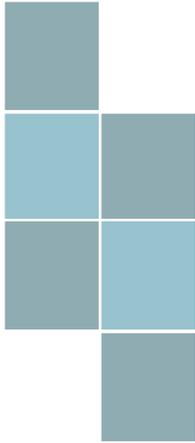
La suplementación de la dieta con BL con actividad FE favorece esta actividad enzimática intestinal, lo cual genera un incremento del metabolismo de los AH. Una de las principales propiedades del AF es su capacidad antioxidante. En estudios previos se observó que la administración oral de *L. fermentum* CRL1446 a ratones alimentados con DC y con una dieta restringida en calorías mejoró el estado oxidativo de los ratones (Abejón Mukdsi y col., 2012; Russo y col., 2016).

En este trabajo de tesis se evaluó el estado oxidativo de los animales alimentados con DRG+s, determinando los lipoperóxidos en plasma y las actividades enzimáticas GPx y GR en hígado. La GPx pertenece a una familia de isoenzimas que constituye uno de los principales sistemas de defensa antioxidante; utiliza glutatión

reducido (GSH) para degradar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La enzima GR contribuye a la regeneración de GSH a partir de glutatión oxidado, particularmente cuando la célula está expuesta a radicales libres, mejorando así el estado oxidativo del hospedador. Los resultados obtenidos mostraron a las 14 semanas de estudio, altos niveles de lipoperóxidos plasmáticos y bajas actividades GPx y GR en los ratones del grupo SM con respecto al grupo control. Cuando se administraron las BL junto con la DRG+s (grupos SM+Lf y SM+Lj) los niveles de lipoperóxidos disminuyeron y las actividades GPx y GR incrementaron en comparación con el grupo SM. Estos resultados indican que las BL con actividad FE son capaces de mejorar el estado oxidativo en el modelo murino de SM.

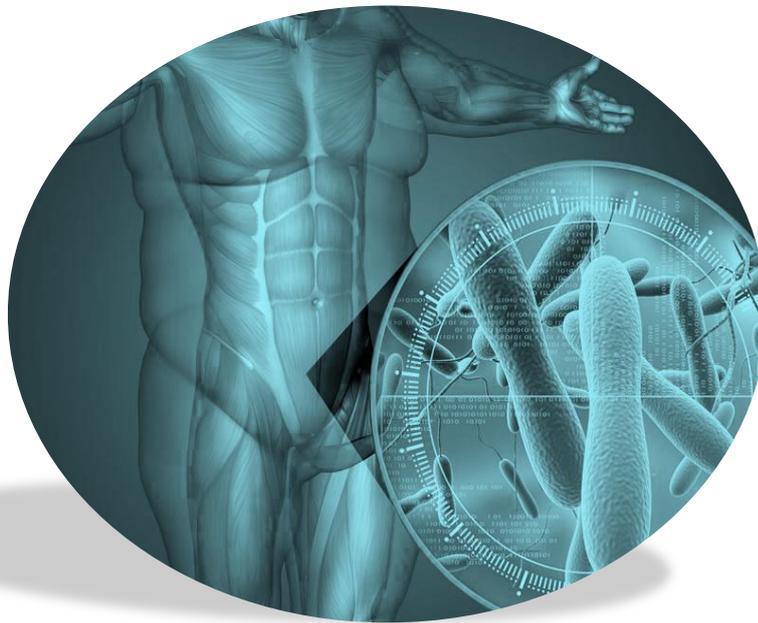
El AF muestra una alta actividad antioxidante *in vitro*; sin embargo, su efecto biológico *in vivo* es cuestionable debido a su bajo grado de absorción y rápido metabolismo dentro del hospedador (Ozgen y col., 2012). Rondini y col. (2004) demostraron que el suministro de AF a ratas, no como ácido libre sino en su forma acomplexada en un producto natural como el salvado de trigo, aumenta el tiempo de vida media en plasma del mismo, con lo cual mejora su disponibilidad. En general el AF administrado en su forma libre es rápidamente absorbido y conjugado en el hígado (Zhao y col., 2004). Recientes estudios informaron que la administración de oligosacáridos ferulados a ratas con DT2 mejoró de manera más efectiva el perfil lipídico de estos animales en comparación con el AF libre (Huang y col., 2018). La incorporación de BL con actividad FE en la dieta podría ser una estrategia para aumentar la biodisponibilidad de AF en el intestino, de manera que el mismo sea liberado gradualmente por hidrólisis enzimática, ejerciendo sus efectos beneficiosos en individuos con riesgo de padecer SM.

En conclusión, los resultados obtenidos mostraron que la administración oral de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 incrementó la actividad FE intestinal mejorando los marcadores bioquímicos del SM y el estado oxidativo de ratones alimentados con DRG+s durante 14 semanas, con lo cual el empleo de estas BL con actividad FE representa una estrategia nutricional prometedora para la prevención del SM.



# CAPÍTULO IV

## ESTUDIOS TECNOLÓGICOS PRELIMINARES: MICROENCAPSULACIÓN



En el presente capítulo se realizó el abordaje del siguiente objetivo específico:

- OE3- Estandarizar un modelo experimental de SM inducido por una dieta rica en grasa en ratones.

## CAPÍTULO IV

### ESTUDIOS TECNOLÓGICOS PRELIMINARES: MICROENCAPSULACIÓN

#### IV.1- Microencapsulación de bacterias lácticas con actividad FE

Los microorganismos probióticos suelen presentar una alta susceptibilidad frente a ciertos tratamientos tecnológicos cuando son incorporados en alimentos o biofármacos; además, su almacenamiento (vida de estante) y la resistencia a las condiciones gastrointestinales representan en algunos casos un desafío. Esta situación hace necesario aplicar tecnologías que favorezcan su viabilidad y estabilidad, manteniéndose fisiológicamente activos al momento del consumo, confiriendo así los beneficios que prometen.

Las cepas *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 fueron sometidas a un proceso de **secado por atomización (*Spray Drying*)**. Las condiciones del secado se ajustaron para asegurar la menor pérdida de viabilidad y la conservación de la actividad FE. La matriz utilizada como material cobertor, compuesta por alginato de sodio, inulina y maltodextrina (1, 15, 10% p/v, respectivamente) permitió obtener temperaturas de  $80\pm 5^{\circ}\text{C}$  en el aire de salida del secador, con un flujo de alimentación de 5 mL/min. Los polvos obtenidos presentaron una humedad residual menor al 3% (p/v) en todos los casos y fueron de fácil disolución en agua destilada a temperatura ambiente. Estos polvos constituyen la forma "macroscópica" de las microcápsulas, ya que se hallan conformados por las bacterias lácticas (BL) recubiertas por la matriz encapsulante.

## IV.2- Evaluación de la viabilidad de las BL

### IV.2.1- Viabilidad de las cepas antes y después del secado

Se evaluó la resistencia de las 3 cepas de BL al proceso de *Spray Drying*. En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas entre el número de células viables antes y después del secado, indicando que *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 son capaces de resistir a este proceso tecnológico manteniendo su viabilidad (Tabla 18).

Tabla 18: Resistencia de las cepas al proceso de secado por atomización

Cepa	Log UFC/mL antes del secado	Log UFC/g después del secado
<i>L. acidophilus</i> CRL 1014	9,28 ± 0,04 <sup>a</sup>	9,23 ± 0,05 <sup>a</sup>
<i>L. fermentum</i> CRL1446	8,77±0,10 <sup>a</sup>	8,80±0,14 <sup>a</sup>
<i>L. johnsonii</i> CRL 1231	9,72 ± 0,01 <sup>a</sup>	9,35 ± 0,07 <sup>a</sup>

Los resultados se expresan como Log UFC/mL de matriz cobertora o Log UFC/g de polvo. Los datos representan la media ± DS (desvío estándar). La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores en la misma fila con la misma letra en superíndice no difieren significativamente.

### IV.2.2- Viabilidad durante el almacenamiento de las microcápsulas

Los polvos fueron almacenados a 4°C y se evaluó la viabilidad de las cepas microencapsuladas hasta los 9 meses (Figura 37). Los resultados mostraron que *L. acidophilus* CRL1014 tuvo una significativa pérdida de viabilidad, mientras que *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 experimentaron un descenso más leve, manteniendo los valores por arriba de  $10^7$  UFC/g hasta el final del período evaluado.

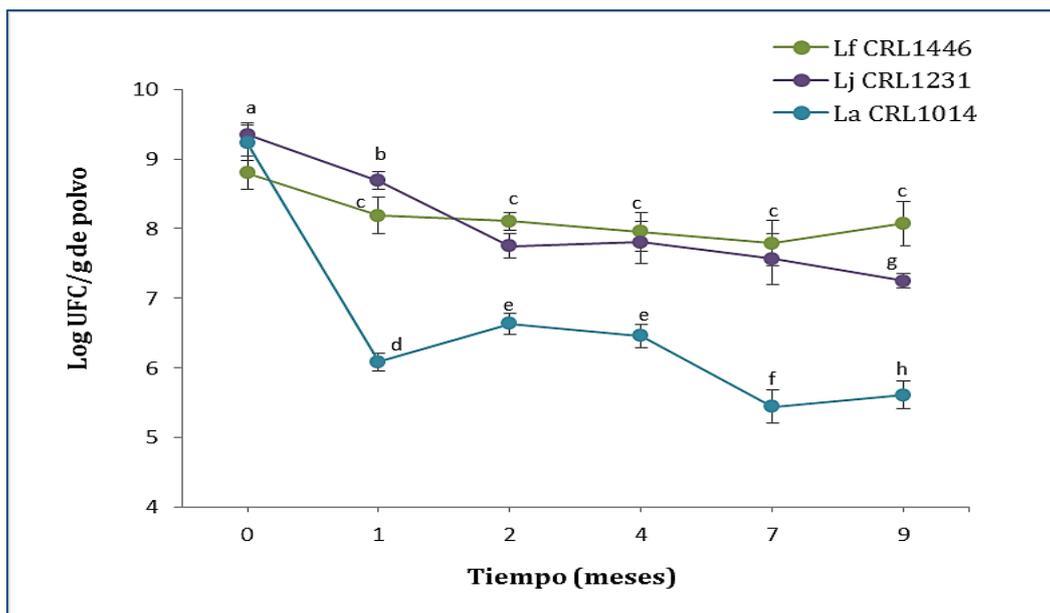
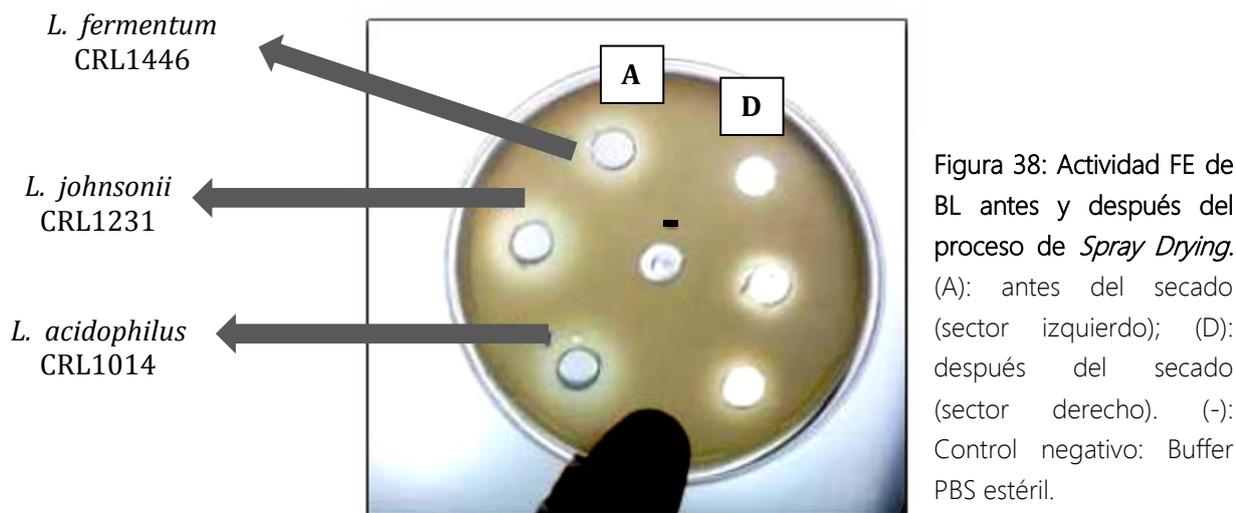


Figura 37: Viabilidad de BL microencapsuladas almacenadas a 4°C. Los resultados se expresan como Log UFC/g de polvo. Los datos representan la media  $\pm$  DS (desvío estándar)  $n=3$ . La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores con letras distintas difieren significativamente.

### IV.3- Evaluación de la actividad FE

#### IV.3.1- Detección de actividad FE de BL antes y después del secado

Se evaluó la presencia de actividad FE en medio MRS agar sin glucosa adicionado de EtF (Figura 38). En todos los casos se observaron halos de aclaramiento alrededor de los pocillos con polvos reconstituidos, demostrando que *L. acidophilus* CRL 1014, *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 mantienen la actividad FE tras el proceso de secado.



#### IV.3.2- Determinación de actividad FE en microcápsulas almacenadas a 4°C

Se determinó cuantitativamente la actividad FE de las cepas microencapsuladas hasta los 9 meses de almacenamiento (Figura 39). Los resultados mostraron que la actividad enzimática se mantuvo estable a lo largo del tiempo en las 3 cepas evaluadas, observándose leves aumentos de la actividad específica FE (a medida que la viabilidad celular disminuye). La actividad específica de *L. fermentum* CRL1446 fue más baja comparada con la de *L. acidophilus* CRL1014 y *L. johnsonii* CRL1231.

En el caso del polvo utilizado como control (matriz sin inocular) no se detectó actividad FE.

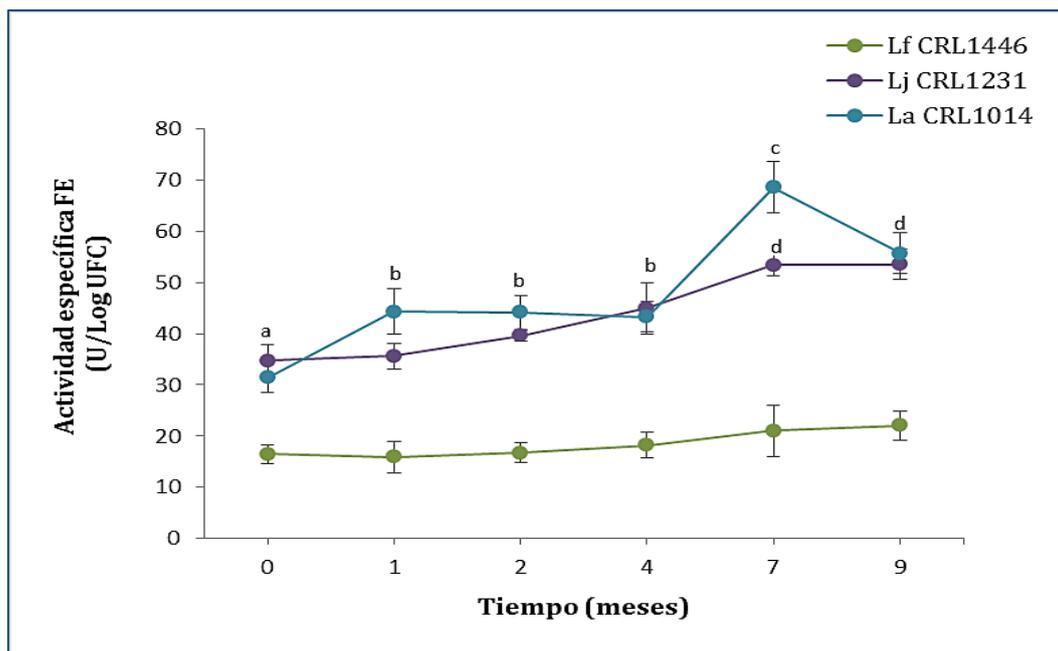


Figura 39: Actividad específica FE de BL microencapsuladas almacenadas a 4°C.

La actividad específica se expresó como U/Log UFC, en donde U =  $\mu\text{mol}$  de AF liberado por hora. Los datos representan la media  $\pm$  DS (desvío estándar)  $n=3$ . La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p<0,05$ . Valores con letras distintas difieren significativamente.

#### IV.4- Resistencia de las bacterias microencapsuladas a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal (TGI)

Para evaluar la resistencia de las 3 cepas de BL microencapsuladas a la digestión gastrointestinal, se determinó la viabilidad celular (Log UFC/g de polvo) antes y después de las incubaciones secuenciales en JG y JI simulados (Tabla 19).

En presencia de JG pH 3 y pH 4, se observó que *L. fermentum* CRL1446 fue la cepa más resistente (disminución de recuentos de 1 unidad logarítmica a pH 3 y sin modificaciones significativas a pH 4). La mayor pérdida de viabilidad fue observada en *L. acidophilus* CRL1014 (disminución de 3 y 1,5 unidades logarítmicas a pH 3 y pH 4, respectivamente). *L. johnsonii* CRL1231, por su parte, mostró mayor resistencia que *L. acidophilus* CRL1014 (disminución de 2 y 0,5 unidades logarítmicas a pH 3 y pH 4, respectivamente).

Cuando las microcápsulas sometidas al JG pH 3 y pH 4 fueron expuestas al JI simulado por 2 h, se observó que solo la viabilidad de *L. acidophilus* CRL1014 fue afectada (disminución de 0,5 unidades logarítmicas), mientras que los recuentos de células viables de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 no se vieron alterados.

Adicionalmente, se pudo comprobar que las cepas microencapsuladas fueron más resistentes que las cepas libres cuando se expusieron a las condiciones simuladas del TGI, es decir que el proceso de microencapsulación permitió una mayor supervivencia de las BL estudiadas (Tabla 19).

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta etapa, se decidió evaluar a continuación la funcionalidad *in vivo* de las microcápsulas de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231, dado que las mismas mostraron una menor pérdida de viabilidad durante el almacenamiento a 4°C y una mayor resistencia a la digestión gastrointestinal simulada.

Tabla 19: Resistencia de BL libres y microencapsuladas a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal

Condiciones		Tiempo de incubación (h)	Log UFC/mL o Log UFC/g					
			La CRL1014		Lf CRL1446		Lj CRL1231	
			Libre	Encapsulada	Libre	Encapsulada	Libre	Encapsulada
Jugo Gástrico (JG)	pH3	0	9,13 ± 0,03 <sup>a</sup>	9,23 ± 0,05 <sup>a</sup>	9,28 ± 0,06 <sup>a</sup>	8,80 ± 0,14 <sup>a</sup>	9,20 ± 0,01 <sup>a</sup>	9,35 ± 0,07 <sup>a</sup>
		2	3,69 ± 0,13 <sup>b</sup>	6,50 ± 0,11 <sup>b*</sup>	7,15 ± 0,05 <sup>b</sup>	7,83 ± 0,02 <sup>b*</sup>	5,12 ± 0,03 <sup>b</sup>	7,52 ± 0,05 <sup>b*</sup>
	pH4	0	9,13 ± 0,03 <sup>a</sup>	9,23 ± 0,05 <sup>a</sup>	9,28 ± 0,06 <sup>a</sup>	8,80 ± 0,14 <sup>a</sup>	9,20 ± 0,01 <sup>a</sup>	9,35 ± 0,07 <sup>a</sup>
		2	4,78 ± 0,01 <sup>b</sup>	7,62 ± 0,07 <sup>b*</sup>	8,85 ± 0,01 <sup>b</sup>	8,68 ± 0,04 <sup>a</sup>	6,89 ± 0,05 <sup>b</sup>	8,71 ± 0,07 <sup>b*</sup>
Jugo Intestinal (JI)	Desde JG a pH3	0	3,69 ± 0,13 <sup>a</sup>	6,50 ± 0,11 <sup>a</sup>	7,15 ± 0,05 <sup>a</sup>	7,83 ± 0,02 <sup>a</sup>	5,12 ± 0,03 <sup>a</sup>	7,52 ± 0,05 <sup>a</sup>
		2	2,31 ± 0,01 <sup>b</sup>	5,99 ± 0,15 <sup>b*</sup>	7,10 ± 0,02 <sup>a</sup>	7,76 ± 0,02 <sup>a*</sup>	4,49 ± 0,01 <sup>b</sup>	7,46 ± 0,21 <sup>a*</sup>
	Desde JG a pH4	0	4,78 ± 0,01 <sup>a</sup>	7,62 ± 0,07 <sup>a</sup>	8,85 ± 0,01 <sup>a</sup>	8,68 ± 0,04 <sup>a</sup>	6,89 ± 0,05 <sup>a</sup>	8,71 ± 0,07 <sup>a</sup>
		2	3,87 ± 0,04 <sup>b</sup>	7,15 ± 0,05 <sup>b*</sup>	8,24 ± 0,61 <sup>a</sup>	8,58 ± 0,01 <sup>a*</sup>	6,63 ± 0,21 <sup>a</sup>	8,05 ± 0,03 <sup>b*</sup>

Los datos representan la media ± DS (desvío estándar) n=3. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$  (a-b): Valores en la misma columna (para una misma condición) con superíndices distintos son significativamente diferentes.

(\*) Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a las células libres después de 2 h de incubación en cada condición.

#### IV.5- Administración oral de las microcápsulas en un modelo experimental de SM

Para probar la funcionalidad *in vivo* de las microcápsulas de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231, las mismas se administraron a ratones Albinos Suizos adultos, los cuales fueron alimentados con DRG+s durante 7 semanas. El protocolo experimental fue similar al que se utilizó con las cepas libres, con la diferencia de que en este caso los ratones recibieron diariamente por gavage los polvos resuspendidos en el agua de bebida (polvo control o conteniendo las cepas, según corresponda). La dosis de administración fue  $10^7$  UFC/día/ratón y el período de evaluación fue de 7 semanas.

##### IV.5.1- Efecto de la administración de BL microencapsuladas sobre la ganancia de peso corporal (GPC) y eficiencia alimentaria (EA)

Después de 7 semanas de alimentación con DRG+s, se observó que la GPC de los ratones del grupo SM fue un 58% mayor en comparación con el grupo control que recibió DC. Sin embargo, cuando los ratones alimentados con DRG+s recibieron microcápsulas conteniendo *L. fermentum* CRL1446 (grupo SM+Lf) y *L. johnsonii* CRL1231 (grupo SM+Lj), no hubo diferencias significativas con respecto al grupo control (Figura 40 A).

La EA para los ratones del grupo SM resultó un 70% mayor que para los ratones del grupo control. Por el contrario, los grupos SM+Lf y SM+Lj, mostraron valores de EA similares al grupo control (Figura 40 B).

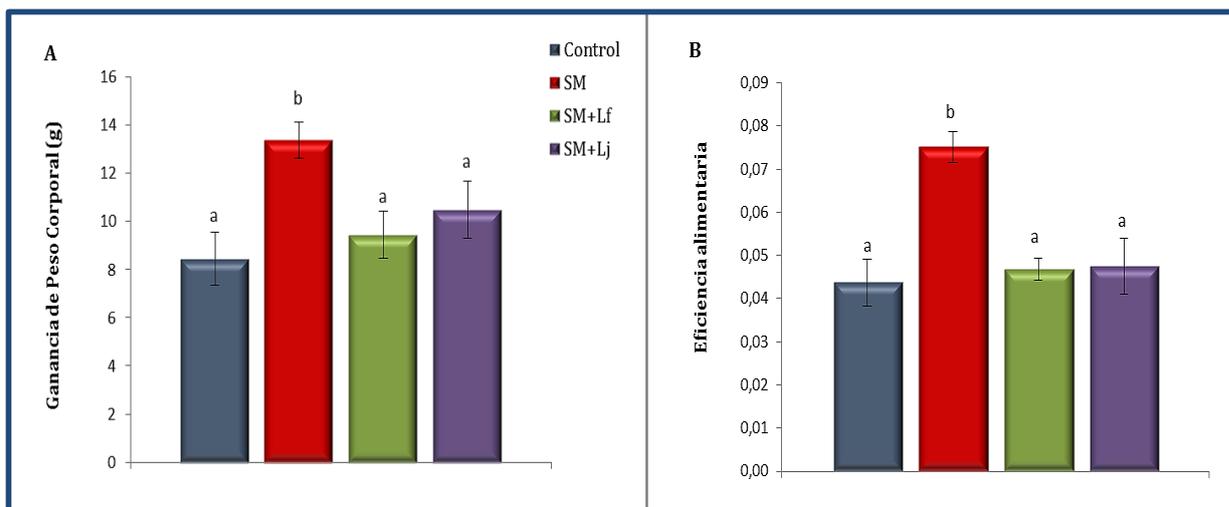


Figura 40: (A) Ganancia de peso corporal, (B) Índice de Eficiencia alimentaria. El índice de eficiencia alimentaria (EA) fue calculado como  $EA = GPC \text{ (g)} / \text{Cantidad de alimento consumido (g)}$ . Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de  $n = 12$  ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores con letras distintas difieren significativamente.

#### IV.5.2- Efecto de la administración de BL microencapsuladas sobre el índice de adiposidad y los niveles de leptina

La acumulación de grasa corporal en los ratones alimentados con DRG+s y microcápsulas vacías fue mayor que en los animales alimentados con DC, lo cual se vio reflejado en el incremento significativo del índice de adiposidad del grupo SM con respecto al control. Sin embargo cuando se administraron las microcápsulas de *L. fermentum* CRL1446 y de *L. johnsonii* CRL1231 el índice de adiposidad mostró valores cercanos al control (Tabla 20).

El consumo de DRG+s indujo un aumento de los niveles plasmáticos de leptina en los ratones del grupo SM (10 veces mayor con respecto al grupo control). La suplementación con las BL microencapsuladas modificó el efecto de la DRG+s. Cuando se comparó con el grupo control, el grupo SM+Lf mostró un leve incremento (2 veces) de la concentración de leptina, mientras que no se observaron diferencias estadísticas significativas con el grupo SM+Lj (Tabla 20).

Tabla 20: Índice de adiposidad y niveles de leptina en plasma

	Control	SM	SM+Lf	SM+Lj
Índice de adiposidad (%)	2,46±0,53 <sup>a</sup>	4,55±0,10 <sup>b</sup>	3,23±0,26 <sup>a</sup>	3,53±0,60 <sup>a</sup>
Leptina (ng/mL)	0,43±07 <sup>a</sup>	4,59±0,29 <sup>b</sup>	0,82±0,02 <sup>c</sup>	0,45±0,05 <sup>a</sup>

Los datos representan la media ± ES (error estándar) de n= 12 ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores con letras superíndices distintas difieren significativamente.

#### IV.5.3- Efecto de la administración de BL microencapsuladas sobre la acumulación de grasa en el hígado

Los estudios histológicos revelaron una estructura normal del parénquima hepático en los ratones del grupo control (Figura 41 A). Se observaron hepatocitos con microvesículas de grasa y núcleos colocados centralmente en los ratones del grupo SM (Figura 41 B). Los animales de los grupos SM+Lf y SM+Lj mostraron una menor acumulación de gotas lipídicas en comparación con los ratones del grupo SM (Figuras 41 C y D).

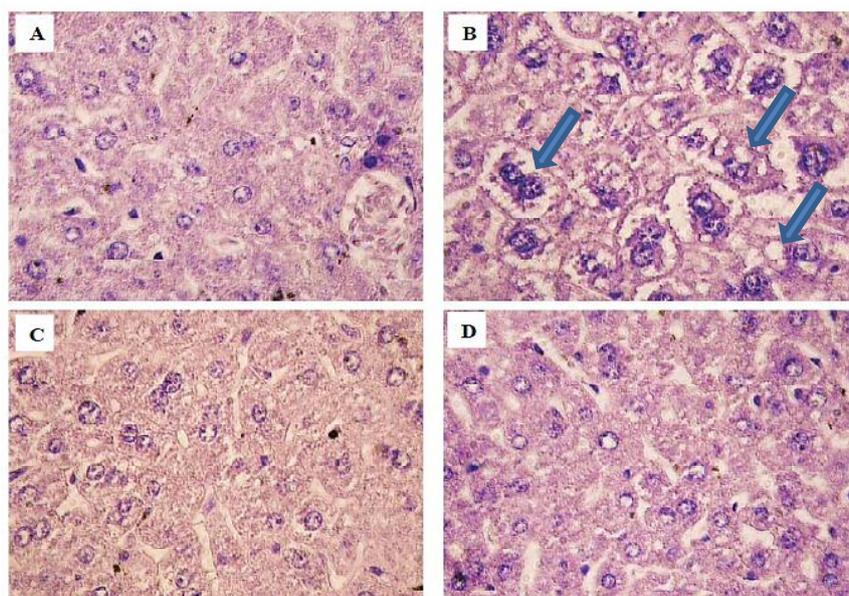


Figura 41: Fotomicrografías representativas de cortes histológicos de hígado de ratones teñidos con hematoxilina-eosina y capturadas con magnificación 1000x. (A) Grupo control (B): Grupo SM (C): Grupo SM+Lf (D): Grupo SM+Lj. Las flechas señalan algunas alteraciones del grupo SM (gotas lipídicas y binucleación).

#### IV.5.4- Efecto de la administración de BL microencapsuladas sobre el perfil lipídico e índices de riesgo cardiovascular

Los resultados mostraron un perfil lipídico alterado en los ratones de todos los grupos alimentados con DRG+s (Figura 42).

Los niveles de colesterol total en el grupo SM aumentaron un 41% con respecto al grupo control. Cuando se administraron las microcápsulas conteniendo *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231, el incremento fue mucho menor (10% y 17%, respectivamente) (Figura 42 A).

Las concentraciones de HDL-colesterol, en comparación con el grupo control, disminuyeron un 30% en el grupo SM y 15% en el grupo SM+Lf, mientras que el grupo SM+Lj no mostró diferencias (Figura 42 B). En cuanto a los niveles de LDL-colesterol, también sufrieron alteraciones; en el grupo SM se observó un aumento de 56%, mientras que en los grupos que recibieron las BL microencapsuladas este aumento fue de solo 27% (Figura 42 C).

Los valores de TG en plasma fueron un 45% más elevados en los ratones del grupo SM con respecto al grupo control. Se observó un aumento más leve para los grupos SM+Lf y SM+Lj (20 y 27% respectivamente) (Figura 42 D).

La Tabla 21 muestra los distintos indicadores de riesgo cardiovascular, calculados con los valores de lípidos en plasma. El grupo SM mostró en todos los casos valores significativamente más altos que el grupo control. Los grupos SM+Lf y SM+Lj también mostraron índices mayores que el grupo control, pero estos valores fueron siempre menores que en el grupo SM que no recibió las BL microencapsuladas.

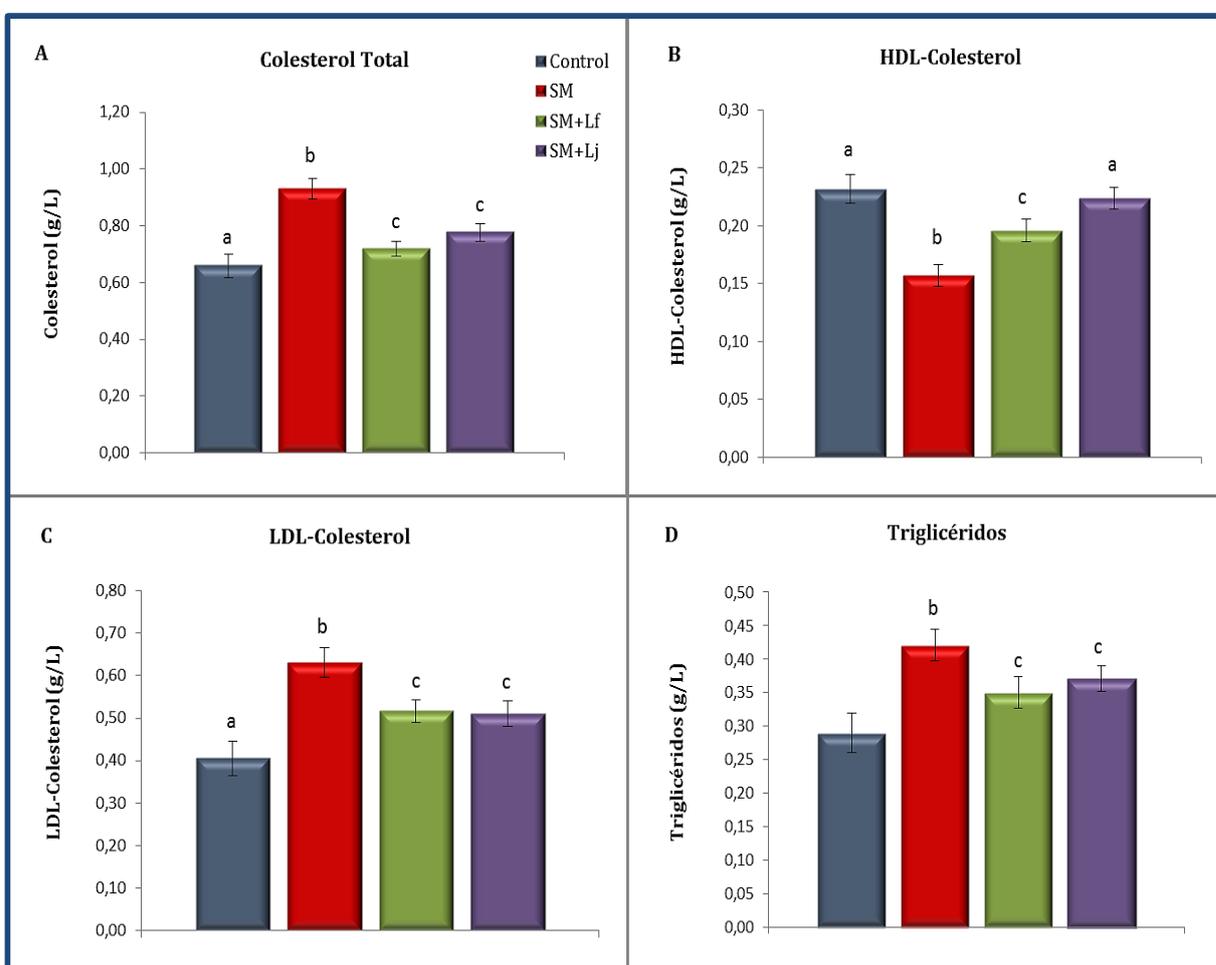


Figura 42: Perfil lipídico de ratones. (A) Niveles plasmáticos de colesterol total (g/L), (B) Niveles plasmáticos de HDL-colesterol (g/L), (C) Niveles plasmáticos de LDL-colesterol (g/L), (D) Niveles plasmáticos de triglicéridos (g/L). Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de  $n=12$  ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores con letras distintas difieren significativamente.

Tabla 21: Índices de riesgo cardiovascular

	Control	SM	SM+Lf	SM+Lj
IA	1,84±0,17 <sup>a</sup>	4,56±0,23 <sup>b</sup>	2,87±0,15 <sup>c</sup>	2,46±0,14 <sup>d</sup>
LDL/HDL	1,73±0,04 <sup>a</sup>	3,74±0,02 <sup>b</sup>	2,80±0,04 <sup>c</sup>	2,23±0,01 <sup>d</sup>
TG/HDL	1,26±0,09 <sup>a</sup>	2,47±0,12 <sup>b</sup>	1,88±0,25 <sup>c</sup>	1,69±0,10 <sup>c</sup>
IAP	0,10±0,03 <sup>a</sup>	0,39±0,05 <sup>b</sup>	0,27±0,02 <sup>c</sup>	0,22±0,03 <sup>c</sup>

Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de n= 12 ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores con letras superíndice distintas difieren significativamente. Índice de aterogenicidad (IA) = (Colesterol total - HDL)/ HDL. Índice de aterogenicidad de plasma (IAP) = Log (TG/HDL).

#### IV.5.5- Prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG)

La tolerancia a la glucosa se determinó a las 7 semanas en el grupo control y los 3 grupos experimentales (Figura 43). Los niveles de glucosa en sangre después de la sobrecarga oral fueron mayores en los ratones del grupo SM con respecto al control, mientras que los grupos SM+Lf y SM+Lj no mostraron diferencias estadísticamente significativas con los ratones normales. Se observó que los animales alimentados con DRG+s (grupo SM) mostraron dificultad para reestablecer los niveles basales de glucosa, mientras que aquellos que fueron alimentados con esta misma dieta pero que además recibieron las BL con actividad FE microencapsuladas, tuvieron un comportamiento que se asemejó más al grupo control, con concentraciones de glucosa en sangre inferiores a 200 mg/dL al cabo de las 2 h. En consecuencia, el grupo SM fue el único que mostró un incremento significativo del área bajo la curva.

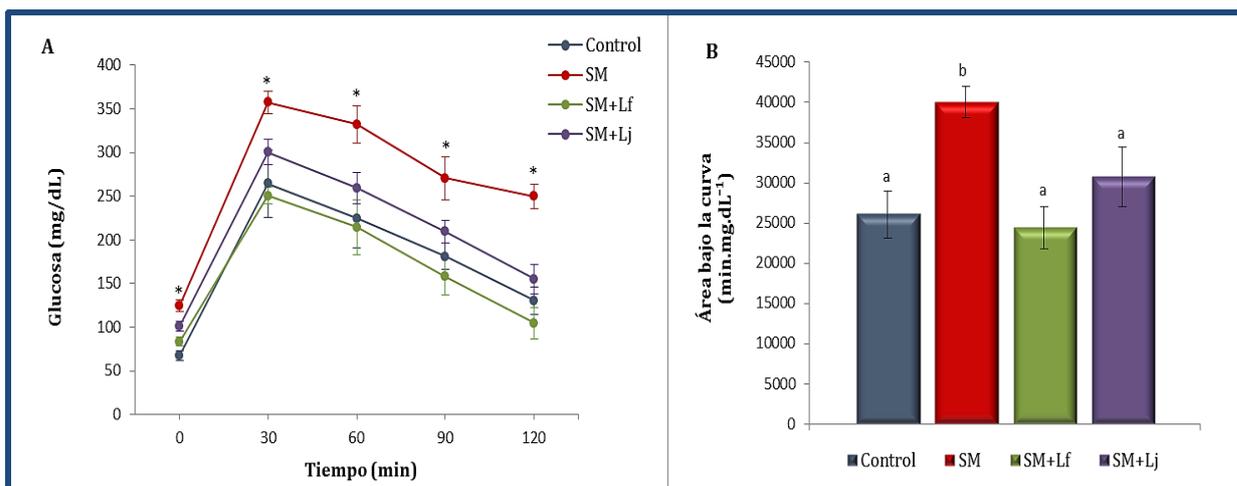


Figura 43: (A) Curvas de tolerancia a la glucosa, (B) Áreas bajo la curva. Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de  $n=12$  ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p<0,05$ . En la figura A los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticas con respecto al grupo control. En la figura B valores con letras distintas difieren significativamente.

#### IV.5.6- Efecto de la administración de BL microencapsuladas sobre los niveles de glucosa e insulina en ayunas

Los resultados mostraron que la concentración plasmática de glucosa en ayunas aumentó un 70% en el grupo SM con respecto al control. La administración de las microcápsulas de *L. fermentum* CRL1446 y de *L. johnsonii* CRL1231 redujo los niveles de glucosa a valores similares a los del grupo control en los ratones alimentados con DRG+s (Tabla 22).

La concentración de insulina en plasma se vio incrementada un 38% en el grupo SM en comparación con el control. Estos elevados niveles de insulina en los animales que consumieron DRG+s se vieron reducidos cuando se suministraron las microcápsulas conteniendo los lactobacilos, siendo los valores alcanzados con *L. fermentum* CRL1446 semejantes a los observados en el grupo control (Tabla 22).

Los valores elevados del índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) en el grupo SM indicaron que el consumo de DRG+s durante 7 semanas indujo RI en los ratones. Sin embargo, cuando se administraron las microcápsulas de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 conjuntamente con la DRG+s no se observaron

diferencias estadísticas significativas entre los grupos SM+Lf, SM+Lj y control (Tabla 22).

Tabla 22: Glucemia, Insulina e índice HOMA

	Control	SM	SM+Lf	SM+Lj
Glucosa (mmol/L)	4,05±0,33 <sup>a</sup>	6,92±0,61 <sup>b</sup>	4,61±0,28 <sup>a</sup>	5,05±0,76 <sup>a</sup>
Insulina (µU/mL)	12,21±0,06 <sup>a</sup>	16,90±0,06 <sup>b</sup>	12,93±0,07 <sup>a</sup>	15,58±0,03 <sup>c</sup>
HOMA-IR	2,20±0,89 <sup>a</sup>	5,20±0,08 <sup>b</sup>	2,65±0,37 <sup>a</sup>	3,89±0,88 <sup>a</sup>

Los datos representan la media ± ES (error estándar) de n= 12 ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores con letras superíndice distintas difieren significativamente.

#### IV.5.7- Efecto de la administración de BL microencapsuladas sobre la actividad feruloil esterasa (FE) intestinal

La actividad FE se determinó en los contenidos de intestino grueso de todos los grupos evaluados (Figura 44). La actividad enzimática en el grupo SM fue un 30% menor que en el grupo control. Cuando se administraron las microcápsulas conteniendo *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 no se observó disminución de la actividad FE y los valores se mantuvieron cercanos a los del grupo control.

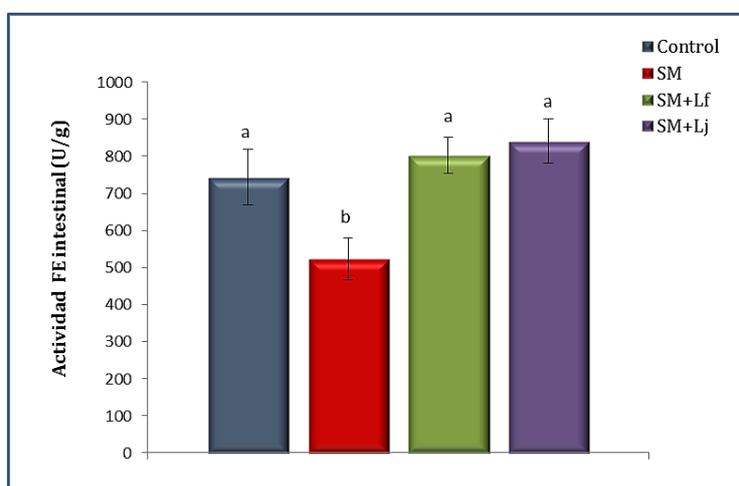


Figura 44: Actividad específica FE determinada en contenidos de intestino grueso. Los datos representan la media ± ES (error estándar) de n= 12 ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores con letras distintas difieren significativamente.

#### IV.5.8- Efecto de la administración de BL microencapsuladas sobre el estado oxidativo de los ratones

Se determinaron las actividades Glutatión Peroxidasa (GPx) y Glutatión Reductasa (GR) en extractos de hígado de los animales de cada grupo experimental y grupo control (Figura 45).

La actividad GPx se redujo significativamente (25%) en los tres grupos de animales que recibieron DRG+s, con respecto a los ratones del grupo control (Figura 45 A).

La actividad GR del grupo SM mostró un descenso de 14% en comparación con el grupo control, pero los grupos SM+Lf y SM+Lj no mostraron diferencias estadísticas significativas (Figura 45 B).

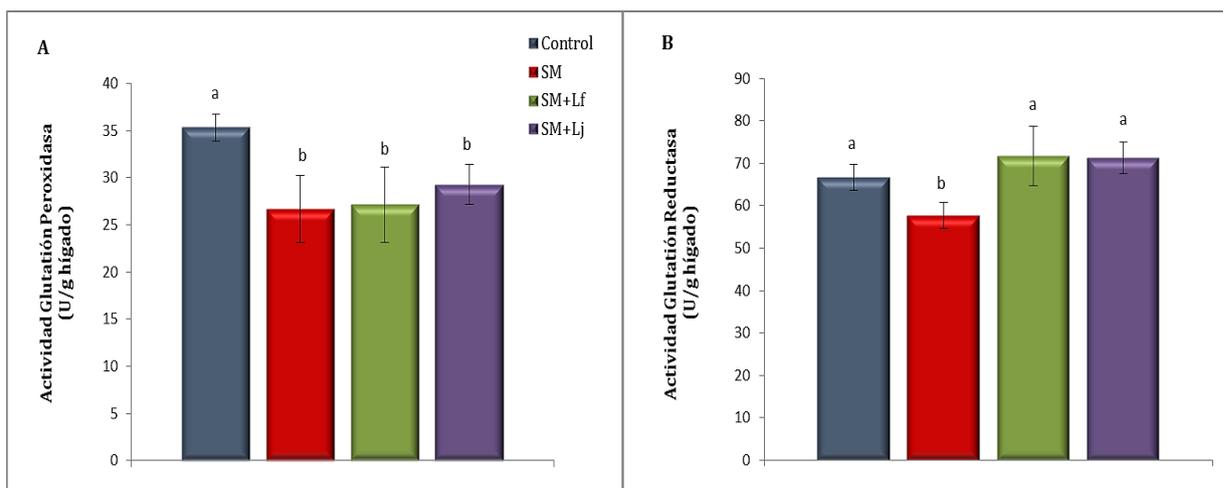


Figura 45: Actividades enzimáticas específicas determinadas a las 7 semanas en extractos de hígado. (A) Glutatión Peroxidasa, (B) Glutatión Reductasa. Los datos representan la media  $\pm$  ES (error estándar) de  $n=12$  ratones. La diferencia estadística fue determinada usando múltiple T test con  $p < 0,05$ . Valores con letras distintas difieren significativamente.

#### IV.6- Discusión

Desde hace un tiempo se ha dado especial atención a la implementación de alimentos funcionales en la dieta como una nueva estrategia de orientación alimentaria para tratar o prevenir distintas patologías.

La búsqueda de diversidad e innovación de productos alimenticios que confieran beneficios a la salud de los consumidores, ha llevado a la industria a investigar métodos que favorezcan la viabilidad de los probióticos frente a factores adversos que reducen su estabilidad durante el procesamiento, almacenamiento y consumo (paso a través del TGI). En este sentido, la microencapsulación se ha convertido en una excelente alternativa tecnológica para incorporar microorganismos en matrices alimentarias que sirvan como vehículos de las cepas probióticas. Es necesario una adecuada selección del método de encapsulación, del material de pared y de la matriz alimenticia para garantizar que los microorganismos probióticos alcancen una concentración  $\geq 10^6$  UFC/g o mL (Rodríguez y col., 2016).

Entre los métodos más comunes para la microencapsulación de probióticos, se encuentra el secado por atomización (Cayra y col., 2017). Esta técnica consiste en atomizar una suspensión que contenga el microorganismo a encapsular y el material de cubierta dentro de una cámara con aire caliente, el cual promueve la evaporación del agua, logrando que los microorganismos queden atrapados dentro del material encapsulante dando lugar a la formación de micropartículas (Lupo-Pasin, y col., 2012). Como la velocidad de secado es relativamente rápida, el daño térmico a los microorganismos es bajo (Izadi y col., 2014). La viabilidad de los microorganismos probióticos sometidos a este proceso depende en gran medida de las temperaturas de entrada y de salida de aire utilizadas, debido al daño que puede ocurrir en la membrana celular. Se dice que temperaturas superiores a 90°C, así como tiempos de exposición al calor prolongados son letales para los mismos. (Peighambardoust y col., 2011; Martín y col., 2015). Varios estudios han reportado la efectividad de esta técnica en la microencapsulación de probióticos, incluyendo BL

(Yonekura y col., 2014; Ilha, y col., 2015) y bifidobacterias (Senaka Ranadheera y col., 2015).

En el caso de los probióticos, para que un material encapsulante sea exitoso, debe propiciar el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos durante y después del proceso de microencapsulación y ser compatible con el sistema alimentario en el que se va a incluir (Kent y Doherty, 2014). Existen varios tipos de materiales de revestimiento para la microencapsulación de probióticos que incluyen principalmente polisacáridos, oligosacáridos, lípidos y proteínas. Dentro de los polisacáridos más utilizados se encuentran agar, carragenina, goma arábiga, dextranos, almidón, celulosa y alginato de sodio (Parra Huertas, 2010). Este último es el material más citado en la literatura como agente encapsulante y es compatible con casi todos los métodos de encapsulación (Kent y Doherty, 2014). Son varios los estudios que han demostrado que la microencapsulación con alginato permite la protección de distintos principios activos y microorganismos probióticos, asegurando su viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos (Pasin y col., 2012) y protegiéndolos de las condiciones ácidas del estómago y la presencia de agentes emulsificantes como las sales biliares en el intestino (Ding y Shah, 2009).

La maltodextrina es un oligosacárido utilizado principalmente como material pared en técnicas de secado por atomización, por su efecto protector frente a altas temperaturas y como agente estimulante del crecimiento de probióticos (Hernández-Carranza y Jiménez-Munguía, 2010; Avila-Reyes y col., 2014; Shokri y col., 2015; Rajam y Anandharamakrishnan, 2015). También se ha demostrado que otros carbohidratos con efecto prebiótico, tales como la inulina, protegen a los probióticos durante la microencapsulación e incrementan su resistencia frente a condiciones gástricas simuladas (Rodríguez-Barona y col., 2012; Krasaekoopt y Watcharapoka, 2014). Distintos estudios sugieren el uso de la inulina como un agente termoprotector que aumenta la supervivencia de los microorganismos después del secado y durante el almacenamiento, debido a que minimiza el estrés

mecánico, oxidativo y osmótico (Rodríguez-Barona y col., 2012; Avila-Reyes y col., 2014).

En el presente trabajo de investigación se utilizó el método de secado por atomización para obtener microcápsulas de *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231, cepas con actividad FE y potencial probiótico. Se empleó como agente de recubrimiento una mezcla de alginato de sodio, inulina y maltodextrina (1, 15 y 10% p/v, respectivamente). Esta combinación de materiales cobertores fue la óptima, ya que su viscosidad permitió ajustar el flujo de alimentación del secador de manera tal que la temperatura del aire de salida no superara los 85°C, lo cual fue conveniente para reducir las pérdidas de viabilidad bacteriana y conservar la actividad FE después del proceso. Además se preparó un polvo control sin el agregado de lactobacilos.

La humedad de los productos deshidratados obtenidos (polvos) en todos los casos fue de 2,5 - 3%. La humedad de los polvos está relacionada con las condiciones de proceso (temperatura de entrada del aire a la cámara de secado y velocidad de alimentación) y con la composición de la matriz encapsulante (Barbosa Cánovas y col., 2005). Varios estudios indican que el contenido de humedad de los polvos y la actividad de agua ( $a_w$ ) deberían ser igual o inferior al 4% y 0,3 respectivamente, para garantizar la estabilidad microbiológica de los polvos (Simpson y col., 2005; Fritzen Freire y col., 2012).

La supervivencia y la viabilidad de los microorganismos después del secado por atomización depende de muchas variables, entre ellas podemos nombrar: tipo de cepa y tolerancia intrínseca al estrés, medio de suspensión, temperatura de secado, tiempo de exposición del microorganismo al calor (velocidad de flujo), humedad del deshidratado, temperatura y condiciones del almacenamiento (Chávez y Ledebøer, 2007).

Los resultados mostraron que la viabilidad de *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 no disminuyó después del proceso de secado por spray. Asimismo, se comprobó que la actividad FE de las cepas estaba

presente en los polvos obtenidos (aparición de halos claros en medio agarizado suplementado con EtF). Sin embargo, cuando se evaluó la viabilidad de las BL microencapsuladas durante el almacenamiento a 4°C hasta los 9 meses, se observó que *L. acidophilus* CRL1014 disminuyó casi 4 unidades logarítmicas, mientras que *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 sufrieron una menor pérdida de viabilidad (2 unidades logarítmicas). La actividad FE se mantuvo estable durante el período de almacenamiento en las tres cepas microencapsuladas.

Además, se evaluó la resistencia de las cepas encapsuladas frente a las condiciones del TGI, observándose que las mismas fueron más resistentes que las bacterias libres (sin encapsular). El orden de supervivencia después de ser sometidas a condiciones gastrointestinales simuladas fue *L. fermentum* CRL1446 > *L. johnsonii* CRL1231 > *L. acidophilus* CRL1014. Debido a que las microcápsulas de *L. acidophilus* CRL1014 fueron las menos resistentes a la digestión gastrointestinal simulada y las que mayor pérdida de viabilidad sufrieron durante los 9 meses de almacenamiento, las mismas no se utilizaron para los ensayos *in vivo* posteriores.

Bathena y col. (2007) formularon microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato (APA) conteniendo varias cepas con actividad FE (*L. fermentum* ATCC11976, *L. fermentum* ATCC14932, *L. reuteri* ATCC23272 y *L. farciminis* ATCC29644) y demostraron que las microcápsulas de *L. fermentum* ATCC11976 poseían una mayor capacidad de liberar AF *in vitro* después del proceso de microencapsulación. Estos autores comprobaron además, que esta cepa microencapsulada conservaba sus propiedades y se mantenía viable después de la exposición a un sistema simulado del TGI humano (Bathena y col., 2008). Otros trabajos de investigación apoyan la encapsulación de BL con actividad FE en micropartículas de APA; tal es el caso de *L. fermentum* NCIMB 5221, cuya actividad enzimática FE y viabilidad se mantuvieron después de la encapsulación, observándose además mayor supervivencia de las células encapsuladas que de las células libres en condiciones gastrointestinales simuladas (Tomaro-Duchesneau y col., 2012).

El secado por atomización empleando maltodextrina como componente de pared se ha utilizado para encapsular microorganismos como *L. plantarum* HM4; las microcápsulas obtenidas se incorporaron con éxito en una leche chocolatada y la viabilidad se mantuvo hasta los 6 meses de almacenamiento a 25°C ( $>10^8$  UFC/g) (Nambiar y col., 2018).

Con el objetivo de evaluar si las cepas con actividad FE mantenían sus propiedades benéficas *in vivo* luego de ser microencapsuladas, se utilizó un modelo murino de SM, en el cual ratones Albinos Suizos adultos fueron alimentados durante 7 semanas con DRG+s y recibieron diariamente por gavage las microcápsulas de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 (grupo SM+Lf y SM+Lj, respectivamente) resuspendidas en agua de bebida (dosis:  $10^7$  UFC/día/ratón).

Uno de los componentes principales del SM es la obesidad abdominal, la cual está directamente relacionada con la ganancia de peso corporal. Se observó que solo los ratones alimentados con DRG+s que no recibieron BL con actividad FE microencapsuladas experimentaron un aumento significativo de peso corporal (más del 50%) con respecto al grupo control. Los valores de EA indican que los ratones alimentados con DRG+s que recibieron microcápsulas de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 durante 7 semanas experimentaron un menor incremento de peso corporal que aquellos ratones que recibieron la misma cantidad y tipo de alimento pero sin la suplementación de los lactobacilos. Los resultados obtenidos sugieren que hay un efecto supresor del aumento de peso en ratones alimentados con DRG+s cuando se administraron las microcápsulas de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231

Resultados similares han sido informados por otros autores cuando se administraron BL en modelos animales de obesidad o SM inducidos por la dieta. Estudios realizados por Kang y col. (2010) demostraron que *Lactobacillus gasseri* BNR17 redujo el peso corporal y el índice de EA en ratas alimentadas con una dieta rica en carbohidratos. Tsai y col. (2016) administraron un complejo probiótico en forma de polvo liofilizado (que contenía *Lactobacillus rhamnosus* NBHK007,

*Bifidobacterium adolescentis* NBHK006 y *Pediococcus acidilactici* NBHK002) a hámsteres sirios dorados alimentados con una dieta alta en grasa y colesterol, y observaron que estos animales mostraban una menor ganancia de peso corporal con respecto a los que recibían la misma dieta sin el complejo de BL. No obstante, Iqbal y col. (2018) investigaron el efecto de *L. rhamnosus* NCIMB 6375, *L. plantarum* NCIMB 8826 y *L. fermentum* NCIMB 5221 microencapsuladas en APA y observaron que la administración durante 6 semanas de estas cepas con actividad FE no modificó significativamente la masa corporal de hámsteres sirios dorados alimentados con una dieta rica en grasa.

Los índices de adiposidad de los grupos alimentados con DRG+s indican que la acumulación de grasa corporal fue menor en los ratones que recibieron microcápsulas de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231. Estos resultados se condicen con los informados por Bathena y col. (2012), quienes observaron una reducción en el índice de adiposidad al administrar microcápsulas de *L. fermentum* ATCC11976 (con actividad FE) en un modelo de SM de hámsteres sirios dorados. Kang y col. (2010) también informaron una reducción de la masa de tejido adiposo mesentérico, epididimal y perirrenal en ratas con sobrepeso, por administración de *Lactobacillus gasseri* BNR17.

Los niveles de leptina mostraron una correlación positiva con los índices de adiposidad; siendo mucho más elevados en el grupo SM que en los grupos SM+Lf y SM+Lj.

La obesidad se caracteriza por una reducida sensibilidad a la leptina; concentraciones elevadas de esta hormona son comunes en individuos obesos con mayor porcentaje de grasa corporal (Considine y col., 2016). Bathena y col. (2012) compararon los niveles de leptina de hámsteres alimentados con dieta hiperlipidémica que recibieron microcápsulas APA vacías y conteniendo *L. fermentum* ATCC11976, observando una disminución cuando se administró la BL con actividad FE microencapsulada.

Una patología comúnmente asociada al SM es la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA). La histología hepática reveló una gran acumulación de vesículas lipídicas en ratones del grupo SM. La administración de microcápsulas de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 en conjunto con la DRG+s redujo la acumulación de grasa en el hígado de los ratones. Estudios previos han demostrado que microcápsulas de *L. fermentum* ATCC11976 con actividad FE tuvieron un efecto benéfico reduciendo el grado de infiltración grasa en el hígado de animales con EHGNA (Bathena y col., 2013).

Los valores alterados de lípidos plasmáticos en ratones alimentados con DRG+s que recibieron microcápsulas vacías (grupo SM) reflejan la dislipidemia característica del SM. Cuando se administraron microcápsulas conteniendo *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 se observó que, si bien las concentraciones de colesterol total, LDL-colesterol y TG fueron mayores que en el grupo control, los valores de todos estos parámetros fueron significativamente más bajos que en el grupo SM. Estos datos sugieren que el suministro de BL con actividad FE microencapsuladas podría prevenir la hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia inducidas por ingesta de una dieta alta en grasa. Además, los ratones del grupo SM mostraron bajas concentraciones de HDL-colesterol y se observó que la administración de las microcápsulas de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 permitió mantener los niveles de esta lipoproteína más elevados en los animales alimentados con DRG+s. Los índices de riesgo cardiovascular mejoraron en todos los casos con la administración de las dos BL microencapsuladas.

Los resultados concuerdan con los informados por otros autores que evaluaron la administración de distintas cepas de *Lactobacillus fermentum* con actividad FE microencapsuladas en modelos de SM en ratas (Tomaro-Duchesneau y col., 2014) y hámsteres sirios dorados (Bathena y col. 2012), observando un efecto hipolipemiante y una mejora de los indicadores de riesgo cardiovascular.

En lo que respecta al metabolismo de la glucosa, los ratones que recibieron microcápsulas de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 durante 7 semanas fueron capaces de prevenir la intolerancia a la glucosa provocada por la ingesta de DRG+s (RI disminuida). Asimismo, se observó que los grupos SM+Lf y SM+Lj mostraron valores reducidos de glucosa en ayunas, insulina y HOMA-IR. El efecto anti-hiperglucémico fue mayor cuando se administraron microcápsulas de *L. fermentum* CRL1446, no existiendo diferencias significativas con respecto al grupo control. Ambas cepas microencapsuladas mejoraron la insulinoresistencia y la hiperinsulinemia compensadora. Bathena y col. (2012) informaron que las microcápsulas de *L. fermentum* ATCC11976 (con actividad FE) controlaron eficazmente la hiperinsulinemia y redujeron los valores de HOMA-IR en hámsteres con SM. Tomaro-Duchesneau y col. (2014) también adjudicaron a microcápsulas de *L. fermentum* NCIMB 5221 (con actividad FE) un moderado control de la hiperinsulinemia de ratas diabéticas.

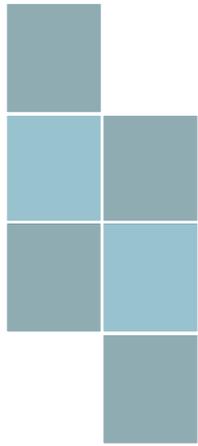
La actividad FE intestinal se vio reducida en ratones alimentados con DRG+s, pero la suplementación con microcápsulas que contenían *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 incrementó los valores, resultando los mismos similares a los del grupo control. La mayor liberación de AF a nivel intestinal en los grupos SM+Lf y SM+Lj explicaría gran parte de los efectos benéficos observados. Estudios previos demostraron que la administración oral de *L. fermentum* CRL1446 aumenta la actividad FE intestinal en ratones normales o sometidos a una dieta de restricción calórica (Abeijón Mukdsi y col., 2012; Russo y col., 2016).

En cuanto a los niveles de enzimas antioxidantes en hígado, se observó que la actividad GPx disminuyó significativamente en los tres grupos de ratones que recibieron DRG+s. La actividad GR en cambio, se vio disminuida en ratones del grupo SM, pero los valores se mantuvieron cercanos a los del grupo control cuando se administraron las microcápsulas de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 conjuntamente con la DRG+s.

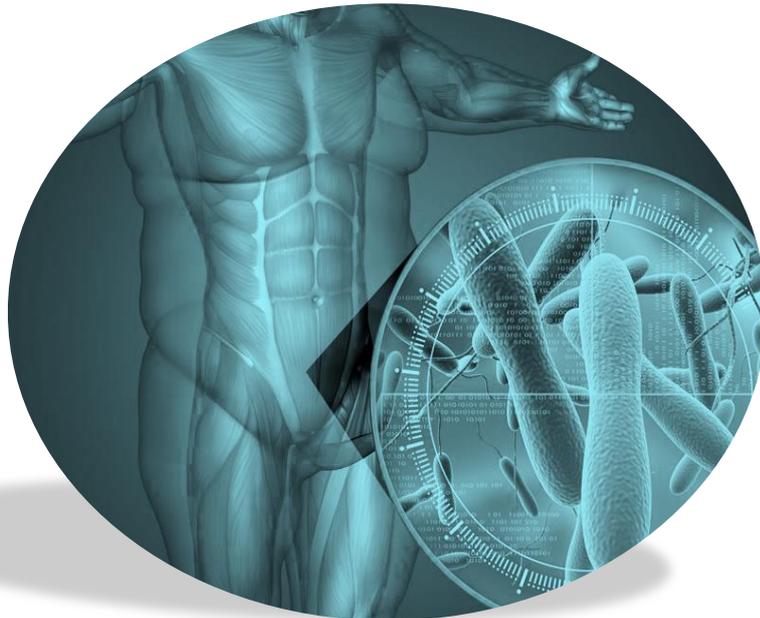
Los individuos con SM presentan un mayor grado de estrés oxidativo, y las actividades de enzimas antioxidantes como GPx y GR se encuentran disminuidas con respecto a pacientes normales (Cardona y col., 2008; García y col., 2014). Sharma y col. (2016) informaron que la administración de *L. casei* y *Bifidobacterium bifidum* a ratas diabéticas provocó un aumento de las actividades GPx, GR, catalasa y superóxido dismutasa. Además, anteriormente se ha demostrado que la administración de *L. fermentum* CRL1446 a ratones normales o sometidos a una dieta de restricción calórica, mejoró el estado oxidativo provocando un aumento de la actividad GR (Abejón Mukdsi y col., 2012; Russo y col., 2016).

En el presente capítulo se demostró que el secado por atomización es un método eficiente para preservar la viabilidad y la actividad FE de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 tras el proceso y durante su almacenamiento y exposición a las condiciones del TGI.

La administración oral de estas BL con actividad FE microencapsuladas incrementó la liberación de AF a nivel intestinal en ratones alimentados con DRG+s observándose una atenuación de los marcadores metabólicos del SM.



# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

-Del estudio inicial de 40 cepas de BL se seleccionaron *L. acidophilus* CRL1014, *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 por su capacidad de liberar altas concentraciones de AF a partir de su forma esterificada (EtF) sin metabolizarlo a otros compuestos.

-Las cepas *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 presentaron mayor resistencia a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, conservando la actividad FE, por lo cual fueron seleccionadas para realizar los estudios *in vivo*.

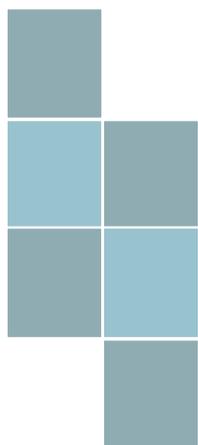
-Se estableció un modelo murino de SM: ratones Albinos Suizos adultos presentaron obesidad, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, hipertrigliceridemia y disminución de HDL-colesterol a las 14 semanas de alimentación con una dieta rica en grasa suplementada con salvado de trigo (DRG+s).

-La administración oral de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 en el modelo murino de SM incrementó la actividad FE intestinal de los ratones alimentados con DRG+s, observándose una atenuación de los marcadores bioquímicos del SM y una mejora del estado oxidativo.

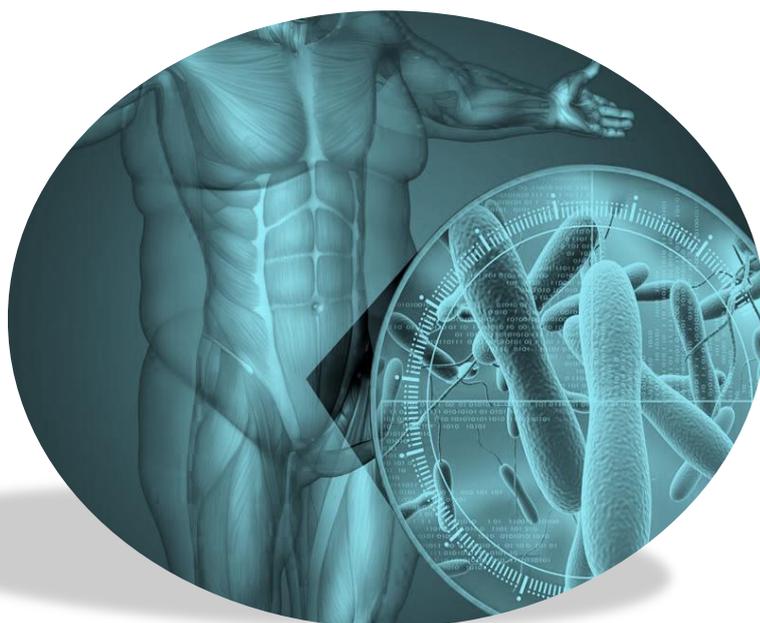
-*L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 resistieron al proceso de secado por atomización. Este método de microencapsulación mostró ser adecuado para preservar la viabilidad y actividad FE de las cepas durante su almacenamiento y exposición a las condiciones del tracto gastrointestinal.

-La administración oral de microcápsulas de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 a ratones alimentados con DRG+s demostró que las cepas evaluadas conservaron su efecto benéfico *in vivo*, atenuando los biomarcadores del SM.

*Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral contribuyen al estudio de cepas de bacterias lácticas del género Lactobacillus con actividad feruloil esterasa (FE) como potenciales probióticos capaces de prevenir el Síndrome Metabólico (SM) inducido por una dieta rica en grasa. Estudios in vitro permitieron seleccionar a Lactobacillus fermentum CRL1446 y Lactobacillus johnsonii CRL1231, ambas cepas con elevada actividad FE y capaces de liberar ácido ferúlico a partir de salvado de trigo. Estudios preclínicos en un modelo murino de SM, que incluyeron la administración oral de estas cepas, evidenciaron que el empleo de las mismas logra mejorar los marcadores metabólicos que caracterizan al SM. Así mismo, las dos cepas de bacterias lácticas mostraron capacidad para resistir a procesos tecnológicos como la microencapsulación por Spray Drying, manteniendo sus efectos beneficiosos.*

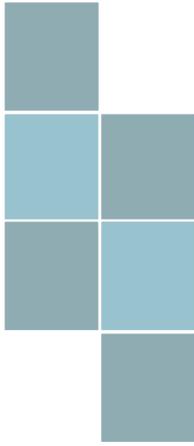


# PROYECCIONES

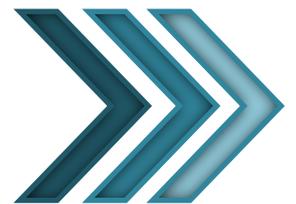
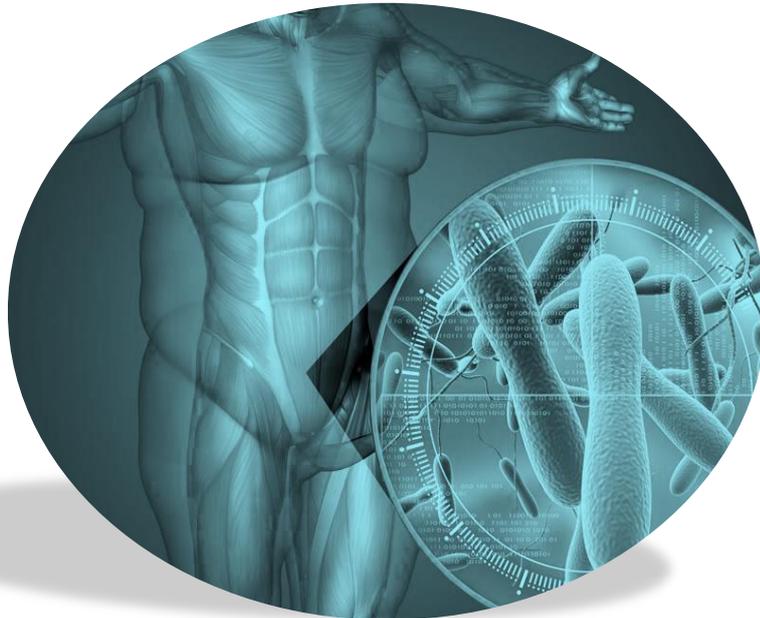


## PROYECCIONES

- Realizar estudios de metagenómica, a fin de evaluar los mecanismos moduladores de las BL con actividad FE en la microbiota intestinal de ratones alimentados con DRG+s.
- Dilucidar los mecanismos reguladores del metabolismo lipídico y glucémico.
- Ampliar los estudios de los metabolitos del ácido ferúlico generados en plasma, heces, hígado y orina.
- Evaluar la administración conjunta de *L. fermentum* CRL1446 y *L. johnsonii* CRL1231 en el modelo murino de SM.
- Realizar la formulación de un suplemento dietario empleando BL con actividad FE.



# ÍNDICE DE ABREVIATURAS



## ABREVIATURAS

AACE: American Association of Clinical Endocrinologists

AB: Ácido benzoico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AF: Ácido ferúlico

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta

AGL: Ácidos grasos libres

AH: Ácidos hidroxicinámicos

ALT: Alanina aminotransferasa

AST: Aspartato aminotransferasa

ATPIII: Adult Treatment Panel III (National Cholesterol Education Program)

BL: Bacterias lácticas

CAT: Catalasa

CE: Cinamil esterasa

col.: Colaboradores

DC: Dieta convencional

DHF: Ácido dihidroferúlico

DHPPA: Ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico

DO: Densidad óptica

DRG: Dieta rica en grasa

DRG+s: Dieta rica en grasa suplementada con salvado

DS: Desvío estándar

DT2: Diabetes mellitus tipo 2

EA: Eficiencia alimentaria

ECV: Enfermedades cardiovasculares

EGIR: European Group for the Study of Insulin Resistance

EHGNA: Enfermedad del hígado graso no alcohólico

ES: Error estándar

EtF: Etil ferulato

FE: Feruloil esterasa

g: Gramos

GPC: Ganancia de peso corporal

GPx: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

h: Hora

HDL-col: HDL-colesterol

HGNA: Hígado graso no alcohólico

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HPPA: Ácido 3-hidroxifenilpropiónico

IA: Índice de aterogenicidad

IAd: Índice de adiposidad

IAP: Índice de aterogenicidad de plasma

IDF: Interational Diabetes Federation

IFN: Interferón

IL: Interleuquina

IRCV: Indicadores de riesgo cardiovascular

JG: Jugo gástrico

JI: jugo intestinal

Kcal: Kilocalorías

*L.*: *Lactobacillus*

*La*: *Lactobacillus acidophilus*

LDL-col: LDL-colesterol

*Lf*: *Lactobacillus fermentum*

*Lj*: *Lactobacillus johnsonii*

M: Molar

MI: Microbiota intestinal

min: Minutos

mL: Mililitros

MM: medio mínimo

mM: Milimolar

MRS: Man-Rogosa-Sharpe

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

OE: Objetivo específico

OID: Obesidad inducida por la dieta

OMS: Organización mundial de la salud

p/p: Peso en peso

p/v: Peso en volumen

PAI-1: Inhibidor del activador de plasminógeno 1

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Proteína C reactiva

pg: Picogramos

pH: Potencial hidrógeno

PTOG: Prueba de tolerancia oral a la glucosa

PTOS: Prueba de tolerancia oral a la sacarosa

qPCR: Quantitative polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)

RI: Resistencia a la insulina

ROS: Especies reactivas de oxígeno

rpm: Revoluciones por minuto

SM: Síndrome metabólico

SOD: Superóxido dismutasa

SRAA: Sistema renina-angiotensina.aldosterona

TAE: Tejido adiposo epididimal

TAM: Tejido adiposo mesentérico

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TG: Triglicéridos

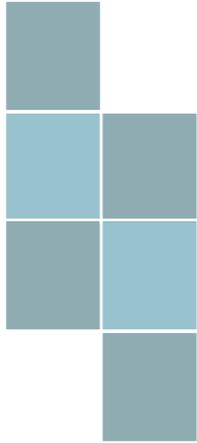
TGI: Tracto gastrointestinal

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

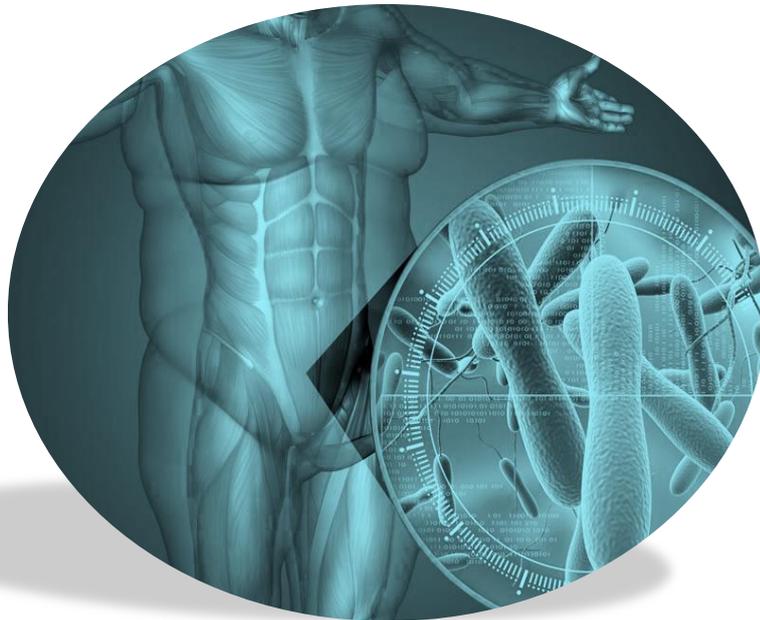
UFC: Unidades formadoras de colonia

$\mu$ L: Microlitros

$\mu$ m: Micrómetros



# BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

## A

Abeijón Mukdsi, M. C., Gauffin Cano, M. P., Gonzalez, S. N., & Medina, R. B. (2012). Administration of *Lactobacillus fermentum* CRL1446 increases intestinal feruloyl esterase activity in mice. *Letters in applied microbiology*, *54*(1), 18-25.

Abeijón Mukdsi, M. C., Haro, C., González, S. N., & Medina, R. B. (2013). Functional goat milk cheese with feruloyl esterase activity. *Journal of Functional Foods*, *5*(2), 801-809.

Acevedo, M., Krämer, V., Tagle, R., Corbalán, R., Arnaíz, P., Berríos, X., & Navarrete, C. (2012). Relación colesterol total a HDL y colesterol no HDL: los mejores indicadores lipídicos de aumento de grosor de la íntima media carotídea. *Revista médica de Chile*, *140*(8), 969-976.

Adisakwattana, S., Moonsan, P., & Yibchok-Anun, S. (2008). Insulin-releasing properties of a series of cinnamic acid derivatives in vitro and in vivo. *Journal of agricultural and food chemistry*, *56*(17), 7838-7844.

Al-muzafar, H. M., & Amin, K. A. (2017). Probiotic mixture improves fatty liver disease by virtue of its action on lipid profiles, leptin, and inflammatory biomarkers. *BMC complementary and alternative medicine*, *17*(1), 43.

Amar, J., Chabo, C., Waget, A., Klopp, P., Vachoux, C., Bermúdez-Humarán, L. G., ... & Ouwehand, A. (2011). Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO molecular medicine*, *3*(9), 559-572.

American Diabetes Association. (2010). Standards of medical care in diabetes—2010. *Diabetes care*, *33*(Suppl 1), S11.

Andreasen, M. F., Christensen, L. P., Meyer, A. S., & Hansen, Å. (2000). Content of phenolic acids and ferulic acid dehydrodimers in 17 Rye (*Secale cereale* L.) Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(7), 2837-2842.

Andreasen, M. F., Kroon, P. A., Williamson, G., & Garcia-Conesa, M. T. (2001a). Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(11), 5679-5684.

Andreasen, M. F., Kroon, P. A., Williamson, G., & Garcia-Conesa, M. T. (2001b). Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free radical biology and medicine*, *31*(3), 304-314.

Angelakis, E., Armougom, F., Million, M., & Raoult, D. (2012). The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future microbiology*, 7(1), 91-109.

AOAC International (2000). Official methods of analysis of AOAC International. *Horwitz Ed.*

AOAC International (2005). Official Methods of Analysis of AOAC International. *Horwitz, W., Ed*, 56.

Appel, S. J., Harrell, J. S., & Davenport, M. L. (2005). Central obesity, the metabolic syndrome, and plasminogen activator inhibitor-1 in young adults. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, 17(12), 535-541.

Argañaraz-Martínez, E., Babot, J. D., Apella, M. C., & Chaia, A. P. (2013). Physiological and functional characteristics of Propionibacterium strains of the poultry microbiota and relevance for the development of probiotic products. *Anaerobe*, 23, 27-37.

Aschner, P. (2002). Prevalencia de Síndrome Metabólico en Colombia. *Diabetes Res Clin Pract*, 57(supl 1), 532.

Aschner, P. (2010). Metabolic syndrome as a risk factor for diabetes. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 8(3), 407-412.

Avila-Reyes, S. V., Garcia-Suarez, F. J., Jiménez, M. T., San Martín-Gonzalez, M. F., & Bello-Perez, L. A. (2014). Protection of L. rhamnosus by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. *Carbohydrate polymers*, 102, 423-430.

Avogaro, P. (1967). Associazione di iperlipidemia, diabete mellito e obesità di medio grado. *Acta Diabetol. Lat.*, 4, 36-41.

## B

Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., ... & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the national academy of sciences*, 101(44), 15718-15723.

Balasubashini, M. S., Rukkumani, R., & Menon, V. P. (2003). Protective effects of ferulic acid on hyperlipidemic diabetic rats. *Acta Diabetologica*, 40(3), 118-122.

Balasubashini, M. S., Rukkumani, R., Viswanathan, P., & Menon, V. P. (2004). Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(4), 310-314.

- Barbosa-Cánovas, G. V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., & Yan, H. (2005). Mixing. *Food powders: Physical properties, processing, and functionality*, 221-246.
- Bel-Rhliid, R., Pagé-Zoerkler, N., Fumeaux, R., Ho-Dac, T., Chuat, J. Y., Sauvageat, J. L., & Raab, T. (2012). Hydrolysis of chicoric and caftaric acids with esterases and *Lactobacillus johnsonii* in vitro and in a gastrointestinal model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(36), 9236-9241.
- Beyer Jr, W. F., & Fridovich, I. (1985). Pseudocatalase from *Lactobacillus plantarum*: evidence for a homopentameric structure containing two atoms of manganese per subunit. *Biochemistry*, 24(23), 6460-6467.
- Bhathena, J., Kulamarva, A., Urbanska, A. M., Martoni, C., & Prakash, S. (2007). Microencapsulated bacterial cells can be used to produce the enzyme feruloyl esterase: preparation and in-vitro analysis. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(5), 1023-1029.
- Bhathena, J., Kulamarva, A., Martoni, C., Urbanska, A. M., & Prakash, S. (2008). Preparation and in vitro analysis of microencapsulated live *Lactobacillus fermentum* 11976 for augmentation of feruloyl esterase in the gastrointestinal tract. *Biotechnology and applied biochemistry*, 50(1), 1-9.
- Bhathena, J., Martoni, C., Malhotra, M., Kulamarva, A., Urbanska, A. M., Paul, A., ... & Tomaro-Duchesneau, C. (2012). Effect of orally administered microencapsulated FA-producing *L. fermentum* on markers of metabolic syndrome: an in vivo analysis. *Journal of Diabetes & Metabolism*, 01(S6)
- Bhathena, J., Martoni, C., Kulamarva, A., Tomaro-Duchesneau, C., Malhotra, M., Paul, A., ... & Prakash, S. (2013). Oral probiotic microcapsule formulation ameliorates non-alcoholic fatty liver disease in Bio F1B Golden Syrian hamsters. *PLoS One*, 8(3), e58394.
- Blüher, M., Fasshauer, M., Tönjes, A., Kratzsch, J., Schön, M. R., & Paschke, R. (2005). Association of interleukin-6, C-reactive protein, interleukin-10 and adiponectin plasma concentrations with measures of obesity, insulin sensitivity and glucose metabolism. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, 113(09), 534-537.
- Bourne, L. C., & Rice-Evans, C. A. (1999). [9] Detecting and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in humans: Pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 91-106). Academic Press.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Brezillon, C., Kroon, P. A., Faulds, C. B., Brett, G. M., & Williamson, G. (1996). Novel ferulic acid esterases are induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar-beet pulp. *Applied microbiology and biotechnology*, *45*(3), 371-376.

Brinkworth, G. D., Noakes, M., Clifton, P. M., & Bird, A. R. (2009). Comparative effects of very low-carbohydrate, high-fat and high-carbohydrate, low-fat weight-loss diets on bowel habit and faecal short-chain fatty acids and bacterial populations. *British journal of nutrition*, *101*(10), 1493-1502.

Brown, K., DeCoffe, D., Molcan, E., & Gibson, D. L. (2012). Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients*, *4*(8), 1095-1119.

Buchanan, C. J., Wallace, G., Fry, S. C., & Eastwood, M. A. (1996). In vivo release of <sup>14</sup>C-labelled phenolic groups from intact dietary spinach cell walls during passage through the rat intestine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *71*(4), 459-469.

## C

Caetano, A. C., da Veiga, L. F., Capaldi, F. R., de Alencar, S. M., Azevedo, R. A., & Bezerra, R. M. (2013). The antioxidant response of the liver of male Swiss mice raised on a AIN 93 or commercial diet. *BMC physiology*, *13*(1), 3.

Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R. G., Tuohy, K. M., ... & Delzenne, N. M. (2007). Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, *50*(11), 2374-2383.

Cani, P. D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., ... & Muccioli, G. G. (2009). Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*

Cani, P. D., & Delzenne, N. M. (2011). The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacology & therapeutics*, *130*(2), 202-212.

Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, *50*(1-2), 131-149.

Cárdenas Quintana, H., Sánchez Abanto, J., Roldán Arbieto, L., & Mendoza Tasayco, F. (2009). Prevalencia del síndrome metabólico en personas a partir de 20 años de edad: Perú, 2005. *Revista española de salud pública*, *83*(2), 257-265.

- Cardona, F., Tunez, I., Tasset, I., Montilla, P., Collantes, E., & Tinahones, F. J. (2008). Fat overload aggravates oxidative stress in patients with the metabolic syndrome. *European journal of clinical investigation*, *38*(7), 510-515.
- Carvalho, B. M., Guadagnini, D., Tsukumo, D. M. L., Schenka, A. A., Latuf-Filho, P., Vassallo, J., ... & Saad, M. J. A. (2012). Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. *Diabetologia*, *55*(10), 2823-2834.
- Castanares, A., McCrae, S. I., & Wood, T. M. (1992). Purification and properties of a feruloyl/p-coumaroyl esterase from the fungus *Penicillium pinophilum*. *Enzyme and microbial technology*, *14*(11), 875-884.
- Cayra, E., Dávila, J. H., Villalta, J. M., & Rosales, Y. (2017). Evaluación de la Estabilidad y Viabilidad de Dos Cepas Probióticas Microencapsuladas por Lecho Fluidizado. *Información tecnológica*, *28*(6), 35-44.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of applied microbiology*, *84*(5), 759-768.
- Chávez, B. E., & Ledebøer, A. M. (2007). Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying technology*, *25*(7-8), 1193-1201.
- Chen, D., & Wang, M. W. (2005). Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and metabolism*, *7*(4), 307-317.
- Cho, J. Y., Moon, J. H., & Park, K. H. (2000). Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid from hot water extracts of *Hovenia dulcis* Thunb and confirmation of their antioxidative and antimicrobial activity. *Korean Journal of Food Science and Technology*, *32*(6), 1403-1408.
- Cho, S. S., & Finocchiaro, T. (2009). *Handbook of prebiotics and probiotics ingredients: health benefits and food applications*. CRC Press.
- Clifford, M. N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(7), 1033-1043.
- Collado, M. C., Isolauri, E., Laitinen, K., & Salminen, S. (2008). Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women—. *The American journal of clinical nutrition*, *88*(4), 894-899.

Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Noyce, M. R., ... & Caro, J. F. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New England Journal of Medicine*, *334*(5), 292-295.

Consulta de Expertos, F. A. O. (2006). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación.

Conway, P. L., Gorbach, S. L., & Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of dairy science*, *70*(1), 1-12.

Coppari, R., & Bjørnbæk, C. (2012). The potential of leptin for treating diabetes and its mechanism of action. *Nature reviews. Drug discovery*, *11*(9), 692.

Cordero, A., León, M., Andrés, E., Ordoñez, B., Laclaustra, M., Grima, A., ... & Alegría, E. (2009). Gender differences in obesity related cardiovascular risk factors in Spain. *Preventive medicine*, *48*(2), 134-139.

Couteau, D., McCartney, A. L., Gibson, G. R., Williamson, G., & Faulds, C. B. (2001). Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *Journal of applied microbiology*, *90*(6), 873-881.

Crovesy, L., Ostrowski, M., Ferreira, D. M. T. P., Rosado, E. L., & Soares-Mota, M. (2017). Effect of Lactobacillus on body weight and body fat in overweight subjects: a systematic review of randomized controlled clinical trials. *International journal of obesity*, *41*(11), 1607.

Cuevas, A., & Alonso, R. (2016). Dislipidemia Diabética. *Revista Médica Clínica Las Condes*, *27*(2), 152-159.

## D

David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., ... & Biddinger, S. B. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, *505*(7484), 559.

De Man, J. C., Rogosa, D., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of applied Bacteriology*, *23*(1), 130-135.

de Oliveira Silva, E., & Batista, R. (2017). Ferulic acid and naturally occurring compounds bearing a feruloyl moiety: a review on their structures, occurrence, and potential health benefits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *16*(4), 580-616.

De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchamp, A., ... & Mithieux, G. (2014). Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell*, *156*(1), 84-96.

Diamant, M., Blaak, E. E., & De Vos, W. M. (2011). Do nutrient–gut–microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes?. *Obesity reviews*, *12*(4), 272-281.

Diaz, A., Espeche, W., March, C., Flores, R., Parodi, R., Genesio, M. A., ... & Poppe, S. (2018). Prevalence of metabolic syndrome in Argentina in the last 25 years: Systematic review of population observational studies. *Hipertension y riesgo vascular*, *35*(2), 64-69.

Dicks, L. M. T., & Botes, M. (2010). Probiotic lactic acid bacteria in the gastrointestinal tract: Health benefits, safety and mode of action *Beneficial Microbes*, *1* (1), 11–29. [dx. doi. org/10.3920/BM2009.12](https://doi.org/10.3920/BM2009.12).

Ding, W. K., & Shah, N. P. (2009). Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, *74*(2), M100-M107.

Doggrell, S. A., & Brown, L. (1998). Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular research*, *39*(1), 89-105.

Donaghy, J., Kelly, P. F., & McKay, A. M. (1998). Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and lactobacilli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *50*(2), 257-260.

Donath, M. Y., & Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, *11*(2), 98.

Douillard, F. P., & De Vos, W. M. (2014, August). Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. In *Microbial cell factories* (Vol. 13, No. 1, p. S8). BioMed Central.

Doyle, M. P., Steenson, L. R., & Meng, J. (2013). Bacteria in food and beverage production. In *The prokaryotes* (pp. 241-256). Springer, Berlin, Heidelberg.

Drissi, F., Raoult, D., & Merhej, V. (2017). Metabolic role of lactobacilli in weight modification in humans and animals. *Microbial pathogenesis*, *106*, 182-194.

Drucker, D. J. (2007). The role of gut hormones in glucose homeostasis. *The Journal of clinical investigation*, *117*(1), 24-32.

Duncan, S. H., Belenguer, A., Holtrop, G., Johnstone, A. M., Flint, H. J., & Lobley, G. E. (2007). Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Applied and environmental microbiology*, *73*(4), 1073-1078.

Duncan, S. H., Lobley, G. E., Holtrop, G., Ince, J., Johnstone, A. M., Louis, P., & Flint, H. J. (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International journal of obesity*, *32*(11), 1720.

Duncan, S. H., Russell, W. R., Quartieri, A., Rossi, M., Parkhill, J., Walker, A. W., & Flint, H. J. (2016). Wheat bran promotes enrichment within the human colonic microbiota of butyrate-producing bacteria that release ferulic acid. *Environmental microbiology*, *18*(7), 2214-2225.

Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., ... & Kiely, B. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 279-292). Springer, Dordrecht.

## E

Eckel, R. H., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *The lancet*, *365*(9468), 1415-1428.

Edeas, M., Khalfoun, Y., Lazizi, Y., Vergnes, L., Labidalle, S., Postaire, E., & Lindenbaum, A. (1995). Effect of the liposolubility of free radical scavengers on the production of antigen P24 from a HIV infected monocytic cell line. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales*, *189*(3), 367-373.

Espósito, K., Ceriello, A., & Giugliano, D. (2007). Diet and the metabolic syndrome. *Metabolic syndrome and related disorders*, *5*(4), 291-296.

Esteban-Torres, M., Reverón, I., Mancheño, J. M., de las Rivas, B., & Muñoz, R. (2013). Characterization of the first feruloyl esterase from *Lactobacillus plantarum*. *Applied and environmental microbiology*, AEM-01523.

Esterbauer, H., & Grill, D. (1978). Seasonal variation of glutathione and glutathione reductase in needles of *Picea abies*. *Plant Physiology*, *61*(1), 119-121.

Ewaschuk, J., Endersby, R., Thiel, D., Diaz, H., Backer, J., Ma, M., ... & Madsen, K. (2007). Probiotic bacteria prevent hepatic damage and maintain colonic barrier function in a mouse model of sepsis. *Hepatology*, *46*(3), 841-850.

## F

Fabersani, E., Russo, M., Marquez, A., Abeijón-Mukdsi, C., Medina, R., & Gauffin-Cano, P. (2018). Modulation of intestinal microbiota and IMMUNO-metabolic parameters by caloric restriction and lactic acid bacteria. *Food Research International*.

Faulds, C. B., & Williamson, G. (1991). The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes*. *Microbiology*, *137*(10), 2339-2345.

Faulds, C. B., & Williamson, G. (1999). The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*(3), 393-395.

- Faulds, C. B. (2010). What can feruloyl esterases do for us?. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 121-132.
- Fazary, A. E., & JU, Y. H. (2007). Feruloyl esterases as biotechnological tools: current and future perspectives. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(11), 811-828.
- Fei, N., & Zhao, L. (2013). An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. *The ISME journal*, 7(4), 880.
- Ferrannini, E., & Natali, A. (1991). Essential hypertension, metabolic disorders, and insulin resistance. *American heart journal*, 121(4), 1274-1282.
- Filannino, P., Gobbetti, M., De Angelis, M., & Di Cagno, R. (2014). Hydroxycinnamic acids used as external acceptors of electrons: an energetic advantage for strictly hetero-fermentative lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*, AEM-02413.
- Filannino, P., Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2018). Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. *Current opinion in biotechnology*, 49, 64-72.
- Finkelstein, E. A., Graham, W. C. K., & Malhotra, R. (2014). Lifetime direct medical costs of childhood obesity. *Pediatrics*, 133(5), 854-862.
- Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). [12] Assays of glutathione peroxidase. In *Methods in enzymology*(Vol. 105, pp. 114-120). Academic Press.
- Fritsch, C., Jänsch, A., Ehrmann, M. A., Toelstede, S., & Vogel, R. F. (2017). Characterization of cinnamoyl esterases from different Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current microbiology*, 74(2), 247-256.
- Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D., Pinto, S. S., Negrão-Murakami, A. N., & Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, 45(1), 306-312.
- Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., ... & Carling, D. (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature communications*, 5, 3611.
- Fry, S. C. (1982). Phenolic components of the primary cell wall. Feruloylated disaccharides of D-galactose and L-arabinose from spinach polysaccharide. *Biochemical Journal*, 203(2), 493-504.
- Fuchs, T., Loureiro, M. D. P., Macedo, L. E., Nocca, D., Nedelcu, M., & Costa-Casagrande, T. A. (2018). Animal models in metabolic syndrome. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 45(5).

Fujita, A., Sasaki, H., Doi, A., Okamoto, K., Matsuno, S., Furuta, H., ... & Nanjo, K. (2008). Ferulic acid prevents pathological and functional abnormalities of the kidney in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty diabetic rats. *Diabetes research and clinical practice*, *79*(1), 11-17.

## G

Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Ward, R. E., Martin, R. J., Lefevre, M., ... & Ye, J. (2009). Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*.

García, J. B., Rentero, P. Z., Cánovas, J. M., Jara, P. G., Hernández, M. L., & Alemán, J. A. (2014). Biochemical and nutritional markers and antioxidant activity in metabolic syndrome. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, *61*(6), 302-308.

Garcia-Conesa, M. T., Plumb, G. W., Waldron, K. W., Ralph, J., & Williamson, G. (1997). Ferulic acid dehydrodimers from wheat bran: isolation, purification and antioxidant properties of 8-O-4-diferulic acid. *Redox Report*, *3*(5-6), 319-323.

Gauffin Cano, P., Santacruz, A., Moya, Á., & Sanz, Y. (2012). *Bacteroides uniformis* CECT 7771 ameliorates metabolic and immunological dysfunction in mice with high-fat-diet induced obesity. *PloS one*, *7*(7), e41079.

Gauffin Cano, P., Santacruz, A., Trejo, F. M., & Sanz, Y. (2013). *Bifidobacterium* CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet-fed mice. *Obesity*, *21*(11), 2310-2321.

Ghosh, S., Basak, P., Dutta, S., Chowdhury, S., & Sil, P. C. (2017). New insights into the ameliorative effects of ferulic acid in pathophysiological conditions. *Food and Chemical Toxicology*, *103*, 41-55.

Gimeno, M. L., Martínez, C. B., Calleja, I. P., & Lenguas, A. C. (2005). SÍNDROME METABÓLICO: RETOS Y ESPERANZAS Síndrome metabólico. *Concepto y fisiopatología*, 3-10.

Ginsberg, H. N. Insulin resistance and cardiovascular disease *J Clin Invest*. 2000; 106: 453-8.

Goderska, K., Gumienna, M., & Czarnecki, Z. (2008). Release of phenolic compounds from bean flour, bean-derived chips and black chokeberry juice and changes in their antioxidant activity during digestion in an in vitro gastrointestinal model. *Polish journal of food and nutrition sciences*, *58*(4).

González Roca, R. (2016). Indicadores de riesgo aterogénico como predictores de síndrome metabólico en una población del municipio Sifontes del estado Bolívar, Venezuela. *Saber*, *28*(2), 221-229.

Gotteland, M. (2013). El papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de la obesidad y de la diabetes de tipo-2. *Rev Chil Endocrinol Diabetes*, 6(4), 155-162.

Govindaswamy, V. (2015). Therapeutical properties of ferulic acid and bioavailability enhancement through feruloyl esterase. *Journal of Functional Foods*, 17, 657-666.

Grabber, J. H., Hatfield, R. D., & Ralph, J. (1998). Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(2), 193-200.

Guglielmetti, S., De Noni, I., Caracciolo, F., Molinari, F., Parini, C., & Mora, D. (2008). Bacterial cinnamoyl esterase activity screening for the production of a novel functional food product. *Applied and environmental microbiology*, 74(4), 1284-1288.

Guo, Z., Hensrud, D. D., Johnson, C. M., & Jensen, M. D. (1999). Regional postprandial fatty acid metabolism in different obesity phenotypes. *Diabetes*, 48(8), 1586-1592.

## H

Hadaegh, F., Khalili, D., Ghasemi, A., Tohidi, M., Sheikholeslami, F., & Azizi, F. (2009). Triglyceride/HDL-cholesterol ratio is an independent predictor for coronary heart disease in a population of Iranian men. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 19(6), 401-408.

Hamad, E. M., Sato, M., Uzu, K., Yoshida, T., Higashi, S., Kawakami, H., ... & Imaizumi, K. (2008). Milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 influences adipocyte size via inhibition of dietary fat absorption in Zucker rats. *British journal of nutrition*, 101(5), 716-724.

He, M., & Shi, B. (2017). Gut microbiota as a potential target of metabolic syndrome: the role of probiotics and prebiotics. *Cell & bioscience*, 7(1), 54.

Hermoso, J. A., Sanz-Aparicio, J., Molina, R., Juge, N., Gonzalez, R., & Faulds, C. B. (2004). The crystal structure of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* suggests evolutive functional convergence in feruloyl esterase family. *Journal of molecular biology*, 338(3), 495-506.

Hernández-Carranza, P., & Jiménez-Munguía, M. T. (2010). Propiedades funcionales y aplicaciones industriales de los fructo-oligosacáridos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(1), 1-8.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... & Calder, P. C. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506.

Hirabayashi, T., Ochiai, H., Sakai, S., Nakajima, K., & Terasawa, K. (1995). Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on murine interleukin-8 production in response to influenza virus infections in vitro and in vivo. *Planta medica*, *61*(03), 221-226.

Hole, A. S., Rud, I., Grimmer, S., Sigl, S., Narvhus, J., & Sahlstrøm, S. (2012). Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. *Journal of agricultural and food chemistry*, *60*(25), 6369-6375.

Holst, B., & Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current opinion in biotechnology*, *19*(2), 73-82.

Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition—. *The American journal of clinical nutrition*, *73*(2), 365s-373s.

<http://fmdiabetes.org/sindrome-metabolico>

<https://www.heart.org/en/health-topics/metabolic-syndrome/about-metabolic-syndrome>

Hu, C. T., Wu, J. R., Cheng, C. C., Wang, S., Wang, H. T., Lee, M. C., ... & Wu, W. S. (2011). Reactive oxygen species-mediated PKC and integrin signaling promotes tumor progression of human hepatoma HepG2. *Clinical & experimental metastasis*, *28*(8), 851-863.

Huang, J., Wang, X., Tao, G., Song, Y., Ho, C., Zheng, J., & Ou, S. (2018). Feruloylated oligosaccharides from maize bran alleviate the symptoms of diabetes in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Food & function*, *9*(3), 1779-1789.

Hulsmans, M., Van Dooren, E., & Holvoet, P. (2012). Mitochondrial reactive oxygen species and risk of atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*, *14*(3), 264-276.

## I

Ilha, E. C., Da Silva, T., Lorenz, J. G., de Oliveira Rocha, G., & Sant'Anna, E. S. (2015). *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. *European Food Research and Technology*, *240*(5), 977-984.

Iqbal, U. H., Westfall, S., & Prakash, S. (2018). Novel microencapsulated probiotic blend for use in metabolic syndrome: design and in-vivo analysis. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 1-9.

Ishii, N., Fujii, M., Hartman, P. S., Tsuda, M., Yasuda, K., Senoo-Matsuda, N., ... & Suzuki, K. (1998). A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature*, *394*(6694), 694.

Izadi, M., Eskandari, M. H., Niakousari, M., Shekarforoush, S., Hanifpour, M. A., & Izadi, Z. (2014). Optimisation of a pilot-scale spray drying process for probiotic yoghurt, using response surface methodology. *International journal of dairy technology*, *67*(2), 211-219.

## J

Johnson, L. W., & Weinstock, R. S. (2006). The metabolic syndrome: concepts and controversy. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 81, No. 12, pp. 1615-1620). Elsevier.

Jung, S. H., Park, H. S., Kim, K. S., Choi, W. H., Ahn, C. W., Kim, B. T., ... & Kim, H. J. (2008). Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. *The Journal of nutritional biochemistry*, *19*(6), 371-375.

## K

Kamal-Eldin, A., Frank, J., Razdan, A., Tengblad, S., Basu, S., & Vessby, B. (2000). Effects of dietary phenolic compounds on tocopherol, cholesterol, and fatty acids in rats. *Lipids*, *35*(4), 427-435.

Kanauchi, M., Watanabe, S., Tsukada, T., Atta, K., Kakuta, T., & Koizumi, T. (2008). Purification and characteristics of feruloyl esterase from *Aspergillus awamori* G-2 strain. *Journal of food science*, *73*(6), C458-C463.

Kang, J. H., Yun, S. I., & Park, H. O. (2010). Effects of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on body weight and adipose tissue mass in diet-induced overweight rats. *The Journal of Microbiology*, *48*(5), 712-714.

Kang, J. H., Yun, S. I., Park, M. H., Park, J. H., Jeong, S. Y., & Park, H. O. (2013). Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice. *PloS one*, *8*(1), e54617.

Karlsson, F. H., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C. J., Fagerberg, B., ... & Bäckhed, F. (2013). Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*, *498*(7452), 99.

Kaur, J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology research and practice*, *2014*.

Kawabata, K., Yamamoto, T., Hara, A., Shimizu, M., Yamada, Y., Matsunaga, K., ... & Mori, H. (2000). Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer letters*, *157*(1), 15-21.

Kawano, M., Miyoshi, M., Ogawa, A., Sakai, F., & Kadooka, Y. (2016). Lactobacillus gasseri SBT2055 inhibits adipose tissue inflammation and intestinal permeability in mice fed a high-fat diet. *Journal of nutritional science*, 5.

Kayahara, H., Miao, Z. H. U. A. N. G., & Fujiwara, G. (1999). Synthesis and biological activities of ferulic acid derivatives. *Anticancer research*, 19(5A), 3763-3768.

Kent, R. M., & Doherty, S. B. (2014). Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. *Food Research International*, 64, 567-576.

Ketsawatsakul, U., Whiteman, M., & Halliwell, B. (2000). A reevaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics. *Biochemical and biophysical research communications*, 279(2), 692-699.

Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International journal of Biosciences*, 1(3), 1-13.

Kim, H. K., Jeong, T. S., Lee, M. K., Park, Y. B., & Choi, M. S. (2003). Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clinica Chimica Acta*, 327(1-2), 129-137.

Kim, K. A., Gu, W., Lee, I. A., Joh, E. H., & Kim, D. H. (2012). High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS one*, 7(10), e47713.

Kimoto, H., Ohmomo, S., Nomura, M., Kobayashi, M., & Okamoto, T. (2000). In vitro studies on probiotic properties of lactococci. *Milchwissenschaft*, 55(5), 245-249.

Kobyliak, N., Conte, C., Cammarota, G., Haley, A. P., Styriak, I., Gaspar, L., ... & Kruzliak, P. (2016). Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. *Nutrition & metabolism*, 13(1), 14.

Konishi, Y., & Kobayashi, S. (2005). Transepithelial transport of rosmarinic acid in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(3), 583-591.

Kostic, A. D., Howitt, M. R., & Garrett, W. S. (2013). Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Genes & development*, 27(7), 701-718.

Kroon, P. A., & Williamson, G. (1999). Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 355-361.

Kroon, P. A., Faulds, C. B., Ryden, P., Robertson, J. A., & Williamson, G. (1997). Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(3), 661-667.

Kumar, N., & Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, 4, 86-93..

Kylin, E. (1923). Studien ueber das Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikämie-Syndrom. *Zentralblatt für innere Medizin*, 44, 105-127.

## L

Lai, K. K., Lorca, G. L., & Gonzalez, C. F. (2009). Biochemical properties of two cinnamoyl esterases purified from a *Lactobacillus johnsonii* strain isolated from stool samples of diabetes-resistant rats. *Applied and environmental microbiology*, 75(15), 5018-5024.

Lakhan, S. E., & Kirchgessner, A. (2011). Gut microbiota and sirtuins in obesity-related inflammation and bowel dysfunction. *Journal of translational medicine*, 9(1), 202.

Lau, D. C., Dhillon, B., Yan, H., Szmítko, P. E., & Verma, S. (2005). Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 288(5), H2031-H2041.

Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *nature*, 444(7122), 1022.

Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., ... & Gordon, J. I. (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320(5883), 1647-1651.

Li, X., Wang, N., Yin, B., Fang, D., Zhao, J., Zhang, H., ... & Chen, W. (2016). *Lactobacillus plantarum* X1 with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity ameliorates type 2 diabetes in mice. *RSC Advances*, 6(68), 63536-63547.

Lim, J. S., Mietus-Snyder, M., Valente, A., Schwarz, J. M., & Lustig, R. H. (2010). The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 7(5), 251.

Lim, S. M., Jeong, J. J., Woo, K. H., Han, M. J., & Kim, D. H. (2016). *Lactobacillus sakei* OK67 ameliorates high-fat diet-induced blood glucose intolerance and obesity in mice by inhibiting gut microbiota lipopolysaccharide production and inducing colon tight junction protein expression. *Nutrition Research*, 36(4), 337-348.

Lo, H. H., & Chung, J. G. (1999). The effects of plant phenolics, caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid on arylamine N-acetyltransferase activities in human gastrointestinal microflora. *Anticancer research*, 19(1A), 133-139.

Lombard, D. B., Chua, K. F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M., & Alt, F. W. (2005). DNA repair, genome stability, and aging. *Cell*, 120(4), 497-512.

Lumeng, C. N., & Saltiel, A. R. (2011). Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *The Journal of clinical investigation*, *121*(6), 2111-2117.

Lupo, P., González, A., & Maestro, G. (2012). Microencapsulation in alginate for food. Technologies and applications. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, *3*(1), 130-151.

## M

Mai, V. (2004). Dietary modification of the intestinal microbiota. *Nutrition reviews*, *62*(6), 235-242.

Malhotra, A., Kang, B. P., Cheung, S., Opawumi, D., & Meggs, L. G. (2001). Angiotensin II promotes glucose-induced activation of cardiac protein kinase C isozymes and phosphorylation of troponin I. *Diabetes*, *50*(8), 1918-1926.

Mallappa, R. H., Rokana, N., Duary, R. K., Panwar, H., Batish, V. K., & Grover, S. (2012). Management of metabolic syndrome through probiotic and prebiotic interventions. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, *16*(1), 20.

Malunga, L. N., & Eck, P. (2016). Inhibition of intestinal  $\alpha$ -glucosidase and glucose absorption by feruloylated arabinoxylan mono- and oligosaccharides from corn bran and wheat aleurone. *Journal of nutrition and metabolism*, *2016*.

Mancuso, C., & Santangelo, R. (2014). Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects. *Food and Chemical Toxicology*, *65*, 185-195.

Mandalari, G., Bisignano, G., Curto, R. L., Waldron, K. W., & Faulds, C. B. (2008). Production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on industrial food processing by-products. *Bioresource technology*, *99*(11), 5130-5133.

Marañón, G. (1927). *Prädiabetische Zustände*. Rudolf Novak & Comp.

Marchesini, G., Bugianesi, E., Forlani, G., Cerrelli, F., Lenzi, M., Manini, R., ... & Rizzetto, M. (2003). Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*, *37*(4), 917-923.

Marik, P. E. (2012). Colonic flora, probiotics, obesity and diabetes. *Frontiers in endocrinology*, *3*.

Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *27*, 15-25.

Massiera, F., Barbry, P., Guesnet, P., Joly, A., Luquet, S., Brest, C. M., ... & Ailhaud, G. P. (2010). A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations. *Journal of lipid research*, jlr-M006866.

Mathew, S., & Abraham, T. E. (2004). Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Critical reviews in biotechnology*, 24(2-3), 59-83.

Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412-419.

McAuley, K. E., Svendsen, A., Patkar, S. A., & Wilson, K. S. (2004). Structure of a feruloyl esterase from *Aspergillus niger*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(5), 878-887.

Millán, J., Pintó, X., Muñoz, A., Zúñiga, M., Rubiés-Prat, J., Pallardo, L. F., ... & Ascaso, J. F. (2009). Lipoprotein ratios: physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vascular health and risk management*, 5, 757.

Monteiro, R., Keating, E., Castro, P., & Azevedo, I. (2009). Abdominal cavity compliance: a participant more in the building up of visceral obesity. *Obesity*, 17(5), 937-937.

Morales, P., Brignardello, J., & Gotteland, M. (2010). La microbiota intestinal: Un nuevo actor en el desarrollo de la obesidad. *Revista médica de Chile*, 138(8), 1020-1027.

Morse, S. A., Zhang, R., Thakur, V., & Reisin, E. (2005). Hypertension and the metabolic syndrome. *The American journal of the medical sciences*, 330(6), 303-310.

Moschen, A. R., Molnar, C., Geiger, S., Graziadei, I., Ebenbichler, C. F., Weiss, H., ... & Tilg, H. (2010). Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose interleukin 6 and tumour necrosis factor  $\alpha$  expression. *Gut*, gut-2010.

Moya-Pérez, A., Neef, A., & Sanz, Y. (2015). *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 reduces obesity-associated inflammation by restoring the lymphocyte-macrophage balance and gut microbiota structure in high-fat diet-fed mice. *PLoS One*, 10(7), e0126976.

Muniyappa, R., Chen, H., Muzumdar, R. H., Einstein, F. H., Yan, X., Yue, L. Q., ... & Quon, M. J. (2009). Comparison between surrogate indexes of insulin sensitivity/resistance and hyperinsulinemic euglycemic clamp estimates in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(5), E1023-E1029.

Múscolo, J. M., D'Ambrosio, M. L., Núñez, M., Trebisacce, C., Lastretti, G., Doallo, C., ... & Brites, F. (2004). Síndrome metabólico en mujeres obesas.: Evaluación de biomarcadores de resistencia insulínica y lipoproteicos. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 38(4), 481-488.

## N

Naczki, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(5), 1523-1542.

Nambiar, R. B., Sellamuthu, P. S., & Perumal, A. B. (2018). Development of milk chocolate supplemented with microencapsulated *Lactobacillus plantarum* HM47 and to determine the safety in a Swiss albino mice model. *Food Control*, 94, 300-306.

Naowaboot, J., Piyabhan, P., Munkong, N., Parklak, W., & Pannangpetch, P. (2016). Ferulic acid improves lipid and glucose homeostasis in high-fat diet-induced obese mice. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 43(2), 242-250.

Nascimento, A. F., Sugizaki, M. M., Leopoldo, A. S., Lima-Leopoldo, A. P., Luvizotto, R. A., Nogueira, C. R., & Cicogna, A. C. (2008). A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 52(6), 968-974.

Neish, A. S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136(1), 65-80.

Nilsson, C., Raun, K., Yan, F. F., Larsen, M. O., & Tang-Christensen, M. (2012). Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(2), 173.

Nishitsuji, K., Xiao, J., Nagatomo, R., Umemoto, H., Morimoto, Y., Akatsu, H., ... & Tsuneyama, K. (2017). Analysis of the gut microbiome and plasma short-chain fatty acid profiles in a spontaneous mouse model of metabolic syndrome. *Scientific reports*, 7(1), 15876.

Nishizawa, C., Ohta, T., Egashira, Y., & Sanada, H. (1998). Ferulic acid esterase activities of typical intestinal bacteria. *Food Science and Technology International, Tokyo*, 4(1), 94-97.

Núñez, I. N., Galdeano, C. M., de LeBlanc, A. D. M., & Perdigón, G. (2014). Evaluation of immune response, microbiota, and blood markers after probiotic bacteria administration in obese mice induced by a high-fat diet. *Nutrition*, 30(11-12), 1423-1432.

Núñez, I. N., Galdeano, C. M., de LeBlanc, A. D. M., & Perdigon, G. (2015). Lactobacillus casei CRL 431 administration decreases inflammatory cytokines in a diet-induced obese mouse model. *Nutrition, 31*(7-8), 1000-1007.

## O

Oboh, G., Agunloye, O. M., Adefegha, S. A., Akinyemi, A. J., & Ademiluyi, A. O. (2015). Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): a comparative study. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology, 26*(2), 165-170.

Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry, 95*(2), 351-358.

Okosun, I. S., Liao, Y., Rotimi, C. N., Prewitt, T. E., & Cooper, R. S. (2000). Abdominal adiposity and clustering of multiple metabolic syndrome in White, Black and Hispanic Americans. *Annals of epidemiology, 10*(5), 263-270.

Olthof, M. R., Hollman, P. C., & Katan, M. B. (2001). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of nutrition, 131*(1), 66-71.

Ou, L., Kong, L. Y., Zhang, X. M., & Niwa, M. (2003). Oxidation of ferulic acid by Momordica charantia peroxidase and related anti-inflammation activity changes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin, 26*(11), 1511-1516.

Ou, S., Li, Y., & Gao, K. (1999). A study on scavenging activity of wheat bran dietary fiber for free radical. *Acta Nutr Sin, 21*, 191-194.

Ou, S., & Kwok, K. C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 84*(11), 1261-1269.

Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews immunology, 11*(2), 85.

Ozgen, I. T., Tascilar, M. E., Bilir, P., Boyraz, M., Guncikan, M. N., Akay, C., & Dundaroz, R. (2012). Oxidative stress in obese children and its relation with insulin resistance. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 25*(3-4), 261-266.

## P

Paiva, L. B. D., Goldbeck, R., Santos, W. D. D., & Squina, F. M. (2013). Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 49*(3), 395-411.

Panagiotou, G., Olavarria, R., & Olsson, L. (2007). Penicillium brasilianum as an enzyme factory; the essential role of feruloyl esterases for the hydrolysis of the plant cell wall. *Journal of biotechnology*, *130*(3), 219-228.

Panchal, S. K., & Brown, L. (2010). Rodent models for metabolic syndrome research. *BioMed Research International*, *2011*.

Park, D. Y., Ahn, Y. T., Huh, C. S., McGregor, R. A., & Choi, M. S. (2013). Dual probiotic strains suppress high fructose-induced metabolic syndrome. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *19*(2), 274.

Parra Huertas, R. A. (2010). Food microencapsulation: a review. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, *63*(2), 5669-5684.

Pasin, B. L., Azón, C. G., & Garriga, A. M. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, *3*(1), 130-151.

Pattison, D. I., & Davies, M. J. (2006). Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases. *Current medicinal chemistry*, *13*(27), 3271-3290.

Peighambardoust, S. H., Tafti, A. G., & Hesari, J. (2011). Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science & Technology*, *22*(5), 215-224.

Pekkinen, J., Rosa, N. N., Savolainen, O. I., Keski-Rahkonen, P., Mykkänen, H., Poutanen, K., ... & Hanhineva, K. (2014). Disintegration of wheat aleurone structure has an impact on the bioavailability of phenolic compounds and other phytochemicals as evidenced by altered urinary metabolite profile of diet-induced obese mice. *Nutrition & metabolism*, *11*(1), 1.

Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., & Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European journal of clinical nutrition*, *64*(S3), S112.

Prabhakar PK, Prasad R, Ali S, Doble M (2013) Synergistic interaction of ferulic acid with commercial hypoglycemic drugs in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytomedicine* 20:488-494

Prados-Bo, A., Gómez-Martínez, S., Nova, E., & Marcos, A. (2015). El papel de los probióticos en el manejo de la obesidad. *Nutrición Hospitalaria*, *31*(1).

Preiss, D., & Sattar, N. (2008). Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clinical science*, *115*(5), 141-150

## R

Raimondi, S., Anighoro, A., Quartieri, A., Amaretti, A., Tomás-Barberán, F. A., Rastelli, G., & Rossi, M. (2015). Role of bifidobacteria in the hydrolysis of chlorogenic acid. *MicrobiologyOpen*, 4(1), 41-52.

Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 773-780.

Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Propionibacterium jensenii* 702 by spray drying in goat's milk. *Small Ruminant Research*, 123(1), 155-159.

Raoult, D. (2008). Obesity pandemics and the modification of digestive bacterial flora. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 27 (2008), pp. 631-634

Raoult, D. (2009). Probiotics and obesity: a link? *Nature Reviews. Microbiology*, 7(9), 616.

Reaven, G. M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37(12), 1595-1607.

Reyes, A. R. P., Ramos, P. C., & Hernández, P. A. (2017). Probióticos y prebióticos: Una revisión de la normativa internacional. *REVISTA PERSPECTIVA*, 18(2), 158-167.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.

Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., ... & Guarner, F. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104(S2), S1-S63.

Rodríguez, Y. A., Rojas, A. F., & Rodríguez, S. (2016). Encapsulation of Probiotics for Food Applications. *Biosalud*, 15(2), 106-115.

Rodríguez-Barona, S., Montes, L. M., & Ramírez, D. D. J. (2012). Microencapsulación de probióticos mediante secado por aspersión en presencia de prebióticos. *Vitae*, 19(1), S186-S188.

Rondini, L., Peyrat-Maillard, M. N., Marsset-Baglieri, A., Fromentin, G., Durand, P., Tomé, D., ... & Berset, C. (2004). Bound ferulic acid from bran is more bioavailable than the free compound in rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13), 4338-4343.

Rosini, T. C., da Silva, A. S. R., & de Moraes, C. (2012). Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Revista da Associação Médica Brasileira (English Edition)*, 58(3), 383-387.

Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European journal of nutrition*, 57(1), 1-24.

Russo, M., Fabersani, E., Abeijón-Mukdsi, M. C., Ross, R., Fontana, C., Benítez-Páez, A., ... & Medina, R. B. (2016). *Lactobacillus fermentum* CRL1446 ameliorates oxidative and metabolic parameters by increasing intestinal feruloyl esterase activity and modulating microbiota in caloric-restricted mice. *Nutrients*, 8(7), 415.

## S

Salminen, S., & Von Wright, A. (2004). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. CRC Press.

Santacruz, A., Collado, M. C., Garcia-Valdes, L., Segura, M. T., Martin-Lagos, J. A., Anjos, T., ... & Sanz, Y. (2010). Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *British Journal of Nutrition*, 104(1), 83-92.

Sanz, Y., Santacruz, A., & Gauffin, P. (2010). Gut microbiota in obesity and metabolic disorders. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), 434-441.

Sanz, Y., & Moya-Pérez, A. (2014). Microbiota, inflammation and obesity. In *Microbial endocrinology: The microbiota-gut-brain axis in health and disease*(pp. 291-317). Springer, New York, NY.

Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.

Shahidi, F., & Chandrasekara, A. (2015). The use of antioxidants in the preservation of cereals and low-moisture foods. In *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* (pp. 413-432).

Shapiro, A., Mu, W., Roncal, C., Cheng, K. Y., Johnson, R. J., & Scarpace, P. J. (2008). Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(5), R1370-R1375.

Sharma, P., Bhardwaj, P., & Singh, R. (2016). Administration of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum* ameliorated hyperglycemia, dyslipidemia, and oxidative stress in diabetic rats. *International journal of preventive medicine*, 7.

Shen, J., Obin, M. S., & Zhao, L. (2013). The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Molecular aspects of medicine*, 34(1), 39-58.

Shokri, Z., Fazeli, M. R., Ardjmand, M., Mousavi, S. M., & Gilani, K. (2015). Factors affecting viability of *Bifidobacterium bifidum* during spray drying. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 7.

Simpson, P. J., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2005). Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 493-501.

Slavin, J., Jacobs, D., & Marquart, L. (1997). Whole-grain consumption and chronic disease: protective mechanisms. *Nutrition and cancer*, 27(1), 14-21.

Smith, M. M., & Hartley, R. D. (1983). Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants. *Carbohydrate Research*, 118, 65-80.

Son, M. J., Rico, C. W., Nam, S. H., & Kang, M. Y. (2010). Influence of oryzanol and ferulic acid on the lipid metabolism and antioxidative status in high fat-fed mice. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 46(2), 150-156.

Sonta, T., Inoguchi, T., Tsubouchi, H., Sekiguchi, N., Kobayashi, K., Matsumoto, S., ... & Nawata, H. (2004). Evidence for contribution of vascular NAD (P) H oxidase to increased oxidative stress in animal models of diabetes and obesity. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(1), 115-123.

Speakman, J., Hambly, C., Mitchell, S., & Król, E. (2007). Animal models of obesity. *Obesity Reviews*, 8, 55-61.

Srinivasan, M., Sudheer, A. R., & Menon, V. P. (2007). Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 40(2), 92-100.

Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, 36(1), 1-29.

Sweazea, K. L., Lekic, M., & Walker, B. R. (2010). Comparison of mechanisms involved in impaired vascular reactivity between high sucrose and high fat diets in rats. *Nutrition & metabolism*, 7(1), 48.

## T

Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., Malhotra, M., Coussa-Charley, M., Kahouli, I., Jones, M. L., ... & Prakash, S. (2012). Probiotic ferulic acid esterase active *Lactobacillus fermentum* NCIMB 5221 APA microcapsules for oral delivery: preparation and in vitro characterization. *Pharmaceuticals*, 5(2), 236-248.

Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., Malhotra, M., Jones, M. L., Labbé, A., Rodes, L., ... & Prakash, S. (2014). Effect of orally administered *L. fermentum* NCIMB 5221 on markers of metabolic syndrome: an in vivo analysis using ZDF rats. *Applied microbiology and biotechnology*, *98*(1), 115-126.

Topakas, E., Vafiadi, C., & Christakopoulos, P. (2007). Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochemistry*, *42*(4), 497-509.

Torres, S., Fabersani, E., Marquez, A., & Gauffin-Cano, P. (2018). Adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. The proactive role of probiotics. *European journal of nutrition*, 1-17.

Tsai, C. C., Chou, L. C., Lai, S. E., & Huang, C. C. (2016). Effect of cholesterol lowering multiplex lactic acid bacteria on lipid metabolism in a hamster model. *African Journal of Microbiology Research*, *10*(20), 708-716.

Tschöp, M., & Heiman, M. L. (2001). Rodent obesity models: an overview. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, *109*(06), 307-319.

Tsou, M. F., Hung, C., Lu, H. F., Wu, L. T., Chang, S., Chang, H. L., ... & Chung, J. G. (2000). Effects of caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid on growth and arylamine N-acetyltransferase activity in *Shigella sonnei* (group D). *Microbios*, *101*(398), 37-46.

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *nature*, *444*(7122), 1027.

Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science translational medicine*, *1*(6), 6ra14-6ra14.

## V

Vague, J. (1947). Sexual differentiation, a factor affecting the forms of obesity. *Presse Med*, *30*, 339-340.

Van Beek, S., & Priest, F. G. (2000). Decarboxylation of substituted cinnamic acids by lactic acid bacteria isolated during malt whisky fermentation. *Applied and environmental microbiology*, *66*(12), 5322-5328.

Vasselli, J. R. (2012). The Role of Dietary Components in Leptin Resistance. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, *3*(5), 736-738. <https://doi.org/10.3945/an.112.002659>

Vega, G. L., Barlow, C. E., Grundy, S. M., Leonard, D., & DeFina, L. F. (2014). Triglyceride-to-high-density-lipoprotein-cholesterol ratio is an index of heart disease mortality and of incidence of type 2 diabetes mellitus in men. *Journal of Investigative Medicine*, *62*(2), 345-349.

Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F., Salojärvi, J., Kootte, R. S., Bartelsman, J. F., ... & Derrien, M. (2012). Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*, *143*(4), 913-916.

## W

Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K., & Scherer, P. E. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature medicine*, *19*(10), 1338.

Wang, X., Geng, X., Egashira, Y., & Sanada, H. (2004). Purification and characterization of a feruloyl esterase from the intestinal bacterium *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and environmental microbiology*, *70*(4), 2367-2372.

Williamson, G. (2013). Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Molecular nutrition & food research*, *57*(1), 48-57.

Wong, S. K., Chin, K. Y., Suhaimi, F. H., Fairus, A., & Ima-Nirwana, S. (2016). Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutrition & metabolism*, *13*(1), 65.

## Y

Yamashita, H., Fujisawa, K., Ito, E., Idei, S., Kawaguchi, N., Kimoto, M., ... & Tsuji, H. (2007). Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in Type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *71*(5), 1236-1243.

Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., & Fisk, I. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. *Journal of functional foods*, *6*, 205-214.

## Z

Zárate, G., Chaia, A. P., González, S., & Oliver, G. (2000). Viability and  $\beta$ -galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. *Journal of Food Protection*, *63*(9), 1214-1221.

Zavaglia, A. G., Kociubinski, G., Perez, P., & DE ANTONI, G. R. A. C. I. E. L. A. (1998). Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. *Journal of food protection*, *61*(7), 865-873.

Zhang, C., Zhang, M., Wang, S., Han, R., Cao, Y., Hua, W., ... & Zhao, G. (2010). Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *The ISME journal*, 4(2), 232.

Zhao, Z., Egashira, Y., & Sanada, H. (2004). Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. *The Journal of nutrition*, 134(11), 3083-3088.

Zhao, Z., & Moghadasian, M. H. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. *Food Chemistry*, 109(4), 691-702.

Zhouen, Z., Side, Y., Weizhen, L., Wenfeng, W., Yizun, J., & Nianyun, L. (1998). Mechanism of reaction of nitrogen dioxide radical with hydroxycinnamic acid derivatives: a pulse radiolysis study. *Free radical research*, 29(1), 13-16.

Zimmet, P. Z., Alberti, K. G. M., & Shaw, J. E. (2005). Mainstreaming the metabolic syndrome: a definitive definition. *Medical Journal of Australia*, 183(4), 175.

Zivkovic, A. M., German, J. B., & Sanyal, A. J. (2007). Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease-. *The American journal of clinical nutrition*, 86(2), 285-300.

