



Universidad de Concepción  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Efecto de la aclimatación producida por estrés ácido a pH 2.6  
en la cepa UCO\_979C *Lactobacillus salivarius* con actividad  
anti -*Helicobacter pylori*".

Seminario de Título presentado a la  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Para optar al título de Biólogo

Enrique Armando Sanhueza Carrera

Concepción, Diciembre del 2013

## Resumen

A la microbiota humana normal (MHN) se le atribuyen diversas funciones imprescindibles para la salud, dentro de ellas se encuentra la protección frente a bacterias patógenas como *Helicobacter pylori*, que afecta el estómago. Esta bacteria es un bacilo Gram negativo, que se asocia con diversas patologías gastrointestinales, dentro de ellas el cáncer gástrico. Se estima hoy en día el 50% de la población mundial la presente y en Chile alrededor del 70%, prevaleciendo siempre en los sectores socioeconómicos bajos. La forma de tratamiento actual consiste en una triple terapia antibiótica. Sin embargo, los resultados obtenidos en el tratamiento han sido variables debido a diversos efectos secundarios. Es por esto que se buscan una nueva alternativa para la prevención de la infección por esta bacteria, dentro de ella se considera la terapia en base a probióticos. Los probióticos han sido definidos por la organización mundial de la salud (OMS) como microorganismos vivos que cuando son suministrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud. Las bacterias que son consideradas probióticas son las pertenecientes al género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, ambas consideradas bacterias ácido lácticas (BAL) producto que en su metabolismo generan diversos ácidos orgánicos como el láctico y acético. Los *Lactobacillus* son bacterias bacilares Gram positivas que en el último tiempo han sido consideradas relevante por las diversas funciones positivas a la salud. Dentro de este género la especie *Lactobacillus salivarius* se le asocia a que puede tolerar de forma eficiente las condiciones del huésped, porque mejora la biodisponibilidad de los nutrientes, por presentar efectos inmunomoduladores, ayuda a mejorar los síntomas de enfermedades inflamatorias del síndrome del intestino irritable, colitis y estreñimiento y porque es capaz de adherirse a células intestinales (enterocitos). Sin embargo, uno de los criterios fundamentales para que una bacteria sea considerada probiótica y ejerza un rol positivo a la salud en su sitio blanco el estómago, es la tolerancia a pH similares a los encontrados en este órgano. La aclimatación a pH ácidos similares a los que se puede encontrar en al estómago humano constituye una opción para mejorar el rendimiento de nuevos productos

probióticos aplicados a nivel gastrointestinal. *Lactobacillus* presentan diversas estrategias para sobrevivir a los estrés ambientales, dentro de ellos se encuentran la producción de proteínas del tipo chaperonas o proteínas de choque térmico que reparan a otras proteínas como las de membrana y el ADN dañado, también existe una sobre expresión de proteínas que conforman la bombas de protones y producción de azúcares en forma de exopolisacáridos (EPS) para protección.

En este estudio se empleó la cepa UCO\_979C *Lactobacillus salivarius* nativa y su variante aclimatada a pH 2.6 de aislamiento gastrointestinal humano, seleccionada por sus propiedades probióticas y su actividad anti *-Helicobacter pylori*, evaluadas in vitro, en modelo celular y animal. La variante aclimatada posee la particularidad de tolerar el pH del medio a 2.6 debido a un proceso generacional que consistió en someterla a pasos sucesivos desde pH 6.8 hasta pH 2.6 disminuyendo gradualmente el valor de pH. En esta cepa tolerante al pH ácido se evaluó el efecto del estrés en la morfología celular, se realizó la cuantificación en la producción de EPS y se le determinó el grado de incidencia en la citología y cambios estructurales externos mediante pruebas analíticas y físicas. Sin embargo, el estrés ácido también involucra cambios a nivel de proteínas por la expresión de genes, es por esto que se realizaron análisis a nivel de proteínas totales y de membrana, por último para evaluar si el estrés ácido modifica el rol probiótico de la variante aclimatada frente a la cepa ATCC 43504 *Helicobacter pylori*, que se asocia al desarrollo de cáncer gástrico humano, se realizaron ensayos de inhibición in vitro.

Los resultados confirman efectivamente que existe un cambio en la morfología, evidenciándose una disminución en las estructuras y tamaño celular, además los EPS rodean la célula en manera de proteger a la difusión de los protones al interior celular. La producción de EPS en medios óptimos de crecimiento demostró que ante el estrés ácido se sobreproducen hasta las primeras 24 horas. En cuanto las pruebas físicas y analíticas se determinó que el estrés ácido modifica componentes importantes a nivel macromolecular dentro de ellos las amidas en las proteínas, en los azúcares los enlaces glucósidos y ramificaciones se ven alterados, los ácidos grasos se ven modificados a nivel de sus grupos metilos y

enlaces éster. A nivel de expresión de proteínas totales y de membrana se presenciaron bandas en la variante aclimatada que no se visualizaron en la cepa nativa, permitiendo a si determinar una presencia y ausencia de estas proteínas que probablemente juegan un rol importante en el estrés ácido. Los ensayos in vitro demostraron que el rol probiótico anti *-Helicobacter pylori* aumenta a condiciones de pH ácidos. Los metabolitos generados en esta condición pueden tener un efecto mayor sobre la sobrevivencia de *Helicobacter pylori*.

Estos resultados ponen de manifiesto que la estrategia de tolerancia a estrés ácido o aclimatación mostrada por algunas bacterias, permite la generación de variantes, las cuales podrían tener aplicación en el desarrollo de probióticos de uso gástrico.

