

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**EVALUACIÓN IN VITRO DE LA INFLUENCIA DE *Lactobacillus acidophilus*
EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA β -glucuronidasa,
METABOLIZADORA DE FÁRMACOS**

TESIS

Presentada por:

Bach. Marcelo Raúl Casas Flores

Para optar el Título Profesional de

QUÍMICO FARMACÉUTICO

TACNA - PERÚ

2026

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**"EVALUACIÓN IN VITRO DE LA INFLUENCIA DE *Lactobacillus acidophilus* EN
LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA β -glucuronidasa, METABOLIZADORA DE
FÁRMACOS"**

TESIS

Presentado por:

Bach. Marcelo Raúl Casas Flores

Para optar el Título Profesional de

QUIMICO FARMACEUTICO

Aprobado por UNANIMIDAD, ante el siguiente jurado:



Mgr. Orlando Agustín Rivera Benavente

Presidente



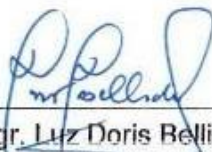
Mgr. Mónica Karina Chipana Flores

Miembro



Mgr. Luz Doris Bellido Angulo

Miembro



Mgr. Luz Doris Bellido Angulo

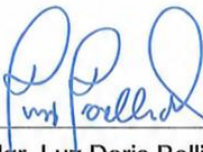
Asesora

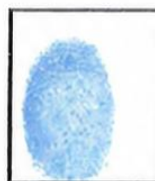
CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, **Mgr. Luz Doris Bellido Angulo**, en mi condición de **ASESORA** acreditado por la **Resolución de Facultad N°13820-2025-FACS-UNJBG** del trabajo de investigación (Tesis) titulado: **EVALUACIÓN IN VITRO DE LA INFLUENCIA DE *Lactobacillus acidophilus* EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA β -glucuronidasa, METABOLIZADORA DE FÁRMACOS**. Presentado por el Bachiller: **Marcelo Raúl Casas Flores**, para optar el título Profesional de **QUÍMICO FARMACÉUTICO**. Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y similitud de trabajos de investigación y producción intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través del software de similitud textual **TURNITIN** cuenta con el nivel de similitud permitido cuyo porcentaje es de: **3%**.

Por lo que **CERTIFICO LA SIMILARIDAD** de la tesis está de acuerdo al nivel **PERMITIDO**, para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio Institucional de la UNJBG**. Se emite el presente certificado con fines de continuar con los trámites respectivos para su obtención del título profesional de **QUÍMICO FARMACÉUTICO**.

Tacna, 07 de julio del 2026


Mgr. Luz Doris Bellido Angulo
DNI: 29570652
ASESORA




Bach. Marcelo Raúl Casas Flores
DNI: 71399288
TESISTA



DEDICATORIA

“A mis padres y familiares, por su amor incondicional, apoyo constante y confianza en cada paso de mi camino académico.

A mis docentes y a todas las personas que contribuyeron con sus conocimientos, orientación y motivación durante el desarrollo de esta investigación.

Finalmente, me la dedico a mí mismo, por la disciplina, el esfuerzo y la determinación demostrados a lo largo de este proceso. Por no rendirme ante las dificultades, mantener el compromiso con mis objetivos y perseverar hasta alcanzar esta meta que representa el fruto de años de dedicación y trabajo.”

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darme la fortaleza, la sabiduría y la perseverancia para llegar hasta aquí.

A mi familia, por su amor incondicional, su apoyo constante y cada palabra de ánimo en los momentos difíciles. Este logro es también de ustedes.

A mi asesora, Mgr. Luz Doris Bellido Angulo, por su guía, paciencia y enseñanzas durante este proceso. Gracias por exigirme lo mejor de mí y acompañarme hasta el final.

ÍNDICE

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	1
1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	2
1.2.1. Problema principal	2
1.2.2. Problemas específicos	2
1.3. JUSTIFICACION E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	2
1.4. ALCANCES Y LIMITACIONES.....	3
1.5. OBJETIVOS.....	4
1.5.1. Objetivo general.....	4
1.5.2. Objetivos específicos	4
1.6. HIPÓTESIS.....	4
1.6.1. Hipótesis general	4
1.6.2. Hipótesis Específicas	5
1.7. VARIABLES.....	5
1.7.1. Variable Independiente	5
1.7.2. Variable Dependiente	5
1.7.3. Indicadores	5
1.7.4. Definición operacional de las variables	7

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	8
2.1. ANTECEDENTES DE ESTUDIO.....	8
2.1.1. Antecedentes internacionales.....	8
2.1.2. Antecedentes nacionales.....	11
2.2. BASES TEÓRICAS	13
2.1.1. Probióticos	13
2.1.2. Microbiota	27
2.1.3. Metabolismo de fármacos.....	36
2.3. Definición de términos	44
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO.....	51
3.1. TIPO, DISEÑO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN	51
3.1.1. Tipo de investigación	51
3.1.2. Diseño de investigación.....	51
3.1.3. Nivel de investigación	51
3.2. POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO	51
3.2.1. Población	51
3.2.2. Muestra.....	52
3.2.3. Muestreo.....	52
3.3. MATERIALES Y/O INSTRUMENTOS.....	52
3.3.1. Materiales	52
3.3.2. Equipos e instrumentos	53
3.3.3. Insumos y reactivos.....	53
3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	54
3.4.1. Preparación de a partir de probiótico comercial	54
3.4.2. Reactivación de <i>Escherichia coli</i> ATC 25922.....	57
3.4.3. Preparación del extracto enzimático crudo.....	58
3.4.4. Preparación del sustrato p-nitrofenil- β -d-glucurónido (PNPG)	59
3.4.5. Curva estándar	59

3.4.6.	Ensayo de actividad enzimática	60
3.4.7.	Cálculo de la Actividad Enzimática	61
3.4.8.	Preparación de medios de cultivo	61
3.5.	TECNICA DE ANALISIS DE DATOS	63
CAPÍTULO IV: RESULTADOS		65
4.1.	Absorbancia del grupo experimental por concentración y tiempo	65
4.2.	Cálculo de la actividad enzimática del extracto crudo de β -glucuronidasa.....	72
4.3.	Resultados del montaje de controles del ensayo de actividad enzimática.....	74
4.4.	Resultados de la preparación del sustrato p-nitrofenil- β -D-glucurónido (PNPG).....	77
4.5.	Curva estándar de p-nitrofenol (PNP) para conversión Abs (405 nm) a concentración molar	78
4.6.	Recuento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> y preparación de suspensiones experimentales	80
4.7.	Análisis estadístico inferencial.....	82
4.7.1.	Prueba de Kruskal-Wallis	83
4.7.2.	Prueba de Mann-Whitney U	85
4.7.3.	Interpretación integrada de los resultados.....	90
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN		91
CONCLUSIONES		101
RECOMENDACIONES.....		103
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1a. Absorbancia (405 nm) del grupo experimental – <i>L. acidophilus</i> 10 ⁶ UFC/ml (n = 8).....	65
Tabla 1b. Absorbancia (405 nm) del grupo experimental – <i>L. acidophilus</i> 10 ⁷ UFC/ml (n = 8).....	67
Tabla 1c. Absorbancia (405 nm) del grupo experimental – <i>L. acidophilus</i> 10 ⁸ UFC/ml (n = 8).....	68
Tabla 2. Resumen estadístico del grupo experimental: promedio, DE, CV%, mediana y valores extremos por concentración y tiempo (n = 8).	70
Tabla 3. Cálculo de la actividad enzimática del extracto crudo de β-glucuronidasa (U/ml) por concentración de <i>L. acidophilus</i> y tiempo de interacción.....	72
Tabla 4. Grupos control del ensayo de actividad enzimática (n=8).	74
Tabla 5. Absorbancia (405 nm) de los grupos control del ensayo de actividad enzimática (n = 8).....	75
Tabla 6. Valores de absorbancia (405 nm) de las soluciones estándar de p-Nitrofenol (PNP) a distintas concentraciones (n=3).	78
Tabla 7. Cálculo de la concentración del cultivo stock de <i>L. acidophilus</i> por el método de recuento en placa	80
Tabla 8. Preparación de suspensiones experimentales de <i>L. acidophilus</i> a tres concentraciones.	81
Tabla 9. Prueba de Kruskal-Wallis: estadístico H, sumas de rangos y p-valor por tiempo	83
Tabla 10. Prueba de Mann-Whitney U: C+ vs cada concentración experimental.....	85
Tabla 11. Prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de las tres concentraciones de <i>L. acidophilus</i> en cada tiempo de interacción.....	87
Tabla 12. Prueba de Mann-Whitney U: comparación del control positivo versus cada grupo experimental (todos los tiempos agrupados).	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución temporal de la absorbancia del grupo experimental por concentración de <i>L. acidophilus</i> (medianas, n=8)	69
Figura 2. Absorbancia promedio de los grupos control (n=8).....	76
Figura 3. Curva estándar de p-Nitrofenol (rango lineal 0.1-0.5nM)	79
Figura 4. Análisis Kruskal-Wallis a t = 0.5 min.....	84
Figura 5. Suma de rangos – Mann Whitney C+ vs cada concentración (n C+ = 8, n exp = 56)	86

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia	114
Anexo 2. Probiótico en presentación de ampolla bebible	115
Anexo 3. Transfiriendo el contenido del probiótico a un tubo de ensayo estéril.	116
Anexo 4. Centrifugando muestra a 4000 rpm durante 5 minutos	117
Anexo 5. Descartando el sobrenadante al centrifugar el probiótico.	118
Anexo 6. Pellet luego de centrifugación de probiótico	119
Anexo 7. Tomando una asada del pellet del probiótico	120
Anexo 8. Realizando una siembra por 4 cuadrantes en placas con agar TSA sangre.	121
Anexo 9. Recipiente hermético con las placas inoculadas con muestra del pellet del probiótico centrifugado	122
Anexo 10. Incubando las placas inoculadas a 35 ± 2 °C durante 96 horas.	123
Anexo 11. Crecimiento <i>Lactobacillus acidophilus</i> en viales con agar BHI.	124
Anexo 12. Tomando una muestra del vial con <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i>	125
Anexo 13. Haciendo una siembra por suspensión en caldo BHI a partir del vial con <i>Lactobacillus acidophilus</i>	126
Anexo 14. Vista del microscopio de <i>Lactobacillus acidophilus</i> luego de tinción gram	127
Anexo 15. Transfiriendo 1 ml del cultivo en caldo BHI de <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> al tubo 10^{-1}	128
Anexo 16. Realizando la serie de diluciones sucesivas transfiriendo 1 ml de cada dilución al siguiente tubo, repitiendo el procedimiento hasta alcanzar la dilución 10^{-10}	129
Anexo 17. Depositando 100 µL de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10} en placas con agar PCA (Agar para recuento de placas) suplementado con TTC (Cloruro de 2,3,5- trifeniltetrazolio).	130

Anexo 18. Realizando cada siembra por extensión por triplicado	131
Anexo 19. Las placas en recipiente hermético para cumplir condiciones microaerófilas y posteriormente llevadas a incubar invertidas a 35 ± 2 °C durante 24 horas.	132
Anexo 20. Seleccionando placas cultivadas con diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10} con mayor crecimiento bacteriano para el análisis.	133
Anexo 21. Cepa de <i>Escherichia coli</i> ATC 25922 a activar	134
Anexo 22. Tubo de ensayo conteniendo caldo BHI inoculado con cepa de <i>Escherichia coli</i> previamente conservada en refrigeración	135
Anexo 23. Vial con <i>Escherichia coli</i> en agar BHI reactivado	136
Anexo 24. Agregando Tween 80 al matraz con EDTA para preparar la solución se encargará de debilitar y aumentar la permeabilidad de la membrana celular	137
Anexo 25. Pipeteo de buffer fosfato para disolver los componentes de la solución que se encargará de debilitar y aumentar la permeabilidad de la membrana celular	138
Anexo 26. Mezclando la solución de EDTA, Tween 80 y buffer fosfato hasta homogenizarla	139
Anexo 27. Distribuyendo la solución permeabilizadora en 6 tubos de ensayo con 10 ml de solución cada uno	140
Anexo 28. Inoculación y disolución de la bacteria <i>E. Coli</i> activo en cada uno de los tubos de ensayo.....	141
Anexo 29. Bacteria <i>E. Coli</i> disuelta.....	142
Anexo 30. Mezcla reservada a -4 °C durante 30 minutos.....	143
Anexo 31. Juntando el sobrenadante de la muestra centrifugada en un tubo estéril con tapa.....	144
Anexo 32. Tomando una muestra del extracto enzimático crudo.....	145
Anexo 33. Realizando siembras en 4 cuadrantes del extracto enzimático crudo en agar MacConkey	146
Anexo 34. Ausencia de crecimiento bacteriano en agar MacConkey (<i>E. Coli</i>) interpretado como pérdida de viabilidad celular, lo cual	

sugiere una posible alteración de la integridad celular, es decir lisis celular.	147
Anexo 35. Agregando buffer fosfato en una fiola de 100 ml para disolver el p-nitrofenol (PNP)	148
Anexo 36. Solución madre de 100 ml a 10 mM de p-nitrofenol	149
Anexo 37. Soluciones finales de 2 ml en las concentraciones de 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1 mM a partir de la solución madre	150
Anexo 38. Preparando las mezclas en tubos Eppendorf de 1.5 ml por triplicado.....	151
Anexo 39. Midiendo la absorbancia de las mezclas a una longitud de onda de 405 nm	152
Anexo 40. Espectrofotómetro UV-Visible, instrumento utilizado a 405 nm	153

ABREVIATURAS

GUS	β -glucuronidasa
PNPG	p-nitrofenil- β -D-glucurónido
PNP	p-nitrofenol
UFC	Unidades formadoras de colonia
BHI	Brain Heart Infusion (Infusión cerebro-corazón)
TSA	Tryptic Soy Agar (Trypticasa de Soja)
PCA + TTC	Plate Count Agar + Triphenyltetrazolium chloride (Agar para recuento de placas + Cloruro de Trifeniltetrazolio)
Abs	Absorbancia
DE	Desviación estándar
CV%	Coeficiente de variación
OD	Densidad óptica
NaOH	Hidróxido de sodio

RESUMEN

El microbioma intestinal influye significativamente en el metabolismo farmacológico a través de enzimas bacterianas como la β -glucuronidasa, capaz de revertir procesos hepáticos de desintoxicación y modificar la biodisponibilidad de diversos fármacos. Este trabajo evaluó in vitro el efecto de *Lactobacillus acidophilus* (obtenido de un probiótico) sobre la actividad de un extracto crudo de β -glucuronidasa aislado de *Escherichia coli* ATCC 25922, empleando permeabilización con EDTA/Tween 80. La actividad enzimática se cuantificó por espectrofotometría a 405 nm con PNPG como sustrato, en tres concentraciones bacterianas y siete tiempos de medición, con ocho réplicas por condición.

Los resultados mostraron que la absorbancia del sistema experimental fue consistentemente inferior al control positivo en todos los grupos, con diferencias estadísticamente significativas (Mann-Whitney, $p < 0.01$). Las variaciones entre concentraciones solo fueron detectables al tiempo inicial de 0.5 minutos (Kruskal-Wallis: $H = 8.923$; $p = 0.012$), sin evidencia de relación dosis-respuesta en tiempos posteriores. Se concluye que *L. acidophilus* reduce la señal enzimática de la β -glucuronidasa frente a PNPG en condiciones in vitro, con posibles implicaciones en la modulación del ciclo enterohepático de ciertos medicamentos.

Palabras clave: *Lactobacillus acidophilus*, β -glucuronidasa, extracto enzimático crudo, PNPG, actividad enzimática, microbioma intestinal, metabolismo de fármacos, probióticos, ensayo in vitro.

ABSTRACT

The gut microbiome significantly influences drug metabolism through bacterial enzymes such as β -glucuronidase, which can reverse hepatic detoxification processes and modify the bioavailability of various drugs. This study evaluated in vitro the effect of *Lactobacillus acidophilus* (obtained from a probiotic) on the activity of a crude β -glucuronidase extract isolated from *Escherichia coli* ATCC 25922, using EDTA/Tween 80 permeabilization. Enzyme activity was quantified by spectrophotometry at 405 nm with PNPG as a substrate, in three bacterial measurements and seven measurement times, with eight replicates per condition.

The results showed that the absorbance of the experimental system was consistently lower than the positive control in all groups, with statistically significant differences (Mann-Whitney, $p < 0.01$). The variations in concentration were only detectable at the initial time of 0.5 minutes (Kruskal-Wallis: $H = 8.923$; $p = 0.012$), with no evidence of a dose-response relationship at subsequent time points. It is concluded that *L. acidophilus* reduces the β -glucuronidase enzyme signal against PNPG under in vitro conditions, with potential implications for the modulation of the enterohepatic circulation of certain drugs.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*, β -glucuronidase, crude enzyme extract, PNPG, enzyme activity, gut microbiome, drug metabolism, probiotics, in vitro assay.

INTRODUCCIÓN

En los últimos veinte años, los científicos se han interesado mucho más en cómo el microbioma intestinal afecta la salud humana, especialmente la salud del sistema digestivo. Actualmente, hay suficientes pruebas para confirmar que los microorganismos que viven en el sistema digestivo hacen más que simplemente descomponer los alimentos; ayudan activamente a producir vitaminas, regulan el sistema inmunológico y protegen contra gérmenes dañinos. Sin embargo, factores como tomar antibióticos durante mucho tiempo, tener enfermedades gastrointestinales o experimentar cambios metabólicos pueden afectar este equilibrio microbiano. En este contexto, los probióticos aparecen como una alternativa de tratamiento que tiene gran importancia. La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) consideran que los probióticos son microorganismos vivos que, si se ingieren en cantidades correctas, ofrecen un beneficio evidente para la salud del individuo o animal que los ingiere. Gracias a esta característica, estos microorganismos están ganando popularidad como una forma de modificar el microbioma intestinal, contribuyendo a mejorar la salud y evitar numerosas enfermedades.(1) El interés científico en los probióticos ha crecido exponencialmente en la última década, impulsado por el desarrollo de técnicas de secuenciación de nueva generación que han permitido caracterizar con mayor precisión el microbioma intestinal y su relación con la salud humana.(2)

Actualmente, los probióticos son ampliamente utilizados como suplementos dietéticos y alimentos funcionales. Diversos ensayos clínicos y metaanálisis respaldan su utilidad en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas no transmisibles, como la diabetes mellitus tipo 2,

el hipercolesterolemia, la hipertensión arterial e incluso algunos tipos de cáncer. (3) En contraste, el uso de antibióticos, aunque fundamental para el tratamiento de infecciones, no distingue entre bacterias patógenas y comensales, lo que puede alterar significativamente tanto la variedad como el funcionamiento de los microorganismos que habitan el intestino. (4) La perturbación del microbioma por antibióticos puede persistir semanas o meses, y en algunos casos los cambios en la composición microbiana no se revierten completamente incluso tras la finalización del tratamiento. (5)

El microbiota intestinal constituye un sistema sumamente complejo y variado que alberga una cantidad de microorganismos que supera en número a las células del cuerpo humano. Esta comunidad microbiana ha sido identificada como un agente ambiental clave que influye en múltiples aspectos fisiológicos del huésped. (6) Estudios recientes destacan su capacidad para metabolizar directamente diversos fármacos o, indirectamente, modificar su metabolismo mediante interacciones multidimensionales con el organismo, lo cual afecta éxito del tratamiento y que aparezcan reacciones no deseadas. (7) La variabilidad interindividual en la respuesta a medicamentos puede explicarse en parte por diferencias en la composición del microbioma intestinal, que determina el perfil de actividad enzimática disponible para metabolizar xenobióticos. (8)

Los probióticos administrados por vía oral modifican la composición del microbiota intestinal y las actividades enzimáticas. Por lo tanto, la coadministración de probióticos con fármacos puede provocar cambios en los parámetros farmacocinéticos de los fármacos. (9)

Se sabe que el microbiota intestinal produce una variedad de enzimas capaces de metabolizar nutrientes y fármacos, lo que podría alterar la estructura del compuesto original y la posterior difusión de membrana, el transporte activo al torrente sanguíneo y/o la eficacia. (2)

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

El microbiota intestinal desempeña un papel crucial en la salud humana, no solo en términos de digestión y homeostasis inmunológica, sino también en la modulación de la actividad enzimática que puede influir en procesos patológicos y en la respuesta farmacológica individual. Entre las enzimas microbianas de mayor interés biomédico se encuentra la β -glucuronidasa, producida principalmente por bacterias intestinales gramnegativas como *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Bacteroides fragilis*. Esta enzima revierte los procesos de detoxificación hepática mediante la hidrólisis de conjugados glucurónidos, liberando compuestos potencialmente tóxicos, mutagénicos o cancerígenos en el lumen intestinal, con consecuencias directas sobre la biodisponibilidad y toxicidad de numerosos fármacos.

Niveles elevados de actividad de β -glucuronidasa se han asociado con mayor incidencia de inflamación intestinal, disbiosis y cáncer colorrectal. De hecho, su actividad fecal elevada ha sido propuesta como biomarcador de riesgo oncológico, dado que facilita la reactivación de carcinógenos dietéticos y metabolitos de fármacos con potencial genotóxico. Por tanto, la modulación de esta enzima representa una estrategia potencialmente preventiva y terapéutica de considerable interés clínico, especialmente a través del uso de probióticos.

En este contexto, *Lactobacillus acidophilus*, uno de los probióticos más empleados en formulaciones comerciales, ha demostrado múltiples efectos beneficiosos sobre el microbiota intestinal y su metabolismo. Sin embargo, existe escasa evidencia experimental directa sobre su efecto específico en la actividad de la β -glucuronidasa obtenida de un extracto enzimático crudo en condiciones in vitro controladas. El uso del extracto crudo —en contraposición a la enzima comercialmente purificada— ofrece una aproximación más representativa del ambiente intestinal real, al conservar las condiciones proteicas y de la matriz bacteriana que podrían influir en la interacción con el probiótico.

Esta problemática adquiere especial relevancia en el Perú, donde el consumo de probióticos comerciales coexiste con el uso sin prescripción de fármacos glucuronidados como el diclofenaco. Purdel et al. (2023) documentaron que los probióticos pueden influir sobre la farmacocinética de fármacos precisamente a través de la modulación de enzimas microbianas como la β -glucuronidasa, generando interacciones clínicamente relevantes que frecuentemente no son reconocidas ni por el paciente ni por el profesional de salud.

Actualmente, se desconoce si *Lactobacillus acidophilus*, en concentraciones propias de suplementos comerciales ampliamente disponibles en farmacias peruanas sin prescripción médica, es capaz de modificar la actividad de esta enzima sobre sus sustratos específicos. Esta brecha científica limita la implementación de estrategias seguras para el uso concomitante de probióticos y medicamentos metabolizados por β -glucuronidasa en la población peruana, y constituye el punto de partida del presente estudio.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1. Problema principal

¿Cómo influye in vitro el *Lactobacillus acidophilus* en la actividad del extracto enzimático crudo de β -glucuronidasa?

1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuál es la actividad enzimática basal del extracto crudo de β -glucuronidasa obtenido de *Escherichia coli* ATCC 25922 bajo condiciones in vitro controladas?
- ¿Cómo varía la actividad del extracto crudo de β -glucuronidasa a lo largo del tiempo de interacción con *L. acidophilus*?
- ¿Cómo la presencia de *L. acidophilus* a diferentes concentraciones modula la actividad del extracto crudo de β -glucuronidasa?

1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

La β -glucuronidasa es una enzima clave en la desconjugación de metabolitos de fármacos, y su actividad puede influir significativamente en la biodisponibilidad, eficacia y toxicidad de numerosos medicamentos de uso frecuente. En este contexto, *Lactobacillus acidophilus*, un probiótico ampliamente utilizado, ha demostrado la capacidad de modular funciones enzimáticas intestinales, incluida la β -glucuronidasa. La relevancia clínica de modular la β -glucuronidasa intestinal se fundamenta en que su actividad determina la magnitud de la reabsorción entero-hepática de fármacos glucuronidados, con consecuencias directas sobre la

biodisponibilidad, la eficacia y el perfil de toxicidad de medicamentos de amplio uso clínico. (10) Evaluar in vitro esta interacción mediante un extracto enzimático crudo resulta particularmente importante, debido a que permite aproximarse a las situaciones bioquímicas reales del intestino con mayor fidelidad que el uso de enzimas purificadas.

Este estudio aportará evidencia experimental sobre los posibles efectos —inhibitorios o estimulantes— del uso concomitante de probióticos y medicamentos metabolizados por β -glucuronidasa. Generará además bases experimentales para optimizar terapias farmacológicas, prevenir reacciones adversas derivadas de la desconjugación intestinal no deseada, y diseñar estrategias coadyuvantes desde la perspectiva del microbioma intestinal con aplicación clínica.

1.4. ALCANCES Y LIMITACIONES

En este trabajo se evaluará la influencia de *L. acidophilus* sobre la actividad de β -glucuronidasa obtenida mediante extracto enzimático crudo de *Escherichia coli* ATCC 25922, empleando PNPG como sustrato específico y espectrofotometría a 405 nm como método de cuantificación. El estudio se restringe a un modelo in vitro controlado, sin incluir modelos animales, modelos intestinales ex vivo. No se analizarán otras enzimas del metabolismo de fármacos ni rutas de biotransformación hepática o renal.

Entre las principales limitaciones se reconoce que el extracto crudo enzimático puede contener otras proteínas bacterianas que interfieran en la reacción, y que la turbidez de las suspensiones bacterianas puede generar señal óptica inespecífica a 405 nm —

efecto reconocido como dispersión de Rayleigh—. Además, las condiciones in vitro no replican completamente el ambiente dinámico del intestino, por lo que los resultados deben interpretarse como evidencia preliminar.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. Objetivo general

Evaluar in vitro la influencia de *Lactobacillus acidophilus* sobre la actividad del extracto enzimático crudo de β -glucuronidasa.

1.5.2. Objetivos específicos

- Determinar la actividad enzimática basal del extracto crudo de β -glucuronidasa de *Escherichia coli* ATCC 25922 en condiciones experimentales controladas.
- Determinar la actividad del extracto crudo de β -glucuronidasa a diferentes tiempos de interacción con *L. acidophilus*.
- Determinar el efecto de diferentes concentraciones de *L. acidophilus* sobre la actividad del extracto crudo de β -glucuronidasa.

1.6. HIPÓTESIS

1.6.1. Hipótesis general

La presencia in vitro de *Lactobacillus acidophilus* modifica la actividad del extracto enzimático crudo de β -glucuronidasa.

1.6.2. Hipótesis Específicas

- El extracto crudo de β -glucuronidasa obtenido de *Escherichia coli* ATCC 25922 presenta actividad enzimática detectable en condiciones experimentales controladas.
- El tiempo de interacción entre *L. acidophilus* y el extracto crudo de β -glucuronidasa influye en la actividad enzimática registrada a lo largo de los intervalos evaluados.
- La presencia de *L. acidophilus* a diferentes concentraciones genera cambios en la actividad del extracto crudo de β -glucuronidasa.

1.7. VARIABLES

1.7.1. Variable Independiente

Presencia de *Lactobacillus acidophilus*

1.7.2. Variable Dependiente

Actividad enzimática del extracto crudo de β -glucuronidasa obtenido de *Escherichia coli* ATCC 25922

1.7.3. Indicadores

Indicadores de la variable independiente:

- Ausencia de *Lactobacillus acidophilus*
- Presencia de *Lactobacillus acidophilus* en cultivo
- Presencia de sobrenadante (metabolitos extracelulares)

Indicadores de la variable dependiente:

- Concentración de p-nitrofenol liberado (μmol)
- Absorbancia a 405nm (espectrofotometría)
- Unidades enzimáticas (U/ml) = μmol de producto / min / m de muestra
- Porcentaje de variación respecto al control

1.7.4. Definición operacional de las variables

Variable		Definición	Dimensión	Indicador	Escala
Variable Independiente	Presencia de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Microorganismo probiótico vivo que, al ser administrado en cantidades adecuadas, confiere un beneficio para la salud del huésped (11)	Concentración bacteriana del inóculo	UFC/ml	De razón
			Tiempo de interacción	0.5, 1, 2, 5, 10, 20 y 30 min	De razón
Variable Dependiente	Actividad enzimática del extracto crudo de β -glucuronidasa obtenido de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Enzima microbiana intestinal que cataliza la hidrólisis de glucurónidos liberando las agliconas correspondientes, revirtiendo la glucuronidación hepática de fase II e influyendo en la disposición de fármacos y compuestos endógenos (12)	Producción de PNP	Absorbancia medida a 405 nm	Intervalo
			Actividad enzimática neta	Cantidad de μmol de PNP liberado (U/ml)	De razón
			Integridad del extracto crudo	Ausencia de crecimiento en agar MacConkey tras permeabilización con EDTA/Tween 80	Nominal dicotómica

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DE ESTUDIO

2.1.1. A nivel internacional

Song Gao y colaboradores (2022), en su investigación desarrollada en Estados Unidos, destacan en su artículo titulado **“The role of gut microbial β -glucuronidase in drug disposition and development”**, que la β -glucuronidasa influye significativamente en la disposición de fármacos y compuestos endógenos. Identificaron diversos inhibidores potenciales y proponen a esta enzima como diana terapéutica, aunque advierten que aún se requieren estudios en humanos para validar estos efectos y comprender posibles implicancias sobre la homeostasis del huésped. (13)

Mahdy Marwa S. y colaboradores (2023), en su investigación desarrollada en Egipto, destacan en su artículo titulado **“Irinotecan-gut microbiota interactions and the capability of probiotics to mitigate Irinotecan-associated toxicity”**, evaluaron in vitro el efecto de *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *L. rhamnosus*, en forma individual y mixta, sobre la expresión del gen de β -glucuronidasa de *E. coli*. La mezcla de *Lactobacillus* spp. alivió significativamente la diarrea inducida por irinotecán en modelos murinos mediante la reducción tanto

de la expresión de β -glucuronidasa como del estrés oxidativo, protegiendo además el epitelio intestinal contra la disbiosis.(14)

Rinse K Weersma y colaboradores (2020), en su investigación desarrollada en Países Bajos, destacan en su artículo titulado **“Interaction between drugs and the gut microbiome”**, que el microbioma intestinal humano no solo se ve afectado por los medicamentos, sino que también puede modificar la forma en que los medicamentos actúan en el cuerpo, alterando su eficacia, toxicidad y biodisponibilidad. Además, el microbioma puede influir en la respuesta a tratamientos como la inmunoterapia contra el cáncer. Comprender estas interacciones bidireccionales es clave para desarrollar estrategias que permitan modular el microbioma y así mejorar los resultados terapéuticos en distintas enfermedades.(15)

Ifeoma Julieth Dikeocha y colaboradores (2022), en su investigación desarrollada en Malasia, destacan en su artículo titulado **“Pharmacomicrobiomics: Influence of gut microbiota on drug and xenobiotic metabolism”**, que la interacción entre medicamentos y microbiota intestinal es bidireccional, compleja y aún poco comprendida, pero clave para la respuesta clínica en humanos. Además, destacan que el microbiota puede transformar estas sustancias, modificando su eficacia y toxicidad.(16)

Ebuzoeme Christabel y colaboradores (2021), investigación desarrollada en Estados Unidos, en su artículo

"Glucuronides Hydrolysis by Intestinal Microbial β -Glucuronidases (GUS) Is Affected by Sampling, Enzyme Preparation, Buffer pH, and Species", evaluaron sistemáticamente cómo las condiciones experimentales afectan la hidrólisis de glucurónidos por GUS microbiana intestinal. Demostraron que el tiempo de colección de muestras, el tipo de preparación del extracto enzimático, el pH del buffer y las diferencias entre especies afectan significativamente la actividad GUS medida, siendo la sonicación el método que proporcionó mayor rendimiento enzimático. Emplearon PNPG como sustrato de referencia y cuantificaron la actividad a 405 nm, validando metodológicamente el sistema experimental empleado en el presente trabajo.(17)

Carmen Purdel y colaboradores (2023), en su investigación desarrollada en Rumanía, destacan en su artículo titulado **"Exploring the potential impact of probiotic use on drug metabolism and efficacy"**, que los probióticos pueden modificar la forma en que se absorben y procesan los fármacos, afectando su biodisponibilidad. Estos efectos pueden darse por distintos mecanismos: cambios en el pH intestinal por producción de ácidos grasos de cadena corta, alteración del tiempo de tránsito intestinal o del grosor de la mucosa, modificación de transportadores intestinales, alteración de la microbiota, regulación de enzimas microbianas y uso de fármacos como fuente de nutrientes para el crecimiento bacteriano.(18)

Mego M. y colaboradores (2024), investigación desarrollada en Eslovaquia, en su ensayo clínico fase III titulado **"The beneficial effect of probiotics in the prevention of irinotecan-induced diarrhea in colorectal cancer patients with colostomy"**, publicado en *Frontiers in Oncology*, evaluaron el efecto de la suplementación probiótica en 279 pacientes con cáncer colorrectal bajo terapia con irinotecán. Demostraron que los probióticos redujeron significativamente la incidencia de diarrea severa mediante la disminución de la actividad de β -D-glucuronidasa intestinal, confirmando en un modelo clínico el mecanismo que el presente estudio explora in vitro.(19)

Gerard Clarke y colaboradores (2018), en una investigación desarrollada en Irlanda, destacan en su artículo titulado **"Drug-gut microbiota interactions: implications for neuropharmacology"**, que el uso de probióticos pueden influir en la farmacocinética de los fármacos al modular la microbiota intestinal y su actividad enzimática, Estudios posteriores han demostrado que *Lactobacillus acidophilus* altera la absorción de glicazida y sulfasalazina, mientras que otras cepas, como *L. reuteri*, reducen la actividad de la enzima β -glucuronidasa, enzima clave en el metabolismo de fármacos como el paracetamol. (20)

2.1.2. A nivel nacional

Juan Miguel del Águila Cortijo y colaboradores (2015), en su tesis **"Evaluación de los hidrolizados de *Chenopodium***

quinoa wildnow* (quinua) *Hordeum vulgare* (cebada) y *Glycine max* (soya) como sustrato beneficioso para la preparación de un producto nutracéutico a base de *Lactobacillus acidophilus”, mencionan la capacidad del *Lactobacillus acidophilus* para reducir la actividad de la enzima β -glucuronidasa en animales y humanos, que podría disminuir la conversión de compuesto procarcinógenos a carcinógenos. (21)

En el Perú existen pocos estudios que aborden directamente la β -glucuronidasa intestinal. La mayoría están vinculados a la salud digestiva, estudios de microbiota fecal, o efectos adversos de fármacos.

Hasta la fecha, no se ha reportado literatura indexada estudios en Tacna sobre:

- Actividad de β -glucuronidasa
- Efectos de *Lactobacillus acidophilus* sobre enzimas intestinales
- Aplicación de ensayos enzimáticos en sistemas in vitro.

Este vacío respalda la importancia del proyecto, permitiendo abrir una línea de investigación relevante tanto en microbiología básica como en farmacología experimental en la región.

2.2. BASES TEÓRICAS

2.1.1. Probióticos

2.1.1.1. Definición

La Organización Mundial de la Salud para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso denominar a los probióticos como "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio de salud al hospedero". Este concepto fue propuesto y posteriormente ratificado un año después por las mismas instituciones, a través de una guía propuesta por un grupo de trabajo para orientar respecto al documento original.(22)

Desde entonces, según la base de datos PubMed, hasta 2014 se habían indexado más de 8 000 artículos de investigación que utilizaron el término probiótico. En los últimos años, ha aumentado exponencialmente afán en el tema y los mecanismos para establecer evidencia estadística y científica han progresado rápidamente, lo que ha posibilitado el desarrollo de una gran cantidad de productos probióticos con mayor respaldo"). Desafortunadamente, de forma simultánea, ha crecido un desmesurado interés comercial en el tema, aunado a las publicaciones sobre probióticos sin mayor respaldo científico en los medios y en Internet, contribuyendo de esa manera al uso erróneo del concepto y a etiquetar productos "con probióticos" que carecen de los criterios para ser considerados como tales,

promoviendo cuestionables y engañosos beneficios de salud en esos productos,(22)

Ante esa situación, la International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) pudo organizar en 2013 una reunión de especialistas clínicos y científicos sobre el tema (grupo de profesionales de diversas especialidades clínicas y de investigación) para reexaminar el concepto de probióticos y contribuir a su legitimación, grupo que incluyó a los participantes de los paneles de expertos originales organizados por FAO/OMS en 2001 y 2002".(22)

El concepto tuvo en este cónclave una modificación semántica (probablemente más evidente en el idioma inglés) y en castellano quedó como: "microorganismos vivos que, cuando se administran en dosis adecuadas, confieren un beneficio de salud al hospedero", captando la esencia de los probióticos: agente microbiano, con viabilidad y beneficioso para la salud. (22)

2.1.1.2. Características

Para considerar el uso de un microorganismo como probiótico, debe evaluar varias características funcionales, técnicas y de seguridad.

Requisitos de seguridad para seleccionar un probiótico:

- Las cepas utilizadas en humanos deberían proceder idealmente de seres humanos (aislados de una persona sana).
- Históricamente no es patogénico.
- No tiene antecedentes de enfermedades gastrointestinales ni de otro tipo.
- No deben llevar genes de resistencia a los antibióticos que puedan transmitirse a otras bacterias. (22)

Características funcionales que un probiótico debe poseer:

Capacidad de resistir las sales biliares y enzimas digestivas del páncreas (un rasgo clave de supervivencia en Intestino delgado).

- Resistencia a las enzimas ácidas y gástricas.
- Apegado al revestimiento del intestino y viviendo brevemente allí.
- Puede desencadenar el sistema inmunológico sin causar inflamación.
- Actividad antagónica frente a patógenos.
- Preferiblemente anticanceroso y propiedades antimutagénicas.(22)

La resistencia al pH gástrico y a las sales biliares, así como la capacidad de adherencia al epitelio intestinal, son características evaluadas mediante protocolos estandarizados in

vitro antes de que una cepa pueda ser considerada probiótica para uso clínico.(6)

Consideraciones tecnológicas en la formulación de un probiótico:

- Debe contribuir favorablemente a las características organolépticas del producto, tales como el sabor y la textura.
- Capacidad de resistencia frente a bacteriófagos.
- Conservación de la viabilidad celular durante las etapas de procesamiento tecnológico.
- Estabilidad sostenida tanto en el producto terminado como a lo largo del período de almacenamiento.(22)

2.1.1.3. Lista de microorganismos considerados “probióticos”

De acuerdo con la definición actualmente vigente, existe un amplio conjunto de especies que comprenden cepas susceptibles de ser catalogadas como portadoras de propiedades probióticas. La mayor parte de las especies propuestas con dicha condición corresponden al grupo de las bacterias ácido lácticas, destacándose de manera particular los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Especies del género *Lactobacillus*.

- *Lactobacillus acidophilus*
- *Lactobacillus amylovorus*
- *Lactobacillus casei*

- *Lactobacillus johnsonii*
- *Lactobacillus paracasei*
- *Lactobacillus reuteri*
- *Lactobacillus rhamnosus*

Especies del género Bifidobacterium.

- *Bifidobacterium adolescentes*
- *Bifidobacterium animalis*
- *Bifidobacterium bifidum*
- *Bifidobacterium breve*
- *Bifidobacterium infantis*

Otras bacterias de carácter ácido láctico.

- *Enterococcus faecalis*
- *Enterococcus faecium*
- *Lactococcus lactis*
- *Leuconostoc mesenteroides*
- *Pediococcus acidilactici*

Microorganismos que no pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas.

- *Bacillus cereus* variedad *toyoi*
- *Escherichia coli* cepa Nissle
- *Propionibacterium freudenreichii*
- *Saccharomyces cerevisiae*

2.1.1.4. Efectos generales de los probióticos

- Ayudan al buen funcionamiento del sistema inmunitario.
- Ayudan en la digestión. Descomponen algunos alimentos que no se digieren bien.
- Controlan microorganismos peligrosos o potencialmente patógenos.
- Producen vitaminas y facilitan la absorción de nutrientes.

Además, algunos pueden:

- Disminuir el riesgo de diarrea asociada con antibióticos.
- Combatir la diarrea infecciosa.
- Disminuir el riesgo/duración de infecciones comunes (gastrointestinales, respiratorias, vaginales).
- Favorecer la digestión de la lactosa.
- Reducir los síntomas de cólico y eccema en los lactantes.
- Ayudar en el tratamiento de molestias digestivas.(22)
-

2.1.1.5. Mecanismo de acción

Los efectos demostrados de los probióticos han sido un principio fundamental de los avances científicos durante décadas. Ciertamente, algunos mecanismos de acción más importantes están presentes en solo unas pocas cepas probióticas, y muchos de estos mecanismos son diversos, heterogéneos y dependen de cada cepa. Sin embargo, los

avances científicos ahora revelan similitudes entre los miembros de algunos grupos taxonómicos de probióticos. Es probable que los beneficios clínicos se deriven de estos mecanismos compartidos, lo que sugiere que existen efectos probióticos específicos de subespecies, específicos de especie o específicos de género. Los ensayos en humanos son necesarios para confirmar los beneficios de salud específicos.(22)

Más concretamente, a continuación, se resumen los principales mecanismos:

- Aumento de la barrera epitelial
- Aumento de la adhesión a la mucosa intestinal
- Inhibición concomitante de la adhesión a los patógenos
- Producción de sustancias antimicrobianas o bacterioquinas
- Modulación de la respuesta inmune

Además de los mecanismos clásicos descritos, estudios recientes han identificado que los probióticos pueden modular directamente la actividad de enzimas bacterianas intestinales, incluyendo la β -glucuronidasa, la nitrorreductasa y la azorreductasa, con consecuencias sobre el metabolismo de fármacos y xenobióticos. (18)

Aumento de la barrera epitelial

El revestimiento que recubre el intestino se encuentra en exposición permanente tanto al contenido luminal como a la

microbiota intestinal residente. La barrera intestinal constituye un mecanismo de defensa de carácter primordial, cuyo funcionamiento se sustenta en la integridad estructural del epitelio intestinal como elemento protector del organismo frente a agentes de origen externo. Los componentes defensivos de dicha barrera comprenden la capa mucosa, los péptidos de naturaleza antimicrobiana, la inmunoglobulina A secretora (IgA) y el complejo de proteínas de unión localizado en las uniones epiteliales. Cuando la funcionalidad de esta barrera se ve comprometida, microorganismos bacterianos y proteínas de procedencia alimentaria pueden traspasar hacia la submucosa, desencadenando procesos inflamatorios que dan origen a diversas alteraciones intestinales, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal, las alergias a las proteínas de la leche de vaca y un amplio espectro de reacciones de hipersensibilidad.

Diversas investigaciones científicas sugieren que el fortalecimiento de la expresión génica vinculada a la señalización de las uniones estrechas podría representar una estrategia viable para optimizar la integridad de la barrera intestinal. En este sentido, microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus* han demostrado capacidad para modular la regulación de múltiples genes implicados en la síntesis de proteínas de unión, entre las que se destacan la E-cadherina y la β -catenina.(22)

Mejor adhesión a la mucosa intestinal

Uno de los beneficios más importantes que los probióticos deben tener es la capacidad de adherirse al revestimiento del intestino, que es necesario para colonizar e interactuar con el huésped. Seguir un plan es clave para controlar el sistema inmunitario y evitar que se combata a los gérmenes. Por lo tanto, el acceso se ha convertido en un paso requerido para las nuevas cepas probióticas que están surgiendo hoy y son muy beneficiosos. Muchos probióticos, especialmente lactobacilos y bifidobacterias, tienen varias partes superficiales que se adhieren a células de epitelio intestinal (CID) y células mucosas. Las células epiteliales pueden producir moco, una sustancia espesa que contiene glicoproteínas para proteger contra bacterias patógenas al impedir que se peguen.

Como se mencionó anteriormente, las cepas *Lactobacillus* tienen la capacidad especial de promover la adhesión, particularmente *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus rhamnosus* GG. Estas bacterias secretan adhesivos para unirse a la capa de moco, junto con proteínas, utilizando ácido lipoteicoico. Algunos estudios indican que las cepas de *Bifidobacterium animalis* e *infantis* están implicadas en proteínas superficiales que interactúan con plasminógenos o enterocitos humanos. Estas proteínas pueden ayudar a que las bacterias se instalen en el intestino humano al descomponer la capa externa de la célula o al ayudarles a acercarse al revestimiento intestinal.

Los probióticos pueden causar alteraciones en las mucinas intestinales por su capacidad para inducir la liberación de defensinas a partir de las células epiteliales, bloqueando de esta manera la unión al patógeno. La adhesión es una de las particularidades determinantes que tienen algunas cepas probióticas; el caso concreto de *Lactobacillus rhamnosus* GG, que presenta mayor adhesión a las células de la mucosa que otras cepas de lactobacilos, está mediada por una proteína adhesiva *L. rhamnosus* GG -0186 y la expresión de exopolisacáridos, que ayudan en la respuesta conjunta de protección frente a las lisis mediadas por el complemento. (22)

Competencia por microorganismos patógenos

Las bacterias probióticas pueden combatir las bacterias dañinas de varias maneras, como reducir el pH en el intestino, bloquear su capacidad para pegarse (competitividad), impedir que se muevan a los tejidos o producir sustancias y defensas antibacterianas. Una forma en que la microbiota intestinal impide que las bacterias dañinas se hagan cargo es creando un entorno duro que limite el pH, el potencial redox y la creación de sulfuro de hidrógeno. Las propiedades de las bacterias que pueden crear un ambiente fisiológicamente restrictivo son típicas de los probióticos. Esta propiedad documentada por Greenberg en 1969 como "exclusión competitiva", lo que significa que una bacteria puede competir por el receptor encontrado en la célula intraepitelial (ICN). Hay muchas maneras de trabajar los probióticos, como se describe en la literatura, incluyendo el

fortalecimiento de la microbiota intestinal, tomar el control de los sitios receptores bacterianos, producir sustancias antimicrobianas, y agotar nutrientes esenciales a través de la competencia.

Las características concretas de adherencia que se forman cuando las proteínas de la superficie entran en contacto con las mucinas pueden evitar que las bacterias patógenas colonicen y son el resultado de algunas cepas probióticas que impiden la capacidad de los patógenos gastrointestinales para adherirse. Se ha demostrado que los lactobacilos y las bifidobacterias impiden la unión de una amplia gama de patógenos, entre ellos *E. coli*, *Salmonella*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes* y Rotavirus. En consecuencia, las investigaciones de laboratorio han evidenciado que son capaces de frenar con eficacia el desarrollo de otras bacterias dañinas como *Shigella*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Staphylococcus*, *Yersinia*, *Salmonella enteritidis* y varias especies de *Clostridium perfringens*. El ácido acético y el ácido láctico son ejemplos de sustancias antimicrobianas que se generan como parte de esta transformación ambiental. Unos pocos bifidobacterias y lactobacilos tienen la capacidad de unirse a los mismos carbohidratos que ciertas bacterias intestinales nocivas. Esto permite que estas cepas compitan con los patógenos por los espacios receptores en las células huésped.(22)

Producción de sustancias antimicrobianas o bacteriocinas

Un enfoque que se ha sugerido relacionado a favor de salud de los probióticos señala que los compuestos antimicrobianos son factores fundamentales en la microbiota. Los lactobacilos, bifidobacterias y la levadura del tipo *Saccharomyces boulardii* son capaces de generar péptidos antimicrobianos, conocidos como bacteriocinas.

Las bacteriocinas son caracterizadas como moléculas de naturaleza catiónica y de reducido tamaño, compuestas por entre 30 y 60 aminoácidos, cuyo mecanismo de acción consiste en interactuar con las membranas de las células bacterianas y comprometer sus vesículas energéticas, ocasionando de este modo la interrupción del gradiente protónico. Dichas moléculas pueden clasificarse en cuatro categorías principales, atendiendo a criterios como su peso molecular, las modificaciones postraduccionales que experimentan y sus características de naturaleza genética. Particularmente, se ha documentado que determinados compuestos sintetizados por *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus acidophilus* ejercen una acción inhibitoria sobre el desarrollo de microorganismos como *Helicobacter*, *Clostridium difficile*, rotavirus, *Shigella* y *Escherichia coli* en diversas patologías del aparato digestivo, manifestando además eficacia frente a múltiples uropatógenos.

Las bacterias grampositivas hacen bacteriocinas. Estas bacteriocinas tienen un rango de acción limitado. Las bacterias grampositivas usan esas bacteriocinas contra bacterias que se

parecen mucho a ellas. Algunas bacteriocinas también atacan a patógenos que aparecen en la comida. Las bacteriocinas rompen la célula objetivo formando agujeros en la membrana y detienen la fabricación de la pared celular.

La exclusión competitiva de los microorganismos patógenos se basa en tres cosas. Primero, bajamos el pH intraluminal. Segundo, competimos con los microorganismos patógenos por los sustratos nutritivos. Tercero, producimos bacteriocinas o compuestos parecidos. El ácido láctico y el ácido acético, que son ácidos orgánicos, inhiben a las bacterias gramnegativas. Asimismo, estos ácidos son los principales elementos antimicrobianos que respaldan la habilidad de los probióticos para antagonizar a los agentes patógenos. Asimismo, la actividad enzimática desplegada por los probióticos en el entorno intestinal puede desempeñar una función determinante dentro de sus mecanismos de acción. Se ha documentado que muchas cepas probióticas tienen más de 20 actividades enzimáticas distintas. La β -galactosidasa es la que aparece con más frecuencia.

Otra cosa que hacen es sintetizar ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Son ácidos grasos saturados y tienen entre 1 y 6 átomos de carbono. Predominan como productos metabólicos en la fermentación de la fibra dietética en el colon. Se calcula que en el colon se generan alrededor de 500 a 600 mmol de AGCC al día. Esa cantidad varía según la cantidad de fibra que haya en la dieta. El acetato (C2), el propionato (C3) y el butirato (C4) son los AGCC presentes en mayor concentración

en el organismo humano y constituyen los aniones predominantes en el entorno colónico. En términos funcionales, estos compuestos representan una fuente energética de carácter esencial para las células epiteliales intestinales, actuando simultáneamente como moléculas señalizadoras de relevancia en la promoción de la homeostasis intestinal. Diversos probióticos, en conjunto con determinadas levaduras, poseen la capacidad de sintetizar principalmente butirato, ácido propiónico y ácido acético, lo que contribuye a la reducción del pH en el lumen intestinal y favorece el fortalecimiento de los mecanismos de competencia frente a microorganismos patógenos.(22)

Los ácidos grasos de cadena corta producidos por lactobacilos, especialmente el butirato y el propionato, no solo reducen el pH intraluminal sino que también regulan la expresión génica de enzimas microbianas mediante modificaciones epigenéticas en bacterias productoras de GUS. (23)

Inmunomodulación

El organismo emplea los probióticos a través de la inmunomodulación. Hay pruebas fehacientes de que los probióticos pueden alterar la respuesta inmunitaria intestinal. Además, pueden alterar la respuesta inmunitaria del organismo en general. Las células que presentan antígenos son fundamentales en el proceso de la reacción inmunitaria. A medida que van madurando, muestran que son capaces de presentar antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad

(MHC) en su superficie. La interacción entre los probióticos y las células inmunitarias son la que permiten que se produzca una buena inmunomodulación. Además, cuentan con receptores específicos que les posibilitan atrapar y procesar partículas externas y antígenos contra los cuales podrían desencadenar una respuesta. Esta capacidad les confiere la posibilidad de desencadenar respuestas inmunitarias específicas dirigidas a un antígeno determinado, contribuyendo de este modo al establecimiento de la tolerancia inmunológica. Las células dendríticas, los macrófagos y, en menor proporción, los monocitos constituyen ejemplos representativos de esta categoría de células presentadoras de antígenos.

El tracto gastrointestinal contiene muchos antígenos. Los antígenos provienen de productos alimenticios, de la microbiota que no es patógena y de los microorganismos dañinos. Los antígenos tocan las células epiteliales y también tocan las células inmunitarias que están bajo la mucosa del intestino. Las células presentadoras de antígenos capturan los antígenos. Los receptores que reconocen patrones moleculares detectan la mayor parte de las bacterias. Los receptores tipo Toll, los TLR, están en las células presentadoras de antígenos y en las células epiteliales del intestino.(22)

2.1.2. Microbiota

2.1.2.1. Definición

La microbiota es definida por los científicos como “(la totalidad de las bacterias, arqueas, eucariotas y virus)”. Dado

que la microbiota cambia dependiendo de su ambiente, a la microbiota que se encuentra en el intestino, por ejemplo, se le llamará microbiota intestinal.

2.1.2.2. Microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal presenta una comunidad densa, grande y compleja de bacterias comensales residentes. La comunidad microbiana intestinal (microbiota) posee efectos beneficiosos sobre la digestión, producción de nutrientes, detoxificación, protección frente patógenos y regulación de la reacción inmunitaria del anfitrión. El intestino del recién nacido se coloniza de forma rápida y abundante por microorganismos que, participando en el desarrollo de la barrera epitelial, homeostasis e inmunidad innata, y genera interacción a la funcionalidad y desarrollo de otros órganos. La microbiota presenta una buena biomasa y diversidad estable y acorde a su propia constitución con la proporción necesaria para que pueda alcanzar sus funciones adecuadamente desde el mismo momento del nacimiento. La evolución de la microbiota intestinal (MI) alcanza para más de 1000 especies bacterianas diferentes con algunas células microbianas 10 veces más abundantes que las células eucariotas. La colonización de la microbiota intestinal es un procedimiento activo y progresivo desde el recién nacido, ya que a 1 mes y a los 6 meses, se observan notables diferencias que van acompañadas de las transformaciones del primer año de vida hasta que ésta se estabiliza desde los 2 a los 3 años de edad, con influencia del

modo de parto (vaginal o cesárea), del tiempo de gestación (normal o premature (n)), de la lactancia (materna o de fórmula), del tiempo de introducción de alimentos sólidos y de la exposición a antibióticos (pre-natal o postnatal). La naturaleza de la flora bacteriana de la MI, a la luz de los nuevos conocimientos, es que se presenta compuesta por aproximadamente unos 10 dominios o filum de los cuales los mayoritarios son los Firmicutes (60.65%) y los Bacteroidetes (20-25%), seguidos por otros como Proteobacteria (5-10%), Actinobacteria (3%) y Verrucomicrobia (<1%). Los dos primeros son los más abundantes en el colon humano, aunque los restantes intervienen también en funciones muy importantes. Igualmente, han sido definidos grupos específicos o enterotipos, sobre la variedad de los géneros, con características específicas, pero presentan también cierta cantidad de funciones comunes. Estas tres variantes por uno de pestos tres géneros: Bacteroides, Prevotella y Ruminococcus. El enterotipo 1 tiene un gran potencial sacarolítico con genes codificantes para enzimas (proteasas, hexoaminidasas y galactosidasas), son muy eficaces en la obtención de energía, con predominio de Bacteroides y especies del género Parabacteroides. El enterotipo 2 degrada las glucoproteínas de la mucosa, que recubren el epitelio de la mucosa intestinal, como la mucina, con predilección de Prevotella, asociada al género Disulfovibrio. Y el enterotipo 3, es partícipe de la degradación de la mucina y el transpore de azúcares por la membrana, lo que subraya la eficiencia metabólica en la degradación de estos sustratos, el captado y la hidrólisis, con predominio de Ruminococcus, que se

asocia al género Akkermansia. Es de interés hacer hincapié en las enfermedades metabólicas provocan alteraciones de las concentraciones de Firmicutes y Bacteroidetes, que evidencian lo mostrado de la trascendencia del desequilibrio de la composición bacteriana de dichos dominios en la patogenia de diferentes enfermedades.(24)

2.1.2.3. Composición y funciones de la microbiota intestinal

La colonización microbiana del cuerpo empieza cuando nacemos. La colonización microbiana del cuerpo genera la microbiota intestinal que vive en el cuerpo. En el útero la exposición a los microorganismos es muy baja. La microbiota intestinal ayuda al desarrollo del sistema inmunológico del cuerpo. La microbiota intestinal también mantiene el equilibrio del cuerpo. Por eso la colonización microbiana del cuerpo en las etapas iniciales es muy importante. Los estudios en animales de cría sin presencia de gérmenes han demostrado que la colonización por microorganismos en los momentos al principio ayuda a que las funciones nutricionales y las funciones inmunitarias se desarrollen. La colonización por microorganismos cuando el animal es adulto hace que las funciones nutricionales y las funciones inmunitarias desaparezcan.(21)

La microbiota es influenciada por varios elementos, como el tipo de parto, la edad gestacional, el tipo de alimentación inicial y la exposición a antibióticos. La microbiota de los bebés nacidos

por vía vaginal es parecida a la de la microbiota vaginal materna, pero en el caso de los que nacen mediante cesárea, su perfil microbiológico se asemeja más al de la piel o al entorno inmediato. Los bebés prematuros cuentan con una menor cantidad de bacterias anaerobias, como *Bacteroides* y *Bifidobacterium*, mientras que tienen más enterobacterias, algunas de las cuales podrían ser patógenas, por ejemplo, *Klebsiella pneumoniae* o *Escherichia coli*. Además, se ha evidenciado que el uso de antibióticos afecta negativamente la manera adecuada en que se adquiere la microbiota intestinal, incluso si estos se suministran a la madre con fines preventivos. En comparación con los que toman fórmulas lácteas artificiales, los bebés que son alimentados solamente con leche materna tienen más microorganismos útiles. La configuración microbiana también se ve afectada por otros elementos, como vivir con animales domésticos, tener hermanos mayores o residir en un lugar urbano o rural.

Cuando se deja de amamantar y se dan alimentos sólidos, la microbiota del intestino cambia. Los filos Firmicutes y Bacteroidetes toman el control y siguen durante toda la vida. Con el tiempo, la microbiota aumenta su capacidad para descomponer carbohidratos y xenobióticos y para sintetizar vitaminas. La microbiota también aumenta su diversidad. La microbiota del intestino comienza a formarse al nacer. Desde el nacimiento la microbiota crea un ecosistema en el neonato. Ese ecosistema afecta el desarrollo de rasgos y patrones que aparecen cuando la persona envejece. En unos tres años, la

microbiota del bebé puede llegar a ser parecida a la microbiota del adulto. Pero los grupos microbianos no maduran hasta la adolescencia.

El 90% de los microorganismos que habitan el tracto intestinal humano pertenece a los filos Firmicutes y Bacteroidetes. El 10% de las bacterias pertenece a los filos Verrucomicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria y Proteobacteria. También hay especies del dominio Archaea. La microbiota del intestino de los humanos tiene levaduras, bacteriófagos y protistas. Los bacteriófagos son el principal elemento viral. Los bacteriófagos juegan un papel importante en la forma del ecosistema intestinal. Los bacteriófagos estimulan el crecimiento de las especies dominantes. Los bacteriófagos permiten la transferencia horizontal del material genético.

Los investigadores encontraron menos de 20 especies de levadura en el intestino de un adulto sano, y la diversidad de esas especies es baja. Las levaduras tienen mucho menos número que las bacterias, pero las levaduras aportan funciones importantes al ecosistema porque las levaduras tienen un tamaño celular más grande y genomas más extensos.

Sobre la composición de cepas, cada persona tiene un perfil de comunidades microbianas. Cada persona tiene cepas que no comparten con otras personas. Hay diferencias entre los segmentos del tracto digestivo y entre las heces y la mucosa intestinal de la persona. Pero las cepas aparecen en cada

segmento, solo cambian las proporciones. Los estudios a largo plazo muestran que los viajes alteran la composición de las heces de una persona. El tiempo que tarda el colon, la dieta y los medicamentos también alteran la composición de las heces de una persona. La variación entre personas es mucho mayor que la variación dentro de la misma persona. El ecosistema microbiano cambia, pero el ecosistema microbiano vuelve a su estado normal.

La resistencia permite que el ecosistema intestinal recupere el estado previo después de una diarrea aguda o de un tratamiento con antibióticos. La resiliencia es un rasgo principal del ecosistema intestinal cuando el ecosistema intestinal está sano. La resiliencia muestra la capacidad del ecosistema intestinal para volver a su equilibrio.

A pesar de que la composición microbiana de cada persona es única, el diseño general del ecosistema muestra patrones comunes entre diferentes individuos, conocidos como enterotipos. Este concepto sugiere que el ecosistema microbiano intestinal establece condiciones internas de simbiosis entre los integrantes de la comunidad, posiblemente reguladas por redes sociales y metabólicas compartidas. El equilibrio y la resistencia de un ecosistema que está expuesto a cambios constantes dependen de estas interacciones. Los sujetos del enterotipo 1 tienen una predominancia de Bacteroides; los pertenecientes al enterotipo 2, de Prevotella; y los del enterotipo 3, de Ruminococcus o Bifidobacterium. Uno de

los elementos que mayor impacto tiene en la identificación del enterotipo es la alimentación.

El envejecimiento es el punto de partida de una nueva fase de inestabilidad en la composición microbiana. El envejecimiento conlleva una disminución gradual de la diversidad de microorganismos, junto con cambios en los niveles de ciertos microorganismos. Estos cambios tienen una estrecha relación con la degradación de la función inmunitaria, un proceso descrito en la literatura científica como "inflamaging", que se caracteriza por el aumento de la inflamación crónica y la reducción de la habilidad para crear reacciones inmunitarias adaptativas. Las bacterias con propiedades antiinflamatorias, como *Faecalibacterium prausnitzii*, y las bacterias beneficiosas, que incluyen a algunas bifidobacterias, disminuyen gradualmente. Modificar el microbioma o administrar ciertos microorganismos de manera dirigida podría ser una posible táctica para disminuir el deterioro fisiológico relacionado con la vejez.(21)

2.1.2.4. Digestión y metabolismo

Con el fin de ayudar en la digestión tanto de alimentos como de medicamentos, la flora intestinal segrega varias enzimas, entre ellas la β -glucosidasa, la β -glucuronidasa, la azorreductasa, la sulfatasa, la nitrorreductasa y la nitrato reductasa. Estas enzimas están involucradas en una amplia variedad de reacciones metabólicas que se producen en el tracto intestinal.

Se asume que algunos microorganismos intestinales juegan un papel significativo en biotransformaciones de gran importancia, que incluyen procesos de metabolismo reductor, hidrólisis, desmetilación, desaminación, deshidroxilación, desacilación, descarboxilación y oxidación (25). La microbiota del intestino puede producir metabolitos que son tóxicos. La producción de trimetilamina a partir de colina y carnitina dietéticas implica el uso de trimetilamina por el hígado y su conversión en TMAO (un factor importante en las enfermedades cardiovasculares). La microbiota obtiene energía de los alimentos de manera diferente según la microbiota específica de cada individuo, además de regular los lípidos para su almacenamiento, lo cual se estudia en relación con la obesidad y el síndrome metabólico. Cuando se transfiere microbiota fecal de un ratón obeso a uno normal, se pueden transferir características fenotípicas asociadas. El ratón receptor puede mostrar aumento de peso y más tejido adiposo. Por lo tanto, la microbiota intestinal es clave en la regulación de la homeostasis metabólica del cuerpo.(21)

El conjunto de actividades enzimáticas de la microbiota intestinal constituye un 'metagenoma funcional' capaz de biotransformar más de 150 medicamentos de uso clínico frecuente, determinando en gran medida la variabilidad interindividual en la respuesta terapéutica. (8)

2.1.3. Metabolismo de fármacos

El proceso por el cual los medicamentos son descompuestos, conocido como metabolismo, implica cambios químicos en sus estructuras una vez que ingresan al cuerpo. En términos generales, este metabolismo tiene como efecto la reducción de los beneficios terapéuticos de los mismos. La mayor parte de las áreas lipofílicas de los medicamentos se transforman en áreas hidrofílicas durante su biotransformación, lo que aumenta su solubilidad en agua y facilita su excreción a través de la orina o la bilis. Este proceso es un avance en el metabolismo, ya que la propiedad lipofílica de los medicamentos les permite permanecer en el organismo más tiempo, lo que puede resultar en toxicidad. Se puede dividir el metabolismo de los medicamentos en reacciones de dos fases: fase I y fase II. (26)

Las reacciones de fase I son las que introducen grupos químicos reactivos o polares en las moléculas de los medicamentos, incluyendo procesos como la oxidación, reducción e hidrólisis, ya que estos medicamentos no son expulsados del organismo. Posteriormente, los medicamentos modificados se combinan con compuestos polares en las reacciones de fase II, las cuales son promovidas por diversas enzimas transferasas, como las UDP-glucuronosiltransferasas, sulfotransferasas y glutatión S-transferasas. (26)

Los medicamentos que han sido conjugados pueden ser procesados posteriormente antes de ser detectados por los

transportadores de eflujo, que los sacan de las células. No obstante, este mismo metabolismo puede generar metabolitos reactivos que resultan tóxicos para el organismo. Este fenómeno se conoce como bioactivación de fármacos, que depende de rasgos estructurales relevantes que poseen estos compuestos.(26)

El metabolismo de los medicamentos corresponde a su degradación a través de un sistema enzimático especializado. Las enzimas CYP participan en más del 90% de las reacciones enzimáticas documentadas. En el ámbito del metabolismo de los medicamentos, las enzimas CYP son las más reconocidas y se encuentran predominantemente en el hígado, aunque otros órganos como los riñones, la placenta, las glándulas suprarrenales, el tracto gastrointestinal y la piel también tienen participación. De los 57 CYP funcionales en seres humanos, las isoformas de las familias CYP1, 2 y 3 son responsables del metabolismo de aproximadamente el 80% de los medicamentos utilizados en la práctica clínica. El metabolismo que realizan las CYP no solo transforma productos lipofílicos en compuestos hidrofílicos para facilitar su eliminación, sino que también es crucial para determinar los resultados de los tratamientos, ya que afecta la eficacia de los medicamentos, su seguridad, su biodisponibilidad y la resistencia a estos, tanto en los órganos que metabolizan como en los sitios de acción locales.(26)

2.1.3.1. La microbiota intestinal y el metabolismo de los fármacos

El sistema digestivo humano contiene billones de organismos diminutos que poseen muchos más genes que el cuerpo humano mismo. Muchos de estos genes ayudan a producir catalizadores de proteínas llamados enzimas. Estas enzimas ayudan a las bacterias intestinales a realizar muchas reacciones químicas, que impulsan los procesos bioquímicos en el cuerpo humano. Una de las cualidades más destacadas del metabolismo intestinal microbiano es lo diverso que es. Por lo tanto, tanto la microbiota como las habilidades metabólicas de las personas en una comunidad suelen diferir. A medida que encontramos más vínculos entre las bacterias intestinales y la salud, es cada vez más importante estudiar los cambios en cómo estos microbios producen productos químicos a nivel molecular. (27)

Cada vez que tomas una pastilla, no eres el único que la recibe. Los billones de bacterias que viven en el intestino también tienen algo que decir al respecto. Y es que uno de las funciones más llamativas de la microbiota intestinal es su habilidad para modificar químicamente los fármacos de pequeña molécula, transformándolos antes de que el cuerpo los absorba por completo. (27)

Los medicamentos orales, por ejemplo, no llegan solos a su destino. En el camino se topan con comunidades bacterianas que los interceptan, los alteran, los descomponen. Si el fármaco

se absorbe bien, ese encuentro ocurre en el intestino delgado. Si su absorción es más limitada, la historia continúa más abajo, en el intestino grueso. Los medicamentos inyectables, en cambio, solo entran en contacto con la microbiota si el organismo los secreta hacia el intestino a través de la bilis. Una ruta distinta, pero igualmente relevante. (27)

Y aquí viene lo que realmente hace pensar: la eficacia de un fármaco depende directamente de su estructura química. Si las bacterias la alteran, aunque sea un poco, las consecuencias pueden ser importantes. El medicamento podría perder potencia, volverse más activo de lo esperado, o incluso generar reacciones imprevistas. Tal vez ahí resida parte de la explicación de algo que los médicos conocen bien: por qué el mismo tratamiento, a la misma dosis, no produce los mismos resultados en todas las personas.(27)

Otro aspecto importante es el reciclaje enterohepático que se produce mediante la excreción biliar y la reabsorción intestinal de un soluto, a veces con conjugación hepática y desconjugación intestinal. El ciclo suele asociarse con picos múltiples y una vida media aparente más larga en un perfil de concentración plasmática-tiempo. Los factores que afectan la excreción biliar incluyen las características del fármaco (estructura química, polaridad y tamaño molecular), el transporte a través de la membrana plasmática sinusoidal y las membranas de las cánulas, la biotransformación y la posible reabsorción desde los conductillos biliares intrahepáticos. La reabsorción intestinal para completar el ciclo enterohepático puede depender

de la hidrólisis de un conjugado farmacológico por las bacterias intestinales. La biodisponibilidad del mismo modo se ve afectada por la capacidad de absorción intestinal, el eflujo de la glicoproteína P a través de la pared intestinal y el metabolismo intestinal. (27)

La recirculación enterohepática puede prolongar el efecto farmacológico de ciertos fármacos y sus metabolitos. De particular importancia es el posible efecto amplificador de la variabilidad enterohepática al definir las diferencias en la biodisponibilidad, el volumen aparente de distribución y el aclaramiento de un compuesto determinado. Las anomalías genéticas, las enfermedades, los adsorbentes administrados por vía oral y ciertos fármacos coadministrados afectan al reciclaje enterohepático. (28)

Efectos del metabolismo microbiano intestinal de los fármacos

El proceso metabólico llevado a cabo por la microbiota intestinal genera diversas consecuencias sobre el mecanismo de acción y la efectividad de los medicamentos. Casos representativos como el de los fármacos azoicos ilustran que el metabolismo microbiano de profármacos, es decir, compuestos inicialmente inactivos, puede resultar determinante para la liberación del principio activo. Este hallazgo, de carácter revelador, impulsó el desarrollo de nuevas estrategias orientadas a la liberación selectiva de fármacos en el intestino

grueso, sustentadas en la actividad enzimática de la microbiota.(27)

Los dos mecanismos principales mediante los cuales la microbiota intestinal ejerce influencia sobre el metabolismo farmacológico son: el mecanismo de biotransformación directa, en el cual las enzimas de origen microbiano llevan a cabo el procesamiento metabólico de los medicamentos, y el mecanismo de biotransformación indirecta, a través del cual los metabolitos microbianos inciden sobre receptores y vías de señalización del huésped.(29)

El metabolismo ejecutado por la microbiota intestinal puede, a su vez, impactar de manera desfavorable sobre la funcionalidad de los fármacos, alterando su interacción con las dianas terapéuticas del organismo. Un ejemplo ilustrativo de este fenómeno es la digoxina, medicamento empleado en el tratamiento de determinadas patologías cardíacas, cuya lactona de tipo α,β -insaturada puede ser transformada en dihidrodigoxina por la microbiota intestinal en un 5 a 10% de los pacientes. Esta modificación estructural, mediada por la bacteria intestinal *Eggerthella lenta*, reduce de forma significativa la afinidad del fármaco por su diana molecular, la Na^+/K^+ ATPasa, con la consecuente disminución de su eficacia terapéutica. Otro ejemplo de relevancia es la levodopa, empleada como tratamiento de primera línea en la enfermedad de Parkinson. Si bien la conversión de levodopa en dopamina mediante enzimas cerebrales resulta esencial para la remisión sintomática, el

metabolismo microbiano intestinal de dicho compuesto genera dopamina de manera periférica, la cual, al no poder atravesar la barrera hematoencefálica, podría comprometer la biodisponibilidad del fármaco a nivel cerebral.(27)

Por otra parte, las alteraciones en la actividad química mediadas por la microbiota pueden constituir la causa de toxicidades no deseadas. A partir de modelos animales, se ha asociado el metabolismo microbiano intestinal con la mortalidad secundaria a la combinación de brivudina y análogos de nucleósidos de fluoropirimidina, fenómeno atribuido a la metabolización de sorivudina en compuestos como el bromoviniluracilo. Este agente inhibe una de las enzimas del huésped responsables de inactivar el 5-fluorouracilo, incrementando su concentración plasmática hasta niveles de carácter tóxico.(27)

Las β -glucuronidasas bacterianas intestinales

La microbiota intestinal cataliza diversas reacciones metabólicas de compuestos endógenos y exógenos estructuralmente diversos, entre las que predominan la reducción y la hidrólisis, que interrelacionan las reacciones de oxidación y conjugación realizadas por los sistemas metabólicos de xenobióticos del huésped para mantener la homeostasis de las moléculas endógenas y su eliminación. Las β -glucuronidasas bacterianas intestinales (BGUS) son miembros de la familia de las glucósido hidrolasas (GH) que catalizan el catabolismo de

carbohidratos complejos y glicoconjugados, como peptidoglicanos, glucósidos, glicolípidos, etc., y la desconjugación de glucurónidos naturales de moléculas pequeñas o metabolitos glucuronidados de compuestos endógenos y xenobióticos formados por las enzimas de fase II del huésped UDP-glucuronosiltransferasas (UGT). Los mamíferos también expresan enzimas GUS. La GUS humana (hGUS) se localiza principalmente en los lisosomas de una variedad de órganos (intestino, hígado, riñón, etc.) y fluidos corporales. Pertenece a la familia 2 de GH y actúa como una exoglicosidasa que cataliza la degradación gradual de glicosaminoglicanos que contienen ácido glucurónico (GlcA), incluidos el sulfato de heparán, el sulfato de dermatán y el sulfato de condroitina, así como algunos glucurónidos de moléculas pequeñas, como los glucurónidos de bilirrubina, la glicirricina y el glucurónido de diflunisal. (30)

La glucuronidación es una de las vías más importantes para la eliminación de endobióticos y xenobióticos del organismo mediante la transferencia de una molécula de GlcA al sustrato, lo que facilita su excreción biliar y urinaria. La reversión de la acción de la inactivación del huésped (glucuronidación) por las BGUS intestinales da como resultado la regeneración de compuestos originales o metabolitos activos en el tracto gastrointestinal (GI), lo que facilita la reabsorción y la recirculación enterohepática y, en consecuencia, aumenta la exposición sistémica al fármaco o causa daño directo al intestino por los metabolitos tóxicos. Se cree que el metabolismo mediado

por las BGUS es responsable de la aparición de diarrea tardía en pacientes con cáncer colorrectal avanzado (CCR) que recibieron tratamiento con irinotecán, y de enteropatía en usuarios a largo plazo de antiinflamatorios no esteroideos (AINE, como diclofenaco, ketoprofeno, indometacina, etc.)(30)

El atlas de β -glucuronidasas microbianas intestinales humanas ha identificado más de 300 estructuras de GUS diferentes, clasificadas en subtipos con distinta especificidad de sustrato y sensibilidad a inhibidores, lo que sugiere que la inhibición selectiva de subtipos específicos podría ser una estrategia terapéutica más precisa que la inhibición global. (10)

2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- Probiótico. Microorganismos vivos que, al ser ingeridos en dosis apropiadas, generan efectos positivos verificables en la salud del individuo que los consume, actuando principalmente a nivel del sistema digestivo.(31)
- β -glucuronidasa bacteriana (GUS). Grupo de enzimas producidas por microorganismos intestinales que rompen los enlaces glucurónidos de compuestos previamente conjugados en el hígado, liberando las formas activas originales y facilitando su recirculación.(13)
- Microbiota intestinal. Conjunto complejo y dinámico de bacterias, arqueas, virus y hongos que residen en el tracto gastrointestinal

humano, participando activamente en procesos metabólicos, inmunológicos y de protección frente a patógenos.(32)

- Glucuronidación. Proceso metabólico de fase II mediante el cual las enzimas hepáticas UDP-glucuronosiltransferasas transfieren ácido glucurónico a fármacos o moléculas endógenas, incrementando su hidrosolubilidad y facilitando su excreción por vía biliar o renal.(33)
- Desconjugación intestinal. Reacción catalizada por enzimas microbianas, principalmente β -glucuronidasas, que elimina el residuo de ácido glucurónico de metabolitos conjugados excretados en la bilis, regenerando compuestos farmacológicamente activos o tóxicos en el lumen intestinal.(34)
- Ciclo enterohepático. Mecanismo fisiológico mediante el cual sustancias (fármacos o metabolitos) se secretan por vía biliar hacia el intestino, son reabsorbidas desde el lumen intestinal y retornan al hígado a través de la circulación portal, prolongando su permanencia en el organismo.(35)
- *Lactobacillus acidophilus*. Bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, ampliamente empleada como probiótico por su capacidad para adherirse al epitelio intestinal y modular la actividad enzimática de la microbiota residente.(14)

- Actividad enzimática (unidades). Medida cuantitativa de la capacidad catalítica de una enzima, definida convencionalmente como la cantidad de sustrato transformado en producto por unidad de tiempo (generalmente μmol de producto liberado por minuto por mililitro de extracto enzimático).(36)
- PNPG (p-nitrofenil- β -D-glucurónido). Sustrato cromogénico sintético diseñado específicamente para medir la actividad de β -glucuronidasa; al ser hidrolizado por la enzima libera p-nitrofenol, un compuesto coloreado que se cuantifica por espectrofotometría a 405 nm.(17)
- p-nitrofenol (PNP). Producto resultante de la hidrólisis enzimática del PNPG por acción de β -glucuronidasa; su absorbancia a 405 nm es proporcional a su concentración, permitiendo estimar indirectamente la actividad de la enzima en una muestra biológica.(37)
- Extracto enzimático crudo. Preparación biológica que contiene la enzima de interés junto con otras proteínas y componentes celulares, obtenida mediante ruptura celular parcial o total sin purificación posterior, lo que preserva el contexto molecular nativo de la enzima.(38)
- Permeabilización celular. Técnica de laboratorio que emplea agentes químicos como EDTA y detergentes (ej. Tween 80) para alterar transitoriamente la integridad de la membrana bacteriana,

permitiendo la salida de proteínas intracelulares sin llegar a la lisis total de la célula.(38)

- Dispersión de Rayleigh. Fenómeno óptico en el cual partículas suspendidas en una solución (como bacterias) dispersan la luz incidente, generando una señal de absorbancia inespecífica que puede interferir con la medición de compuestos cromogénicos en espectrofotometría, especialmente a longitudes de onda cortas como 405 nm.(39)
- UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro). Unidad de medida microbiológica que estima la concentración de bacterias viables en una suspensión, basada en el conteo de colonias aisladas que crecen en un medio sólido después de sembrar volúmenes conocidos de diluciones seriadas.(40)
- Farmacomicrobiómica. Campo de estudio emergente que investiga las interacciones bidireccionales entre el microbioma intestinal y los fármacos, incluyendo cómo los microorganismos modifican la estructura, eficacia y toxicidad de los medicamentos, y cómo estos alteran la composición microbiana.(16)
- Bacteriocinas. Péptidos con actividad antimicrobiana sintetizados por ciertas bacterias, incluyendo lactobacilos, que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos al alterar la integridad de su membrana celular o interferir con la síntesis de su pared.
(18)

- Ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Productos de fermentación bacteriana de fibras dietéticas en el colon, principalmente acetato, propionato y butirato, que actúan como fuente energética para los colonocitos, regulan el pH intraluminal y modulan la expresión de enzimas microbianas como la β -glucuronidasa.(41)
- Disbiosis. Alteración cualitativa o cuantitativa de la composición y función de la microbiota intestinal, caracterizada por pérdida de diversidad microbiana, predominio de especies potencialmente dañinas y disminución de microorganismos beneficiosos, asociada a diversas enfermedades.(42)
- Cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli*. Microorganismo de referencia certificado por la American Type Culture Collection, ampliamente utilizado en investigación como control de calidad en ensayos microbiológicos y como fuente estándar de β -glucuronidasa por su perfil genético bien caracterizado y estabilidad fenotípica.(14)
- Recirculación enterohepática. Proceso farmacocinético mediante el cual un fármaco o metabolito es secretado desde el hígado hacia el intestino a través de la bilis, luego reabsorbido desde el lumen intestinal y transportado nuevamente al hígado, prolongando su vida media en plasma.(34)
- Ensayo colorimétrico enzimático. Técnica analítica que cuantifica la actividad de una enzima midiendo la intensidad del color

generado por un producto de reacción, donde la absorbancia registrada a una longitud de onda específica es directamente proporcional a la concentración de dicho producto.(36)

- Medio de cultivo BHI (Brain Heart Infusion). Caldo nutritivo rico en proteínas, vitaminas y carbohidratos derivados de extractos de cerebro y corazón bovinos, empleado para el crecimiento de microorganismos exigentes, incluyendo *Lactobacillus spp.* y *E. coli*, gracias a su alto contenido de nutrientes.(40)
- Tinción de Gram. Método diferencial de coloración bacteriana que clasifica los microorganismos en Gram-positivos (retención del cristal violeta, color púrpura) o Gram-negativos (pérdida del colorante primario y captación de safranina, color rosado), basado en la estructura de su pared celular.(43)
- Espectrofotometría UV-Visible. Técnica analítica que mide la cantidad de luz absorbida por una muestra en función de la longitud de onda (rango ultravioleta y visible), permitiendo cuantificar compuestos coloreados o que reaccionan para formar productos coloreados, como el p-nitrofenol a 405 nm.(44)
- Sobrenadante. Fase líquida que queda por encima del sedimento (pellet) después de centrifugar una suspensión celular o una muestra biológica; en el contexto de esta tesis, el sobrenadante contiene el extracto enzimático crudo de β -glucuronidasa liberado tras la permeabilización bacteriana.(17)

- Pellet bacteriano. Agregado compacto de células bacterianas que se forma en el fondo de un tubo de centrifuga después de aplicar una fuerza centrífuga suficiente, permitiendo separar físicamente los microorganismos del líquido sobrenadante.(14)
- PKa. Constante de disociación ácida que indica el pH en el cual un compuesto se encuentra 50% en su forma protonada (no ionizada) y 50% en su forma desprotonada (ionizada); para el p-nitrofenol, un pKa de 7.15 significa que a pH menores predomina la forma incolora y no detectable a 405 nm.(33)

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. TIPO, DISEÑO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

3.1.1. Tipo de investigación

La presente investigación es de tipo experimental, de corte transversal y prospectivo.

3.1.2. Diseño de investigación

Experimental: Se trabajará con grupo control y grupo experimental. Además, se manipulará de manera intencional la variable independiente para analizar el efecto en la variable dependiente.

3.1.3. Nivel de investigación

El nivel de investigación es explicativo. No se limita a describir ni a correlacionar variables, sino que busca determinar la relación causa-efecto entre la presencia y concentración.

3.2. POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

3.2.1. Población

Cepas de *Lactobacillus acidophilus* contenidas en el probiótico comercial, presentado en ampollas bebibles, disponible en farmacias de la ciudad de Tacna.

3.2.2. Muestra

Cepas de *Lactobacillus acidophilus* obtenida de una ampolla bebible del probiótico comercial, adquirida en una farmacia de la ciudad de Tacna.

3.2.3. Muestreo

No probabilístico por conveniencia.

3.3. MATERIALES E INSTRUMENTOS

3.3.1. Materiales

- Tubos de ensayo estériles
- Micropipetas de 10 y 100 μ L
- Puntas estériles
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml
- Placas de Petri estériles
- Viales de vidrio estériles
- Asa bacteriológica
- Matraz Erlenmeyer de 250 y 500 ml
- Fiolas volumétricas de 100 ml
- Papel Kraft
- Espátula de acero inoxidable
- Gradilla metálica
- Mechero Bunsen

- Guantes de nitrilo
- Mascarilla
- Mandil descartable

3.3.2. Equipos e instrumentos

- Espectrofotómetro UV-Visible (Marca: Thermoscientific)
- Autoclave (Marca: Greetmed)
- Incubadora microbiológica (Marca: Memmert)
- Centrífuga (Marca: Ortoalresa)
- Balanza analítica (Marca: Kern)
- Agitador vórtex
- Refrigerador (4 °C)

3.3.3. Insumos y reactivos

- Probiótico comercial (ampolla bebible con *L. acidophilus* $\geq 10^5$ UFC/ml) con FV: 08/23, Lote: 20801024, elaborado en el Perú.
- Cepa certificada ATCC 25922
- Agar TSA suplementado con sangre 5%
- Caldo y agar BHI (Brain Heart Infusion)
- Agar MacConkey
- Agar PCA suplementado con TTC
- p-nitrofenil- β -D-glucurónido (PNPG, Sigma-Aldrich, pureza $\geq 98\%$)
- p-nitrofenol (PNP, Sigma-Aldrich, para curva estándar)
- EDTA disódico
- Tween 80 (polisorbato 80)

- Buffer fosfato sódico (pH 7)
- Agua destilada estéril

3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.4.1. Preparación de a partir de probiótico comercial

3.4.1.1. Aislamiento y aumento de biomasa

Se mezcló un vial de probiótico comercial y se transfirieron aproximadamente 8 ml a un tubo de ensayo estéril (ver Anexo 3). Después, la muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, equilibrando el sistema con un tubo del mismo volumen que contenía agua. Al finalizar la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se conservó el pellet bacteriano (ver Anexo 4 y 5).

A partir del pellet obtenido se cogió una asada y se realizó una siembra en cuatro cuadrantes en placas de agar TSA sangre, que se colocaron invertidas en un cultivo en un recipiente de vidrio hermético donde se generó un ambiente microaerófilo mediante la combustión de una vela como medio para reducir así la concentración de oxígeno (ver Anexo 7,8 y 9). Las placas fueron incubadas a 35 ± 2 °C durante 96 horas (ver Anexo 10).

Tras el periodo de incubación se observó crecimiento compatible con *Lactobacillus acidophilus* en la placa. De una colonia aislada se realizó una siembra por agotamiento en un vial inclinado que contenía agar

BHI a fin de incrementar la biomasa bacteriana en medio enriquecido, incubando el cultivo a 35 ± 2 °C durante 24 horas en condiciones microaerófilas (ver Anexo 11).

Pasado el tiempo, se tomó una muestra del cultivo del vial y se inoculó en caldo BHI, incubándose a 35 ± 2 °C durante 24 horas en condiciones microaerófilas, obteniéndose así un cultivo activo listo para su uso en posteriores diluciones (ver Anexo 12 y 13).

3.4.1.2. Tinción de Gram para confirmación bacteriana

Se tomó una muestra del cultivo bacteriano del BHI y se sembró con un asa de siembra, extendiéndose sobre un portaobjetos, fijándose a calor.

Se tiñó el frotis con cristal violeta cinco minutos y se lavó con agua destilada. Se añadió lugol durante dos minutos y se lavó. Se decoloró con alcohol-acetona y se lavó con agua destilada. Finalmente, se tiñó con safranina como colorante de contraste durante 45 segundos y se lavó por última vez.

La observación se llevó a cabo mediante microscopía óptica a aumentos de 40X y 100X (ver Anexo 14).

3.4.1.3. Preparación de la serie de diluciones y recuento en placa

Se prepararon diluciones decimales (1:10) usando diez tubos estériles etiquetados desde 10^{-1} hasta 10^{-10} , conteniendo cada uno 9 ml de buffer fosfato estéril pH 7. Se transfirió 1 ml del cultivo en caldo BHI al tubo 10^{-1} y se homogenizó, continuándose la serie de diluciones sucesivas pasando 1 ml de cada dilución al siguiente tubo, repitiéndose el procedimiento hasta llegar a la dilución 10^{-10} (ver Anexo 15 y 16). La siembra por extensión consiste en depositar 100 μ L de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10} de cada tubo, en placas con agar PCA (Agar para recuento de placas) suplementado con TTC (Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio), realizándose cada siembra por triplicado. Las placas se incubaron invertidas a 35 ± 2 °C durante 24 horas bajo condiciones microaerófilas, seleccionándose las que mostraban el primer crecimiento bacteriano para su análisis (ver Anexo 17,18,19 y 20).

3.4.1.4. Cálculo de UFC/ml del cultivo stock de *Lactobacillus acidophilus*

Se realizó el conteo de colonias en las placas seleccionadas, calculándose el promedio de los triplicados para cada dilución.

El cálculo de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) se realizó mediante la siguiente expresión:

$$UFC/ml (stock) = \frac{\text{colonias promedio} \times \text{factor de dilución}}{\text{volumen sembrado (ml)}}$$

Este valor se consideró como una estimación de la concentración del cultivo stock.

3.4.1.5. Preparación de suspensiones experimentales

Se prepararon suspensiones de *Lactobacillus acidophilus* a concentraciones de 10^8 , 10^7 y 10^6 UFC/ml para un volumen final de 10 ml, utilizando la ecuación:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

3.4.2. Reactivación de *Escherichia coli* ATC 25922

Se tomó una asada de la cepa conservada en refrigeración de *E. coli*, y se inoculó en un tubo de ensayo que contenía caldo BHI (Brain Heart Infusion), se incubó a 35 ± 2 °C durante 24 horas con el objetivo de reactivar la bacteria (ver Anexo 22). A partir del cultivo reactivado, se sembró por agotamiento en dos viales que contenían agar BHI en inclinación, incubándose a 35 ± 2 °C durante 24 horas, observándose posteriormente el crecimiento de la bacteria lista como para la siguiente etapa (ver Anexo 23).

3.4.3. Preparación del extracto enzimático crudo

El cultivo activo se sometió a un procedimiento de liberación de contenido intracelular; para ello, se preparó una solución de 60 ml de buffer fosfato (pH 6.8-7), 0.12 g de EDTA y 60 μ L de Tween 80 como detergente no iónico, con la finalidad de debilitar y hacer más permeable la membrana celular (45,46).

Luego, la solución fue distribuida en 6 tubos de ensayo que contenían 10 ml de solución cada uno (ver Anexo 26 y 27).

Se tomó una asada del vial con el *E. Coli* activo y se sembró por suspensión en cada uno de los tubos, reservándose posteriormente el cultivo a -4 °C durante 30 minutos (ver Anexo 28 y 30).

Pasado este proceso se centrifugó la muestra y se obtuvo el sobrenadante, el cual fue considerado como extracto enzimático crudo y sobre el que se reservó una parte en tubo estéril con tapa a -69 °C (ver Anexo 31).

Con el objetivo de evaluar la viabilidad bacteriana posterior al tratamiento, se realizaron siembras en 4 cuadrantes del extracto enzimático crudo en medio de cultivo MacConkey incubándose a 35 ± 2 °C durante 24 horas (ver Anexo 32 y 33).

La ausencia de crecimiento bacteriano fue entendida como pérdida de viabilidad celular, lo que sugiere la posible alteración de la integridad celular, es decir, lisis celular (ver Anexo 34).

3.4.4. Preparación del sustrato p-nitrofenil-β-d-glucurónido (PNPG)

Para la preparación de la solución stock de p-nitrofenil-β-D-glucurónido (PNPG), se pesaron 50 mg del compuesto, equivalentes a 0.050 g. Considerando un peso molecular (PM) de 315.23 g/mol, se procedió a calcular la concentración resultante al disolver dicha masa en un volumen de 10 ml de buffer fosfato. (47,48)

La concentración molar se determinó mediante la siguiente expresión:

$$M = \frac{\text{masa}}{PM \cdot \text{volumen}}$$

3.4.5. Curva estándar

Se preparó una solución madre de 100 ml a 10 mM de p-nitrofenol (PNP) y se hicieron los cálculos para preparar una solución final de 2 ml en las concentraciones de 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1 mM a partir de la solución madre usando la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Se elaboró una curva estándar utilizando PNP a diferentes concentraciones, con el fin de relacionar la absorbancia con la cantidad de producto formado y permitir la estimación de la actividad enzimática (48,49) (ver Anexo 36 y 37).

3.4.6. Ensayo de actividad enzimática

La actividad de la enzima β -glucuronidasa fue evaluada mediante la hidrólisis del sustrato PNPg.

Para ello, se preparó las siguientes mezclas:

Condición	Tiempo (min)	Buffer (μ L)	Extracto enzimático crudo (μ L)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (μ L)	PNPG (μ L)	NaOH (μ L)
Control positivo	-	100	100	-	100	-
Control negativo	-	100	-	-	100	-
Control bacterias (para 10^6 , 10^7 y 10^8)	-	100	-	100	100	-
Experimental (para 10^6 , 10^7 y 10^8)	0,5 min	100	100	100	100	100
	1 min	100	100	100	100	100
	2 min	100	100	100	100	100
	5 min	100	100	100	100	100
	10 min	100	100	100	100	100
	20 min	100	100	100	100	100
	30 min	100	100	100	100	100

Fuente: Elaboración propia

Los reactivos fueron preparados en tubos Eppendorf de 1.5 ml, llevando a cabo cada condición experimental por duplicado.

En cada tubo se añadió simultáneamente 100 μ L de p-nitrofenil- β -D-glucurónido (PNPG) a una concentración de 1 mM

y en ese momento se consideró el inicio de la reacción (tiempo cero, $t = 0$) para todas las réplicas (ver Anexo 38).

La reacción enzimática se paró en momentos de tiempo establecidos (0.5, 1, 2, 5, 10, 20 y 30 minutos) añadiendo 100 μL de NaOH 1 M al tubo correspondiente.

Las mezclas de reacción fueron enviadas a las cubetas espectrofotométricas y la absorbancia fue medida a 405 nm (ver Anexo 39).

Los controles experimentales incluidos permitieron que se validara el desarrollo de la reacción enzimática y detectar posibles interferencias en la medición.

3.4.7. Cálculo de la Actividad Enzimática

Se utilizó la curva estándar de PNP para determinar la concentración de p-nitrofenol en cada muestra.

La actividad enzimática (U/ml) fue calculada utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad enzimática (U/ml)} = \frac{\mu\text{mol de PNP liberado}}{\text{volumen (ml)} \times \text{tiempo (h)}}$$

3.4.8. Preparación de medios de cultivo

3.4.8.1. Preparación de agar TSA suplementado con sangre

Se preparó el medio agar TSA suplementado con sangre (40 g/l + 5-10% sangre), pesando 2.28 g del medio

deshidratado y disolviéndolo en 57 ml de agua destilada en un matraz.

La mezcla fue cubierta con papel kraft y esterilizada en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente, una vez que el medio alcanzó una temperatura adecuada, se adicionaron 3 ml de sangre estéril, homogenizando cuidadosamente para evitar la formación de burbujas.

Finalmente, el medio fue distribuido en 4 placas estériles y dejado solidificar.

3.4.8.2. Preparación de caldo y agar BHI (Brain Heart Infusion)

a) Caldo BHI

Se prepararon 260 ml de caldo BHI (37 g/l), pesando 9.62 g del medio deshidratado y disolviéndolo en 260 ml de agua destilada.

La solución fue cubierta con papel kraft y esterilizada en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

b) Agar BHI

Se prepararon 70 ml de agar BHI (52 g/l), pesando 3.64 g del medio deshidratado y disolviéndolo en 70 ml de agua destilada.

Posteriormente, el medio fue distribuido en 10 viales estériles, con un volumen aproximado de 7 ml por vial. Los viales fueron cubiertos con papel kraft y esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Una vez esterilizados, los viales se colocaron en posición inclinada para permitir la solidificación del medio, obteniéndose así superficies adecuadas para la siembra por agotamiento.

3.4.8.3. Preparación de agar MacConkey

Se prepararon 100 ml de agar MacConkey (51.55 g/l), pesando 5.155 g del medio deshidratado y disolviéndolo en 100 ml de agua destilada en un matraz.

La mezcla fue cubierta con papel kraft y esterilizada en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente, el medio fue distribuido en placas estériles, con un volumen aproximado de 15 ml por placa, dejándose solidificar.

Este medio fue utilizado para la verificación de crecimiento bacteriano posterior a los procesos de lisis celular.

3.5. TÉCNICA DE ANÁLISIS DE DATOS

Las mediciones registradas en las pruebas de laboratorio se guardarán y organizarán en una base de datos creada en Microsoft Office Excel. Luego se extraerán de Excel a la aplicación estadística SPSS v.21 para su análisis. Los resultados saldrán de la aplicación de métodos estadísticos descriptivos. Se calcularán medidas de tendencia central, como la media y la mediana. También se obtendrán medidas de dispersión, por ejemplo, desviación estándar y coeficiente de variación, y se expresarán en % cuando

corresponda. Y se registrarán los valores extremos, mínimo y máximo, con referencia a cada Grupo Experimental y Grupo Control respectivamente. Se harán tablas comparativas y representaciones gráficas del cambio temporal en la absorción bacteriana para cada concentración. Antes del análisis inferencial se evaluará la normalidad de los datos con la prueba de Shapiro-Wilk, dado el tamaño muestral por grupo ($n = 8$). Si no se cumple la normalidad. Se espera que no, por el carácter heterogéneo de los datos de absorbancia en sistemas con suspensiones bacterianas. En ese caso se aplicarán pruebas estadísticas no paramétricas. Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Mann-Whitney U. El nivel de significancia a adoptar será $\alpha = 0.05$ para todas las pruebas inferenciales. La discusión de los resultados se hará en relación con la literatura científica que sustenta la teoría del funcionamiento antibacteriano y con los objetivos de nuestra investigación. Y al final se presentarán las conclusiones y recomendaciones de acuerdo a los resultados.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. ABSORBANCIA DEL GRUPO EXPERIMENTAL POR CONCENTRACIÓN Y TIEMPO

Tabla 1a. Absorbancia (405 nm) del grupo experimental – *L. acidophilus* 10^6 UFC/ml (n = 8).

t (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	Prom.	DE
0.5	0.012	0.008	0.006	0.010	0.014	0.003	0.010	0.061	0.016	0.019
1	0.013	0.012	0.009	0.007	0.001	0.001	0.010	0.019	0.009	0.006
2	0.021	0.027	0.029	0.019	0.033	0.022	0.044	0.028	0.028	0.008
5	0.027	0.016	0.099	0.030	0.017	0.019	0.062	0.018	0.036	0.030
10	0.061	0.021	0.018	0.012	0.024	0.043	0.023	0.364	0.071	0.120
20	0.027	0.048	0.005	0.022	0.012	0.026	0.023	0.018	0.023	0.013
30	0.004	0.005	0.007	0.012	0.009	0.012	0.003	0.003	0.007	0.004

Fuente: *Elaboración propia*

Interpretación de las Tablas 1a:

Las tres tablas muestran absorbancias en su mayoría bajas (0.001-0.099 UA), salvo réplicas puntuales claramente atípicas (0.364 UA en 10^6 /t=10) que destacan numéricamente frente al resto de su fila.

La ausencia de una columna o fila con valores sistemáticamente más altos confirma que ningún tiempo ni concentración favorece de forma consistente una mayor producción de PNP.

Tabla 1b. Absorbancia (405 nm) del grupo experimental – *L. acidophilus* 10⁷ UFC/ml (n = 8).

t (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	Prom.	DE
0.5	0.000	0.006	0.001	0.017	0.018	0.023	0.020	0.027	0.014	0.010
1	0.018	0.011	0.012	0.013	0.001	0.015	0.015	0.019	0.013	0.006
2	0.015	0.011	0.017	0.009	0.021	0.037	0.050	0.022	0.023	0.014
5	0.029	0.151	0.032	0.023	0.184	0.031	0.023	0.095	0.071	0.065
10	0.023	0.014	0.020	0.035	0.010	0.007	0.037	0.021	0.021	0.011
20	0.013	0.018	0.014	0.013	0.020	0.025	0.017	0.011	0.016	0.005
30	0.001	0.007	0.003	0.007	0.002	0.016	0.010	0.265	0.039	0.092

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de las Tablas 1b:

Las tres tablas muestran absorbancias en su mayoría bajas (0.001-0.095 UA), salvo réplicas puntuales claramente atípicas (0.265 UA en 10⁷ /t=30) que destacan numéricamente frente al resto de su fila. La ausencia de una columna o fila con valores sistemáticamente más altos confirma que ningún tiempo ni concentración favorece de forma consistente una mayor producción de PNP.

Tabla 1c. Absorbancia (405 nm) del grupo experimental – *L. acidophilus* 10^8 UFC/ml (n = 8).

t (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	Prom.	DE
0.5	0.023	0.057	0.025	0.049	0.035	0.034	0.016	0.030	0.034	0.014
1	0.003	0.011	0.001	0.015	0.007	0.011	0.016	0.017	0.010	0.006
2	0.018	0.047	0.023	0.023	0.033	0.022	0.032	0.023	0.028	0.009
5	0.025	0.048	0.036	0.028	0.236	0.024	0.024	0.013	0.054	0.074
10	0.023	0.034	0.021	0.014	0.006	0.019	0.022	0.019	0.020	0.008
20	0.036	0.030	0.025	0.014	0.026	0.012	0.024	0.021	0.024	0.008
30	0.020	0.002	0.012	0.007	0.002	0.005	0.002	0.012	0.008	0.007

Fuente: *Elaboración propia*

Interpretación de las Tablas 1c:

Las tres tablas muestran absorbancias en su mayoría bajas (0.001-0.057 UA), salvo réplicas puntuales claramente atípicas (0.236 UA en 10^8 /t=5) que destacan numéricamente frente al resto de su fila. La ausencia de una columna o fila con valores sistemáticamente más altos confirma que ningún tiempo ni concentración favorece de forma consistente una mayor producción de PNP.

Figura 1. Evolución temporal de la absorbancia del grupo experimental por concentración de *L. acidophilus* (medianas, n=8)

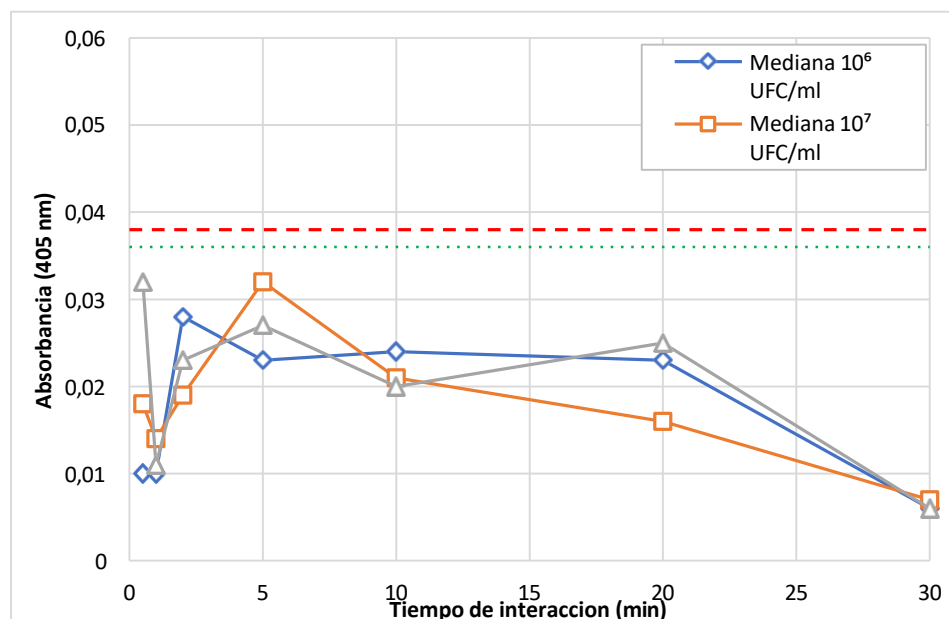


Figura 1. Evolución temporal de la absorbancia (405 nm) del grupo experimental por concentración de *L. acidophilus* (medianas, n=8). La línea discontinua indica el nivel del control positivo (Abs=0.038). Los valores del grupo experimental se mantienen consistentemente en el rango del control negativo o por debajo del control positivo.

Interpretación de la Figura 1:

Las tres curvas oscilan sin tendencia ascendente ni descendente clara, y ninguna línea logra cruzar ni acercarse a la línea roja del control positivo en ningún punto del eje temporal. El patrón (subidas y bajadas irregulares) es característico de ruido biológico más que de una cinética enzimática real, reforzando visualmente que no existe producción neta sostenida de PNP a lo largo del tiempo evaluado.

Tabla 2. Resumen estadístico del grupo experimental: promedio, DE, CV%, mediana y valores extremos por concentración y tiempo (n = 8).

t (min)	Concentración (UFC/ml)	Prom.	DE	CV%	Mediana	Mín-Máx
0.5	10 ⁶	0.016	0.019	120.6	0.010	0.003-0.061
	10 ⁷	0.014	0.010	73.4	0.018	0.000-0.027
	10 ⁸	0.034	0.014	40.5	0.032	0.016-0.057
1	10 ⁶	0.009	0.006	67.5	0.010	0.001-0.019
	10 ⁷	0.013	0.006	42.9	0.014	0.001-0.019
	10 ⁸	0.010	0.006	59.1	0.011	0.001-0.017
2	10 ⁶	0.028	0.008	28.7	0.028	0.019-0.044
	10 ⁷	0.023	0.014	61.5	0.019	0.009-0.050
	10 ⁸	0.028	0.009	33.8	0.023	0.018-0.047
5	10 ⁶	0.036	0.030	82.2	0.023	0.016-0.099
	10 ⁷	0.071	0.065	91.0	0.032	0.023-0.184
	10 ⁸	0.054	0.074	136.7	0.027	0.013-0.236
10	10 ⁶	0.071	0.120	169.0	0.024	0.012-0.364
	10 ⁷	0.021	0.011	51.9	0.021	0.007-0.037
	10 ⁸	0.020	0.008	40.3	0.020	0.006-0.034
20	10 ⁶	0.023	0.013	55.9	0.023	0.005-0.048
	10 ⁷	0.016	0.005	28.1	0.016	0.011-0.025
	10 ⁸	0.024	0.008	33.6	0.025	0.012-0.036
30	10 ⁶	0.007	0.004	54.7	0.006	0.003-0.012
	10 ⁷	0.039	0.092	235.6	0.007	0.001-0.265
	10 ⁸	0.008	0.007	83.6	0.006	0.002-0.020

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la Tabla 2:

Cinco de las 21 combinaciones (23.8%) presentan CV% superior a 100%, concentrándose en $t=5$ y $t=10$ min para las tres concentraciones, sugiriendo que ese intervalo temporal intermedio es el más propenso a variabilidad por outliers. En contraste, $t=20$ min muestra los CV% más bajos y homogéneos entre concentraciones (28.1%-33.6%), indicando mayor estabilidad del sistema en ese punto. La columna "Mediana" se mantiene siempre por debajo de 0.034 UA, sin excepción, validando la conclusión de supresión incluso al excluir el efecto de outliers.

4.2. Cálculo de la actividad enzimática del extracto crudo de β -glucuronidasa

Tabla 3. Cálculo de la actividad enzimática del extracto crudo de β -glucuronidasa (U/ml) por concentración de *L. acidophilus* y tiempo de interacción.

t (min)	Conc. (UFC/ml)	Abs neta (prom.)	[PNP] (μ mol/ml)	Actividad (U/ml)	Interpretación
C+	—	0.038	0.00366	N/A*	Señal basal del extracto crudo
0.5	10^6	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
0.5	10^7	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
0.5	10^8	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
1	10^6	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
1	10^7	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
1	10^8	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
2	10^6	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
2	10^7	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
2	10^8	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
5	10^6	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
5	10^7	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
5	10^8	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
10	10^6	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
10	10^7	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
10	10^8	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
20	10^6	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
20	10^7	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
20	10^8	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
30	10^6	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
30	10^7	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable
30	10^8	≤ 0	≤ 0	≤ 0	Sin actividad neta detectable

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la Tabla 3:

La uniformidad absoluta del resultado " ≤ 0 " en las 21 filas —sin una sola excepción— es en sí misma un hallazgo estadísticamente relevante: indica que el fenómeno de supresión no depende del azar ni de una combinación específica de tiempo-concentración, sino que es un efecto sistemático y reproducible de la presencia de *L. acidophilus* sobre la señal enzimática del extracto crudo.

4.3. Resultados del montaje de controles del ensayo de actividad enzimática

Tabla 4. Grupos control del ensayo de actividad enzimática (n=8).

Grupo Control	Composición
Control positivo	Buffer + extracto enzimático + PNPG
Control negativo	Buffer + PNPG (sin enzima, sin bacteria)
Control bacterias 10^6	Buffer + <i>L. acidophilus</i> 10^6 + PNPG
Control bacterias 10^7	Buffer + <i>L. acidophilus</i> 10^7 + PNPG
Control bacterias 10^8	Buffer + <i>L. acidophilus</i> 10^8 + PNPG

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la Tabla 4:

El diseño de cinco grupos control permite aislar cada fuente de variación: el control positivo establece la señal enzimática máxima esperable, el negativo el ruido de fondo del sistema, y los tres controles bacterianos cuantifican específicamente la interferencia óptica que aporta cada concentración de *L. acidophilus* por sí sola, sin enzima presente.

Tabla 5. Absorbancia (405 nm) de los grupos control del ensayo de actividad enzimática (n = 8).

GRUPO CONTROL	1	2	3	4	5	6	7	8	Prom.	DE	CV%
Control positivo	0.065	0.022	0.021	0.036	0.036	0.055	0.031	0.036	0.038	0.015	40.3
Control negativo	0.012	0.026	0.022	0.012	0.072	0.043	0.059	0.040	0.036	0.022	61.1
C. bacterias 10^6	0.332	0.358	0.278	0.143	0.318	0.289	0.401	0.257	0.297	0.077	26.1
C. bacterias 10^7	0.071	0.109	0.270	0.170	0.353	0.114	0.025	0.436	0.194	0.145	75.0
C. bacterias 10^8	0.195	0.142	0.182	0.163	0.217	0.187	0.163	0.160	0.176	0.024	13.5

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la Tabla 5:

Los CV% del C+ (40.3%) y C- (61.1%) son elevados pese a valores absolutos bajos, reflejando que ambos controles miden esencialmente ruido analítico sin señal real dominante. En contraste, el control bacteriano a 10^8 UFC/ml presenta el CV% más bajo de la tabla (13.5%), sugiriendo que a mayor concentración celular la turbidez se vuelve más estable y reproducible entre réplicas, mientras que a 10^7 UFC/ml la variabilidad es máxima (CV%=75.0%), posiblemente por agregación celular irregular.

Figura 2. Absorbancia promedio de los grupos control (n=8)

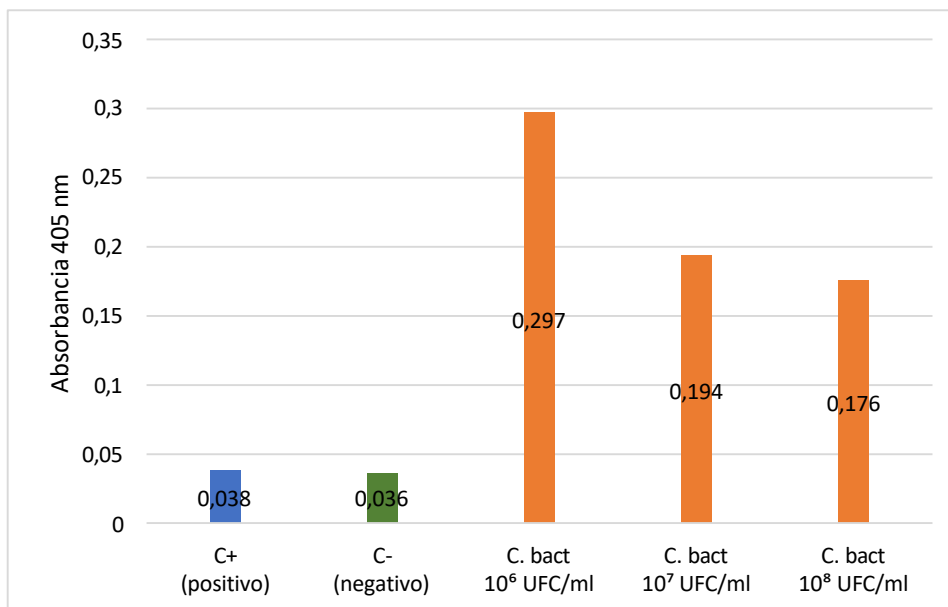


Figura 2. Absorbancia promedio (405 nm) de los grupos control. C+ = control positivo (extracto enzimático + PNPG); C- = control negativo (solo PNPG). Los controles de bacterias reflejan interferencia óptica por turbidez y no actividad β -glucuronidasa real.

Interpretación de la Figura 2:

El contraste visual es contundente: las dos primeras barras (C+ y C-) son prácticamente indistinguibles en altura, mientras que las tres barras de controles bacterianos se elevan abruptamente, multiplicando por 5 a 8 veces el nivel del C+. Este "salto" visual confirma que la señal dominante en el sistema proviene de la turbidez bacteriana y no de actividad enzimática, justificando por qué no puede interpretarse la absorbancia experimental sin antes restar esta interferencia.

4.4. Resultados de la preparación del sustrato p-nitrofenil-β-D-glucurónido (PNPG)

La concentración molar se determinó mediante la siguiente expresión:

$$M = \frac{\text{masa}}{PM \cdot \text{volumen}}$$
$$M = \frac{0.05}{315.23 \times 0.01} \approx 0.0159 \text{ mol/L}$$

Sustituyendo en la ecuación:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$16 \cdot V_1 = 1 \cdot 10$$

$$V_1 = 0.625 \text{ ml}$$

Donde:

- $C_1 = 16 \text{ mM}$ (concentración de la solución stock)
- $C_2 = 1 \text{ mM}$ (concentración final deseada)
- $V_2 = 10 \text{ ml}$ (volumen final)

Obteniéndose así un volumen final de 10 ml de solución de trabajo a 1 mM.

4.5. Curva estándar de p-nitrofenol (PNP) para conversión Abs (405 nm) a concentración molar

Tabla 6. Valores de absorbancia (405 nm) de las soluciones estándar de p-Nitrofenol (PNP) a distintas concentraciones (n=3).

Concentración (mM)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	DE	CV (%)
0.10	0.546	0.570	0.568	0.561	0.013	2.37
0.25	1.352	1.384	1.425	1.387	0.037	2.64
0.50	2.720	2.738	2.778	2.745	0.030	1.08
0.75*	3.621	3.588	3.539	3.582*	0.041*	1.15 *
1.00*	3.727	3.682	3.674	3.694*	0.029*	0.77 *

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la Tabla 6:

Las absorbancias crecen proporcionalmente con la concentración hasta 0.50 mM (CV% entre 1.08% y 2.64%, evidenciando alta precisión instrumental), pero a partir de 0.75 mM el incremento se atenúa bruscamente (solo 0.112 UA de diferencia respecto a 0.50 mM, frente a un salto de 1.358 UA entre 0.10 y 0.50 mM), confirmando numéricamente la pérdida de linealidad del detector a concentraciones elevadas.

Figura 3. Curva estándar de p-Nitrofenol (rango lineal 0.1-0.5nM)

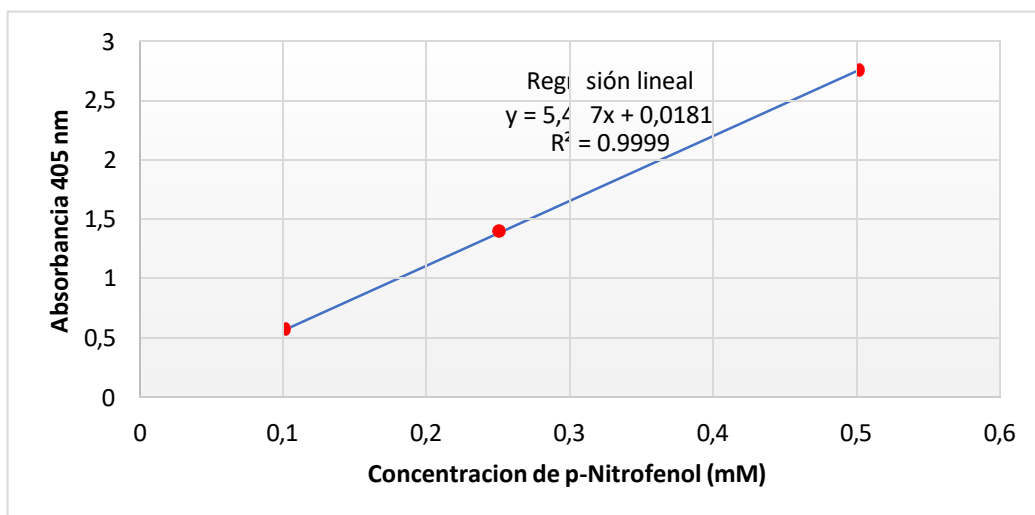


Figura 3. Curva estándar de p-Nitrofenol (PNP) en el rango lineal (0.1–0.5 mM). Los puntos representan el promedio de tres lecturas. La línea continua corresponde al ajuste lineal ($R^2 = 0.9999$). Los puntos de 0.75 y 1.0 mM fueron excluidos del ajuste por saturación del detector.

Interpretación de la Figura 3:

La trayectoria prácticamente recta de los tres puntos graficados confirma visualmente la excelente linealidad ($R^2 = 0.9999$) del sistema en el rango validado. La pendiente pronunciada y constante ($5.4573 \text{ Abs} \cdot \text{mM}^{-1}$) indica alta sensibilidad del método: pequeños cambios en la concentración de PNP generan cambios claramente detectables en la absorbancia, lo que valida su uso para estimar con precisión la actividad enzimática en los ensayos posteriores.

4.6. Recuento de *Lactobacillus acidophilus* y preparación de suspensiones experimentales

Tabla 7. Cálculo de la concentración del cultivo stock de *L. acidophilus* por el método de recuento en placa.

Dilución seleccionada	Colonias promedio (triplicado)	Volumen sembrado (ml)	Factor de dilución	UFC/ml
10^{-8}	1	0.1	10^8	1×10^9

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la Tabla 7:

El recuento de 1 colonia/placa a dilución 10^{-8} es un valor bajo pero contable, situado en el límite inferior aceptable para recuentos confiables (idealmente 30-300 colonias/placa). Esto evidencia que el cultivo, aunque viable, no alcanzó una densidad celular máxima, posiblemente por las condiciones microaerófilas subóptimas durante la incubación.

Tabla 8. Preparación de suspensiones experimentales de *L. acidophilus* a tres concentraciones.

Concentración objetivo (UFC/ml)	Volumen de stock (ml)	Buffer fosfato (ml)	Volumen final (ml)
1×10^6	0.01	9.99	10
1×10^7	0.10	9.90	10
1×10^8	1.00	9.00	10

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la Tabla 8:

El volumen de stock requerido aumenta en proporción geométrica ($0.01 \rightarrow 0.10 \rightarrow 1.00$ ml) para lograr concentraciones que también aumentan en factor de 10, manteniendo siempre el volumen final en 10 ml. Esto confirma que las diluciones se ejecutaron correctamente según la ecuación $C_1V_1 = C_2V_2$, garantizando la trazabilidad y reproducibilidad de cada suspensión experimental preparada.

4.7. Análisis estadístico inferencial

Los datos obtenidos para el grupo experimental mostraron que presentaban distribución no normal (personas de entre 28% en todos los grupos experimentales analizados), así que se aplicaron técnicas estadísticas no paramétricas (Kruskal-Wallis y Mann-Whitney U), consideradas adecuadas para datos con distribución asimétrica o para muestras de tamaño pequeño hasta medio.

4.7.1. Prueba de Kruskal-Wallis

Tabla 9. Prueba de Kruskal-Wallis: estadístico H, sumas de rangos y p-valor por tiempo.

t (min)	R ₁ (10 ⁶)	R ₂ (10 ⁷)	R ₃ (10 ⁸)	N	H	p	Decisión
0.5	71.50	80.00	148.50	24	8.923	0.012	Rechaza H ₀ *
1	81.00	124.00	95.00	24	2.428	0.297	No rechaza H ₀
2	113.00	72.50	114.50	24	2.851	0.240	No rechaza H ₀
5	79.00	122.00	99.00	24	2.317	0.314	No rechaza H ₀
10	126.00	89.50	84.50	24	2.577	0.276	No rechaza H ₀
20	108.50	69.50	122.00	24	3.726	0.155	No rechaza H ₀
30	102.00	100.00	98.00	24	0.020	0.990	No rechaza H ₀

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la Tabla 9:

Comparando las sumas de rangos por fila, se observa que el grupo 10⁸ UFC/ml (R₃) lidera en 4 de los 7 tiempos (0.5, 2, 20 y parcialmente otros), mientras que en t=30 min los tres grupos prácticamente empatan (102.00, 100.00, 98.00 — diferencia menor a 4 unidades), produciendo el H más bajo de toda la tabla (0.020). Solo en t=0.5 min la diferencia entre rangos es lo suficientemente amplia (148.50 vs 71.50-80.00) para alcanzar significancia estadística.

Figura 4. Análisis Kruskal-Wallis a t = 0.5 min

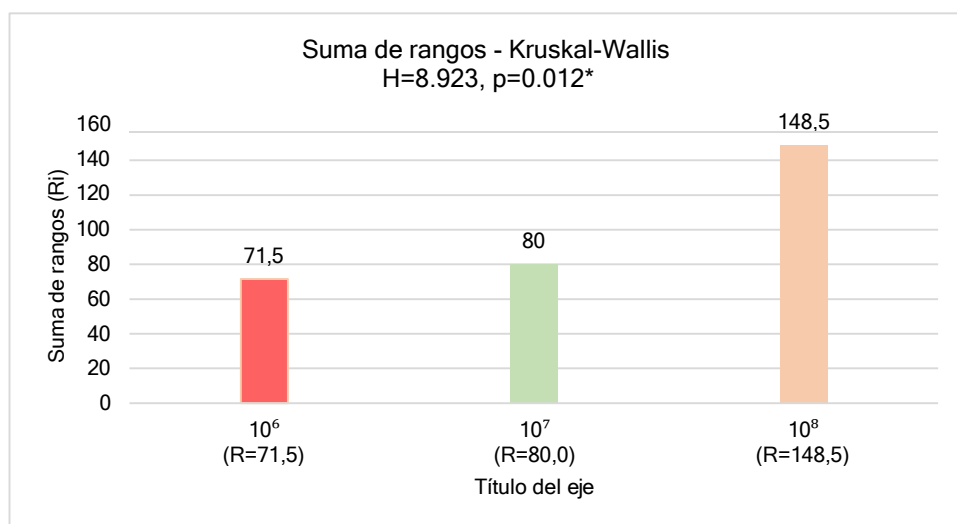


Figura 4. Kruskal-Wallis a t=0.5 min. Sumas de rangos R_i . El grupo 10^8 presenta rango marcadamente superior.

Interpretación de la Figura 4:

En la figura se muestra el análisis de Kruskal-Wallis realizado a los 0,5 minutos de interacción, evidenciando diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones evaluadas de *Lactobacillus acidophilus* ($H = 8,923$; $p = 0,012$). El grupo correspondiente a 10^8 UFC/mL presentó la mayor suma de rangos ($R = 148,5$), superando ampliamente a los grupos 10^7 UFC/mL ($R = 80,0$) y 10^6 UFC/mL ($R = 71,5$). Asimismo, los valores de 10^6 y 10^7 UFC/mL fueron relativamente similares entre sí, mientras que la concentración de 10^8 UFC/mL mostró un comportamiento claramente diferenciado, lo que indica que sus mediciones tendieron a ser mayores en comparación con las demás concentraciones evaluadas durante este tiempo de interacción.

4.7.2. Prueba de Mann-Whitney U

Tabla 10. Prueba de Mann-Whitney U: C+ vs cada concentración experimental.

Comparación	n C+	n exp	W C+	W exp	U ₁	U ₂	U (min)	p
C+ vs 10 ⁶	8	56	402	1678	82	366	82	0.004*
C+ vs 10 ⁷	8	56	409	1671	75	373	75	0.003*
C+ vs 10 ⁸	8	56	393	1687	91	357	91	0.007*

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la Tabla 10:

Los valores U (75, 82 y 91) son notablemente bajos respecto al máximo teórico posible ($n_1 \times n_2 = 448$), ubicándose todos muy próximos al extremo inferior de la distribución. La comparación con 10⁷ UFC/ml obtuvo el p-valor más pequeño (0.003) y el U más bajo (75), sugiriendo que esa concentración intermedia produjo la separación más marcada respecto al control positivo entre las tres evaluadas.

Figura 5. Suma de rangos - Mann Whitney C+ vs cada concentración (n C+ = 8, n exp = 56)

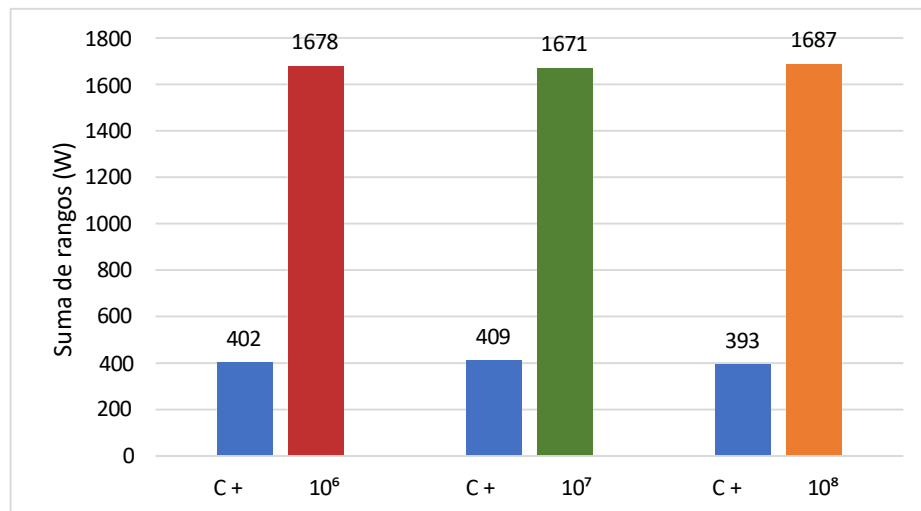


Figura 5. Sumas de rangos (W) del C+ y cada grupo experimental (Mann-Whitney). Los valores de W exp (barra roja, naranja y verde) superan ampliamente a W C+ (azul), indicando que los valores del C+ tienden a tener rangos más altos, es decir absorbancias mayores que el grupo experimental

Interpretación de la Figura 5:

La desproporción visual es evidente: la barra roja del C+ apenas alcanza 402 unidades mientras las tres barras experimentales superan las 1670 unidades — más de cuatro veces su longitud. Esta diferencia masiva en las sumas de rangos, pese a que el C+ tiene solo 8 observaciones frente a 56 del grupo experimental, confirma que prácticamente todas las observaciones del C+ ocupan las posiciones más altas (mayor absorbancia) dentro del ordenamiento conjunto.

Resumen del análisis estadístico inferencial:

Tabla 11. Prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de las tres concentraciones de *L. acidophilus* en cada tiempo de interacción.

Tiempo (min)	n por grupo	H (estadístico)	gl	p	Conclusión
0.5	8	8.923	2	0.012	Sig. *
1	8	2.428	2	0.297	No sig.
2	8	2.851	2	0.240	No sig.
5	8	2.317	2	0.314	No sig.
10	8	2.577	2	0.276	No sig.
20	8	3.726	2	0.155	No sig.
30	8	0.020	2	0.990	No sig.

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la Tabla 11:

El análisis comparativo entre las tres concentraciones de *L. acidophilus* (10^6 , 10^7 y 10^8 UFC/ml) reveló diferencias estadísticamente significativas únicamente en el tiempo de interacción más corto, $t = 0.5$ min ($H = 8.923$; $p = 0.012$). En los seis tiempos restantes (1 a 30 min), los valores de p oscilaron entre 0.155 y 0.990, muy por encima del umbral de significancia ($\alpha = 0.05$), indicando que no existen diferencias entre las tres concentraciones evaluadas a partir del primer minuto de interacción.

Esto sugiere que el efecto inicial observado a los 0.5 min — probablemente vinculado a la mayor masa bacteriana del grupo 10^8 UFC/ml generando interferencia óptica residual— se diluye

rápidamente, y que la concentración de *L. acidophilus* no determina la magnitud del efecto supresor dentro del rango evaluado. En otras palabras, no hay una relación dosis-respuesta sostenida en el tiempo.

Tabla 12. Prueba de Mann-Whitney U: comparación del control positivo versus cada grupo experimental (todos los tiempos agrupados).

Comparación	n C+	n grupo exp.	U	p bilateral	Sig.
C+ vs 10 ⁶ UFC/ml	8	56	366.0	0.004	*
C+ vs 10 ⁷ UFC/ml	8	56	373.0	0.003	*
C+ vs 10 ⁸ UFC/ml	8	56	357.0	0.007	*

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la Tabla 12:

Al comparar cada grupo experimental contra el control positivo (extracto crudo sin bacteria), los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas en las tres concentraciones evaluadas.

Todos los valores p son menores a 0.01, lo que confirma con alta confianza estadística que la presencia de *L. acidophilus*, independientemente de su concentración, suprime significativamente la señal enzimática del extracto crudo de β -glucuronidasa respecto al sistema sin bacteria.

4.7.3. Interpretación integrada de los resultados

Los resultados de Kruskal-Wallis firmaron la existencia de diferencias solamente en el tiempo instantáneo $t = 0.5$ min ($H = 8.923$, $p = 0.012$), que se deben a que el grupo 10^8 UFC/ml presenta valores mucho más elevados que 10^6 y 10^7 en dicho instante ($R_3 = 148.50$ vs $R_1 = 71.50$ y $R_2 = 80.00$). En los seis tiempos restantes (1-30 min) se registraron diferencias no significativas entre concentraciones ($p = 0.155-0.990$). Esto implica que, desde el minuto uno, el efecto de la concentración bacteriana en la señal de absorbancia se homogeneiza.

Los resultados del test de Mann-Whitney nos permitieron firmar que los valores del grupo experimental son significativamente inferiores que los registrados en el control positivo, en las tres concentraciones evaluadas ($p < 0.01$). Esto también señala la carencia de capacidad de incrementar la actividad β -glucuronidasa del extracto crudo sobre PNPG por efecto de *L. acidophilus*, pues los valores de absorbancia neta del sistema completo se hallan por debajo de los niveles basales del extracto crudo solo. Este hallazgo es consistente con el hallado en estudios previos que han descrito efectos inhibitorios o de modulación de lactobacilos sobre la β -glucuronidasa.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

➤ Absorbancia del grupo experimental y supresión de la señal enzimática

Las absorbancias del grupo experimental (extracto crudo + *L. acidophilus* + PNPG) presentaron medianas entre 0.006 y 0.034 UA, consistentemente por debajo del control positivo (mediana = 0.036 UA) en todos los tiempos y concentraciones evaluados. La absorbancia neta corregida fue ≤ 0 en todos los grupos, resultando en una actividad enzimática neta de ≤ 0 U/ml. Este hallazgo es el resultado central del estudio y responde directamente al objetivo general.

La hipótesis general plantea que "*L. acidophilus* modifica la actividad del extracto enzimático crudo de β -glucuronidasa sobre PNPG". Los resultados la sugieren: la presencia de la bacteria modifica la señal enzimática, reduciéndola de forma consistente y estadísticamente significativa. La modificación observada es en sentido supresor, lo que tiene implicaciones farmacológicas relevantes dado el rol de la GUS en la recirculación enterohepática de fármacos glucuronidados.

Este resultado es concordante con el antecedente más cercano al trabajo: Mahdy et al. (2023) demostraron que la mezcla de *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus* redujo

significativamente la expresión del gen GUS de *E. coli* in vitro, y que esta reducción se tradujo en menor toxicidad intestinal por irinotecán en modelos murinos. El presente estudio extiende esta evidencia al demostrar que incluso *L. acidophilus* en forma individual —a concentraciones compatibles con formulaciones comerciales de probióticos— es capaz de suprimir la señal enzimática detectable de un extracto crudo de β -glucuronidasa. Mego et al. (2024) van más allá, demostrando en un ensayo clínico con 279 pacientes oncológicos que la administración de probióticos reduce la diarrea inducida por irinotecán mediante la disminución de la actividad intestinal de β -D-glucuronidasa, lo que otorga relevancia clínica directa a los hallazgos obtenidos in vitro en el presente trabajo.

En cuanto a los mecanismos que explicarían la supresión observada, el marco teórico del estudio contempla la producción de ácidos orgánicos con reducción del pH local, la adsorción de proteínas del extracto crudo a la superficie bacteriana, y la posible competencia cinética por el sustrato PNP. El primero de estos mecanismos cobra especial relevancia considerando el pKa del PNP (7.15): si *L. acidophilus* reduce el pH del microambiente de reacción por debajo de 7.15 mediante producción de ácido láctico, el PNP generado permanece en su forma protonada e incolora, reduciendo la absorbancia registrada aunque haya actividad enzimática real en el sistema. Esta interferencia analítica pH-dependiente es independiente de la actividad catalítica y puede contribuir de forma significativa a los resultados observados. Simpson et al. (2024), publicado en *Cell Host & Microbe*, documentaron que diversas

estrategias terapéuticas —incluyendo la modificación del pH intraluminal— pueden modular el ciclo catalítico de las GUS bacterianas intestinales, afectando la homeostasis de endobióticos y xenobióticos glucuronidados.

➤ **Validación del sistema analítico: Curva estándar de PNP**

La curva estándar de p-nitrofenol (PNP) mostró excelente linealidad en el rango de 0.1 a 0.5 mM ($R^2 = 0.9999$, pendiente = $5.4573 \text{ Abs} \cdot \text{mM}^{-1}$, CV% entre 1.08% y 2.64%), confirmando la idoneidad del método espectrofotométrico a 405 nm para cuantificar el PNP generado por hidrólisis enzimática del PNPG. Los puntos de 0.75 y 1.0 mM fueron excluidos del ajuste lineal por presentar saturación del detector (diferencia de Abs = 0.112 UA), fenómeno que constituye una desviación de la Ley de Beer-Lambert intrínseca al instrumento.

Este hallazgo se alinea con el marco teórico del estudio y con la literatura especializada. Wang et al. (2021) documentan que el ensayo colorimétrico con PNPG como sustrato de β -glucuronidasa es altamente sensible y reproducible cuando se restringe al rango de linealidad validado, siendo 0.1-0.5 mM el rango más frecuentemente reportado en ensayos de actividad GUS in vitro. Ebuzoeme et al. (2021) —en un estudio que validó metodológicamente el uso de PNPG como sustrato estándar para GUS microbiana intestinal— señalan que el pH del buffer, la preparación del extracto y el tiempo de reacción son variables críticas que determinan la sensibilidad del sistema analítico, lo que respalda las condiciones experimentales

empleadas en el presente trabajo. Asimismo, la detección espectrofotométrica a 405 nm del PNP liberado como producto de la hidrólisis catalizada por β -glucuronidasa bacteriana es reconocida como método de referencia en ensayos de actividad GUS, dado que el ensayo ha sido desarrollado para detectar β -glucuronidasa mediante la escisión de p-nitrofenil β -D-glucurónido para producir un producto cromofórico monitoreable por el aumento de absorbancia a 405 nm, siendo altamente sensible.

➤ **Concentración del stock de *L. acidophilus* y preparación de suspensiones**

El recuento por extensión en agar PCA + TTC a dilución 10^{-8} arrojó 1 colonia/placa en triplicado, obteniéndose un stock de 1×10^9 UFC/ml. Las suspensiones experimentales a 10^6 , 10^7 y 10^8 UFC/ml fueron preparadas mediante la ecuación $C_1V_1 = C_2V_2$, procedimiento estándar en microbiología experimental.

Las concentraciones empleadas son fisiológicamente relevantes y metodológicamente coherentes. Purdel et al. (2023) establecen que las concentraciones bacterianas de 10^6 a 10^9 UFC/ml corresponden a las densidades celulares presentes fisiológicamente en distintos tramos del intestino delgado y del colon humano, validando la elección de los niveles experimentales evaluados. Mahdy et al. (2023), en el antecedente internacional más cercano al presente trabajo, emplearon concentraciones similares de *L. acidophilus* al evaluar in vitro su efecto sobre la β -glucuronidasa de *E. coli*, observando reducción significativa de la expresión génica de GUS, lo que contextualiza los resultados obtenidos.

La escasa producción de colonias a dilución 10^{-8} (1 colonia/placa) podría atribuirse a que el cultivo en caldo BHI no alcanzó su máxima densidad celular, o a que las condiciones microaerófilas generadas mediante vela en recipiente cerrado no fueron óptimas para el crecimiento masivo de *L. acidophilus*. Esta especie presenta tasas de crecimiento más lentas que las bacterias aerobias estrictas, lo que es consistente con su naturaleza anaerobia facultativa y sus requerimientos metabólicos específicos. No obstante, la concentración de 10^9 UFC/ml del stock resultó suficiente para preparar los tres niveles experimentales requeridos con precisión adecuada.

➤ **Actividad basal del control positivo y limitación metodológica del extracto crudo**

El control positivo (extracto crudo + PNPG) presentó una absorbancia media de 0.038 ± 0.015 UA (CV% = 40.3%), prácticamente idéntica al control negativo (buffer + PNPG: 0.036 ± 0.022 UA). Esta mínima diferencia de 0.002 UA —dentro del margen de variabilidad instrumental— constituye la limitación metodológica central del estudio: la actividad catalítica del extracto crudo fue marginal en las condiciones del ensayo.

Contrastando con la hipótesis específica que plantea que "el extracto crudo de β -glucuronidasa presenta actividad catalítica medible sobre PNPG en condiciones controladas", puede afirmarse que la actividad fue técnicamente registrada pero no significativamente diferenciable del ruido de fondo del sistema

reactivo. Esta limitación es inherente al método de permeabilización empleado.

Wang et al. (2021) documentan que los métodos de permeabilización química suave —EDTA más detergente no iónico— generan extractos con menor rendimiento enzimático en comparación con la sonicación o los ciclos de congelación-descongelación, debido a que actúan principalmente sobre la membrana externa bacteriana sin acceder eficientemente al contenido citoplasmático. Esta observación es crítica para el presente estudio, dado que la β -glucuronidasa de *E. coli* es predominantemente intracelular. Gao et al. (2022) corroboran esta naturaleza intracelular de la GUS de *E. coli*, señalando que los métodos de extracción incompleta pueden subestimar considerablemente la actividad enzimática total presente en las células. Ebuzoeme et al. (2021) añaden que la preparación del extracto enzimático es una de las variables más determinantes en la variabilidad de los resultados de actividad GUS, observando que la sonicación incrementó significativamente el rendimiento proteico total y la actividad enzimática recuperada en comparación con métodos más suaves.

Este conjunto de evidencias respalda la necesidad de emplear métodos de obtención del extracto con mayor poder de disrupción celular en estudios futuros, tal como se recomienda en las conclusiones del presente trabajo.

➤ **Interferencia óptica de los controles bacterianos**

Los controles bacterianos (*L. acidophilus* + PNPG, sin extracto) registraron absorbancias medias entre 0.176 (10^8 UFC/ml) y 0.297 UA (10^6 UFC/ml), muy superiores a los controles positivo y negativo. Este hallazgo, lejos de constituir un resultado enzimático, refleja la dispersión de Rayleigh generada por las suspensiones bacterianas sobre la luz incidente a 405 nm.

El marco teórico del estudio anticipa este fenómeno en el apartado de limitaciones, señalando que "la turbidez de las suspensiones bacterianas puede generar señal óptica inespecífica a 405 nm —efecto reconocido como dispersión de Rayleigh—". Dikeocha et al. (2022), en el contexto de la pharmacomicrobiomics, advierten que en ensayos con células bacterianas intactas, la turbidez genera señales ópticas inespecíficas que pueden confundirse con la absorbancia del producto enzimático, especialmente cuando ambas se miden en rangos de longitud de onda similares. Candeliere et al. (2022) señalan en este mismo sentido que los ensayos de actividad GUS con suspensiones bacterianas requieren controles de turbidez rigurosos para una interpretación correcta de los datos.

La mayor absorbancia del control 10^6 UFC/ml (0.297 UA) respecto al control 10^8 UFC/ml (0.176 UA) resulta aparentemente paradójica pero es explicable: a menor concentración bacteriana, las células individuales tienen mayor probabilidad de permanecer en suspensión homogénea sin agregarse entre sí, generando mayor dispersión óptica por partícula. A mayor concentración, tiende a

formarse más sedimentación y agregación celular, reduciendo la dispersión efectiva. Este fenómeno es consistente con la física de coloides bacterianos y respalda la necesidad del control bacteriano específico para cada concentración, tal como fue implementado en el diseño experimental del presente estudio.

La corrección mediante absorbancia neta ($Abs_{neta} = Abs_{experimental} - Abs_{control_bacteria}$) es metodológicamente indispensable y constituye una fortaleza del diseño, garantizando que la señal analizada refleje exclusivamente la interacción enzima-bacteria-sustrato, sin contaminación por señal óptica inespecífica.

➤ **Análisis estadístico: Kruskal-Wallis y Mann-Whitney**

La prueba de Kruskal-Wallis detectó diferencias significativas entre concentraciones únicamente a $t = 0.5$ min ($H = 8.923$; $p = 0.012$), atribuibles al rango marcadamente superior del grupo 10^8 UFC/ml ($R_3 = 148.50$ vs $R_1 = 71.50$ y $R_2 = 80.00$). En los seis tiempos restantes no se detectaron diferencias entre concentraciones ($p = 0.155$ - 0.990). La prueba de Mann-Whitney confirmó que los valores del grupo experimental son significativamente menores que el control positivo en las tres concentraciones ($p < 0.01$).

La hipótesis específica sobre diferencias significativas entre grupos experimentales y controles se confirma para la comparación experimental vs control positivo (Mann-Whitney, $p < 0.01$ en los tres grupos), pero no se confirma una relación dosis-respuesta consistente entre concentración bacteriana y magnitud de supresión.

La ausencia de relación dosis-respuesta en la mayoría de los tiempos evaluados es consistente con lo reportado por Zhang et al. (2024), quienes observaron que en sistemas in vitro estáticos el efecto de los probióticos sobre la actividad enzimática no siempre exhibe relación lineal dosis-dependiente, especialmente cuando la señal enzimática basal es baja y la variabilidad intersistema es elevada. Los elevados CV% observados (hasta 235.6% en el grupo 10^7 UFC/ml a $t = 30$ min) reflejan alta heterogeneidad entre réplicas, posiblemente relacionada con la distribución no homogénea de las células bacterianas en el volumen reducido de reacción (400 μ l en tubos Eppendorf). En sistemas de mayor volumen o con agitación continua, esta distribución podría ser más homogénea, reduciendo la variabilidad. Candeliere et al. (2022) documentaron que la alta variabilidad interindividual en la actividad GUS intestinal es una característica inherente a los sistemas biológicos que involucran bacterias, lo que respalda la adopción de la mediana como estadístico de tendencia central en el presente estudio.

La significancia observada únicamente a $t = 0.5$ min puede explicarse porque en ese instante inicial, la mayor masa bacteriana del grupo 10^8 UFC/ml genera mayor dispersión óptica residual —no completamente corregida por la corrección de turbidez— que eleva artificialmente su absorbancia respecto a las otras concentraciones. Esta diferencia se diluye en la variabilidad del sistema a tiempos mayores, reflejando la naturaleza dinámica de las interacciones entre las bacterias, el extracto enzimático y el sustrato PNPG en el tiempo.

Desde el punto de vista farmacológico, la reducción de la señal enzimática asociada a la presencia de *L. acidophilus* tiene implicaciones clínicas que trascienden el modelo in vitro. Weersma et al. (2020) documentan que la interacción entre fármacos y microbioma intestinal es bidireccional y puede determinar la eficacia terapéutica y el perfil de toxicidad de numerosos medicamentos de uso frecuente. En el contexto específico de fármacos metabolizados por β -glucuronidasa, una reducción de la actividad GUS intestinal disminuiría la desconjugación de glucurónidos de irinotecán, diclofenaco y estrógenos conjugados, reduciendo su reabsorción entero-hepática y potencialmente su toxicidad gastrointestinal, tal como fue demostrado clínicamente por Mego et al. (2024). Dikeocha et al. (2022) señalan que la pharmacomicrobiomics como disciplina emergente requiere precisamente este tipo de estudios que caractericen las interacciones específicas entre cepas probióticas y enzimas microbianas individuales, para poder predecir con mayor exactitud las consecuencias clínicas del uso concomitante de probióticos y medicamentos.

CONCLUSIONES

- PRIMERA** La señal de absorbancia que produce el extracto enzimático crudo de β -glucuronidasa sobre el sustrato PNPG se ve claramente alterada cuando se añade *Lactobacillus acidophilus* en el sistema de reacción in vitro. Ésta se encuentra estadísticamente significativamente por debajo del control positivo en las tres concentraciones ejecutadas (10^6 , 10^7 y 10^8 UFC/ml), como indica la prueba de Mann-Whitney ($p < 0.01$ en todos los casos).
- SEGUNDA** Se analizó el extracto crudo de β -glucuronidasa obtenido por permeabilización química de *E. coli* ATCC 25922 con EDTA/Tween 80 se obtuvo un valor basal enzimático de 0.038 ± 0.015 UA a 405 nm, prácticamente el mismo que el control negativo (0.036 ± 0.022 UA). Estos evidencian que la actividad catalítica del extracto crudo era marginal, por lo que los resultados deben interpretarse principalmente como variaciones de señal enzimática aparente y no como una medición absoluta de actividad β -glucuronidasa purificada.
- TERCERA** El tiempo de interacción entre *L. acidophilus* y el extracto crudo no establece un patrón temporal claro de modulación de la actividad enzimática. Se encuentra que las absorbancias del grupo experimental siempre permanecen por debajo del control positivo en todos los

tiempos analizados (0.5-30 min), no evidenciando tendencia ni creciente ni decreciente de la actividad enzimática en función del tiempo, sugiriendo que el efecto modulador se establece ya en los primeros momentos y que después permanece relativamente estable.

CUARTA No existió una relación dosis-respuesta consistente entre la concentración de *L. acidophilus* (10^6 , 10^7 y 10^8 UFC/ml) y la magnitud de la supresión de la actividad enzimática del extracto crudo de β -glucuronidasa. La prueba de Kruskal-Wallis encontró diferencias significativas entre concentraciones solamente a $t = 0.5$ min ($H = 8.923$; $p = 0.012$), sin hallarse diferencias en los seis tiempos restantes ($p > 0.05$), lo que sugiere que un efecto supresor cualitativamente similar entre las tres concentraciones bacterianas evaluadas, en el rango de concentración estudiado.

RECOMENDACIONES

- Utilizar un método de aislamiento del extracto enzimático con el mayor rendimiento de β -glucuronidasa, como podría ser la sonicación en frío (3×30 s, 40% de amplitud, en baño de hielo) o ciclos de congelación-descongelación (3 ciclos, $-80^\circ\text{C} / 37^\circ\text{C}$), para aumentar la concentración enzimática del extracto e incrementar la sensibilidad del sistema analítico, concretando una señal del control positivo claramente diferenciada del control negativo.
- Validar la identidad molecular del *L. acidophilus* utilizado mediante PCR con cebadores para amplificar el gen 16S rRNA o por medio de la secuenciación de amplicones, y así reforzar la fundamentación microbiológica del estudio y descartar la posible contaminación del inóculo comercial de probióticos.
- Ampliar el estudio incluyendo otras cepas de *Lactobacillus* de interés clínico (*L. rhamnosus* GG, *L. reuteri*, *L. casei*) y comparar el efecto de unas cepas frente a otras y su efecto modulador del extracto crudo de β -glucuronidasa para evaluar si la supresión que se evidencia es específica de *L. acidophilus* o si es una característica de género.
- Valorar la relevancia clínica de los hallazgos mediante estudios preclínicos en modelos animales con la administración por vía oral de *L. acidophilus* y comprobar si la circulación enterohepática modificada de fármacos glucuronidados de interés clínico (irinotecán, diclofenaco, estrógenos conjugados) también

muestra una modulación con mediciones de parámetros farmacocinéticos y marcadores de toxicidad gastrointestinal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Su GL, Ko CW, Bercik P, Falck-Ytter Y, Sultan S, Weizman AV, et al. AGA Clinical Practice Guidelines on the Role of Probiotics in the Management of Gastrointestinal Disorders. *Gastroenterology*. 1 de agosto de 2020;159(2):697-705. doi:10.1053/j.gastro.2020.05.059 PubMed PMID: 32531291.
2. Milner E, Stevens B, An M, Lam V, Ainsworth M, Dihle P, et al. Utilizing Probiotics for the Prevention and Treatment of Gastrointestinal Diseases. *Front Microbiol*. 9 de agosto de 2021;12. doi:10.3389/fmicb.2021.689958
3. Statista [Internet]. [citado 1 de junio de 2026]. Probiotic supplements: market value in Latin America 2027. Disponible en: https://www.statista.com/statistics/971090/probiotic-dietary-supplement-market-value-latin-america/?srsltid=AfmBOor0dWbQVc52492XBHsaLiuNL1SQNzUp0hY526yhAx_nDTJBCgcw
4. Benedetti DC, Palacios JA. Los probióticos y su uso en el tratamiento de enfermedades. *Rev Cienc Bioméd*. 15 de enero de 2020;9(1):1. doi:10.32997/rcb-2020-3043
5. Impact of the Gut Microbiota Balance on the Health-Disease Relationship: The Importance of Consuming Probiotics and Prebiotics [Internet]. [citado 17 de mayo de 2026]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/6/1261>
6. Olvera-Rosales LB, Cruz-Guerrero AE, Ramírez-Moreno E, Quintero-Lira A, Contreras-López E, Jaimez-Ordaz J, et al. Impact of the

- Gut Microbiota Balance on the Health-Disease Relationship: The Importance of Consuming Probiotics and Prebiotics. *Foods*. junio de 2021;10(6):6. doi:10.3390/foods10061261
7. Zhang L, Chu CQ. Gut Microbiota-Medication Interaction in Rheumatic Diseases. *Front Immunol*. 3 de diciembre de 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.796865
 8. Javdan B, Lopez JG, Chankhamjon P, Lee YCJ, Hull R, Wu Q, et al. Personalized Mapping of Drug Metabolism by the Human Gut Microbiome. *Cell*. 25 de junio de 2020;181(7):1661-1679.e22. doi:10.1016/j.cell.2020.05.001 PubMed PMID: 32526207.
 9. Kim JK, Choi MS, Jeong JJ, Lim SM, Kim IS, Yoo HH, et al. Effect of Probiotics on Pharmacokinetics of Orally Administered Acetaminophen in Mice. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. febrero de 2018;46(2):122-30. doi:10.1124/dmd.117.077222 PubMed PMID: 29212822.
 10. A pathway linking atopic dermatitis to skin microbes: Cell Host & Microbe [Internet]. [citado 17 de mayo de 2026]. Disponible en: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(24\)00013-1?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312824000131%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(24)00013-1?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312824000131%3Fshowall%3Dtrue)
 11. Su GL, Ko CW, Bercik P, Falck-Ytter Y, Sultan S, Weizman AV, et al. AGA Clinical Practice Guidelines on the Role of Probiotics in the Management of Gastrointestinal Disorders. *Gastroenterology*. 1 de agosto de 2020;159(2):697-705. doi:10.1053/j.gastro.2020.05.059 PubMed PMID: 32531291.
 12. Gao S, Sun R, Singh R, So SY, Chan CTY, Savidge T, et al. The role of gut microbial beta-glucuronidases (gmGUS) in drug disposition and development. *Drug Discov Today*. octubre de 2022;27(10):103316.

doi:10.1016/j.drudis.2022.07.001 PubMed PMID: 35820618; PubMed Central PMCID: PMC9717552.

13. Gao S, Sun R, Singh R, Yu So S, Chan CTY, Savidge T, et al. The role of gut microbial β -glucuronidase in drug disposition and development. *Drug Discov Today*. 1 de octubre de 2022;27(10):103316. doi:10.1016/j.drudis.2022.07.001
14. Mahdy MS, Azmy AF, Dishisha T, Mohamed WR, Ahmed KA, Hassan A, et al. Irinotecan-gut microbiota interactions and the capability of probiotics to mitigate Irinotecan-associated toxicity. *BMC Microbiol*. 2 de marzo de 2023;23(1):53. doi:10.1186/s12866-023-02791-3
15. Weersma RK, Zhernakova A, Fu J. Interaction between drugs and the gut microbiome. *Gut*. 1 de agosto de 2020;69(8):1510-9. doi:10.1136/gutjnl-2019-320204 PubMed PMID: 32409589.
16. Dikeocha IJ, Al-Kabsi AM, Miftahussurur M, Alshawsh MA. Pharmacomicrobiomics: Influence of gut microbiota on drug and xenobiotic metabolism. *FASEB J*. 2022;36(6):e22350. doi:10.1096/fj.202101986R
17. Ebuzoeme C, Etim I, Ikimi A, Song J, Du T, Hu M, et al. Glucuronides Hydrolysis by Intestinal Microbial β -Glucuronidases (GUS) Is Affected by Sampling, Enzyme Preparation, Buffer pH, and Species. *Pharmaceutics*. 8 de julio de 2021;13(7):1043. doi:10.3390/pharmaceutics13071043 PubMed PMID: 34371734; PubMed Central PMCID: PMC8309147.
18. Purdel C, Ungurianu A, Adam-Dima I, Margină D. Exploring the potential impact of probiotic use on drug metabolism and efficacy. *Biomed Pharmacother*. 1 de mayo de 2023;161:114468. doi:10.1016/j.biopha.2023.114468

19. Mego M, Kasperova B, Chovanec J, Danis R, Reckova M, Bystricky B, et al. The beneficial effect of probiotics in the prevention of irinotecan-induced diarrhea in colorectal cancer patients with colostomy: a pooled analysis of two probiotic trials (Probio-SK-003 and Probio-SK-005) led by Slovak Cooperative Oncology Group. *Front Oncol.* 22 de julio de 2024;14. doi:10.3389/fonc.2024.1438657
20. Walsh J, Griffin BT, Clarke G, Hyland NP. Drug-gut microbiota interactions: implications for neuropharmacology. *Br J Pharmacol.* diciembre de 2018;175(24):4415-29. doi:10.1111/bph.14366 PubMed PMID: 29782640; PubMed Central PMCID: PMC6255959.
21. Álvarez J, Fernández Real JM, Guarner F, Gueimonde M, Rodríguez JM, Saenz de Pipaon M, et al. Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterol Hepatol.* 1 de agosto de 2021;44(7):519-35. doi:10.1016/j.gastrohep.2021.01.009
22. Esquer JC. *Manual de Probióticos.* Ergon; 2020. 290 p.
23. Zimmermann M, Zimmermann-Kogadeeva M, Wegmann R, Goodman AL. Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes. *Nature.* junio de 2019;570(7762):462-7. doi:10.1038/s41586-019-1291-3
24. Guillot CC. Microbiota intestinal y sus nuevos retos [Internet]. 15 de diciembre de 2022. doi:10.5281/ZENODO.7443084
25. Marín González P. Efecto de la Microbiota Intestinal sobre la Biodisponibilidad de los Fármacos [Internet]. 2022 [citado 11 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/39854>
26. Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans [Internet]. [citado 26 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/23/12808>

27. Biocodex Microbiota Institute [Internet]. [citado 15 de marzo de 2025]. La microbiota intestinal y el metabolismo de los fármacos. Disponible en: <https://www.biocodexmicrobiotainstitute.com/es/pro/la-microbiota-intestinal-y-el-metabolismo-de-los-farmacos>
28. Roberts MS, Magnusson BM, Burczynski FJ, Weiss M. Enterohepatic Circulation. *Clin Pharmacokinet*. 1 de agosto de 2002;41(10):751-90. doi:10.2165/00003088-200241100-00005
29. Pant A, Maiti TK, Mahajan D, Das B. Human Gut Microbiota and Drug Metabolism. *Microb Ecol*. 1 de julio de 2023;86(1):97-111. doi:10.1007/s00248-022-02081-x
30. Wang P, Jia Y, Wu R, Chen Z, Yan R. Human gut bacterial β -glucuronidase inhibition: An emerging approach to manage medication therapy. *Biochem Pharmacol*. 1 de agosto de 2021;190:114566. doi:10.1016/j.bcp.2021.114566
31. AGA Clinical Practice Guidelines on the Role of Probiotics in the Management of Gastrointestinal Disorders - Gastroenterology [Internet]. [citado 1 de junio de 2026]. Disponible en: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(20\)34729-6/fulltext](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(20)34729-6/fulltext)
32. Álvarez J, Fernández Real JM, Guarner F, Gueimonde M, Rodríguez JM, Saenz de Pipaon M, et al. Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterol Hepatol*. 1 de agosto de 2021;44(7):519-35. doi:10.1016/j.gastrohep.2021.01.009
33. Wang P, Jia Y, Wu R, Chen Z, Yan R. Human gut bacterial β -glucuronidase inhibition: An emerging approach to manage medication therapy. *Biochem Pharmacol*. agosto de 2021;190:114566. doi:10.1016/j.bcp.2021.114566 PubMed PMID: 33865833.
34. Weersma RK, Zhernakova A, Fu J. Interaction between drugs and the gut microbiome. *Gut*. agosto de 2020;69(8):1510-9. doi:10.1136/gutjnl-

- 2019-320204 PubMed PMID: 32409589; PubMed Central PMCID: PMC7398478.
35. Roberts MS, Magnusson BM, Burczynski FJ, Weiss M. Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(10):751-90. doi:10.2165/00003088-200241100-00005 PubMed PMID: 12162761.
 36. Sancenon V, Goh WH, Sundaram A, Er KS, Johal N, Mukhina S, et al. Development, validation and quantitative assessment of an enzymatic assay suitable for small molecule screening and profiling: A case-study. *Biomol Detect Quantif.* junio de 2015;4:1-9. doi:10.1016/j.bdq.2015.03.001 PubMed PMID: 27077032; PubMed Central PMCID: PMC4822204.
 37. Enzymatic Assay of β -Glucuronidase (EC 3.2.1.31) from *E. coli* [Internet]. [citado 1 de junio de 2026]. Disponible en: https://www.sigmaaldrich.com/PE/en/technical-documents/protocol/protein-biology/enzyme-activity-assays/enzymatic-assay-of-b-glucuronidase-from-ecoli?srsId=AfmBOopW8Fhzj9jLOgRXChqmwEUXh3sc4CiPRDeVN_SnWW34LAaFLgwj_
 38. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods [Internet]. [citado 1 de junio de 2026]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-666X/8/3/83>
 39. Montesinos-Cruz V, Somerville GA. Shining a Light on Spectrophotometry in Bacteriology. *Antibiotics.* diciembre de 2024;13(12):1164. doi:10.3390/antibiotics13121164
 40. Olvera-Rosales LB, Cruz-Guerrero AE, Ramírez-Moreno E, Quintero-Lira A, Contreras-López E, Jaimez-Ordaz J, et al. Impact of the Gut Microbiota Balance on the Health-Disease Relationship: The

- Importance of Consuming Probiotics and Prebiotics. *Foods*. 2 de junio de 2021;10(6):1261. doi:10.3390/foods10061261 PubMed PMID: 34199351; PubMed Central PMCID: PMC8230287.
41. Zimmermann M, Zimmermann-Kogadeeva M, Wegmann R, Goodman AL. Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes. *Nature*. junio de 2019;570(7762):462-7. doi:10.1038/s41586-019-1291-3 PubMed PMID: 31158845; PubMed Central PMCID: PMC6597290.
 42. Milner E, Stevens B, An M, Lam V, Ainsworth M, Dihle P, et al. Utilizing Probiotics for the Prevention and Treatment of Gastrointestinal Diseases. *Front Microbiol*. 9 de agosto de 2021;12:689958. doi:10.3389/fmicb.2021.689958 PubMed PMID: 34434175; PubMed Central PMCID: PMC8381467.
 43. Álvarez J, Fernández Real JM, Guarner F, Gueimonde M, Rodríguez JM, Saenz de Pipaon M, et al. Gut microbes and health. *Gastroenterol Hepatol*. 2021;44(7):519-35. doi:10.1016/j.gastrohep.2021.01.009 PubMed PMID: 33652061.
 44. Montesinos-Cruz V, Somerville GA. Shining a Light on Spectrophotometry in Bacteriology. *Antibiotics*. 3 de diciembre de 2024;13(12):1164. doi:10.3390/antibiotics13121164 PubMed PMID: 39766554; PubMed Central PMCID: PMC11672422.
 45. Shehadul Islam M, Aryasomayajula A, Selvaganapathy PR. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines*. 8 de marzo de 2017;8(3):83. doi:10.3390/mi8030083 PubMed PMID: null; PubMed Central PMCID: PMC6190294.
 46. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods [Internet]. [citado 17 de mayo de 2026]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-666X/8/3/83>

47. Ebuzoeme C, Etim I, Ikimi A, Song J, Du T, Hu M, et al. Glucuronides Hydrolysis by Intestinal Microbial β -Glucuronidases (GUS) Is Affected by Sampling, Enzyme Preparation, Buffer pH, and Species. *Pharmaceutics*. 8 de julio de 2021;13(7):1043. doi:10.3390/pharmaceutics13071043 PubMed PMID: 34371734; PubMed Central PMCID: PMC8309147.
48. Enzymatic Assay of β -Glucuronidase (EC 3.2.1.31) from *E. coli* [Internet]. [citado 17 de mayo de 2026]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/PE/en/technical-documents/protocol/protein-biology/enzyme-activity-assays/enzymatic-assay-of-b-glucuronidase-from-ecoli>
49. Sancenon V, Goh WH, Sundaram A, Er KS, Johal N, Mukhina S, et al. Development, validation and quantitative assessment of an enzymatic assay suitable for small molecule screening and profiling: A case-study. *Biomol Detect Quantif*. 27 de abril de 2015;4:1-9. doi:10.1016/j.bdq.2015.03.001 PubMed PMID: 27077032; PubMed Central PMCID: PMC4822204.
50. Montesinos-Cruz V, Somerville GA. Shining a Light on Spectrophotometry in Bacteriology. *Antibiotics*. diciembre de 2024;13(12):1164. doi:10.3390/antibiotics13121164

ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia.

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA	TECNIAS E INSTRUMENTO
Problema principal ¿Cómo influye in vitro el <i>Lactobacillus acidophilus</i> en la actividad del extracto enzimático crudo de β-glucuronidasa? Problemas específicos ¿Cuál es la actividad enzimática basal del extracto crudo de β-glucuronidasa obtenido de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 bajo condiciones in vitro controladas? ¿Cómo varía la actividad del extracto crudo de β-glucuronidasa a lo largo del tiempo de interacción con <i>L. acidophilus</i>? ¿Cómo la presencia de <i>L. acidophilus</i> a diferentes concentraciones modula la actividad del extracto crudo de β-glucuronidasa?	Objetivo general Evaluar in vitro la influencia de <i>Lactobacillus acidophilus</i> sobre la actividad del extracto enzimático crudo de β-glucuronidasa. Objetivos específicos Determinar la actividad enzimática basal del extracto crudo de β-glucuronidasa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en condiciones experimentales controladas. Determinar la actividad del extracto crudo de β-glucuronidasa a diferentes tiempos de interacción con <i>L. acidophilus</i>. Determinar el efecto de diferentes concentraciones de <i>L. acidophilus</i> sobre la actividad del extracto crudo de β-glucuronidasa.	Hipótesis general La presencia in vitro de <i>Lactobacillus acidophilus</i> modifica la actividad del extracto enzimático crudo de β-glucuronidasa. Hipótesis Específicas El extracto crudo de β-glucuronidasa obtenido de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 presenta actividad enzimática detectable en condiciones experimentales controladas. El tiempo de interacción entre <i>L. acidophilus</i> y el extracto crudo de β-glucuronidasa influye en la actividad enzimática registrada a lo largo de los intervalos evaluados. La presencia de <i>L. acidophilus</i> a diferentes concentraciones genera cambios en la actividad del extracto crudo de β-glucuronidasa.	Variable Independiente Presencia de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (concentraciones: 10^6, 10^7 y 10^8 UFC/ml) Variable Dependiente Actividad enzimática del extracto crudo de β-glucuronidasa obtenido de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (indicadores: absorbancia a 405 nm, concentración de PNP liberado en μmol, unidades enzimáticas U/ml)	Tipo de investigación Experimental Diseño de investigación Experimental clásico Nivel de investigación Explicativo POBLACIÓN Y MUESTRA Población Cepas de <i>Lactobacillus acidophilus</i> contenidas en el probiótico comercial, presentado en ampollas bebibles, disponible en farmacias de la ciudad de Tacna. Muestra Cepas de <i>Lactobacillus acidophilus</i> obtenida de una ampolla bebible del probiótico comercial, adquirida en una farmacia de la ciudad de Tacna. Muestreo: No probabilístico por conveniencia	Técnica Ensayo enzimático colorimétrico Instrumento Espectrofotómetro UV-Visible (lectura a 405 nm)

Anexo 2. Probiótico en presentación de ampolla bebible.



Anexo 3. Transfiriendo el contenido del probiótico a un tubo de ensayo estéril.



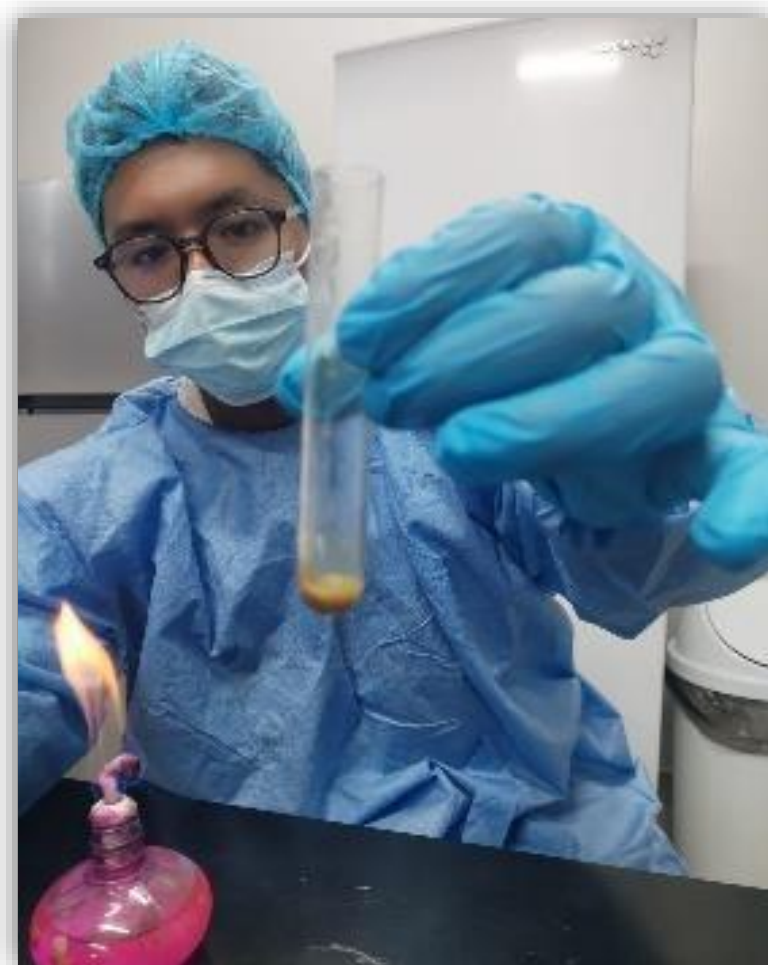
Anexo 4. Centrifugando muestra a 4000 rpm durante 5 minutos.



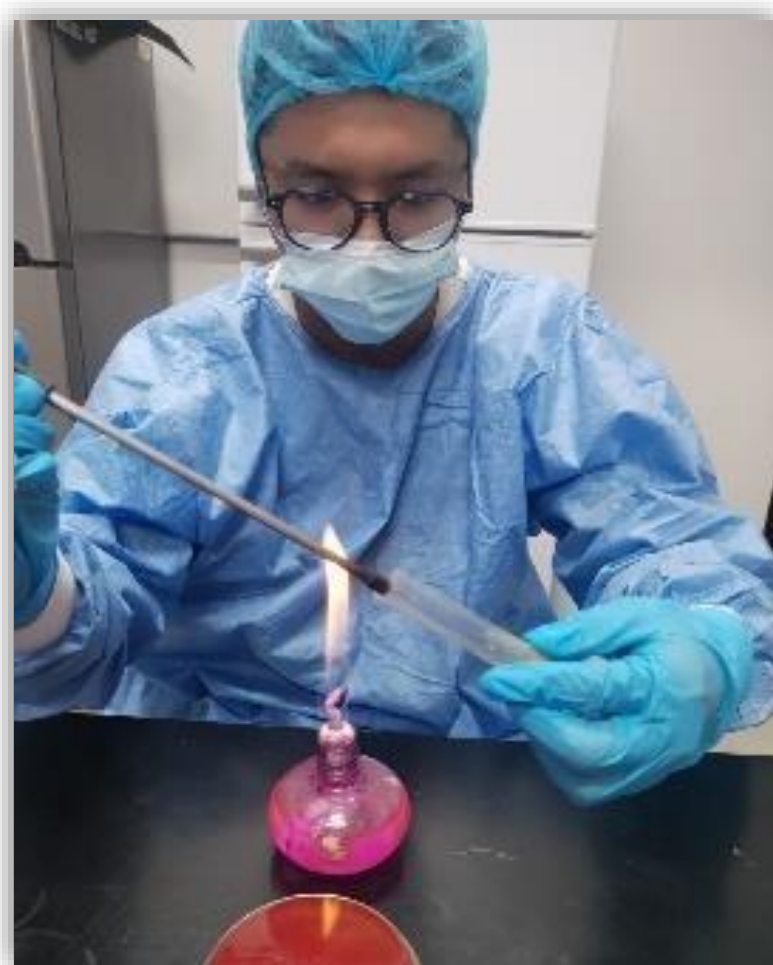
Anexo 5. Descartando el sobrenadante al centrifugar el probiótico.



Anexo 6. Pellet luego de centrifugación de probiótico.



Anexo 7. Tomando una asada del pellet del probiótico.



Anexo 8. Realizando una siembra por 4 cuadrantes en placas con agar TSA sangre.



Anexo 9. Recipiente hermético con las placas inoculadas con muestra del pellet del probiótico centrifugado.



Anexo 10. Incubando las placas inoculadas a 35 ± 2 °C durante 96 horas.



Anexo 11. Crecimiento *Lactobacillus acidophilus* en viales con agar BHI.



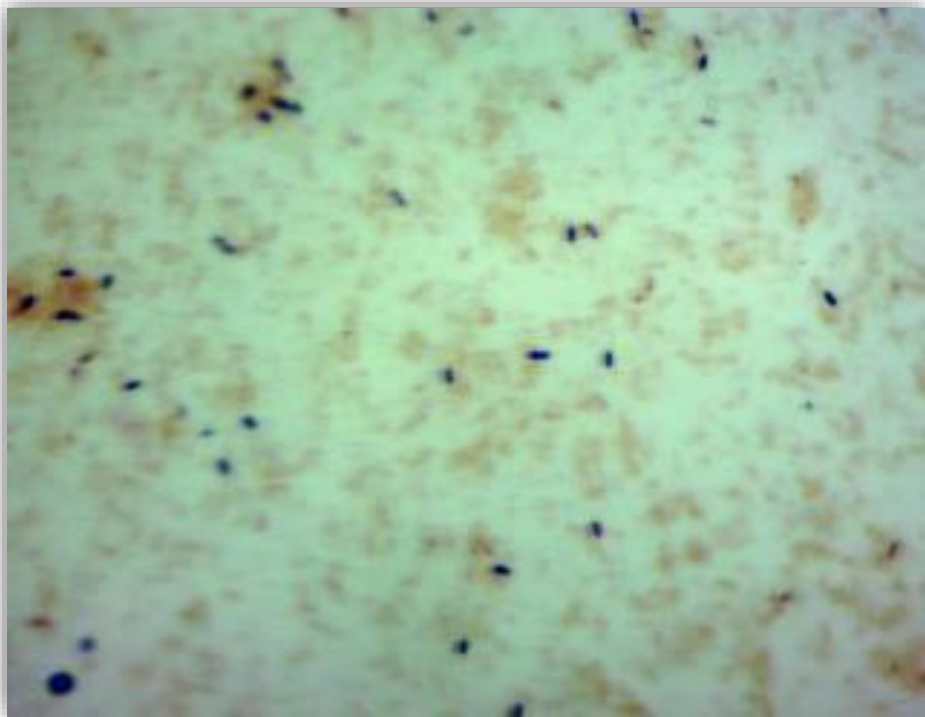
Anexo 12. Tomando una muestra del vial con *Lactobacillus acidophilus*.



Anexo 13. Haciendo una siembra por suspensión en caldo BHI a partir del vial con *Lactobacillus acidophilus*.



Anexo 14. Vista del microscopio de *Lactobacillus acidophilus* luego de tinción gram.



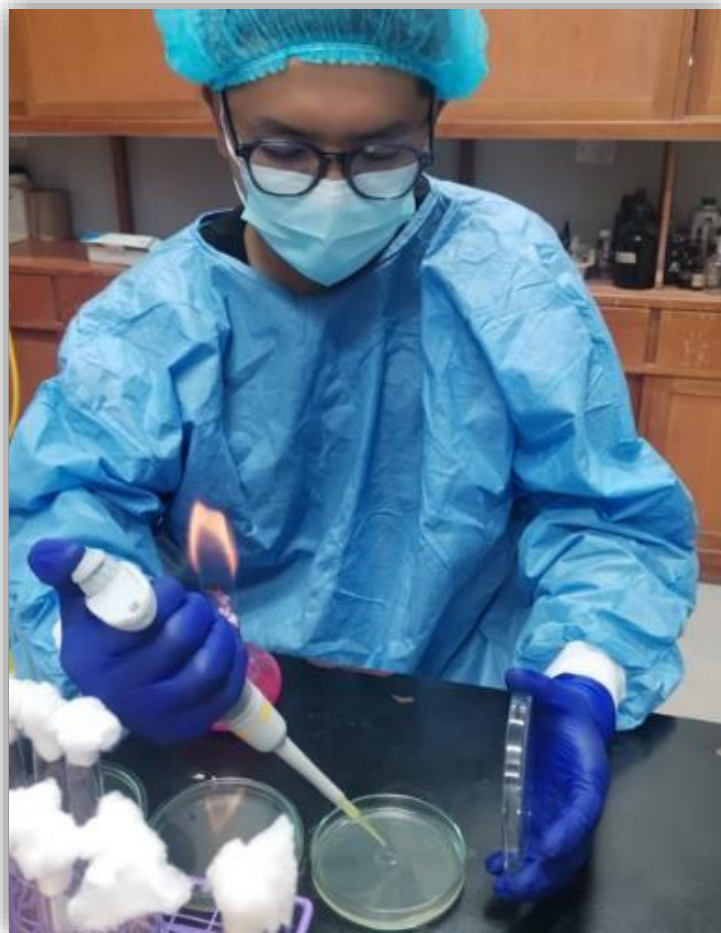
Anexo 15. Transfiriendo 1 ml del cultivo en caldo BHI de *Lactobacillus acidophilus* al tubo 10^{-1} .



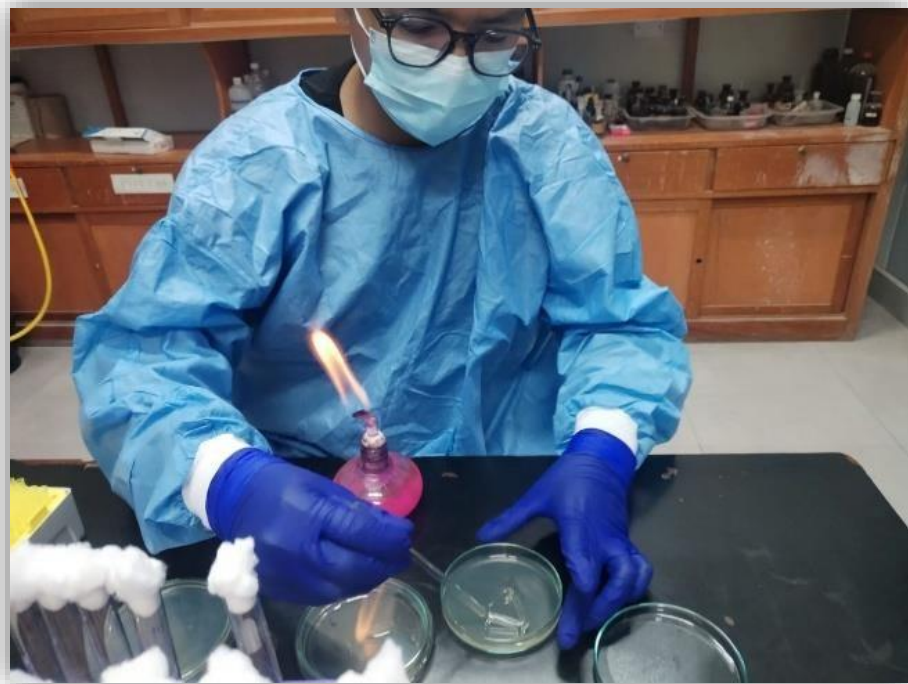
Anexo 16. Realizando la serie de diluciones sucesivas transfiriendo 1 ml de cada dilución al siguiente tubo, repitiendo el procedimiento hasta alcanzar la dilución 10^{-10} .



Anexo 17. Depositando 100 μL de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10} en placas con agar PCA (Agar para recuento de placas) suplementado con TTC (Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio).



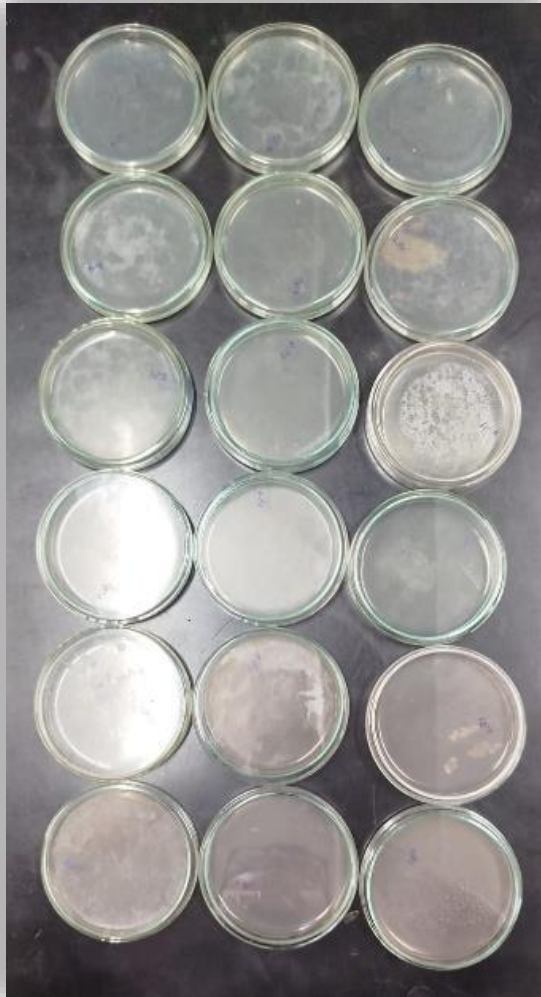
Anexo 18. Realizando cada siembra por extensión por triplicado.



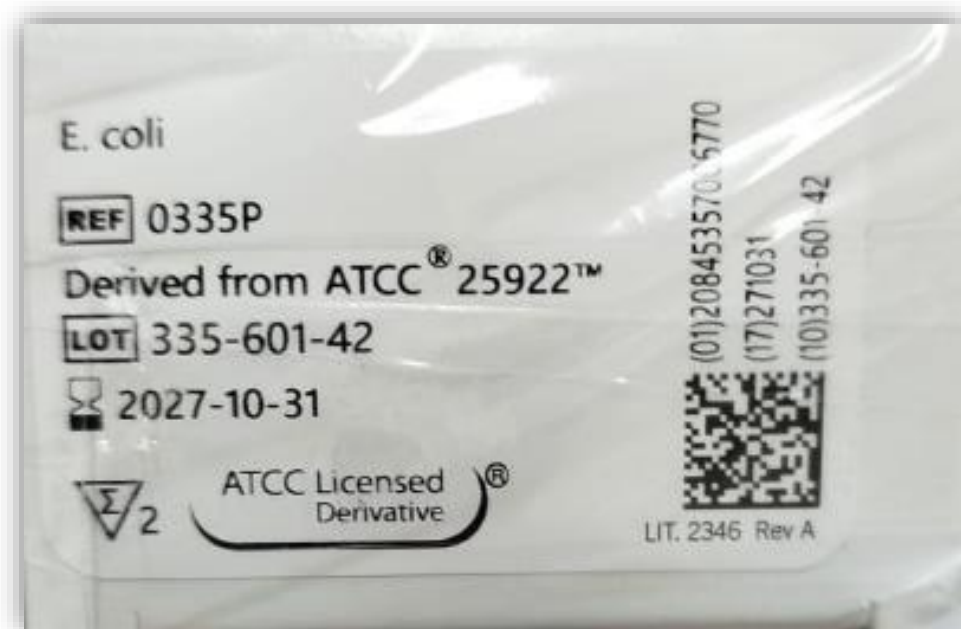
Anexo 19. Las placas en recipiente hermético para cumplir condiciones microaerófilas y posteriormente llevadas a incubar invertidas a 35 ± 2 °C durante 24 horas.



Anexo 20. Seleccionando placas cultivadas con diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10} con mayor crecimiento bacteriano para el análisis.



Anexo 21. Cepa de *Escherichia coli* ATC 25922 a activar



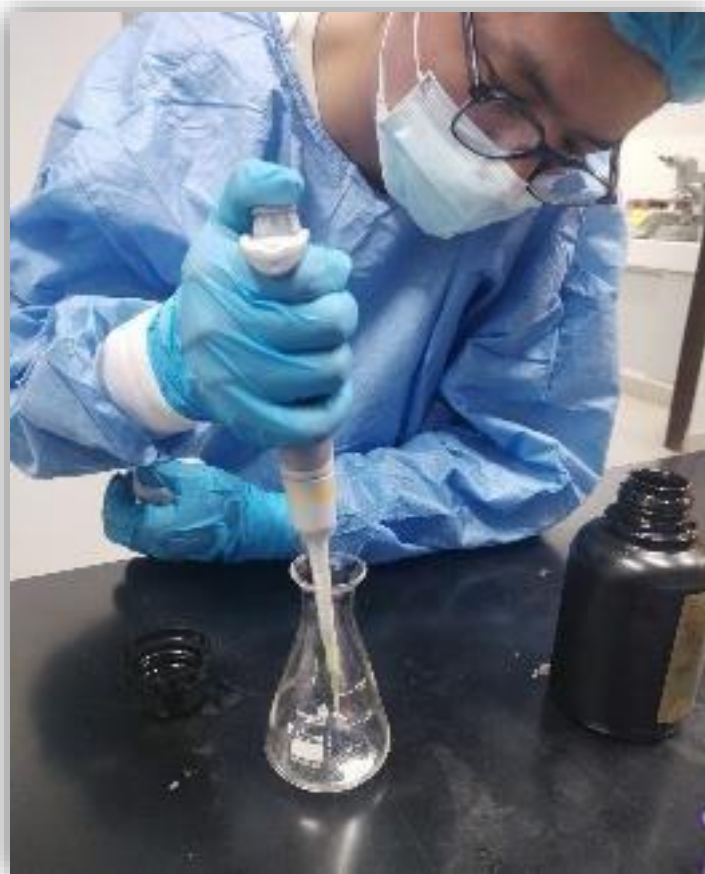
Anexo 22. Tubo de ensayo conteniendo caldo BHI inoculado con cepa de *Escherichia coli* previamente conservada en refrigeración



Anexo 23. Vial con *Escherichia coli* en agar BHI reactivado



Anexo 24. Agregando Tween 80 al matraz con EDTA para preparar la solución se encargará de debilitar y aumentar la permeabilidad de la membrana celular



Anexo 25. Pipeteo de buffer fosfato para disolver los componentes de la solución que se encargará de debilitar y aumentar la permeabilidad de la membrana celular



Anexo 26. Mezclando la solución de EDTA, Tween 80 y buffer fosfato hasta homogenizarla.



Anexo 27. Distribuyendo la solución permeabilizadora en 6 tubos de ensayo con 10 ml de solución cada uno.



Anexo 28. Inoculación y disolución de la bacteria *E. Coli* activo en cada uno de los tubos de ensayo.



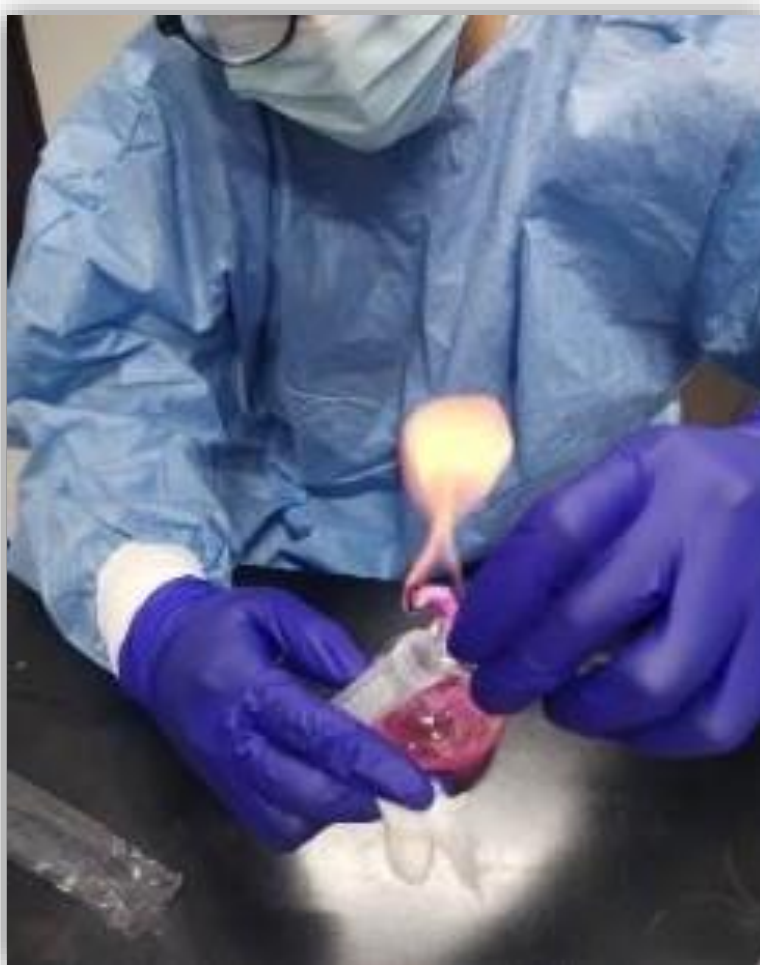
Anexo 29. Bacteria *E. Coli* disuelta



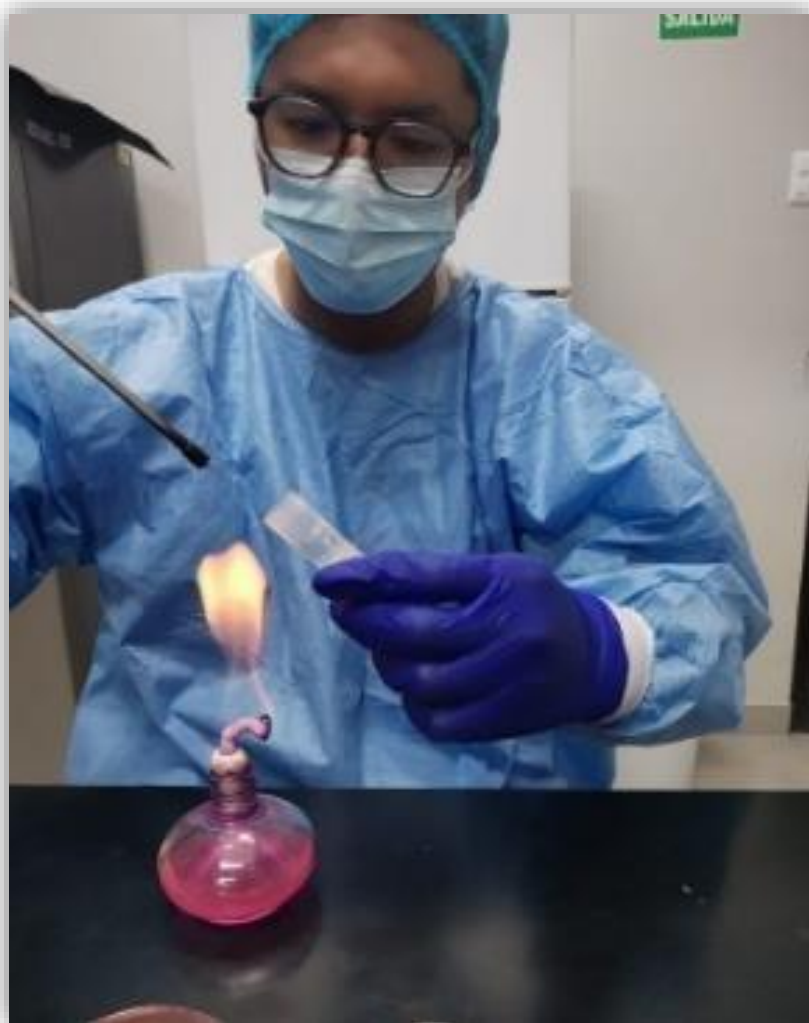
Anexo 30. Mezcla reservada a -4°C durante 30 minutos



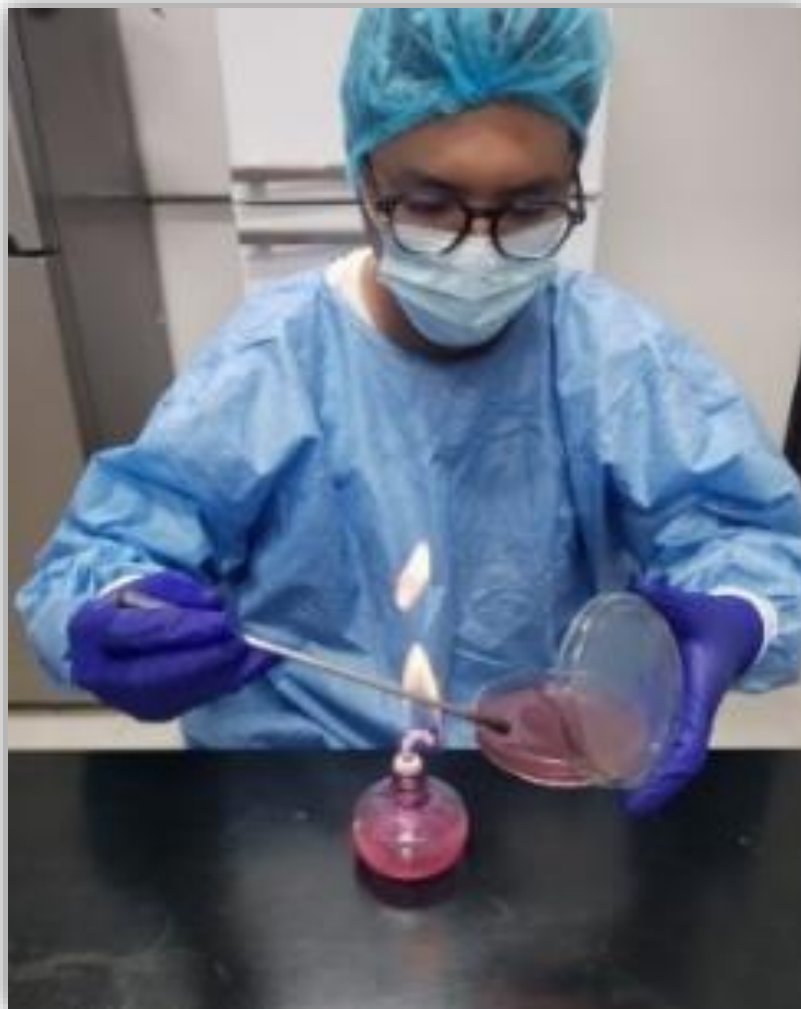
Anexo 31. Juntando el sobrenadante de la muestra centrifugada en un tubo estéril con tapa.



Anexo 32. Tomando una muestra del extracto enzimático crudo



Anexo 33. Realizando siembras en 4 cuadrantes del extracto enzimático crudo en agar MacConkey



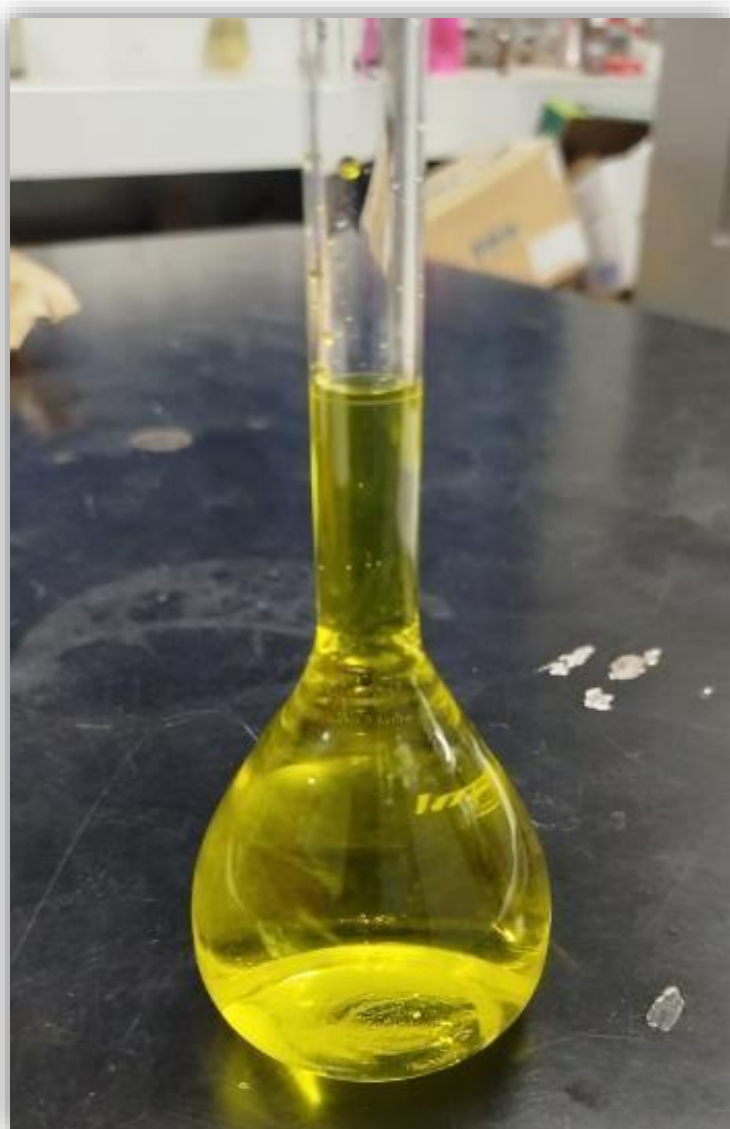
Anexo 34. Ausencia de crecimiento bacteriano en agar MacConkey (*E. Coli*) interpretado como pérdida de viabilidad celular, lo cual sugiere una posible alteración de la integridad celular, es decir lisis celular.



Anexo 35. Agregando buffer fosfato en una fiola de 100 ml para disolver el p-nitrofenol (PNP)



Anexo 36. Solución madre de 100 ml a 10 mM de p-nitrofenol



Anexo 37. Soluciones finales de 2 ml en las concentraciones de 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1 mM a partir de la solución madre



Anexo 38. Preparando las mezclas en tubos Eppendorf de 1.5 ml por triplicado.



Anexo 39. Midiendo la absorbancia de las mezclas a una longitud de onda de 405 nm.



Anexo 40. Espectrofotómetro UV-Visible, instrumento utilizado a 405 nm.

