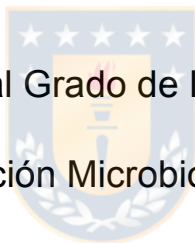




Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Mención Microbiología

**Comportamiento de la cepa *Lactobacillus fermentum*
UCO-979C encapsulada en carragenina para su potencial
uso en un producto probiótico no lácteo como alternativa
preventiva de la infección por *Helicobacter pylori***



Tesis Para optar al Grado de Doctor en Ciencias
Mención Microbiología

CRISTIAN FELIPE GUTIERREZ ZAMORANO

CONCEPCIÓN-CHILE 2019

Profesor guía: Dra. Apolinaria García Cancino
Depto. Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dra. Apolinaria García Cancino.

Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Miguel Martínez Poblete.

Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Patricio Godoy Martínez.

Facultad de Medicina
Universidad Austral



Dr. Martín Gotteland.

Profesor Evaluador Externo Instituto de Tecnología de los Alimentos INTA
Universidad de Chile

Dr. Victor Campos Araneda.

Director Programa Doctorado
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



Tesis financiada con el apoyo de:

- CONICYT-PCHA/ Doctorado Nacional/2012-21120911

- Innova Chile, “Desarrollo de un producto probiótico no lácteo para la prevención de patologías asociadas a *Helicobacter pylori*” código 14IDL2-29744

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los integrantes del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de Concepción, liderados por mi tutora, la Dra. Apolinaria García-Cancino, en este lugar encontré una forma distinta de desarrollar mi perfil profesional y aportar con mi grano de arena a la microbiología, como también aprender de ella.

Al Laboratorio de *ex vivo* del Centro Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, liderado por la Dra. Marisela González, que me acogieron en más de una ocasión para aprender de un tema que en pocas partes del mundo se desarrolla.

A mi familia, profesores y amigos dentro y fuera de la universidad que me han apoyado en estos años. Y a todos quienes de una u otra forma aportaron en este trabajo.



TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	XI
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
I.I <i>Helicobacter pylori</i>	1
I.II Tratamiento de <i>H. pylori</i>	3
I.III Probióticos	7
I.IV Encapsulación de cepas probióticas	9
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
Hipótesis	13
Objetivo General	13
Objetivos específicos	13
CAPÍTULO III: EFFECT OF CARRAGEENAN ENCAPSULATION OF <i>L. FERMENTUM</i> UCO-979C IN ITS VIABILITY, PROBIOTIC PROPERTIES AND ANTI- <i>H. PYLORI</i> ACTIVITY	14
CAPÍTULO IV: INCREASED ANTI- <i>HELICOBACTER PYLORI</i> EFFECT OF THE PROBIOTIC <i>LACTOBACILLUS FERMENTUM</i> UCO-979C STRAIN ENCAPSULATED IN CARRAGEENAN EVALUATED IN GASTRIC SIMULATIONS UNDER FASTING CONDITIONS	58
CAPÍTULO V: UNA CEPA DE <i>LACTOBACILLUS FERMENTUM</i> RGM 2341 Y SU USO PARA CONTRARRESTAR LA REACCIÓN INFLAMATORIA CAUSADA POR ENTEROBACTERIAS.	82
CAPÍTULO VI: UNA FORMULACIÓN DE ENCAPSULACIÓN PARA <i>LACTOBACILLOS</i> QUE PERMITE PROLONGAR SU VIABILIDAD	91
CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN	102
CONCLUSIONES	114
PROYECCIÓN	115
REFERENCIAS	116

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Trastornos gástricos como consecuencia de la infección por *H. pylori*. Se muestran los porcentajes promedio de prevalencias en la población mundial infectada, de cada una de estas patologías **1**

Figura 2. Enfoques alternativos a la actual terapia alopática contra *H. pylori*. **6**

Figura 3. Composición química de carrageninas. **11**

CAPÍTULO III

Fig. 1 a) Capsules obtained using 1:1 2% w/v kappa and lambda carrageenan in 0.01%w/v CaCl₂. b) Size decrease of capsules at 37 °C under agitation in the time **27**

Fig. 2 Counts of encapsulated or non-encapsulated *L. fermentum* UCO-979C strain exposed during 12 h to stress conditions in MRS broth. a) pH 3.0. b) 3% w/v bile salts **29**

Fig. 3 1:1 2% kappa and lambda carrageenan capsules with or without *L. fermentum* UCO-979C probiotic strain. a) Micrography of the surface of a probiotic free capsule (magnification 60X). b) Micrography of surface of a probiotic containing capsule (magnification 60X). c) Cross section of a probiotic containing capsule on the same day of preparation (magnification 10.000X). d) Cross section of a probiotic containing capsule after 60 days of storage at 4 °C in saline solution, pH 7.0 (magnification 10.000X). e) Cross section of a probiotic containing capsule after 60 days of storage at 4 °C in saline solution, pH 3.0 (magnification 10.000X). f) Cross section of a probiotic containing capsule after 60 days of storage at 4 °C in 3% bile salts in saline solution (magnification 10.000X) **30**

Fig. 4 *L. fermentum* UCO-979C strain survival during 12 h when exposed to 1.65 g/L pepsin, 0.43 g/L amylase and 0.6 mM urea. a) Bacterial counts of non-encapsulated *L. fermentum* UCO-979C. b) Bacterial counts of carrageenan encapsulated *L. fermentum* UCO-979C **31**

Fig. 5 Biofilm formation on glass or polystyrene by non-encapsulated *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* UCO-979C released from capsules. McFarland 0.5 or 5 inoculums were incubated in 24 wells plates during 24 h in MRS broth. Biofilm formation was measured spectrophotometrically at 570 nm after crystal violet staining **34**

Fig. 6 Percentage viability of *H. pylori* SS1 (10⁸ CFU/mL) after 2 h of incubation in PBS plus 2% w/v kappa or lambda carrageenan. a) Viability of *H. pylori* SS1 strain incubated during 2 h with kappa or lambda carrageenan. *H. pylori* viability was evaluated spectrophotometrically measuring resazurin reduction. Six replicates were done. Bars correspond to SD. *** Statistical significance (p<0.05). b) SEM of a cross section of a carrageenan matrix showing *H. pylori* SS1 (magnification **36**

10.000X)

Fig. 7 AGS cells incubated in the presence of 1:1 2% w/v kappa and lambda carrageenan in 0.01% CaCl₂. a) Viability of AGS cells incubated for 2, 4 or 6 h in carrageenan. AGS cells viability was evaluated spectrophotometrically measuring resazurin reduction. Six replicates were done. Bars correspond to SD. *** Statistical significance (p<0.05). b) and c) SEM observations of AGS cells incubated in the presence of kappa and lambda carrageenan (magnification 1000X and 5000X, respectively)

38

Fig. 8 Effect of probiotic *L. fermentum* UCO-979C over *H. pylori* SS1 (10⁸ CFU/mL) adherence on AGS cells. AGS cells were treated with the probiotic, either encapsulated or non-encapsulated, or carrageenan 1 h previous to a 1 h exposure to *H. pylori* SS1

39

Fig. 9 FITC-labelled *L. fermentum* UCO-979C fluorescence detected by an I-BOX equipment with silver green filter allowing to assign colors depending on intensity of FITC fluorescence (red for high intensity and green for low intensity while blue indicates absence of fluorescence). a) *In vitro* fluorescence of FITC-labelled kappa and lambda carrageenan encapsulated probiotic showing high fluorescence. b) *In vitro* observation of non-labelled kappa and lambda carrageenan encapsulated probiotic showing that both carrageenan and the unlabeled probiotic produced fluorescence. c) *In vivo* fluorescence produced by FITC-labelled kappa and lambda carrageenan encapsulated probiotic inoculated into Mongolian gerbil revealing the presence of the probiotic in the mouth and stomach, showing high intensity FITC fluorescence indicative of high presence of *L. fermentum* UCO-979C probiotic strain

41

Fig. 10 *L. fermentum* UCO-979C and *H. pylori* SS1 adherence to Mongolian gerbil's stomach prophylactically treated with the probiotic and then challenged with the pathogen. iBox images with silver green filter allowing to assign colors depending on intensity of FITC fluorescence (red for high intensity and green for low intensity while blue indicates absence of fluorescence). Images at left correspond to the whole organ and images at right correspond to longitudinally sectioned and opened organ. Numbering code 1: antrum, 2: body and 3: fundus. a) Non-encapsulated FITC-labelled *L. fermentum* UCO-979 adherence two days after inoculation, showing adherence to the antrum and body. b) FITC-labelled *H. pylori* SS1 adherence two days after inoculation, showing adherence to the antrum and body. c) Adherence of FITC-labelled *L. fermentum* UCO-979C inoculated together with lambda carrageenan, until day 14, and challenged with FITC-labelled *H. pylori* SS1, showing bacterial adherence on the antrum, body and fundus

43

CAPÍTULO IV

Figure 1. Counts of *H. pylori* SS1 strain challenged with planktonic or carrageenan encapsulated *L. fermentum* UCO-979C probiotic strain or bacteria-free carrageenan capsules under simulated gastric conditions and fasting. Bars indicate the standard deviation of 3 replicates. Significant differences: * = p<0.05, ** = p<0.01

66

Figure 2. Counts of *H. pylori* SS1 strain challenged with planktonic or encapsulated

67

L. fermentum UCO-979C probiotic strain under simulated gastric conditions and administration of a healthy adult standard diet. Bars indicate the standard deviation of 3 replicates. Significant differences: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$

Figure 3. Counts of *H. pylori* SS1 strain, subjected to simulated gastric conditions, challenged with carrageenan encapsulated *L. fermentum* UCO-979C probiotic strain under fasting or healthy adult standard diet. Bars indicate the standard deviation of 3 replicates. Significant differences: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$

67

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I

Tabla 1. Tratamientos indicados para la erradicación de *Helicobacter pylori*. 4

Tabla 2. Modo de acción y mecanismos de resistencia de los agentes antimicrobianos utilizados para el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. 5

Tabla 3.- Comparación de las características y/o propiedades de la carragenina kappa, iota y lamda 12

CAPÍTULO III

Table 1. Qualitative characteristics (consistency and fusion time at 100°C) of 2% kappa and lambda carrageenan mixtures 27

Table 2. *H. pylori* SS1 inhibition by probiotic *L. fermentum* UCO-979C, either released from carrageenan capsules or non-encapsulated, assayed using the radial diffusion method in Columbia agar supplemented with defibrillated horse blood or horse serum. 35

Table 3. *L. fermentum* UCO-979C and *H. pylori* SS counts in different regions of the stomach of Mongolian gerbils. Upper data correspond to animals receiving the probiotic or *H. pylori* SS1 and colonies counted on day 2. Lower data correspond to animals receiving the probiotic up to day 14, then infected three times during a 10 days period with *H. pylori* SS1 and colonies counted on day 25. 42

CAPÍTULO IV

Table 1. Conditions and strains used in the gastric simulations. 64

RESUMEN

La infección por *Helicobacter pylori* es una de las enfermedades infecciosas crónicas más frecuentes en la actualidad. En Chile, reportes de la prevalencia de esta infección varía entre un 60% y 79%. La mayor parte de los sujetos infectados permanecen asintomáticos; sin embargo, entre un 10-15% desarrollan úlcera gástrica o duodenal, otros adenocarcinoma y un porcentaje mínimo linfoma de MALT. Actualmente, numerosas terapias basadas en antibióticos están disponibles. Sin embargo, éstas presentan varios problemas asociados, incluyendo la aparición de resistencia a los antibióticos que se utilizan y los efectos adversos asociados al tratamiento, el riesgo de re-infección y el alto costo de la terapia antibiótica. Las terapias de erradicación con uso de antibióticos fracasan entre un 20 y 80% de los casos, según la población estudiada. El retraso en el desarrollo de una vacuna para prevenir o erradicar la infección ha fomentado la investigación de nuevos enfoques terapéuticos.

Dado que *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica y despliega su virulencia a través de múltiples mecanismos, es deseable contar con agentes profilácticos que puedan impedir o reducir la colonización y, por lo tanto, proteger al huésped. Es en este escenario que los probióticos se destacan como una alternativa emergente y atractiva para el manejo y la prevención de las enfermedades gastrointestinales. Los probióticos ejercen su función de una manera directa o indirecta a través de la modificación de la microbiota endógena, o bien realizando un efecto inmunomodulador. Los productos alimenticios suplementados con probióticos son generalmente derivados lácteos y en escasas ocasiones productos naturales como vegetales fermentados en preparaciones caseras, no existiendo en el mercado un producto alimenticio suplementado con cepas probióticas de origen gástrico humano para el manejo preventivo de la infección por *H. pylori*.

Uno de los principales impedimentos tecnológicos involucrados en la incorporación de cepas probióticas en formulaciones alimenticias no lácteas radica en la baja viabilidad de los microorganismos durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos, sumado a la pérdida que normalmente sufren las cepas probióticas debido al efecto de enzimas, acidez gástrica o a la acción de las sales biliares, en su paso por el tracto gastrointestinal, lo que en conjunto, impiden su efecto óptimo. Así, la encapsulación de cepas bacterianas en polímeros naturales es una opción manejable para aumentar la viabilidad de las bacterias durante el proceso productivo y el paso por el tracto digestivo.

El presente trabajo tuvo como objetivo general, evaluar el comportamiento de las propiedades probióticas y actividad anti-*H. pylori* de la cepa *Lactobacillus*

fermentum UCO-979C libre y encapsulada en carragenina para su potencial uso en un producto probiótico no lácteo como alternativa preventiva de la infección por *H. pylori*.

Para lograr lo propuesto se encapsuló la cepa probiótica *L. fermentum* UCO-979C con carrageninas, y se sometió a condiciones de estrés (pH, sales biliares, enzimas) para comprobar su viabilidad, mantención de propiedades probióticas y actividad anti-*H. pylori*. Ensayos en línea celular fueron realizados para comprobar el efecto antiadherente de la cepa probiótica y la carragenina y se revisó el efecto profiláctico del consumo del probiótico junto al polisacárido en un modelo animal. Además, se sometió la cepa planctónica y encapsulada a una simulación gástrica, realizada por primera vez para esta cepa con los componentes de una dieta chilena estándar.

Los resultados *in vitro* mostraron que la encapsulación con carragenina no afectó la viabilidad del probiótico y favoreció su supervivencia en condiciones de estrés, como pH bajo (3.0), sales biliares (3%) y actividad enzimática (pepsina). Además, la encapsulación con carragenina no afectó las propiedades probióticas ni la actividad anti-*H. pylori* de la cepa *L. fermentum* UCO-979C. Usando el modelo de gerbo de Mongolia, se demostró que la mezcla de probiótico y carragenina reducía la colonización de *H. pylori* en el estómago del gerbo (reducción de 3 logaritmos o indetectable). Cuando se evaluó el efecto de la cepa probiótica encapsulada con carrageninas, contra la cepa patogénica *H. pylori* SS1 en condiciones gástricas simuladas (en ayunas o dieta estándar). Las simulaciones mostraron colaboración entre *L. fermentum* y las carrageninas contra el patógeno, siendo indetectable a 1,5 o 2,5 h, respectivamente.

Por lo tanto, se puede concluir que la encapsulación en carragenina de *L. fermentum* UCO-979C no altera las propiedades del probiótico, la carragenina aporta actividad anti-*H. pylori* y que la administración del probiótico en ayunas (ambiente ácido) proporciona un mejor efecto anti- *H. pylori* que administrándolo asociado a la dieta.

ABSTRACT

Helicobacter pylori infection is presently one of the most frequent chronic infectious diseases. Reports of the prevalence of this infection in Chile ranges from 60% to 79%. Most infected individuals remain asymptomatic; nevertheless, between 10 - 15% of them develop gastric or duodenal ulcers or adenocarcinoma and a small percentage will develop MALT lymphoma. A number of therapies, based on antibiotics, are presently available but they are associated to problems including the emergence of resistance to the antibiotics used and the adverse effects associated to the treatment, the risk of re-infection and the high cost of the antibiotic therapy. Depending on the population studied, eradication therapies fail in 20 to 80% of the cases. The lack of a vaccine to prevent or eradicate *H. pylori* infection has encouraged the search for new approaches to deal with this problem.

Since *H. pylori* colonizes the gastric mucosa making use of multiple virulence mechanisms, it is desirable to have prophylactic agents able to avoid or reduce colonization, thus protecting the host. In this scenario, probiotics stand out as an emerging and attractive alternative to handle and to prevent gastrointestinal diseases. Probiotics act directly or indirectly, either modifying the endogenous microbiota or acting as immunomodulators. Foods supplemented with probiotics usually are dairy derivatives and occasionally homemade fermented vegetal products. Food supplemented with probiotics of human gastric origin to prevent *H. pylori* infection are not presently available in the market.

One of the main technological problems to incorporate probiotics as supplements to non-dairy foods is the low viability of microorganisms during the processing and storage of food in addition to the effect of enzymes, gastric acidity or the activity of bile salts in the gastrointestinal tract. Altogether, the expected benefit to be provided by probiotics is far from optimal. Encapsulation of bacterial strains, in natural polymers is a practical option to improve the viability of bacteria during production processing and during the passage through the digestive tract. The general aim of this work was to evaluate if carrageenan encapsulation of the probiotic strain *Lactobacillus fermentum* UCO-979C affected its probiotic properties and anti-*H. pylori* activity in order to use it, as a supplement for a non-dairy probiotic food, as a preventive alternative to the infection by this pathogen.

Therefore, carrageenan encapsulated probiotic *L. fermentum* UCO-979C strain was subjected to stress conditions to test its viability, probiotic properties and anti-*H. pylori* activity and compared with the same non-encapsulated strain. The anti-adherent effect on *H. pylori* of the probiotic and of carrageenan was tested using cell lines and the prophylactic effect of the probiotic and of the polysaccharide were

tested using an animal model (Mongolian gerbil). Moreover, the encapsulated and non-encapsulated probiotic was subjected to gastric simulated conditions using a Chilean standard diet, a test not previously done.

In vitro results showed that carrageenan encapsulation of *L. fermentum* UCO-979C did not affected the probiotic properties, anti-*H. pylori* activity and viability of the probiotic strain and favored its survival under stress conditions such as low pH (3.0), bile salts (3%) and the enzymatic activity of pepsin. The *in vivo* assays showed that the probiotic and carrageenan mixture reduced, from 3 logs up to render it undetectable, *H. pylori* colonization in the stomach of Mongolian gerbils. Using simulated gastric conditions, either under fasting or providing a Chilean standard diet, it was shown that the probiotic and carrageenan collaborated to eliminate the pathogenic *H. pylori* SS1 strain making it undetectable after 1.5 or 2.5 h, respectively.

Therefore, it can be concluded the carrageenan encapsulation of *L. fermentum* UCO-979C did not affected its probiotic properties, that carrageenan also contributed to the anti-*H. pylori* activity and that the administration of the probiotic under fasting (acidic environment) improves its anti-*H. pylori* effect when compared to the administration associated to the diet.



CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

I.1 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo con forma espiral, con 3,5 μm de longitud y 0,5 μm de anchura, de 2 a 7 flagelos recubiertos que facilitan su movilidad en medios viscosos. Fue aislado por primera vez en 1982 desde cultivos de mucosa gástrica de pacientes con úlcera y gastritis por los médicos australianos Barry Marshall y Robin Warren (Premio Nobel de Medicina 2005), su hábitat es el epitelio gástrico humano, y su presencia en ese tejido se ha relacionado con diversas patologías. En algunos individuos, la infección es adquirida a temprana edad y la persistencia de la bacteria en el estómago provoca inflamación crónica y daño del tejido gástrico (Ayala *et al.*, 2014), alteraciones que podrían evolucionar a enfermedades gástricas severas, tales como úlceras pépticas (úlceras duodenales y úlceras gástricas), linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (linfoma MALT) o adenocarcinoma gástrico (Figura 1) (Sach & Scott, 2012).

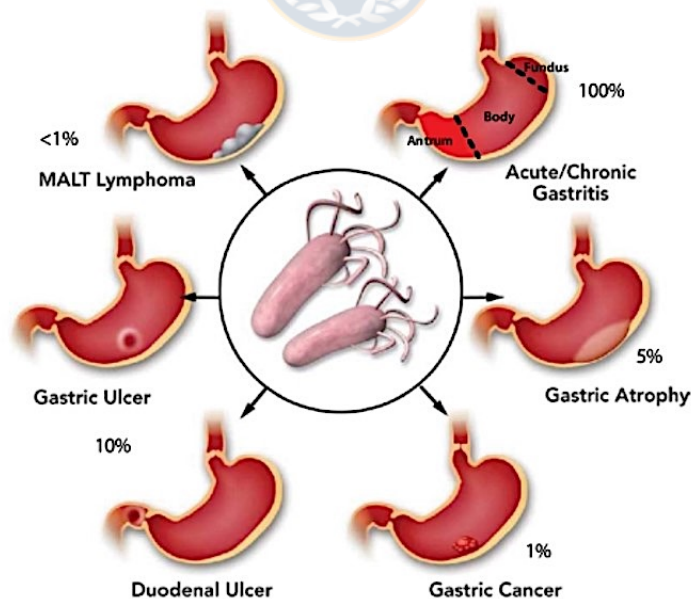


Figura 1. Trastornos gástricos como consecuencia de la infección por *H. pylori*. Se muestran los porcentajes promedio de prevalencias en la población mundial infectada, de cada una de estas patologías (Sach & Scott, 2012).

La importancia que ha adquirido la infección por *H. pylori* en los últimos 20 años se debe principalmente a que:

- Es un agente etiológico de patología gastroduodenal, tanto benigna como maligna, y su erradicación se asocia con cicatrización de úlceras pépticas, desaparición de la gastritis, disminución de la reactivación de úlceras en proceso de mejora, mejoría de la sintomatología dispéptica y regresión del linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) de bajo grado. Además, se ha asociado con el desarrollo de adenocarcinoma gástrico, y su inclusión por parte de la International Agency for Research in Cancer (IARC) en 1994 entre los agentes carcinógenos tipo 1, convirtiéndolo en uno de los microorganismos de mayor interés en patología humana.
- La aparición cada vez más frecuente de cepas de *H. pylori* resistentes a los antibióticos más utilizados en su tratamiento, (Malfertheiner *et al.*, 2012; Engstrand *et al.*, 2013; Camargo *et al.*, 2014).
- La Organización Mundial de la Salud publica en Febrero de 2017 una lista de “patógenos prioritarios” resistentes a antibióticos catalogados como crítico, Elevado y Medio, en la que se incluyen 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana, *H. pylori* queda en la categoría Elevada por su resistencia a claritromicina (OMS, 2017).
- En la última década se han reportado investigaciones que relacionan la infección por *H. pylori* con patologías extragástricas. Estas asociaciones se fundamentan en que el proceso inflamatorio crónico causado por *H. pylori* generaría una cantidad importante de mediadores inflamatorios que actuarían en diferentes blancos, fuera del estómago, relacionándose la infección con patologías vasculares, autoinmunes, de la piel, relacionadas con salud reproductiva, encefalopatía hepática, diabetes mellitus, linfoma MALT extragástrico y retraso en el crecimiento en niños, entre otras. Incluso en el año 2005 el European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPSG) reconoció que la erradicación de *H. pylori* debería ser considerada en pacientes con anemia por deficiencia de hierro y en trombocitopenia idiopática (Nilsson, 2005; Suzuki *et al.*, 2006; Moyaert *et al.*, 2008).

- Presenta una distribución mundial correlacionada con el nivel socioeconómico de la población, con prevalencias que van desde un 20% de las personas en Australia hasta un 90% en el norte de África y en algunas zonas de Latinoamérica (Wirtz *et al.*, 2010).

I.II Tratamiento de *H. pylori*:

Para el tratamiento de la infección producida por *H. pylori*, las recomendaciones internacionales destacan las incluidas en el consenso de Mastrich del año 2016 (Malfertheiner *et al.*, 2017), donde se establece que al momento de detectar *H. pylori* en el estómago se debe aplicar un tratamiento.

Actualmente, el tratamiento de pacientes infectados por *H. pylori* se basa en el uso combinado de un inhibidor de la bomba de protones (IBP) y antibióticos, como claritromicina y amoxicilina durante 7 a 14 días (tratamiento de primera línea) (Malfertheiner *et al.*, 2017), IBP en combinación con dos o tres antibióticos, incluyendo amoxicilina, claritromicina, metronidazol y tetraciclina (terapia de segunda línea) y, recientemente, el tratamiento con cuatro fármacos, el que puede ser secuencial, concomitante o con bismuto. El tratamiento secuencial consiste en un IBP más amoxicilina durante 5 días, seguido de una terapia triple por 5 días con un IBP más claritromicina y tinidazol o metronidazol. En la terapia concomitante, un IBP, claritromicina, metronidazol/tinidazol y amoxicilina son administrados cada 12 horas, durante 3-7 días. Finalmente, la terapia cuádruple conteniendo bismuto, consiste en una sal de bismuto, tetraciclina HCl, metronidazol/tinidazol, y un IBP, administrado tres o cuatro veces al día, durante 7 a 14 días, En la Tabla 1 se resumen los tratamientos recomendados para su erradicación.

Tabla 1. Tratamientos indicados para la erradicación de *Helicobacter pylori*.

Tratamiento	Fármacos	Posología	Duración
Terapia cuádruple sin bismuto (concomitante)	IBP Amoxicilina Claritromicina Metronidazol	Dosis estándar/12 h 1 g/12 h 500 mg/12 h 500 mg/12 h	14 días
Terapia cuádruple con la nueva presentación farmacéutica con bismuto (140 mg), metronidazol (125 mg) y tetraciclina (125 mg) por cápsula	IBP Bismuto-metronidazol-tetraciclina	Dosis estándar/12 h 3 cápsulas/6 h	10 días
Terapia cuádruple clásica con bismuto	IBP Subcitrate de bismuto Doxicilina Metronidazol	Dosis estándar/12 h 120 mg/6 h o 240 mg/12 h 100 mg/12 h 500 mg/8 h	10-14 días
Terapia cuádruple con levofloxacino y bismuto	IBP Amoxicilina Levofloxacino Subcitrate de bismuto	Dosis estándar/12 h 1 g/12 h 500 mg/24 h 240 mg/12 h	14 días
Terapia triple con levofloxacino	IBP Amoxicilina Levofloxacino	Dosis estándar/12 h 1 g/12 h 500 mg/24 h	14 días
Terapia triple con rifabutina	IBP Amoxicilina Rifabutina	Dosis estándar/12 h 1 g/12 h 150 mg/12 h	10 días

Tabla extraída de Guix y Cantera, 2017.

Una de las principales causas del fracaso de estos tratamientos es la resistencia de *H. pylori* a los distintos antibióticos utilizados. Por ello, se ha sugerido que las quinolonas, tetraciclinas, rifabutina y la furazolidona podrían ser candidatos alternativos para el tratamiento de tercera línea; además, el tratamiento con IBP/amoxicilina a dosis altas podría también ser efectivo (Ayala *et al.*, 2014). Sin embargo, estudios donde se han usado quinolonas y rifabutina en vez de claritromicina han dado resultados mixtos (Zullo *et al.*, 2013) En la Tabla 2. se describen los mecanismos por los que *H. pylori* podría estar desarrollando la resistencia antibiótica. Al mismo tiempo, la falta de cumplimiento del tratamiento por el paciente, el alto costo asociado a estas terapias, la recurrencia de la infección por *H. pylori* y la capacidad de este patógeno para desarrollar biopelículas, tanto *in vitro* como *in vivo*, constituyen otras causales del fracaso de estos tratamientos (Ayala *et al.*, 2014; García *et al.*, 2014).

Tabla 2. Modo de acción y mecanismos de resistencia de los agentes antimicrobianos utilizados para el tratamiento de la infección *por Helicobacter pylori*.

Antibiótico	Modo de acción	Mecanismos de resistencia
Metronidazol	Procesos de reducción de electrones, conducen a la formación de radicales nitroanión y posterior daño en el ADN	(1) absorción deficiente del fármaco y / o aumento de la salida del medicamento; (2) actividad potenciada de las enzimas de reparación del ADN; (3) aumento de las capacidades de captación de oxígeno; y (4) disminución de la activación de antibióticos debido a cambios en las enzimas reductoras de metronidazol
Claritromicina	La inhibición de la síntesis de proteínas uniendo y ralentizando la actividad de la unidad ribosomal bacteriana	mutaciones del punto ARNr
Amoxicilina	La inhibición de la síntesis de la pared celular	mutaciones del gen <i>pbp</i> , alteraciones de la permeabilidad de la membrana y bombas de eflujo
Tetraciclina	Síntesis de proteína de inhibición reversible	Mutación de tres nucleótidos contiguos en el gen 16S rRNA
Fluoroquinolonas	Inhibición de la ADN girasa, topoisomerasa tipo II y topoisomerasa IV	Mutaciones puntuales en las regiones determinantes de la resistencia a quinolonas
Rifabutina	Inhíbe la subunidad β de la ARN polimerasa dependiente del ADN de <i>H. pylori</i> codificada por el gen <i>rpo B</i>	Mutación del gen <i>rpo B</i>

Extraída de Ghotaslou *et al.* (2015).

Tomando en cuenta lo anterior, las investigaciones actuales apuntan al desarrollo de estrategias preventivas, curativas y/o coadyuvantes para la terapia contra este microorganismo. Los enfoques alternativos a la actual terapia alopática contra *H. pylori* incluyen el uso de plantas como fitofármacos (Vitor & Vale, 2011), vacunas, péptidos, fototerapia, polisacáridos, microorganismos, miel y propóleos, mucina gástrica, hongos y probióticos (Figura 2) (Ayala *et al.*, 2014).

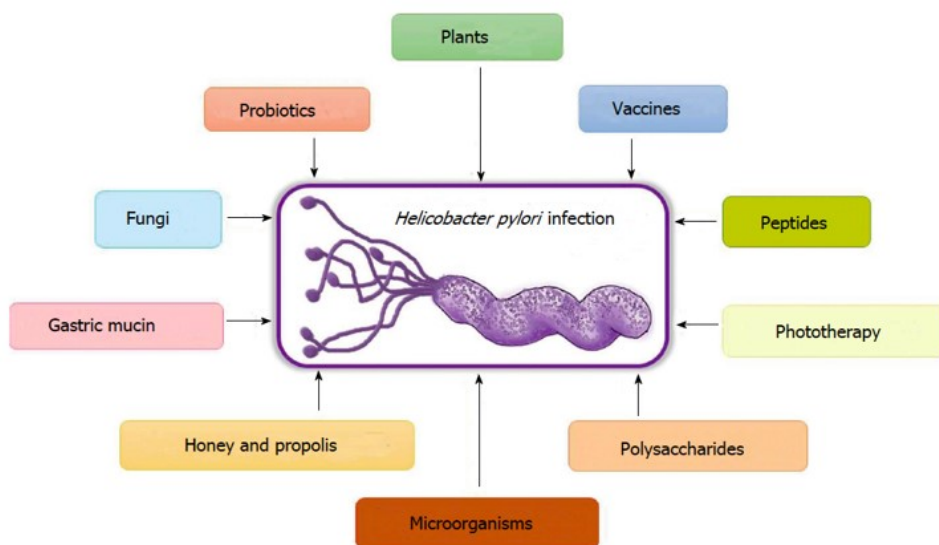


Figura 2. Enfoques alternativos a la actual terapia alopática contra *H. pylori* (extraído de Ayala *et al.*, 2014).

De estos enfoques, destacan vacunas, polisacáridos y probióticos. En el primer caso, dado que la ureasa es altamente expresada por todas las cepas de *H. pylori* y, además, ureasa y catalasa han demostrado ser eficaces en la inducción de respuesta inmune a la infección, estos antígenos serían los mejores candidatos para formulaciones de vacunas. Sin embargo, aunque se han obtenido algunos resultados prometedores en modelos animales, se han realizado pocos ensayos clínicos, los que han culminado sin éxito en cuanto a la inmunización y a la eliminación de la bacteria (Ayala *et al.*, 2014). Por otra parte, se ha ensayado la actividad anti-*H. pylori* de varios polisacáridos crudos y purificados, de diversas fuentes (algas, microalgas y plantas). En general, los polisacáridos no inhiben el crecimiento de *H. pylori in vitro*, pero sus propiedades anti-adhesivas podrían ser muy valiosas para prevenir o tratar esta infección, o incluso para prevenir la reinfección después del tratamiento de erradicación con antibióticos. Debido a la disponibilidad de estos compuestos, el tratamiento anti-adhesivo a base de hidratos de carbono puede representar una alternativa segura y de bajo costo. Los probióticos, en tanto, aparecen como una alternativa natural, presentes hace varios años en el mercado de alimentos, cuya actividad inhibitoria frente a *H. pylori* ha sido reportada en diversas y numerosas investigaciones.

I.III Probióticos

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que administrados de forma oral y en cantidades adecuadas, confieren un efecto beneficioso en la salud del huésped (FAO, 2000). La actividad probiótica puede ser ejercida por diferentes mecanismos: i) impedir la colonización de microorganismos patógenos (adherencia), ii) producir sustancias con acción antibacteriana, iii) regular la respuesta inmunitaria y iv) modificar el ambiente, acidificándolo, impidiendo la sobrevivencia de microorganismos sensibles (Fons *et al.*, 2000).

Se ha reportado que en ensayos *in vitro*, *Lactobacillus acidophilus* (Lorca *et al.*, 2001), *L. casei* cepa Shirota (Sourgas *et al.*, 2004), *Bacillus subtilis* (Pinchuk *et al.*, 2001) y *Weissella confusa* (Nam *et al.*, 2002), entre otros, tienen un efecto antagonista sobre *H. pylori*. En modelos animales, en tanto, los principales resultados muestran un efecto profiláctico de algunas cepas probióticas frente a *H. pylori*, una reducción en la colonización bacteriana de este patógeno y alivio de la inflamación gástrica asociada con esta infección (Johnson-Henry *et al.*, 2004). Desde algunos años los resultados en torno a ensayos clínicos con humanos son promisorios. Se han llevado a cabo estudios en los cuales se investigó la eficacia de las combinaciones de antibióticos y probióticos, y otros que utilizaron sólo probióticos como una alternativa a los antibióticos para el tratamiento de la infección por *H. pylori*. En este contexto, Malfertheiner *et al.* (2017) estudiaron la eficacia de *Lactobacillus reuteri* en la erradicación de *H. pylori*. Los pacientes fueron examinados al cabo de 4 a 6 semanas después de la terapia de erradicación. Se encontró que *L. reuteri* más pantoprazol curan entre el 13,6% y 14,2% de los pacientes infectados con *H. pylori*, por lo que los investigadores concluyeron que *L. reuteri* podría tener un potencial rol en la erradicación de esta infección. Tolone *et al.* (2012) llevaron a cabo un estudio en el cual se evaluó la sintomatología asociada a la infección y al tratamiento de erradicación de *H. pylori* en pacientes tratados con triple terapia convencional, y con terapia triple complementada con la ingesta de probióticos. Los resultados sugieren que la

adición de probióticos al tratamiento con triple terapia no aumentó significativamente la tasa de erradicación de *H. pylori*; sin embargo, se redujo significativamente la frecuencia de dolor epigástrico, náuseas, vómitos y diarrea. De modo similar, Ahmad *et al.* (2013) estudiaron el efecto combinado de la triple terapia con probióticos, en 66 niños infectados con *H. pylori*. Los resultados mostraron que la adición de probióticos en la dieta minimizaba la incidencia de efectos secundarios y mejoraba la tasa de erradicación de *H. pylori*, siendo ésta significativamente mayor en el grupo que recibió los probióticos. Además, hubo una tasa menor de náuseas y/o vómitos y diarrea en ese mismo grupo de niños, en comparación con los que fueron tratados con placebo. Un Metaanálisis realizado por Wang *et al.* (2017), reuniendo ciento cuarenta estudios (20.215 pacientes), complementando más de 10 estrategias probióticas en el tratamiento de erradicación de *H. pylori*. Las tasas de erradicación y eventos adversos fueron de 84.1% y 14.4% en el grupo probiótico, mientras que 70.5% y 30.1% en el grupo control respectivamente. En general, los probióticos suplementados fueron efectivos para mejorar la eficacia de la erradicación de *H. pylori* y disminuir la incidencia de eventos adversos, a pesar de algunos subtipos ineficaces. En la terapia de erradicación triple, no hubo diferencias significativas entre los probióticos efectivos, y los probióticos combinados no mostraron una mejor eficacia y tolerancia que un solo uso. En la terapia triple de 7 días y 14 días, *Lactobacillus acidophilus* fue una opción ligeramente mejor, mientras que *Saccharomyces boulardii* fue más aplicable para la terapia triple de 10 días.

Es decir, la comunidad científica al día de hoy no puede recomendar los probióticos para ser utilizados como un agente único para la terapia de erradicación. Sin embargo, su uso asociado al tratamiento estándar como un complemento mejorará las tasas de erradicación y disminuirá los efectos secundarios relacionados con el tratamiento.

I.IV Encapsulación de cepas probióticas

En el mercado actual existen productos que incorporan cepas probióticas, sin embargo el sector de los alimentos funcionales, entre ellos los probióticos aún enfrenta desafíos tecnológicos asociados a la estabilidad y viabilidad de los microorganismos durante la elaboración y almacenamiento del alimento y además, contra el ambiente hostil que éstos encuentran en el tracto gastrointestinal. La capacidad de los microorganismos probióticos para sobrevivir y multiplicarse en el hospedador influye fuertemente en sus beneficios probióticos, ya que éstas deben ser metabólicamente estables y activas en el producto, de modo de tener efectos beneficiosos en el huésped. Según la normativa vigente presente en el Reglamento Sanitario de Los Alimentos (2006 Rev. 2017), un alimento que posea bacterias beneficiosas como los probióticos debe contener al menos 10^6 a 10^7 UFC de bacterias viables por gramo de producto. Sin embargo, aún existen varios problemas con respecto a la baja viabilidad de las bacterias probióticas en los productos lácteos almacenados (Zapata *et al.* 2005).

Los factores que afectan la viabilidad de los probióticos en productos lácteos fermentados incluyen acidez titulable, pH, peróxido de hidrógeno, oxígeno disuelto contenido, temperatura de almacenamiento, concentración de ácidos láctico y acético e incluso la concentración de proteínas de suero de leche (Dave y Shah, 1997) Frente a lo anterior, una herramienta útil es la encapsulación, que corresponde a una tecnología de envasado de sólidos, líquidos o materiales gaseosos en pequeñas cápsulas con un diámetro que varía de unas pocas micras a algunos milímetros, que pueden liberar su contenido a velocidades controladas bajo las influencias de condiciones específicas (Anal & Stevens, 2005; Anal, Stevens & Retribañan-López, 2006). Las aplicaciones de la encapsulación en la industria alimentaria son variadas, incluyendo la estabilización del material de núcleo, el control de la reacción oxidativa, proporcionar una liberación sostenida o controlada (tanto temporales como liberación controlada en el tiempo), enmascaramiento de sabores, colores u olores, extensión de la vida útil y la protección de los componentes contra la pérdida nutricional.

La encapsulación de cepas probióticas en una matriz de polímero biodegradable tiene varias ventajas: i) Fácil manejo de células encapsuladas en comparación con células en suspensión; ii) el número de partículas es cuantificable, permitiendo así controlar la dosis administrada; iii) incorporación de componentes crioprotectores en la matriz, mejorando así la supervivencia de las células durante el procesamiento y almacenamiento; y iv) una vez que las cápsulas se han secado, se puede aplicar un recubrimiento de la superficie, el cual puede ser utilizado para mejorar la estética y las propiedades sensoriales del producto y pueden también ser funcionales, proporcionando un nivel extra de protección a las células probióticas. Además, la capa de revestimiento puede tener propiedades de disolución tales que permitan la liberación retardada de las células por ejemplo, bajo un cambio en el pH. Algunos polímeros utilizados en encapsulación en la industria alimentaria son alginato, quitosano, carboximetil celulosa (CMC), carragenano, gelatina y pectina.

La carragenina es un polisacárido natural que se extrae de macroalgas marinas rojas y se utiliza comúnmente como un aditivo alimentario dando consistencia a diversos alimentos, tales como cecinas, gelatinas y lácteos, mejorando la estética y las propiedades organolépticas del producto (Mahmood *et al.*, 2017). Además de las propiedades espesantes se ha observado que la carragenina kappa no ejerce efectos tóxicos sobre línea de células AGS y Caco-2 (Liu *et al.*, 2017).

Existen tres tipos de carrageninas, kappa (κ), iota (ι) y lambda (λ), formadas por unidades alternadas de D-galactosa y 3,6-anhidro-galactosa unidos por enlaces glicosídicos α -1,3 y β -1,4. Según su estructura química, las carrageninas son clasificadas como polisacáridos de alto peso molecular (>100 kDa) con diferente grado de sulfatación, entre un 15% a 40% (Coviello *et al.*, 2007; Necas & Bartosikova, 2013). Además, la cantidad de sulfatos está relacionado inversamente al grado de polimerización de la carragenina. Mayor porcentaje de sulfatación, muestra un menor grado de gelificación y viceversa (Figura 3) (Pavli *et al.*, 2011).

Se ha reportado el uso de este polisacárido para la encapsulación de células, ya sea solo (Klein & Vorlop, 1985), o bien como una combinación de k - carragenina y goma arábica. Esta última se ha utilizado para encapsular bacterias lácticas, mejorando así su estabilidad durante la producción de biomasa en productos lácteos (Audet *et al.*, 1988; Audet *et al.*, 1990). Doleyres *et al.* (2002 y 2004) inmovilizaron células probióticas en gel de carragenina y goma arábica, las cuales exhibieron una mayor tolerancia al estrés por congelación, secado, peróxido de hidrógeno y condiciones gastrointestinales simuladas. Adicionalmente, Song *et al.* (2014), estudiaron el efecto de polímeros naturales funcionalizados con ácidos sialicos o sulfatos, encontrando una relación directa entre la funcionalización del polímero y la inhibición de la adherencia de *H. pylori* a glóbulos rojos y células AGS. Dado que la carragenina posee grupos sulfatos, la encapsulación de cepas probióticas con carragenina funcionalizada podría, además de conservar las propiedades probióticas, inhibir la adherencia de *H. pylori* en el epitelio gástrico.

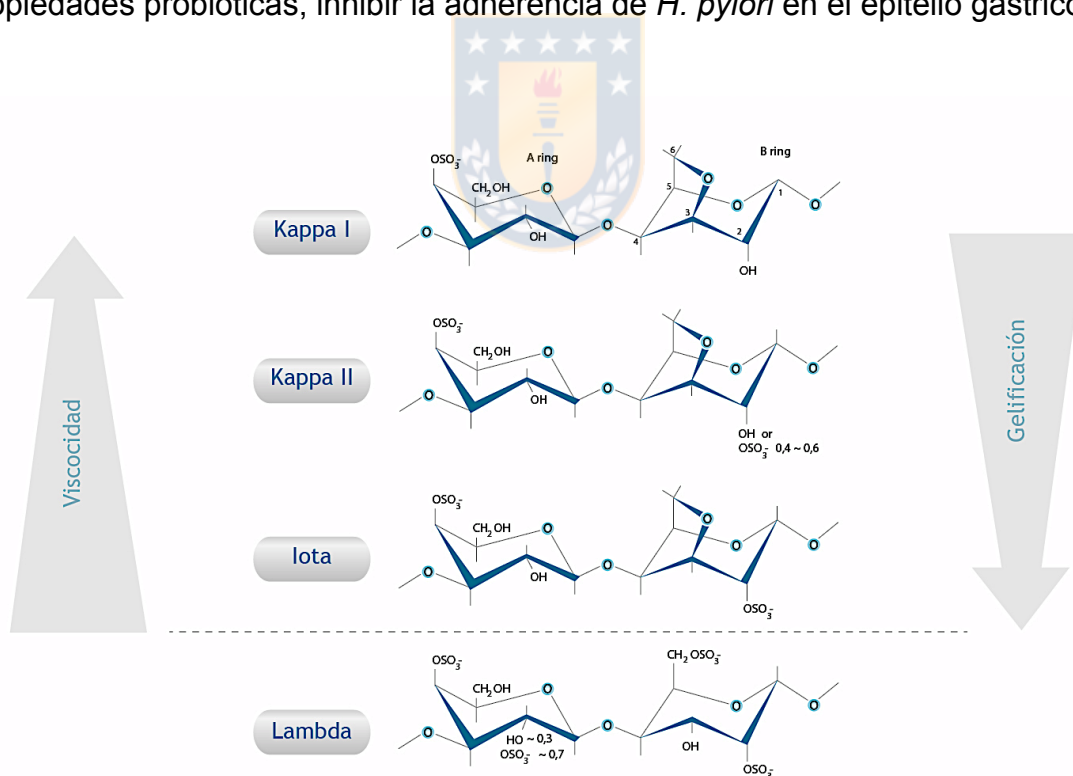


Figura 3. Composición química de carrageninas consultado en <http://www.gelymar.com/es/configuracion-quimica/>

En la Tabla 3. se presentan las diferencias entre los tipos de carragenina (Usov, 2011; Running *et al.*, 2012).

Tabla 3.- Comparación de las características y/o propiedades de la carragenina kappa, iota y lamda

Carragenina	Rango en el nivel de éster sulfato (%)	Rango del contenido de 3,6-anhidro-galactosa (%)	Solubilidad agua caliente 40 – 70 °C	Solubilidad agua fría	Solubilidad en soluciones azucaradas (65%)	Solubilidad en solución salina (20%)
Kappa	25 - 30	28 - 35	Si	No	No	No
Iota	28 - 35	25 - 30	Si	No	No	Si
Lamda	32 - 39	0	Si	Si	No	Si

Las soluciones de carragenina kappa e iota forman geles termorreversibles al ser activadas con calor. Al producirse el enfriamiento de la solución, las cadenas de carragenina forman dobles hélices y la presencia de sales de potasio o calcio promueven aún más la gelificación. Este estado sólido obtenido a temperaturas inferiores a 40°C forman cápsulas resistentes a pequeños cambios de temperatura en condiciones de almacenamiento.

La solución de carragenina es estable a pH neutro, por lo que si se acidifica una solución del mismo polímero a un pH más bajo afectaría su estabilidad, ya que produce la hidrólisis del polímero traduciéndose en una disminución en la fuerza de la gelificación y una disminución de la viscosidad. Sin embargo, una vez formada la cápsula gelificada, ésta será resistente en ambientes ácidos hasta pH 3,5 (Running *et al.*, 2012).

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

HIPÓTESIS

La encapsulación de la cepa *L. fermentum* UCO-979C con carragenina permite el mantener su viabilidad en condiciones de estrés provocados por procesos mecánicos y por las condiciones presentes en el tracto gastrointestinal, inhibe la adherencia de *H. pylori*, no altera las propiedades probióticas, ni su actividad anti-*H. pylori*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las propiedades probióticas y actividad anti-*Helicobacter pylori* de la cepa *Lactobacillus fermentum* UCO-979C encapsulada en carragenina para su potencial uso en un producto probiótico no lácteo como alternativa preventiva de la infección por *Helicobacter pylori*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar la cepa *Lactobacillus fermentum* UCO-979C en relación a propiedades probióticas como producción de peróxidos, ácido láctico, producción de exopolisacáridos, tolerancia a condiciones de estrés a pH bajo, sales biliares y enzimas hidrolíticas; y su actividad anti-*Helicobacter pylori*.
- 2) Determinar la viabilidad de la cepa *Lactobacillus fermentum* UCO-979C encapsulada con carragenina y determinar que conserva sus propiedades probióticas y su actividad anti-*Helicobacter pylori*.
- 3) Determinar si la mezcla de carrageninas kappa y lambda puede inhibir la adhesión de *Helicobacter pylori* a células AGS.
- 4) Analizar el efecto de la incorporación de la cepa *Lactobacillus fermentum* UCO-979C no encapsulada y encapsulada en un sistema gástrico que simule prevención de la infección por *Helicobacter pylori*.

CAPÍTULO III: EFFECT OF CARRAGEENAN ENCAPSULATION OF *L. FERMENTUM* UCO-979C IN ITS VIABILITY, PROBIOTIC PROPERTIES AND ANTI-*H. PYLORI* ACTIVITY

Manuscrito enviado a la revista Food and Bioprocess Technology el 6 de febrero de 2019.

Cristian Gutiérrez-Zamorano¹, Enrique Sanhueza-Carrera¹, Katia Sáez-Carrillo², Carlos T. Smith¹, Carlos L. González¹, Apolinaria García-Cancino¹.

¹Departamento de Microbiología, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

²Departamento de Estadística, Universidad de Concepción, Concepción, Chile



Abstract

This work reports the effect of carrageenan as an encapsulating agent for the probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strain, which exhibits a potent anti-*Helicobacter pylori* activity, subjected to different stress conditions. Carrageenan, a polysaccharide which also possesses anti-*H. pylori* activity, is widely used in the food industry. Therefore, our aim was to evaluate the effect on the viability and properties of the probiotic strain *L. fermentum* UCO-979C when encapsulated with this polysaccharide. *In vitro* results showed that carrageenan encapsulation did not affected the viability of the probiotic and that it favors its survival under stress conditions, such as low pH (3.0), bile salts (3%) and enzymatic activity (pepsin). Besides, carrageenan encapsulation did not affected the probiotic properties nor the anti-*H. pylori* activity of *L. fermentum* UCO-979C. Using the Mongolian gerbil model, it was demonstrated that the probiotic and carrageenan mixture reduced *H. pylori* colonization of the stomach (reduction of 3 logarithms or undetectable). Carrageenan encapsulation of *L. fermentum* UCO-979C, besides the anti-*H. pylori* activity of the polysaccharide, may increase the viability of probiotics added to functional foods, improving human health.

1. Introduction

Probiotics are defined by the WHO as live microorganisms which when administered in adequate concentrations confer a health benefit to the host (Williams 2010; Mizock 2015). A probiotic strain must possess several characteristics including functional properties, safety, resistance to industrial processing and useful shelf life (Nuraida 2015). The most used probiotics belong to the lactic acid bacteria group because they produce lactic acid (Kolida *et al.*, 2006) or bacteriocins (Klaenhammer 1993) which are antagonistic against pathogens. Ideally, probiotics must remain viable at low pH and in the presence of bile salts and be able to colonize the gastrointestinal tract (Peres *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2014). Moreover, they must not be resistant to antibiotics and lack transferable antibiotic resistance genes (Coppola *et al.*, 2005), they must not produce histamines nor other potentially damaging compounds for the host (Ancin-Azpilicueta *et al.*, 2008).

The probiotic characteristics of a number of *Lactobacillus*, which are Gram positive microorganisms and usual components of the human microbiota (Williams 2010), have been studied. Their beneficial effects include helping in metabolic processes and mitigation of several gastrointestinal diseases or disorders, such as irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease or allergies (García *et al.*, 2009). Some probiotics have shown antagonism against the pathogen *Helicobacter pylori* and help to eradicate it (Lorca *et al.*, 2001). *H. pylori* selectively colonize the gastric epithelium of more than 50% of the worldwide population (Wirtz *et al.*, 2010), infection acquired during infancy in more than 70% of the cases. Untreated

infection with this pathogen induces chronic gastritis in all affected individuals (Abadi & Yamaoka, 2018). Furthermore, *H. pylori* is a gastric cancer promoter, can produce gastric and duodenal ulcer and mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma (Mommersteeg *et al.*, 2018).

The 2016 V Maastricht Consensus establishes that *H. pylori* positive patients must receive a pharmacological treatment (Malfertheiner *et al.*, 2017) but its resistance to antibiotics, mainly clarithromycin, is increasing (Siddique *et al.*, 2018), causing the lost of effectivity of conventional therapy. Probiotics are an alternative, preventive or coadjuvant measure, against the infection with this pathogen (Ayala *et al.*, 2014).



Lactobacillus fermentum UCO-979C, besides possessing excellent probiotic characteristics (Garcia *et al.*, 2017), has shown a high inhibitory effect on *H. pylori* in *in vitro* models (Salas-Jara *et al.*, 2016, Vega-Sagardía *et al.*, 2018) and the Mongolian gerbil animal model (Garcia *et al.*, 2017; Merino *et al.*, 2018). Moreover, García-Castillo *et al.* (2018) showed that this probiotic strain has a potent immunomodulatory effect in *in vitro* and animal models.

Viability of probiotics may be negatively affected by production, storage or digestive tract conditions. Encapsulation, a technology packing diverse elements which are released at a certain location (Anal & Stevens, 2005; Kailasaphaty & Masondole, 2005), is one of the most efficient methods to maintain viability of probiotics along time (Burgain *et al.*, 2011). Agar, chitosan, alginate, xanthan gum,

polyacrylamide, gelatin and carrageenan have been used to encapsulate bacteria (Rathore *et al.*, 2013).

Carrageenan, extracted from different genera of red algae (*Rhodophyta*), are included in the formulation of several foods improving the organoleptic and performance of products (Mahmood *et al.*, 2017). Carrageenan are high molecular weight polysaccharides (>100 kDa) with 15% to 40% ester-sulfate content (Coviello *et al.*, 2007; Necas, & Bartosikova, 2013), their amount of sulfates being inversely proportional to their polymerization degree (Pavli *et al.*, 2011), and their differences being given by the quantity and position of ester-sulfate groups. Kappa carrageenan contains between 25% and 30% sulfate groups while lambda carrageenan contains between 32% and 40% (Nanaki *et al.*, 2010). Song *et al.* (2014) reported that synthetic addition of sulfates to natural polysaccharides, such as pectin, guar gum or chitosan, significantly reduces *H. pylori* adherence to AGS cells and erythrocytes.

Thus, besides postulating that the prophylactic administration of *L. fermentum* UCO-979C probiotic strain may be effective against *H. pylori* infection, we can also postulate that carrageenan encapsulation may improve the prophylactic effect of the probiotic strain. The aim of this work was to test these postulates analyzing probiotic properties (i.e. lactic acid production and biofilm formation) and anti-*H. pylori* activity of carrageenan encapsulated *L. fermentum* UCO-979C strain.

2. Materials and Method

2.1 Bacterial strains and cell line

Bacterial strains and the cell line used in this work are kept at the Laboratory of Bacterial Pathogenesis, Department of Microbiology, University of Concepcion, Chile. Bacterial strains *L. fermentum* UCO-979C and *H. pylori* SS1 were cultured as described by Vega-Sagardia *et al.* (2018). Adenocarcinoma gastric epithelial (AGS) cell line, also available at the Laboratory of Bacterial Pathogenesis above mentioned, was cultured according to Salas-Jara *et al.* (2016). For the assays, AGS cells with 5 to 10 passages were used.

2.2 Preparation of encapsulating matrices and *L. fermentum* UCO-979C encapsulation

Different proportions (100%:0%, 75%:25%, 50%:50%, 25%:75% and 0%:100% w/w) of kappa and/or lambda carrageenan (Gelymar S.A. Santiago, Chile) at a concentration of 1, 2 or 3% w/v in sterile 0,01% CaCl₂ w/v were manually agitated and heated to 80 °C until complete dissolution. Capsules were prepared following the procedure of Iwanaga *et al.* (2003) and also 2x2x2 cm cubes were obtained using silicone molds. Time of fusion of cubes was determined at 100 °C and size reduction of capsules was determined at 37 °C.

After determining the matrix providing the desired properties, *L. fermentum* UCO-979C probiotic strain was encapsulated following the Iwanaga *et al.* (2003) procedure with modifications. Fifty mL of the selected mixture of dissolved carrageenan at 80 °C was allowed to cool to 40 °C and mixed with a pellet of *L.*

fermentum UCO-979C cultured for 24 h in 50 mL MRS broth, centrifuged at 2000 g for 10 min at 4°C and washed twice using sterile water. After homogenizing the final mixture (5 min), it was transferred to a 50 mL syringe to drip the mixture on commercial vegetal oil at 0 °C under constant agitation to obtain the capsules. Once obtained, capsules were washed three times using cold sterile distilled water, sieved and stored under sterile conditions at 4 °C. Capsules prepared following the same procedure without the probiotic were used as control.

2.3 Quantification of L. fermentum UCO-979C viable cells released from capsules

Five g of capsules were dissolved, using a vortex, in 10 mL sterile saline solution and dilutions plated in Petri dishes containing MRS agar. After 48 h incubation at 37 °C, viable *L. fermentum* UCO-979C cells were counted. The same procedure was used to determine viable counts of the probiotic after been subjected for 0, 6 and 12 h to the following conditions: pH 3.0, 3% w/v bile salts, 6 mM urea, 1.65 g/L porcine pepsin or 0,43 g/L amylase.

2.4 Lactic acid production by L. fermentum UCO-979C before encapsulation and after release from capsules

Lactic acid production was determined after allowing *L. fermentum* UCO-979C obtained from a fresh culture or released from capsules to grow for 48 h under microaerobic conditions (5% CO₂) in MRS broth adjusted to pH 8.0. Samples were filtered (0.22 µm) and lactic acid present in the filtrate was measured spectrophotometrically using the L-Lactic Acid (L-Lactate) Assay kit (Megazyme Lactic Acid, Megazyme International, Wicklow, Ireland) following the instructions of

the manufacturer. Infinite M200 pro (TECAN Trading AG, Männedorf, Switzerland) was used.

2.5 L. fermentum UCO-979C strain biofilm formation before and after encapsulation

Biofilm formation by *L. fermentum* UCO-979C released from capsules after 30 days storage or non-encapsulated, obtained as described in Section 2.3 and Section 2.1, respectively, was studied. Bacteria were cultured on MRS agar for 24 h at 37°C under microaerobic conditions and 700 µL of each bacterial suspension adjusted to McFarland 0.5 or 5 and deposited in 24-well flat-bottom polystyrene microtiter plates (SPL Life Sciences). Biofilm formation was assayed in wells with or without 10 mm diameter sterile glass coverslips (Lebeer et al., 2007). Microtiter plates were incubated at 37 °C under microaerobic condition for 24 h. Culture medium and non-adhered cells were removed by aspiration and the wells washed three times using pH 7.0 phosphate buffered saline (PBS) and allowed to dry at room temperature for 10 min and stained with 800 µL of 0.1% w/v crystal violet (Merck, Darmstadt, Germany) according to (Stepanović et al., 2007). Biofilm formation was assessed spectrophotometrically Infinite M200 pro (TECAN Trading AG, Männedorf, Switzerland), measuring absorbance according to the same authors. Results reported correspond to the average of three independent assays

2.6 *H. pylori* SS1 strain growth inhibition caused by *L. fermentum* UCO-979C released from capsules or non-encapsulated

Inhibition of *H. pylori* SS1 growth by *L. fermentum* UCO-979C released from capsules after 30 days encapsulation or non-encapsulated was assayed by means of the radial diffusion method (Sgouras *et al.*, 2005). Briefly, 6 mm diameter wells were punched in 8 cm diameter Petri dishes having 25 ml of Columbia agar supplemented with 5% horse blood or 7% horse serum and a McFarland 2 suspension of *H. pylori* SS1 (Hartzen *et al.*, 1997).

L. fermentum UCO-979C released from capsules or non-encapsulated were cultured overnight in MRS agar and one colony suspended in 6 ml MRS broth without citrate and incubated for 18 h at 37 °C, then 50 µL aliquots were added to the wells of the Petri dishes. A sample of the same 18 h culture was centrifuged at 2000 g for 10 min and 50 µL of supernatant or 50 µL of the pellet, resuspended in a volume of sterile saline solution equal to the supernatant removed and washed three times, were also added to wells as described above. Plates were incubated under microaerobic condition at 37 °C for 96 h. The halo of inhibition of *H. pylori* SS1 produced by *L. fermentum* UCO-979C was calculated subtracting the halo obtained with MRS broth without citrate from the halo obtained in the presence of *L. fermentum* UCO-979C, its supernatant or its bacterial cells resuspended from the pellet. Wells containing only sterile saline solution were evaluated. Inhibition results were expressed as indicated by Gaudana *et al.* (2010). All assays were done in duplicate.

2.7 Viability of *H. pylori* SS1 cells and AGS cells in the presence of carrageenan

H. pylori SS1 strain was cultured as described in Section 2.1. *H. pylori* SS1 colonies were suspended in BHI (BD Bacto, Le Pont de Claix, France) broth at a McFarland 2 turbidity and 500 μ L of the suspension added to each well of 24 well plates and 500 μ L of 2% kappa or lambda carrageenan in 0.01% w/v CaCl_2 added. Plates were incubated during 2 h at 37 °C under microaerobic condition and 500 μ L of 0.001% w/v resazurin added and incubated for 1 h under the same conditions. Viability of the probiotic was evaluated measuring spectrophotometrically Infinite M200 pro (TECAN Trading AG, Männedorf, Switzerland) (570 nm) the resazurin reduced following the procedure of O'Brien *et al.* (2000). Experiments were done in triplicate and the control contained *H. pylori* SS1 but no carrageenan.

AGS cells, cultured as described in Section 2.1, were seeded in 24 well plates and cultured until confluence. Five hundred μ L of 2% kappa/lambda carrageenan in RPMI 1640 medium plus 10% fetal calf serum were added to each well and plates incubated for 2, 4 or 6 h at 37 °C under microaerobic condition. Cells were washed three times using 500 μ L PBS 1X and 1 mL 0.001% w/v resazurin added and treated and measured as described above. AGS cells not subjected to carrageenan were used as positive control.

H. pylori SS1 and AGS cells subjected to carrageenan treatment were observed under scanning electron microscopy (SEM) performed as described in Section 2.12.

2.8 Anti-adherence effect of carrageenan encapsulated *L. fermentum* UCO-979C on *H. pylori* SS1 in the AGS cellular model

Five g of *L. fermentum* UCO-979C containing capsules were dissolved in 5 mL sterile distilled water at 37°C for 10 min under agitation and its effect on *H. pylori* SS1 adherence on AGS cells evaluated. Also, the same effect was evaluated using non-encapsulated *L. fermentum* UCO-979C adjusted to McFarland 2 and dissolved probiotic free carrageenan capsules.

Plates (96 wells) containing 90% confluent AGS cells were challenged with 50 µL of *L. fermentum* UCO-979C containing dissolved capsules or 50 µL non-encapsulated *L. fermentum* UCO-979C or 50 µL of probiotic free dissolved capsules and incubated for 30 min at 37 °C under microaerobic condition. Then, 50 µL of McFarland 2 *H. pylori* SS1 suspension were added and incubated for 2 h under the same conditions. Plates were washed thrice using 100 µL PBS 1X, then 150 µL phenol red (2% urea + 0.003% phenol red at pH 6.8) were added per well and incubated for further 2 h at room temperature. Measurements were done spectrophotometrically Infinite M200 pro (TECAN Trading AG, Männedorf, Switzerland) device at 570 nm wavelength (Salas-Jara *et al.* 2016). *H. pylori* challenged AGS cells in the absence of the probiotic strain or carrageenan were used as positive control and AGS cells not challenged with the pathogen were used as negative control. All experiments were replicated 6 times.

2.9 FITC labeling of *H. pylori* SS1 and *L. fermentum* UCO-979C

FITC labeling of *L. fermentum* UCO-979C and *H. pylori* SS1 was done according to García *et al.* (2017). Briefly, suspensions of approximately 10^{10} CFU/mL in PBS 1X were prepared from previously cultured *H. pylori* SS1 or *L. fermentum* UCO-979C strains. Then, 10 μ L of fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma, St Louis, MO, USA) were added to 1 ml of *H. pylori* PBS suspension (6×10^8 CFU/mL), incubated in darkness (with occasional hand shaking) for 1 h at room temperature and incubated for 1 h at 37 °C under microaerobic condition. Supernatants were eliminated after centrifuging at 10000 g for 5 min and pellets washed twice using PBS 1X and centrifuging at 10000 g for 5 min.



2.10 Encapsulated *L. fermentum* UCO-979C antagonism against *H. pylori* assayed in the Mongolian gerbil model

2.10.1 Preparation and administration of microorganisms to Mongolian gerbils

Male and female 24 to 28 weeks old *Meriones unguiculatus* (Mongolian gerbils) were fed with commercial pellets and water *ad libitum*. The encapsulated probiotic was administered with the commercial extruded food. The non-encapsulated probiotic (1 mL of McFarland 2, corresponding to $1.2 \times 10^9 \pm 0.2$ CFU/mL) or *H. pylori* SS1 (1 mL of McFarland 2, corresponding to $3.5 \times 10^7 \pm 0.1$ CFU/mL) were administered by means of a gastric cannula to animals previously fasted for 18 h and anesthetized by isofluorane inhalation (Baxter International Inc., Deerfields, Illinois, USA) (García *et al.*, 2017, Merino *et al.* 2018). Colonization by

microorganisms was evaluated *in vivo*, 24 h after feeding or inoculation, using an iBox equipment (Scientia, Upland, California, USA) (García *et al.*, 2017).

2.10.2 Mongolian gerbils gastric sampling and evaluation of the prophylactic activity of the probiotic

To evaluate the prophylactic effect achieved by the probiotic, encapsulated *L. fermentum* UCO-979C (1 mL $1.8 \times 10^9 \pm 0.1$ CFU/mL) was administered during 14 days to 7 animals and *H. pylori* SS1 was inoculated at day 15 (1mL $1.2 \times 10^8 \pm 0.2$ CFU/mL). Ten days later, animals were sacrificed; their stomachs removed and divided into antrum, body and fundus sections. Each section was homogenized using a mortar and saline solution and cultured in MRS broth or Columbia agar supplemented with 5% defibrillated horse blood and DENT to detect the presence of *Lactobacillus* or *Helicobacter*, respectively (García *et al.*, 2017).

2.11 Scanning electron microscopy

Samples observed included capsules (surface and cross sections), *H. pylori* SS1 treated with carrageenan and AGS cells treated with carrageenan. Samples were washed with saline solution and fixed and dehydrated with 100% methanol at 4°C for 24 h and critical point dried using CO₂. Samples were visualized using an Auto-scan model U1 scanning electron microscope (ETEC Corporation, Hayward, CA, USA) at the Center for Microscopy and Spectroscopy, University of Concepcion, Chile.

2.12 Statistical analysis

The number of replicates for each experiment is mentioned in the respective Sections. For standard deviation and statistical significance, calculations and preparation of figures, Infostat and GraphPad Prism 7 software were used. One-way ANOVA with 95% confidence were performed and results considered significant when $p < 0.05$.

3 Results and Discussion

3.1 Kappa and lambda carrageenan proportions for encapsulation of *L. fermentum* UCO-979C

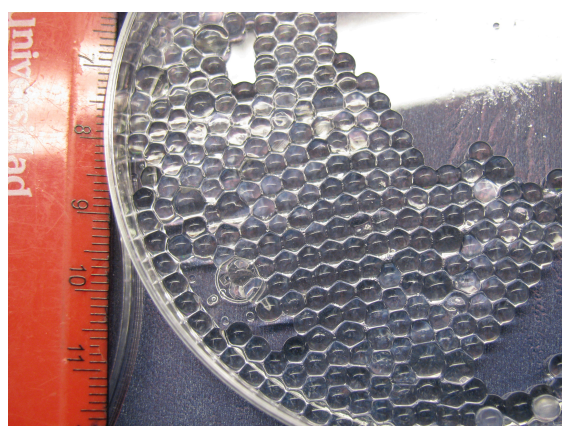
Cubes (2x2x2 cm) prepared using 1, 2 or 3% kappa and lambda carrageenan in 0,01% w/v CaCl_2 were tested to select the better concentration and mixture. Proportions of kappa and lambda carrageenan mixture were 100%:0%, 75%:25%, 50%:50%, 25%:75% and 0%:100% w/w. One percent carrageenan capsules were fragile, losing their structure within 10 minutes at room temperature and 3% carrageenan capsules required a long time to fuse. On the contrary, 2% carrageenan capsules showed an appropriate stability (Table 1) and 50% kappa and 50% lambda carrageenan capsules were selected because they contained the highest percentage of lambda carrageenan allowing a good jellification and an appropriate fusion time. These results allowed to define that capsules should be made using 2% carrageenan in a 50% kappa and 50% lambda proportion. The highest possible percentage of lambda carrageenan is desirable because it contains more sulfate groups, responsible of *H. pylori* inhibition (Song *et al.*, 2014).

These capsules showed to be approximately 3 to 4 mm in diameter spheres (Fig. 1a) and their size decreased to 0.5 mm when subjected to 37°C under gentle agitation for 10 min due to temperature and friction (Fig. 1b). Capsules were fully dissolved after 12 min (Fig. 1b). This assay allowed to estimate the release time of the probiotic under gastric conditions.

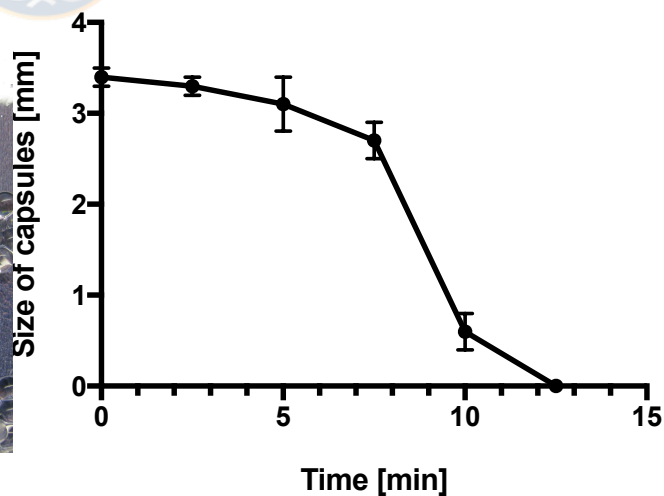
Table 1 Qualitative characteristics (consistency and fusion time at 100°C) of 2% kappa and lambda carrageenan mixtures

Carrageenan mixture	Kappa (%)	Lambda (%)	Consistency at room temperature	Fusion time at 100°C (min)
Kappa	0	100	Liquefied gel	N.D.
+ Lambda	25	75	Semisolid gel	47 ± 6
(2%)	50	50	Solid gel	79 ± 3
	75	25	Solid gel	73 ± 4
	100	0	Solid gel	N.D.

ND: not determined



(a)



(b)

Fig. 1 a) Capsules obtained using 1:1 2% w/v kappa and lambda carrageenan in 0.01%w/v CaCl₂. b) Size decrease of capsules at 37 °C under agitation in the time.

3.2 Viability of encapsulated L. fermentum UCO-979C strain subjected to pH 3.0 or bile salts

The purpose of encapsulating bacteria is to improve its viability when exposed to adverse environmental conditions (Cheow & Hadinoto, 2013). When encapsulated, *L. fermentum* UCO-979C strain showed no significant differences in viability after 12 h incubation in MRS broth at pH 3.0 or at pH 6.4. When the non-encapsulated bacterium was subjected to the same conditions, significantly lower counts were obtained at pH 3.0 (Fig. 2a). Similarly, when cultured in the presence or absence of 3% w/v bile salts in MRS broth, the encapsulated probiotic strain showed no significant difference in counts but the non-encapsulated probiotic bacterium significantly decreased its counts in the presence of bile salts (Fig. 2b). Therefore, encapsulation protected the probiotic from a low pH and from bile salts. Sulfate groups of carrageenan could retain the protons present in the acidic environment; thus, impeding their contact with the bacterial strain (Servaty *et al.*, 2001). Hydrated carrageenan impedes osmotic changes, such as those caused by bile salts (De Kruif & Tuinier, 2001). These properties of carrageenan may explain the contribution of encapsulation to maintain *L. fermentum* UCO-979C strain viability.

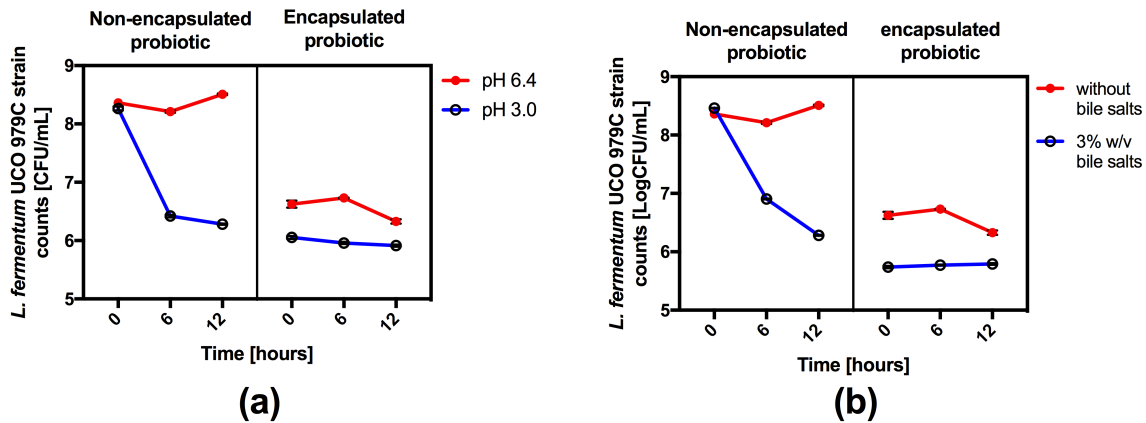


Fig. 2 Counts of encapsulated or non-encapsulated *L. fermentum* UCO-979C strain exposed during 12 h to stress conditions in MRS broth. a) pH 3.0. b) 3% w/v bile salts.

Capsules with or without the probiotic *L. fermentum* UCO-979C strain subjected, during 60 days at 4 °C, to saline solution at pH 6.4 or pH 3.0 or saline solution plus 3% bile salts at pH 6.4 were studied by SEM. At day 0, capsules with or without bacteria were approximately spherical (Fig. 3a and 3b). Cross sections of capsules with bacteria at day 0 (Fig. 3c) showed no interaction between the probiotic strain and carrageenan, the bacterial cell wall appearing undamaged (agreeing with counts of the probiotic described above). On day 60, capsules subjected to saline solution at pH 6.4 or pH3.0 (Fig. 3d and 3e), showed no differences when compared to observations made at day 0. Nevertheless, on day 60 in the presence of 3% bile salts (Fig. 3f), concentration nearly tenfold the physiological (Wu *et al.*, 2016), an alteration of the cell wall was observed.

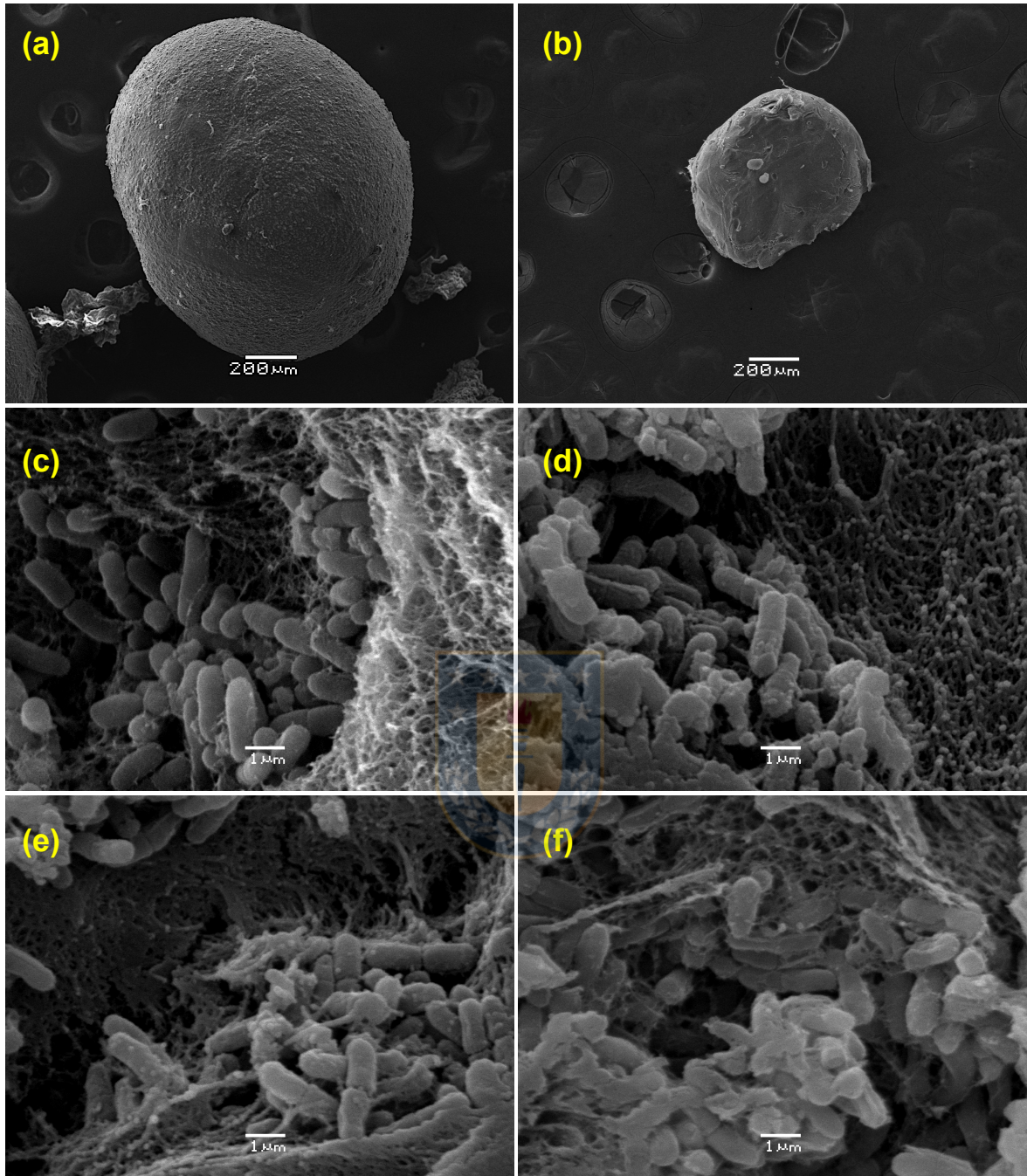


Fig. 3 1:1 2% kappa and lambda carrageenan capsules with or without *L. fermentum* UCO-979C probiotic strain. **a)** Micrography of the surface of a probiotic free capsule (magnification 60X). **b)** Micrography of surface of a probiotic containing capsule (magnification 60X). **c)** Cross section of a probiotic containing capsule on the same day of preparation (magnification 10.000X). **d)** Cross section of a probiotic containing capsule after 60 days of storage at 4 °C in saline solution, pH 7.0 (magnification 10.000X). **e)** Cross section of a probiotic containing capsule after 60 days of storage at 4 °C in saline solution, pH 3.0 (magnification 10.000X). **f)** Cross section of a probiotic containing capsule after 60 days of storage at 4 °C in 3% bile salts in saline solution (magnification 10.000X)

3.3 Non-encapsulated or encapsulated *L. fermentum* UCO-979C strain growth in MRS supplemented with enzymes or urea

The effect of amylase or porcine pepsin enzymes or urea on the growth of non-encapsulated *L. fermentum* UCO-979 strain was evaluated during 12 h in MRS broth. Non-encapsulated *L. fermentum* UCO-979C counts in the presence of amylase or urea showed no significant differences with those in the absence of these compounds. On the contrary, pepsin (1.65 g/L) was able to induce a significant decrease in cell counts (Fig. 4a).

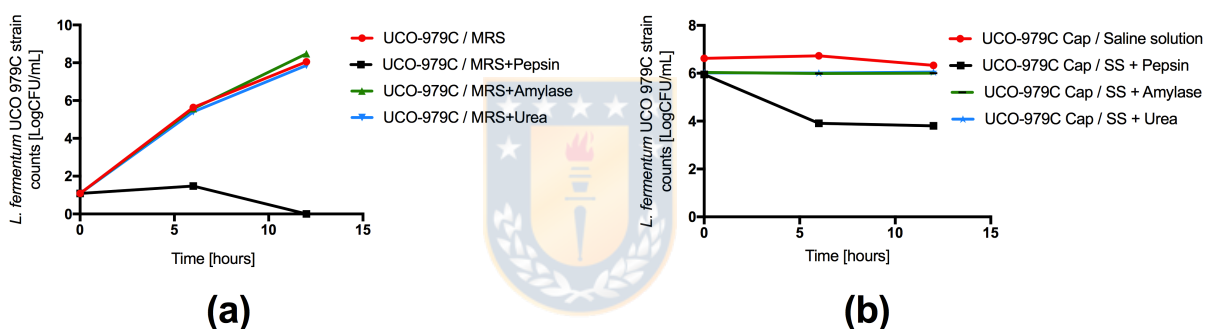


Fig. 4 *L. fermentum* UCO-979C strain survival during 12 h when exposed to 1.65 g/L pepsin, 0.43 g/L amylase and 0.6 mM urea. a) Bacterial counts of non-encapsulated *L. fermentum* UCO-979C. b) Bacterial counts of carrageenan encapsulated *L. fermentum* UCO-979C.

When a similar 12 h experiment was performed using encapsulated *L. fermentum* UCO-979C in saline solution, nor amylase neither urea reduced bacterial counts when compared to controls without amylase or urea (Figure 5b). On the contrary, porcine pepsin significantly reduced bacterial counts (Figure 5b). Therefore, taking into consideration that *L. fermentum* UCO-979C was released from the capsules during the incubation and that both, encapsulated and non-encapsulated bacterium

were affected by pepsin, it can be suggested that the activity of this enzyme affects the probiotic strain when it is in a planktonic condition. The effect of pepsin may be the consequence of its proteolytic activity against hydrophobic peptide bonds of hydrophobic proteins (Leszczyńska *et al.*, 2009) and its activation of a bacteriolytic substance secreted in the antrum of the stomach (Viillard & Raynaud, 1968). Since the assays described in this work were done *in vitro*, the latter must be disregarded.

In similar experiments, Heidebach *et al.* (2009) showed a 5 log reduction of non-encapsulated *Lactobacillus paracasei* counts during a 90 min exposition to simulated gastric juice at pH 2.5. Nag *et al.* (2011) reported a 6.1 log reduction of planktonic *Lactobacillus casei* and only a 3.1 log reduction of the same strain when encapsulated in sodium caseinate and gellan gum in a 120 min time span. Therefore, encapsulation also protects probiotic strain *L. fermentum* UCO-979C subjected to some gastric conditions.

3.4 Evaluation of L-lactic acid production and biofilm formation on abiotic surfaces by L. fermentum UCO-979C released from carrageenan capsules

L-lactic acid production and biofilm formation are desirable and important characteristics of a probiotic strain. Since *H. pylori* is inhibited by lactic acid (Ryan *et al.*, 2009), production of this compound by a probiotic is particularly relevant. Therefore, these two characteristics were evaluated to confirm that they were maintained by the probiotic released from capsules. *L. fermentum* UCO-979C released from capsules maintained L-lactic acid production, reaching $2,786 \pm 0,320$

g/L of supernatant as compared to $2,496 \pm 0,744$ g/L of supernatant by the non-encapsulated probiotic, a non-significant difference ($p > 0.05$). Besides its antimicrobial effect due to a lowering of pH, lactic acid may also inhibit *H. pylori* urease (García *et al.*, 2017). Since lactic acid produced by *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* or *Lactobacillus casei* Shirota strains showed to *in vitro* or *in vivo* inhibit *H. pylori* (Ryan *et al.*, 2009), the capacity of *L. fermentum* UCO-979C to maintain lactic acid production after been released from capsules is a fundamental probiotic characteristic.

Regarding biofilm formation, non-encapsulated *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* UCO-979C released from capsules were able to form biofilms *in vitro* on glass or polystyrene after incubating them during 24 h (Fig. 5). Regarding biofilm formation on polystyrene, the initial inoculum affected the quantity of biofilm formed, being biofilm production significantly greater when a less concentrated inoculum was used. There was no significant difference when McFarland 0.5 inoculums of non-encapsulated or encapsulated probiotic were compared. However, when comparing biofilm formation by the encapsulated or non-encapsulated probiotic using McFarland 5 inoculums, the non-encapsulated probiotic showed a significantly larger biofilm quantity (Fig. 5). In accordance with our results, Salas-Jara *et al.* (2016) using *L. casei* Shirota and *L. fermentum* UCO-979C strains on glass, polystyrene and AGS and Caco-2 cells, also reported that a less concentrated inoculum produced more biofilm and attributed it to biofilm maturation causing the dispersal of cells which were eliminated during the washing step. Regarding biofilm formation on glass, when McFarland 0.5 inoculums were

compared, non-encapsulated *L. fermentum* UCO979-C showed a significantly larger biofilm formation and the same was observed when McFarland 5 inoculums were compared (Fig. 5). *L. fermentum* UCO-979C is an excellent biofilm forming strain (Salas-Jara *et al.*, 2016) and since it maintains this characteristic after being release from capsules contributes to its colonization of the gastric epithelium (Terraf *et al.*, 2012) and also avoids *H. pylori* colonization.

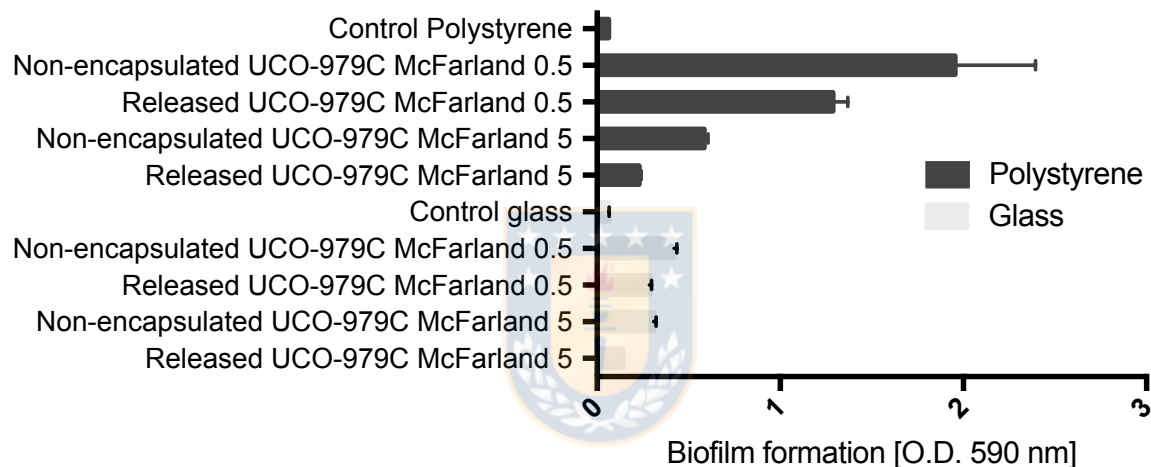


Fig. 5 Biofilm formation on glass or polystyrene by non-encapsulated *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* UCO-979C released from capsules. McFarland 0.5 or 5 inoculums were incubated in 24 wells plates during 24 h in MRS broth. Biofilm formation was measured spectrophotometrically at 570 nm after crystal violet staining.

3.5 Anti-*H. pylori* activity of *L. fermentum* UCO-979C released from capsules

The capacity of *L. fermentum* UCO-979C released from capsules to inhibit growth of pathogenic *H. pylori* SS1 strain was evaluated using the radial diffusion method and compared with that of the non-encapsulated probiotic. Following the Gaudana *et al.* (2010) criterion, results showed that the inhibition of *H. pylori* SS1 growth by

the probiotic did not decreased after encapsulation and been release from capsules (Table 2).

Table 2. *H. pylori* SS1 inhibition by probiotic *L. fermentum* UCO-979C, either released from carrageenan capsules or non-encapsulated, assayed using the radial diffusion method in Columbia agar supplemented with defibrillated horse blood or horse serum.

Conditions	Saline solution	MRS without citrate	<i>L. fermentum</i> UCO-979C culture	Supernatant of <i>L. fermentum</i> UCO-979C culture	Pellet	(1) *	(2) *
Non encapsulated <i>L. fermentum</i> UCO-979C grown on Columbia agar plus horse serum	NI	1,20 mm 1,20 mm	2,75 mm 2,95 mm	2,80 mm 2,95 mm	NI	1,65	1,68
		$\bar{X} = 1,20$	$\bar{X} = 2,85$	$\bar{X} = 2,88$			
<i>L. fermentum</i> UCO-979C released from carrageenan capsules grown on Columbia agar plus horse serum	NI	1,30 mm 1,20 mm	3,00 mm 3,00 mm	3,00 mm 2,80 mm	NI	1,75	1,65
		$\bar{X} = 1,25$	$\bar{X} = 3,00$	$\bar{X} = 2,90$			
Non encapsulated <i>L. fermentum</i> UCO-979C grown on Columbia agar plus horse blood	NI	1,25 mm 1,15 mm	2,90 mm 2,90 mm	2,80 mm 2,90 mm	NI	1,70	1,65
<i>L. fermentum</i> UCO-979C released from carrageenan capsules grown on Columbia agar plus horse blood	NI	1,25 mm 1,15 mm	3,20 mm 2,80 mm	2,95 mm 2,80 mm	NI	1,80	1,68
		$\bar{X} = 1,20$	$\bar{X} = 3,00$	$\bar{X} = 2,88$			

* The *H. pylori* SS1 inhibition halo was calculated subtracting de halo obtained without the probiotic strain from the halo obtained in the presence of the probiotic (1) and subtracting the halo obtained without the probiotic from the halo obtained using the supernatant of a culture of the probiotic (2).

NI = no inhibition, Halo \leq 1 mm: no inhibition, 1 < Halo \leq 2 mm: mild inhibition, 2 < Halo \leq 5 mm: strong inhibition, Halo > 5 mm: very strong inhibition.

3.6 *H. pylori* SS1 viability in the presence of carrageenan

Hirno *et al.* (1995) studied the anti-*H. pylori* effect of diverse polysulfated carbohydrates, reporting that kappa carrageenan reduced up to 95% *H. pylori* loads while lambda carrageenan reduced them approximately 98-100%. Our results showed that a 1:1 mixture of kappa and lambda carrageenan at 2%

concentration significantly decreased, nearly 80%, the viability of *H. pylori* SS1 strain (Fig. 6a). Although the inhibition of *H. pylori* reported by Hirno *et al.* (1995) was higher than the one obtained under our conditions, the degree of inhibition of the pathogenic *H. pylori* SS1 pathogenic strain was considerable. Our SEM observations showed a link between carrageenan and *H. pylori* (Fig. 6b), indicating the possibility of an interaction between the sulfated polysaccharide and the outer membrane of the pathogen. Shibata *et al.* (1999) reported that the outer membrane proteins of *H. pylori* were the affinity target of sulfated groups of polysaccharides, concordant with our SEM observations.

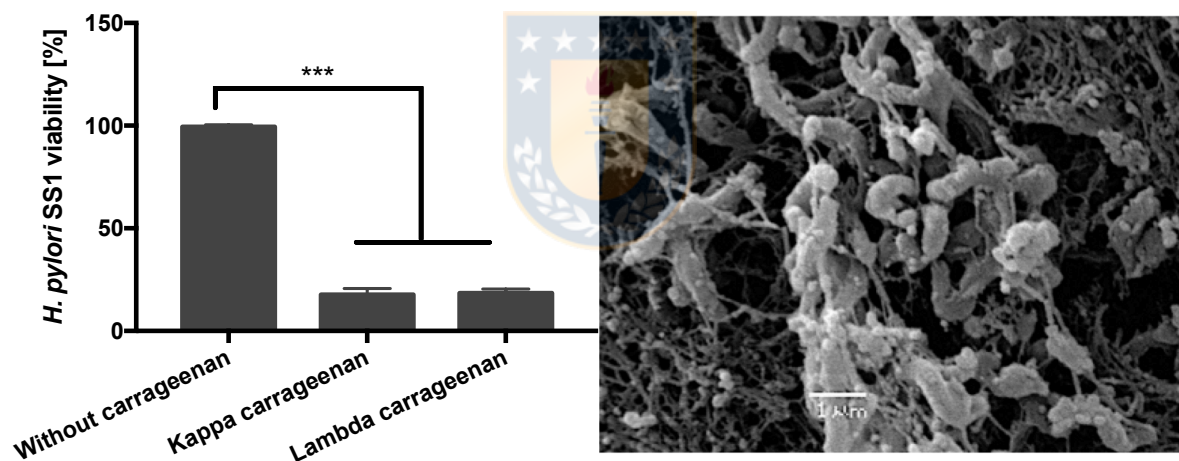


Fig. 6 Percentage viability of *H. pylori* SS1 (10^8 CFU/mL) after 2 h of incubation in PBS plus 2% w/v kappa or lambda carrageenan. **a)** Viability of *H. pylori* SS1 strain incubated during 2 h with kappa or lambda carrageenan. *H. pylori* viability was evaluated spectrophotometrically measuring resazurin reduction. Six replicates were done. Bars correspond to SD. *** Statistical significance ($p < 0.05$). **b)** SEM of a cross section of a carrageenan matrix showing *H. pylori* SS1 (magnification 10.000X).

Carrageenan and other polysaccharides (such as alginates, pectin or fucoidan) possess acid groups (sialylated or sulfated) which bind to glycolipids present in cellular membranes; thus competing with *H. pylori* to bind to the gastric epithelium mucin, avoiding the binding of the pathogen (Song *et al.*, 2014). Chua *et al.* (2015) reported that fucoidan binds with greater affinity to *H. pylori* than to AGS cells; thus, binding sites of the pathogen would not be available to bind to epithelial cells. Since carrageenan possesses a demonstrated anti-*H. pylori* effect, encapsulating the probiotic *L. fermentum* UCO-979C which also inhibits this pathogen, combining the probiotic and carrageenan should improve the inhibitory effect over *H. pylori*.

3.7 AGS cells viability in the presence of carrageenan

AGS cells were incubated, up to 6 h, in the presence of 1:1 2% kappa and lambda carrageenan. Their viability was evaluated spectrophotometrically measuring resazurin associated to viable cells. Results showed that carrageenan did not significantly reduced resazurin quantity during the initial two hours of incubation, but at times 4 and 6 h they were significantly reduced (30% and 50%, respectively) (Fig. 7a). Since SEM observations showed that AGS cells lost their adherence to the polystyrene plates in the presence of carrageenan (Fig. 7b), the diminishing of resazurin along time should in fact be the consequence of the detachment, of AGS cells which were lost during the washing procedure rather than a decreased viability.

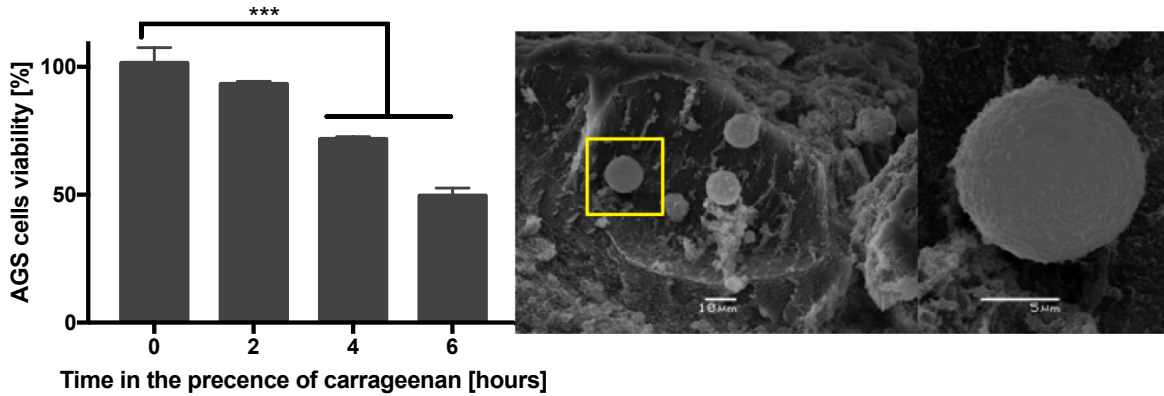


Fig. 7 AGS cells incubated in the presence of 1:1 2% w/v kappa and lambda carrageenan in 0.01% CaCl₂. **a)** Viability of AGS cells incubated for 2, 4 or 6 h in carrageenan. AGS cells viability was evaluated spectrophotometrically measuring resazurin reduction. Six replicates were done. Bars correspond to SD. *** Statistical significance ($p < 0.05$). **b)** and **c)** SEM observations of AGS cells incubated in the presence of kappa and lambda carrageenan (magnification 1000X and 5000X, respectively).

3.8 Decreased adherence of *H. pylori* over AGS cells previously treated with encapsulated *L. fermentum* UCO-979C

AGS cells previously treated for 1 h with carrageenan capsules free of probiotic showed a significant decrease of *H. pylori* SS1 adherence to them when compared to non-treated AGS cells (Fig. 8). AGS cells previously treated for 1 h with non-encapsulated or encapsulated probiotic decreased the adherence of the pathogen even more than probiotic free capsules showing no significant difference between them (Fig. 8). Thus, the probiotic, either encapsulated or non-encapsulated, inhibited the adhesion of the pathogen significantly more than carrageenan alone and that, in the presence of the probiotic, carrageenan does not contribute *in vitro* in a cellular model to improve the anti-adherence activity of the probiotic against *H. pylori* SS1.

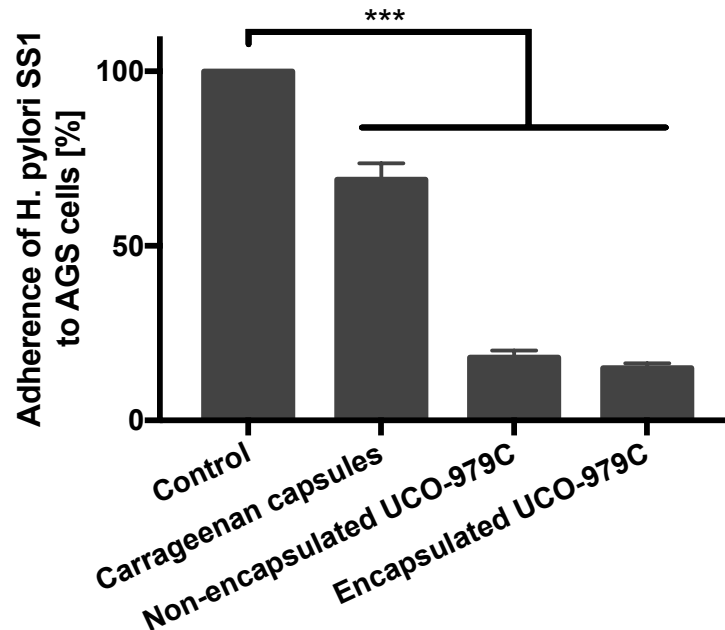


Fig. 8 Effect of probiotic *L. fermentum* UCO-979C over *H. pylori* SS1 (10^8 CFU/mL) adherence on AGS cells. AGS cells were treated with the probiotic, either encapsulated or non-encapsulated, or carrageenan 1 h previous to a 1 h exposure to *H. pylori* SS1.

3.9 Prophylactic effect of encapsulated and non-encapsulated *L. fermentum* UCO-979C adhered to the upper gastrointestinal tract on *H. pylori* SS1 colonization in the Mongolian gerbil model

The adherence of encapsulated *L. fermentum* UCO-979C to the upper gastrointestinal tract was monitored using an iBox equipment whose silver green filter allows to assign colors depending on intensity of FITC fluorescence (red for high intensity and green for low intensity while blue indicates absence of fluorescence). Preliminary *in vitro* assays allowed us to confirm that encapsulated FITC-labelled probiotic fluorescence was detectable by the iBox, discarding the possible interference of the capsule (Fig. 9a), and that probiotic free carrageenan capsules showed the absence of fluorescence, discarding the possibility of false positive results (Fig. 9b).

Mongolian gerbils feed with commercial food supplemented with kappa and lambda carrageenan encapsulated FITC-labelled probiotic showed a high adherence of the probiotic to mouth and stomach (Fig. 9c). Intestinal inflammation, caused by kappa carrageenan, was detected in the animals (data not shown). Therefore, experiments were continued using only lambda carrageenan, the one having more sulfate groups which are important to inhibit *H. pylori* (Necas & Bartosikova, 2013).

In the following assays, a gastric cannula was used for direct delivery of non-encapsulated *L. fermentum* UCO-979C or *H. pylori* SS1 into the stomach. iBox images showed that on day 2 the probiotic (Fig. 10a) or *H. pylori* SS1 (Fig. 10b) were adhered mainly to the antrum and body, forming patches (arrows). On the other hand, bacterial counts from samples obtained on day 2 showed that the probiotic was adhered mainly to the body and antrum and lesser (two logs less) to the fundus and that the pathogen was mainly adhered to the antrum and lesser to the body and fundus (two and three logs less, respectively) (Table 3, upper section). Thus, iBox observations and bacterial counts indicate a similar tendency. For the prophylactic assay, FITC-labelled *L. fermentum* UCO-979C and lambda carrageenan were administered until day 14 and then animals were infected with three doses of FITC-labelled *H. pylori* SS1 strain within 10 days and results observed at day 25. Results showed high FITC fluorescence in the body and in a lesser degree in the antrum (Figure 10c). In this case, fluorescence intensity in the antrum decreased (from red to green), a site colonized by the pathogen on day 2 (red in Fig. 10b).

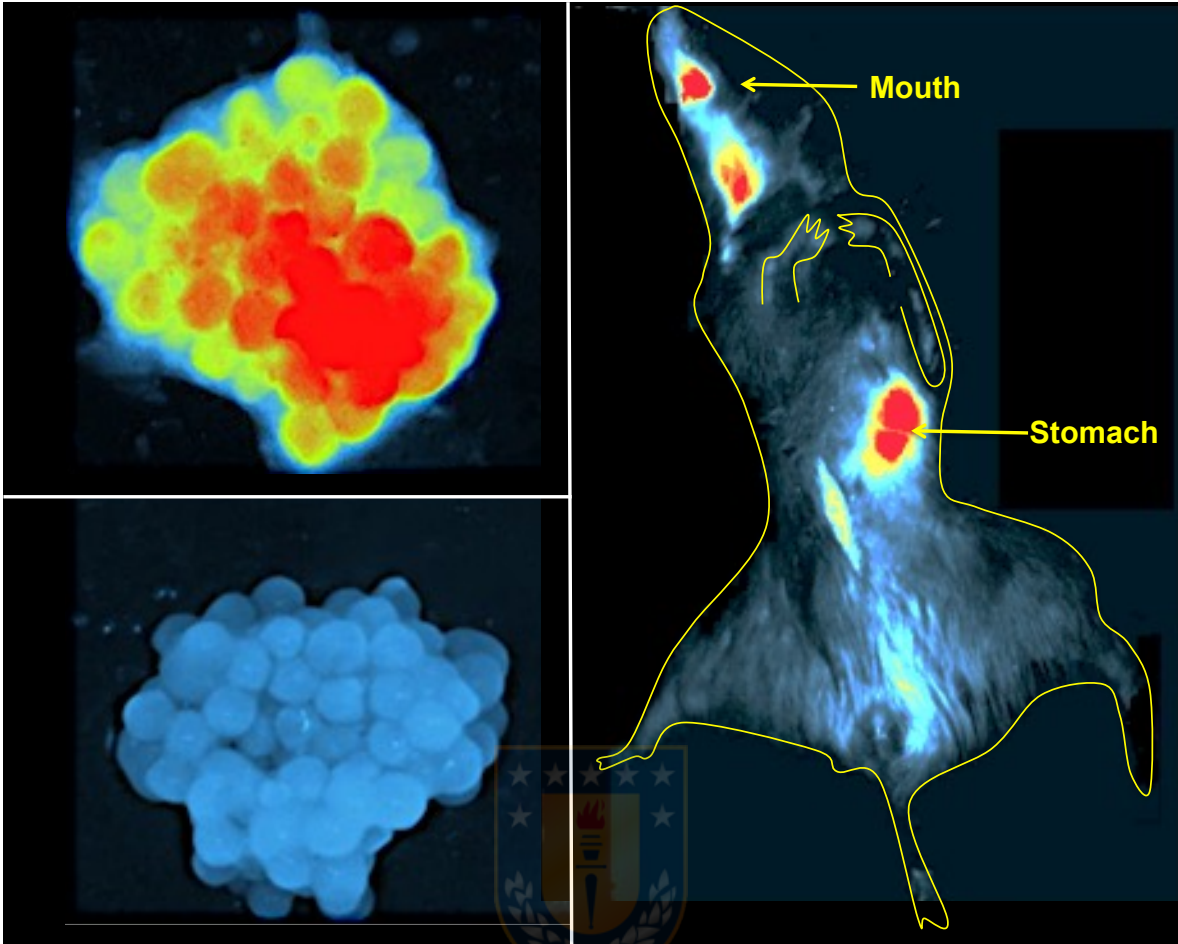


Fig. 9 FITC-labelled *L. fermentum* UCO-979C fluorescence detected by an I-BOX equipment with silver green filter allowing to assign colors depending on intensity of FITC fluorescence (red for high intensity and green for low intensity while blue indicates absence of fluorescence). **a)** *In vitro* fluorescence of FITC-labelled kappa and lambda carrageenan encapsulated probiotic showing high fluorescence. **b)** *In vitro* observation of non-labelled kappa and lambda carrageenan encapsulated probiotic showing that both carrageenan and the unlabeled probiotic produced fluorescence. **c)** *In vivo* fluorescence produced by FITC-labelled kappa and lambda carrageenan encapsulated probiotic inoculated into Mongolian gerbil revealing the presence of the probiotic in the mouth and stomach, showing high intensity FITC fluorescence indicative of high presence of *L. fermentum* UCO-979C probiotic strain

At the end of the previous assay (day 25), samples were obtained to determine bacterial counts. These results indicated that the probiotic colonized mainly the body and in lesser degrees the fundus and antrum (Table 3, lower section). The pathogen barely colonized the antrum and it was not detected in the body and fundus (Table 3, lower section). If iBox observations are correlated with the results of bacterial counts, it can be suggested that fluorescence observed in the body and fundus of the stomach at day 25 (Fig. 10c) was mainly due to the presence of FITC-labelled *L. fermentum* UCO-979C and that the FITC-labelled probiotic and FITC-labelled *H. pylori* SS1 contribute to the fluorescence observed in the antrum.

Table 3. *L. fermentum* UCO-979C and *H. pylori* SS counts in different regions of the stomach of Mongolian gerbils. Upper data correspond to animals receiving the probiotic or *H. pylori* SS1 and colonies counted on day 2. Lower data correspond to animals receiving the probiotic up to day 14, then infected three times during a 10 days period with *H. pylori* SS1 and colonies counted on day 25.

Bacterial strain	Antrum	Body	Fundus
<u>Bacterial counts on day 2</u>			
<i>L. fermentum</i> UCO-979C	$2,5 \times 10^7 \pm 02^b$	$2,8 \times 10^7 \pm 01^c$	$1,2 \times 10^5 \pm 01^d$
<i>H. pylori</i> SS1	$1,2 \times 10^6 \pm 01^f$	$2,2 \times 10^4 \pm 01^a$	$2,5 \times 10^3 \pm 01^b$
<u>Bacterial counts on day 25</u>			
<i>L. fermentum</i> UCO-979C	$3,2 \times 10^3 \pm 01^b$	$1,8 \times 10^7 \pm 02^c$	$1,4 \times 10^5 \pm 01^d$
<i>H. pylori</i> SS1	$1,25 \times 10^{3c}$	Not detected	Not detected

Unidirectional ANOVA. Means with different letter indicate significant differences according to the Fisher test ($p < 0.05$).

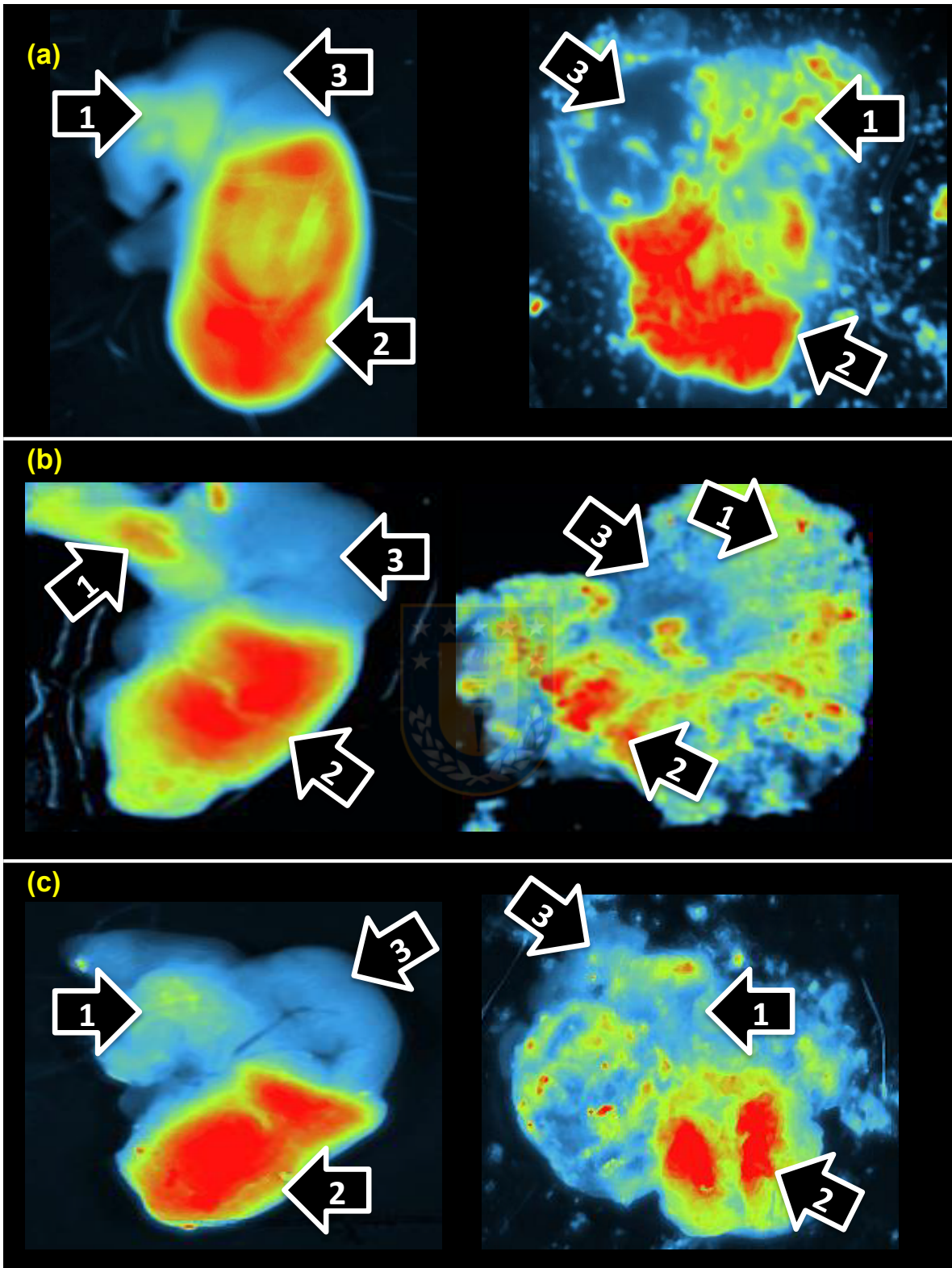


Fig. 10 *L. fermentum* UCO-979C and *H. pylori* SS1 adherence to Mongolian gerbil's stomach prophylactically treated with the probiotic and then challenged with the pathogen. iBox images with silver green filter allowing to assign colors depending on intensity of FITC

fluorescence (red for high intensity and green for low intensity while blue indicates absence of fluorescence). Images at left correspond to the whole organ and images at right correspond to longitudinally sectioned and opened organ. Numbering code 1: antrum, 2: body and 3: fundus. **a)** Non-encapsulated FITC-labelled *L. fermentum* UCO-979 adherence two days after inoculation, showing adherence to the antrum and body. **b)** FITC-labelled *H. pylori* SS1 adherence two days after inoculation, showing adherence to the antrum and body. **c)** Adherence of FITC-labelled *L. fermentum* UCO-979C inoculated together with lambda carrageenan, until day 14, and challenged with FITC-labelled *H. pylori* SS1, showing bacterial adherence on the antrum, body and fundus.

In a similar experiment but in the absence of carrageenan, Merino *et al.* (2018) also reported a decreased *H. pylori* colonization in the antrum of *L. fermentum* UCO-979C treated gerbils. Sunanlignon *et al.* (2012) reported that also *L. rhamnosus* reduced *H. pylori* colonization and infection in a mice model. In the present study, in agreement with the previous authors, we observed that stomachs of all Mongolian gerbils receiving *L. fermentum* UCO-979C and then infected with *H. pylori* showed the absence of gastritis or ulcers while animals not prophylactically treated showed those type of lesions (data not shown). Delgado *et al.* (2015) reported that certain microorganisms, including *Lactobacillus*, selectively colonize the human or animal stomach. Some lactobacilli have the capacity to produce exopolysaccharides which block receptors of the gastric epithelial cells which will no longer be available as binding sites for other microorganisms. Exopolysaccharide production is an important feature of probiotics and *L. fermentum* UCO-979C strain produces high quantities of this product, allowing it to adhere on AGS and Caco-2 cell lines and, moreover, to form biofilms on them (Salas-Jara *et al.*, 2016). Thus, exopolysaccharide produced by *L. fermentum* UCO-979C may be an important factor participating in its *in vivo* adherence to the stomach of Mongolian gerbils reported in this work.

Histological studies reported that *H. pylori* and some probiotic strains adhere to or colonize the same sites (De Klerk *et al.*, 2016; Emara *et al.*, 2016, Oh *et al.*, 2016). According to Terayama *et al.* (2016), gastric protection may be the result of probiotics adhering before the pathogen. Therefore, as suggested by the results of Manfredi *et al.* (2012), the consumption of probiotics before an infection may have a prophylactic effect in the host, also supported by our results.

4. Conclusions

Encapsulation of *L. fermentum* UCO-979C probiotic strain in 1:1 2% w/v kappa and lambda carrageenan mixture provided an appropriate capsule to protect the probiotic strain from a low pH, bile salts and pepsin when compared to non-encapsulated probiotic, improving its viability. After been released from the carrageenan capsules, the probiotic maintained its L-lactic acid production and biofilm forming capacity, important characteristics for a probiotic. In addition, the probiotic also maintained its inhibitory activity against *H. pylori*.

The kappa and lambda carrageenan mixture was bactericidal for *H. pylori* SS1 but it did not affected the viability of the probiotic strain. On the other hand, in the presence of carrageenan, AGS adherent cells detached from polystyrene in a time-dependent fashion.

The assay using Mongolian gerbils showed that the probiotic strain was released from capsules and that it adhered to the upper gastrointestinal tract. It was also

shown that the released probiotic reduced *H. pylori* colonization of the stomach and *H. pylori* induced ulcers.

The results of this work suggest that carrageenan encapsulation of the probiotic strain *L. fermentum* UCO-979C, besides the anti-*H-pylori* activity of this compound by itself, may increase the viability of probiotics added to functional foods, positively improving human health.

5. Ethics statement

All current ethical requirements of the University of Concepcion, Chile and the “Fondo Nacional del Desarrollo Científico y Tecnológico” (FONDECYT), Chile (Comité asesor bioética CONICYT 2009) for the use and care of animals were followed. Animals were kept at the Biotherium of the Pharmacognosy Laboratory, University of Concepción, during the whole experimental process.

6. Conflict of interest

None.

7. Acknowledgements

This work was supported by Grant 14IDL2-29744, CORFO, Chile.

8. References

- Abadi, A. T. B., & Yamaoka, Y. (2018). *Helicobacter pylori* therapy and clinical perspective. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 14, 111–117
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.03.005>
- Anal A. & Stevens W. (2005) Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics*, 290, 45-54
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.11.015>
- Ancin-Azpilicueta C, González-Marco A, & Jiménez-Moreno N. (2008). Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 257–75.
<http://dx.doi.org/10.1080/10408390701289441>.
- Ayala, G., Escobedo-Hinojosa, W. I., de la Cruz-Herrera, C. F., & Romero, I. (2014). Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*, 20(6), 1450-1469.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i6.1450>
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104, 467–483. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>
- Chua, E. G., Verbrugghe, P., Perkins, T. T., & Tay, C. Y. (2015). Fucoidans disrupt adherence of *Helicobacter pylori* to AGS cells in vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 120981
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/120981>
- Coppola R, Succi M, Tremonte P, Reale A, Salzano G, & Sorrentino E. (2005) Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from

Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*, 85, 193-204.
<https://doi.org/10.1051/lait:2005007>

Coviello T, Matricardi P, Marianecchi C, & Alhaique F. (2007). Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release* Volume 119, 5-24 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.01.004>

de Klerk, N., Maudsdotter, L., Gebreegziabher, H., Saroj, S. D., Eriksson, B., Eriksson, O. S., Roos, S., Lindén, S., Sjölander, H., & Jonsson, A. B. (2016). Lactobacilli reduce *Helicobacter pylori* attachment to host gastric epithelial cells by inhibiting adhesion gene expression. *Infection and Immunity*, 84(5), 1526-1535. <https://doi.org/10.1128/IAI.00163-16>

De Kruif, C. G., & Tuinier, R. (2001). Polysaccharide protein interactions. *Food hydrocolloids*, 15(4-6), 555-563. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00076-5)

Delgado, S, Leite, A.M, Ruas-Madiedo, P, & Mayo, B. (2015). Probiotic and technological properties of *Lactobacillus* spp strains from the human stomach in the search for potential candidates against gastric microbial dysbiosis. *Frontiers in Microbiology*. 14(5), 766-773 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00766>

Emara, M.H, Elhawari, S.A, Yousef, S, Radwan, M.I, & Abdel-Aziz, H.R. (2016). Emerging role of probiotics in the management of *Helicobacter pylori* infection: histopathologic perspectives. *Helicobacter*, 21(1), 3-10. <https://doi.org/10.1111/hel.12237>

Garcia A, Henríquez P, Retamal C, & Pineda S. (2009) Probiotic properties of *Lactobacillus* spp isolated from gastric biopsies of *Helicobacter pylori*

infected and non-infected individuals. *Revista Médica de Chile*, 137(3), 369-376. <https://doi.org/S0034-98872009000300007>

García, A., Navarro, K., Sanhueza, E., Pineda, S., Pastene, E., Quezada, M., & González, C. (2017). Characterization of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-*Helicobacter pylori* activity. *Electronic Journal of Biotechnology*, 25, 75-83. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.11.008>

García-Castillo, V., Zelaya, H., Ilabaca, A., Espinoza-Monje, M., Komatsu, R., Albarracín, L., & Villena, J. (2018). *Lactobacillus fermentum* UCO-979C beneficially modulates the innate immune response triggered by *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Beneficial Microbes*, 9(5), 829-841 <https://doi.org/10.3920/BM2018.0019>

Gaudana, S. B., Dhanani, A. S., & Bagchi, T. (2010). Probiotic attributes of *Lactobacillus* strains isolated from food and of human origin. *British Journal of Nutrition*, 103(11), 1620–1628. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114509993643>.

Hartzen, S. H., Andersen, L. P., Bremmelgaard, A., Colding, H., Arpi, M., Kristiansen, J., Justesen, T., Espersen, F., Frimodt-Møller, N., & Bonnevie, O. (1997). Antimicrobial susceptibility testing of 230 *Helicobacter pylori* strains: Importance of medium, inoculum, and incubation time. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(12), 2634–2639. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.41.12.2634>

- Heidebach, T., Forst, P., & Kulozik, U. (2009). Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 23, 1670–1677. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.006>
- Hirno, S., Utt, M., Ringner, M., & Wadström, T. (1995). Inhibition of heparan sulphate and other glycosaminoglycans binding to *Helicobacter pylori* by various polysulphated carbohydrates. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 10(3-4), 301-306. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1995.tb00048.x>
- Iwanaga, K., Yabuta, T., Kakemi, M., Morimoto, K., Tabata, Y., & Ikada, Y. (2003). Usefulness of microspheres composed of gelatin with various cross-linking density. *Journal of Microencapsulation*, 20(6), 767-776. <https://doi.org/10.3109/02652040309178087>
- Kailasapathy, K., & Masondole, L. (2005). Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60(3), 252-258 <https://search.proquest.com/docview/199395634?accountid=15690>
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), 39-85. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x>
- Kolida, S., Saulnier, D. M., & Gibson, G. R. (2006). Gastrointestinal microflora: Probiotics. *Advances in Applied Microbiology*, 59(6), 187–219. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(06\)59007-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(06)59007-0)
- Lebeer S, Verhoeven TL, Perea Velez M, Vanderleyden J, & De Keersmaecker SC. (2007). Impact of environmental and genetic factors on bio Im

formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 6768–6775.

<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01393-07>

Leszczyńska, K., Namiot, A., Fein, D. E., Wen, Q., Namiot, Z., Savage, P. B., Diamond, S., Janmey, P., & Bucki, R. (2009). Bactericidal activities of the cationic steroid CSA-13 and the cathelicidin peptide LL-37 against *Helicobacter pylori* in simulated gastric juice. *BMC Microbiology*, 9(1), 187-197. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-187>

Lorca G. Wadström T. Valdez G. & Ljungh A. 2001. *Lactobacillus acidophilus* autolysins inhibit *Helicobacter pylori* in vitro. *Current in Microbiology* 42(1), 39-44. <https://doi.org/10.1007/s002840010175>

Mahmood K. Tabasum S. Nasif M. Sultan N. Aslam N. Noreen A. & Zuber M. (2017). A review on synthesis, properties and applications of natural polymer based carrageenan blends and composites. *International Journal of Biological Macromolecules* 96, 282–301. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.095>

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C A., Gisbert, JP., Kuipers, EJ., Axon, AT., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, DY., Hunt, R., Moayyedi, P., Rokkas, T., Rugge, M., Selgrad, M., Suerbaum, S., & El-Omar, EM. (2017) Management of *Helicobacter pylori* infection- The Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* 0,1-25 <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>

Manfredi, M, Bizzarri, B, Sacchero, R.I, Maccari, S, Calabrese, L, Fabbian, F, & De'Angelis, G.L. (2012). *Helicobacter pylori* infection in clinical practice:

- Probiotics and a combination of probiotics + lactoferrin improve compliance, but not eradication, in sequential therapy. *Helicobacter*. 17(4), 254-263. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2012.00944.x>
- Merino, J. S., García, A., Pastene, E., Salas, A., Saez, K., & González, C. L. (2018). *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strongly inhibited *Helicobacter pylori* SS1 in *Meriones unguiculatus*. *Beneficial Microbes*, 9(4), 625-627. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0160>
- Mizock, B., FACP, & FCCM. (2015). Probiotics. *Disease-a-Month*, 61(7), 259-290. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2015.03.011>
- Mommersteeg, M. C., Yu, J., Peppelenbosch, M. P., & Fuhler, G. M. (2018). Genetic host factors in *Helicobacter pylori*-induced carcinogenesis: Emerging new paradigms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1869(1), 42-52. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.11.003>
- Nag, A., K.-S. Han, & H. Singh. (2011) Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. *International Dairy Journal*, 21(4), 247-253. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.002>
- Nanaki S. Karavas E. Kalantzi L. & Bikiaris D. (2010). Miscibility study of carrageenan blends and evaluation of their effectiveness as sustained release carriers. *Carbohydrate Polymers*, (79), 1157-1167. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.067>
- Necas J. & Bartosikova L. (2013). Carrageenan a review. *Veterinarni Medicina*, (58), 187-205.

- Nuraida L. (2015) A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. *Food Science and Human Wellness*; 4(2), 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.06.001>
- O'Brien J. Wilson I. Orton T. & Pognan F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267, 5421–5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>
- Oh, Y., Osato, M. S., Han, X., Bennett, G., & Hong, W. K. (2002). Folk yoghurt kills *Helicobacter pylori*. *Journal of Applied Microbiology*, 93(6), 1083-1088. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01779.x>
- Patel PJ, Singh SK, Panaich S, & Cardozo L. (2014) The aging gut and the role of prebiotics, probiotics, and synbiotics: A review. *Journal of Clinical Gerontology and Geriatrics*, 5(1), 3-6. <https://doi.org/10.1016/j.jcgg.2013.08.003>
- Pavli M. Baumgartner S. Kos P. & Kogej K. (2011). Doxazosin-carrageenan interactions: A novel approach for studying drug-polymer interactions and relation to controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 421(1), 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.09.019>
- Peres CM, Alves M, Hernandez-Mendoza A, Moreira E, Silva S, Bronze MR, Vilas-Boas, L., Peres, C., & Malcata, X. (2014) Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics. *LWT-Food Science and Technology* 59(1), 234–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.003>.

- Rathore S. Mahendrakumar P. Liew C. Chan L. & Sia P. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 369-381. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.022>
- Ryan, K.A, O'Hara, A.M, Van Pijkeren, J.P, Douillard, P.F, & O'Toole, P.W. (2009). *Lactobacillus salivarius* modulates cytokine induction and virulence factor gene expression in *Helicobacter pylori*. *Journal Medical Microbiology*. 58(8): 996-1005. <https://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.009407-0>
- Salas-Jara, M. J., Sanhueza, E. A., Retamal-Díaz, A., González, C., Urrutia, H., & García, A. (2016). Probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C biofilm formation on AGS and Caco-2 cells and *Helicobacter pylori* inhibition. *Biofouling*, 32(10), 1245-1257. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1249367>
- Servaty, R., Schiller, J., Binder, H., & Arnold, K. (2001). Hydration of polymeric components of cartilage—an infrared spectroscopic study on hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28(2), 121-127. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(00)00161-6)
- Sgouras, D.E. Panayotopoulou, B, Martinez-Gonzalez, K, Petraki, S, & Michopoulos, A. (2005). *Lactobacillus johnsonii* La1 attenuates *Helicobacter pylori*-associated gastritis and reduces levels of proinflammatory chemokines in C57BL/6 mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 12(12), 1378-1386. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.12.1378-1386.2005>

- Shibata, H., Kimura-Takagi, I., Nagaoka, M., Hashimoto, S., Sawada, H., Ueyama, S., & Yokokura, T. (1999). Inhibitory effect of Cladosiphon fucoidan on the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric cells. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 45(3), 325-336. <https://doi.org/10.3177/jnsv.45.325>
- Siddique, O., Ovalle, A., Siddique, A. S., & Moss, S. F. (2018). *Helicobacter pylori* Infection: an Update for the Internist in the Age of Increasing Global Antibiotic Resistance. *The American journal of medicine*, 131(5), 473-479. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2017.12.024>
- Song, W., Wang, Y., Zhang, L., Fu, S., Zeng, Y., & Hu, H. (2014). Preparation and evaluation of polysaccharide sulfates for inhibiting *Helicobacter pylori* adhesion. *Carbohydrate Polymers*, 103, 398-404. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.063>
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura GD, Djukić S, Ćirković I, Ruzicka F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Journal of Pathology Microbiology and Immunology*. 115, 891– 899. <http://dx.doi.org/10.1111/apm.2007.115.issue-8>
- Sunanliganon, C, Thong-Ngam, D, Tumwasorn, & S, Klaikeaw, N. (2012). *Lactobacillus plantarum* B7 inhibits *Helicobacter pylori* growth and attenuates gastric inflammation. *World Journal of Gastroenterology*. 18(20), 2472-2480. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v18.i20.2472>

- Terayama, Y, Matsuura, T, Uchida, M, Narama, I, & Ozaki, K. (2016). Probiotic (yogurt) containing *Lactobacillus gasseri* OLL2716 is effective for preventing *Candida albicans*-induced mucosal inflammation and proliferation in the forestomach of diabetic rats. *Histology and Histopathology*. 31(6), 689-697. <http://dx.doi.org/10.14670/HH-11-710>
- Terraf, M., Juarez Tomas, M., Nader-Macias, M., & Silva, C. (2012). Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. *Journal of Applied Microbiology*. 113(6), 1517-1529. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05429.x>
- Vega-Sagardía, M., Rocha, J., Sáez, K., Smith, C. T., Gutierrez-Zamorano, C., & García-Cancino, A. (2018). Encapsulation, with and without oil, of biofilm forming *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strain in alginate-xanthan gum and its anti-*Helicobacter pylori* effect. *Journal of Functional Foods*, 46, 504-513. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.067>
- Villard, V., & Raynaud, P. (1968) Presence of a bacteriolytic agent in contents of rabbit stomach. In *Journal de Physiologie*, (p. 323). París: Masson Editeur.
- Williams NT. (2010) Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67, 449–58. <http://dx.doi.org/10.2146/ajhp090168>.
- Wirtz V. Dreser A. & Gonzales R. (2010). Trends in antibiotic utilization in eight Latin American countries, 1997-2007. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 27(3), 219-225.
- Wu, W, Wang, F, Gao, X, Niu, T, Zhu, X, Yan, X, & Chen, H. (2016). Synergistic effect of kappa-carrageenan on oxazolone-induced inflammation in balb/c

mice. *BMC Gastroenterology*. 25(16), 41- 50.

<https://doi.org/10.1186/s12876-016-0459-7>



CAPÍTULO IV: INCREASED ANTI-*HELICOBACTER PYLORI* EFFECT OF THE PROBIOTIC *LACTOBACILLUS FERMENTUM* UCO-979C STRAIN ENCAPSULATED IN CARRAGEENAN EVALUATED IN GASTRIC SIMULATIONS UNDER FASTING CONDITIONS

Trabajo aceptado en Food Research International el 30 de diciembre de 2018.

Cristian Gutiérrez-Zamorano^a, Marisela González-Ávila^b, Gustavo Díaz-Blas^a, Carlos T. Smith^a, Carlos González-Correa^a and Apolinaria García-Cancino^{a*}.

^aDepartamento de Microbiología, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

^bCentro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Guadalajara, México.



Abstract

Helicobacter pylori, a gastric carcinogenic pathogen, colonizes the stomach of 50% of the human population and is considered as a WHO priority 2 due to its antibiotics resistance. Therefore, research should aim to avoid *H. pylori* infection. Probiotics are an emerging alternative to handle this pathogen, making it necessary to have means to evaluate their effectivity. This work evaluated the effect of a carrageenan encapsulated probiotic, *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strain, against the pathogenic *H. pylori* SS1 strain under simulated gastric conditions (fasting or standard diet, pH 3.0 under microaerobic condition and agitation). Samples were obtained from simulators up to 2.5 h after adding the probiotic, either planktonic or carrageenan encapsulated, and *H. pylori* counted

using enriched Columbia agar. Gastric simulations under fasting or standard diet showed collaboration between *L. fermentum* and carrageenan against the pathogen, it being undetectable at 1.5 or 2.5 h, respectively, allowing to conclude that administration of the probiotic under fasting (harsher acid environment) provides a better anti-*H. pylori* effect than administering it associated to the diet. Thus, it can be suggested to consume low pH resistant probiotics under fasting.

1. Introduction

Helicobacter pylori is a bacterium whose niche is the gastric epithelium, it infects nearly 50% of the population of the world and it is associated to several gastroduodenal pathologies, including gastric cancer and peptic ulcer (Abadi and Yamaoka, 2018; Mommersteeg *et al.*, 2018). This pathogen may cause chronic gastritis which can derive in the development of atrophic gastritis, intestinal metaplasia and, finally, contribute to gastric cancer (Wroblewski and Peek, 2013; Mommersteeg *et al.*, 2018).

According to the Maastricht V Consensus, *H. pylori* is listed in the second category of antibiotics susceptibility (10-50% resistance); thus, the standard therapy is not always successful due to the high levels of resistance to clarithromycin (15% to 40%) and to metronidazole (Malfertheiner *et al.*, 2017). Therefore, it is necessary to search for innovative strategies to prevent the infection by this pathogen (Ayala *et al.*, 2014). Among them, using probiotic strains with anti-*H. pylori* potential must be considered (Salas-Jara *et al.*, 2016; Garcia *et al.*, 2017).

Probiotics are an emerging alternative to handle gastrointestinal diseases (Dore *et al.*, 2015; Abadi and Yamaoka, 2018). They act modifying the microbiota, as antibacterial agents or immunomodulators (García-Castillo *et al.*, 2018). For a number of years, our group has been interested in the search of approaches to prevent *H. pylori* infection, particularly the use of probiotics. Extensive research allowed us to conclude that *L. fermentum* UCO-979C strain possesses excellent probiotic properties and anti-*H. pylori* activity in cellular models (Salas-Jara *et al.*, 2016; Vega-Sagardía *et al.*, 2018) and in animal models (Garcia *et al.*, 2017; Merino *et al.*, 2018). Besides, its potent immunomodulatory ability has been shown at *in vitro* and animal model levels (García-Castillo *et al.*, 2018). Therefore, the prophylaxis against *H. pylori* infection using *L. fermentum* UCO-979C strain may also be effective if used in humans. It must be considered that a probiotic strain must fulfill certain survival and viability requirements when consumed with foods (Champagne *et al.*, 2018; de Simone, 2018).

To avoid the necessity of subjecting patients or volunteers to sampling processes, which may be invasive, or extended follow ups, it is possible to evaluate the digestion of probiotic foods consumed by humans using animal models. Nevertheless, since there are differences between the native microbiota of animal models and humans (Ritchie *et al.*, 2015) results must be carefully considered. Systems able to simulate the physiology of organs or tissues may be also helpful to study responses to drugs, foods or microorganisms. Initially, particularly in the case of the stomach, simulating systems may include enzymes, nutrients, metabolites,

physiological pH values and bacteria, providing an appropriate approach to simulate organs outside the human body.

Carrageenan is a high molecular weight polysaccharide used as additive in several foods (Mahmood *et al.*, 2017). The presence of sulfates in the structure of carrageenan, and other polysaccharides used in the food industry, give them anti-*H. pylori* activity (Song *et al.*, 2014). On the other hand, encapsulation is a procedure providing long term protection to probiotics (Burgain *et al.*, 2017). Therefore, carrageenan encapsulation of *L. fermentum* UCO-979C may both protect the probiotic and improve its anti-*H. pylori* activity.

Therefore, considering that *L. fermentum* UCO-979C strain is a low-pH tolerant probiotic (Garcia *et al.*, 2017) and it has shown probiotic activity against the pathogen *H. pylori* in *in vitro* (also including eukaryotic cells) and animal model assays, the aim of this work was to evaluate the effect of this probiotic encapsulated in carrageenan against the pathogenic *H. pylori* SS1 strain under simulated gastric conditions.

2. Materials and Method

2.1. Bacterial strains and culture

Lactobacillus fermentum UCO-979C strain was isolated from a gastric biopsy obtained in 2008 from a patient. Previously, the patient signed an informed consent in agreement with the regulations of the “Ethics Committee of the Guillermo Grant

Benavente Hospital” located at Concepcion, Chile. The protocol of the study was approved with the code #08-03-03. This strain has been extensively characterized (Garcia *et al.*, 2017), including sequencing its whole genome (Karlyshev *et al.*, 2015). To culture *L. fermentum* UCO-979C strain, Mann-Rogosa Sharpe (MRS) broth (BD Difco, Le Pont de Claix, France) was used. Culturing was done under microaerobic conditions (5% CO₂) at 37 °C during 18 h followed by culturing in MRS agar (BD Difco, Sparks, MD, USA) under similar conditions for further 24 h.

Since it has been used in previous studies due to its capacity to efficiently colonize the digestive tract of several animals used as model, including mice (Lee *et al.*, 1997) and Mongolian gerbils (Garcia *et al.*, 2017; Merino *et al.*, 2018), *Helicobacter pylori* SS1 strain was the challenging pathogenic bacterium used in this study. *H. pylori* SS1 strain was cultured on Columbia blood agar base (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) supplemented with 5% horse blood and 1% *H. pylori* selective supplement DENT (Oxoid) under microaerobic conditions (5% CO₂) at 37 °C during 72–96 h. Colonies were suspended in saline solution and adjusted to an optical density of McFarland 2 for the simulation assays.

2.2. Carrageenan encapsulation of *L. fermentum* UCO-979C

Two percent Kappa I and Lambda carrageenans, in a 1:1 proportion, in 0.01% CaCl₂ was used to encapsulate the probiotic strain following the procedure of Iwanaga *et al.* (2003) with modifications. Two hundred mL of dissolved carrageenan was mixed with the pellet obtained after culturing *L. fermentum* UCO-979C during 24 h in 200 mL MRS broth and centrifuging at 2000 g for 10 min at

4°C. The final mixture was vigorously homogenized during 5 min and placed in 50 mL syringes. Capsules were obtained dripping the mixture on commercial vegetal oil at 0°C under constant agitation. Capsules were washed thrice using cold sterile distilled water, sieved and stored in sterile Petri dishes at 4°C until used. Carrageenan capsules without the probiotic, to be used as controls, were prepared following the same procedure.

*2.3. Quantification of viable *L. fermentum* UCO-979C cells in capsules*

Capsules were weighted and dissolved in 1 mL saline solution using a vortex and seeded in Petri dishes containing MRS agar. Viable cells were counted after 48 h of incubation at 37 °C.



2.4. Gastric simulation system

The minimal conditions of the stomach were simulated following the procedure of Hernandez-Moedano *et al.* (2014) and Silva *et al.* (2017) but including only the stomach section. Assays were performed considering a fasting condition using sterile saline solution (0.9% w/v) adjusted to pH 3.0 or a sterilized (121°C for 15 min) simulated Chilean healthy adult standard diet (59.12% w/v carbohydrates [50% saccharose and 50% wheat flour], 28.26% w/v lipids [vegetal oil], 12.6% w/v proteins [casein peptone]) also adjusted at pH 3.0 (Ministerio de Salud, Chile, 2011). Two hundred mL of saline solution or standard diet were added to each simulator and supplemented with 0.33 g pepsin, 0,086 g amylase and urea to reach a final concentration of 0.6 mM. Microaerobic conditions were obtained placing the simulators in an incubating chamber with 5% CO₂ at 37°C and orbital

shacking (150 rpm). A simulator containing saline solution at pH 7.0 and without enzymes or urea was used as a control.

2.5. Gastric simulation under fasting or standard diet conditions using planktonic or encapsulated L. fermentum UCO-979C strain and H. pylori SS1 strain.

The effect, under gastric simulation, of planktonic or encapsulated *L. fermentum* UCO-979C on the viability of *H. pylori* SS1, was assessed under several conditions detailed in Table 1.

Table 1. Conditions and strains used in the gastric simulations.

Condition	Added strains
Control	<i>H. pylori</i> SS1
Fasting	<i>H. pylori</i> SS1
Fasting	Planktonic <i>L. fermentum</i> UCO-979C and <i>H. pylori</i> SS1
Fasting	Capsulated <i>L. fermentum</i> UCO-979C and <i>H. pylori</i> SS1
Fasting	<i>H. pylori</i> SS1 and carrageenan capsule without bacteria
Standard diet	<i>H. pylori</i> SS1
Standard diet	Planktonic <i>L. fermentum</i> UCO-979C and <i>H. pylori</i> SS1
Standard diet	Capsulated <i>L. fermentum</i> UCO-979C and <i>H. pylori</i> SS1

Gastric simulations were performed at 37°C with 5% CO₂ and agitation.

For the assays requiring planktonic probiotic, 2 mL of an overnight culture of *L. fermentum* UCO-979C (10⁹ UFC/mL) in MRS broth were added to the simulators. For the assays requiring encapsulated probiotic, 5 g of capsules containing 4x10⁸ *L. fermentum* UCO-979C UFC/g of capsules were added to simulators. Two mL of *H. pylori* SS1 adjusted at McFarland 2, obtained as described above, were added to the simulators.

2.6. *H. pylori* SS1 viability assessment

To assess the viability of *H. pylori* in the assays of gastric simulation, 2 mL aliquots were obtained from each simulator at times 0, 0.5, 1, 1.5 and 2.5 h. Serial dilutions were prepared from each aliquot and cultured on Columbia agar, as described above, and colonies counted after selecting the plates with the convenient number of colonies.

2.7. Statistical analysis

All experiments were done in triplicate. To determine the standard deviation and the statistical significance and to obtain graphics, GraphPad Prism 7 software was used. A one way ANOVA analysis was performed with 95% confidence.



3. Results

Results of the simulations under fasting showed a significant decrease of *H. pylori* counts along time when compared to the pH 7.0 control. There was no significant differences in pathogen counts between the fasting simulations at times 0 and 0.5 h. The simulation containing carrageenan encapsulated *L. fermentum* UCO-979C showed to provide the best reduction of the pathogen, producing a significant decrease in *H. pylori* counts at 1 h and the pathogen was not detected at 1.5 and 2.5 h. *H. pylori* was not detected in the simulations including the planktonic probiotic or capsules without probiotic at 2.5 h (Figure 1).

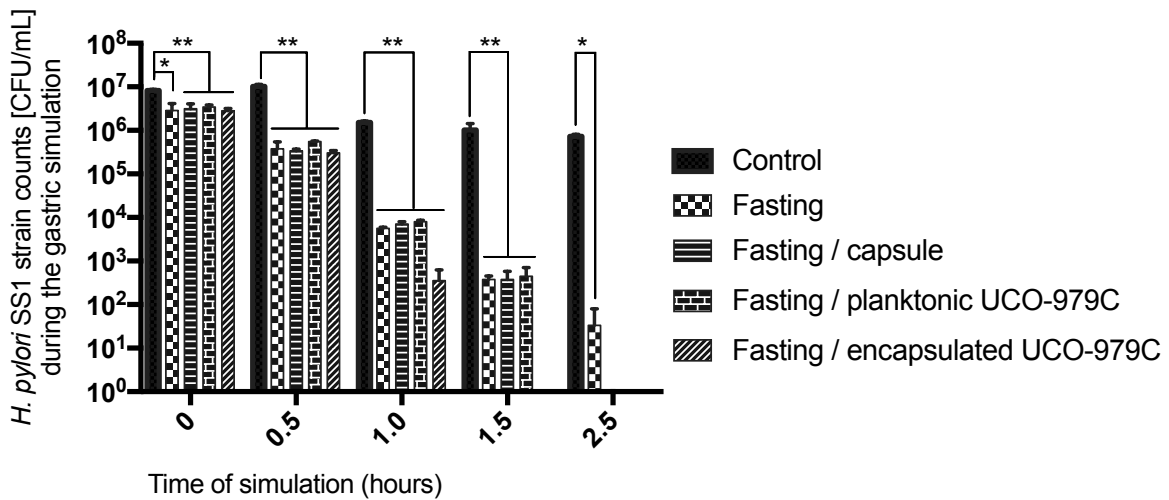


Figure 1. Counts of *H. pylori* SS1 strain challenged with planktonic or carrageenan encapsulated *L. fermentum* UCO-979C probiotic strain or bacteria-free carrageenan capsules under simulated gastric conditions and fasting. Bars indicate the standard deviation of 3 replicates. Significant differences: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$.

In the simulation with standard diet, a decrease of *H. pylori* counts was observed from 1.5h on. The simulation including planktonic probiotic and the simulation without probiotic showed the presence of *H. pylori* (1.0×10^2 in both cases) after 2.5 h while, at the same time span, *H. pylori* was not detected in the simulation including the carrageenan encapsulated probiotic strain (Figure 2).

When comparing the effect of the encapsulated probiotic added to the simulator under fasting or under healthy adult standard diet conditions, under fasting conditions *H. pylori* counts decreased in 4 logs after 1 h of simulation and it was undetectable after 1.5 h but under standard diet this pathogen was still detectable (1.3×10^3 CFU/mL) at 1.5 h and was not detected at 2.5 h (Figure 3). Regarding the pH values in the simulator, under fasting conditions it decreased from 3.00 to 2.92 and under healthy adult standard diet condition, it decreased from 3.00 to 2.54.

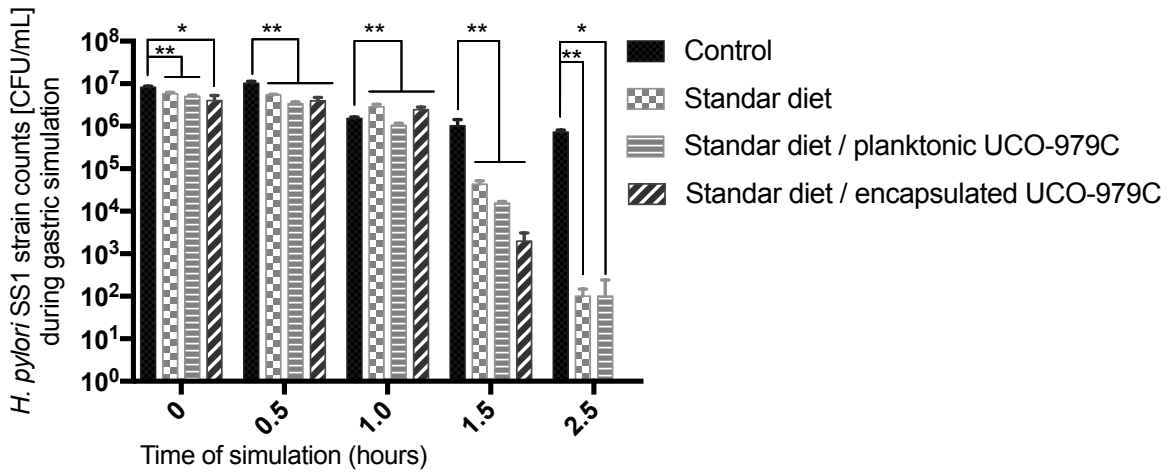


Figure 2. Counts of *H. pylori* SS1 strain challenged with planktonic or encapsulated *L. fermentum* UCO-979C probiotic strain under simulated gastric conditions and administration of a healthy adult standard diet. Bars indicate the standard deviation of 3 replicates. Significant differences: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$.

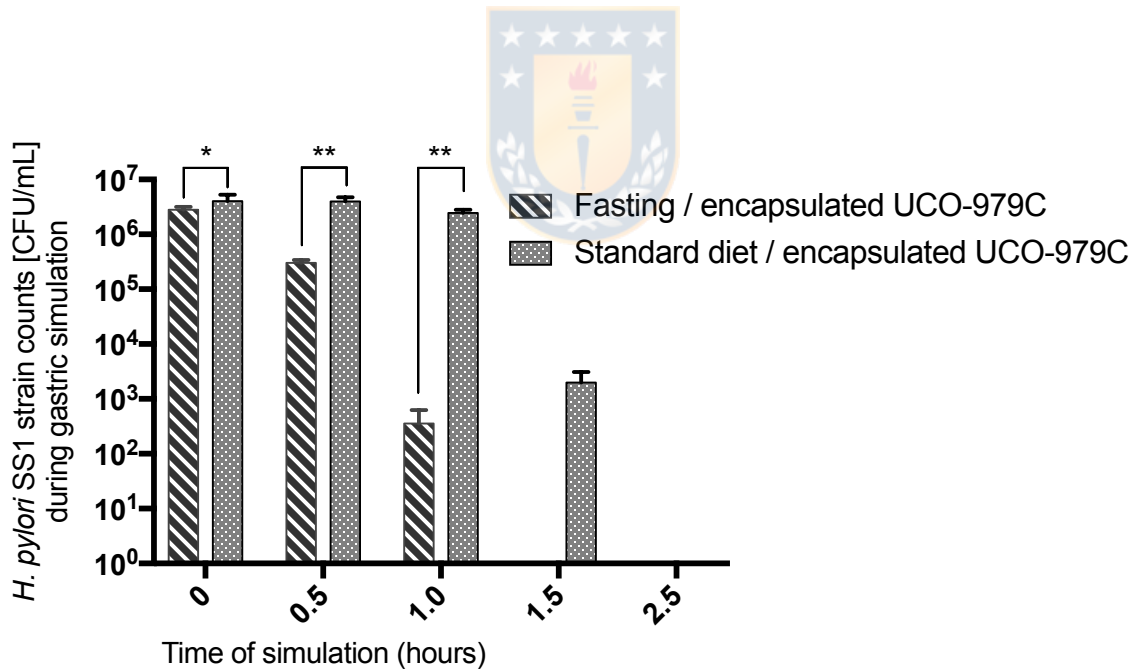


Figure 3. Counts of *H. pylori* SS1 strain, subjected to simulated gastric conditions, challenged with carrageenan encapsulated *L. fermentum* UCO-979C probiotic strain under fasting or healthy adult standard diet. Bars indicate the standard deviation of 3 replicates. Significant differences: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$.

4. Discussion

Numerous studies have associated *H. pylori* colonization with several gastric pathologies, including gastric cancer (Sachs and Scott, 2012). Since the cancer risk associated to this pathogen is high, the WHO included *H. pylori* among Group 1 gastric cancer risk factors (IARC, 1994).

The most recent Maastricht Consensus recommendation indicates that every person infected with *H. pylori* must be treated (Malfertheiner *et al.*, 2017). Nevertheless, antibiotic treatments are not always effective or reinfection may follow a successful treatment. Moreover, the WHO included *H. pylori* in the “Priority 2: high” list of pathogens due to its antibiotic resistance and indicated the necessity to develop new antibiotics to treat this pathogen (Tacconelli *et al.*, 2017).

Therefore, alternative approaches to the current therapeutic allopathy against *H. pylori* are necessary. These alternatives include, among others, plant extracts, vaccines, peptides, phototherapy, polysaccharides, honey and propolis, gastric mucin and fungi (Ayala *et al.*, 2014; Dore *et al.*, 2015; Abadi and Yamaoka, 2018). Probiotics with anti-*H. pylori* activity are also a promising alternative and the *in vitro* antagonism against this pathogen has been reported for *L. acidophilus*, *L. casei* Shirota strain, *Bacillus subtilis* and *Weissella confusa* (Johnson-Henry *et al.*, 2001). Results using animal models have shown the prophylactic effect of some probiotic strains which reduced the colonization by *H. pylori* (de Klerk *et al.*, 2016).

In a meta-analysis study, Wang *et al.* (2017) indicated that most strategies to eradicate *H. pylori* including probiotics were effective when associated to conventional therapy but none of the probiotics included in the analysis showed better results than others. On the other hand, Losurdo *et al.* (2018), in another meta-analysis, indicated that in some cases, probiotics are able to defeat *H. pylori* and that the administration of probiotics, on the contrary to antibiotics, is not subjected to the risk of resistance. Therefore, although probiotics are generally accepted as a prophylactic option, their usefulness as therapeutic options is still to be elucidated.

Probiotics may generate a hostile environment for *H. pylori* without damaging the host. They can produce lactic acid (Oh *et al.*, 2002) or bacteriocines (Dobson *et al.*, 2012), counteract *H. pylori* produced hypochlorhydria (Rivas-Traverso and Hernandez, 2000), inhibit the adherence of the pathogen to epithelial tissue receptors of the host (Wang *et al.*, 2013) or alter the activity of *H. pylori* urease as shown *in vitro* for *L. acidophilus* (O Connor *et al.*, 1989). The strain used in this study, *L. fermentum* UCO-979C, has shown a potent anti-*H. pylori* activity both *in vitro* (Salas-Jara *et al.*, 2016; García *et al.*, 2017; Vega-Sagardía *et al.*, 2018) and in animal models (Garcia *et al.*, 2017; Merino *et al.*, 2018) and it also possesses immunomodulating activity (Garcia-Castillo *et al.*, 2018).

Nevertheless, the anti-*H. pylori* activity of *L. fermentum* UCO-979C strain has not been yet studied simulating physiological stomach conditions, the approach used in this study. Anti-*H. pylori* activity was evaluated using planktonic probiotic or,

considering the anti-*H. pylori* activity of certain polysaccharides (Shannon and Abu-Ghannam, 2016), as carrageenan encapsulated probiotic.

There are no conclusive answers about the best time of day to consume probiotics. During fasting, the pH of the stomach is too acid, reducing the viability of the probiotic but it may easily reach an epithelium to which it can adhere. It is possible to speculate that, if consumed with other foods, the stomach pH may be more favorable increasing the viability of the probiotic but, being mixed with the food, its possibility to adhere to the epithelium might be reduced.

Our results showed that in the fasting gastric simulation, *H. pylori* counts significantly decreased at all sampled times when compared to the pH 7.0 control. The reduction of counts of this same pathogen was reported by Schreiber *et al.* (2005) using *H. pylori* and mucins and they attributed it to the acidic pH. These results explain the observation of Thorens *et al.* (1996) reporting that children and certain adults, in the latter due to their feeding habits or other reasons, which have less acidic pH in their stomachs favor the viability of microorganisms.

Hirno *et al.* (1995) studied the inhibitory effect of several dissolved polysulfate carbohydrates over *H. pylori*, showing that lambda- and kappa-carrageenan killed 98-100 or 85-95% *H. pylori*, respectively. Based on these results, carrageenan was chosen as the encapsulating material in this work. Carrageenan, as well as some alginates, pectins or fucoidans, possess acid groups (sialylated or sulfated) which bind to glycolipid groups of biological membranes. These sulfated polysaccharides

compete with *H. pylori* to bind to gastric epithelium mucins, inhibiting the binding of the pathogen (Song *et al.*, 2014). On the other hand, Chua *et al.* (2015) determined that fucoidans bind to *H. pylori* with greater affinity than AGS cells. Shibata *et al.* (1999) reported that this affinity is directed to several *H. pylori* outer membrane proteins. In addition, these sulfated polysaccharides can increase the viscosity of the stomach content, prolonging the gastric emptying time which favors the release and effect of probiotics encapsulated with these polysaccharides (Lutay *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2014). Therefore, it could be expected that encapsulation of the probiotic with carrageenan improved the anti-*H. pylori* activity already reported for *L. fermentum* UCO-979C also in the gastric simulation assay.

In the simulation using the standard diet, no significant differences were observed in *H. pylori* counts up to 1.5 h. Since, under fasting the pathogen was undetectable in a shorter time, suggesting a protecting role of foods for this pathogen. In the simulation using standard diet and the encapsulated probiotic, the pH in the simulator decreased, perhaps caused by the food fermentation by *L. fermentum* UCO-979C. O’Gara *et al.* (2008) studied the viability of *H. pylori* in a gastric simulation, under fasting and in the presence of food, but they adjusted the pH to a value close to 6 because they wanted to simulate mainly a zone proximal to the epithelium, where the gastric mucin is present. As opposed to the results of this work, they reported that a diet containing carbohydrate, proteins, lipids and NaCl (5 g/L) significantly reduced *H. pylori* counts after 6 h of simulation which was not observed under fasting. These authors attributed this effect to the components of their standard food.

5. Conclusion

The anti-*H. pylori* effect of *L. fermentum* UCO-979C strain in a simulated gastric system ratifies the probiotic activity of this strain previously shown in *in vitro* and in animal model studies. The anti-*H. pylori* effect was enhanced when the probiotic was encapsulated in carrageenan, showing a collaborative work between the probiotic strain and carrageenan. Results also showed that consuming the probiotic, under fasting conditions provided better anti-*H. pylori* effect than consuming it associated to other foods. Thus, consuming this probiotic, or others probiotics resistant to low pH, is recommended after fasting.



6. Acknowledgements

This work was funded by project Corfo 14IDL2-29744 of Innova-Chile (Chile) and by the doctorate scholarship of Conicyt (Chile) PCHA/Doctorado Nacional/2012-21120911 (CG-Z).

7. Declaration of interests

None.

References

Abadi, A. T. B., & Yamaoka, Y. (2018). *Helicobacter pylori* therapy and clinical perspective. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 14, 111–117
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.03.005>

Ayala, G., Escobedo-Hinojosa, W. I., de la Cruz-Herrera, C. F., & Romero, I. (2014). Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*, 20(6), 1450. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i6.1450>

Champagne, C. P., da Cruz, A. G., & Daga, M. (2018). Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. *Current Opinion in Food Science*. 22 160-166 <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.04.008>

Chua, E. G., Verbrugghe, P., Perkins, T. T., & Tay, C. Y. (2015). Fucoidans disrupt adherence of *Helicobacter pylori* to AGS cells in vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 120981
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/120981>

de Klerk, N., Maudsdotter, L., Gebreegziabher, H., Saroj, S. D., Eriksson, B., Eriksson, O. S., Roos, S., Lindén, S., Sjölander, H., & Jonsson, A. B. (2016). Lactobacilli reduce *Helicobacter pylori* attachment to host gastric epithelial cells by inhibiting adhesion gene expression. *Infection and Immunity*, IAI-00163. <https://doi.org/10.1128/IAI.00163-16>

de Simone, C. (2018). The Unregulated Probiotic Market. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. In Press <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.01.018>

Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait?. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 1-6. <https://doi.org/10.1128/AEM.05576-11>

Dore, M. P., Goni, E., & Di Mario, F. (2015). Is there a role for probiotics in *Helicobacter pylori* therapy?. *Gastroenterology Clinics*, 44(3), 565-575., <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2015.05.005>

García, A., Navarro, K., Sanhueza, E., Pineda, S., Pastene, E., Quezada, M., & González, C. (2017). Characterization of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-*Helicobacter pylori* activity. *Electronic Journal of Biotechnology*, 25, 75-83.

<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.11.008>

Garcia-Castillo, V., Zelaya, H., Ilabaca, A., Espinoza-Monje, M., Komatsu, R., Albarracín, L., & Villena, J. (2018). *Lactobacillus fermentum* UCO-979C beneficially modulates the innate immune response triggered by *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Beneficial Microbes*, 9(5):829-841

<https://doi.org/10.3920/BM2018.0019>.

Hernandez-Moedano, A., Moreno-Ramos, E. F., Herrera-Rodríguez, S. E., & Gonzalez-Avila, M. (2014). Changes in intestinal microorganisms influenced by agave fructans in a digestive tract simulator. *Journal of Chemical Biological and Physical Sciences*, 4, 19-25. <https://www.researchgate.net/publication/269697087>

Hirno, S., Utt, M., Ringner, M., & Wadström, T. (1995). Inhibition of heparan sulphate and other glycosaminoglycans binding to *Helicobacter pylori* by various polysulphated carbohydrates. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 10(3-4), 301-306. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1995.tb00048.x>

International Agency for Research on Cancer. (1994). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans (Vol. 61). *International Agency for Research on Cancer*.



Iwanaga, K., Yabuta, T., Kakemi, M., Morimoto, K., Tabata, Y., & Ikada, Y. (2003). Usefulness of microspheres composed of gelatin with various cross-linking density. *Journal of Microencapsulation*, 20(6), 767-776. <https://doi.org/10.3109/02652040309178087>

Johnson-Henry, K. C., Mitchell, D. J., Avitzur, Y., Galindo-Mata, E., Jones, N. L., & Sherman, P. M. (2004). Probiotics reduce bacterial colonization and gastric inflammation in *H. pylori*-infected mice. *Digestive Diseases and Sciences*, 49(7-8), 1095-1102. <https://doi.org/10.1023/B:DDAS.0000037794.02040.c2>

Karlyshev AV, Villena J, González C, Albarracin L, Barros J, García A. 2015. Draft genome sequence of a probiotic strain, *Lactobacillus fermentum* UCO-979C. *Genome Announcements*. 3:e01439–15. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.01439-15>

Lee, A., O'Rourke, J., Ungaria, M., Robertson, B., Daskalopoulos, G., Dixon, M., (1997) Standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: Introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 112:1386-1397,

Losurdo, G., Cubisino, R., Barone, M., Principi, M., Leandro, G., Ierardi, E., & Di Leo, A. (2018). Probiotic monotherapy and *Helicobacter pylori* eradication: A systematic review with pooled-data analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 24(1), 139-149. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i1.139>

Lutay, N., Nilsson, I., Wadström, T., & Ljungh, Å. (2011). Effect of heparin, fucoidan and other polysaccharides on adhesion of enterohepatic *Helicobacter* species to murine macrophages. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(1), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9109-7>

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C A., Gisbert, JP., Kuipers, EJ., Axon, AT., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, DY., Hunt, R., Moayyedi, P., Rokkas, T., Rugge, M., Selgrad, M., Suerbaum, S., El-Omar, EM. (2017) Management of *Helicobacter pylori* infection- The Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* 0:1-25 <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>

Merino, J. S., García, A., Pastene, E., Salas, A., Saez, K., & González, C. L. (2018). *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strongly inhibited *Helicobacter pylori* SS1 in *Meriones unguiculatus*. *Beneficial Microbes*, 9 (4), 625 - 627, <https://doi.org/10.3920/BM2017.0160>

Ministerio de Salud. (2011) Encuesta Nacional de Salud ENS Chile 2009-2010 Tomo I, *Ministerio de Salud, Gobierno de Chile*

Mommersteeg, M. C., Yu, J., Peppelenbosch, M. P., & Fuhler, G. M. (2018). Genetic host factors in *Helicobacter pylori*-induced carcinogenesis: Emerging new paradigms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1869(1), 42-52. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.11.003>

O'Connor, H., Schorah, C., Habibzedah, N., Axon, A., Axon, A., Cockel, R. (1989) Vitamin C in the human stomach: relation to gastric pH, gastroduodenal disease, and possible sources. *Gut*. 30(4):436-442.

O'Gara, E. A., Maslin, D. J., Nevill, A. M., & Hill, D. J. (2008). The effect of simulated gastric environments on the anti-*Helicobacter activity* of garlic oil. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), 1324-1331. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03637.x>

Oh, Y., Osato, M. S., Han, X., Bennett, G., & Hong, W. K. (2002). Folk yoghurt kills *Helicobacter pylori*. *Journal of Applied Microbiology*, 93(6), 1083-1088. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01779.x>

Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47-e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>

Rivas-Traverso, F., & Hernández, F. (2000). *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Revista Biomédica*, 11(3), 187-205.

RSA, 2017. "Reglamento Sanitario de los Alimentos". Decreto Supremo N° 977. Departamento de Asesoría Jurídica. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. [en línea] http://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/04/DECRETO_977_96_actualizado_a-octubre-2016.pdf.

Sachs, G., and Scott, D., (2012) *Helicobacter pylori*: Destruction or Preservation. *F1000 Medicine Reports* 2012, 4:7. <https://doi.org/10.3410/M4-7>

Salas-Jara, M. J., Sanhueza, E. A., Retamal-Díaz, A., González, C., Urrutia, H., & García, A. (2016). Probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C biofilm formation on AGS and Caco-2 cells and *Helicobacter pylori* inhibition. *Biofouling*, 32(10), 1245-1257. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1249367>

Schreiber, S., Bucker, R., Groll, C., Azevedo-Vethacke, M., Garten, D., Scheid, P., Friedrich, S., Gatermann, S. et al. (2005) Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen in vivo. *Infection and Immunity* 73, 1584–1589. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1584-1589.2005>

Shannon, E., & Abu-Ghannam, N. (2016). Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine Drugs*, 14(4), 81. <https://doi.org/10.3390/md14040081>

Shibata, H., Kimura-Takagi, I., Nagaoka, M., Hashimoto, S., Sawada, H., Ueyama, S., & Yokokura, T. (1999). Inhibitory effect of Cladosiphon fucoidan on the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric cells. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 45(3), 325-336. <https://doi.org/10.3177/jnsv.45.325>

Silva, M. S., Ramos, C. L., González-Avila, M., Gschaedler, A., Arrizon, J., Schwan, R. F., & Dias, D. R. (2017). Probiotic properties of *Weissella cibaria* and *Leuconostoc citreum* isolated from tejuino—A typical Mexican beverage. *LWT-Food Science and Technology*, 86, 227-232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.009>

Song, W., Wang, Y., Zhang, L., Fu, S., Zeng, Y., & Hu, H. (2014). Preparation and evaluation of polysaccharide sulfates for inhibiting *Helicobacter pylori* adhesion. *Carbohydrate Polymers*, 103, 398-404. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.063>

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., & Ouellette, M. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318-327. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)

Thorens, J., Froehlich, F., Schwizer, W., Saraga, E., Bille, J., Gyr, K., Duroux, P., Nicolet, M., Pignatelli, B., Blum, A., Gonvers, J., Fried, M. (1996). Bacterial overgrowth during treatment with omeprazole compared with cimetidine: a prospective randomised double blind study. *Gut*, 39(1), 54-59.

Vega-Sagardía, M., Rocha, J., Sáez, K., Smith, C. T., Gutierrez-Zamorano, C., & García-Cancino, A. (2018). Encapsulation, with and without oil, of biofilm forming *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strain in alginate-xanthan gum and its anti-*Helicobacter pylori* effect. *Journal of Functional Foods*, 46, 504-513. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.067>

Wang, Z. H., Gao, Q. Y., & Fang, J. Y. (2013). Meta-analysis of the efficacy and safety of Lactobacillus-containing and Bifidobacterium-containing probiotic compound preparation in *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 47(1), 25-32. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e318266f6cf>

Wang, F., Feng, J., Chen, P., Liu, X., Ma, M., Zhou, R., ... & Zhao, Q. (2017). Probiotics in *Helicobacter pylori* eradication therapy: systematic review and

network meta-analysis. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 41(4), 466-475. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2017.04.004>

Wroblewski, L. E., & Peek, R. M. (2013). *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis: mechanisms. *Gastroenterology Clinics*, 42(2), 285-298. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2013.01.006>



CAPÍTULO V: UNA CEPA DE *LACTOBACILLUS FERMENTUM* RGM 2341 Y SU USO PARA CONTRARRESTAR LA REACCIÓN INFLAMATORIA CAUSADA POR ENTEROBACTERIAS.

Solicitud de registro de patentes N° 2016-03406, octubre de 2017, supera etapa pericial.

Nombre Inventores:

A. García; C. González; C. Gutiérrez; E. Sanhueza; C. Parra

Dirección:

Barrio Universitario s/n, Empreudec, Concepción

Nombre Solicitante:

Universidad de Concepción

Dirección:

Barrio Universitario s/n, Empreudec, Concepción

Representante:

Xiména Sepúlveda Barrera

Dirección:

Barrio Universitario s/n, Empreudec, Concepción

Resumen:

Esta Tecnología corresponde a la cepa código de acceso RGM 2341, depositada en la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos. Se resguarda el uso de esta cepa porque sirve para contrarrestar la reacción inflamatoria aguda causada por enterobacterias, preferentemente *Helicobacter pylori*.

MEMORIA DESCRIPTIVA

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria Gram negativa, colonizadora del sistema digestivo humano, particularmente del estómago. Se estima que entre dos tercios a tres cuartos de la población mundial se encuentra infectada por esta bacteria, siendo particularmente susceptible a la infección las poblaciones más vulnerables de los países en vías de desarrollo económico.

La gran extensión y expansión geográfica de la infección por *H. pylori* se atribuye a sus peculiares rasgos biológicos. Debido a su forma en espiral y a la presencia de flagelos, ésta es capaz de penetrar la mucosa del epitelio gástrico, adhiriéndose a la superficie celular dada la expresión de moléculas de adhesión. Una vez adherida al epitelio, la bacteria produce ureasa, una enzima que cataliza la reacción de urea a amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco no sólo neutraliza la acidez natural del ambiente local gástrico, sino que incide sobre el epitelio, destruyendo la mucosa, promoviendo su muerte celular y detonando un proceso inflamatorio localizado. Una vez adherida al epitelio gástrico, la infección por *H. pylori* puede extenderse gradualmente hacia otros puntos del estómago.

Diversas patologías han sido asociadas a la infección por esta bacteria, entre ellas úlceras pépticas, gastritis y dispepsia e incluso se la ha propuesto como agente etiológico del linfoma gástrico de tejido linfoide asociado a mucosas y del desarrollo de cáncer gástrico.

También diversas han sido las estrategias biológicas, clínicas y médicas llevadas a cabo para la prevención y el tratamiento de la infección humana. Se ha utilizado una gran gama de antibióticos para su tratamiento; sin embargo se han identificado cepas de *H. pylori* resistentes a ellos. Desde el punto de vista farmacológico, la terapia considera el uso de metronidazol y amoxicilina o claritromicina junto a omeprazol; sin embargo, esta estrategia es financieramente costosa y temporalmente extensa, particularmente en los países en vías de desarrollo económico y social.

Desde el punto de vista preventivo y de salud pública, las principales estrategias recaen en los métodos de saneamiento público, como el alcantarillado, el

tratamiento de aguas, las campañas de alimentación saludable y la alimentación con productos lavados y/o hervidos. Si bien estas actividades han mejorado las condiciones sanitarias de la población en general, aún la infección por *H. pylori* persiste. Nuevas estrategias con diverso éxito, han concurrido entonces para combatir al patógeno, destacándose una terapia múltiple que incluye antibióticos, hongos y plantas; además del uso de propóleos y polisacáridos para evitar la colonización y la adherencia primaria al epitelio gástrico del huésped. También se han desarrollado vacunas, aunque ellas no han logrado aún una inmunización completa ni la erradicación total del agente bacteriano. Las últimas estrategias preventivas recaen en el uso de agentes y alimentos probióticos, los cuales también evitarían la adhesión primaria de *H. pylori* al epitelio gástrico, compitiendo espacialmente por un lugar donde la bacteria pueda asirse y asentarse para comenzar la infección.

Entre los agentes probióticos más importantes utilizados para formular alimentos con función preventiva de la infección por *H. pylori* se encuentra el género bacteriano *Lactobacillus*.

Lactobacillus es un género de bacterias Gram positivas anaerobias capaces de producir ácido láctico mediante el proceso de fermentación láctica. Estas bacterias son agentes que se encuentran naturalmente en diversos órganos y tejidos humanos, como el tracto gastrointestinal y el vaginal. El ácido láctico posibilita un ambiente local ácido, el cual inhibe el desarrollo de agentes potencialmente dañinos.

Diversas cepas de especies de *Lactobacillus* se han utilizado en formulaciones de alimentos y medicamentos probióticos dadas sus propiedades biológicas. Numerosos productos alimenticios como yogurt, helados, lácteos en general, jugos, postres e incluso productos cárnicos han aprovechado estas propiedades y cualidades para formular alimentos que adquieran mayor valor agregado al consumidor; valor que se traduce en efectos benéficos a la salud de los mismos.

Una especie ampliamente individualizada y utilizada como agente y alimento probiótico para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, incluyendo el

tratamiento ante la infección por *H. pylori* es *Lactobacillus fermentum*. Esta especie es capaz de producir peróxido de hidrógeno en el medio local gástrico, es capaz de adherirse a dicho epitelio, es capaz de ejercer actividad inmunomoduladora, de resistir concentraciones de ácidos biliares y de acidez típica del ambiente local gástrico; de colonizar eficientemente la superficie mucosa gástrica y de disminuir la actividad ureasa del patógeno. Todas estas cualidades se resumen en el concepto “actividad anti-*H. pylori*”.

A pesar de los avances realizados en la actualidad para distinguir funcionalmente esta especie y de cepas de ésta en particular; de la distinción de la actividad anti *H. pylori* y de sus beneficios en el tratamiento por la infección de éste y otros patógenos; estas consideraciones no han alcanzado un nivel de desarrollo adecuado o suficiente para la prevención satisfactoria de esta infección, siendo aún un agente particularmente importante en el desarrollo de enfermedades humanas evitables, cursando además con altos gastos médicos asociados, especialmente en la población con escaso acceso a condiciones sanitarias mínimas.

Considerando la extensión geográfica de *H. pylori*, y dada la prevalencia, por ejemplo de cáncer gástrico en Chile; el cual se configura como el segundo tipo de cáncer más común en el mundo y con una tasa cercana al veinte por cien mil habitantes en nuestro país y, afectando predominantemente a varones por sobre mujeres (2,6:1,0) (Guía Clínica MINSAL de Cáncer Gástrico, 2010. Ministerio de Salud, Chile), es que la búsqueda de nuevas y eficaces estrategias para la profilaxis frente a la infección por *H. pylori* resulta de importancia superlativa. En este sentido la exposición de bacterias con actividad anti-*H. pylori* y provisión de éstas dada su capacidad probiótica, cumple dicho objetivo; aún más dada la resistencia común a las terapias convencionales disponibles a la fecha.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente tecnología comprende una cepa de *Lactobacillus* sp, específicamente comprende la cepa *L. fermentum*, depositada en la Colección Chilena De

Recursos Genéticos Microbianos, bajo el número de acceso RGM 2341, depositada el 15 de noviembre de 2016. La cepa, aislada de antro pilórico y/o cuerpo gástrico humano de una biopsia de un paciente del Hospital Clínico Regional de Concepción, Guillermo Grant Benavente, es útil en la prevención y tratamiento de la infección por el patógeno gástrico *H. pylori*, dada sus propiedades biológicas, cuales en conjunto se presentan superiores a otras cepas del género *Lactobacillus* disponibles en el mercado y utilizadas comercialmente; ello observado y verificado en un modelo *in vitro* y confirmado en un modelo animal *in vivo*.

La cepa RGM 2341 exhibe un amplio y cuantitativamente superior perfil de actividad anti-*H. pylori*, siendo esta actividad mediada por el conjunto íntegro de sus propiedades biológicas evidenciadas en estos modelos.

La propiedad de la actividad anti-*H. pylori* se conjuga mediante las siguientes particularidades de la cepa:

RGM 2341 es capaz de formar biopelículas *in vitro* tanto en el modelo celular AGS, un modelo de adenocarcinoma gástrico estándar, como en el modelo celular CACO-2, un modelo de adenocarcinoma colorrectal epitelial humano. La formación de biopelículas en estos modelos respalda la capacidad que tiene RGM 2341 de proveer una barrera mecánica sustentable y adaptativa a la geografía del tracto digestivo humano, así como de su configuración particular desde el estómago hasta el colon en su zona más distal. Esta barrera mecánica dificulta la adhesión inicial de *H. pylori* a la mucosa epitelial gástrica, entorpeciendo la adhesión necesaria para desencadenar su mecanismo biológico patogénico. En ambos modelos celulares *in vitro*, RGM 2341 es capaz de adherirse a las células desde la adición del inóculo, y formar una biopelícula de estructura densa entre las cuatro y doce horas, hasta al menos las 24 horas.

La anterior capacidad de formación de biopelículas *in vitro* se observa de igual forma en un modelo animal *in vivo*. Este modelo, gerbo de Mongolia, un modelo roedor superior, presenta ventajas en su selección pues presenta un comportamiento similar epitelial gástrico en cuanto a las lesiones observadas en humanos tras la infección por *H. pylori*. En este modelo se verifica la distribución

espacial de RGM 2341 en las zonas del estómago, observando que la cepa a pesar de organizarse en macro colonias puntuales, se extiende eficiente y eficazmente sobre el antro, el cuerpo y el fondo del órgano, conformando un verdadero tapiz en la extensión completa del epitelio gástrico animal. Al desafiar la cepa en este modelo con la cepa patógena, se coteja la disminución cuantitativa de *H. pylori* debido a la imposibilidad mecánica de asirse al epitelio.

La inhibición de la adhesión del patógeno se verifica en el modelo *in vitro* mediante uso de *H. pylori* ATCC 43504, un modelo patogénico estándar de investigación en este aspecto. La inhibición observada mediante el uso de esta cepa patogénica provee un piso común de observación *in vitro*, siendo verificada esta inhibición por cuanto el uso de la cepa *H. pylori* SS1 en el modelo *in vivo*. Esta última cepa emula en el modelo *in vivo* las laceraciones patogénicas observadas en humanos. Además de minimizar la adherencia *in vitro* y de eliminar la presencia del patógeno *in vivo*, RGM 2341 es capaz de inhibir la actividad ureasa de *H. pylori* ATCC 43504 en hasta un 80,4% en el modelo celular AGS y de hasta un 83,1% en el modelo celular CACO-2. La provisión de este hallazgo respalda lo observado en el modelo animal, donde tras co-infección no se detecta actividad ureasa cuyo responsable fuera la presencia del patógeno, siendo atribuida esta actividad a la presencia de bacterias que conforman el microbioma normal del huésped en el tracto digestivo.

En aras de verificar la tolerancia a las condiciones normales del ambiente gástrico animal, proyectándoles al ambiente normal de la condición humana, RGM 2341 se expone a una serie de escenarios de evaluación. La cepa es tolerante a pH 3,0; exhibiendo concentraciones de hasta 10^6 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) *in vitro*. También es capaz de tolerar la presencia de sales de ácidos biliares en una concentración del 2-3%, presentando una concentración de entre 10^6 a 10^7 UFC/mL *in vitro*, hasta por 24 horas de exposición en ambos casos. Estas propiedades reflejan la capacidad de RGM 2341 de tolerar eficiente y eficazmente el ambiente normal estomacal, pudiendo desarrollar las demás propiedades que le configuran sin inconvenientes fisiológicos.

Estas propiedades se resumen en que RGM 2341 exhibe agregación en solución salina positiva e hidrofobicidad fuerte in vitro en comparación a otras cepas probióticas.

RGM 2341 exhibió un perfil de producción de peróxido de hidrógeno de hasta más tres (+3) según el criterio de Felten de 1999. Por otro lado, evidencia una capacidad productora de ácido láctico en el orden de 2,8 a 3,5 mg/mL. En otra arista de las capacidades de RGM 2341, la cepa revela una amplia capacidad en la producción de exopolisacárido, de 270 mg/L a pH 5 y de hasta 1094,8 mg/L a pH 7 y a 0,5 de densidad óptica; siendo este polisacárido uno compuesto por dos azúcares, ramnosa y manosa, dos azúcares ramificados que potencian las propiedades conjuntas anti *H. pylori* así como la formación de una biopelícula estable. Este perfil amplio de propiedades fisiológicas de la cepa comulga al unísono en una superior actividad anti microbiana sobre cepas patogénicas entéricas; siendo incluso superior a cepas comerciales. La propiedad de producir peróxido de hidrógeno en amplia cuantía explicita un mecanismo de defensa básico a la presencia de patógenos, utilizando radicales libres para impedir la colonización gástrica. En cuanto a su capacidad antioxidante, RGM 2341 evidencia que es eficientemente capaz de retrasar la oxidación de la biopelícula y de la mucosa del tracto digestivo; posibilitando una protección primaria enérgica a la presencia de patógenos. En último término la modulación de la producción de exopolisacáridos dado el pH y la concentración efectiva de RGM 2341, promueve la construcción de un ambiente celular que no sólo suscita la protección de la célula en particular, sino de la colonia y del tapiz o biopelícula generada por el conjunto bacteriano sobre la mucosa del tracto digestivo. La promoción de la producción de exopolisacárido se expone, luego, como parte de la protección mecánica hacia el mecanismo de patogenicidad de *H. pylori*, brindando además amparo al ambiente natural del tracto digestivo en el tiempo y espacio.

RGM 2341 ostenta un significativo poder de minimización de la inflamación aguda localizada en el tracto digestivo donde construye la biopelícula dada la presencia explícita de *H. pylori*. Ello configura un hallazgo importante por cuanto modula

positivamente la reducción del proceso inflamatorio agudo en conjunto al bloqueo mecánico de su adhesión al epitelio y a la remoción celular de esta mediante un mecanismo de radicales libres. Ello, en suma, conforma un mecanismo completo de prevención y tratamiento a la infección por el patógeno.

Por último, RGM 2341 presenta susceptibilidad a 18 antibióticos de extendido uso médico, pudiendo ser eliminada fácilmente de la mucosa del tracto gástrico; ello en línea a las normativas sanitarias de consumo humano y de definición técnica y de bioseguridad propuestas por la FAO y la Organización Mundial de la Salud para el uso de cepas probióticas y de los requisitos mínimos que los alimentos que les componen deben tener. Por otro lado no evidencia producción de histamina, la principal amina biogénica, presentándose biosegura a su consumo en el tiempo. Todas estas propiedades biológicas se conjugan en que RGM 2341 ostenta características que en el unísono son superiores a otras cepas probióticas de la especie *L. fermentum*, así como frente a *L. casei* Shirota, una cepa ampliamente utilizada en alimentos y productos probióticos. Por lo mismo, RGM 2341 se perfila como una alternativa de elección superior para ser utilizada en la prevención y tratamiento de la infección por *H. pylori*.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Lactobacillus fermentum* CARACTERIZADA porque corresponde a la cepa código de acceso RGM 2341 depositada en la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos.
2. La cepa, según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque presenta capacidad anti enterobacterias.
3. La cepa, según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque presenta capacidad anti *Helicobacter pylori*.
4. Uso de la cepa, según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque se utiliza para contrarrestar la reacción inflamatoria aguda causada por enterobacterias, preferentemente *Helicobacter pylori*.

5. Uso de la cepa, según la reivindicación 3, CARACTERIZADO porque se utiliza para inhibir la adhesión, crecimiento y desarrollo patogénico de *Helicobacter pylori*.

6. Uso de la cepa, según la reivindicación 3, CARACTERIZADO porque su utilización es biosegura sanitaria y alimenticiamente.



CAPÍTULO VI: UNA FORMULACIÓN DE ENCAPSULACIÓN PARA LACTOBACILLOS QUE PERMITE PROLONGAR SU VIABILIDAD

Solicitud de registro de patentes 2017-03045, octubre de 2017 pasa la etapa pericial.

Nombre Inventores:

Apolinaria García; Marco Vega; Cristian Gutiérrez;
Enrique Sanhueza y Carlos González

Dirección:

Barrio Universitario s/n, Empreudec, Concepción

Nombre Solicitante:

Universidad de Concepción

Dirección:

Barrio Universitario s/n, Empreudec, Concepción

Representante:

Ximena Sepúlveda Barrera

Dirección:

Barrio Universitario s/n, Empreudec, Concepción

Resumen:

Se presenta una formulación de encapsulación para lactobacilos que comprende biomasa de la cepa *L. fermentum* RGM 2341, a una concentración entre $1,0 \times 10^8$ – $1,0 \times 10^{10}$ UFC/mL; y 1-3% p/v de la matriz de alginato-carragenina lambda, compuesta por proporciones variables de alginato (30-50%) y carragenina lambda (50-70%). Además se presenta el proceso de elaboración de las cápsulas y su uso para la potenciación de la actividad anti-*H. pylori* y la prolongación de la viabilidad del lactobacilo.

MEMORIA DESCRIPTIVA

Los probióticos han demostrado su efecto beneficioso en el ser humano, principalmente frente a enfermedades gastrointestinales causadas por bacterias patógenas, ya que ayudan al balance de la microbiota normal, promoviendo la integridad y movilidad intestinal, e inhibiendo bacterias patógenas (Luc *et al.*, 2007; Kaushik *et al.*, 2009). Este último tiempo, se ha demostrado que diversas especies de *Lactobacillus* son capaces de inhibir el crecimiento de *H. pylori* y mejorar las tasas de erradicación de esta bacteria cuando se administran antes o después de la terapia estándar (Du *et al.*, 2012; Efrati *et al.*, 2012; Sunanliganon *et al.*, 2012).

H. pylori es una bacteria Gram negativa de forma espiralada que se encuentra en el estómago humano. Aunque la colonización gástrica por *H. pylori* induce gastritis histológica en todos los individuos infectados, solo una minoría desarrolla signos clínicos evidentes (Van Amsterdam *et al.*, 2006). Entre las patologías asociadas se encuentran la gastritis crónica, linfoma de MALT, úlcera duodenal y úlcera gástrica, e incluso es el principal factor de riesgo de desarrollar cáncer gástrico (Uemura *et al.*, 2001).

H. pylori necesita al menos cuatro características básicas para ser capaz de colonizar y establecer una infección en la mucosa gástrica: la enzima ureasa, flagelos, presentar una forma de espiral y adhesinas. Es capaz de sobrevivir en pH gástrico gracias a la síntesis de ureasa, enzima que utiliza para generar un microentorno de pH neutro, ya que convierte la urea a iones de amoníaco, neutralizando el ácido jugo gástrico (Andersen, 2007). La infección por *H. pylori* afecta aproximadamente al 50% de la población mundial, llegando a valores de hasta un 90% en países en vías de desarrollo (Van Amsterdam *et al.*, 2006). La prevalencia de *H. pylori* en Chile varía entre un 60% y 79% dependiendo de la condición socioeconómica, de la educación y a las condiciones sanitarias de la población estudiada (Vallejos *et al.*, 2007). La última guía de manejo de la infección por *H. pylori* (Malfertheiner *et al.* 2017) recomienda en primera instancia la terapia de erradicación de primera línea: inhibidor de bomba de protones (PPI),

claritromicina, y amoxicilina o metronidazol (terapia triple). Sin embargo, existe la problemática del aumento de la resistencia de *H. pylori*, principalmente a claritromicina (Aguilera-Correa *et al.*, 2017) y la alta prevalencia de efectos adversos que producen los antibióticos, ambas son las principales causas de las fallas en el tratamiento contra *H. pylori* (Malfertheiner *et al.*, 2017; Wirtz *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista preventivo y de salud pública, las principales estrategias recaen en los métodos de saneamiento público, como el alcantarillado, el tratamiento de aguas, las campañas de alimentación saludable y la alimentación con productos lavados y/o hervidos. Si bien estas actividades han mejorado las condiciones sanitarias de la población en general, aún la infección por *H. pylori* persiste. Nuevas estrategias han concurrido entonces para combatir al patógeno, destacándose una terapia múltiple que incluye antibióticos, hongos y plantas; además del uso de propóleos y polisacáridos para evitar la colonización y la adherencia primaria al epitelio gástrico del huésped. También se han desarrollado vacunas, aunque ellas no han logrado aún una inmunización completa ni la erradicación total del agente bacteriano. Las últimas estrategias preventivas recaen en el uso de alimentos probióticos, la cual es una solución alternativa de bajo costo para prevenir o disminuir la colonización por *H. pylori* (Ayala *et al.*, 2014).

Por otro lado, es conocido algunos beneficios de la encapsulación de bacterias en la industria de los alimentos, las cuales son a) la protección de las células bacterianas frente a procesos de liofilización; b) la distribución homogénea de las bacterias probióticas dentro del producto final; c) la liberación controlada del contenido capsular en el sitio blanco y d) la mantención de la viabilidad de bacterias probióticas en el tiempo (Kalasaphaty & Masondole, 2005; Mortazavian *et al.*, 2008). La encapsulación es uno de los métodos más eficientes para mantener la viabilidad de cepas probióticas en el tiempo, y corresponde a una tecnología de envasado en pequeñas cápsulas selladas con un diámetro que varía entre 1-3 mm, capaces de liberar su contenido en el lugar indicado a velocidades controladas, bajo la influencia de condiciones específicas (Anal and Stevens,

2005; Kalasaphaty & Masondole, 2005). Además, la encapsulación permite mejorar la estabilidad y viabilidad de las cepas probióticas durante el proceso de producción de biomasa bacteriana a gran escala, asociado principalmente a procesos de elaboración de productos lácteos comerciales.

El Alginato es un polisacárido natural ampliamente utilizado en encapsulación, debido a su biocompatibilidad y bajo costo, contiene cantidades variables de ácido (1,4) β -D- manurónico y de ácido α -L-gulurónico. Es capaz de gelificar al interactuar su carga negativa de COO- derivada de los ácidos que la componen, con las cargas positivas de Ca⁺⁺ (Martin *et al.*, 2009). En cuanto a la carragenina, Doleyres *et al.* (2002 y 2004) han registrado un aumento en la tolerancia frente al estrés por cambios en la temperatura y a condiciones gastrointestinales simuladas de bifidobacterias probióticas inmovilizadas en un gel de carragenina y goma arábiga. Además, estudios realizados por Song *et al.* (2014) evidenciaron que al sulfatar sintéticamente polisacáridos naturales tales como pectina, y quitosano, se produce una disminución estadísticamente significativa en la adherencia de *H. pylori* a células AGS y eritrocitos, lo que muestra que existe una relación positiva entre la disminución de la adherencia de *H. pylori* a células AGS y el grado de sulfatación de los polisacáridos. Por ello, otro polisacárido a usar es carragenina lambda, formada por unidades alternadas de D-galactosa y 3,6-anhidro-galactosa unidos por enlaces glicosídicos α -1,3 y β -1,4. La carragenina lambda posee entre un 32% y un 40% de grupos sulfatos de forma natural, lo que ayudaría a inhibir a *H. pylori* (Nanaki *et al.*, 2010). La cantidad de sulfatos está relacionada inversamente al grado de polimerización de la carragenina y que menor porcentaje de sulfatación, muestra un menor grado de gelificación y viceversa (Pavli *et al.*, 2011), por ello la matriz se complementa con alginato, que es el agente que forma la cápsula al unirse con Ca⁺⁺.

Referencias

Anal A., y Stevens W. 2005 Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics* 290: 45-54.

Andersen, L. 2007. Colonization and infection by *Helicobacter pylori* in humans *Helicobacter*. Suppl 2:12-15.

Ayala, G., Escobedo-Hinojosa, W., de la Cruz-Herrera, C, y Romero, I. 2014. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*. 20(6):1450.

Doleyres, Y., Paquin, C., LeRoy, M., y Lacroix, C. 2002. *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free- and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 168-173.

Doleyres, Y., Fliss, I., y Lacroix C. 2004. Increased stress tolerance of *Bifidobacterium longum* and *Lactococcus*. *Journal of Applied Microbiology*. 97, 527–539

Du, Y., Su, J., Fan, Y., Lu, P., Zheng, X., Li, C., Guo, P., Xu, Y., Gong, F., y Li, Z. 2012. Adjuvant probiotics improve the eradication effect of triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*. 18(43):6302.

Efrati, C., Nicolini, G., Cannaviello, C., O'Sed, N., P., y Valabrega, S. 2012. *Helicobacter pylori* eradication: sequential therapy and *Lactobacillus reuteri* supplementation. *World Journal of Gastroenterology*. 18(43):6250.

Kalasaphaty K., y Masondole, L. 2005. Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* 60:252-258.

Kaushik, J., Kumar, A., Duary, R., Mohanty, A., Grover, S., y Batish, V., K. 2009. Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PloS one*. 4(12):e8099.

Luc, D. V., y Frederic, L. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 13:194-199.

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Gisbert, J., Kuipers, E., Axon, A., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, D., Hunt, R., Moayyedi, P., Rokkas, T., Rugge, M., Selgrad, M., Suerbaum, S., Sugano, K., y El-Oma, E. 2017. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* 2017;66:6–30.

- Martín, M., Morales, M., Gallardo, V., y Ruiz, M. 2009. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharmaceutica*, Vol.50 no1; 43-50.
- Mortazavian, A., Azizi, A., Ehsani, M.R., Razavi, S., Mousavi, S., Sohrabvandi, S., y Reinheimer, J. 2008. Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Milchwissenschaft* 63 (4), 427–429.
- Nanaki, S., Karavas, E., Kalantzi, L., y Bikiaris, D. 2010. Miscibility study of carrageenan blends and evaluation of their effectiveness as sustained release carriers. *Carbohydrate Polymers* Volume 79, 1157-1167.
- Pavli, M., Baumgartner, S., Kos, P., y Kogej, K. 2011. Doxazosin-carrageenan interactions: A novel approach for studying drug-polymer interactions and relation to controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 421(1), 110–119.
- Song, W., Wang, Y., Zhang L., Fu, S., Zeng, Y., y Hu, H. 2014. Preparation and evaluation of polysaccharide sulfates for inhibiting *Helicobacter pylori* adhesion. *Carbohydrate Polymers* 103: 398– 404.
- Sunanliganon, C., Thong-Ngam, D., Tumwasorn, S., y Klaikeaw, N. 2012. *Lactobacillus plantarum* B7 inhibits *Helicobacter pylori* growth and attenuates gastric inflammation. *World Journal of Gastroenterology*. 18(20):2472-2480.
- Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Taniyama, K., Sasaki, N., y Schlemper, R. 2001. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *The New England Journal of Medicine*. 345(11):784-789.
- Vallejos, C., Garrido, L., Cáceres, D., Madrid, A., C. Defilippi y Toledo, H. 2007. Prevalencia de la resistencia a metrodinazol, claritromicina y tetraciclina en *Helicobacter pylori* aislado de pacientes de la Región Metropolitana. *Revista Médica de Chile*. 135(3):287-293.
- Van Amsterdam, K., Van Vliet, A., H., Kusters, J., G., y Van der Ende, A. 2006. Of microbe and man: determinants of *Helicobacter pylori*-related diseases. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(1):131- 156.

Wirtz, V., Dreser, A., y Gonzales, R. 2010. Trends in antibiotic utilization in eight Latin American countries, 1997-2007. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 27(3):219-225.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente tecnología corresponde a una formulación que comprende polisacáridos de alginato, carragenina y una cepa probiótica. Específicamente la formulación comprende los polisacáridos de alginato y carragenina lamda, para encapsular la cepa probiótica *L. fermentum* RGM 2341, a fin de potenciar la actividad anti-*H. pylori* y, además, prolongar la vida útil de estos probióticos para su posterior incorporación en formulaciones alimenticias.

La formulación comprende:

a) Biomasa de la cepa de *L. fermentum* RGM 2341, a una concentración entre $1,0 \times 10^8$ – $1,0 \times 10^{10}$ UFC/mL; y

b) 1-3% p/v de la matriz de alginato-carragenina lambda, compuesta por proporciones variables de alginato (30-50%) y carragenina lambda (50- 70%).

La cepa de *L. fermentum* de fuente humana gástrica, tiene como nombre de referencia UCO-979C, y se encuentra depositada desde el 15 de noviembre de 2016 en la Colección Chilena De Recursos Genéticos Microbianos, bajo el número de registro RGM 2341.

El alginato posee la cualidad de formar la cápsula en contacto con una solución de cloruro de calcio, y por otro lado, tanto *L. fermentum* como carragenina poseen la capacidad de inhibir al patógeno *H. pylori* observadas in vitro e in vivo (modelo animal). Hay que mencionar que poseen distintos mecanismos para inhibir a la bacteria patógena de interés.

El proceso de encapsulación de la cepa comprende las siguientes etapas:A) Cultivar en un matraz con 200 mL de caldo MRS con 100 µL de la cepa una probiótica anti-*H. pylori*, incubando por 18 h a 37°C, específicamente el probiótico es *L. fermentum* UCO-979C. B) El cultivo bacteriano obtenido en A) se centrifuga a 1500-3000 G por 10 minutos a 4°C en tubos de reacción, y se realizan dos

lavados con suero fisiológico, el pellet obtenido fue lavado 2 veces con agua destilada estéril, para llevarse a una concentración final de $1,0 \times 10^8$ - 10^{10} UFC/mL en solución salina. C) En paralelo se prepara una mezcla de alginato-carragenina lambda, compuesta por proporciones variables de alginato (30-50%) y carragenina lambda (50-70%), disolviendo ambos polisacáridos en 2% p/v de agua destilada estéril, y utilizando un agitador magnetico a 150 rpm a 40°C por 40 minutos en un volumen final de 100 ml. D) Mezclar todo el pellet bacteriano obtenido en B) que contiene $1,0 \times 10^8$ - 10^{10} UFC/mL de *L. fermentum* UCO-979C, con 1-3% p/v de la matriz elaborada en C). La mezcla se realiza introduciendo el pellet bacteriano al matraz que contiene la matriz polisacárida a temperatura ambiente (25°C), Homogeneizándose en un agitador magnético a 150 rpm por 10 minutos aproximadamente. E) Traspasar la mezcla obtenida en D) a un encapsulador basado en el método gelificación iónica, donde la mezcla forma pequeñas gotas producto de la aspersion, las que caen en un recipiente que contiene CaCl₂, produciéndose el reticulado por la interacción de el alginato con el calcio, F) Las cápsulas formadas, se retiran con un tamiz metálico estéril y se lavan con agua destilada estéril para quitar el exceso de sal de calcio, y G) Finalmente, las cápsulas se depositan en placas Petri que contienen suero fisiológico, y son cerradas con parafilm. Se mantienen a 4°C hasta su utilización (mantienen su viabilidad al menos 2 meses).

El equipo encapsulador posee la capacidad de producir una aspersion de la mezcla (alginato+carragenina Lambda+próbioticos) en pequeñas gotas, la cual cae en un recipiente que contiene CaCl₂, produciéndose la gelificación iónica por la interacción de el alginato con el calcio, y a su vez el reticulado formado contiene carragenina lambda y próbioticos en su interior.

Los parámetros para lograr cápsulas de alginato/carragenina lambda son:

Boquilla de 500-800 micrómetros

Frecuencia de 90-120 Hz

Amplitud 3-5, Velocidad de 150-250

Presión de 150-250 mbar Las cápsulas obtenidas (figura 1) con este proceso presentan las siguientes características macroscópicas:

Tamaño: 2-4 milímetros

Relativamente esféricas, con ciertas irregularidades.

Blancas.

Son blandas al tacto, pero resisten la temperatura corporal al ser manipuladas.

El uso del encapsulado permite una mayor inhibición de *H. pylori*, en comparación a usar solamente la bacteria u otras matrices sin grupos sulfatos. Además la cápsula intrínsecamente posee la capacidad de aumentar la viabilidad a lo largo del tiempo (al menos 2 meses) y proteger a la cepa de agentes externos.

Las capsulas de alginato/carragenina lambda que contienen *L. fermentum* RGM 2341, presentan las siguientes ventajas en comparación al estado de la técnica:

1. *L. fermentum* RGM 2341 es capaz de sobrevivir a pH gástrico y ser liberado a dichas condiciones desde las cápsulas de alginato/carragenina lambda. La cepa al no ser encapsulada y además incorporada en un alimento puede sufrir pérdida de la viabilidad al carecer de la protección de una cápsula.
2. Las cápsulas son capaces de mantener la viabilidad de *L. fermentum* RGM 2341 a lo largo del tiempo, manteniendo una concentración mayor al exigido según el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile, que indica una concentración mínima de 10^6 UFC/g producto final.
3. Hay Producción de ácido láctico (0,191 mg/mL) y H_2O_2 (+) según el criterio de Felten (1999), de las bacterias probióticas recuperadas desde las cápsulas.
4. Permite la encapsulación de biomasa desde un bioreactor, demostrando que el proceso de encapsulación puede ser escalable para futuras incorporaciones en alimentos funcionales.
5. Experimentalmente está demostrado que la composición de la cápsula es capaz de actuar y afectar negativamente a *H. pylori* en modelo celular AGS. Además de no afectar la viabilidad de la cepa RGM 2341, tampoco a las células de origen gástrico AGS.

6. En modelo in vivo, la cepa RGM 2341 es capaz de liberarse a nivel gástrico desde las cápsulas, actuando de manera profiláctica y terapéutica.

Todas estas características biológicas se conjugan en que la cepa RGM 2341 ostenta una actividad anti *H. pylori*, y que la matriz de alginato y carragenina le adiciona capacidad inhibitoria frente a este patógeno, además de la protección de la viabilidad que le otorga una cápsula de polisacáridos. Por ello, esta formulación innovadora se perfila para ser utilizada en un producto o alimento probiótico funcional.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de encapsulación para lactobacilos CARACTERIZADA porque comprende: Biomasa de la cepa de *L. fermentum* RGM 2341, a una concentración entre $1,0 \times 10^8 - 1,0 \times 10^{10}$ UFC/mL; y 1-3% p/v de la matriz de alginato-carragenina lambda, compuesta por proporciones variables de alginato (30-50%) y carragenina lambda (50- 70%).
2. Una formulación de encapsulación para lactobacilos, según reivindicación 1, CARACTERIZADA porque las cápsulas presentan las siguientes características macroscópicas: tamaño entre 2-4 milímetros; esferas blancas con ciertas irregularidades; y blandas al tacto, pero resistentes a la temperatura corporal al ser manipuladas.
3. Un proceso para la encapsulación de la cepa, según reivindicación 1, CARACTERIZADA porque comprende las siguientes etapas: (A) Cultivar en un matraz con 200 ml de caldo MRS con 100 μ L de la cepa una probiótica anti-*H. pylori*, incubando por 18 h a 37°C, específicamente el probiótico es *L. fermentum* RGM 2341; (B) El cultivo bacteriano obtenido en A) se centrifuga a 1500-3000 G por 10 minutos a 4°C en tubos de reacción, y se realizan dos lavados con suero fisiológico, el pellet obtenido fue lavado 2 veces con agua destilada estéril, para llevarse a una concentración final de $1,0 \times 10^8-10^{10}$ UFC/mL en solución salina; (C) En paralelo se prepara una mezcla de alginato-carragenina lambda, compuesta por proporciones variables de alginato (30-50%) y carragenina lambda (50-70%),

disolviendo ambos polisacáridos en 2% p/v de agua destilada estéril, y utilizando un agitador magnético a 150 rpm a 40°C por 40 minutos en un volumen final de 100 ml; Mezclar todo el pellet bacteriano obtenido en B) que contiene $1,0 \times 10^8$ - 10^{10} UFC/mL de *L. fermentum* RGM 2341, con 1-3% p/v de la matriz elaborada en C). (D) La mezcla se realiza introduciendo el pellet bacteriano al matraz que contiene la matriz polisacárida a temperatura ambiente (25°C), homogeneizándose en un agitador magnético a 150 rpm por 10 minutos aproximadamente;

(E) Traspasar la mezcla obtenida en D) a un encapsulador basado en el método de gelificación iónica, donde de la mezcla forma pequeñas gotas producto de la aspersión, las que caen en un recipiente que contiene CaCl₂, produciéndose el reticulado por la interacción del alginato con el calcio; Las cápsulas formadas, se retiran con un colador metálico estéril y se lavan con agua destilada estéril para quitar el exceso de sal de calcio; y Finalmente, las cápsulas se depositan en placas Petri que contienen suero fisiológico, y son cerradas con parafilm. Se mantienen a 4°C hasta su utilización (mantienen su viabilidad al menos 2 meses).

4. Un proceso para la encapsulación de la cepa, según reivindicación 3, CARACTERIZADA porque los parámetros para lograr las cápsulas en el encapsulador (etapa E) son: boquilla de 500-800 micrómetros; frecuencia de 90-120 Hz; amplitud 3-5, Velocidad de 150-250; y presión de 150-250 mbar.

5. Uso de la formulación de encapsulación para lactobacilos, según reivindicación 1, CARACTERIZADA porque su utilización permite la potenciación de la actividad anti- *H. pylori*, ya que tanto *L. fermentum* RGM 2341 como carragenina poseen la capacidad de inhibir al patógeno *H. pylori* observadas *in vitro* e *in vivo* (modelo animal).

6. Uso de la formulación de encapsulación para lactobacilos, según reivindicación 1, CARACTERIZADA porque su utilización permite prolongar la viabilidad del lactobacilo a lo largo del tiempo (al menos 2 meses) y proteger a la cepa de agentes externos, para su posterior incorporación en formulaciones alimenticias.

CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN

Entre las bacterias patógenas que pueden colonizar y afectar el estómago humano, *H. pylori* es el patógeno de mayor interés, ya que coloniza selectivamente el epitelio gástrico llegando a causar inflamación gástrica crónica y daño tisular, que pueden progresar a patologías como la úlcera péptica o el adenocarcinoma gástrico (Felten *et al.*, 1999). Dado que el riesgo de cáncer asociado con este patógeno es alto, la OMS incluyó a *H. pylori* entre los factores de riesgo de cáncer gástrico tipo 1 (IARC, 1994).

La recomendación más reciente del Consenso de Maastricht indica que todas las personas infectadas con *H. pylori* deben ser tratadas (Malfertheiner *et al.*, 2017). Sin embargo, los tratamientos con antibióticos no siempre son eficaces o la reinfección puede seguir a un tratamiento exitoso. Además, la OMS incluyó *H. pylori* en la lista de patógenos "Prioridad 2: alta" debido a su resistencia a los antibióticos e indicó la necesidad de desarrollar nuevos antibióticos para tratar este patógeno (Tacconelli *et al.*, 2017). Se hace necesario desarrollar estrategias alternativas para combatirlo como son los probióticos que comparten el nicho de *H. pylori*.

Se han llevado a cabo varios estudios sobre los efectos de las bacterias probióticas sobre *H. pylori*. Estudios *in vitro* demostraron la inhibición de *H. pylori* por bacterias probióticas, posteriormente estudios preclínicos y clínicos indicaron que la eficacia de los probióticos contra *H. pylori* es parcial cuando se administran

solos, pero aumentaron la eficacia y/o la reducción de los efectos secundarios de una terapia antibiótica al administrarlos en conjunto con el tratamiento de erradicación (García *et al.*, 2017).

Una cepa, potencialmente probiótica, debe cumplir con una serie de características agrupadas en tres categorías principales: propiedades funcionales, seguridad y propiedades tecnológicas (Lee *et al.*, 2009; Mizock, 2015; Patel *et al.*, 2014). Estudios previos caracterizaron y determinaron que la cepa *L. fermentum* UCO-979C posee propiedades probióticas, segura y con una potente actividad anti-*H. pylori* (García *et al.*, 2017). Estos resultados indicaron que *L. fermentum* UCO-979C podría usarse como un microorganismo probiótico seguro.

La tolerancia a sales biliares y al bajo pH son propiedades necesarias en las cepas probióticas debido a las condiciones de estrés que se encuentran en el tracto gastrointestinal de los humanos. En este sentido, los microorganismos probióticos que se cree que colonizan la región del estómago deben ser tolerantes al menos a pH 3 (Vitor & Vale, 2014; Sanhueza *et al.*, 2015). Otras especies pertenecientes al género *Lactobacillus*. han sido aislados desde estómago humano (*Lactobacillus gastricus*, *Lactobacillus antri* , *Lactobacillus kalixensis* y *Lactobacillus ultunensis*) que muestran también resistencia a pH bajo permitiéndoles habitar el estómago (Schreiber *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2005). En los resultados de este trabajo, la cepa *L. fermentum* UCO-979C sobrevivió a pH 3 y a las sales biliares.

Sumado a lo anterior, la cepa *L. fermentum* UCO-979C presenta una potente actividad anti-*H. pylori* capaz de inhibir el crecimiento de este patógeno. García *et al.* (2017) describe la reducción de la actividad de la ureasa de *H. pylori*, y disminución de la adhesión del patógeno a las células gástricas, y regulando de manera beneficiosa la respuesta inflamatoria. Se han descrito cepas probióticas con actividad anti-*H. pylori* a través de la producción de compuestos antimicrobianos como bacteriocinas, autolisinas y ácidos orgánicos (Butel, 2014). En este sentido, la producción de ácido láctico por la cepa *L. fermentum* UCO-979C podría ser uno de los factores importantes en la inhibición de *H. pylori*, acidificando el medio o inhibiendo la enzima ureasa de *H. pylori* en el estómago, al momento de ser consumido por la población.



La mejor forma de incorporar probióticos al consumo humano es por medio de la dieta, ingesta de alimentos ricos en bacterias probióticas o fermentados. Lamentablemente no todos los alimentos generan el ambiente favorable para mantener las cepas probióticas en condiciones adecuadas para mantener la viabilidad y características en el tiempo. Es por ello que aparece la necesidad de proteger la cepa probiótica de estresores externos como el pH, cloruro de sodio o etapas del proceso productivo, hasta que pueda alcanzar el sitio de acción en el tracto gastrointestinal. En este sentido, el propósito de encapsular bacterias es asegurar su viabilidad cuando se exponen a condiciones ambientales adversas (Cheow y Hadinoto, 2013).

En este trabajo se escogió la encapsulación con carrageninas ya que estos polisacáridos logran una gelificación suficientemente fuerte que soporte la manipulación y temperatura ambiental, siendo deseable el porcentaje más alto posible de carragenina lambda debido a que contiene más grupos sulfato, los cuales serían responsables de cierta actividad inhibitoria de *H. pylori* (Song *et al.*, 2014). Sin embargo es necesario que las cápsulas se disuelvan bajo condiciones fisiológicas para liberar su contenido en el sitio de acción seleccionado, permitiendo estimar el tiempo de liberación del probiótico en condiciones gástricas.

Los resultados indican que la cápsula con la proporción de carrageninas seleccionada protegió el probiótico de un pH bajo (pH 3) y de altas concentraciones de sales biliares (3%) hasta por 2 meses. Los grupos sulfato de carragenano podrían retener los protones presentes en el ambiente ácido e impiden su contacto con la cepa bacteriana (Servaty *et al.*, 2001). La carragenina hidratada impide también los cambios osmóticos, como los causados por las sales biliares (De Kruif & Tuinier, 2001). Estas propiedades de la carragenina pueden explicar la contribución de la encapsulación para mantener la viabilidad de la cepa de *L. fermentum* UCO-979C.

Mediante estudio de imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de la cepa *L. fermentum* UCO-979C encapsulada en carrageninas y sometido, durante 60 días a 4 °C a una solución salina pH 6.4 o solución salina con 3% de sales biliares a pH 6.4, no se observó interacción entre la cepa probiótica y la carragenina, ya que la membrana bacteriana no se advertía

dañada. Luego de 60 días, las cápsulas en solución salina a pH 6.4 o pH 3.0, no mostraron diferencias en la superficie cuando se compararon con las observaciones realizadas en el día 0. Sin embargo, cuando se mantuvieron por 60 días en presencia de sales biliares 3%, concentración casi diez veces la fisiológica (Wu *et al.*, 2016), se observó una alteración de la membrana celular, correlacionado con el bajo recuento que presentó la cepa en los mismos tiempos.

Presencia de amilasa o de urea no afectaron el crecimiento de la cepa *L. fermentum* UCO-979 no encapsulada o encapsulada. Sin embargo, la bacteria encapsulada como la no encapsulada se vieron afectadas por la acción proteolítica de la pepsina, se puede sugerir que la actividad de esta enzima afecta la cepa probiótica cuando se encuentra en una condición planctónica. El efecto de la pepsina puede ser la consecuencia de su actividad proteolítica contra los enlaces peptídicos hidrófobos de las proteínas hidrófobas (Leszczyńska *et al.*, 2009) y su activación de una sustancia bacteriolítica secretada en el antro del estómago (Viallard & Raynaud, 1968).

En experimentos similares, Heidebach *et al.* (2009) mostraron una reducción de 5 logs de los recuentos de *Lactobacillus paracasei* no encapsulados durante una exposición de 90 minutos al jugo gástrico simulado a un pH de 2.5. Nag *et al.* (2011) informaron una reducción logarítmica de 6.1 de *Lactobacillus casei* planctónico y solo una reducción logarítmica de 3.1 de la misma cepa cuando se encapsula en caseinato de sodio y goma gellan en un lapso de tiempo de 120 minutos. Comparando estos resultados, la encapsulación también protegió la cepa

probiótica *L. fermentum* UCO-979C bajo condiciones gástricas ensayadas *in vitro*. Una vez se comprobado que la cepa mantiene su viabilidad, fue necesario corroborar que mantenía sus propiedades probióticas y actividad anti-*H. pylori*.

En este estudio la cepa fue ensayada en la producción de ácido L-láctico y la formación de biopelículas, estas dos características fueron evaluadas para confirmar que fueran mantenidas por el probiótico liberado de las cápsulas de carrageninas. Además, el ácido láctico puede inhibir la ureasa de *H. pylori* con un efecto antimicrobiano debido a una disminución del pH (García *et al.*, 2017). Dado que el ácido láctico producido por *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* o *Lactobacillus casei* Shirota mostró que *in vitro* o *in vivo* inhibe *H. pylori* (Ryan *et al.*, 2009), la capacidad de *L. fermentum* UCO-979C para mantener la producción de ácido láctico después de ser liberado de las cápsulas es una característica probiótica fundamental.

Otra propiedad deseable que mantuviera la cepa probiótica luego de la encapsulación, fue la formación de biopelícula. En este sentido, *L. fermentum* UCO-979C no encapsulado o liberado de las cápsulas formaron biopelícula *in vitro* sobre vidrio y poliestireno. Esto concuerda con lo reportado por Salas-Jara *et al.* (2016) quienes observaron la producción de biopelícula utilizando cepas de *L. casei* Shirota y *L. fermentum* UCO-979C en vidrio, poliestireno y células AGS y Caco-2, los autores también informaron que un inóculo menos concentrado produjo más biopelícula y lo atribuyeron a la maduración de la biopelícula formada causando la dispersión de células que se eliminaron durante la etapa de lavado. *L. fermentum* UCO-979C es una excelente cepa formadora de biopelículas (Salas-

Jara *et al.*, 2016) y mantiene esta característica después de liberarse de las cápsulas, facilitando la colonización en el epitelio gástrico (Terraf *et al.*, 2012) y con ello evitando la colonización por *H. pylori*.

La capacidad de la cepa probiótica *L. fermentum* UCO-979C liberada de las cápsulas para inhibir el crecimiento de la cepa patógena *H. pylori* SS1 evaluada mediante el método de difusión radial y comparada con la del probiótico no encapsulado. Los resultados mostraron que la inhibición del crecimiento de *H. pylori* SS1 por el probiótico no disminuyó después de la encapsulación y liberación de las cápsulas. Teniendo en consideración que se mantiene la actividad de la cepa probiótica, se espera que se sume el efecto anti-*H. pylori* de la carragenina ya que Estudios previos como el de Hirno *et al.* (1995) han estudiado el efecto anti-*H. pylori* de diversos hidratos de carbono polisulfatados. Los autores indican que la carragenina kappa redujo hasta un 95% la carga de *H. pylori* mientras que la carragenina lambda la redujo aproximadamente en un 98-100%. Nuestros resultados mostraron que una mezcla de carrageninas kappa y lambda (2%) disminuyó casi el 80%, la viabilidad de la cepa *H. pylori* SS1. Aunque la inhibición de *H. pylori* reportada por Hirno *et al.* (1995) fue más alto que el obtenido en nuestras condiciones, el grado de inhibición de la cepa patógena *H. pylori* SS1 fue considerable. Las micrografías obtenidas por SEM mostraron un enlace entre la mezcla de carrageninas y *H. pylori*, lo que indica la posibilidad de una interacción entre el polisacárido sulfatado y la membrana externa del patógeno. En efecto, Shibata *et al.* (1999) informaron que las proteínas de la membrana externa de *H. pylori* eran el punto de afinidad de los grupos sulfatados de polisacáridos, resultado concordante con nuestras observaciones.

La carragenina y otros polisacáridos (como alginatos, pectina o fucoidanos) poseen grupos ácidos (sialilados o sulfatados) que se unen a los glucolípidos presentes en las membranas celulares; compitiendo así con *H. pylori* para unirse a la mucina del epitelio gástrico, evitando la unión del patógeno (Song *et al.*, 2014). Chua *et al.* (2015) informaron que el fucoidano se une con mayor afinidad a *H. pylori* que a células AGS; por lo tanto, los sitios de unión del patógeno no estarían disponibles para unirse a las células epiteliales. En este sentido, las células de AGS tratadas previamente con cápsulas de carragenina sin probióticos mostraron una disminución de la adherencia de *H. pylori* SS1 en comparación con las células de AGS no tratadas.

Las células AGS tratadas previamente durante 1 h con el probiótico no encapsulado o encapsulado disminuyeron la adherencia del patógeno incluso más que las cápsulas sin probióticos. Por lo tanto, el probiótico, ya sea encapsulado o no encapsulado, inhibió la adhesión del patógeno significativamente más que la mezcla de carrageninas por sí sola, entonces la carragenina no contribuye en un modelo celular *in vitro* a mejorar la actividad de antiadherencia contra *H. pylori* SS1.

En los ensayos en modelo de gerbo de Mongolia, la adherencia al tracto gastrointestinal superior de *L. fermentum* UCO-979C con carragenina lambda, visualizada mediante equipo iBox, mostraron que el probiótico marcado con FITC encapsulado con carragenina presentó una alta adherencia del probiótico a la boca y el estómago. Sin embargo, se detectó en los animales una inflamación intestinal, causada por la carragenina kappa. Por lo tanto, los experimentos se

continuaron utilizando solo carragenina lambda, con más grupos sulfato que son importantes para inhibir *H. pylori* (Necas & Bartosikova, 2013).

Las imágenes de iBox mostraron que el probiótico o *H. pylori* SS1 se adhirieron principalmente al antro y al cuerpo del animal, formando parches. Por otro lado, los recuentos bacterianos de las muestras obtenidas mostraron que el probiótico se adhirió principalmente al cuerpo y al antro y en menor medida al fundus, el patógeno se adhirió principalmente al antro y menos al cuerpo y fundus. Por lo tanto, las observaciones de iBox y los recuentos de bacterias indican una tendencia similar.

En un experimento en ausencia de carragenina, Merino *et al.* (2018) también informaron una disminución de la colonización por *H. pylori* en el antro de los gerbos tratados con *L. fermentum* UCO-979C. Sunanlignon *et al.* (2012) informaron que *L. rhamnosus* redujo la colonización e infección por *H. pylori* en un modelo de ratones. En el presente estudio, de acuerdo con los autores anteriores, se observa que los estómagos de todos los gerbos de Mongolia que recibieron *L. fermentum* UCO-979C y luego se infectaron con *H. pylori* mostraron la ausencia de gastritis o úlceras, mientras que los animales no tratados profilácticamente mostraron ese tipo de lesiones. Delgado *et al.* (2015) informaron que ciertos microorganismos, incluido *Lactobacillus*, colonizan selectivamente el estómago humano o animal. Por lo tanto, la biopelícula producida por *L. fermentum* UCO-979C puede ser un factor importante que participa en su adherencia *in vivo* al estómago de los gerbos de Mongolia informados en este trabajo.

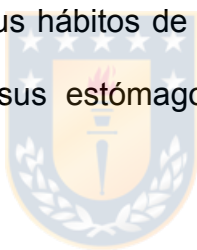
Estudios histológicos han informado que *H. pylori* y algunas cepas probióticas se adhieren o colonizan los mismos sitios (de Klerk *et al.*, 2016; Emara *et al.*, 2016; Oh *et al.*, 2016). Según Terayama *et al.* (2016), la protección gástrica puede ser el resultado de la adhesión de probióticos antes del patógeno. Por lo tanto, como lo sugieren los resultados de Manfredi *et al.* (2012), el consumo de probióticos antes de una infección puede tener un efecto profiláctico en el huésped.

Dada la constante solicitud a nivel mundial de evitar la experimentación con animales, se están desarrollando alternativas para poder eliminar metodologías que los incluyan, o disminuir el número de animales que se someten a ensayos, que según cifras aportadas por la Unión Británica para la Abolición de la Vivisección y el Consejo en Bioética Nuffield asciende hasta unos 100 millones de vertebrados en todo el planeta. Una herramienta que se ha desarrollado en algunos centros de investigación a nivel mundial, es la simulación de tracto digestivo humano. Esta herramienta es útil para representar las condiciones fisiológicas más cercanas a la del cuerpo humano y poder controlar los hábitos alimenticios que en un modelo animal ciertamente serán diferentes, por el tipo de dieta y los regímenes de alimentación. Por lo que basándose en el ensayo animal, no hay respuestas concluyentes sobre la mejor hora del día para consumir los probióticos. Durante el ayuno, el pH del estómago es demasiado ácido, lo que reduce la viabilidad del probiótico, pero puede alcanzar fácilmente un epitelio al que poder adherirse. Es posible especular que, si se consume con otros alimentos, el pH del estómago puede ser más favorable, lo que aumenta la

viabilidad del probiótico, pero al mezclarse con el alimento, su posibilidad de adherirse al epitelio podría reducirse.

Los resultados de simulación gástrica mostraron que en ayunas, el recuento de *H. pylori* disminuyó en todos los tiempos muestreados en comparación con el control de pH 7.0. Además, se muestra que una vez consumido el probiótico se debe esperar al menos una hora antes de consumir alimentos.

La reducción de los recuentos de *H. pylori* fue informada por Schreiber *et al.* (2005) utilizando *H. pylori* y mucinas y lo atribuyeron al pH ácido. Estos resultados explican la observación de Thorens *et al.* (1996) informaron que los niños y ciertos adultos, estos últimos debido a sus hábitos de alimentación u otras razones, que tienen un pH menos ácido en sus estómagos favorecen la viabilidad de los microorganismos.



En resumen los resultados de esta tesis permitieron esclarecer si las propiedades probióticas u otras actividades deseables de una cepa probiótica, en este caso *L. fermentum* UCO-979C son conservadas al ser confinada para su protección en una matriz polimérica que además aporta con actividad anti-*H. pylori*, capaz de ser liberada y actuar frente al patógeno. Además, poner en en marcha por primera vez una simulación gástrica con una cepa probiótica con sitio de acción escogido el estómago humano y con la acción de una dieta chilena estándar. recomendando que para este probiótico el mejor momento del día para ser consumido es en ayunas y luego no ingerir alimentos hasta una hora después, para que el romper el

ayuno no afecte la acción anti-H. pylori de la capa y el polímero. Resultado que el modelo animal no aporta.



CONCLUSIONES

1. El efecto anti-*H. pylori* de la cepa *L. fermentum* UCO-979C en un sistema gástrico simulado ratifica la actividad probiótica de esta cepa mostrada previamente en estudios *in vitro* y en modelos animales. La cepa probiótica *L. fermentum* UCO-979C es un buen candidato para su uso en humanos para la protección gástrica contra *H. pylori*.

2. La encapsulación de *L. fermentum* UCO-979C en 1:1 2% p/v de carrageninas kappa y lambda proporcionó una cápsula apropiada para proteger la cepa probiótica de un pH bajo, sales biliares y pepsina en comparación con probiótico no encapsulado mejorando su viabilidad.

3. Después de ser liberado de las cápsulas de carragenina, el probiótico mantuvo su producción de ácido L-láctico y su capacidad de formación de biopelículas manteniendo su actividad inhibitoria contra *H. pylori*.

4. La mezcla de kappa y lambda carragenina fue bactericida para *H. pylori* SS1 pero no afectó la viabilidad de la cepa probiótica. Se demostró que *L. fermentum* UCO-979C liberado de desde las cápsulas redujo la colonización por *H. pylori* del estómago.

5. En la simulación gástrica, el efecto anti-*H. pylori* se mejoró cuando el probiótico se encapsuló en carragenina. Los resultados también mostraron que consumir el probiótico, en condiciones de ayuno proporcionó un mejor efecto anti-*H. pylori* que

consumirlo asociado a otros alimentos. Por lo tanto, se recomienda consumir este probiótico u otros probióticos resistentes a pH bajo como primera comida después del ayuno y esperar al menos 1 hora para ingerir otro alimento.

PROYECCIÓN

Los resultados de este trabajo sugieren que la encapsulación con al menos carragenina lambda de la cepa probiótica *L. fermentum* UCO-979C, puede aumentar la viabilidad de la cepa probiótica sometida a condiciones de estrés. La actividad anti-*H-pylori* de la cepa como de carragenina lambda, pueden ser una alternativa en la prevención de la infección con este patógeno, de esta forma el incorporar la cepa probiótica encapsulada a un alimento y hacerlo funcional, se estaría mejorando la salud humana.



REFERENCIAS

Ahmad, K., Fatemeh, F., Mehri, N. & Maryam S. (2013) Probiotics for the treatment of pediatric *helicobacter pylori* infection: a randomized double blind clinical trial. *Iranian Journal of Pediatrics*, 23,79-84.

Anal A. & Stevens W. (2005) Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics*, 290, 45-54.

Anal, A. K., Stevens, W. F. & Remunan-Lopez, C. (2006). Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics*, 312(1-2), 166-173.

Audet, P., Paquin, C. & Lacroix, C. (1988). Immobilized growing lactic acid bacteria with k-carrageenan-locust bean gum gel. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29, 11-18.

Audet, P., Paquin, C. & Lacroix, C. (1990). Batch fermentations with a mixed culture of lactic acid bacteria immobilized separately in k-carrageenan locust bean gum gel beads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32, 662-668.

Ayala, G., Escobedo-Hinojosa, W. I., de la Cruz-Herrera, C. F. & Romero, I. (2014). Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*, 20(6), 1450-1469.

Butel, M.J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(1), 1–8.

Camargo M., García A., Riquelme A., Otero W., Camargo C., Hernandez-García T., Candia R., Bruce M. & Rabkin C. (2014) The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: a systematic review in latin America. *American journal of gastroenterology*, 109(4), 485.

Cheow, W. S. & Hadinoto, K. (2013). Biofilm-Like *Lactobacillus rhamnosus* Probiotics Encapsulated in Alginate and Carrageenan Microcapsules Exhibiting Enhanced Thermotolerance and Freeze-Drying Resistance. *Biomacromolecules*, 14(9), 3214–3222.

Cho, I. & Blaser MJ. (2012) The Human Microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Genetic Review*, 13, 260-270.

Chua, E. G., Verbrugghe, P., Perkins, T. T. & Tay, C. Y. (2015). Fucoidans disrupt adherence of *Helicobacter pylori* to AGS cells in vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 120981 <http://dx.doi.org/10.1155/2015/120981>

Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C. & Alhaique, F. (2007). Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release*, 119, 5-24.

Dave, R. I., & Shah, N. P. (1997). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7, 31-41.

de Klerk, N., Maudsdotter, L., Gebreegziabher, H., Saroj, S. D., Eriksson, B., Eriksson, O. S., Roos, S., Lindén, S., Sjölander, H. & Jonsson, A. B. (2016). Lactobacilli reduce *Helicobacter pylori* attachment to host gastric epithelial cells by inhibiting adhesion gene expression. *Infection and Immunity*, 84(5), 1526-1535.

de Kruif, C. G. & Tuinier, R. (2001). Polysaccharide protein interactions. *Food hydrocolloids*, 15(4-6).

Delgado, S., Leite, A.M, Ruas-Madiedo, P, & Mayo, B. (2015). Probiotic and technological properties of *Lactobacillus* spp strains from the human stomach in the search for potential candidates against gastric microbial dysbiosis. *Frontiers in Microbiology*. 14(5), 766-773.

Doleyres, Y., Paquin, C., LeRoy, M. & Lacroix, C. (2002). *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free- and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 168-173.

Doleyres, Y., Fliss, I., & Lacroix, C. (2004). Continuous production of mixed lactic starters containing probiotics using immobilized cell technology. *Biotechnology Progress*, 20, 145-150.

Emara, M.H, Elhawari, S.A, Yousef, S, Radwan, M.I, & Abdel-Aziz, H.R. (2016). Emerging role of probiotics in the management of *Helicobacter pylori* infection: histopathologic perspectives. *Helicobacter*, 21(1), 3-10.

Engstrand L. & Lindberg M. (2013) *Helicobacter pylori* and the gastric microbiota. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27, 39–45.

FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada

Felten, A., Barreau, C., Bizet, Ch., Lagrange, P. & Philippon A. (1999) Lactobacillus species identification, H₂O₂ production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3),729-733.

Fons, M., Gómez, A. & Karjalainen T. (2000). Mechanisms of colonization and colonization resistance of the digestive tract. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2, 240-246.

García, A., Salas-Jara, M., Herrera, C. & González C. (2014). Biofilm and *Helicobacter pylori*: From environment to human host. *World Journal of Gastroenterology*, 20, 5632-5638.

García, A., Navarro, K., Sanhueza, E., Pineda, S., Pastene, E., Quezada, M., & González, C. (2017). Characterization of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-*Helicobacter pylori* activity. *Electronic Journal of Biotechnology*, 25, 75-83.

Ghotaslou, R., Ebrahimzadeh, H., Mahammadzadeh, Y. (2015). Prevalence of antibiotics resistance in *Helicobacter pylori*: A recent literature review. *World Journal of Methodology* 5(3), 164-174.

Guix, J. y Cantera, C. (2017). Actualización en el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* del adulto. *Butlletí d'informació terapèutica*. 28(9), 67-74.

Heidebach, T., Forst, P., & Kulozik, U. (2009). Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 23, 1670–1677.

Hirmo, S., Utt, M., Ringner, M., & Wadström, T. (1995). Inhibition of heparan sulphate and other glycosaminoglycans binding to *Helicobacter pylori* by various polysulphated carbohydrates. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 10(3-4), 301-306.

IARC, International Agency for Research on Cancer. (1994). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans (Vol. 61). *International Agency for Research on Cancer*.

Johnson-Henry, K. C., Mitchell, D. J., Avitzur, Y., Galindo-Mata, E., Jones, N. L., & Sherman, P. M. (2004). Probiotics reduce bacterial colonization and gastric inflammation in *H. pylori*-infected mice. *Digestive Diseases and Sciences*, 49(7-8), 1095-1102.

Klein, J., Vorlop, K.-D., Steinert, H.-J., 1986. Biokatalysator und Verfahren zu seiner Herstellung. DE000003432923A1.

Lee, A., Phillips, M. W., O'rourke, J. L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Fraser, G. J. & Kouprach, S. (1992). *Helicobacter muridarum* sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(1), 27-36.

Leszczyńska, K., Namiot, A., Fein, D. E., Wen, Q., Namiot, Z., Savage, P. B., Diamond, S., Janmey, P., & Bucki, R. (2009). Bactericidal activities of the cationic steroid CSA-13 and the cathelicidin peptide LL-37 against *Helicobacter pylori* in simulated gastric juice. *BMC Microbiology*, 9(1), 187-197.

Liu, J., Zhan, X., Wan, J., Wang, Y. & Wang, CH. (2017). Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: Favourable physical features versus adverse biological effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 282–301.

Lorca, G., Wadström, T., Valdez, G. & Ljungh A. (2001). *Lactobacillus acidophilus* autolysins inhibit *Helicobacter pylori* in vitro. *Current in Microbiology*, 42(1), 39-44.

Mahmood, K., Tabasum, S., Nasif, M., Sultan, N., Aslam, N., Noreen, A. & Zuber M. (2017). A review on synthesis, properties and applications of natural polymer based carrageenan blends and composites. *International Journal of Biological Macromolecules* 96, 282–301.

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C A., Gisbert, JP., Kuipers, EJ., Axon, AT., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, DY., Hunt, R., Moayyedi, P., Rokkas, T., Rugge, M., Selgrad, M., Suerbaum, S., & El-Omar, EM. (2017) Management of *Helicobacter pylori* infection- The Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* 0,1-25

Manfredi, M, Bizzarri, B, Sacchero, R.I, Maccari, S, Calabrese, L, Fabbian, F, & De'Angelis, G.L. (2012). *Helicobacter pylori* infection in clinical practice: Probiotics and a combination of probiotics + lactoferrin improve compliance, but not eradication, in sequential therapy. *Helicobacter*. 17(4), 254-263.

Merino, J. S., García, A., Pastene, E., Salas, A., Saez, K., & González, C. L. (2018). *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strongly inhibited *Helicobacter pylori* SS1 in *Meriones unguiculatus*. *Beneficial Microbes*, 9(4), 625-627.

Mizock, B., FACP, & FCCM. (2015). Probiotics. *Disease-a-Month*, 61(7), 259-290.

Moyaert, H., Franceschi, F., Roccarina, D., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. & Gasbarrini, A. (2008) Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection: other *Helicobacters*. *Helicobacter*, 13: 47-57.

Nag, A., K.-S. Han, & H. Singh. (2011) Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. *International Dairy Journal*, 21(4), 247-253.

Nam, H., Ha, M., Bae, O. & Lee, Y. (2002) Effect of *Weissella confusa* strain PL9001 on the adherence and growth of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 4642-4645

Necas, J. & Bartosikova, L. (2013). Carrageenan a review. *Veterinarni Medicina*, (58), 187-205.

Nilsson, J. R. (2005). Ethanol affects endocytosis and proliferation of *Tetrahymena pyriformis* GL and promotes encystment. *Acta Protozoologica*. 44, 293–299.

Oh, Y., Osato, M. S., Han, X., Bennett, G., & Hong, W. K. (2002). Folk yoghurt kills *Helicobacter pylori*. *Journal of Applied Microbiology*, 93(6), 1083-1088.

Patel, P.J., Singh, S.K., Panaich, S. & Cardozo, L. (2014) The aging gut and the role of prebiotics, probiotics, and synbiotics: A review. *Journal of Clinical Gerontology and Geriatrics*, 5(1), 3-6.

Pavli, M., Baumgartner, S., Kos, P. & Kogej, K. (2011). Doxazosin-carrageenan interactions: A novel approach for studying drug-polymer interactions and relation to controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 421(1), 110–119.

Pinchuk, IV., Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B., Sorokulova, IB., Mégraud, F. & Urdaci, MC. (2001) In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 3156-3161.

Roos, S., Engstrand, L. & Jonsson, H. (2005) *Lactobacillus gastricus* sp. nov., *Lactobacillus antri* sp. nov., *Lactobacillus kalixensis* sp. nov., and *Lactobacillus ultunensis* sp. nov., isolated from human stomach mucosa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 77–82.

RSA, 2017. “Reglamento Sanitario de los Alimentos”. Decreto Supremo N° 977. Departamento de Asesoría Jurídica. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. [en línea] <http://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/04/DECRETO_977_96_actualizado_a-octubre-2016.pdf>.

Running C., Falshaw R. & Janaswamy S. (2012) Trivalent iron induced gelation in lamda-carrageenan. *Carbohydrate Polymers*, 87, 2735– 2739

Ryan, K.A., O’Hara, A.M., Van Pijkeren, J.P., Douillard, P.F., & O’Toole, P.W. (2009). *Lactobacillus salivarius* modulates cytokine induction and virulence factor gene expression in *Helicobacter pylori*. *Journal Medical Microbiology*. 58(8), 996-1005.

Sachs, G., and Scott, D., (2012) *Helicobacter pylori*: Destruction or Preservation. *F1000 Medicine Reports* 2012, 4:7.

Salas-Jara, M. J., Sanhueza, E. A., Retamal-Díaz, A., González, C., Urrutia, H., & García, A. (2016). Probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C biofilm formation on AGS and Caco-2 cells and *Helicobacter pylori* inhibition. *Biofouling*, 32(10), 1245-1257.

Sanhueza, E., Paredes-Osses, E., González, C. & García, A. (2015) Effect of pH in the survival of *Lactobacillus salivarius* strain UCO_979C wild type and the pH acid acclimated variant. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18, 343-6.

Schreiber, S., Bucker, R., Groll, C., Azevedo-Vethacke, M., Garten, D., Scheid, P., Friedrich, S., Gatermann, S. et al. (2005) Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen in vivo. *Infection and immunity*, 73, 1584–1589.

Servaty, R., Schiller, J., Binder, H., & Arnold, K. (2001). Hydration of polymeric components of cartilage—an infrared spectroscopic study on hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28(2), 121-127.

Shibata, H., Kimura-Takagi, I., Nagaoka, M., Hashimoto, S., Sawada, H., Ueyama, S., & Yokokura, T. (1999). Inhibitory effect of Cladosiphon fucoidan on the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric cells. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 45(3), 325-336.

Song, W., Wang, Y., Zhang, L., Fu, S., Zeng, Y. & Hu, H. (2014). Preparation and evaluation of polysaccharide sulfates for inhibiting *Helicobacter pylori* adhesion. *Carbohydrate Polymers*, 103, 398-404.

Sgouras, D.E., Panayotopoulou, B., Martinez-Gonzalez, K., Petraki, S. & Michopoulos, A. (2005). *Lactobacillus johnsonii* La1 attenuates *Helicobacter pylori*-associated gastritis and reduces levels of proinflammatory chemokines in C57BL/6 mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 12(12), 1378-1386.

Sunanliganon, C, Thong-Ngam, D, Tumwasorn, & S, Klaikeaw, N. (2012). *Lactobacillus plantarum* B7 inhibits *Helicobacter pylori* growth and attenuates gastric inflammation. *World Journal of Gastroenterology*. 18(20), 2472-2480.

Suzuki, M., Mimuro, H., Suzuki, T., Park, M., Yamamoto, T., Sasakawa, C. (2005) Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *The Journal of Experimental Medicine*, 202, 1235-1247.

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L. & Ouellette, M. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318-327.

Terayama, Y., Matsuura, T., Uchida, M., Narama, I. & Ozaki, K. (2016). Probiotic (yogurt) containing *Lactobacillus gasseri* OLL2716 is effective for preventing *Candida albicans*-induced mucosal inflammation and proliferation in the forestomach of diabetic rats. *Histology and Histopathology*, 31(6), 689-697.

Terraf, M., Juarez Tomas, M., Nader-Macias, M., & Silva, C. (2012). Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. *Journal of Applied Microbiology*, 113(6), 1517-1529.

Thorens, J., Froehlich, F., Schwizer, W., Saraga, E., Bille, J., Gyr, K., Duroux, P., Nicolet, M., Pignatelli, B., Blum, A., Gonvers, J., Fried. M. (1996). Bacterial overgrowth during treatment with omeprazole compared with cimetidine: a prospective randomised double blind study. *Gut*, 39(1), 54-59.

Tolone, S., Pellino, V., Vitaliti, G., Ianzafame, A. & Tolone, C. (2012) Evaluation of *Helicobacter pylori* eradication in pediatric patients by triple therapy plus lactoferrin and probiotics compared to triple therapy alone. *Italian Journal of Pediatrics* 38:1-63

Usov A. (2011) Polysaccharides of the red algae. *Advanced in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 65: 115-217.

Villard, V., & Raynaud, P. (1968) Presence of a bacteriolytic agent in contents of rabbit stomach. In *Journal de Physiologie*, p. 323. Paris: Masson Editeur

or J., Vale F. (2011) Alternative therapies for *Helicobacter pylori*: probiotics and phytomedicine. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 63:153-164.

Wang, F., Feng, J., Chen, P., Liu, X., Ma, M., Zhou, R. & Zhao, Q. (2017). Probiotics in *Helicobacter pylori* eradication therapy: systematic review and network meta-analysis. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 41(4), 466-475.

Wirtz V. Dreser A. & Gonzales R. (2010). Trends in antibiotic utilization in eight Latin American countries, 1997-2007. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 27(3), 219-225.

Wroblewski, L. E. & Peek, R. M. (2013). *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis: mechanisms. *Gastroenterology Clinics*, 42(2), 285-298.

Wu, W., Wang, F., Gao, X., Niu, T., Zhu, X., Yan, X. & Chen, H. (2016). Synergistic effect of kappa-carrageenan on oxazolone-induced inflammation in balb/c mice. *BMC Gastroenterology*. 25(16), 41-50.

Zapata, I. C., Sepúlveda-Valencia, U., & Rojano, B. A. (2015). Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las propiedades fisicoquímicas, probióticas y antioxidantes de yogurt saborizado con mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw). *Información Tecnológica*, 26(2), 17-28.

Zullo, A., De Francesco, V., Hassan, V., Ridola, L., Repici, A., Bruzzese, V., Vaira, D. (2013) Modified sequential therapy regimens for *Helicobacter pylori* eradication: A systematic review. *Digestive and Liver Disease*, 45 :18-22

COMUNICACIONES REALIZADAS

Apolinaria García, Marcela Espinoza, **Cristian Gutiérrez**, (2018) “Probióticos y *Helicobacter pylori*” En: Boletín Enlaces de Salud. 5ta Ed. ISBN 04-2015-060316095300-106. Masayoshi-Hatakeyama, Guadalajara-México.

Marco Vega-Sagardía, Jorge Rocha, Katia Sáez, Carlos T. Smith, **Cristian Gutiérrez-Zamorano**, Apolinaria García-Cancino, (2018) Encapsulation, with and without oil, of biofilm forming *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strain in alginate-xanthan gum and anti-*Helicobacter pylori* effect. Journal of Functional Foods, 46, 504-513.

Gutiérrez-Zamorano, C., González-Ávila, M., Díaz-Blas, G., Simth, C. González-Correa, C., García-Cancino, A. (2019) Increased anti-*Helicobacter pylori* effect of the probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strain encapsulated in carrageenan evaluated in gastric simulations under fasting conditions. *Food Research International* (In Press, Accepted Manuscript)
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.064>

TRABAJO EN REVISIÓN

Cristian Gutiérrez-Zamorano, Enrique Sanhueza-Carrera, Katia Sáez-Carrillo, Carlos T. Smith, Carlos L. González, Apolinaria García-Cancino, Effect of carrageenan encapsulation of *L. fermentum* UCO-979C on its viability, probiotic properties and anti-*H. pylori* activity, Food and Bioprocess Technology. 6 de febrero de 2019.

SOLICITUD DE PATENTE

Nº solicitud: 01367-2017

Fecha: 30/11/2017

Título: Una formulación de encapsulación para lactobacilos que permite prolongar su viabilidad.

Nº solicitud: 03406-2016

Fecha: 30/12/2016

Título: Una cepa de *Lactobacillus fermentum* RGM 2341 y su uso para contrarrestar la reacción inflamatoria causada por enterobacterias

ASISTENCIA A CONGRESOS

Cristian Gutiérrez, Interacción al encapsular en carrageninas la cepa *Lactobacillus fermentum*, XVII Congreso Latinoamericano de Nutrición SLAN, REPUBLICA DOMINICANA, Punta Cana, 2015 (modalidad oral)

Cristian Gutiérrez, Interacción entre carrageninas/*Helicobacter pylori*/*Lactobacillus fermentum*/celulas AGS: Innovación en alimentos probióticos, I Congreso Nacional Multidisciplinario de Nutrición y Dietética, PANAMA, Ciudad de Panamá, 2015 (Expositor invitado)

Cristian Gutiérrez, Apolinaria García, “Desarrollo de un probiótico con actividad anti *Helicobacter pylori*: Sorteando obstáculos desde la ciancia básica hacia la industria”, II Congreso Nacional Multidisciplinario de Nutrición y Dietética, PANAMA, Coronado, 2016 (Expositor invitado)

Cristian Gutiérrez, Apolinaria García, “Probióticos de cuarta generación, un paréntesis” II Congreso Nacional Multidisciplinario de Nutrición y Dietética, PANAMA, Coronado, 2016 (Expositor invitado)

Cristian Gutiérrez, Marco Vega, Apolinaria García, “Encapsulation of strain as a potential fourth generation probiotic product”, XL Congreso Nacional de Microbiología, MEXICO, Guadalajara, 2017. (Modalidad póster)

Marcela Espinoza Monje, **Cristian Gutiérrez Zamorano**, Gustavo Díaz Blas, Apolinaria García Cancino “Selección de cepas lactasa-positiva para formulación de alimento probiótico dirigido a intolerantes a la lactosa” XVIII Congreso Latinoamericano de Nutrición, MEXICO, Guadalajara, 2018 (Modalidad oral)

Apolinaria García Cancino, Marisela González Ávila, Gustavo Díaz Blas, **Cristian Gutiérrez Zamorano**, “Simulación gástrica frente a la infección por *Helicobacter pylori* con la cepa probiótica UCO-979C” XVIII Congreso Latinoamericano de Nutrición, MEXICO, Guadalajara, 2018 (Modalidad oral)

PARTICIPACIÓN EN CURSOS DICTADOS

Instructor en: Curso de actualización de Probióticos y aplicaciones prácticas, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ) (México), 6 y 7 de abril 2017, 16 horas.

Charla en Simposio “Probióticos en la sociedad: Una mirada integradora y nuevas perspectivas de aplicaciones biotecnológicas” INN BIO UdeC, 19 de enero 2017, 8 horas.

Instructor en: Curso Teórico-práctico, Aislamiento y caracterización de cepas potencialmente probióticas con aplicación en la industria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ) (México), 5 al 9 de noviembre de 2018, 40 horas.

