



Evaluación del potencial hepatotóxico de metabolitos proteicos producidos por *Bifidobacterium adolescentis* sobre la línea celular de origen humano THLE-2

Jenny Mercedes Suarez Rodríguez

Estudiante de Bacteriología

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para obtener el título de:

BACTERIOLOGA

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Bacteriología

Bogotá D.C., Colombia

2018



Evaluación del potencial hepatotóxico de metabolitos proteicos producidos por *Bifidobacterium adolescentis* sobre la línea celular de origen humano THLE-2

Director

Juan Carlos Ulloa Rubiano, Ph.D

Departamento de Microbiología Pontificia Universidad Javeriana

Par evaluador

Jhon Jairo Sutachan Rubio

Departamento De Nutrición y Bioquímica

NOTA DE ADVERTENCIA

ARTICULO 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en su trabajo de grado. Solo velara por lo que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué los trabajos de grado no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia.”

Agradecimientos

Al Dr. Juan Carlos Ulloa, director de este trabajo por su acompañamiento, apoyo y paciencia durante el desarrollo de este trabajo, Por guiarme, enseñarme y darme la oportunidad de aprender cosas nueva y reforzar las ya aprendidas a lo largo de la carrera.

A mi familia y amigos por el constante apoyo, motivación y colaboración durante el desarrollo de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	9
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
4. JUSTIFICACIÓN	13
5. MARCO TEORICO	14
5.1 Enfermedad Diarreica Aguda.....	14
5.2 Rotavirus.....	15
5.2.1 Generalidades.....	16
5.2.2 Ciclo Replicativo	17
5.2.3 Terapéutica actual para tratar la diarrea por rotavirus.....	17
5.2.4 Alternativas terapéuticas	17
5.3 <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	18
5.4 Toxicidad	18
5.4.1 <i>Glutation-S-Transferasa</i>	19
5.4.2 <i>Superoxido Dismutasa</i>	19
5.4.3 <i>Respiración Mitocondrial MTT</i>	19
5.5 Hepatotoxicidad.....	20
5.1.1 <i>Linea celular THLE-2</i>	20
6. OBJETIVOS	22
6.1 <i>Objetivo general</i>	22
6.2 <i>Objetivos específicos</i>	22
7. PROPUESTA METODOLOGICA	23
7.1 <i>Metabolitos proteicos de Bifidobacterium adolescentis 20083</i>	23
7.2 <i>Linea Celular THLE-2</i>	23
7.3.3 <i>Ensayo de afectación de la respiración mitocondrial mediante el método de MTT</i>	23
7.4 <i>Evaluación de marcadores de toxicidad</i>	23
7.4.1 <i>Evaluación de la actividad de la enzima Glutation-S-Transferasa</i>	24
7.4.2 <i>Evaluación de la actividad de la enzima Superoxido Dismutasa</i>	24
8. RESULTADOS	25
9. DISCUSIÓN	30
10. CONCLUSIÓN	31
11. ANEXOS	32
12. BIBLIOGRAFÍA	32

LISTA DE IMAGENES

Figura N°1: Casos de enfermedad diarreica aguda en Colombia entre el año 2014 y 2016.

Figura N°2. Mortalidad por enfermedad diarreica aguda en menores de cinco años según entidad territorial de residencia, periodo epidemiológico XIII, en Colombia para el 2017.

Figura N°3. Metabolización del MTT a sales de formazán por células viables.

Figura N°4. Reacción enzimática de SOD

Figura N°5. Efecto citotóxico (MTT) que ejercen los metabolitos proteicos de *B. adolescentis* sobre la respiración mitocondrial de células THLE-2 después de ser expuestas a diferentes concentraciones (250µg/mL hasta 0,03 µg/mL) durante 72 horas, como control negativo se utilizaron células THLE-2 sin tratamiento. Los resultados son el producto de 3 ensayos independientes por triplicada. Lectura a 540nm.

Figura N°6. Efecto ejercido sobre la actividad de la Glutacion-S-Transferasa en células THLE-2 después de ser expuestas a diferentes concentraciones (250µg/mL hasta 0,03 µg/mL) de metabolitos proteicos de *B. adolescentis* durante 72 horas. Mock representa células THLE-2 sin tratamiento. La gráfica es el resultado de un experimento independiente realizado por duplicado y muestra el cambio de absorbancias (DO_{355nm}) con respecto al tiempo, medidas cada minuto durante 6 minutos.

Figura N°7. Actividad de Glutación-S-Transferasa en células THLE-2 expuestas a diferentes concentraciones de metabolitos proteicos (250 µg/mL- 0 µg/mL) de *Bifidobacterium adolescentis* durante 72 horas. Mock representa células sin tratamiento y control GST es el control interno del estuche utilizado. La gráfica es el resultado de un experimento independiente realizado por duplicado.

Figura N°8. Medición del porcentaje de actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) en células THLE-2 expuestas a diferentes concentraciones de metabolitos proteicos (250 µg/mL- 0,03 µg/mL) de *Bifidobacterium adolescentis* durante 72 horas. Mock representa células sin tratamiento. La gráfica es el resultado de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

LISTA DE TABLAS

Tabla N°1. Principales características epidemiológicas de las infecciones por virus causante de gastroenteritis aguda, importancia frente a Rotavirus.

Tabla N°2. Concentraciones de proteínas de *B. adolescentis* usadas para tratar células THLE-2 durante 72 horas y concentraciones finales de proteínas citoplasmáticas totales de THLE-2 después de los tratamientos. La medición se realizó por el método del ácido bicinónico y las lecturas fueron realizadas a 540nm.

1. Resumen

El Rotavirus es actualmente un agente infeccioso de gran importancia por la diarrea severa que causa y el número de muertes que ocasiona, estudios han reportado que al no existir una terapéutica actual contra el virus el uso de probióticos principalmente bacterias probióticas como *Bifidobacterium adolescentis* están siendo una alternativa terapéutica gracias a que se ha mostrado que las bacterias completas o metabolitos proteicos de estas tienen actividad antiviral contra el virus. Sin embargo, no existe evidencia suficiente en la que se demuestre que los metabolitos proteicos de *B. adolescentis* 20083 son seguros para su administración, por lo que el propósito de la investigación es evaluar el potencial hepatotóxico de metabolitos proteicos producidos por *Bifidobacterium adolescentis* sobre la línea celular de origen humano THLE-2.

Para la evaluación del potencial hepatotóxico de los metabolitos proteicos se emplearon células THLE-2 sin metabolitos como controles para cada una de las técnicas y se llevó a cabo el método MTT para evaluar respiración mitocondrial junto con dos marcadores específicos de toxicidad Glutación-S-Transferasa (GST) y Superóxido Dismutasa (SOD).

Con el método MTT se evidenció que las concentraciones más altas tuvieron un mayor porcentaje de toxicidad con respecto al control ($P < 0.0001$). En cuanto a la actividad de GST se encontró que la concentración de $250\mu\text{g/mL}$ fue aquella que ejerció una mayor disminución en la actividad de la enzima sin embargo, todas las concentraciones disminuyeron la actividad de GST ($P < 0.0001$). Así mismo, para el caso de la actividad de SOD se encontró que todas las concentraciones de los metabolitos ejercieron el aumento en la actividad de esta.

Las proteínas del secretoma de *Bifidobacterium adolescentis* ejercen un daño parcial a las células THLE-

2. Introducción

La enfermedad diarreica aguda es una problemática a nivel mundial, ocupa el segundo lugar entre las causas de muerte que pueden ser prevenibles. Durante la última década han ocasionado 760.000 millones de muertes en niños menores de cinco años, según la organización mundial de la salud cada año se producen alrededor de dos millones de casos de diarrea en todo el mundo. En Colombia para el año 2017 se notificaron 116 muertes por enfermedad diarreica aguda en menores de 5 años. Es importante tener presente que las características epidemiológicas, agentes etiológicos y la presentación clínica de la enfermedad varía entre los países acorde a las condiciones ambientales, sociales, económicas y hábitos alimentarios ¹. Adicionalmente podría suponerse que no todos los casos de diarrea aguda son reportados en nuestro país.

Los agentes infecciosos más frecuentes suelen ser: Los virus (Rotavirus), protozoarios intestinales (Giardia) y las bacterias (Salmonella no tifoidea, *Shigella spp*, *Vibrios*, *Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli* patógenas) ². El rotavirus es el principal causante de diarrea severa ocasionando 453.000 muertes, 2.3 millones de hospitalizaciones y 24 millones de visitas ambulatorias por año en todo el mundo en niños menores de 5 años. En el 2013, se estimó que el Rotavirus ocasiono más de 200.000 muertes a nivel mundial ³. El virus se caracteriza por infectar enterocitos maduros del intestino delgado y por replicarse exclusivamente en el citoplasma de la célula llevando a la muerte de estos por medio de un efecto lítico lo que genera diarrea como consecuencia de esta infección. Adicionalmente se ha visto involucrada a la proteína- enterotoxina NSP4 como responsable del aumento de la diarrea en los niños. ⁴. El aumento de la diarrea por la enterotoxina NSP4 se ha relacionado con la liberación del Ca²⁺ intracelular del retículo endoplasmático por medio de un mecanismo dependiente de la fosfolipasa C lo que lleva a que se altere la permeabilidad de la membrana plasmática conduciendo a un desequilibrio celular ⁵.

Con el fin de prevenir y controlar la infección por Rotavirus a partir del año 2009 la OMS recomendó la vacunación, procedimiento que ha sido incluido en todos los programas nacionales de inmunización. En la actualidad, se encuentran disponibles dos vacunas eficaces basadas en cepas de rotavirus de origen humano y/o animal, las cuales se caracterizan porque son vivas, orales y atenuadas ⁶. Las dos vacunas son Rotarix®, que es monovalente, procedente de una cepa humana y RotaTeq® pentavalente, recombinante desarrollada a partir de rotavirus de origen humano y bovino. Sin embargo, se ha visto que en niños vacunados con RotaTeq® con una dosis completa el rotavirus sigue estando presente, lo que se debe a la gran diversidad genómica del virus debido principalmente a reordenamiento y eventos de recombinación ⁷.

En la actualidad no existe una terapéutica específica contra el rotavirus dado que lo que se trata es la deshidratación que puede llevar a la muerte como consecuencia de la diarrea intensa que este virus puede causar. Sin embargo, este tratamiento principalmente con líquidos intravenosos no suelen ser de fácil disponibilidad en países en vía de desarrollo ⁸. Hoy en día, el tratamiento más utilizado es la administración de soluciones de rehidratación suplementadas con sales de zinc con la desventaja de que para su uso se debe determinar la dosis óptima para que logre ejercer su efecto beneficioso en los niños de países con medianos y altos ingresos ⁹. Una alternativa es el uso de microorganismos probióticos, siendo estos levaduras o bacterias caracterizados por proporcionar efectos beneficiosos contra gran variedad de agentes infecciosos¹⁰. Los más estudiados han sido *Lactobacillus spp*, *L. reuteri*, *Lactobacillus casei*, *S. boulardii*, *Bifidobacterium spp* y *S. thermophilus* en el tratamiento y prevención de la enfermedad diarreica aguda en niños causada por rotavirus en donde se han sugerido varios mecanismos de acción, algunos de los cuales actúan bloqueando los receptores evitando la adhesión y la invasión del virus y en la producción de sustancias aun no muy bien identificadas para la inactivación de partículas virales ¹¹.

Adicional a esto, se ha visto que gran variedad de estas bacterias probióticas entre muchas otras tienen actividad antiviral contra rotavirus *in vitro* en diferentes líneas celulares (Lee et al., 2015, Seo et al., 2010, Kang et al., 2015). En un estudio realizado por Olaya-Galán en el año 2016, se evaluó que los metabolitos proteicos de *B. adolescentis* 20083 presentan actividad antiviral contra la infección del rotavirus *in vitro* evidenciado en la línea MA104 (células de Riñón de mono), determinada por la disminución en la producción de la enterotoxina NSP4 y la liberación de Ca^{2+} ¹⁵ lo que podría significar que los metabolitos pueden contribuir a una posible alternativa terapéutica. Sin embargo, aún no se conoce si estos metabolitos pueden llegar a generar algún tipo de toxicidad en el momento de su administración, razón por la cual el objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial hepatotóxico de los metabolitos proteicos de esta bacteria por medio de la medición *in vitro* de la actividad de dos marcadores de toxicidad específicos del hígado (Glutación-S-Transferasa [GST] y Superóxido Dismutasa [SOD]) y el efecto que ejercen sobre la respiración mitocondrial a través de la actividad succinato deshidrogenasa utilizando la técnica de MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol – Sigma-Aldrich®) en la línea celular normal THLE-2 de origen hepático humano.

3. Problema

La enfermedad diarreica aguda es considerada la segunda causa de muerte de niños menores de 5 años ocasionando la muerte de 525.000 niños cada año. Se sabe que se producen 1.700 millones de casos de enfermedades diarreicas en todo el mundo, las cuales en su mayoría podrían ser prevenibles mediante el acceso a agua potable y a servicios de saneamiento e higiene ¹⁶.

Rotavirus es uno de los agentes más importantes que causa la diarrea aguda y es una preocupación a nivel mundial en la salud pública debido a que causa aproximadamente 215.000 muertes en niños menores de 5 años según la estimación de la OMS en el 2013 ¹⁷. Hoy en día, la infección por rotavirus es considerada como inmunoprevenible, debido a que se dispone de dos vacunas vivas atenuadas, una vacuna monovalente (RV1; Rotarix™) y la otra pentavalente (RV5; RotaTeq™) las cuales la OMS recomendó a todos los países particularmente a aquellos donde las tasas de mortalidad por diarrea en niños es alta.

A finales de 2014, más de 70 países introdujeron las vacunas en sus programas de vacunación rutinaria documentando un gran impacto en la diarrea grave y la enfermedad por rotavirus que suele requerir hospitalización ¹⁸. En países con tasas de mortalidad baja, RV1 previene el 86% de los casos de diarrea grave por rotavirus y RV5 previene el 87%, mientras que en los países con altas tasas de mortalidad la eficacia de la vacuna es menor dado que RV1 previene el 63% de los casos y RV5 el 57% ¹⁹ por lo que la mortalidad sigue siendo alta. Adicional a esto, las vacunas presentan como desventajas su alto costo, por tanto falta de acceso y por otra parte, la capacidad de recombinarse y/o reordenarse genéticamente con cepas silvestres generando nuevas estirpes genéticas que producen la diarrea ⁷; Además, los efectos secundarios que puede generar son problemas leves en donde los niños se vuelven irritables a la vacuna, o pueden presentar diarrea o vómito leve y temporal, también se ha visto un aumento del riesgo de intususcepción siendo la afectación más grave, donde una parte del intestino se introduce en una porción adyacente del intestino bloqueando el paso de alimento, líquidos y en ocasiones flujo sanguíneo que puede llevar a una perforación en el intestino o muerte del tejido intestinal. Evidenciándose poco después de la primera dosis ²⁰.

La terapéutica actual para tratar la diarrea producida por rotavirus no es específica, se basa en tratar la sintomatología (deshidratación, pérdida de peso corporal, desnutrición, vómito, fiebre en algunos casos, acidosis metabólica, dolor abdominal y con frecuencia diarrea con materia fecal líquida o blanda, sin sangre ni moco), buscando remplazo de electrolitos y disminución de los episodios diarreicos con administración de suero oral con sales de zinc ²¹. Otros medicamentos que se utilizan para tratar la diarrea son la loperamida indicada para el control de procesos diarreicos, en ocasiones es utilizada en la ileostomía para disminuir el volumen y el número de deposiciones. Sin embargo, no es recomendable su consumo debido a que puede generar insuficiencia hepática grave, suboclusión intestinal, colitis pseudomembranosa y en niños < 1 año si se administra altas dosis puede llevar a la depresión del sistema nervioso central ²². En el grupo de los opiodes se encuentra la codeína y el difenoxilato utilizados para el dolor pero también para aliviar la tos y la diarrea severa, pero a causa de sus efectos secundarios (somnia, confusión, estreñimiento y en algunos casos dependiendo la dosis deprime la respiración) no es una opción para el tratamiento ²³. Otro medicamento es el subsalicilato de bismuto utilizado para el tratamiento de diarreas, dolencias estomacales, acidez, náuseas o indigestiones, pero no es recomendable prescribirlo a niños menores de 12 años debido a que causa daños en el hígado e industrialmente está considerado como un metal pesado que puede ser tóxico y en grandes dosis mortal ²⁴.

Desde varios años se ha venido usando sobre los infantes con diarrea viral el Smecta®, que es un silicato natural hidratado de aluminio y magnesio, el cual se administra por vía oral y se caracteriza porque no se

absorbe sino que actúa a nivel del lumen intestinal afectando la permeabilidad intestinal y el flujo de electrolitos como consecuencia de su efecto protector en el epitelio gastrointestinal ²⁵. Se ha propuesto el uso de este como un tratamiento efectivo y seguro para tratar la diarrea por rotavirus dado que logra una rápida disminución en el número de deposiciones diarias y mejora la consistencia de las heces ²⁶. Los efectos secundarios son hipersensibilidad al medicamento, insuficiencia renal, puede afectar el tránsito digestivo provocando estreñimiento y en algunos casos impedir la absorción de algunos nutrientes (Instituto Nacional de Vigilancia de medicamentos y alimentos, 1998). En la actualidad no existen estudios que evidencien completamente la seguridad que soporten la administración de este medicamento en el infante.

Actualmente se ofrecen productos nutracéuticos (Bebidas y derivados lácteos como yogurt, queso, helados, alimentos secos en polvo y masticables siendo la forma más común de presentación), preparaciones medicinales (Alimentos en polvo como algunas leches, productos comestibles masticables, sólidos granulados y preparaciones médicas, dentales o cosméticas) los cuales son fabricados con bacterias probióticas vivas ²⁸, sin embargo, el mal uso de estos productos llevan a la pérdida de eficacia de su actividad benéfica debido a que no se administran dosis sostenidas en el tiempo o porque simplemente se promueve la muerte celular por malas prácticas como por ejemplo la elevada temperatura para la preparación de las leches formuladas.

Así entonces, con vacunas que no son siempre accesibles y que pueden no proteger contra algunos tipos de rotavirus patógenos y por otra parte, con medicamentos inespecíficos que pueden desencadenar efectos secundarios, se hace necesario encontrar una alternativa específica que contribuya a la prevención y control de la diarrea que produce rotavirus. Una posible alternativa es el uso de bacterias probióticas como *Bifidobacterium adolescentis* 20083 gracias a que en el 2016 fue probado por Olaya-Galán y colaboradores, que los metabolitos proteicos de esta tienen actividad antiviral *in vitro* contra Rotavirus, mediada por la disminución de la expresión de la proteína no estructural NSP4 (enterotoxina) ¹⁵. Conociendo la actividad anti-rotavirus que tienen estos metabolitos podrían eventualmente utilizarse como coadyuvantes para el tratamiento de la diarrea que produce. No obstante, para saber si es potencialmente útil en humanos se requiere evaluar si tienen un efecto tóxico inicialmente *in vitro*.

Por lo tanto la pregunta de investigación del presente trabajo es: **¿Presentan un potencial hepatotóxico los metabolitos proteicos producidos por *Bifidobacterium adolescentis* sobre la línea celular de origen humano THLE-2?**

4. Justificación

Rotavirus es a nivel mundial la principal causa de diarrea severa y deshidratación en niños pequeños. La mayoría de gastroenteritis ocasionadas por este virus ocurren en países de bajos ingresos afectando principalmente a bebés menores de un año ²⁰. El virus se caracteriza por infectar los enterocitos dañando el revestimiento de estos en el intestino delgado lo que conlleva a la reducción en la capacidad de absorción y en diarrea ²⁹.

Aunque existen dos vacunas para prevenir la enfermedad diarreica producida por rotavirus, se conoce que las cepas vacunales sufren reordenamientos genéticos con virus silvestres, lo que reduce la protección inmunológica contra las nuevas estirpes. En concreto no existe una terapéutica específica contra el rotavirus debido a que lo que se trata es la sintomatología causada por la diarrea que este genera usualmente por medio de medicamentos inespecíficos los cuales pueden desencadenar efectos secundarios ³⁰ lo que hace necesario encontrar una alternativa específica que contribuya a la prevención y control de la diarrea que produce rotavirus.

Una estrategia ampliamente investigada e implementada para este propósito es el uso de bacterias probióticas como *Bifidobacterium* spp que produce múltiples beneficios para la salud humana gracias a que modula y mejora la respuesta del sistema inmune, bloquea la actividad de patógenos en el intestino, tiene efectos protectores de la barrera gastrointestinal, puede inducir cambios cuantitativos y cualitativos de la microbiota intestinal y reduce la fermentación colónica anormal ³¹. Adicional a esto, se ha comprobado que varias especies de *Bifidobacterium* tienen actividad antiviral contra varios virus como *Bifidobacterium longum* SPM 1205 y SPM 1206 que ejercen actividad antiviral contra rotavirus ¹², las lipoproteínas de *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium breve* presentan actividad antiviral contra el virus Coxsackievirus B4 *in vitro* ³² y *Bifidobacterium adolescentis* con actividad antiviral frente al virus de la hepatitis B ³³, Virus del Papiloma Humano tipo 16 ³⁴ y *B. adolescentis* SPM 0214 contra el virus Herpes Simplex Tipo I ³⁵.

Para el caso de la cepa de *B. adolescentis* 20083 fue probado por Olaya-Galán y colaboradores en el 2016, que sus metabolitos proteicos tienen actividad antiviral contra rotavirus *in vitro* mediada por la disminución de la expresión de la proteína no estructural NSP4 (enterotoxina) lo cual causa adicionalmente una disminución del calcio intracelular, mecanismo *in vivo* involucrado en la producción de la diarrea osmótica y secretora, respectivamente ¹⁵. Conociendo la actividad anti-rotavirus que tienen estos metabolitos podrían eventualmente utilizarse como coadyuvantes para el tratamiento de la diarrea que produce. Pero para saber si es potencialmente útil en humanos se requiere evaluar si tienen un efecto tóxico, si son económicamente viables y si son compatibles con el medio ambiente ³⁶. Esto en la actualidad sería de gran ayuda dado que se podría evitar las infecciones inhibiendo la actividad del virus lo que llevaría a mejorar las condiciones de vida y reducir la morbi-mortalidad infantil en el mundo.

Así entonces y teniendo cuenta que se conoce la actividad antiviral de proteínas obtenidas del secretoma de *B. adolescentis* ¹⁵, es necesario confirmar que no causan efectos negativos, comenzando con experimentos *in vitro* como la toxicidad predictiva siendo un método de evaluación de la toxicidad, realizada de manera *in vitro* como vía alternativa a los ensayos con animales ³⁷ cuyo fin es proporcionar información sobre rutas metabólicas, la interacción de metabolitos activos con dianas celulares y moleculares de manera similar a como sucede *in vivo* tal y como se ha evidenciado con el hígado ³⁸. Ejemplo de esto es la utilización de la línea celular THLE-2 porque expresan características fenotípicas de las células epiteliales hepáticas normales de adulto ³⁹ lo que permitió evaluar dos marcadores de toxicidad envueltos en estrés celular (GST y SOD) y la

viabilidad celular de los metabolitos proteicos a través de la actividad succinato deshidrogenasa utilizando la técnica de MTT (3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol).

5. Marco Teórico

5.1. Enfermedad Diarreica Aguda

La enfermedad diarreica aguda se encuentra entre las cinco principales causas de muerte en países de bajos y medianos ingresos, ocasiona la muerte de casi 1.3 millones de niños menores de 5 años y en todo el mundo se presentan alrededor de dos millones de casos de enfermedad diarreica cada año. La diarrea es ocasionada por diversos organismos bacterianos, víricos y parásitos, en el caso de los bacterianos se encuentra a *Shigella* spp, *Salmonella no tifoidea*, *Campylobacter* spp y *Yersinia* spp como los principales causantes de diarrea y en el caso de los víricos se ha reportado que diferentes virus se asocian con la producción de diarrea encontrándose al sapovirus y al norovirus GII.4 de la familia *Caliciviridae*, al adenovirus con los serotipos 40 y 41 asociados con mayor frecuencia a la diarrea, al astrovirus y al rotavirus como la causa más común de diarrea pediátrica siendo el G1P[8], el G2P[4], el G3P[8], el G4P[8] Y el G9P[8] los cinco genotipos más frecuentes ⁴⁰

En Colombia, se ha reportado que la enfermedad diarreica aguda ocupa el segundo lugar de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años principalmente en donde las necesidades básicas son insatisfechas, en el 2011 se presentaron 314 muertes por diarrea en menores de 5 años, con un tasa de 7.34 x 100.000 menores. Esta enfermedad se incluye dentro de las que causan el 60 a 80% de las consultas pediátricas y del 40 a 50% de las hospitalizaciones en niños menores de cinco años.⁴¹ . En el 2016 se registraron 3'399.997 casos de enfermedad diarreica aguda, al comparar respecto a los años 2014 y 2015 se observó que a la semana epidemiológica 52 habían 3'041.766 de casos lo que corresponde al 11.8% de incremento con respecto al año 2016 (**Figura 1**) ¹.

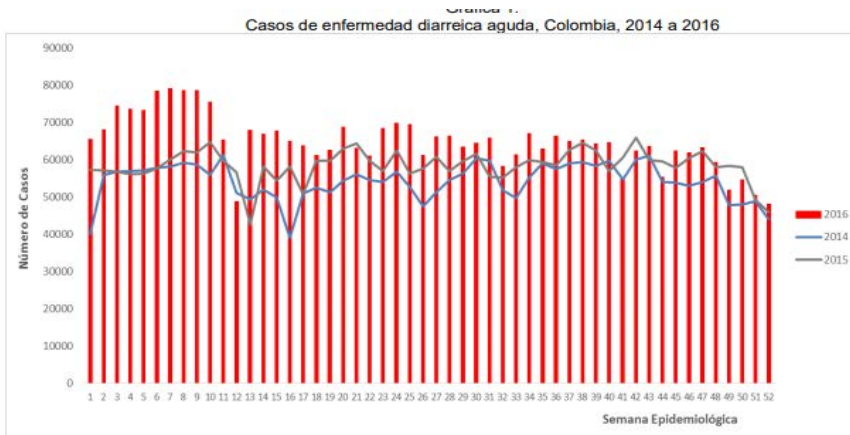


Figura 1. Casos de enfermedad diarreica aguda en Colombia entre el año 2014 y 2016. Tomado de: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/PSP/asis-colombia-2016.pdf>

En el 2017 se notificaron 116 muertes por enfermedad diarreica aguda en niños menores de cinco años donde el 61.2% corresponde a muertes en niños menores de un año, en comparación con el 2016 se observó una disminución del 13% en el número de casos. Respecto a la tasa de mortalidad se observó un mayor valor en los departamentos del Chocó, la Guajira, Risaralda, Valle del Cauca, Norte de Santander y Vichada (**Figura 2**) ¹.

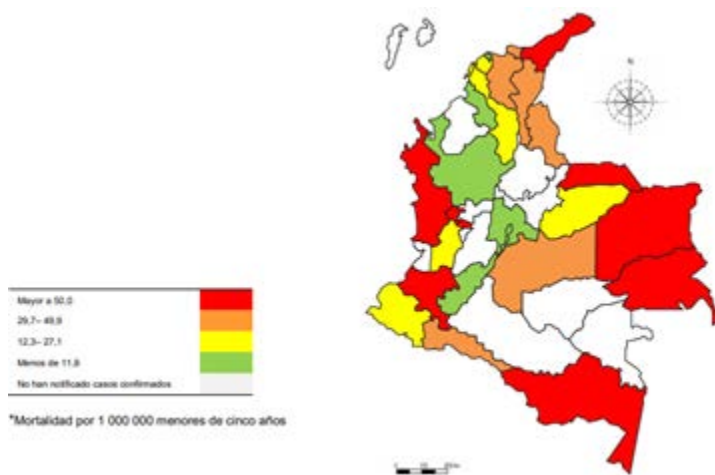


Figura 2. Mortalidad por enfermedad diarreaica aguda en menores de cinco años según entidad territorial de residencia, periodo epidemiológico XIII, en Colombia para el 2017.

Tomado de: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/PSP/asis-colombia-2016.pdf>

5.2. Rotavirus

5.2.1 Generalidades

Rotavirus es un virus que pertenece a la familia *Reoviridae*, descrito en 1963 en muestras fecales de ratones y monos por microscopía electrónica. Este virus tiene un diámetro de 75 nm aproximadamente, es un virus ARN de doble cadena, desnudo y de forma icosaédrica. El ARNdc se encuentra dividido en 11 segmentos que codifican para 6 proteínas estructurales que constituyen las capas proteicas del virus (denominadas VPs) y 6 proteínas no estructurales (denominadas NSP), siendo las NSP las encargadas de llevar a cabo el ciclo de replicación viral, y las VPs las que interactúan con proteínas del huésped para genera la patología y la respuesta inmune ⁴².

El virus se transmite principalmente por la vía fecal-oral pero también puede trasmitirse en bajos títulos del virus en secreciones del conducto respiratorio y otros fluidos corporales. La infección con el virus puede ocurrir a través de la ingestión de alimentos contaminados y/o mediante contacto con superficies contaminadas debido a que el virus es estable en el medio ambiente (**Tabla 1**). La mayoría de infecciones infantiles por rotavirus se relaciona con las condiciones sanitarias, la ubicación del hogar y el nivel socioeconómico pero se ha visto que la incidencia de esta infección es similar en países de niveles socioeconómicos más altos y más bajos lo que indica que no hay distinción alguna. Se ha visto que el rotavirus infecta enterocitos del epitelio medio y superior del intestino en la persona, induce la muerte celular y altera la homeostasis iónica por lo que se considera un proceso multifactorial dado que involucra la liberación descontrolada de Ca²⁺, pérdida de agua y de los electrolitos ⁴³.

Se ha visto que el periodo de incubación del virus en los niños pequeños es de 24 a 78 horas con una duración de 3 a 7 días y de hasta 14 días en los casos que son más graves, las manifestaciones clínicas que produce la infección por rotavirus varían en los niños debido que pueden presentar desde una diarrea acuosa leve de duración limitada hasta una diarrea severa acompañada de vómito y fiebre lo que provoca deshidratación (10-20 deposiciones por día), desequilibrio electrolítico, irritabilidad e incluso la muerte ⁴².

Agente infeccioso	Rotavirus	Norovirus	Astrovirus	Adenovirus
Reservorio	Humano	Humano	Humano	Humano
Mecanismos de transmisión	Contacto directo (fecal-oral) Vehículo común	Contacto directo (fecal-oral) Vehículo común Aerosoles	Contacto directo (fecal-oral)	Contacto directo (fecal-oral)
Período de incubación	3 días (1-4 días)	24 a 48 horas	12 a 72 horas	3 a 10 días
Período de transmisibilidad	Mientras dure la enfermedad y hasta ocho días después	Dos días después del fin de síntomas	Mientras dure la enfermedad	Mientras dure la enfermedad
Medidas de prevención y control	Lavado de manos Desinfección de materiales Vacuna (Rotateq, Rotarix)	Evitar la contaminación del vehículo común Lavado de manos Desinfección del material	Lavado de manos Desinfección del material	Lavado de manos Desinfección del material

Tabla 1. Principales características epidemiológicas de las infecciones por virus causante de gastroenteritis aguda, importancia frente a Rotavirus. Tomado de: <https://miradorsalud.com/del-rotavirus-al-norovirus/>

5.2.2 Ciclo Replicativo

La replicación del rotavirus en el hospedero se da en el intestino, específicamente en el citoplasma de la célula hospedera susceptible que es el enterocito maduro. Las proteínas de las tres capas de su cápside, hacen que el virus sea resistente al ambiente ácido del estómago y a las enzimas digestivas del intestino. Una vez que los viriones del rotavirus arriban al el intestino, estos entran e infectan a los enterocitos de las vellosidades del intestino delgado por medio de endocitosis o penetración directa, lo cual conlleva a cambios funcionales y estructurales en el epitelio. Cuando el virus ya ha penetrado la célula, este pierde su capa más externa la cual está compuesta por la proteína VP7, debido a la baja concentración de Ca^{2+} presente en los endosomas. Al perder la capa más externa se generan las partículas de doble capa (DLPs) que son liberadas al citoplasma, donde empieza el proceso de transcripción ⁴. La selección, el empaquetamiento y la replicación tanto de los segmentos del genoma como la morfogénesis del virión se llevan a cabo en los viroplasma. Una vez formadas las DLPs abandonan el viroplasma y adquieren la capa externa al gemar a través de la membrana del RE, por medio de este proceso los virus son envueltos por una membrana lipídica transitoria la cual pierden conforme las partículas migran dentro del RE y ésta es reemplazada por la tercera capa de proteínas (VP7 y VP4)⁴⁴. Finalmente, los virus salen de la célula por gemación (a pesar de no ser virus envueltos) dándose exclusivamente a nivel de la superficie del enterocito.

Los Rotavirus infectan enterocitos maduros a nivel del intestino delgado sin embargo, se ha visto que puede extenderse la infección hasta el íleon distal y colon. El enterocito infectado empieza a experimentar vacuolización, distensión del retículo endoplasmático y de las mitocondrias lo que lleva a que se altere la arquitectura de las mucosas y con ello un borramiento de las microvellosidades generando una menor superficie de absorción lo conlleva a diarrea. Adicional, se ha visto involucrada la enterotoxina NSP4 en la producción de diarrea al generar un aumento de los niveles de calcio intracitoplasmático por medio de la formación de un complejo NSP4-Receptor el cual induce señales que llevan a la activación de una fosfolipasa C de membrana la cual cliva residuos de fosfatidil inositol desatando la vía del inositol trifosfato promoviendo la liberación de calcio al citosol y posterior a la activación y apertura de un canal de cloro

especifico lo que permite una liberación masiva de cloro y agua hacia la luz intestinal terminando en diarrea⁴⁵.

5.2.3 Terapéutica actual para tratar la diarrea por rotavirus.

Para la prevención y existen dos vacunas contra el rotavirus, una es Rotarix® (derivada de una sola cepa común de rotavirus humano) es una vacuna monovalente atenuada, la cual uso la cepa P1A [8] G1 la cual contiene los antígenos del rotavirus más comunes el VP7 Y VP4, se ha reportado que en América latina la efectividad de la vacuna ha sido del 82%, así mismo ha logrado disminuir el número de hospitalizaciones a un 39% de los casos por diarrea. Esta vacuna en el año 2004 se licenció por primera vez en República Dominicana y México y para el año 2008 había sido aprobada en Estados Unidos. Se caracteriza por semejar la infección natural sin desencadenar en ningún momento la enfermedad, está indicada para la inmunización activa de lactantes contra la enfermedad gastrointestinal grave por rotavirus. En los últimos años esta vacuna se ha introducido en el cronograma de vacunación en más de 90 países en todo el mundo. La segunda vacuna disponible es la denominada RotaTeq®, la cual contiene cuatro rotavirus recombinantes vivos humanos y 1 bovino, incluyendo los serotipos G1 - G4 de una cepa de rotavirus humano y la proteína P7 de la cepa de rotavirus bovino WC3. Esta vacuna se administra en intervalos de 1 a 2 meses en tres dosis y se suele administrar de 6 a 12 semanas de edad. Se ha evidenciado que la eficacia de la vacuna frente a las enfermedades diarreicas ha sido de un 74% lo que ha llevado a reducir el número de hospitalizaciones y la utilización de recursos de salud.⁴⁶

A pesar de que ambas han mostrado ser eficaces para la prevención de la enfermedad, también presentan desventajas dado que en los países de baja renta no tienen accesibilidad a la vacuna lo que hace que la efectividad de esta no se pueda dar, no necesariamente en todos los vacunados se va a inducir una respuesta inmunológica protectora, no protege contra la gastroenteritis causada por otros agentes patógenos y no se puede administrar en niños que padezcan diarrea o vómito, sin embargo la OMS recomienda que las vacunas contra el rotavirus se incluyan en todos los programas nacionales de inmunización y que se consideren una prioridad particularmente en los países de Asia Meridional y Sudoriental y África subsahariana.⁴⁷ En la Actualidad no existen tratamientos antivirales específicos ni fármacos antivirales específicos para la infección que causa el rotavirus, dado que el tratamiento se enfoca a la sintomatología que genera la enfermedad y no inhibir al virus directamente, por ende el tratamiento de la diarrea viral se centra en el reemplazo de líquidos con sales de rehidratación oral (SRO) para prevenir la deshidratación y tratamiento con Zinc para tratar la severidad y duración. El reemplazo de líquidos con sales de rehidratación Oral (SRO) se da según el grado de deshidratación que se presente, se debe tener presente que debe ser hipotónica (Na:60mmol/L, glucosa: 74-111 mmol/L).⁴⁸ En el tratamiento farmacológico están incluidos los antieméticos para reducir el número de episodios de vómitos, sin embargo no debería utilizarse dado que tiene un efecto adverso pues produce un aumento de la incidencia de diarrea y se utiliza antisecretores con el fin de reducir la secreción de agua y electrolitos en el intestino. Adicionalmente se usan otros medicamentos como la loperamida, opiodes, anticolinérgicos o bismuto los cuales no son útiles para el tratamiento dado que son inespecíficos y pueden ejercer efectos secundarios sobre el infante (insuficiencia hepática grave, suboclusion intestinal, colitis pseudomembranosa, somnolencia, confusión, estreñimiento, dolencias estomacales, acidez y/o náuseas).²¹.

5.2.4 Alternativas Terapéuticas

Se ha convertido en un reto desarrollar nuevos tratamientos antivirales para tratar las infecciones por rotavirus, sin embargo el uso de microorganismos probióticos ha ganado mucha influencia en este campo principalmente con el uso de bacterias probióticas que han demostrado ser seguras y accesibles para el tratamiento de enfermedades diarreicas principalmente en poblaciones pediátricas.⁴⁹ Los probióticos son microorganismos no patógenos viables (bacterias o levaduras) los cuales al administrarse en cantidades

suficientes generan un efecto beneficioso en el hospedero. Actualmente la única levadura utilizada es la *Saccharomyces boulardii* no patógena y las bacterias probióticas comúnmente utilizadas son especies de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli*, especies de *Streptococcus*, *Lactococcus lactis* y algunas especies de *Enterococcus*.

Los Probióticos generan beneficios en el hospedero por medio de diferentes mecanismos de acción, estos pueden generar efectos directos sobre el epitelio aumentando la expresión de mucina por medio de las células caliciformes lo que hace que se limite el movimiento bacteriano a través de la capa mucosa, Pueden también aumentar la expresión de defensinas y la secreción de moco por medio de las células epiteliales con el fin de prevenir la proliferación de comensales o patógenos. Por otro lado, los efectos pueden ser sobre la inmunidad de la mucosa dado que aumentan los niveles de células productoras de IgA y por lo tanto la secreción de esta, lo que limita la colonización epitelial al unirse a las bacterias y sus antígenos contribuyendo a la homeostasis intestinal. Otro efecto es la regulación de la presencia de bacterias patógenas gracias a que los Probióticos componen y mejoran la barrera intestinal. Adicional, se ha visto que algunos pueden matar directamente a la bacteria patógena o al menos inhibir el crecimiento de esta a través de la expresión de factores antimicrobianos como lo son las bacteriocinas.⁵⁰

5.3. *Bifidobacterium adolescentis*

El género *Bifidobacterium* fue aislado por primera vez en 1899 ± 1900 por Tisser, describiéndolas como microorganismos anaeróbicos en forma de bastón, con morfología bífida, presente en las heces de los lactantes. Se describen en la literatura como bacterias Gram positivas anaerobias, no formadoras de esporas, no móviles y catalasa negativa. Se ha descrito que para su crecimiento el pH óptimo es de 6 ± 7 así mismo la temperatura es de 37 ± 41°C.⁵¹

Es una especie importante del tracto intestinal y están asociadas con un estado sano en los seres humanos. Se ha descubierto que estos microorganismos son dominantes en el intestino grueso, especialmente en el colon proximal, caracterizada porque tiene múltiples efectos benéficos para la salud, incluyendo la síntesis y mejora de la disponibilidad de nutrientes, mejorar el estado del tracto gastrointestinal, mejora la respuesta del sistema inmune, reduce el colesterol sérico y bloquea y elimina patógenos. También se ha visto que tiene actividad antiviral contra diferentes virus como el virus de la Hepatitis B³³, el Virus del Papiloma Humano tipo 16³⁴, El coxsackievirus B4 y el virus Herpes Simplex tipo 1.³² Así mismo, se reportó en el año 2016 por el grupo de virología de la Pontificia Universidad Javeriana que también puede disminuir la infección viral *in vitro* contra el rotavirus, gracias a que se evidencio que disminuye la producción NSP4 (enterotoxina del rotavirus asociada con la diarrea) y a su vez logra disminuir la cantidad y liberación del Ca intracelular implicado en el efecto de homeostasis celular.¹⁵

5.4. Toxicidad

Se define como la capacidad intrínseca que posee un agente químico de producir efectos adversos sobre un órgano. La toxicología es la identificación y cuantificación de los efectos adversos asociados a la exposición a agentes físicos y sustancias químicas. Es importante tener presente que la toxicología se encuentra dividida en disciplinas normalizadas como, toxicología clínica, la forense, la de investigación y la reguladora, en donde si se hace referencia a que los sistemas o procesos orgánicos se ven afectados hablamos de una inmunotoxicología o toxicología genética.

La toxicología es un importante componente en las estrategias de prevención gracias a que proporciona información sobre los peligros potencialmente utilizados por la industria en el desarrollo de productos por medio de la obtención de información pertinente para el diseño de moléculas o formulaciones.⁵² En el siglo XXI se implementa un nuevo paradigma denominado pruebas de toxicología predictiva, siendo un método de

evaluación de la toxicidad realizada de manera *in vitro* como vía alternativa a los ensayos con animales completos. En la evaluación de toxicidad predictiva se integran ensayos *in vitro*, moleculares y bioquímicos con enfoque de la quimiofarmática para predecir la probabilidad de que puedan generarse efectos adversos por medio de herramientas matemáticas, químicas, estructurales y estadísticas para predecir estos posibles efectos sobre la salud humana y/o el medio ambiente. En los ensayos *in vitro* se incluye el uso de modelos celulares 2D o 3D los cuales comprenden procesos relevantes de señalización, morfología y bioquímica dado que están diseñados para reemplazar ensayos *in vivo*, además de permitir evaluar específicamente los procesos mecánicos que pueden llevar a efectos adversos. Este tipo de ensayos son muy buenos dado que cada vez se está reemplazando más el uso de animales con la gran ventaja de que proporcionan información sobre rutas metabólicas, la interacción de metabolitos activos con dianas celulares y moleculares de manera similar a como sucede *in vivo* como se ha evidenciado con el hígado.³⁸

5.4.1 Glutación-S-Transferasa (GST)

La Glutación-S-Transferasa (GST) representa un grupo importante de enzimas encargadas de desintoxicar tanto compuestos endógenos como productos farmacéuticos y/o contaminantes ambientales por medio de un proceso de biotransformación en donde genera productos solubles en agua más fáciles de eliminar. Es una enzima multifuncional ampliamente estudiada en procariotas y eucariotas.

Su principal función es la de desintoxicar los xenobióticos catalizando el ataque nucleofílico por la forma reducida del glutatión (GSH) sobre átomos electrofílicos de carbono, azufre o nitrógeno de los sustratos xenobióticos no polares con el fin de evitar que estos interactúen con proteínas celulares y ácidos nucleicos generando un daño para la célula.⁵³

5.4.2 Superóxido dismutasa (SOD)

La Superóxido dismutasa participa en la defensa antioxidante contra el O₂ libre, gracias a que cataliza la conversión de O₂ a H₂O₂ el cual puede participar en la señalización celular, Adicional desempeña un papel importante en la inhibición de la inactivación oxidativa del óxido nítrico evitando la formación de peroxinitrito y por consiguiente evita la disfunción endotelial y mitocondrial. Se ha estudiado que esta enzima inhibe la citotoxicidad inducida por O₂ a través de la inactivación de los centros de hierro-azufre que suelen contener las enzimas mitocondriales como la aconitasa y la fumarasa, esta reacción es importante dado que si no se lleva a cabo el O₂ puede inactivar las enzimas que contienen Hierro y Azufre haciendo que el hierro se libere y conlleve a la formación de un radical hidroxilo altamente tóxico que puede generar un daño oxidativo en el ADN mitocondrial⁵⁴.

5.4.3 Respiración mitocondrial MTT

Es un ensayo colorimétrico rápido, versátil y cuantitativo, basado en una sal de tetrazolio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) donde se mide la supervivencia y/o proliferación de las células por medio de espectrofotometría a una absorbancia de 540-570 nm.

El MTT es una sal de tetrazolio de color amarillo la cual permite medir la actividad y viabilidad celular por la reducción (aceptación de H⁺) del anillo de la sal de tetrazolio MTT por acción de enzimas deshidrogenasas principalmente la succinato-deshidrogenasa a cristales azules de formazán insolubles en agua pero solubles en dimetil sulfóxido (DMSO). La viabilidad celular es proporcional a la absorbancia que presentan los cristales de formazán⁵⁵ (**Figura 3**).

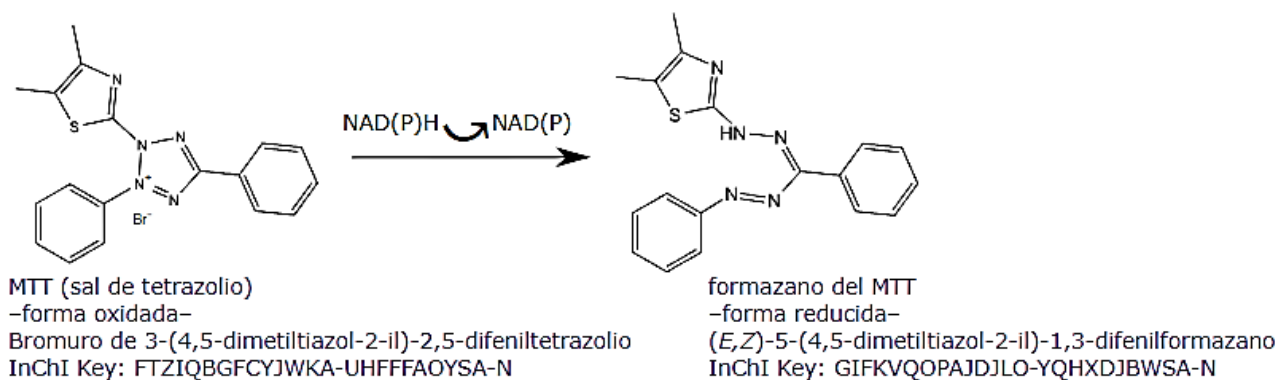


Figura 3. Metabolización del MTT a sales de formazán por células viables. Tomado de: Diaz SLC. Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Isertia laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. *Pontif Univ Javeriana*. 2006

5.5 Hepatotoxicidad

La Hepatotoxicidad es un problema clínico importante en todo el mundo, es una de las principales razones por las que fármacos candidatos fracasan o a la retirada de medicamentos que ya se habían aprobado y se estaban administrando. Se ha evidenciado que los mecanismos generales implicados en la hepatotoxicidad inducida por fármacos incluye la muerte celular, la formación de metabolitos reactivos mediado por el metabolismo, la reacción mediada por el sistema inmune y la disfunción mitocondrial.⁵⁶

En este caso, los estudios con animales han mostrado ser insuficientes para evitar que candidatos a fármacos puedan entrar en ensayos clínicos por lo que se han buscado herramientas adicionales que permitan realizar una mejor evaluación del riesgo hepatotóxico en humanos. En la actualidad se utilizan ensayos basados en células, como monocultivos de hepatocitos primarios, sin embargo, no son muy buenos dado que se ha evidenciado que presentan pérdida de la actividad metabólica del citocromo P450 y una breve ventana experimental al haber disminución de la viabilidad celular y desdiferenciación. Otra opción es la línea celular de hepatoma humano HepG2 pero tiene una desventaja y es que la expresión de enzimas metabólicas es baja y la expresión de receptores nucleares es reducida, sumado a que es una línea tumoral.⁵⁷ No obstante, se ha venido estudiando otra línea celular de origen hepático denominada THLE-2 que ha mostrado ser una buena opción gracias a que expresan características fenotípicas de las células epiteliales hepáticas adultas normales y a que conservan las actividades enzimáticas de fase I y II, además de tener capacidad de metabolizar carcinógenos a sus metabolitos carcinogénicos finales capaces de unirse al ADN.⁵⁸

5.1 Línea Celular THLE-2

La línea celular THLE-2 se derivó de células hepáticas normales primarias (lóbulo izquierdo) de adulto, las células epiteliales fueron transformadas con el antígeno T del virus SV40 mediante la introducción de un vector retroviral que contenía el fragmento *Bgl I-Hpa I* del antígeno T grande en la línea celular de empaquetamiento anfotrópico PA317.

Estas células hepáticas humanas immortalizadas constituyen un modelo *in vitro* para estudios farmacotoxicológicos y también para la investigación de la etiología y patogénesis del carcinoma hepatocelular, gracias a que expresan características fenotípicas de las células epiteliales hepáticas normales de adulto. Adicional se caracteriza por ser una línea no tumorigénica, por tener cariotipos casi diploides y por no expresar alfa-fetoproteína. Esta línea tiene la capacidad de metabolizar benzo[a]pireno, N-nitrosodimetilamina y aflatoxina B1 a sus metabolitos carcinogénicos finales que se unen al ADN lo que indica que las vías del citocromo P450 son funcionales, así como la actividad de enzimas involucradas en el

metabolismo como NADPH citocromo P450 reductasa, Superóxido Dismutasa, Catalasa, Glutación S-transferasa y Glutación peroxidasa.⁵⁹

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Evaluar el potencial hepatotóxico de metabolitos proteicos producidos por *Bifidobacterium adolescentis* sobre la línea celular de origen humano THLE-2.

6.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto que ejercen los metabolitos proteicos de interés sobre la respiración mitocondrial a través de la actividad succinato deshidrogenasa.
- Evaluar si los metabolitos proteicos de interés inducen mecanismos de detoxificación a través de actividad de la Glutación-S-Transferasa (GST).
- Evaluar si los metabolitos proteicos de interés ejercen un aumento de especies reactivas de O₂ intracelular mediante la actividad superóxido dismutasa (SOD).

7. Propuesta Metodológica

7.1. Metabolitos proteicos de *Bifidobacterium adolescentis* 20083.

Previamente los metabolitos fueron producidos en lotes de cultivo de *B. adolescentis* de 500 mL, bajo condiciones de anaerobiosis estricta con mezcla 80:20 de N₂:CO₂ a 37°C. Las proteínas separadas por ultrafiltración, chequeadas por SDS-PAGE y cuantificadas por el método de ácido bicinónico se pegilan con PEG 8000 al 10% p/v. Finalmente se resuspendieron en buffer de mantenimiento con glicerol al 10% y se almacenaron a -20°C (Lo realizó otra estudiante).

7.2. Línea celular THLE-2

Se utilizó la línea celular THLE-2 (Origen hepático humano/ Adulto), las cuales fueron cultivadas en botellas T25 tratadas con una mezcla de 0.01 mg/mL de fibronectina, 0.03 mg/mL de colágeno humano y 0.01 mg/mL de albumina sérica bovina disuelta en medio BEBM. Para llevar a cabo el subcultivo se descartó el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS1X una vez, luego con PBS-EDTA 1mM una vez y luego se disociaron las células con EDTA-Tripsina 0.25% (p/v). Pasados 8 minutos se agregó medio BEBM suplementado con extracto pituitario bovino, hidrocortisona, hEGF, insulina, triiodotironina, transferrina, ácido retinoico y suero fetal bovino al 10% para neutralizar la tripsina. El subcultivo se realizó en proporción 1:3.

La siembra en placas de 96 pozos se realizó tripsinizando las células de la misma manera explicada, se hizo conteo de células viables en cámara de Neubauer y se sembraron 10.000 células por pozo. Estas se incubaron a 37°C con 5% CO₂.

7.3. Ensayo de afectación de la respiración mitocondrial mediante el método de MTT.

A las 48 horas de sembradas las células, se lavaron con medio de cultivo sin suero fetal bovino y fueron puestas en contacto con los metabolitos proteicos de *Bifidobacterium adolescentis* 20083 diluidos en el mismo medio a diferentes concentraciones 1:2 desde 250µg/mL hasta 0,03µg/mL durante 72 horas a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂. Pasado este tiempo, se procedió a evaluar la actividad mitocondrial midiendo la viabilidad celular por el método de MTT (Sigma- Adrich Cat# M2128) siguiendo las instrucciones del fabricante, en donde se agregó 30µl de MTT preparado a una concentración de 1 mg/mL en PBS y se incubo durante 4 horas a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂. Después de este tiempo se procedió a retirar el MTT y agregar 100µl de DMSO (Para solubilizar los cristales de formazán), se llevó la placa a agitación a 550 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente y finalmente se leyó a 540 nm.

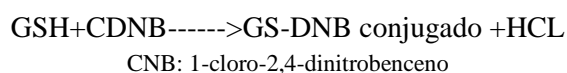
Este ensayo se realizó 3 veces por triplicado cada tratamiento. A partir de los resultados se determinaron las concentraciones tóxicas. El control de viabilidad fueron células sin tratamiento.

7.4. Evaluación de marcadores de toxicidad

Se evaluó la actividad de dos marcadores específicos de metabolismo hepático de xenobióticos: Glutación-S-Transferasa y Superóxido dismutasa, los cuales pueden alterar su actividad en presencia de un posible efecto tóxico por estrés celular.

7.4.1 Medición de la actividad de la enzima Glutación-S-Transferasa.

Se evaluó la actividad de la Glutación- S- Transferasa usando el estuche comercial Glutathione-S-Transferase (GST) Assay Kit, (Sigma-Aldrich Cat# CS0410), siendo un método colorimétrico que muestra la actividad del enzima, fundamentado en la siguiente reacción:



La tasa de aumento en la absorción es directamente proporcional a la actividad de GST.⁶⁰

Para ello se sembraron igualmente 10.000 células/pozo en placas de 96 pozos durante 48 horas a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂, luego de este tiempo se lavaron las células con medio sin suero fetal bovino y fueron puestas en contacto con los metabolitos proteicos de *Bifidobacterium adolescentis* 20083 a diferentes concentraciones 1:2 desde 250µg/mL hasta 0µg/mL durante 72 horas a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂. Se procedió a lavar con 100µl de medio de cultivo sin SFB, se tripsinizaron y se neutralizo con medio con SFB. El contenido de cada pozo se trasladó a tubos de 0.6 mL los cuales se llevaron a centrifugar a 2800 g durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadió 100µl de PBS-Tritón al 1% durante 30 minutos a temperatura ambiente para luego ser almacenados a -20°C O/N.

La actividad de GST se analizó espectrofotométricamente a 355 nm con glutatión reducido (GSH) y 1-cloro-2,4- dinitrobencono (CDNB) como sustratos. Se realizó una dilución 1:10 de las muestras y el control, para ello una vez descongeladas se llevaron a centrifugar a 10000 g durante 10 minutos, se tomaron 2 µl de muestra y se diluyo con 18µl con Buffer de muestra, finalmente y siguiendo las instrucciones del fabricante se mezclaron en una placa de 96 pozos todos los componente de la reacción enzimática agregando 4µl de cada muestra y el control con 196µl del master mix y 200µl solo de master mix como blanco, se agito suavemente por unos segundos y se leyó a 355 nm cada minuto durante 6 minutos.⁶¹

Los resultados se expresaron como el número de veces que cambia la actividad de la enzima ejercidos por los metabolitos proteicos en comparación con el control negativo - Mock (Células sin tratamiento), para ellos se estableció la Absorbancia de Mock como 1 (Comportamiento basal) y se calculó mediante la ecuación ((Abs (Muestra)*1)/ (Abs Mock)) el cambio en la actividad para cada una de las concentraciones. Se realizaron 3 experimentos cada uno por duplicado, sin embargo al observar un comportamiento diferente entre los experimentos se decidió analizar solo el primero, ya que mostró datos más confiables.

7.4.2 Medición de la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa

Se evaluó la actividad de Superóxido dismutasa usando el estuche comercial SOD Assay Kit (Sigma-Aldrich Cat# 19160) donde se utilizó Sal de tetrazolio de Dojindo altamente soluble en agua, WST-1 (2- (4-yodofenil) - 3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-disulfofenil) 2H tetrazolio, Sal monosódica) que produce un colorante de formazán soluble en agua tras la reducción con un anión superóxido.

Es una técnica colorimétrica, fundamentada en la siguiente reacción (Figura 4):

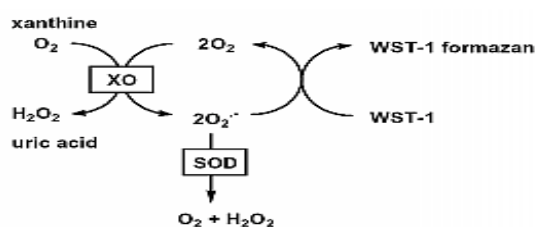


Figura 4. Reacción enzimática de SOD⁶²

Para ello se sembraron igualmente 10.000 células/pozo en placas de 96 pozos durante 48 horas a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂, y se procedió a efectuar el mismo procedimiento mencionado anteriormente en ‘la medición de la actividad de la enzima GST⁶³. La actividad de SOD se analizó espectrofotométricamente a 450 nm siguiendo las instrucciones del fabricante, se procedió a preparar las

soluciones de trabajo en donde para la solución de trabajo (WST) se diluyó 1:20, para la solución de trabajo enzimático en primer lugar se llevó el tubo a centrifugar durante 5 segundos y después se diluyeron 15µl de esta solución con 2.500µl Buffer de dilución. Una vez preparado las soluciones de trabajo se descongelaron las muestras a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos, luego en una placa de 96 pozos se mezclaron 20 µl de cada muestra con 200µl de solución de trabajo más 20µl de solución de trabajo enzimático, se mezcló bien la placa por 5 min a temperatura ambiente y se llevó a incubar a 37°C durante 20 minutos. Finalmente, pasado este tiempo se leyó la placa a 450 nm cada minuto durante 10 minutos.

Los resultados se expresaron en porcentaje de actividad de SOD mediante la ecuación indicada en el Kit: $\frac{[(\text{Ablanco1}-\text{Ablanco3})-(\text{Amuestra}-\text{Ablanco2})]}{(\text{Ablanco1}-\text{Ablanco3})} \times 100$, cada una de las diferentes concentraciones fue comparada con el Mock (células sin tratamiento). Se realizaron 3 experimentos cada uno por duplicado.

Cuantificación de proteínas citoplasmáticas de células THLE-2 previamente expuestas por 72h a proteínas del secretoma de *B. adolescentis*.

Paralelamente, se cuantificó el contenido de proteína por duplicado utilizando el kit de ácido bicinonónico (BCA) (Pierce - Thermo Scientific™ 23227) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las concentraciones de proteína se calcularon usando una curva estándar preparada con albúmina sérica bovina del mismo estuche

63.

7.4 Análisis estadístico: Para realizar el análisis estadística de los resultados se utilizó estadística no paramétrica donde se determinó la media y la desviación estándar empleando GraphPad prism versión 7.02. con el fin de establecer comparaciones en los niveles de cada uno de los factores experimentales (diferentes concentraciones) respecto al control indicando si existen diferencias significativas entre sí se aplicó el test U de Mann-Whitney. Se consideraron diferencias significativas con $P < 0,05$.

8. Resultados

Luego de las 72h post-exposición de las células de origen hepático THLE-2 a los metabolitos proteicos de interés de *B. adolescentis*, se evaluó la respiración mitocondrial, actividad GST y SOD, como marcadores de toxicidad celular. En total 14 concentraciones (1:2) de metabolitos proteicos fueron tenidas en cuenta, desde 250µg/mL hasta 0,03 µg/mL y cada una de las técnicas tuvo sus respectivos controles. A continuación la descripción de los resultados obtenidos para cada una de las evaluaciones.

8.1 Efecto ejercido por los metabolitos del secretoma de *B. adolescentis* sobre la respiración mitocondrial de células THLE-2

Se realizó el análisis con MTT el cual mostró que las concentraciones entre 250µg/mL y 15,6 µg/mL resultan ser significativamente tóxicas para las células en comparación con el control negativo ($p < 0,0001$) y 7,8µg/mL ($p = 0,0003$), con un rango de toxicidad entre el 59% (250µg/mL) y 18% (7,8 µg/mL). Las demás concentraciones desde 3,9µg/mL a 0,03µg/mL ejercieron un rango de % de toxicidad menor entre 9% y 1%, respectivamente. Se observó un 0% de toxicidad para el control negativo (**Figura 5**).

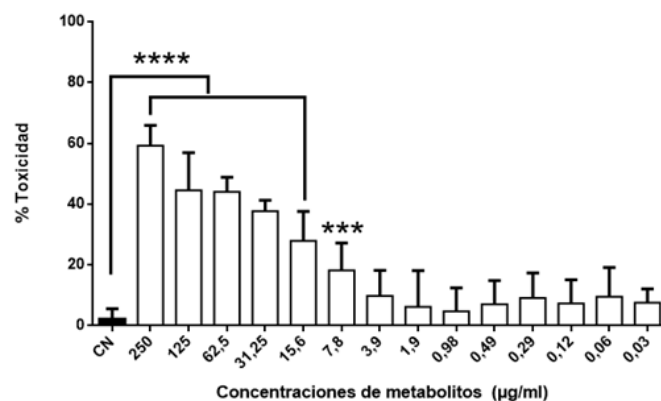


Figura 5. Efecto citotóxico (MTT) que ejercen los metabolitos proteicos de *B. adolescentis* sobre la respiración mitocondrial de células THLE-2 después de ser expuestas a diferentes concentraciones (250µg/mL hasta 0,03 µg/mL) durante 72 horas, como control negativo se utilizaron células THLE-2 sin tratamiento. Los resultados son el producto de 3 ensayos independientes por triplicada. Lectura a 540nm.

8.2 Efecto ejercido por los metabolitos del secretoma de *B. adolescentis* sobre la actividad GST en células THLE-2

Se evaluó la actividad de GST ejercida por los metabolitos proteicos de interés a las mismas concentraciones evaluadas para MTT, se utilizó como control negativo (Mock) células sin tratamiento y como control de la técnica la enzima GST proporcionada por el Kit (Control GST). Las lecturas se realizaron cada minuto durante 6 minutos siguiendo las instrucciones del Kit, observándose un comportamiento de actividad lineal tanto de los tratamientos como del control GST evidenciado en la lectura de las absorbancias siendo similares entre el minuto 1 al minuto 6, a diferencia del MOCK donde se evidencio que a medida que pasaba el tiempo la absorbancia detectada era menor (Figura 6).

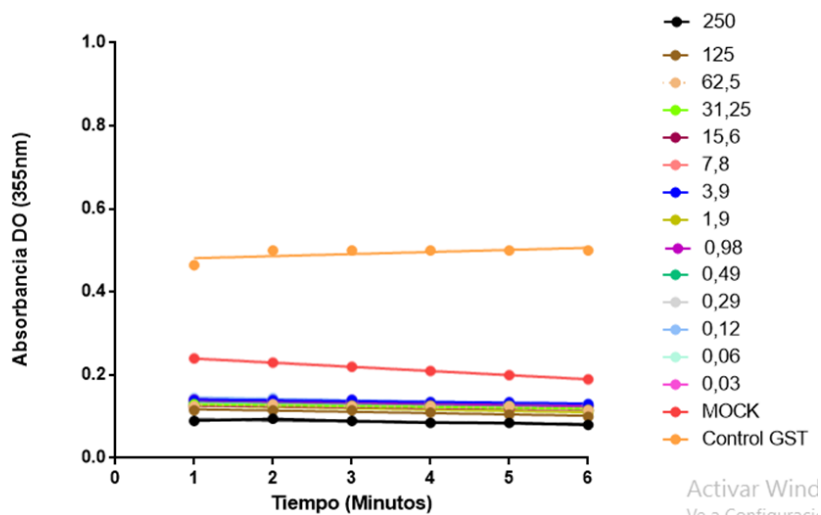


Figura 6. Efecto ejercido sobre la actividad de la Glutacion-S-Transferasa en células THLE-2 después de ser expuestas a diferentes concentraciones (250µg/mL hasta 0,03 µg/mL) de metabolitos proteicos de *B. adolescentis* durante 72 horas. Mock representa células THLE-2 sin tratamiento. La gráfica es el resultado de un experimento independiente realizado por duplicado y muestra el cambio de absorbancias (DO_{355nm}) con respecto al tiempo, medidas cada minuto durante 6 minutos.

Los resultados muestran que todas las concentraciones de los metabolitos de *B. adolescentis* inhibieron la actividad GST en las células THLE-2 expuestas durante 72 horas. Asimismo se nota una tendencia dependiente de la concentración, es decir, la concentración de 250µg/mL fue la que ejerció la mayor disminución en la actividad de la enzima y las concentraciones 3.9 µg/mL, 0.12 µg/mL y 0.03 µg/mL fueron las que ejercieron la menor disminución de la actividad. Todas las concentraciones evaluadas ejercieron una disminución estadísticamente significativa con respecto al Mock ($p < 0.0001$). Con el ánimo de ver el número de veces en que se reduce la actividad se obtuvo la siguiente gráfica donde Mock se interpretó como el comportamiento basal de la actividad evaluada reflejándose como 1 (Figura 7).

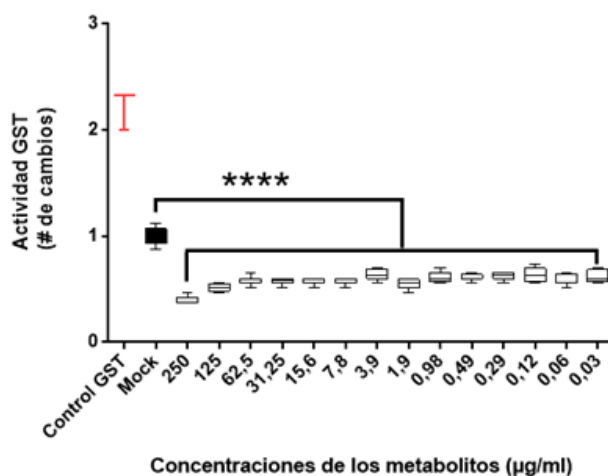


Figura 7. Actividad de Glutación-S-Transferasa en células THLE-2 expuestas a diferentes concentraciones de metabolitos proteicos (250 µg/mL- 0 µg/mL) de *Bifidobacterium adolescentis* durante 72 horas. Mock representa células sin tratamiento y control GST es el control interno del estuche utilizado. La gráfica es el resultado de un experimento independiente realizado por duplicado.

8.3 Efecto ejercido por los metabolitos del secretoma de *B. adolescentis* sobre la actividad SOD en células THLE-2

Usando las mismas concentraciones de metabolitos y exposición durante 72 horas, se evaluó la actividad de SOD en las células THLE-2 teniendo como control negativo células sin tratar (MOCK). Las lecturas se realizaron a 450nm cada minuto durante 10 minutos, observando que todas las concentraciones de metabolitos evaluadas estimulan la actividad de SOD en las células THLE-2. Con el ánimo de ver el porcentaje de actividad de la enzima se obtuvo la siguiente gráfica (Figura 8).

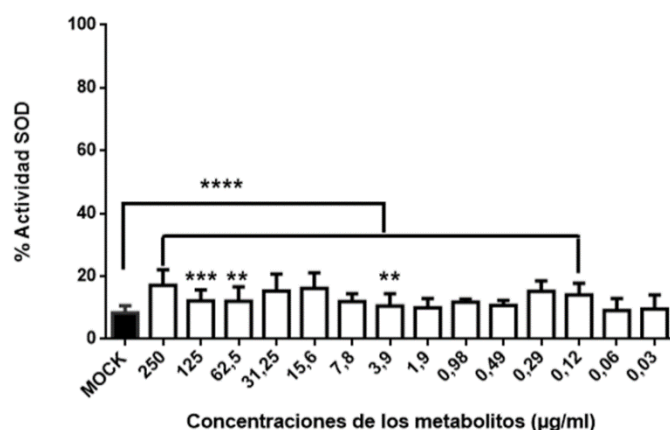


Figura 8. Medición del porcentaje de actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) en células THLE-2 expuestas a diferentes concentraciones de metabolitos proteicos (250 µg/mL- 0,03 µg/mL) de *Bifidobacterium adolescentis* durante 72 horas. Mock representa células sin tratamiento. La gráfica es el resultado de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

Así, las concentraciones de los metabolitos proteicos desde 250 µg/mL hasta 0,12 µg/mL ejercieron un aumento significativo en la actividad de la enzima con respecto al Mock ($p < 0,0001$). Con respecto a la concentración 0,06 µg/mL y 0,03 µg/mL se observa que ejercen un menor aumento en la actividad enzimática en comparación con las demás concentraciones, sin embargo, no fueron estadísticamente significativas en comparación con el Mock.

Cuantificación de proteínas citoplasmáticas de células THLE-2 expuestas por 72h a proteínas del secretoma de *B. adolescentis*.

Se realizó la cuantificación de proteínas citoplasmáticas (Ácido bicinonónico – BCA) tras exponer a diferentes concentraciones desde 250 µg/mL hasta 0,03 µg/mL. Los resultados se resumen en la siguiente tabla (Tabla 2).

Concentraciones de proteínas de <i>B. adolescentis</i> usadas en las células THLE-2 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	concentraciones finales de proteínas citoplasmáticas totales de THLE-2 post tratamiento ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
250	2,36
125	2,04
62,5	1,84
31,3	1,05
15,63	1,08
7,81	1,20
3,91	1,48
1,95	1,16
0,98	1,48
0,49	1,20
0,29	1,44
0,122	1,36
0,061	1,72
0,03	1,72

Tabla 2. Concentraciones de proteínas de *B. adolescentis* usadas para tratar células THLE-2 durante 72 horas y concentraciones finales de proteínas citoplasmáticas totales de THLE-2 después de los tratamientos. La medición se realizó por el método del ácido bicinónico y las lecturas fueron realizadas a 540nm.

9. Discusión

Durante los últimos años se ha visto que numerosos medicamentos y alternativas terapéuticas han sido retirados o no se han llevado al mercado a causa de la falta de seguridad de uso y por esto, es necesario que durante el desarrollo esta clase de valoraciones sea realizada con suficiencia, iniciando con estudios *in vitro*⁶⁴.

Se conoce que uno de los órganos principales involucrados en reacciones de toxicidad es el hígado, razón por la cual muchos de los estudios se realizan en líneas celulares hepáticas de las cuales se resalta la línea celular THLE-2 como una de las más importantes por ser de origen humano normales y por su capacidad y estabilidad metabólica como modelo *in vitro* para estudios farmacotoxicológicos⁶⁵. Esta línea tiene la capacidad de metabolizar benzo[a]pireno, N-nitrosodimetilamina y aflatoxina B1 a sus metabolitos carcinogénicos finales que se unen al ADN lo que indica que las vías del citocromo P450 son funcionales (indica funcionalidad similar al hígado humano), así como la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo como NADPH citocromo P450 reductasa, Superóxido dismutasa, Catalasa, Glutación S-transferasa y Glutación peroxidasa⁶⁶ por lo que fue seleccionada para este estudio.

En diferentes estudios se ha visto implicado el uso de la línea celular THLE-2 para evaluar el efecto hepatotóxico junto con marcadores de estrés oxidativo de xenobióticos, hipoglucemiantes orales como triglitazone⁶¹ y otros tipos de fármacos⁶⁴. En este estudio, se evaluó el posible efecto hepatotóxico ejercido por los metabolitos del secretoma de *B. adolescentis* previamente descritos por Olaya y col., por tener una actividad antirotavirus¹⁵. Similar al trabajo previo en 2016 de Olaya y col., se evaluaron diferentes concentraciones pero a diluciones 1:2 desde 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 0,03 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados observados muestran la afectación mitocondrial desde un 1% hasta un 59%, resultados que no correlacionan con los obtenidos por Olaya y col., donde concentraciones menores a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los metabolitos para cada bacteria fueron >90% atóxicas en la línea celular MA104 (Células de Riñón de Mono Verde) susceptibles de infección por el rotavirus cepa RRV (Rhesus Rotavirus). Estas diferencias en primera instancia pueden estar

determinadas al tipo de células evaluadas ya que los hepatocitos tienen algunas funciones metabólicas diferentes en comparación con las células renales ⁶⁷Asimismo el principal propósito de Olaya y col., fue evaluar la actividad antiviral de estos metabolitos, no la toxicidad hepática en células de origen humano¹⁵.

Por otra parte, los resultados del presente trabajo relacionados con la evaluación de la actividad de GST y SOD, manifestaron una afectación de la actividad de las dos enzimas. Así, se pudo observar que ocurrió la inhibición de la GST citoplasmática en las células THLE-2 tratadas con todas las concentraciones de proteínas lo que correlaciona con la afectación de la respiración mitocondrial evaluada por MTT observada principalmente con concentraciones entre 250µg/mL hasta 7,8 µg/mL. La CC50 calculada es de 211µg/mL.

En un estudio reportado por M.E. Letelier y col., mostraron que la disminución de la actividad de la enzima puede darse a través de dos mecanismos: oxidación inducida por ROS y unión no específica de Cu²⁺ + a los grupos tiol⁷⁰. Otro estudio similar mostró igualmente reducción en la actividad de la enzima ejercida por flavonoides donde se encontró la generación de ROS y la inhibición de la actividad por la unión de los flavonoides a los grupos tiol y/o a los sitios activos de la enzima ⁷¹ por lo que se generaría la hipótesis de que alguna porción de los metabolitos proteicos evaluados en el presente trabajo podrían estar uniéndose al sitio activo de la GST ejerciendo un efecto de reducción sobre su actividad o por la disminución inducida de la expresión de los genes de GST.

Las superóxido dismutasas son un grupo de metaloenzimas que protegen a las células de los radicales superóxido generados endógenamente. Si las proteínas evaluadas en el presente trabajo están promoviendo la producción de ROS por estrés de la mitocondria, es de esperarse que la actividad de SOD aumente tal y como sucedió de manera estadísticamente significativa, lo que correlaciona con los resultados de MTT observados y descritos anteriormente.

En conjunto se obtuvo con este trabajo que las proteínas del secretoma de *B. adolescentis* previamente reportadas por tener una actividad antiviral *in vitro* contra rotavirus, ejercen estrés celular mediado por inhibición de la actividad de la respiración mitocondrial y aumento en la producción de ROS. Si las proteínas que posiblemente se están uniendo a sitios activos de GST son las mismas que ejercen la actividad antiviral debe ser comprobado, toda vez que en los ensayos se ha evaluado el pull completo de proteínas extraídas del secretoma del *B. adolescentis* por lo que una o varias proteínas podrían estar involucradas en cada uno de los efectos (antiviral y de inhibición de la GST). Por otra parte, aunque la GST fue inhibida por las proteínas de interés, la actividad de SOD aumentó lo que significa que esta enzima está defendiendo a las THLE-2 de los radicales libres producidos endógenamente y podría ser esta actividad la que defiende de la muerte celular cuando se exponen las células a concentraciones menores de 7,8µg/mL, según lo mostrado por los resultados de MTT.

Finalmente es importante analizar, que en el posible evento de una administración oral de las proteínas de interés producidas por *B. adolescentis*, éstas atravesarán una primera barrera que es el ambiente ácido de estómago en donde deben permanecer estables aquellas que tengan actividad contra los rotavirus para que continúen su camino hasta el intestino delgado donde se encontrarán con las partículas virales. En este órgano también tendrán que interactuar con los enterocitos maduros y algunas posiblemente se excretarán sin interactuar. Olaya y col., mostraron que algunas de estas proteínas pueden bloquear el ingreso de los rotavirus e inhibir el ciclo replicativo después de la infección viral, lo que significa que algunas de las proteínas se adhieren a receptores virales y otras entran al citoplasma celular. Como aspecto particular, las concentraciones evaluadas por Olaya y col., fueron >95% atóxicas en las células MA104 susceptibles de infección por rotavirus. Es posible que el metabolismo en los enterocitos sea diferente, toda vez que estos poseen además bombas de expulsión de xenobióticos, por esto es necesario probarlos en líneas intestinales de origen humano, aspecto que está siendo estudiado por este mismo grupo de investigación.

10. Conclusión

Las proteínas del secretoma de *Bifidobacterium adolescentis* ejercen un daño parcial a las células THLE-2 cuando son expuestas durante 72 horas mediado por estrés mitocondrial y producción de especies reactivas de oxígeno.

11. Recomendaciones

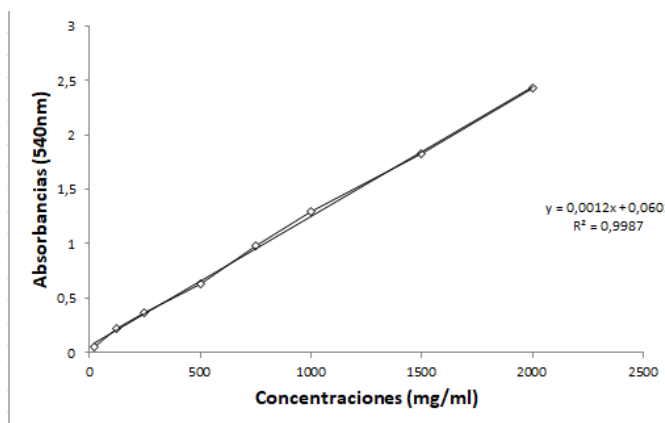
- Se sugiere realizar experimentos de medición de producción de ROS mitocondrial en aras de comprobar su rol en la toxicidad predictiva de las proteínas de interés.
- Se necesita realizar los mismos ensayos con dos lotes adicionales de proteínas obtenidos con la misma metodología para tener ensayos robustos.
- Se necesita realizar ensayos de toxicidad predictiva intestinal en orden de conocer el posible daño que las proteínas de interés causan.

10. ANEXOS

Tabla 1 Cantidad de proteína presente en las diferentes concentraciones de los metabolitos proteicos.

Se realizó la curva estándar con albumina sérica bovina para la cuantificación de proteínas citoplasmáticas

Curva patron			
Concentracion ug/l	Abs 1	Abs 1	Promedio
2000	2,538	2,325	2,4315
1500	1,897	1,757	1,827
1000	1,209	1,390	1,2995
750	0,997	0,967	0,982
500	0,662	0,61	0,636
250	0,364	0,369	0,3665
125	0,242	0,21	0,226
25	0,051	0,042	0,0465



Bibliografía

1. Aguda ED. No Title. 2017;(1).
2. Nacional P. Boletín epidemiológico. 2012;2008:2009-2012.
3. Yen C, Tate JE, Hyde TB, et al. Current status and future considerations Rotavirus vaccines. *Hum Vaccines Immunother.* 2014;10(June):1-13.
4. Manuscript A, Replication R. NIH Public Access. 2013;10(3):165-177. doi:10.1038/nrmicro2673.Structural
5. Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. *Gastroenterology.* 2009;136(6):1939-1951. doi:10.1053/j.gastro.2009.02.076
6. Kotirum S, Vutipongsatorn N, Kongpakwattana K, Hutubessy R, Chaiyakunapruk N. Global economic evaluations of rotavirus vaccines: A systematic review. *Vaccine.* 2017;35(26):3364-3386. doi:10.1016/j.vaccine.2017.04.051
7. Bucardo F, Rippinger CM, Svensson L, Patton JT. Vaccine-derived NSP2 segment in rotaviruses from vaccinated children with gastroenteritis in Nicaragua. *Infect Genet Evol.* 2012;12(6):1282-1294. doi:10.1016/j.meegid.2012.03.007
8. Lukacik M, Thomas RL, Aranda J V. A Meta-analysis of the Effects of Oral Zinc in the Treatment of Acute and Persistent Diarrhea. *Pediatrics.* 2008;121(2):326-336. doi:10.1542/peds.2007-0921
9. Aggarwal R, Sentz J, Miller MA. Role of Zinc Administration in Prevention of Childhood Diarrhea and Respiratory Illnesses: A Meta-analysis. *Pediatrics.* 2007;119(6):1120-1130. doi:10.1542/peds.2006-3481
10. Szajewska H. Probiotics and prebiotics in pediatrics: Where are we now? *Turk J Pediatr.* 2007;49(3):231-244. doi:10.1542/peds.2010-2548
11. Vlasova AN, Kandasamy S, Chattha KS, Rajashekara G, Saif LJ. Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Vet Immunol Immunopathol.* 2016;172:72-84. doi:10.1016/j.vetimm.2016.01.003
12. Lee DK, Park JE, Kim MJ, Seo JG, Lee JH, Ha NJ. Probiotic bacteria, B.longum and L.acidophilus

- inhibit infection by rotavirus in vitro and decrease the duration of diarrhea in pediatric patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015;39(2):237-244. doi:10.1016/j.clinre.2014.09.006
13. Seo BJ, Mun MR, Kumar RVJ, et al. Bile tolerant *Lactobacillus reuteri* isolated from pig feces inhibits enteric bacterial pathogens and porcine rotavirus. *Vet Res Commun*. 2010;34(4):323-333. doi:10.1007/s11259-010-9357-6
 14. Kang JY, Lee DK, Ha NJ, Shin HS. Antiviral effects of *Lactobacillus ruminis* SPM0211 and *Bifidobacterium longum* SPM1205 and SPM1206 on rotavirus-infected Caco-2 cells and a neonatal mouse model. *J Microbiol*. 2015;53(11):796-803. doi:10.1007/s12275-015-5302-2
 15. Olaya Galán NN, Ulloa Rubiano JC, Velez Reyes FA, Fernandez Duarte KP, Salas Cárdenas SP, Gutierrez Fernandez MF. In vitro antiviral activity of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium adolescentis* against rotavirus infection monitored by NSP4 protein production. *J Appl Microbiol*. 2016;120(4):1041-1051. doi:10.1111/jam.13069
 16. OMS. Centro de prensa Enfermedades cardiovasculares. 2014:1-6. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>.
 17. WHO. Immunization , Vaccines and Biologicals :Estimated rotavirus deaths for children under 5 years of age : 2013:1-2. http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/rotavirus/en/.
 18. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, et al. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013. *Clin Infect Dis*. 2016;62(Suppl 2):S96-S105. doi:10.1093/cid/civ1013
 19. Soares-Weiser K, MacLehose H, Bergman H, et al. Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;(11):10-13. doi:10.1002/14651858.CD008521.pub3
 20. World Health Organization. Rotavirus vaccines WHO Position Paper. *Who*. 2013;5(88):49-64.
 21. López P, Cáceres C, López E. Enfermedad por rotavirus clínicas , prevención y manejo. *Precop Scp*. 2010;6(2):45-55.
 22. Farmac F, Tableta C, Terap I, et al. Loperamida. 2018:2-4.
 23. Volkow N. ¿En qué consiste el abuso de medicamentos de prescripción? *Nida*. 2012.
 24. Bi B. Propiedades químicas del Bismuto - Efectos del Bismuto sobre la salud - Efectos ambientales del Bismuto Bismuto. 2018:2018.
 25. Santiago R, Navarro D, Artís M, Duque L, Arredondo C, Rondón L. Terapia complementaria en diarrea aguda. 2014;77(1):93-102.
 26. Yao-Zong Y, Shi-Rong L, Delvaux M. Comparative efficacy of dioctahedral smectite (Smecta®) and a probiotic preparation in chronic functional diarrhoea. *Dig Liver Dis*. 2004;36(12):824-828. doi:10.1016/j.dld.2004.07.012
 27. No Title. 1998.
 28. Antonio L, Rubio S, Huertas AB, G PM, Medina C. Alimentos Funcionales con Probioticos. 2014:113.
 29. World Health Organization. Rotavirus Vaccination. Meeting of the immunization Strategic Advisory Group of Experts, April 2009. *Wkly Epidemiol Rec*. 2009;84(23):220-236. <http://www.who.int/wer/2009/wer8423.pdf?ua=1>.

30. Riechmann ER, Torres JB, José M, Rodríguez L. Diarrea aguda. *Protoc la Soc Española Gastroenterol Hepatol y Nutr Pediátrica y la Soc Española Pediatría*. 2009;20. doi:10.1002/14651858
31. Botschinsky B, Botschinsky D, Tsiami A. A review of the evidence available for the use and effectiveness of probiotic drinks and supplements for the treatment of irritable bowel syndrome. *Int J Probiotics Prebiotics*. 2011;6(1):21-38.
32. El Kfoury KA, Romond MB, Scuotto A, et al. Bifidobacteria-derived lipoproteins inhibit infection with coxsackievirus B4 in vitro. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;50(2):177-185. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.03.010
33. Lee DK, Kang JY, Shin HS, Park IH, Ha NJ. Antiviral activity of Bifidobacterium adolescentis SPM0212 against Hepatitis B virus. *Arch Pharm Res*. 2013;36(12):1525-1532. doi:10.1007/s12272-013-0141-3
34. Cha MK, Lee DK, An HM, et al. Antiviral activity of Bifidobacterium adolescentis SPM1005-A on human papillomavirus type 16. *BMC Med*. 2012;10(1):72. doi:10.1186/1741-7015-10-72
35. An HM, Lee DK, Kim JR, et al. Antiviral activity of bifidobacterium adolescentis SPM 0214 against herpes simplex virus type 1. *Arch Pharm Res*. 2012;35(9):1665-1671. doi:10.1007/s12272-012-0918-9
36. OECD. The application of biotechnology to industrial sustainability – a primer. *Paris OECD Publ*. 2001. doi:10.1205/psep.05005
37. Chapman KL, Holzgreffe H, Black LE, et al. Pharmaceutical toxicology: Designing studies to reduce animal use, while maximizing human translation. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2013;66(1):88-103. doi:10.1016/j.yrtph.2013.03.001
38. Settivari RS, Ball N, Murphy L, Rasoulpour R, Boverhof DR, Carney EW. Predicting the future: opportunities and challenges for the chemical industry to apply 21st-century toxicity testing. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015;54(2):214-223. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4382627&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
39. Order Q, No C, Type C. Thle-2 (atcc ® crl-2706TM). 2018;6597:1-5.
40. Kotloff KL. The Burden and Etiology of Diarrheal Illness in Developing Countries. *Pediatr Clin North Am*. 2017;64(4):799-814. doi:10.1016/j.pcl.2017.03.006
41. De La Hoz F, Enrique M, Duran, Martínez. Pacheco García, Oscar Eduardo. Quijada Bonilla H. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública, mortalidad por enfermedad diarreica agua en menores de 5 años. *Inst Nac Salud*. 2014;1:17.
42. Esona MD. Rotavirus. 2015;35:363-391.
43. Vlasova AN, Amimo JO, Saif LJ. Porcine rotaviruses: Epidemiology, immune responses and control strategies. *Viruses*. 2017;9(3):1-27. doi:10.3390/v9030048
44. Ramig RF. Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection MINIREVIEW Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *J Virol*. 2004;78(19):10213–20. doi:10.1128/JVI.78.19.10213
45. Sirok A, Pera V Le. Agentes virales de gastroenteritis Rotavirus. *Temas Bacteriol y Virol Médica*. 2008:519-534. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/virusgastroenteritis.pdf>.
46. Lin CL, Chen SC, Liu SY, Chen KT. Disease caused by rotavirus infection. *Open Virol J*. 2014;8:14-19. doi:10.2174/1874357901408010014

47. OMS. Inmunización, Vacunas y Productos Biológicos. *Doc posición la OMS sobre las vacunas contra el virus del papiloma Hum.* 2013:1-8. <http://www.who.int/topics/breastfeeding/es/>.
48. Costa i Pagés, Joan; Polanco Allué, Isabel; Gonzalo de Liria R. Guía de práctica clínica: gastroenteritis aguda del niño. *Guía Práctica Clínica SEGHN-SEIP.* 2010:28. http://www.guiasalud.es/GPC/GPC_464_Gastroenteritis.pdf.
49. Pant N, Marcotte H, Brüßow H, Svensson L, Hammarström L. Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and antibodies. *BMC Microbiol.* 2007;7:1-9. doi:10.1186/1471-2180-7-86
50. Ohland CL, Macnaughton WK. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298(167):G807-819. doi:10.1152/ajpgi.00243.2009.
51. Gomes AMP, Malcata FX. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci & Technol.* 1999;10(4-5):139-157. doi:10.1016/S0924-2244(99)00033-3
52. Silbergeld EK. Toxicología, principios generales de la toxicología. *Encicl salud y Segur en el Trab.* 2000:1-84.
53. Awasthi YC, Ramana K V, Chaudhary P, Srivastava SK. Free Radical Biology and Medicine Regulatory roles of glutathione-S-transferases and 4-hydroxynonenal in stress-mediated signaling and toxicity. 2017;111(September 2016):235-243.
54. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(6):1583-1606. doi:10.1089/ars.2011.3999
55. Diaz SLC. Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Iseria laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. *Pontif Univ Javeriana.* 2006:1-104.
56. Shehu AI. Mechanisms of Drug- Induced Hepatotoxicity. *Clin Liver Dis.* 2017;21(1):35-54. doi:10.1016/j.cld.2016.08.002
57. Novik EI, Dwyer J, Morelli JK, et al. Long-enduring primary hepatocyte-based co-cultures improve prediction of hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017;336(September):20-30. doi:10.1016/j.taap.2017.09.013
58. Grollino MG, Raschellà G, Cordelli E, et al. Cytotoxicity, genotoxicity and gene expression changes elicited by exposure of human hepatic cells to Ginkgo biloba leaf extract. *Food Chem Toxicol.* 2017;109:486-496. doi:10.1016/j.fct.2017.09.042
59. Links Q. Thle-2 (atcc ® crl-2706 TM). 2018:3-5.
60. Description P, Solution B, Solution C, et al. Technical bulletin. :5-7.
61. Moatamedi Pour L, Farahnak A, Molaei Rad M, Golmohamadi T, Eshraghian M. Activity Assay of Glutathione S-Transferase (GSTs) Enzyme as a Diagnostic Biomarker for Liver Hydatid Cyst in Vitro. *Iran J Public Health.* 2014;43(7):994-999. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438
62. Gmbh SC, Postfach I. 19160 SOD determination kit. *October.* 2004;50(October):755-757.
63. Pietsch C, Hollender J, Dorusch F, Burkhardt-Holm P. Cytotoxic effects of pentachlorophenol (PCP) and its metabolite tetrachlorohydroquinone (TCHQ) on liver cells are modulated by antioxidants. *Cell Biol Toxicol.* 2014;30(4):233-252. doi:10.1007/s10565-014-9283-4
64. Greene N, Aleo MD, Louise-May S, Price DA, Will Y. Using an in vitro cytotoxicity assay to aid in compound selection for in vivo safety studies. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2010;20(17):5308-5312.

doi:10.1016/j.bmcl.2010.06.129

65. Patel DN, Ho HK, Tan LL, et al. Hepatotoxic potential of asarones: In vitro evaluation of hepatotoxicity and quantitative determination in herbal products. *Front Pharmacol.* 2015;6(FEB):1-13. doi:10.3389/fphar.2015.00025
66. Pfeifer AM, Cole KE, Smoot DT, et al. Simian virus 40 large tumor antigen-immortalized normal human liver epithelial cells express hepatocyte characteristics and metabolize chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(11):5123-5127. doi:10.1073/pnas.90.11.5123
67. Rudo KM, Dauterman WC, Langenbach R. Human and Rat Kidney Cell Metabolism of 2-Acetylaminofluorene and Benzo (a) pyrene. 1989:1187-1192.
68. Tarazona a M, Olivera-Angel M, Lenis YY. Mitochondrial rol and oxidative stress in the developmental blockade of in vitro produced bovine embryos. *Arch Med Vet.* 2010;133(3):125-133. doi:10.4067/S0301-732X2010000300003
69. Liu L, Li T, Tan J, et al. NG as a novel nitric oxide donor induces apoptosis by increasing reactive oxygen species and inhibiting mitochondrial function in MGC803 cells. *Int Immunopharmacol.* 2014;23(1):27-36. doi:10.1016/j.intimp.2014.08.005
70. Letelier ME, Martinez M, Gonzalez-Lira V, Faundez M, Aracena-Parks P. Inhibition of cytosolic glutathione S-transferase activity from rat liver by copper. *Chem Biol Interact.* 2006;164(1-2):39-48. doi:10.1016/j.cbi.2006.08.013
71. Boušová I, Skálová L. Inhibition and induction of glutathione S-transferases by flavonoids: Possible pharmacological and toxicological consequences. *Drug Metab Rev.* 2012;44(4):267-286. doi:10.3109/03602532.2012.713969
72. González LT, Minsky NW, Espinosa LEM, Aranda RS, Meseguer JP, Pérez PC. In vitro assessment of hepatoprotective agents against damage induced by acetaminophen and CCl4. *BMC Complement Altern Med.* 2017;17(1):39. doi:10.1186/s12906-016-1506-1