

Efecto de probióticos sobre cepas de *Helicobacter pylori*

Gonzalez Magallanes B.¹, Avilés Jiménez, F.², Hernández Sánchez H.¹

¹Laboratorio de Biotecnología de alimentos, Departamento de Ingeniería Bioquímica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Av. Wilfrido Massieu 399, Nueva Industrial Vallejo, Gustavo A. Madero, 07738, Ciudad de México, México. Tel: 5567664594, 5557296000 ext. 57866. ²Hospital de pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330, Doctores, Cuauhtémoc, 06720, Ciudad de México, México. Tel. 56276900 ext. 22408. Correo: bgm-1621@hotmail.com

Palabras clave: *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, *Helicobacter pylori*, inhibición.

Introducción

De cada diez personas infectadas por la bacteria *Helicobacter pylori*, solo una desarrolla enfermedad y nueve nunca la desarrollan. La infección se asocia etiológicamente con la presencia de úlceras pépticas, ya sea gástrica o duodenal, y con el desarrollo de un tipo especial de linfoma gástrico denominado MALToma; de igual manera, participa en la cadena multicausal etiológica del desarrollo de cáncer gástrico. En 1994 la Organización Mundial de la Salud (específicamente, la IARC-*International Agency for Research on Cancer*) ha clasificado a dicho patógeno como agente biológico carcinógeno para el hombre categoría 1, donde la incidencia más alta de infección tiene lugar durante la infancia en países en vías de desarrollo y parece estar relacionada con condiciones económicas e higiénico-sanitarias desfavorables. Los principales problemas en la terapia de erradicación de *H. pylori* son la tasa de fracaso de más del 20% y el alto porcentaje de efectos secundarios de la terapia con antibióticos. Además, debido a los eventos adversos, hay como resultado una mayor resistencia de cepas bacterianas a los antibióticos. De acuerdo con la publicación de Goderska et al., en 2018, la terapia triple estándar ya no puede recomendarse para su uso empírico, debido al alto nivel de resistencia a los dos antibióticos clave; claritromicina y metronidazol [1]. Por ello se están implementando estrategias alternativas en la práctica clínica para tratar cepas resistentes de *H. pylori*, como el uso de probióticos. Los estudios publicados hasta la fecha sugieren que los probióticos pueden tener un doble papel en la lucha contra la infección por *H. pylori*; disminuyen la frecuencia de eventos adversos gastrointestinales causados por la terapia con antibióticos y aumenta la tasa de erradicación [2]. Se ha observado que, al administrar probióticos junto con el tratamiento correspondiente para tratar la infección con *H. pylori*, aumenta su eficacia y/o reducen efectos secundarios que este provoca, además de prevenir infecciones y ser usados como posible profilaxis. El objetivo de este trabajo es comprobar el efecto de los sobrenadantes de cepas probióticas con y sin células viables, sobre cepas de *H. pylori* en un modelo *in vitro*.

Metodología

Se emplearon cuatro cepas probióticas comerciales: *Lactobacillus plantarum* 299v, *Lb. plantarum* DGIA1, *Lb. casei* Shirota y *Saccharomyces boulardii*. Se utilizaron cuatro cepas de *H. pylori* de aislamientos clínicos, dos cepas de cáncer gástrico y dos de gastritis no atrófica y cepa de referencia *H. pylori* 26695. Las cepas de *Lactobacillus* se incubaron en caldo MRS a 37 °C durante 24 h y la levadura en caldo YPD a 37 °C por 48 h. Después del tiempo de incubación, se procedió a separar los tipos de sobrenadantes: a) sobrenadantes con células viables. Se tomó una alícuota de 1 mL de cada cepa después del tiempo de incubación. Estos sobrenadantes se utilizaron el mismo día en que se obtuvieron. b) Sobrenadantes sin células viables. Los sobrenadantes se centrifugaron a 6000 rpm, durante 20 min a 20 °C y se esterilizaron por filtración utilizando una membrana con poro de 0.45 µm de diámetro. c) Sobrenadantes sin células viables neutralizados. De los sobrenadantes esterilizados por filtración, se tomaron alícuotas independientes y se ajustaron a pH 6.5 con NaOH 5 N para neutralizar el efecto inhibitorio de ácido láctico y se le adiciono catalasa (1 mg/mL). Para demostrar la naturaleza proteica de los posibles agentes antimicrobianos producidos por las cepas probadas en esta investigación, se trató por separado los sobrenadantes (pH 6.5) con tres enzimas proteolíticas: proteasa tipo VIII de *Bacillus licheniformis* (1µL/mL), tripsina tipo III de páncreas bovino (1 mg/mL) y pronasa de *Streptomyces griseous* (1 mg/mL). La actividad de los sobrenadantes se evaluó mediante un ensayo de difusión en agar. Las cepas de *H. pylori* se cultivaron en agar base sangre. Posteriormente se obtuvo una turbidez igual a la del tubo 0.5 de la escala de McFarland

en solución salina de estas cepas y se sembraron por estría masiva. Sobre el agar se hicieron pozos de 0.85 cm de diámetro, se agregaron 80 µL de cada uno de los distintos sobrenadantes en cada pocillo y se incubaron a 37 °C en microaerofilia (con 10% de CO₂) durante 72 h. La actividad antimicrobiana se evaluó midiendo la formación de zonas de inhibición alrededor de los pozos. Para cada una de las réplicas de los experimentos, se realizó desviación estándar utilizando la herramienta de Excel. Se realizaron pruebas de esterilidad a todos los sobrenadantes.

Resultados y discusión

En la Figura 1, se observa el diámetro del tamaño de la formación de halos obtenidos a partir de sobrenadantes que contenían células viables. En la Figura 2, se observa la formación de halos sobre el agar donde se sembró *H. pylori*.

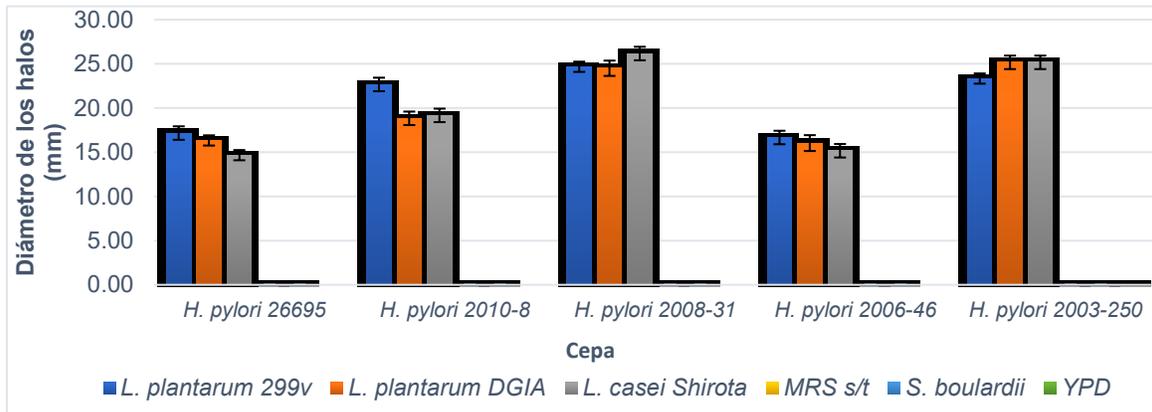


Figura 1. Tamaño de los halos de inhibición de *H. pylori* con sobrenadantes de probióticos con células viables. Halos de *H. pylori*, con sobrenadantes probióticos que contenían células viables. Se utilizó medio MRS y YPD, como controles. No se observó algún tipo de inhibición por parte de *S. boulardii*, ni de los medios. Para cada experimento se realizó 3 réplicas.

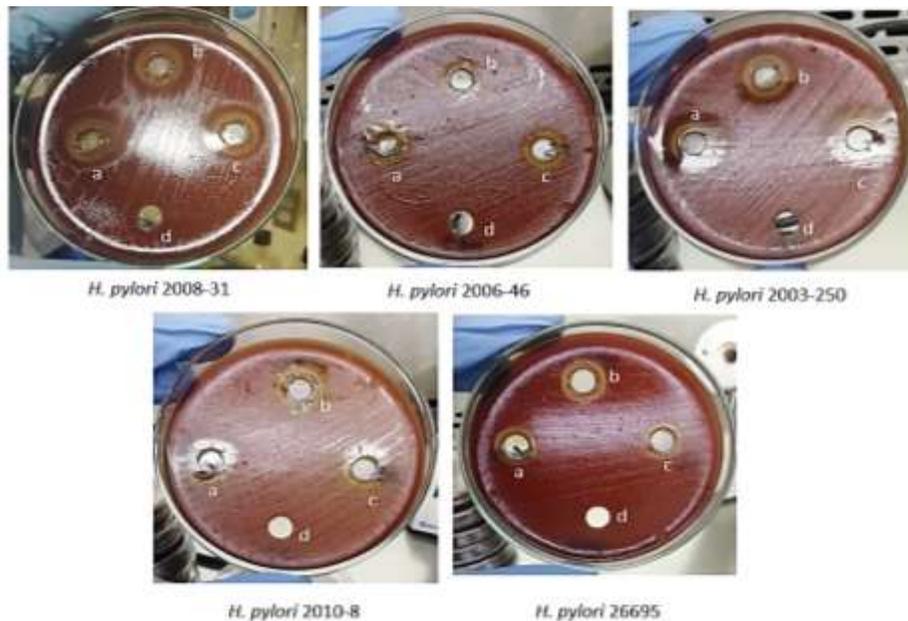


Figura 2. Halos de inhibición de *H. pylori* con sobrenadantes de probióticos con células viables. Imágenes obtenidas de la formación de halos sobre cepas de *H. pylori* con sobrenadantes que contenían células

viables de cepas probióticas. En cada uno de los pozos; a) *Lb. plantarum* DGIA, b) *Lb. plantarum* 299v, c) *Lb. casei* Shirota y d) MRS.

En la Figura 3 se registró el tamaño del diámetro de los halos que se formaron a partir de los sobrenadantes que se esterilizaron por filtración. En la Figura 4 las imágenes de las placas de agar. En cuanto a los resultados obtenidos a partir de los sobrenadantes a los cuales se les realizó un tratamiento con NaOH y catalasa, y con las enzimas proteolíticas proteasa tipo VIII de *B. licheniformis*, tripsina tipo III de páncreas bovino y pronasa de *S. griseous*, para ver si la actividad anti-*H. pylori*, en caso de existir, era de naturaleza proteica, se observó que no hubo inhibición del crecimiento de las cepas de *H. pylori*.

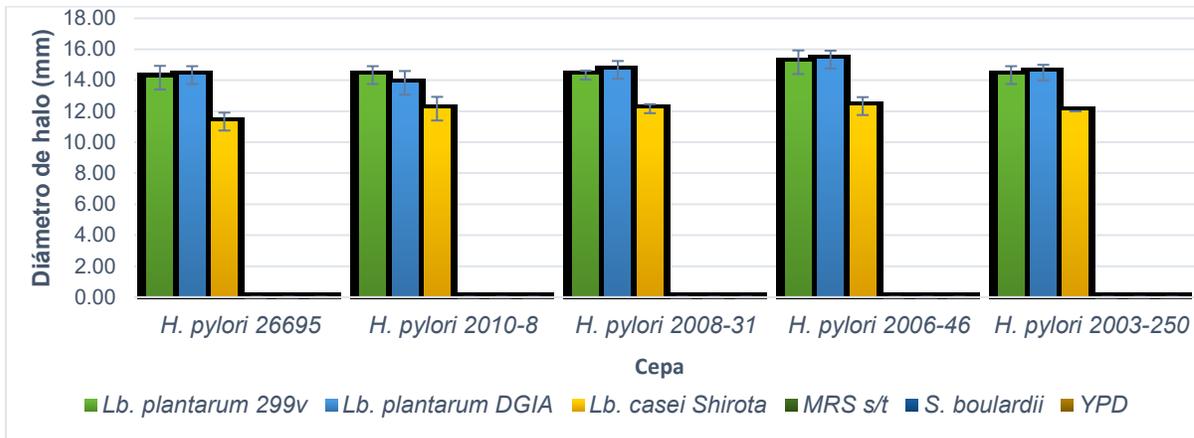


Figura 3. Tamaño de los halos de inhibición de *H. pylori* con sobrenadantes de probióticos sin células viables. Tamaño de los halos obtenidos sobre las cepas de *H. pylori*, con sobrenadantes probióticos que fueron esterilizados por filtración. Se utilizó medio MRS y YPD, como controles. No se observó algún tipo de inhibición por parte de *S. boulardii*, ni de los medios. Para cada experimento se realizó 3 réplicas.

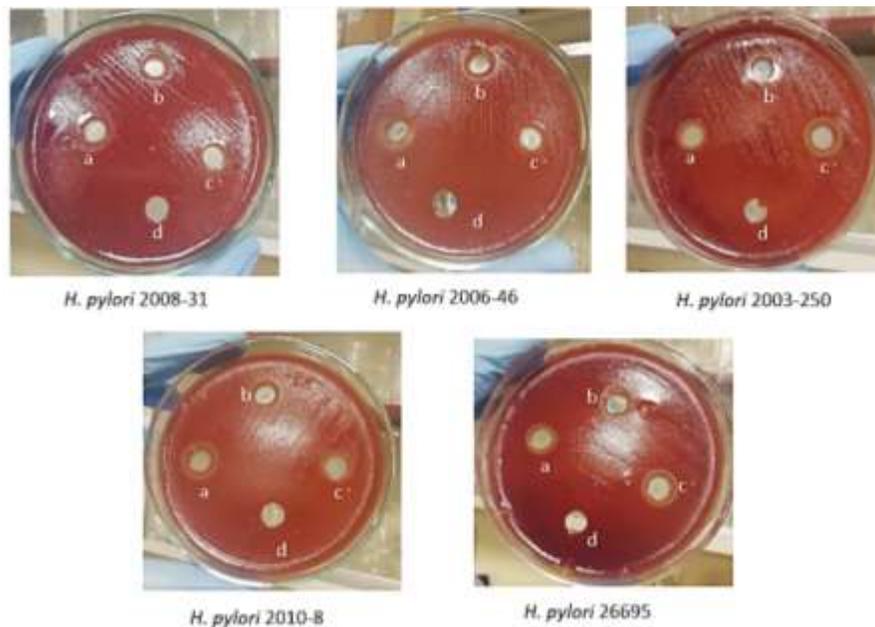


Figura 4. Halos de inhibición de *H. pylori* con sobrenadantes de probióticos sin células viables.

En la figura se observan las imágenes obtenidas de la formación de halos sobre cepas de *H. pylori* con sobrenadantes esterilizados por filtración de a) sobrenadante de *Lb. plantarum* DGIA, b) sobrenadante de *Lb. plantarum* 299v, c) sobrenadante de *Lb. casei* Shirota y d) MRS.

Podemos ver una mayor actividad de inhibición en los sobrenadantes que tienen células viables, comparada a la de los sobrenadantes esterilizados por filtración. Este es un fenómeno que ha llamado mucho la atención y que se ha observado mucho en bacterias lácticas y que se ha denominado síntesis de bacteriocinas controlada por *quorum sensing*, en el cuál la bacteriocina sólo se produce cuando se detecta la presencia de un microorganismo potencialmente competitivo. Este mecanismo se ha observado en *Streptococcus thermophilus* [3] y en diferentes especies de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Se ha demostrado que este mecanismo tiene una relación costo-beneficio mayor que la síntesis constitutiva de bacteriocinas [4] por lo que es muy probable que este sea el escenario que se presenta en este estudio y que los probióticos estén produciendo bacteriocinas reguladas por *quorum sensing*. Se realizó una prueba con ácido láctico comercial al 0.7% a un pH de 3.7, para ver si este era uno de los componentes que provocaban la inhibición, se eligió ese pH ya que es el obtenido posterior a la incubación (fermentación) de las cepas probióticas en su medio de crecimiento. Sin embargo, no se observó inhibición de *H. pylori*, ya que se sabe, resiste pH gástrico. Se ha visto que una posible causa de la inhibición del crecimiento de *H. pylori* por probióticos (específicamente *Lb. casei* Shirota), se debe a la inhibición de la actividad de la ureasa provocada, por el ácido láctico producido por el probiótico y la posterior incapacidad de *H. pylori* de crecer a pH bajo en ausencia de ureasa [5]. Es posible que haya una diferencia en el tipo de ácido láctico comercial y el producido por las cepas probióticas. Se sabe que todos las BAL, por definición, producen lactato a partir de la fermentación de carbohidratos. El lactato existe en dos formas enantioméricas, un enantiómero dextrorotario (D-lactato) y un enantiómero levorotario (L lactato). En el caso de *Lb. plantarum* 299v produce una mezcla de lactato L y D, y este último representa aproximadamente el 61.9% de la producción total de lactato. Todas las BAL producen una cierta cantidad de D-lactato, que varía del 1 al 97% de todo el lactato producido, dependiendo de la cepa, siendo el 40% una cantidad típica [6]. A pesar de que no se tiene evidencia del tipo de ácido láctico que produce la cepa *Lb. plantarum* DGIA, por el simple hecho de pertenecer a esta especie, se sabe que produce una mezcla de lactato L y D como se mencionó anteriormente. Se ha demostrado que el ácido láctico participa en la actividad antibacteriana de las cepas probióticas de *Lactobacillus*. Cabe destacar que el ácido láctico L muestra una mayor actividad antibacteriana que el ácido láctico D o una combinación de ácido láctico L y D. Es por ello, que la mayor actividad antibacteriana de las cepas probióticas de *Lactobacillus* que producen ácido láctico L, se cree que podría estar relacionada en parte con la mayor proporción de lactato L en los sobrenadantes libres de células que en las cepas que producen ácido láctico D y L [7]. También, pueden estar produciéndose otras sustancias que provocan la inhibición de *H. pylori*. Respecto a los sobrenadantes obtenidos a partir del crecimiento de los probióticos, al ser tratados para inhibir actividad del peróxido de hidrógeno y neutralizar el ácido láctico, así como su actividad proteica, no se observó algún efecto de inhibición. El hecho de que no haya inhibición de las cepas de *H. pylori* utilizadas en este proyecto, puede deberse a la neutralización del ácido láctico y probablemente del peróxido de hidrogeno. En cuanto a los sobrenadantes a los cuales se les agregó enzimas proteolíticas, se observó que tampoco hubo inhibición del crecimiento de las cepas de *H. pylori*. Lo cual nos indica que es muy probable que la actividad inhibitoria se deba a moléculas de naturaleza proteica como bacteriocinas o sustancias inhibidoras parecidas a bacteriocinas (BLIS por sus siglas en inglés). A diferencia de las bacteriocinas, las BLIS son compuestos antimicrobianos que pueden inhibir tanto a bacterias Gram positivas como negativas. Se ha observado su presencia en diferentes microorganismos probióticos. Dado todo lo anterior, es muy probable que en el caso de los probióticos utilizados en este estudio se tenga la producción de BLIS sintetizados vía regulación por *quorum sensing* y activos contra *H. pylori*. Respecto a la levadura *S. boulardii*, como podemos ver en los resultados, no inhibió el crecimiento de ninguna de las cepas de *H. pylori*. El hecho de que no se haya observado inhibición de las cepas de *H. pylori* por parte de *S. boulardii*, puede deberse a que además de que los productos secretados no tengan ningún efecto sobre la cepa patógena, el tipo de modelo usado en este trabajo no haya sido el más adecuado, ya que se ha visto que la levadura es capaz de reducir la colonización de *H. pylori* en el sistema humano gastrointestinal, donde se usó un estudio *in vivo* con niños de Irán [8].

Conclusión

Tanto los sobrenadantes con y sin células viables de las cepas de lactobacilos inhibieron el crecimiento de *H. pylori*, produciéndose una mayor inhibición en los sobrenadantes que contienen células viables en el modelo ya mencionado. Utilizando el mismo modelo, los sobrenadantes con y sin células viables del probiótico *S. boulardii*, no inhibieron el crecimiento de las cepas de *H. pylori*. Los sobrenadantes de las cepas probióticas neutralizadas y tratadas con enzimas, no inhibieron el crecimiento de las cepas de *H. pylori*. Por lo tanto, la naturaleza de los componentes inhibitorios se puede inferir que es de tipo proteico.

Referencias

1. Goderska, K., Agudo-Pena, S. y Alarcon, T. (2018). *Helicobacter pylori* treatment: antibiotics or probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**(1), 1–7.
2. Homan, M. y Orel, R. (2015). Are probiotics useful in *Helicobacter pylori* eradication? *World Journal of Gastroenterology*, **21**(37), 10644–10653.
3. Fontaine, L., Céline, B., Guédon, E., Guillot, A., Ibrahim, M., Grossiord, B. y Hols, P. (2007). Quorum-Sensing Regulation of the Production of Blp Bacteriocins in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, **189**(20), 7195–7205.
4. Blanchard, A. E., Liao, C. y Lu, T. (2016). An Ecological Understanding of Quorum Sensing-Controlled Bacteriocin Synthesis. *Cellular and Molecular Bioengineering*, **9**, 1–12.
5. Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. y Mentis, A. (2004). *In Vitro* and *In Vivo* Inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* Strain Shirota. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(1), 518–526.
6. Probi, A. y JHeimbach, L. (2016). Generally Recognized as Safe (GRAS) Determination for the Use of *Lactobacillus plantarum* Strain 299v in Conventional Foods. United States Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, **1**(477), 1–94.
7. Fayol-Messaoudi, D., Berger, N. C., Coconnier-Polter, M. H., Liévin-Le Moal, V. y Servin, A. L. (2005). pH-, Lactic Acid-, and Non-Lactic Acid-Dependent Activities of Probiotic Lactobacilli against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(10), 6008–6013.
8. Namkin, K., Zardast, M. y Basirinejad, F. (2016). *Saccharomyces boulardii* in *Helicobacter pylori* eradication in children: A randomized trial from Iran. *Iranian Journal of Pediatrics*, **26**(1), 1–5.