



Selección y caracterización de una cepa de *Lactiplantibacillus* spp. productora de GABA como potencial modulador del eje microbiota-intestino-cerebro

Lic. Joaquín Lozano

Tesis de Maestría, PEDECIBA

Área Biología,

Sub-Área Microbiología

2023

Director de Tesis: Dr. Pablo Zunino

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Co-Directora de Tesis: Dra. Sofía Fernández-Ciganda

Departamento de Microbiología

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Tribunal de Tesis:

Presidente de tribunal:

Dr. Martín Fraga

Vocales:

Dr. Juan Pablo Damián

Dra. Patricia Lagos

Índice

Resumen.....	4
Lista de Abreviaturas.....	5
Introducción.....	6
Microbiota intestinal.....	6
Eje microbiota-intestino-cerebro.....	8
Microbiota intestinal y patologías neurológicas.....	10
Probióticos.....	13
Probióticos y salud mental.....	15
Ácido γ -aminobutirico.....	17
Quesería y suero fermentos naturales.....	19
Antecedentes.....	22
Hipótesis.....	23
Objetivo general.....	23
Materiales y métodos.....	24
Cepas bacterianas.....	24
Adhesión a mucus.....	24
Formación de biofilms.....	25
Análisis semi-cuantitativo de la producción bacteriana de GABA.....	26
Cuantificación de la producción de GABA por HPLC.....	27
Selección de cepas candidatas para ensayos <i>in vivo</i>	29
Diseño del ensayo <i>in vivo</i> para evaluar efectos de la administración crónica de la cepa LPB145.....	30
Adiestramiento de los animales.....	31
Administración oral crónica de las cepas.....	32
Ensayos comportamentales.....	32
Test de Campo Abierto (CA).....	33
Laberinto en cruz elevado (LCE).....	33
Test de Nado Forzado (TNF).....	34
Visualización y análisis estadístico de datos de ensayos comportamentales.....	36
Colección muestras de heces y extracción de ADN bacteriano.....	37
Secuenciación masiva del gen del ARN ribosomal 16S y procesamiento de datos.....	37
Visualización y análisis estadístico de datos de secuenciación.....	38
Capítulo 1: Caracterización <i>in vitro</i> de cepas aisladas de SFN.....	40
Objetivos específicos.....	40
Resultados.....	40

Adhesión a mucus	40
Formación de biofilms.....	42
Screening semicuantitativo de producción de GABA.....	42
Cuantificación de la producción de GABA por UHPLC-MS.....	43
Selección de la cepa candidata	43
Liofilización de la cepa candidata.....	46
Discusión	46
Capítulo 2: Caracterización de la actividad probiótica de la cepa LPB145.....	49
Objetivos específicos.....	49
Resultados.....	49
Dosis, adiestramiento de los animales y administración oral crónica de la cepa LPB145	49
Comportamientos asociados a la administración de LPB145	50
Efecto del tratamiento con LPB145 sobre la composición microbiana fecal.....	53
Abundancias diferenciales de ASV inducidas por la administración de LPB145.....	58
Discusión	60
Conclusiones	64
Bibliografía	68

Resumen

Las cepas bacterianas implicadas en procesos de fermentación de productos lácteos presentan un interesante potencial por sus posibles cualidades probióticas y sus propiedades tecnológicas. En un estudio realizado previamente, se generó una colección de 101 cepas de lactobacilos aisladas de suero fermentos naturales utilizados en la producción de queso artesanal uruguayo, en función de su potencial para producir ácido gamma-aminobutírico (GABA) y su potencial probiótico.

En este estudio, se profundizó el análisis del potencial probiótico *in vitro* de esta colección, así como la producción de GABA. El GABA es un aminoácido no proteico ampliamente distribuido en la naturaleza. Sin embargo, el papel más conocido de GABA es su función como el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central. La evidencia preclínica y clínica sugiere que el sistema GABA tiene un papel relevante en trastornos de salud mental, lo que sugiere su modulación como una posible estrategia de tratamiento. La producción microbiana de GABA es una propiedad de gran interés para los investigadores preclínicos y clínicos, y también para la industria alimentaria.

En este estudio se seleccionó la cepa LPB145 por su producción de GABA *in vitro* y su potencial como probiótico, y se investigó el efecto de su administración en el comportamiento en ratas. Es así que se evaluaron los efectos conductuales de la administración oral y crónica de LPB145 en comportamientos similares a la ansiedad y la depresión utilizando el laberinto en cruz elevado, el campo abierto y la prueba de natación forzada en ratas. También se evaluó el impacto del tratamiento con la cepa LPB145 sobre la estructura de la microbiota intestinal.

Nuestros resultados mostraron que la administración de LPB145 indujo un comportamiento de tipo antidepresivo sin cambios en la actividad locomotora. En cambio, el tratamiento no modificó la ansiedad experimental. La estructura y la diversidad de la microbiota intestinal no se vieron afectadas por el tratamiento, aunque la abundancia de ASV específicos podría estar implicada en los cambios de comportamiento. Estos hallazgos proporcionan evidencia del potencial de las cepas probióticas aisladas de fuentes alimentarias para modular el eje intestino-cerebro e impactar positivamente en la salud mental.

Lista de Abreviaturas

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta

ASV: *Ampicon sequence variant*

BAL: Bacterias del ácido láctico

BDFN: Factor neurotrófico derivado del cerebro

CA: Campo abierto

Eje MIC: Eje Microbiota-Intestino-cerebro

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GadB: Enzima glutamato descarboxilasa

GadC: Canal antiporter glutamato-GABA

gad: Operón *gad*

GLP-1: *Glucagonlike peptide-1*

GRAS: *Generally regarded as safe*

IL-10: Interleucina-10

IL-6: Interleucina-6

ISRS: Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina

IRSN: Inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina

Lcb: *Lacticaseibacillus*

LCE: Laberinto en cruz elevado

Linfocitos Treg: Linfocitos T reguladores

Lpb: *Lactiplantibacillus*

MI: Microbiota Intestinal

MRS: Mann-Rogosa-Sharpe

NMDS: Escalamiento multidimensional no métrico

ON: Overnight

PYY: Péptido tirosina-tirosina

SFN: Sueros fermento naturales

TGI: Tracto gastrointestinal

TLR: Receptores tipo Toll

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TNF: Test de nado forzado

UFC: Unidades formadoras de colonias

UHPLC/MS: Equipo de Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento acoplado a un espectrómetro de masas

Introducción

Microbiota intestinal

La microbiota intestinal (MI) es una gran comunidad microbiana (aproximadamente 10^{14} microorganismos) que reside en el intestino y vive en simbiosis con su hospedero (Collins et al., 2012). En dicha comunidad predominan las bacterias, aunque también se encuentran arqueas, virus, hongos y protozoarios. Se han identificado en este ambiente, más de 1200 especies de bacterias y más de 7000 cepas, las cuales pertenecen principalmente a los filos Bacteroidetes y Firmicutes y en menor cantidad Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria y Verrucomicrobia. Cada individuo posee, dentro de su MI, una colección de alrededor de 160 especies particulares (Schroeder et al., 2018).

La MI contribuye con la salud del hospedero de varias maneras. Las principales son la digestión de polisacáridos complejos (Hooper & MacPherson, 2010), la protección del hospedero frente a patógenos a través de varios mecanismos, como la exclusión competitiva y la producción de péptidos antimicrobianos, y la estimulación de la respuesta inmune (Dunne et al., 1999), llegando a influir incluso en la morfología y función cerebral (Luczynski et al., 2016).

Se cree que la digestión de polisacáridos complejos fue el impulsor detrás de la evolución de la relación entre los mamíferos y los microorganismos que forman la MI. Esto les ha otorgado a los mamíferos un metagenoma adaptable que codifica para una gran diversidad de enzimas que le permiten al hospedero obtener nutrientes de alimentos que no puede digerir con sus propias enzimas, particularmente carbohidratos (Hooper & MacPherson, 2010).

Existe una gran variabilidad en la composición de la MI, incluso a nivel interpersonal, que es influida por factores tanto intrínsecos como la variabilidad genética entre individuos y la edad, así como extrínsecos como infecciones, uso de antibióticos, enfermedades y principalmente la dieta (Claesson et al., 2011; Salonen et al., 2014).

Existe asimismo una íntima relación entre la microbiota y las células del tejido intestinal, incluyendo células epiteliales, células inmunes y nerviosas. Se ha demostrado que las bacterias de la microbiota intestinal pueden modular algunas funciones de las células del hospedero. Por ejemplo, en comparación con ratones criados en ambientes estériles, sin la posibilidad de adquirir una microbiota intestinal propia (ratones *germ-free*), se determinó que la microbiota intestinal estimula la maduración de las células del epitelio entérico llevando a una mejor absorción de nutrientes por cambios en la expresión de proteínas canales de membrana Na⁺/glucosa, además de proteínas de transporte de lípidos y lipasas (Hooper et al., 2001).

A su vez, la microbiota puede estimular varios procesos como la reparación del tejido epitelial a través de la activación de los receptores tipo Toll (TLR), que generan señales que reclutan células mieloides, las cuales estimulan la proliferación del tejido epitelial. Además, se ha visto que ciertas bacterias pueden activar la rama antiinflamatoria del sistema inmune, ya sea por la inducción de la expresión de citoquinas antiinflamatorias (como IL-10) o por la diferenciación de linfocitos T reguladores (Treg). Esto se vio con ratones gnotobióticos a los cuales se administró un cóctel de bacterias y se pudo observar una expansión de la población de linfocitos Treg de los cuales una fracción expresaban la citoquina anti-inflamatoria Interleucina-10 (IL-10) (Hooper et al., 2012).

Esta interacción se da también en la dirección contraria, ya que la composición de la MI puede ser regulada a través de la acción del sistema inmune entérico del hospedero. Una de estas formas de regulación es la estratificación de la MI causada por la capa de mucina secretada por las células caliciformes, que recubre el epitelio intestinal. Esta capa de mucus separa a la MI del epitelio intestinal y su grosor y tipo de estratificación varían a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI).

En el colon existe una barrera más gruesa, con una capa de mucus fija y otra laxa donde reside la mayor parte de la población bacteriana (Johansson et al., 2008). En otras zonas del intestino en las cuales la capa de mucina no se encuentra tan desarrollada, la estratificación se da en parte por proteínas antimicrobianas secretadas por células epiteliales bajo el control de TLR (Brandl et al., 2007).

Otro agente que cumple un rol en la estratificación es la inmunoglobulina A, secretada por linfocitos B residentes en las placas de Peyer, activados por células dendríticas que censan a las bacterias capaces de atravesar la capa de mucus luminal y las células

epiteliales (Macpherson & Uhr, 2004).

Eje microbiota-intestino-cerebro

Además de la relación entre la microbiota con las células epiteliales e inmunes del tejido intestinal, también existe una relación íntima con el sistema nervioso. Sudo y colaboradores (2004), observaron que ratones *germ-free* respondieron de forma exacerbada a pruebas de respuesta ante el estrés inducido en comparación con controles normales (Hooper et al., 2012; Sudo et al., 2004). Esta respuesta exacerbada pudo ser revertida a través de una re-colonización bacteriana intestinal. Sakar y colaboradores explicaron que estos resultados sobre el comportamiento podrían ser a causa de modificaciones en el eje microbiota-intestino-cerebro (eje MIC) (Sarkar et al., 2016). Este se define como el canal de comunicación bidireccional entre la MI y el cerebro que abarca al sistema nervioso central, el sistema neuroendócrino y neuroinmune, el sistema nervioso autónomo y el sistema nervioso entérico (Grenham et al., 2011).

La conexión entre los sistemas digestivo y nervioso se debe en parte a que durante la embriogénesis ambos tejidos se originan de la cresta neural y se desarrollan en conjunto influenciándose entre ellos mediante señales moleculares (Chen et al., 2013).

En el centro de este eje MIC se encuentra el sistema nervioso entérico, cuyo brazo efector integra señales para generar respuestas fisiológicas como la secreción y la motilidad intestinal, además de modular la actividad inmune, ya que la mayoría de las células inmunes tienen receptores para neurotransmisores. Su brazo aferente recibe señales de los nervios sensoriales entéricos y las envía al cerebro. Señales químicas como la presencia de endotoxinas bacterianas y citoquinas proinflamatorias generan impulsos nerviosos que indican al cerebro el estado de infección bacteriana e inflamación a nivel entérico (Furness, 2012).

El sistema nervioso autónomo se encarga por su parte de inhibir o estimular la función intestinal, dependiendo del contenido intestinal generado por el catabolismo de alimentos por parte de los microorganismos de la MI y la digestión. Este sistema está íntimamente conectado con el sistema límbico, responsable de los instintos y comportamientos. Esta comunicación provee el circuito neural necesario para explicar

la relación entre el comportamiento y la función intestinal tanto en salud, así como en enfermedad (ej. síndrome de colon irritable) (Collins et al., 2012).

Los microorganismos de la MI influyen en este eje a través de varios mecanismos, como la estimulación de la secreción de citoquinas por las células del hospedero. Se conoce que la exposición crónica a altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias puede llevar a desórdenes neuropsiquiátricos y depresión (Cryan et al., 2019; Dowlati et al., 2010; Logan & Katzman, 2005).

Otros mecanismos se basan en la generación de metabolitos secundarios, que llevan a cambios en el sistema nervioso del hospedero. Algunos de estos metabolitos secundarios son neurotransmisores, como la serotonina y el ácido γ -aminobutírico (GABA). La serotonina es un neurotransmisor neuromodulador fundamental del sistema nervioso humano y GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio de la sinapsis. La secreción de estas moléculas por parte de las bacterias suele ser parte del catabolismo de los aminoácidos, siendo el triptófano el precursor de la serotonina y el ácido glutámico el del GABA (Wall et al., 2014) (Figura 1).

La secreción bacteriana de serotonina es responsable de la mayor parte de su concentración en sangre. Se ha observado que en ratones normales los niveles de serotonina fueron 2,8 veces más altos en comparación con ratones *germ-free* (Sarkar et al., 2016). El GABA secretado por bacterias es muy relevante en casos de humanos que padecen de ansiedad o depresión, neuropatologías que se asocian a desequilibrios en los niveles de GABA en sangre (Misra & Mohanty, 2019).

Otros metabolitos producidos por la MI que llegan a influir en este eje son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), productos del metabolismo de polisacáridos complejos. Estos AGCC que incluyen al acetato, butirato y propionato (Qin et al., 2010), se absorben a nivel del intestino delgado y son dirigidos principalmente al tejido muscular esquelético y al hígado, aunque algunos pueden atravesar la barrera hematoencefálica activando áreas específicas del cerebro (Dockray, 2014) (Figura 1).

Los AGCC también estimulan a las células enteroendocrinas a liberar péptidos hormonales como el PYY (péptido tirosina-tirosina), el GLP-1 (*glucagonlike peptide-1*) y la colecistoquinina, los cuales inhiben la motilidad intestinal y disminuyen el tránsito, mejorando así la absorción de nutrientes (Zhang et al., 2008). A su vez, estas hormonas tienen la capacidad de modificar neuronas de forma epigenética al penetrar la barrera

hematoencefálica, generando una cascada de señalizaciones que llega a generar modificaciones como deacetilaciones en sus histonas (Stilling et al., 2014) (Figura 1).

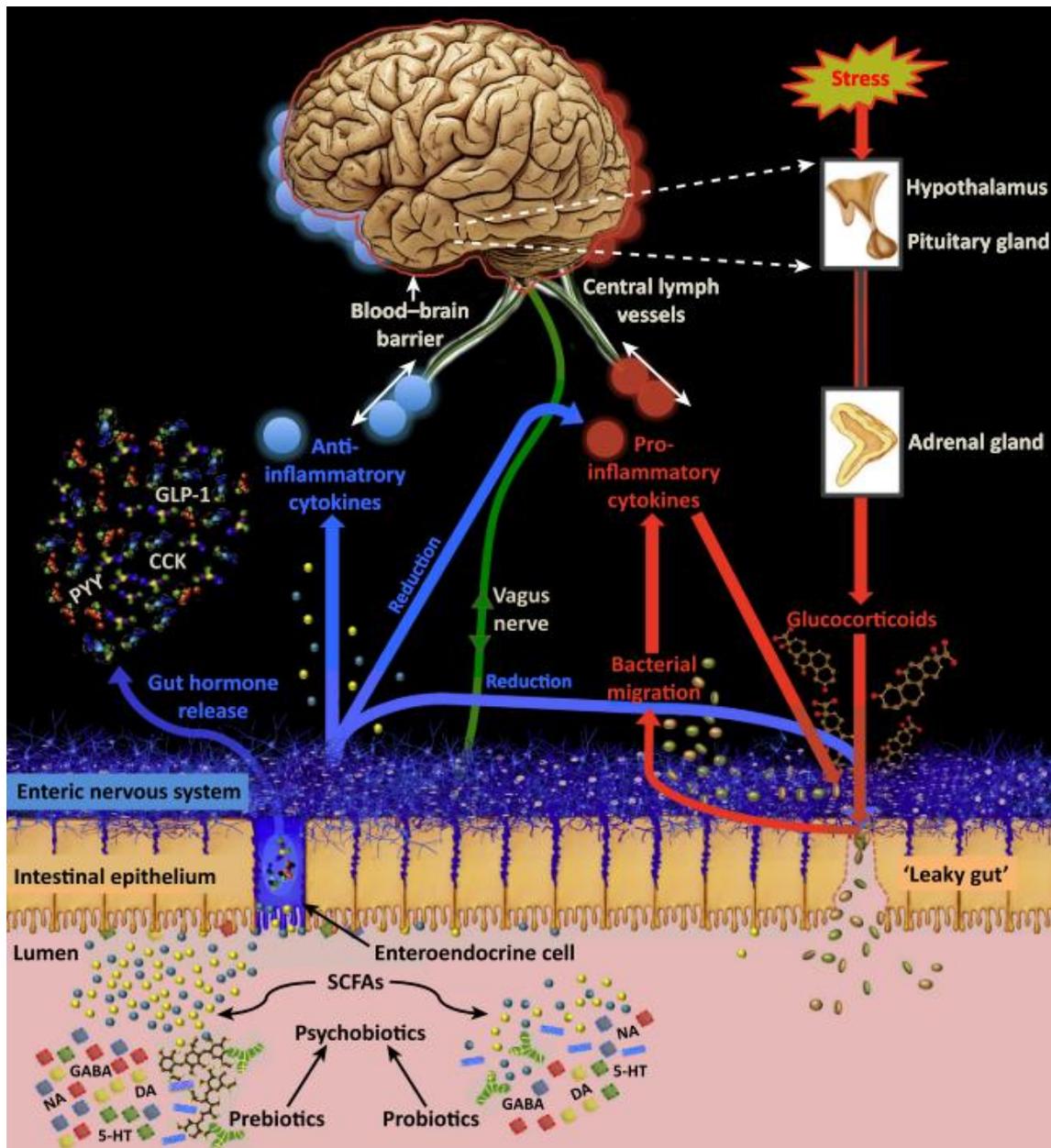


Figura 1: Esquema gráfico del eje microbiota-intestino-cerebro y sus distintas vías de señalización bidireccional, extraído de Sarkar *et al.*, 2016.

Microbiota intestinal y patologías neurológicas

Mediante estos mecanismos, en los últimos años se han evidenciado vínculos entre la MI y distintas patologías neurológicas, como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, fatiga crónica y trastornos del espectro autista. Individuos con estas

patologías poseen MI alteradas al compararse con individuos de similar edad y dieta (Kandpal et al., 2022).

Un claro ejemplo es el de la enfermedad de Alzheimer, en el cual individuos que poseen niveles elevados de GABA tienen menor riesgo de padecer esta enfermedad. Asociado a esto, individuos que padecen la enfermedad presentan, indicios de una baja en las poblaciones de bacterias potencialmente productoras de GABA en la MI (Manyevitch et al., 2018; Zhuang et al., 2020). Otro ejemplo sería el de la enfermedad de Parkinson, en la cual, mediante distintos mecanismos, la MI puede influir directamente en la patogénesis de la enfermedad, llevando a una disminución en los niveles de AGCC y grelina. Dicho compuesto es un conocido neuroprotector que se ha propuesto como posible terapia para esta patología (Bayliss & Andrews, 2013; Morgan et al., 2018). También puede inducir un aumento en la actividad de células microgliales debido a la presencia de citoquinas proinflamatorias, lo cual genera una secreción de neurotoxinas por parte de dichas células, llevando a la pérdida de neuronas dopaminérgicas dentro de la sustancia negra (Elfil et al., 2020).

La depresión es otro caso clínico que involucra al eje MIC, ya que varios metabolitos implicados en esta patología son metabolizados principalmente por bacterias dentro de la MI. Un metabolito esencial en este caso es la serotonina, producida a partir del triptófano. También a partir de este aminoácido se puede formar kynureina, compuesto considerado neurotóxico. Cambios en la MI tienden a la producción de uno u otro compuesto a partir del triptófano disponible. En individuos con depresión se ha visto estimulada la vía de la kynureina, llevando a niveles bajos de serotonina en sangre e inflamación causada por la kynureina, formando el cuadro clínico clásico en cuadros depresivos (Dantzer et al., 2011).

Un sistema de neurotransmisores que se ve afectado dentro de este caso clínico es el sistema GABAérgico, donde se ha visto que las neuronas GABAérgicas en pacientes depresivos muestran una significativa baja en la expresión de receptores GABA_A y transportadores de GABA en ciertas regiones del cerebro como la corteza prefrontal y el hipocampo (Guilloux et al., 2012; Luscher et al., 2011). Regiones involucradas en el procesamiento emocional y la regulación del estado de ánimo.

Cuando hay una disminución en la función gabaérgica, puede haber una mayor excitabilidad neuronal y una menor capacidad de regular las respuestas emocionales, lo que se asocia con los síntomas depresivos (Luscher et al., 2011).

Además, se ha demostrado que algunos antidepresivos, como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) y los inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina (IRSN), pueden aumentar la función gabaérgica. Estos medicamentos actúan sobre el sistema serotoninérgico y noradrenérgico, pero también pueden tener efectos indirectos en el sistema gabaérgico, mejorando la disponibilidad o la eficacia del GABA y ayudando así a aliviar los síntomas depresivos (Pinna et al., 2009).

Es importante destacar que la depresión es un trastorno complejo y multifactorial, en el que intervienen múltiples sistemas neuroquímicos y factores psicosociales. El sistema gabaérgico es solo uno de los aspectos involucrados en la fisiopatología de la depresión, y su relación con esta enfermedad aún se está investigando y comprendiendo en mayor detalle (Sarawagi et al., 2021).

En el caso de la ansiedad, otra clásica patología estudiada en profundidad desde el punto de vista de la endocrinología bacteriana, la comunicación a través de este eje se ve claramente en ensayos de trasplante fecal, donde se evidenció que fenotipos de tipo-ansiedad pueden ser transferidos entre ratones a través del trasplante fecal de ratones afectados a ratones sin signos de comportamientos asociados a la ansiedad (Li et al., 2019).

En cuanto al involucramiento del sistema gabaérgico en esta patología, se conoce que desempeña un papel crucial en la regulación de la excitabilidad neuronal y la respuesta al estrés. La disminución de los niveles de GABA o una alteración en la función gabaérgica pueden contribuir al desarrollo de trastornos de ansiedad. Cuando la función gabaérgica se ve comprometida, hay un desequilibrio en la excitación-inhibición en el cerebro, lo que puede manifestarse como una respuesta exagerada al estrés y una mayor sensibilidad a las situaciones ansiosas (Möhler, 2012).

Los fármacos ansiolíticos, como las benzodiazepinas, actúan aumentando la actividad del sistema gabaérgico en el cerebro, uniéndose a las subunidades α y γ del receptor GABA_A de las neuronas a lo largo de todo el SNC, aumentando la afinidad de estos receptores al GABA. Estos medicamentos facilitan la acción del GABA, lo que conduce a una mayor inhibición neuronal y una reducción de los síntomas de ansiedad (Pym et al.,

2005). Sin embargo, es importante tener en cuenta que el uso a largo plazo de benzodiazepinas puede tener efectos secundarios y riesgo de dependencia, por lo que su uso se recomienda solo de forma temporal y bajo supervisión médica (Schmitz, 2016). En resumen, el sistema gabaérgico desempeña un papel crucial en la regulación de la ansiedad. La disminución de la función gabaérgica puede contribuir al desarrollo de trastornos de ansiedad, mientras que aumentar la actividad gabaérgica, ya sea a través de medicamentos ansiolíticos o intervenciones terapéuticas, puede ayudar a reducir los síntomas de ansiedad y promover una mayor sensación de calma y relajación.

Probióticos

En el 2013, la International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) organizó un encuentro de expertos de distintas áreas asociadas a los probióticos y sus aplicaciones, para generar una actualización del conocimiento y ajustar el concepto de probiótico, establecido por la Organización Mundial de la Salud junto con la Organización para la Alimentación y la Agricultura en 2002 (FAO/WHO et al., 2002). En dicha instancia se definieron los probióticos como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedero.

El uso de probióticos es una práctica ampliamente utilizada tanto en seres humanos como en animales (Ducatelle et al., 2014; Hill et al., 2014). Principalmente, se han utilizado cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* debido a distintas características intrínsecas de estos géneros, como considerarse en general bacterias de tipo GRAS (*generally regarded as safe*) por cumplir con la normativa de seguridad para su consumo establecida por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) de los EEUU (Wessels et al., 2004). Se los considera parte de la microbiota normal de los mamíferos (Reid et al., 1999) y poseen características deseables en productos comerciales como la capacidad de resistir distintos procesos de conservación (ej. liofilización) (Vinderola et al., 2017).

Reid y colaboradores establecieron una serie de requerimientos mínimos para la evaluación de un microorganismo para ser llamado probiótico en concordancia con lo establecido por la ISAPP (Reid et al., 2019).

- Los microorganismos deben estar vivos y en números suficientes cuando se administran.
- Los microorganismos deben estar identificados genéticamente a nivel de cepa, utilizando la terminología actual.
- Se deben realizar estudios de tamaño y diseño apropiados utilizando la cepa en el hospedero al que está destinado el probiótico (tanto humanos como especies animales).
- Cepas que muestren dar un beneficio con respecto a alguna condición, pueden no ser probióticos para otra aplicación.
- Cepas que son probióticas para humanos, pero están estudiadas en modelos animales, deben aclarar su designación como probióticos para humanos bajo testeo experimental. Los probióticos generalmente son aislados de la microbiota de individuos sanos de la misma especie a la cual se desee administrar, ya que se considera que están adaptados a las condiciones presentes en el tracto gastrointestinal (TGI) de la especie en cuestión (Fuller, 1989; Morelli, 2000a; Vázquez Zeballos et al., 2014).

Sin embargo, también existen numerosos trabajos en los cuales se han aislado bacterias con potencial probiótico de distintas fuentes, principalmente de alimentos fermentados como yogures y quesos. Se ha visto que, en estos ambientes, las bacterias aisladas pueden tener distintas características y una mayor variedad de genes que le permitan adaptarse a la variabilidad y exigencia del ambiente en el que viven (Choi et al., 2018; Gueimonde et al., 2004; Maragkoudakis et al., 2006; Parvez et al., 2006).

Los mecanismos de acción propuestos para los probióticos son muy variados y generalmente son cepa-específicos. Muchos se basan en la modulación de la MI de forma de generar cambios en las vías de comunicación entre esta y el hospedero, generando cambios a nivel sistémico que llevan a una mejora en la salud (Riaz Rajoka et al., 2017).

Si el objetivo es la administración oral, se busca que las cepas resistan la acción de sales biliares y medios ácidos para sobrevivir al tránsito gastrointestinal (Bezkorovainy, 2001). También se procura que muestren una adhesión tanto al mucus como a las células del epitelio intestinal con el fin de esclarecer su capacidad de permanecer en el lumen intestinal para cumplir su función y competir por sitios de colonización con posibles patógenos (Izquierdo et al., 2008; Vinderola et al., 2017).

Es relevante para este estudio mencionar que en los últimos años se renovó la taxonomía del género *Lactobacillus* siendo los denominados previamente grupos filogenéticos como *Lactobacillus casei* (Hill et al., 2018) y *Lactobacillus plantarum* (Huang et al., 2011), actualmente se denominan género *Lacticaseibacillus* (género *Lcb*) y género *Lactiplantibacillus* (género *Lpb*) respectivamente (Zheng et al., 2020).

Probióticos y salud mental

Teniendo en cuenta todos estos avances en el estudio de probióticos, junto con el esclarecimiento de las vías de comunicación que existen entre la MI y el cerebro, el siguiente paso lógico surge con el estudio de los efectos de probióticos en la salud mental, humor y comportamiento (Barros-Santos et al., 2020; Dinan et al., 2013; Sun et al., 2021).

Durante la década pasada surgió y cayó en desuso el concepto de “psicobiótico” el cual, según Sarkar y colaboradores se definen como microorganismos que, al ser ingeridos en cantidades adecuadas, producen un beneficio en la salud mental. Dicho concepto cayó en desuso debido a la cantidad de productos probióticos con efectividad dudosa, que apodaron ese nombre con fines comerciales (Sarkar et al., 2016).

Existe una gran variedad de mecanismos de acción a través de los cuales esta clase de probióticos podrían ejercer su función. La mayoría de estos ya fueron nombrados en la sección sobre la comunicación entre la microbiota y el cerebro a través del eje MIC (Wall et al., 2014).

Debido a la novedad de la temática, la mayoría de la evidencia se encuentra en estudios en modelos con roedores en los cuales se han visto los efectos que pueden llegar a tener sobre trastornos como la depresión y la ansiedad (Bravo et al., 2011; Desbonnet et al., 2010; Logan & Katzman, 2005).

En uno de estos estudios, Bravo y colaboradores analizaron los mecanismos de acción de una cepa de *Lacticaseibacillus rhamnosus* en ratones. En este estudio, la administración de esta cepa causó una reducción en niveles de ansiedad en el test de puente elevado (un modelo de evaluación de comportamientos de tipo-ansiedad), y una reducción de la elevación inducida por estrés de corticosterona en sangre. A su vez, se

determinó que en estos ratones hubo un aumento en receptores de GABA (GABA_A y GABA_B) en células del sistema nervioso central (Bravo et al., 2011).

Alteraciones en estos receptores se han relacionado con comportamientos de ansiedad y depresión en modelos animales (Cryan & Kaupmann, 2005). Posteriormente, se repitió el mismo experimento, pero realizando una vagotomía (sección del nervio vago). En este caso no se observó ninguno de los efectos tipo-ansiolítico ni aumento en la expresión de receptores, lo que indicaría que la vía por la cual esta cepa psicobiótica ejerce sus efectos es principalmente a través del nervio vago (Bravo et al., 2011).

Desbonnet y colaboradores analizaron el efecto de la ingestión crónica de una cepa de *Bifidobacterium infantis* en ratones bajo un modelo de tipo-depresión inducida por separación maternal temprana. En este modelo, los ratones separados de la madre respondieron de manera negativa en el test de nado forzado (un modelo de evaluación de comportamientos de tipo-depresión), y mostraron un aumento en la expresión de ciertas citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α . Tras el tratamiento con *B. infantis*, se revirtió el comportamiento tipo-depresivo en el test de nado forzado, disminuyeron los niveles de citoquinas proinflamatorias y aumentó la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Desbonnet et al., 2010).

Entre estos y otros trabajos sobre la temática, se ha visto que la utilización de una cepa bacteriana para tratar distintas neuropatologías es algo viable, aunque su mecanismo de acción es cepa-específico y debe ser caracterizado. También es común que cepas con claro efecto en modelos animales, no se traduzca en efectos en humanos. Esto probablemente se deba a diferencias en la composición de la MI, la fisiología de las redes neurales del nervio vago y el grado de desarrollo del sistema nervioso en seres humanos en comparación con especies animales (Kelly et al., 2017).

Debido a esto, los ensayos clínicos hasta el momento son pocos y no poseen una gran profundidad. Aun así, ciertos trabajos han mostrado resultados prometedores con una mejora en pacientes que consumieron de forma oral alimentos fermentados con microorganismos con potencial psicobiótico y mostraron un decaimiento en niveles de ansiedad y estrés (Akkasheh et al., 2016; Pinto-Sanchez et al., 2017; Selhub et al., 2014). Otros estudios analizaron el efecto de formulaciones probióticas (*Lactobacillus helveticus* R0052 y *Bifidobacterium longum*) en los niveles de estrés, ansiedad, depresión y el humor en general de 55 voluntarios masculinos y femeninos (Messaoudi

et al., 2011). Los individuos ingirieron la formulación diariamente por 30 días y se les realizaron pruebas analizando los niveles de ansiedad, depresión y estrés, además de analizar la cantidad de cortisol en orina (indicador fisiológico de estrés). Se vio así que hubo una disminución en los niveles de estos comportamientos y los valores de cortisol urinario disminuyeron, tanto en los individuos sanos, así como los que, en las mediciones iniciales, mostraron índices de depresión y ansiedad. Esto evidenciaría la actividad de estos microorganismos como psicobióticos. Experimentos posteriores del grupo buscaron efectos deletéreos de esta formulación y no encontraron que se generaran disfunciones en la memoria y el aprendizaje ni generó adicción, lo cual afirma la inocuidad del producto (Messaoudi et al., 2011).

También se evidenció que existió un cambio en la conectividad neuronal entre ciertas regiones del cerebro durante una tarea de reconocimiento emocional en mujeres sanas que consumieron crónicamente lácteos fermentados adicionados con la cepa probiótica *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* I-2494 (Tillisch et al., 2013). De esta forma se mostró la relación entre la MI con la función cerebral.

En un estudio clínico reciente, se esclarece un posible mecanismo de acción a través del cual estas formulaciones probióticas pueden influir en el SNC, donde se vio que el tratamiento con una preparación de *Lactobacillus helveticus* R0052 y *Bifidobacterium longum* R0175 disminuyó los síntomas de depresión en pacientes con depresión leve y moderada. Y una de las causas que generó este cambio fue el aumento del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDFN por su sigla en inglés) circulante. Este factor interfiere en procesos neurofisiológicos importantes tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, apoya la supervivencia neuronal, así como neuroplasticidad y neuroprotección (Heidarzadeh-Rad et al., 2020).

Ácido γ -aminobutírico

Otro de los mecanismos que pueden ser causa de estos resultados, y que debido a la temática de este trabajo nos es de gran relevancia, es la producción microbiana de compuestos neuroactivos, en particular el GABA. Este compuesto es producido por la enzima glutamato descarboxilasa, la cual cataliza la descarboxilación irreversible del

ácido glutámico a GABA, utilizando piridoxal fosfato como cofactor para su función (Wu & Shah, 2015).

Esta enzima se encuentra distribuida tanto entre eucariotas como en bacterias y arqueas (Siragusa et al., 2007). En bacterias, cumple su función dentro de un mecanismo de resistencia a pH bajos, ya que descarboxila el L-glutamato, consumiendo así un protón citoplasmático (Teixeira et al., 2014). Hasta el momento, se ha observado cepas de los géneros *Lactiplantibacillus bacillus* y *Lacticaseibacillus* que expresan la enzima (Wu et al., 2018).

Se considera que este mecanismo es esencial para lactobacilos que crecen en medios ácidos, como los encontrados en alimentos fermentados ácidos y en procesos de fermentación de lácteos, donde el medio se acidifica a medida que avanza la fermentación, ya que mejora la competitividad en estos nichos (Su et al., 2011).

Las características bioquímicas de esta enzima varían según la cepa, pero en líneas generales, su pH óptimo es de 3,8 a 4,5 (Teixeira et al., 2014) y dependiendo de la especie si su isoforma funcional es un dímero o un tetramero (Hiraga et al., 2008; Komatsuzaki et al., 2008).

Molecularmente, la enzima glutamato descarboxilasa se encuentra codificada dentro de un operón llamado *gad*, formado por varios genes que codifican para proteínas que permiten que este sistema de resistencia a medios ácidos funcione en su totalidad. En lactobacilos, la enzima glutamato descarboxilasa (GadB) funciona en conjunto con una proteína canal antiporter glutamato-GABA llamada GadC que cataliza el paso de una molécula de glutamato del medio externo, expulsando una molécula de GABA. Esto aumenta la disponibilidad de glutamato intracelular e impide la inhibición por exceso de producto. Este funcionamiento en paralelo de estas enzimas solo es viable a pH bajos, ya que a pH neutros la enzima GadB se encuentra inactiva en el citoplasma y cuando el pH externo baja, ésta se transporta hacia la membrana para trabajar en conjunto con la proteína canal activando este sistema de resistencia a medios ácidos (Feehily & Karatzas, 2013) (Figura 2).

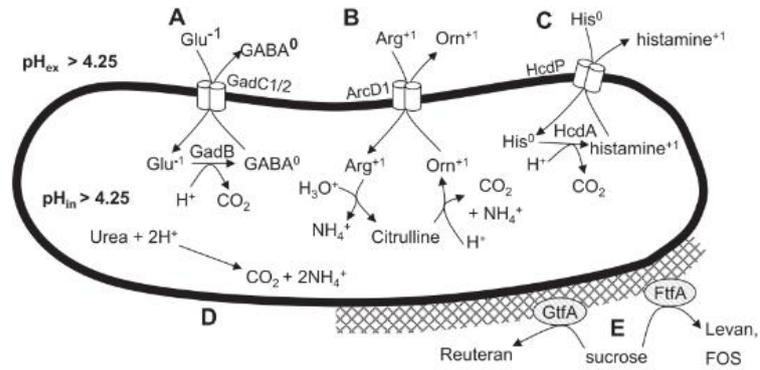


Figura 2: Distintos mecanismos bacterianos de resistencia a medios ácidos, entre los que se destaca el operón *gad*. Figura extraída de Teixeira y colaboradores (2014)

Quesería y suero fermentos naturales

La quesería artesanal es una gran industria a nivel nacional, generando 10 millones de kilos de queso al año por 800 productores (INALE, 2017). Aproximadamente un 40% de los quesos producidos son los denominados quesos de pasta dura o semidura, también denominados quesos grana, como los quesos Parmigiano originarios de Italia. Este tipo de quesos se caracteriza por la utilización de cultivos iniciadores complejos llamados sueros fermento naturales (SFN), que junto con la microbiota natural de la leche (la cual se utiliza sin pasteurizar) son responsables de las características de estos (Gatti et al., 2014).

Los SFN son asociaciones de microorganismos integrados por bacterias ácido lácticas dominantes y microorganismos no lácticos contaminantes, como las levaduras (Gatti et al., 2014; Reinheimer et al., 1995, 1996). Se considera que los SFN utilizados en la quesería artesanal podrían ser una fuente rica de microorganismos con potencial probiótico, ya que su población principal son bacterias ácido lácticas, como los lactobacilos, ampliamente caracterizados por tener propiedades probióticas (Maragkoudakis et al., 2006; Morelli, 2000b; Vinderola et al., 2017b).

En nuestro país, el uso del SFN se encuentra muy extendido en comparación con el uso de iniciadores comerciales. Sin embargo, se conoce muy poco de su composición y de su potencial tecnológico (Fraga Cotelo et al., 2013; Lozano et al., 2022; Reginensi et al., 2013).



Figura 3: A) Agregado de SFN en el proceso de fabricación del queso. B) Adición del suero de la elaboración diaria al SFN original. C) Tanques de enfriado de SFN. Cortesía del Msc. Álvaro González Revello.

La obtención de SFN se basa en la mezcla de un cultivo original de SFN con el suero resultante de la elaboración diaria del queso, dejando enfriar gradualmente el producto a lo largo de varios días (Figura 3). De esta forma, ciertas cepas provenientes de la microbiota nativa de la leche son seleccionadas y la composición microbiana puede variar con el tiempo y entre los SFN de distintos productores, generando así diferencias en las propiedades de sus quesos (Bottari et al., 2010; Gatti et al., 2014).

A pesar de esta variedad entre productores, existe una microbiota base en los SFN, establecida por las condiciones de acidez y cambios de temperatura dados durante el proceso de fabricación del queso y la generación del nuevo SFN. Esta microbiota base está compuesta principalmente por *Lactobacillus* spp. termófilos homofermentativos y en menor medida por heterofermentativos y *Streptococcus thermophilus* (Beresford et al., 2001; Parente & Cogan, 2004).

Los SFN utilizados en la quesería artesanal son una fuente rica en microorganismos con potencial producción de GABA. La presión selectiva del mismo proceso de fabricación del queso en la que se liberan grandes cantidades de aminoácidos por la proteólisis de

las proteínas de la leche y la acidificación del medio, selecciona bacterias con mecanismos de resistencia a medios ácidos como lo es el operón *gad* (Feehily & Karatzas, 2013; Siragusa et al., 2007).

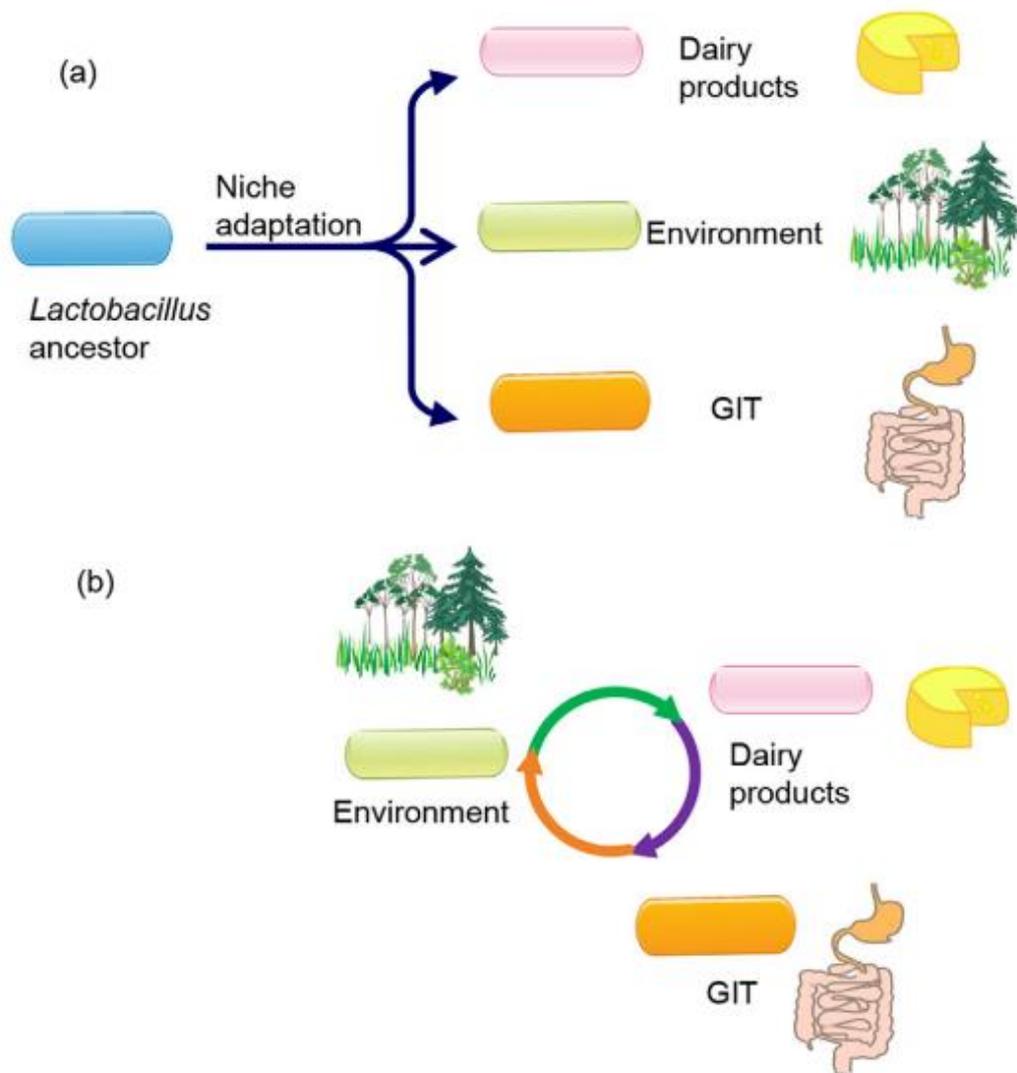


Figura 4: Proceso de adaptación al nicho de los lactobacilos. a) Un ancestro común, con el potencial de adaptarse a distintos nichos, sufrió múltiples cambios genómicos, que permitieron la mejor adaptación a ambientes específicos (ambiental, alimentos o tracto gastrointestinal). b) La misma cepa puede cambiar de hábitat como cuando un humano consume alimentos fermentados, donde esta cepa posee el potencial de adaptarse al nuevo ambiente por provenir del mismo ancestro común. Figura extraída de Stefanovic y colaboradores (2021).

Se considera que debido a la presión selectiva de ambientes como los SFN, y otros ambientes de alimentos fermentados, el género *Lactobacillus* representa uno de los géneros más grandes y diversos de todas las bacterias del ácido láctico (BAL), abarcando especies con aplicaciones en campos industriales, biotecnológicos y médicos (Figura 4). El aumento en el número de genomas disponibles de *Lactobacillus* ha permitido la comprensión de la genética de este grupo, demostrando su plasticidad y adaptabilidad a distintos nichos (Stefanovic et al., 2017). Los lactobacilos son reconocidos como potenciales fábricas celulares, confirmado por la exitosa producción de compuestos como el GABA (Lozano et al., 2022). La comprensión profunda de las características de estas cepas abre las posibilidades para futuras aplicaciones basadas en el conocimiento.

Antecedentes

En trabajos previos realizados en el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Veterinaria (UdelaR), se aislaron BAL partir de SFN de productores de San José y Colonia, utilizados para la producción de quesos artesanales de tipo Grana y se determinaron sus características biotecnológicas.

Posteriormente, se analizaron dichas bacterias para analizar su potencial como productor de GABA mediante ensayos moleculares y su capacidad para resistir ambientes similares a los encontrados en el tracto gastrointestinal (Lozano et al., 2019, Lozano et al., 2022). En estas cepas es que se basan los consiguientes ensayos que engloban esta tesis.

Hipótesis

La hipótesis de este trabajo postula que los SFN son repositorios naturales de bacterias con potencial probiótico, algunas de las cuales, al ser administradas en forma crónica, tienen la capacidad de generar cambios comportamentales beneficiosos a través de la modulación del eje MIC.

Objetivo general

El objetivo de este estudio fue caracterizar diferentes propiedades probióticas de cepas aisladas de SFN de queserías artesanales nacionales *in vitro*, y en base a los resultados obtenidos, evaluar el efecto de la administración crónica de una de ellas en modelos comportamentales específicos para evaluar ansiedad y estados depresivos en ratas. Además, se procuró caracterizar el impacto del tratamiento sobre la comunidad bacteriana de la MI de los animales.

Los objetivos específicos se presentan al inicio de los capítulos de esta tesis.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas

En este trabajo se utilizaron aislamientos de lactobacilos (n=101) pertenecientes a la colección del Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Leche de la Facultad de Veterinaria (Montevideo, Uruguay). Estas cepas habían sido previamente aisladas de SFN provenientes de cinco queserías artesanales elaboradoras de queso tipo Grana, ubicadas en los departamentos de San José y Colonia, Uruguay.

En trabajos previos del laboratorio se había realizado una caracterización parcial de las cepas, que incluyó la detección del gen codificante de la enzima glutamato decarboxilasa (*gadB*). También se midió la capacidad de estas cepas de resistir condiciones similares a las encontradas en el tracto gastrointestinal (pH bajos y sales biliares). Por último, se identificaron taxonómicamente a nivel de género mediante secuenciación del gen que codifica el ARN ribosomal 16S.

La presente investigación se inició a partir una colección de 25 aislamientos que contienen el gen *gadB*, son resistentes a pH bajos y sales biliares, y pertenecen a los géneros *Lactiplantibacillus* (n=19) y *Lacticaseibacillus* (n=6).

Los cultivos de rutina se realizaron en placas con medio Mann-Rogosa-Sharpe (MRS) agar (Oxoid, Inglaterra) a 37°C en microaerofilia. Para su almacenamiento, las cepas fueron congeladas a -80 °C en caldo MRS suplementado con 20% de glicerol.

Adhesión a mucus

En primera instancia se realizó una extracción de mucus a partir de heces frescas de ratas utilizando el método de doble precipitación etanólica (Ouweland et al., 1999). Brevemente, las heces se diluyeron al cuarto en una solución de PBS suplementado con 0,5 g/l de NaN₃, 1mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y 10 mM EDTA pH=8, para luego ser homogeneizado en un Stomacher® 80 Biomaster (Steward, Inglaterra+) por 30 segundos a velocidad baja. Esta suspensión se agitó por una hora en baño de hielo y se centrifugó por 30 min a 15.000 x g (4 °C). Al finalizar, el sobrenadante se recuperó y se diluyó con etanol absoluto, de manera de llegar a una concentración final del 70% del

sobrenadante. Este producto se volvió a centrifugar por 30 min a 10.000 x g (4 °C). Una vez culminada esta centrifugación se descartó el sobrenadante y el pellet se suspendió con 4 ml agua milliQ y se repitió la precipitación con etanol. Luego de centrifugar y descartar el sobrenadante, el sedimento se dejó secando overnight (ON) al aire, a temperatura ambiente y se suspendió en agua milliQ. Luego de confirmar la ausencia de materia insoluble, el mucus se liofilizó y se almacenó a -20 °C para posteriores usos.

Con el mucus extraído pronto para usar, se continuó con el ensayo de adhesión para los 25 aislamientos, el cual se basó en el método propuesto por Sugimura y colaboradores con modificaciones (Sugimura et al., 2001) y se realizó por triplicado. En una placa de poliestireno de 96 pocillos se incubaron *overnight* a 4 °C, 200 µl de una solución a 1 mg/ml del mucus liofilizado en agua por pocillo. Luego los pocillos se lavaron con PBS y se bloquearon con 200 µl de una solución de BSA (1 mg/ml) por 1 hora a 37 °C y se lavaron nuevamente. Cultivos frescos de las cepas a estudiar (cultivo ON en Caldo MRS a 37 °C en microaerofilia) fueron centrifugados y lavados dos veces con PBS antes de resuspenderlos en PBS a una concentración final aproximada de 5×10^6 unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml). Se tomaron 100 µl de las suspensiones de cada cepa y se incubaron en los pocillos recubiertos con mucus durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, para eliminar las bacterias que no se adhirieron al mucus, los pocillos se lavaron dos veces con PBS. Luego, para liberar las bacterias adheridas, los pocillos se lavaron con una solución de PBS con Tritón X-100 al 0,5 %, pipeteando minuciosamente para homogeneizar el lavado. Las bacterias viables se contaron antes y después de la hora de incubación siguiendo el método de recuento en placa y se calculó el porcentaje de adhesión como UFC adheridas al mucus/UFC en la suspensión original x 100. Los ensayos se realizaron por triplicado, se incluyeron blancos de PBS estéril y se usó la cepa *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) como control positivo (Morita et al., 2009).

Formación de biofilms

Luego se evaluó la capacidad de formar biofilms que tienen estas cepas utilizando el método semicuantitativo de análisis de formación de biofilms estáticos por medio de la tinción con cristal violeta (Lebeer et al., 2007).

Para ello se partió de una suspensión bacteriana en PBS a una concentración aproximada de 5×10^8 UFC/ml preparada a partir de un cultivo fresco (cultivo ON en Caldo MRS a 37 °C en microaerofilia), de la cual se transfirieron 20 μ l a un pocillo con 180 μ l de medio fresco mTSB (15 g/l de TSB y 20 g/l de Proteasa Peptona) en una placa de 96 pocillos, haciendo triplicados y dejando pocillos sin inocular como blanco. Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C en microaerofilia.

Una vez finalizado el periodo de incubación, se retiró el cultivo y cada pocillo se lavó dos veces con PBS 1X. Luego se agregaron 200 μ l de cristal violeta 0,1% y se incubó por 15 minutos a 37 °C. Al finalizar, se retiró el cristal violeta y los pocillos se lavaron dos veces más con 200 μ l de PBS 1X, se agregaron 200 μ l etanol 95% y se agitó suavemente para solubilizar todo el cristal violeta asociado a las bacterias adheridas a la placa. Por último, se midió la densidad óptica (DO) de la solución a 590 nm, longitud de onda que absorbe el cristal violeta. Este ensayo se realizó por triplicado.

La absorbancia de la solución se comparó con la absorbancia de los blancos y se utilizó la siguiente escala de producción de biofilms propuesta por Stepanović y colaboradores (Stepanovic et al., 2000).

$DO_{Cepa} \leq DO_{Blanco}$	no formadora de biofilm
$DO_{Blanco} \leq DO_{Cepa} \leq 2 \times DO_{Blanco}$	formación baja de biofilm
$2 \times DO_{Blanco} \leq DO_{Cepa} \leq 4 \times DO_{Blanco}$	formación media de biofilm
$4 \times DO_{Blanco} \leq DO_{Cepa}$	formación alta de biofilm

Análisis semi-cuantitativo de la producción bacteriana de GABA

A partir de la comprobación de la presencia del gen *gadB* en el genoma de las cepas seleccionadas, se realizó un screening inicial para analizar la potencial producción de GABA, nos basamos en la metodología propuesta por Wu y Shah con modificaciones. Dicha metodología se basa en la observación de producción de gas bajo ciertas condiciones, y que se asocia con la producción de CO₂, producto de la descarboxilación del ácido glutámico por a glutamato decarboxilasa (Wu & Shah, 2015), como se observa en la Figura 5.



Figura 5: Protocolo de *screening* de actividad de la enzima, glutamato descarboxilasa

A partir de un cultivo de rutina (condiciones explicadas en la sección cepas bacterianas) se preparó una suspensión bacteriana en PBS estéril con una concentración aproximada de 5×10^8 UFC/ml, de la cual se transfirió 1 ml a un tubo con 9 ml de MRS suplementado con 10 mg/ml de ácido glutámico (Sigma Aldrich, UE) y el pH ajustado a 5. El tubo, que contenía una campana de gases para detectar la formación de burbujas en el medio, se incubó por 48 h a 37 °C.

De acuerdo con la cantidad de gas retenido en la campana producida luego de la incubación, se estimó empíricamente la potencial producción de GABA.

Cuantificación de la producción de GABA por UHPLC/MS

Se realizó una cuantificación de la producción de GABA extracelular usando un equipo de Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento acoplado a un espectrómetro de masas (UHPLC/MS por sus siglas en inglés) Thermo Scientific Ultimate 3000 RS acoplado a un sistema de espectrómetro de masas Thermo Scientific ISQ EC. Tubos con caldo MRS suplementado con 10 mg/ml de ácido glutámico (Sigma Aldrich, UE) (pH inicial = 5) se inocularon con cada cepa a una concentración normalizada de 1×10^6 UFC/ml y se incubaron a 37 °C durante 48 h. Se tomaron muestras de los cultivos a las 24 y 48 h y se procesaron inmediatamente. Las muestras se diluyeron 1:1 en ácido clorhídrico 0,1 M y la mezcla se centrifugó a $13.000 \times g$ durante 10 min a 4 °C. A continuación, los

sobrenadantes se filtraron a través de filtros de jeringa de acetato de celulosa de 2,5 mm de diámetro y 0,22 μm de tamaño de poro (GVS) y se analizaron mediante UHPLC/MS, siguiendo el protocolo descrito en la Nota de aplicación de Thermo Fisher para la separación y detección de aminoácidos en vino (Park et al., 2019), con modificaciones menores. Las modificaciones incluyeron la reducción del flujo de la fase móvil a 0,3 ml/minuto y el uso de un volumen de inyección de 5 μl . La fase móvil utilizada fue una mezcla de la fase móvil A, que contenía un 10 % de una solución de formiato de amonio 200 mM en acetonitrilo a pH = 2,8 y una fase móvil B, que contenía un 10 % de una solución de formiato de amonio 200 mM en agua a un pH = 2,8. La fase móvil se inyectó de acuerdo con el gradiente presentado en la tabla 1 durante la ejecución, mientras que la detección se realizó utilizando el modo de monitoreo de ion único en el modo positivo, seleccionando un ion de m/z 104 correspondiente al valor de m/z de GABA en su forma aniónica. Los picos obtenidos se analizaron e integraron con el software de procesamiento de datos Chromeleon™ Chromatography Data System (CDS) (Thermo Fisher Scientific, EU) versión 7.2. Los valores de concentración de las muestras se calcularon como los valores de las áreas de los picos de GABA divididos por el factor de dilución de la inyección e interpolados con un estándar inyectado en dicha corrida (GABA diluido a 0,05mM). Se hicieron triplicados mediante experimentos independientes. Este ensayo se realizó por triplicado.

Gradiente de inyección de fase móvil

Tiempo (min)	Porcentaje de fase móvil A	Porcentaje de fase móvil B
0	100	0
5	100	0
15	84,4	15
20	66,7	33,3
30	66,7	33,3
30,2	100	0
40	100	0

Tabla 1: gradiente de inyección de fase móvil

Se evaluó la normalidad de los valores de concentración de GABA en grupos separados usando una prueba de Shapiro-Wilk y se compararon entre los grupos según su género

y nivel de producción, usando el test t de Student para valores normales y una prueba no paramétrica de Mann-Whitney cuando no era normal. Se consideró significación estadística cuando $p < 0,05$.

También se compararon los valores de concentración de GABA entre 24 y 48 horas, siguiendo el criterio anterior.

Selección de cepas candidatas para ensayos *in vivo*

Luego de la caracterización *in vitro*, se evaluaron los resultados obtenidos junto con aquellos obtenidos a partir de los trabajos previos del grupo de investigación (Lozano et al., 2019). Combinando los distintos atributos analizados en las diferentes fases de los ensayos se seleccionaron las 3 cepas más promisorias. Las cepas fueron evaluadas en base a su potencial habilidad para colonizar el TGI de las ratas, predicha a partir de la resistencia a medios ácidos y presencia de sales biliares, así como su adhesión a mucus y su producción de biofilms, en combinación con la capacidad para producir GABA.

Por último, se analizó la capacidad de estas cepas de resistir el proceso de liofilización para su posterior administración en los ensayos *in vivo*. Para ello se liofilizaron varias suspensiones de cepas candidatas junto con la cepa *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) como control de una cepa resistente al proceso de liofilización (Morita et al., 2009).

Para ello se utilizó un cultivo ON de rutina de la cepa a liofilizar, el cual se centrifugó y lavó 2 veces con PBS (10.000 x g, 15 min), para luego resuspender el pellet en 25 ml de leche descremada en polvo reconstituida al 10% (Conaprole, Uruguay) (autoclavada a 121°C previamente por 7 minutos). Dicha suspensión se congeló por dos horas a -80 °C y luego se liofilizó en un liofilizador de mesa de Labotec Group a -40 °C por 24 h. El producto se almacenó a 4 °C y se realizaron recuentos en placa para determinar el valor de UFC por gramo.

Las dosis de las cepas candidatas se prepararon resuspendiendo la cantidad de material liofilizado necesario para tener 5×10^8 UFC en 0,5 ml de PBS estéril y se almacenó a -80 °C en dosis individuales.

Por último, para determinar si hubo pérdida de viabilidad de las dosis durante el almacenamiento, se almacenaron las dosis a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un periodo de tiempo mayor al largo del ensayo *in vivo* (2 meses) y se realizó un conteo en placa.

Se consideró resistente a la liofilización, a las cepas que luego del periodo mantuvieron el mismo orden de magnitud de células viables que cuando fueron almacenadas.

Diseño del ensayo *in vivo* para evaluar efectos de la administración crónica de la cepa LPB145

Para los ensayos *in vivo*, se diseñó un cronograma experimental que incluyera el adiestramiento de los animales, la administración diaria de las cepas durante 28 días, las recolecciones de heces para el estudio de la microbiota y los ensayos comportamentales (Figura 6).

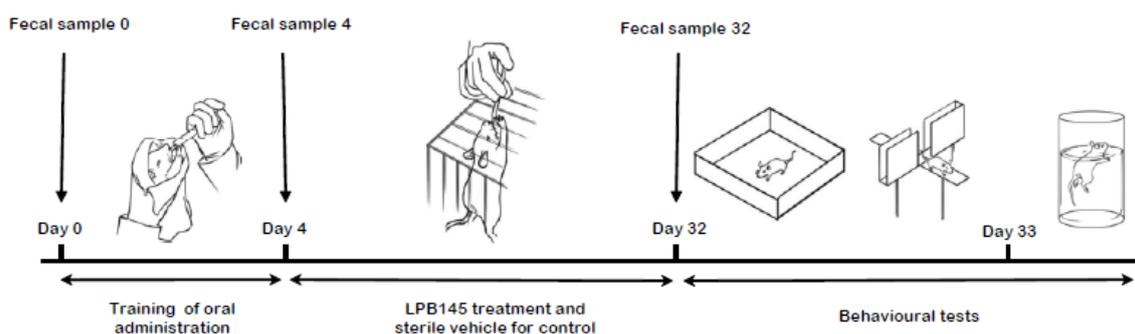


Figura 6: Cronograma de los 33 días del ensayo *in vivo*. Ilustrado por Alejandro Rodríguez Juele

Animales

Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con la Ley Nacional de Experimentación Animal No 18.611 y de acuerdo a las normas éticas establecidas y aprobadas por el Comité de Ética en el Uso de Animales del IIBCE, número de protocolo, 001/02/2020. Se tomaron las medidas necesarias para minimizar el estrés de los animales y utilizar el número mínimo necesario para obtener resultados confiables y reproducibles. Se utilizaron 24 ratas macho adultas de la cepa Wistar de 230-270 gr de 2 meses de edad, provenientes del Bioterio del IIBCE. Los animales fueron criados y

alojados en cajas de 48.0 x 37.5 x 21.0 cm en grupos de 4 animales y mantenidos en condiciones controladas de temperatura (22 ± 2 °C), ciclo de luz-oscuridad (7:00 AM-7:00 PM), con alimentación y agua *ad libitum*.

Las ratas se separaron en jaulas según el tratamiento (una jaula para animales tratados con la suspensión bacteriana y una jaula para animales control que recibieron solo vehículo estéril), 12 ratas por cada grupo, se midió el alimento y agua consumidos diariamente y la viruta de la jaula fue cambiada cada tres días.

Adiestramiento de los animales

Para este ensayo se decidió administrar la preparación bacteriana de manera oral, en forma activa y voluntaria (Tillmann & Wegener, 2018), ya que consideramos a la alternativa de sondaje intragástrico muy estresante durante un período de tiempo tan largo, al punto de que podría llegar a afectar los ensayos comportamentales.

Para realizar la administración oral de manera rutinaria, fue necesario, en una primera instancia, un adiestramiento de cuatro días. Inicialmente, los animales se sujetaron y se administró de forma directa con la jeringa en la boca una dosis de 0,5 ml de leche descremada reconstituida al 10% y estéril para que aprendieran que la preparación bacteriana en leche se trataba de un alimento palatable (Figura 7A). Esto se repitió por dos días. Al tercero se administró la suspensión desde la jaula cerrada para que el animal se habituara a la jeringa y consumiera voluntariamente la preparación durante los siguientes 28 días del ensayo (Figura 7B).

Luego de cuatro días de adiestramiento en la que se le administró únicamente leche reconstituida y estéril, los animales ya tomaban el producto voluntariamente de la jeringa desde adentro de la jaula.

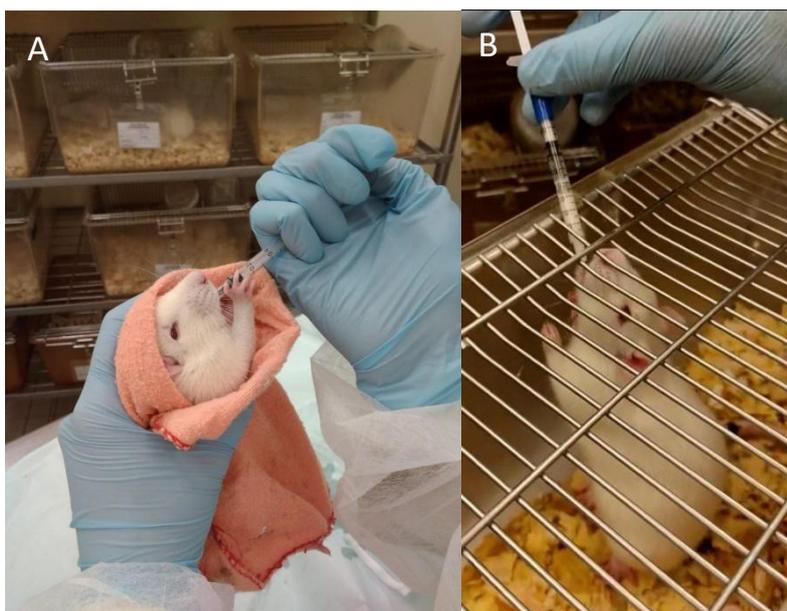


Figura 7: Adiestramiento de los animales para la administración de la suspensión bacteriana. A: Adiestramiento durante los primeros dos días; B: Administración oral en una rata ya adiestrada, consumiendo voluntariamente desde la jeringa (Bioterio de ratas, IIBCE, Montevideo, Uruguay)

Administración oral crónica de las cepas

Luego del cuarto día del adiestramiento, el día siguiente se consideró el día 4 en nuestro cronograma al comenzar a administrar las distintas preparaciones a los dos grupos. El grupo control se le siguió administrando la misma dosis de leche reconstituida y estéril que se había provisto en el adiestramiento, mientras que a los del grupo tratado, se les comenzó a administrar una dosis suspensión bacteriana con 5×10^8 UFC diluida en 0,5 ml de leche. Así se siguió durante 28 días en los que diariamente se le administraba una dosis a cada animal. La administración fue realizada por el mismo experimentado durante todo el periodo.

Ensayos comportamentales

Los ensayos comportamentales fueron llevados a cabo en el cuarto de experimentación del Departamento de Neurofarmacología Experimental del IIBCE bajo condiciones de temperatura y ciclo luz-oscuridad similares a las existentes en el bioterio. Los animales fueron trasladados al cuarto de comportamiento 24 h antes de la realización de cada

experimento y fueron siempre manipulados por el mismo experimentador para lograr su correcta habituación. Los ensayos comportamentales fueron realizados a lo largo de dos días. En el primer día, se realizó el test de campo abierto, el laberinto en cruz elevado y el pre-test del test de nado forzado. Al segundo día se realizó el test de nado forzado. Todos los test fueron realizados por el mismo experimentador entre las 9 y 14 horas.

Test de Campo Abierto (CA)

El CA es un modelo ampliamente utilizado para evaluar la actividad locomotora en un plano horizontal (Archer, 1973; Montgomery et al., 1955). El sistema consiste en una caja de 60 x 60 cm con paredes de acrílico de 40 cm de alto en la cual se deja al animal por 10 minutos para que explore libremente y posee una cámara de video colocada encima del CA con la que se filma la conducta de los animales (Pellow & File, 1986) (Figura 8). Todos los animales realizaron únicamente una vez el test y posteriormente a través de programa de video-seguimiento Ethovision XT 7.0 (Noldus) se analizaron los videos y se cuantificaron automáticamente los siguientes parámetros: distancia recorrida total (en centímetros como actividad locomotora) y tiempo de permanencia en el centro (en segundos) en intervalos de 5 minutos y durante la totalidad del experimento.

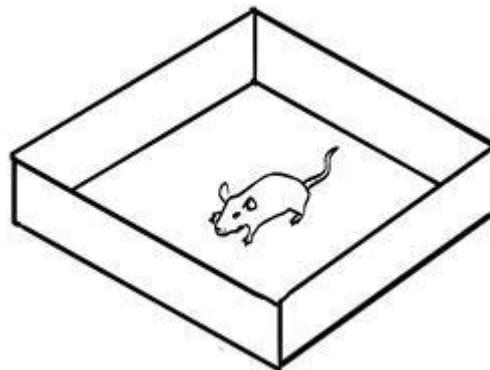


Figura 8: Ilustración gráfica del test de campo abierto. Ilustrado por Alejandro Rodríguez Juele

Laberinto en cruz elevado (LCE)

El LCE es un modelo de ansiedad experimental para roedores basado en las respuestas no condicionales de estos animales hacia ambientes potencialmente peligrosos

(Montgomery et al., 1955; Pellow & File, 1986). Este modelo se utiliza para observar el efecto tipo-ansiolítico o tipo-ansiogénico de tratamientos.

El aparato está constituido por dos brazos abiertos cruzados en ángulo recto por dos brazos cerrados por paredes laterales (40 cm) que se extienden a partir de una plataforma central de 10 x 10 cm y está elevado a 50 cm del suelo (Figura 9). Dado que los roedores tienen un miedo innato a los espacios abiertos y elevados, los brazos abiertos combinan ambos estímulos aversivos (Lister et al., 1990).

Los animales fueron colocados en el centro del laberinto con su cabeza orientada hacia un brazo cerrado. El tiempo de registro fue de 5 min durante los cuales se los dejó explorar el ambiente libremente. Se cuantificaron por observación directa los siguientes parámetros: 1) número de entradas a los brazos abiertos y cerrados; 2) tiempo de permanencia en ambos brazos. Se consideró como criterio de entrada a un brazo, la introducción de las cuatro patas del animal dentro del mismo.

Además, se cuantificaron las siguientes conductas: 1) evaluación de riesgo o *risk assessment* (parámetro que se cuantifica sobre el brazo cerrado y consiste en el estiramiento del cuerpo del animal hacia el brazo abierto sin abandonar el brazo cerrado); 2) hundimientos de cabeza o *head dipping* (conducta medida en el brazo abierto cuando el animal explora fuera del margen del brazo en dirección al suelo) y 3) la exploración de final de brazo o *end arm exploration* (conducta en el brazo abierto donde el animal llega al final del brazo abierto). La cuantificación de estas conductas en el LCE complementa las observaciones realizadas a partir de los parámetros clásicos (número de entradas y tiempo en los brazos abiertos y cerrados) y colabora en la caracterización del perfil ansioso/ansiolítico de los animales (Carobrez & Bertoglio, 2005; Rodgers et al., 1997; Weiss et al., 1998).

Test de Nado Forzado (TNF)

El TNF es un modelo que se basa en la observación de roedores forzados a nadar (situación de estrés inescapable). Luego de una etapa inicial de movimiento orientado a escapar, desarrollan una postura inmóvil (Porsolt et al., 1978; Porsolt et al., 2001). Posteriormente, fue modificado (Detke et al., 1995; Lucki, 1997) y ha sido desde entonces ampliamente utilizado por su capacidad de detectar tratamientos con

propiedades tipo-antidepresivas. Consiste de un recipiente cilíndrico de plástico con paredes opacas que tiene 24 cm de diámetro y 50 cm de alto, profundidad del agua a 30 cm, y temperatura mantenida en 23-24 °C (Figura 10).

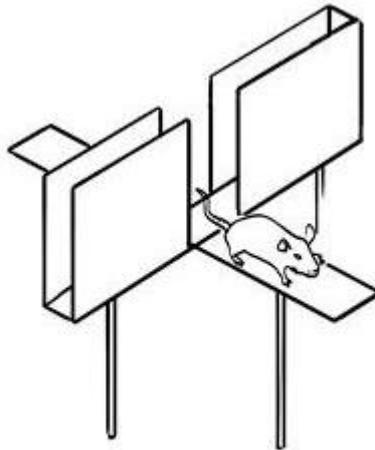


Figura 9: Ilustración gráfica del Laberinto en cruz elevado. Ilustrado por Alejandro Rodríguez Juele

El ensayo consiste en dos sesiones de nado a lo largo de dos días, comenzando con el denominado pre-test, en el que los animales se dejaron en el recipiente con agua por 15 minutos, donde no se registran comportamientos. Luego se retiraron, se secaron y fueron devueltos a la caja original. 24 horas después, se realiza la segunda sesión, donde se dejó al animal en el recipiente por 5 minutos, en los cuales varios comportamientos fueron registrados, estos son los tiempos de nado, inmovilidad y escalamiento, los comportamientos fueron cuantificados por observación directa y por dos observadores simultáneamente.

El tiempo de nado es el tiempo en que el animal se mantiene activamente nadando, desplazándose por el recipiente, mientras que la inmovilidad es la postura en la que el animal se mantiene a flote realizando movimientos mínimos. El escalamiento es un comportamiento vigoroso en el que el animal intenta escapar del recipiente por las paredes con un movimiento ascendente y las patas delanteras por encima de la línea del agua (Cryan et al., 2002).

Tratamientos con efectos tipo-antidepresivos, efectivos en la clínica, aumentan los comportamientos activos orientados a escapar de la situación (nado y escalamiento o *climbing*) y disminuyen el tiempo de inmovilidad o comportamiento pasivo (Cryan et al., 2005). Adicionalmente y de forma más reciente, se ha descrito la sensibilidad de este modelo para evidenciar respuestas comportamentales pro-depresivas, las que se definen por un aumento en la inmovilidad y una disminución del nado y escalamiento (Lagos et al., 2011; Temel et al., 2007).

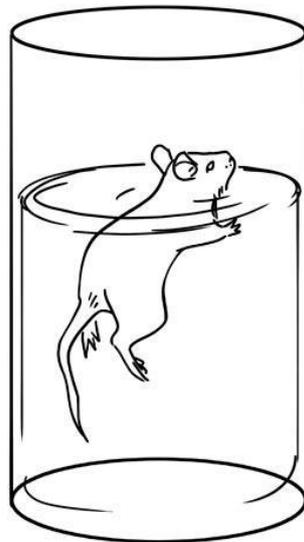


Figura 10: Ilustración gráfica del test de nado forzado. Ilustrado por Alejandro Rodríguez Juele

Visualización y análisis estadístico de datos de ensayos comportamentales

Los datos de los experimentos CA, LCE y TNF se presentan como mediana \pm error estándar de la mediana. La comparación de los resultados de los ensayos comportamentales entre grupos se realizó mediante la prueba t de Student no pareada (Valor de p establecido en 0,05). La significancia estadística se estableció en $P < 0,05$. Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron utilizando el software GraphPad V8.0 (software GraphPad Prism).

Colecta de muestras de heces y extracción de ADN bacteriano

Se recolectaron muestras de las heces de todos los animales durante tres momentos del ensayo, (1) al comienzo del ensayo en el día -4, antes de administrar la primera dosis de leche estéril; (2) al día 0 antes de administrar la primera dosis de preparación bacteriana y (3) al día 28, durante la realización del test de CA (Figura 6).

Para la recolección se dejó a las ratas en una caja limpiada profundamente con alcohol 70% hasta que defecara, ahí procedimos a retirar las heces con pinzas limpiadas profundamente con alcohol 70% y dejamos las heces en tubos estériles de 2ml, las muestras fueron almacenadas a -80 °C luego de su recolección.

La extracción de ADN bacteriano a partir de las heces extraídas se realizó utilizando el kit comercial Quick-DNA Fecal/Soil Microbe MiniPrep Kit (Zymo Research, USA), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante para muestras fecales. El paso de disrupción mecánica con perlas se realizó utilizando el equipo FastPrep-24™ (MP Biomedicals, CA, USA) a 6 m/s por 40 s. La calidad y concentración del ADN extraído se analizó utilizando el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc. Finlandia) y el producto final fue almacenado a -20 °C.

Secuenciación masiva del gen del ARN ribosomal 16S y procesamiento de datos

Las comunidades bacterianas de la microbiota intestinal de los animales se analizaron mediante secuenciación masiva de la región V4 del gen rADN 16S, a partir del ADN extraído previamente.

Esta se realizó en el Centro de Genómica de la Universidad de Minnesota (Minneapolis, EE. UU.), con una plataforma Illumina MiSeq para generar lecturas pareadas de 300 bases de longitud. Los datos generados fueron procesados con el paquete de R Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (dada2) (Callahan, Sankaran, et al., 2016a), siguiendo el pipeline presentado en el repositorio de GitHub (<https://benjjnn.g.gubub.io/dada2>) y por Callahan y colaboradores (2016b).

Las lecturas se recortaron y filtraron utilizando parámetros predeterminados con `truncLen=c(230,200)` y `trimLeft=10`. Luego, se fusionaron los reads pareados.

Posteriormente, se obtuvieron las secuencias representativas de cada ASV (por las siglas en inglés de "*Amplicon Sequence Variant*") y se eliminaron las quimeras. La asignación taxonómica de las ASVs representativas se realizó empleando la base de datos SILVA_138 para las secuencias con una identidad de secuencias del 99%. Se eliminaron los ASV con menos de 10 lecturas en total y los reads pertenecientes a mitocondrias, cloroplastos y eucariotas se excluyeron empleando el paquete "phyloseq" versión 1.28.0 (McMurdie & Holmes, 2013), mediante la función "subset_taxa".

Se utilizó DECIPHER para realizar múltiples alineaciones de secuencias (Wright, 2015) y phangorn (Schliep, 2011) para construir un árbol filogenético con los parámetros recomendados por Calahan y colaboradores (Callahan, et al., 2016b).

Visualización y análisis estadístico de datos de secuenciación

Para analizar los datos de secuenciación, se utilizaron los paquetes R phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) y ampvis2.

Los recuentos se normalizaron calculando las abundancias relativas de cada ASV en cada muestra para su posterior análisis. Con los recuentos normalizados, se calcularon matrices de distancia utilizando los métodos de Jaccard (presencia/ausencia), Bray-Curtis (abundancia), UniFrac (relación filogenética) y Weighted-UniFrac (relación filogenética ponderada por abundancia), y se realizó un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) como método exploratorio para analizar la distribución de las muestras. Los parámetros de diversidad alfa se calcularon utilizando la función `estimate_richness`, implementada en phyloseq con funciones del paquete vegan (Oksanen et al., 2015). Los parámetros de diversidad alfa calculados de los grupos tratados se compararon con el grupo de control utilizando una prueba de Kruskal-Wallis (valor de p establecido en 0,05). Para evaluar el efecto del tratamiento y el día sobre la comunidad bacteriana, se analizó la diversidad beta a través de un análisis de varianza multivariado con permutaciones (PERMANOVA) con la función `adonis` (paquete vegan) utilizando matrices de distancias de Bray-Curtis (`matriz~Tratamiento` y `matriz~Tiempo`).

Luego, se realizaron comparaciones entre el grupo control y el tratado en cada día de muestreo por separado (valor de p establecido en 0,05). Se empleó también la función "betadisper" para evaluar homogeneidad de varianza (Anderson et al., 2006) comparando las distancias de las muestras individuales a los centroides de grupo en el espacio multidimensional utilizando "permutest". Las diferencias entre las abundancias relativas de las diferentes ASV se examinaron utilizando el software DESeq2 (Love et al., 2014). El umbral para los valores ajustados p por tasa de descubrimiento falso (FDR) se estableció en 0,1 (predeterminado).

Para analizar las relaciones filogenéticas entre los ASV secuenciadas y la cepa LPB145 se realizó un árbol de máxima verosimilitud (Tamura et al., 1993) utilizando las secuencias obtenidas, y una secuencia de 16S de LPB145 obtenida en estudios previos (Lozano et al., 2019). Se utilizó un valor de *bootstrap* de 500 réplicas y un modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros.

Capítulo 1: Caracterización *in vitro* de cepas aisladas de SFN

Objetivos específicos

- Caracterizar una colección de cepas de lactobacilos aisladas de suero fermento naturales de cinco queserías artesanales uruguayas.
- Evaluar su potencial probiótico mediante ensayos *in vitro*.

Resultados

Adhesión a mucus

Las distintas cepas mostraron una capacidad similar para adherirse al mucus. El rango de porcentajes de las bacterias inoculadas que se adhirieron al mucus de las placas del ensayo varió del 1 al 7 % (Tabla 2).

Cepa	Identidad	% de Adhesión a mucus inmovilizado ^(A)	Formación de biofilms ^(B)	Screening producción de GABA ^(C)	Producción de GABA por UHPLC-MS (mM) ^(D)
16	<i>Género Lcb</i>	1.58 ± 0.60	No formadoras	No productoras	0,87 ± 0,34
17A	<i>Género Lcb</i>	3.91 ± 1.67	Formación media	No productoras	0,8 ± 0,36
17B	<i>Género Lcb</i>	1.98 ± 0.49	No formadoras	No productoras	0,63 ± 0,22
19A	<i>Género Lcb</i>	1.12 ± 0.72	No formadoras	No productoras	0,78 ± 0,33
117	<i>Género Lcb</i>	4.45 ± 2.01	Formación baja	No productoras	0,95 ± 1,05
119A	<i>Género Lpb</i>	3.59 ± 0.92	No formadoras	Producción media	0,99 ± 0,33
119B	<i>Género Lpb</i>	6.12 ± 4.45	No formadoras	Producción media	35,23 ± 23,03
121	<i>Género Lpb</i>	2.97 ± 1.53	Formación baja	Producción baja	37,68 ± 15,79
132B	<i>Género Lpb</i>	5.01 ± 1.18	No formadoras	Producción baja	36,67 ± 12,89
140	<i>Género Lcb</i>	7.19 ± 3.38	Formación baja	Producción baja	34,16 ± 21,14
142A	<i>Género Lpb</i>	5.32 ± 1.21	Formación baja	No productoras	13,06 ± 4,25
143	<i>Género Lpb</i>	2.82 ± 0.85	Formación alta	Producción baja	13,38 ± 4,13
145	<i>Género Lpb</i>	3.72 ± 1.04	Formación media	No productoras	51,82 ± 13,53
146	<i>Género Lpb</i>	4.61 ± 0.77	Formación media	No productoras	9,76 ± 0,45
147	<i>Género Lpb</i>	4.00 ± 1.10	No formadoras	No productoras	14,28 ± 3,52
148	<i>Género Lpb</i>	2.46 ± 0.46	No formadoras	Producción media	39,41 ± 8,21
149A	<i>Género Lpb</i>	2.80 ± 0.8	Formación baja	Producción media	40,37 ± 14,24
149B	<i>Género Lpb</i>	4.62 ± 2.9	No formadoras	Producción media	40,31 ± 16,65
150	<i>Género Lpb</i>	2.41 ± 0.93	No formadoras	Producción media	44,34 ± 22,17
153	<i>Género Lpb</i>	3.49 ± 2.57	No formadoras	Producción media	36,44 ± 8,85
155	<i>Género Lpb</i>	3.15 ± 0.95	No formadoras	Producción media	38,02 ± 12,5
162A	<i>Género Lpb</i>	2.70 ± 0.79	No formadoras	Producción media	34,93 ± 11,71
162B	<i>Género Lpb</i>	2.64 ± 1.74	No formadoras	Producción media	36,08 ± 13,42
164B	<i>Género Lpb</i>	2.37 ± 0.89	No formadoras	Producción media	38,7 ± 12,97
165	<i>Género Lpb</i>	2.93 ± 0.9	No formadoras	Producción media	36,1 ± 17,96

Tabla 2: Resultados de los ensayos de caracterización in vitro de la colección de cepas.

^(A) El porcentaje de adhesión se calculó como la relación entre bacterias adheridas y el inóculo inicial. Resultados presentados como promedio ± desviación estándar.

^(B) Formación de biofilms de acuerdo a la escala establecida por Lebeer et al., 2008.

^(C) Producción de gas en el ensayo de *screening* de producción de GABA.

^(D) Producción de GABA analizado por UHPLC-MS (mM).

Formación de biofilms

Se observó una capacidad variable en la formación de biofilms estáticos entre las distintas cepas (Tabla 2).

La formación de biofilm resultó predominantemente baja o mediana según los parámetros establecidos por Stefanovic y colaboradores, a la vez que otras cepas fueron no formadoras. Solo una cepa (143, Género *Lpb*) fue altamente formadora de biofilm.

Screening semicuantitativo de producción de GABA

Este método de *screening* permitió realizar un análisis rápido, económico y semicuantitativo de la producción de GABA por parte de la colección de cepas. Se pudo percibir la diferencia en la producción de gas entre las cepas de los géneros *Lcb* y *Lpb*, siendo las cepas del género *Lpb* las mayores productoras, mientras que las cepas del grupo *Lcb* no produjeron gas (Figura 11).

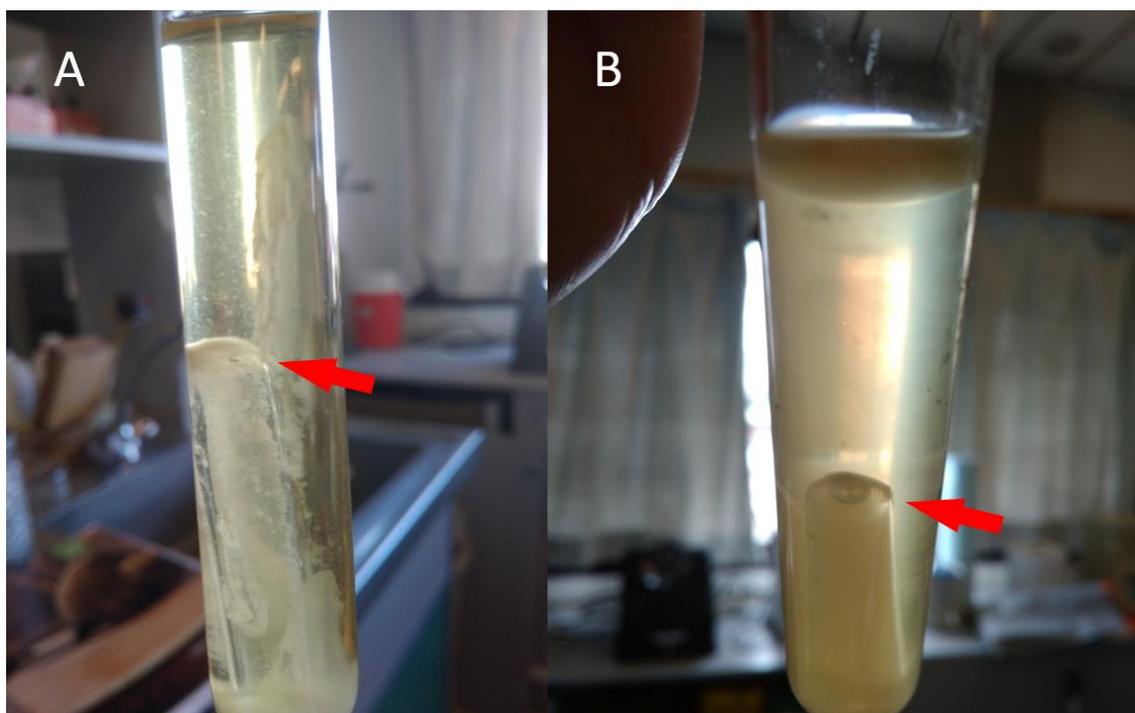


Figura 11: Producción de gas tras el ensayo de *screening* de producción de GABA, A) Cultivo de cepa con producción baja; B) Cultivo de cepa con producción media. La flecha indica la burbuja de gas generada.

Cuantificación de la producción de GABA por UHPLC-MS

Las cepas mostraron una alta variabilidad en la producción extracelular de GABA por UHPLC-MS (Figura 12), llegando en algunos casos a diferencias de dos órdenes de magnitud entre ellas. El valor más bajo de producción de GABA a las 24 h de incubación se obtuvo para la cepa 16 con una concentración de GABA de 0,14 μM y el nivel más alto se obtuvo para la cepa 149A con una producción de 13,18 μM . A las 48 h, la menor productora fue la cepa 17B (0,40 μM) y la mayor productora fue la cepa 145 con una concentración de GABA de 51,82 μM (Figura 13A).

Se pudieron distinguir tres grupos distintos de cepas de acuerdo a su producción de GABA a las 48 h (Figura 13). Las cepas del grupo *Lcb* mostraron la producción más baja, mientras que las cepas del grupo *Lpb* se pudieron separar en dos grupos distintos, baja producción y alta producción (Figura 13B).

En todas las cepas del grupo *Lpb*, se observó un aumento ($p < 0.05$ test de Mann-Whitney) en la concentración de GABA entre 24 y 48 horas de cultivo (Figura 13C).

Selección de la cepa candidata

El análisis en conjunto de todos los resultados de la caracterización *in vitro* de las cepas, junto a los estudios previos (Lozano et al., 2022) llevó a la selección de tres cepas candidatas para su uso en ensayos *in vivo*.

Así se seleccionó la cepa 145, por ser la mayor productora de GABA además de poseer una capacidad de adhesión a mucus por encima del promedio de las cepas, y capacidad de resistir ambientes similares al tracto gastrointestinal.

Para facilitar su nomenclatura a futuro, se renombró la cepa seleccionada como LPB145.

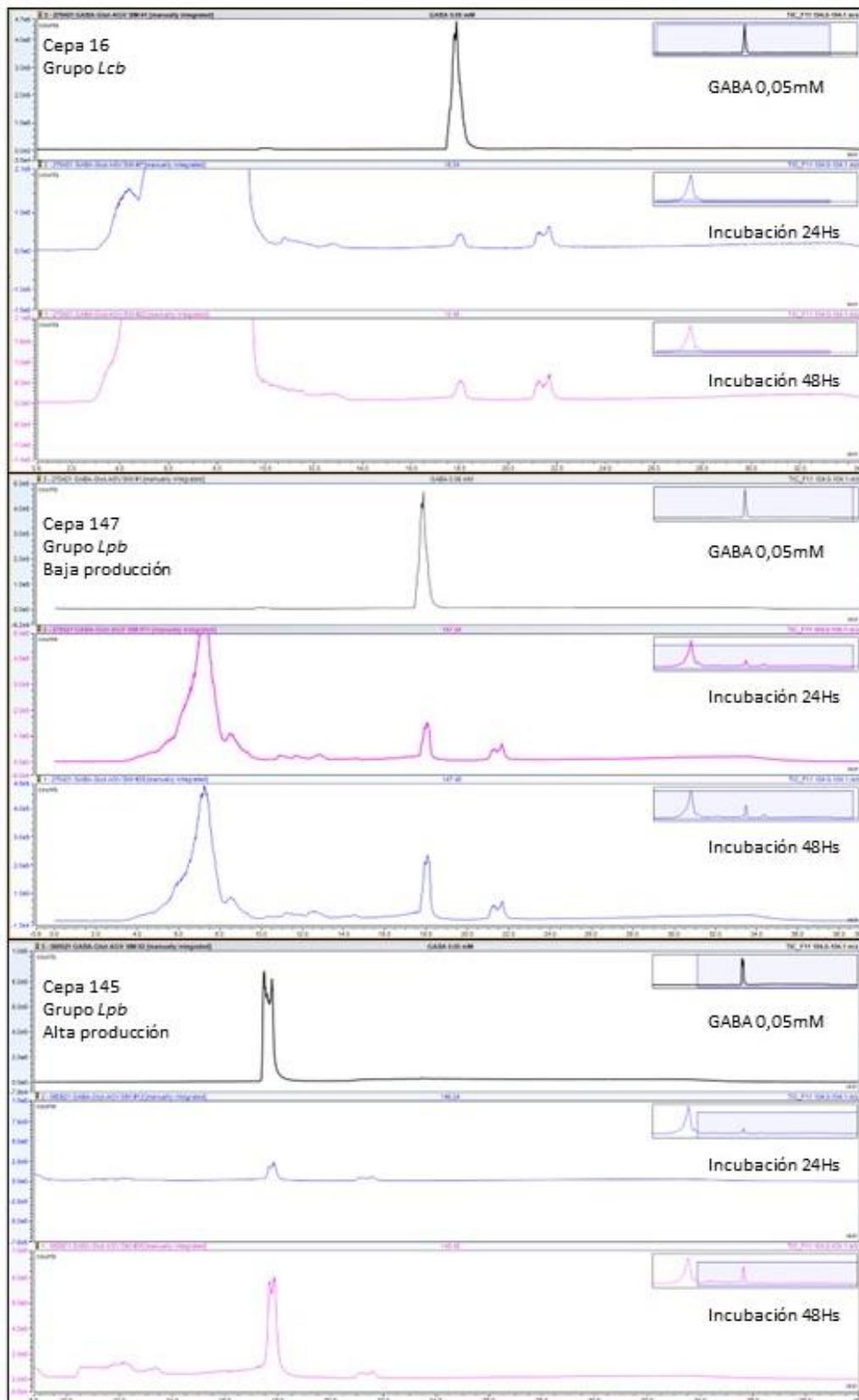


Figura 12: Espectro SIM UHPLC-MS, $m/z=104$ de los aislamientos 16, 147 y 145, mostrando el patrón del estándar de GABA (Arriba), el pico de producción de GABA a las 24 horas (Medio) y 48 horas (Abajo).

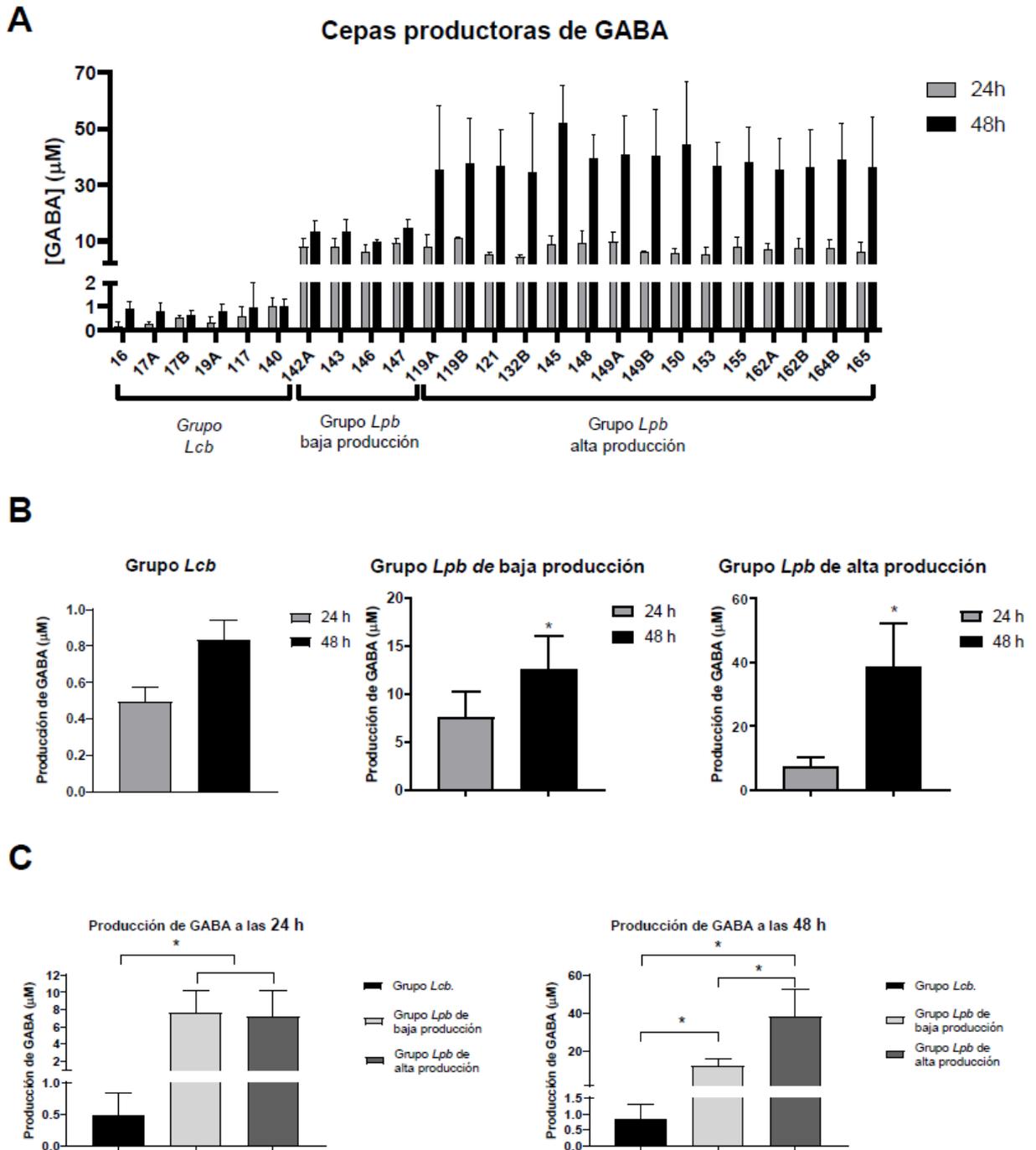


Figura 13: A) Síntesis de GABA extracelular por las cepas a las 24 (barras grises) y 48(barras negras) horas, resultados presentados como promedio \pm desviación estándar. B) Producción de GABA entre las 24 y 48 horas dentro de cada grupo, (*) indica diferencias significativas ($p < 0.05$ test de Mann-Whitney). C) Producción de GABA entre los diferentes grupos a las 24 and 48 horas (*) indica diferencias significativas ($p < 0.05$ test de Mann-Whitney).

Liofilización de la cepa candidata

La cepa candidata fue capaz de resistir las condiciones descritas para el proceso de liofilización. Se formularon dosis de LPB145. Se formularon dosis de las cepas candidatas en leche descremada reconstituida, idénticas a las que luego se utilizaron en los ensayos *in vivo* y se almacenaron a -80°C . Luego de 36 días de almacenamiento del producto liofilizado, la formulación de las dosis continuaba teniendo la misma viabilidad bacteriana en comparación con el día 0, medida en base a las UFC/ml de las distintas suspensiones (Tabla 3).

Cepa	Viabilidad bacteriana - día 0 (UFC/ml)	Viabilidad bacteriana - día 36 (UFC/ml)
LPB145	3.5×10^9	8.3×10^9

Tabla 3: Concentración de bacterias (UFC/ml) de las suspensiones liofilizadas medida por recuento en placa en el día 0 y después de 36 días de almacenamiento a -80°C .

Discusión

En este capítulo se evaluó la capacidad de adhesión a mucus y formación de biofilm, de forma de expandir el análisis del potencial probiótico de cepas caracterizadas previamente (Lozano et al., 2022).

La capacidad de adhesión *in vitro* a mucus, ha sido utilizado para predecir el comportamiento de la bacteria en la luz intestinal. En este trabajo, el porcentaje de adhesión fue menor al encontrado en otros trabajos similares (Fernández et al., 2018; Ouwehand et al., 1999; Sugimura et al., 2011), pero no se descarta que las cepas administradas puedan ejercer su efecto benéfico durante su paso por el TGI mientras dure el período de administración oral. Este resultado podría ser esperable, ya que las cepas evaluadas no provienen del TGI. Consideramos que este resultado podría no afectar el efecto deseado de las cepas en el hospedero como posibles probióticos si se mantiene su administración en el tiempo (van Tassel & Miller, 2011; Wang et al., 2021).

En cuanto a la formación de biofilms se vio una relativamente baja producción entre todas las cepas, con unas pocas excepciones. Estos resultados se podrían explicar por el

origen de las cepas, puesto que en el suero fermento natural es un medio líquido donde las bacterias están libres, y justamente las formadoras de biofilm son las que forman el cuajo que posteriormente, luego de cortado y secado, dará lugar al queso para consumo. Otra razón podría ser el medio utilizado para el ensayo, el mTSB Puede ser el medio no indicado para el análisis de la producción de biofilms en esta colección de cepas, estudios indican que para que distintas cepas de lactobacilos, se necesitan niveles nutricionales variados para la formación de biofilms (Lebeer et al., 2007, 2011). Como perspectiva, sería de gran interés evaluar distintos medios de cultivo con menor disponibilidad de nutrientes para promover las condiciones para el desarrollo de biofilms.

Para verificar la actividad del operón *gad*, que codifica a la enzima GadB en nuestra colección de cepas, inicialmente se puso a punto una técnica de *screening* semicuantitativo de producción de GABA basada en la propuesta por Wu y colaboradores (Wu et al., 2015). En dicho ensayo se vio que las cepas del género *Lcb* mostraron una producción de GABA casi nula, mientras que entre los miembros del género *Lpb* se observó mayor variabilidad en la producción. Debido a la naturaleza de *screening* semicuantitativo de este ensayo, basada en la producción de gas, procedimos a confirmar y cuantificar la producción de GABA. Cabe destacar la sencillez y rapidez del ensayo, el cual solo requiere de materiales básicos de microbiología clásica, aunque comparándolo con una metodología precisa de cuantificación, como lo es el UHPLC-MS, los resultados se correspondieron solo parcialmente, varias cepas del grupo *Lpb* de alta producción mostraron una producción de gas baja o nula, entre ellas, la cepa que más adelante se utilizó para la realización de los ensayos *in vivo*.

La producción de GABA extracelular fue confirmada y cuantificada por UHPLC-MS. Las cepas del género *Lpb* mostraron una producción de GABA significativamente mayor que las cepas del género *Lcb*. Estos resultados concuerdan con estudios previos que reportan que varias cepas del género *Lpb* son utilizadas como productoras de GABA para la formulación de alimentos funcionales (Sarasa et al., 2020; Shan et al., 2015). Una observación interesante fue la uniformidad de la producción de GABA a las 24 h en el género *Lpb*, mientras que, a las 48 h, un grupo de 15 cepas del género *Lpb* (75% de las cepas analizadas de este género) mostró una producción significativamente mayor que el resto de cepas pertenecientes a este género. Este cambio, solo observado a las 48 h,

podría explicarse por la naturaleza del operón *gad*, que se activa cuando el ácido láctico de la fermentación comienza a acumularse y el pH del medio desciende (Feehily & Karatzas, 2013). Sin embargo, las cepas caracterizadas como productoras bajas de GABA no deben subestimarse, ya que se ha informado en otros estudios que cepas similares podrían producir GABA en diferentes condiciones experimentales. Por ejemplo, la falta de piridoxal-5-fosfato ha demostrado ser una limitación en ensayos similares porque funciona como cofactor esencial para ciertas cepas de lactobacilos (Kawee-ai & Seesuriyachan, 2019; Komatsuzaki et al., 2005; Wu & Shah, 2015).

En el proceso de selección se analizaron todas las características estudiadas durante la caracterización *in vitro*, incluida la resistencia al proceso de liofilización, aunque se ponderó particularmente la producción de GABA. También se prestó especial importancia a la adhesión a mucus intestinal, ya que, para cumplir su función, es deseable que las células bacterianas se adhieran a las paredes intestinales del hospedero.

En conjunto, estos resultados mostraron que los lactobacilos dentro de la comunidad de iniciadores de suero natural de la industria del queso artesanal tienen el potencial de ser probióticos eficientes, con beneficios adicionales como la producción de compuestos bioactivos como GABA. Por ello se decidió continuar con la caracterización de una cepa seleccionada del grupo *Lpb* de alta producción (LPB145) para esclarecer su potencial probiótico en ensayos *in vivo* de administración crónica y analizar efectos comportamentales de este tratamiento en animales de laboratorio.

Capítulo 2: Caracterización de la actividad probiótica de la cepa LPB145

Objetivos específicos

- Caracterizar los efectos comportamentales en ratas inducidos por la administración crónica de una cepa del género *Lactiplantibacillus* potencialmente probiótica y productora de GABA.
- Estudiar el impacto de este tratamiento en la microbiota intestinal

Resultados

Dosis, adiestramiento de los animales y administración oral crónica de la cepa LPB145

Se formularon las dosis con la cepa seleccionada LPB145 y para cada ensayo se prepararon 125 dosis (estrictamente se necesitaban 114). Se realizaron recuentos en placa de algunas dosis al azar ($n = 4$), que dieron lugar a valores entre 2×10^8 y 9×10^8 UFC por dosis de 0,5 ml.

El adiestramiento de las ratas 4 días antes del comienzo del ensayo fue exitoso, ya que se logró desarrollar un protocolo de administración atraumático para los animales.

Comportamientos asociados a la administración de LPB145

Con el fin de analizar los efectos comportamentales del tratamiento, se realizó la caracterización del efecto de la administración crónica de la cepa LPB145 en la actividad locomotora y los efectos tipo-ansiolíticos y tipo-antidepresivos.

A grandes rasgos, los resultados obtenidos mostraron que la administración crónica de la cepa LPB145 productora de GABA indujo un efecto tipo-antidepresivo en los animales sometidos al TNF, pero no se observó efecto tipo-ansiolítico evaluado en el LCE.

En primer lugar, cabe destacar que no hubo diferencias en la actividad locomotora evaluada mediante el test de CA. Cambios en esta actividad podrían influir en los consiguientes test comportamentales que se basan en diferencias de distintos patrones locomotores, y, por lo tanto, cambiarían la interpretación del resto de los resultados. No existieron diferencias significativas en la actividad locomotora entre los animales tratados y el control, tanto durante los 10 minutos completos del test ($p=0,768$, test t de Student), así como en los intervalos de 5 minutos (0-5 minutos, $p= 0,9743$; 5-10 minutos, $p= 0,599$, test t de Student) (Figura 14 A-C).

Otro aspecto a observar en el test del CA es el tiempo en el centro. En este caso se vio una tendencia en el aumento del tiempo de permanencia de las ratas tratadas en el centro del CA, aunque la diferencia no fue significativa ($p= 0,3032$, test t de Student). Esto podría indicar un posible efecto tipo-ansiolítico, ya que el animal se siente más expuesto en el centro del campo, aunque para verificarlo, es necesaria la realización de más test comportamentales como el LCE, el cual da una visión mucho más clara de este tipo de efectos para un tratamiento (Figura 14 D-F).

Continuando con esta línea, en el LCE se vio que el tratamiento no generó cambios significativos en cuanto a las salidas a los brazos abiertos ni con el tiempo que pasaron allí. Este resultado, junto con el número de salidas totales sin diferencias significativas entre tratamientos, indica que no hubo efectos sobre la ansiedad experimental en este modelo (Figura 15 A-D).

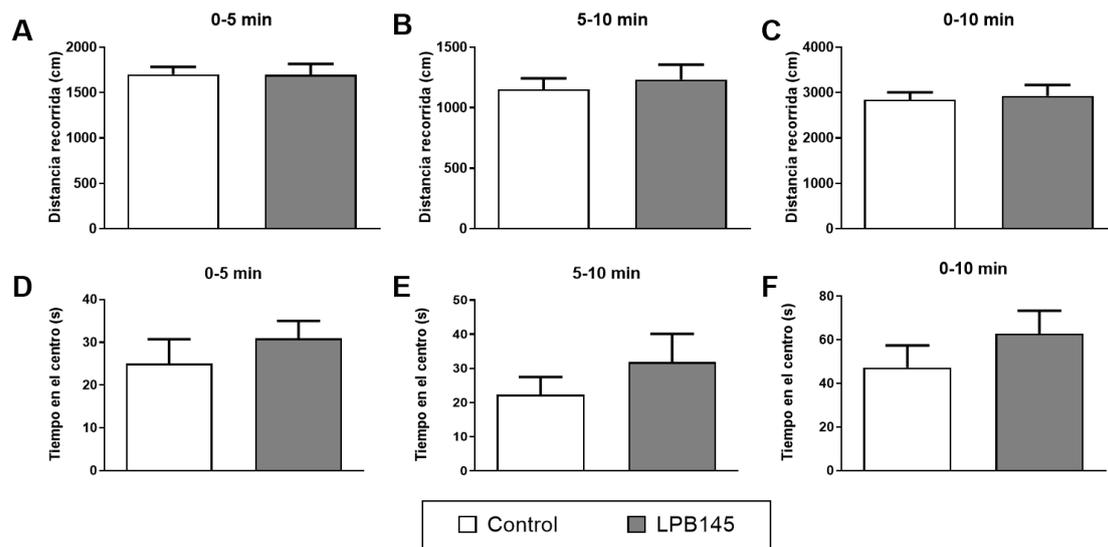


Figura 14: Efectos comportamentales del tratamiento con LPB145 evaluados en el CA. Las barras representan la media \pm SEM de la distancia recorrida en distintos intervalos de tiempo (A-C) y el tiempo de permanencia en el centro del CA (D-F) en los mismos intervalos de tiempo. Prueba t de Student; n = 12 por grupo.

En el mismo sentido, no se vio un aumento de los comportamientos que se evalúan en los brazos abiertos, como son el *head dipping* y las llegadas al final del brazo. Tampoco se vieron diferencias en los comportamientos de los brazos cerrados como los *risk assessment*. Estos resultados apoyan la ausencia de efectos tipo-ansiolíticos sobre el comportamiento de las ratas (Figura 15 E-G).

Por último, se realizó el TNF, en el cual se analizan los efectos del tratamiento sobre la depresión experimental. En este ensayo se analizan tres comportamientos, dos activos, como el nado y el *climbing* y uno pasivo, como la inmovilidad.

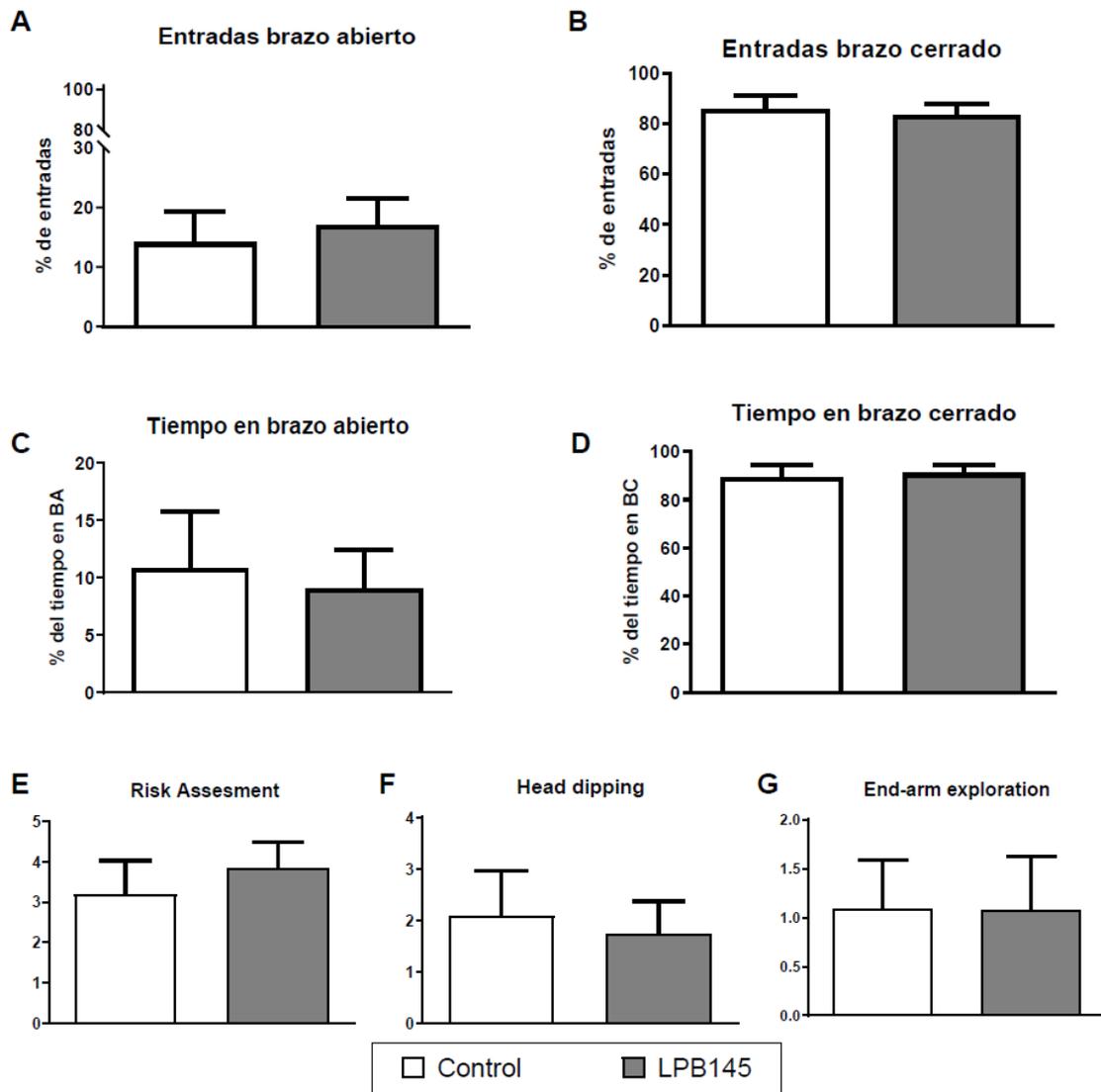


Figura 15: Efectos comportamentales del tratamiento con LPB145 evaluados en el LCE. Las barras representan la media \pm SEM del porcentaje de entradas en los Brazos abiertos y cerrados (A y B respectivamente) y el porcentaje de tiempo de permanencia en los Brazos abiertos y cerrados (C y D), los comportamientos complementarios se representan como recuentos medios \pm SEM (E-G). Prueba t de Student; n = 12 por grupo.

En este ensayo sí se vieron cambios significativos en la inmovilidad, la cual fue menor en las ratas tratadas con respecto al control ($P=0,0256$ test t de Student). Esta disminución es causada por un aumento en la actividad, medido por el tiempo de *climbing* y nado, aunque ninguno de estos comportamientos fue significativamente mayor en el grupo tratado que en el control (Figura 16).

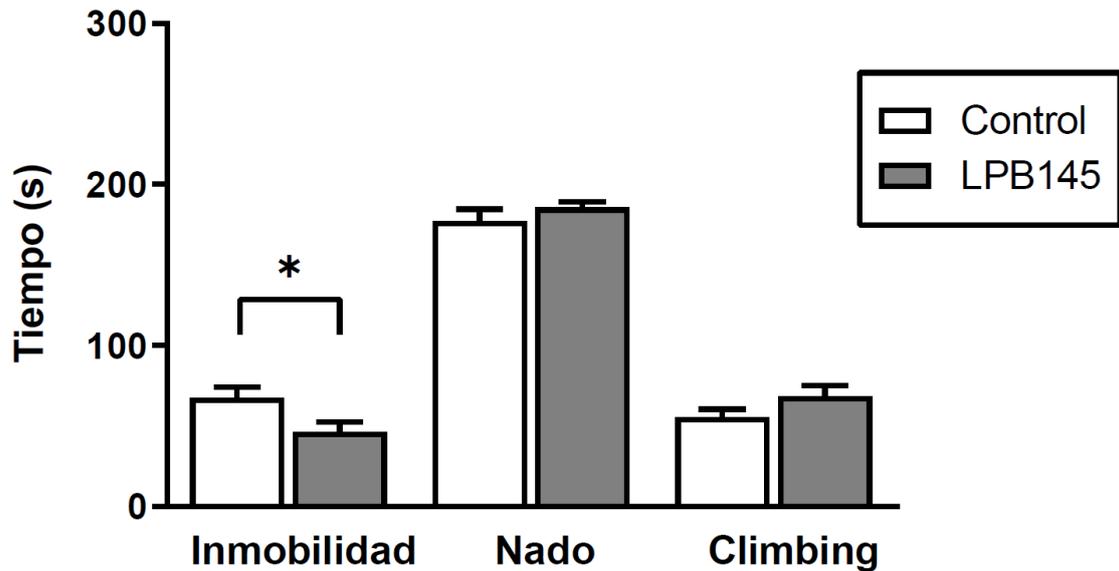


Figura 16: Efectos comportamentales del tratamiento con LPB145 evaluados en el TNF. Las barras representan la media \pm SEM del tiempo dedicado a las conductas de inmovilidad, natación o escalada. * = $P < 0,05$, en relación con el grupo de control, prueba t de Student, $n=12$ por grupo.

Efecto del tratamiento con LPB145 sobre la composición microbiana fecal

La microbiota fecal de las ratas se caracterizó por medio de la secuenciación de la región V4 del rADN bacteriano 16S. Después de filtrar por calidad y tamaño y eliminar *singletons* y quimeras, se retuvo el 69,8% de las lecturas iniciales, dejando un promedio de (64006 ± 25104) lecturas por muestra. Después de la eliminación de ASV de recuento bajo (ASV con menos de 10 lecturas totales), se definieron 3265 ASV diferentes. Cerca de un tercio de los ASV (35,6%) no pudieron clasificarse a nivel de género. La composición taxonómica a nivel de filo reveló que los filios más abundantes fueron *Bacillota* y *Bacteroidota* que juntos representaron el 87,7% de la microbiota bacteriana total. La abundancia de estos filios se mantuvo constante en cada grupo a lo largo del tiempo ($P > 0,05$, prueba de Mann-Whitney) (Figura 17). Cabe destacar que hubo un renombramiento en todos los nombres de los filios bacterianos y los géneros que previamente eran *Lactobacillus*.

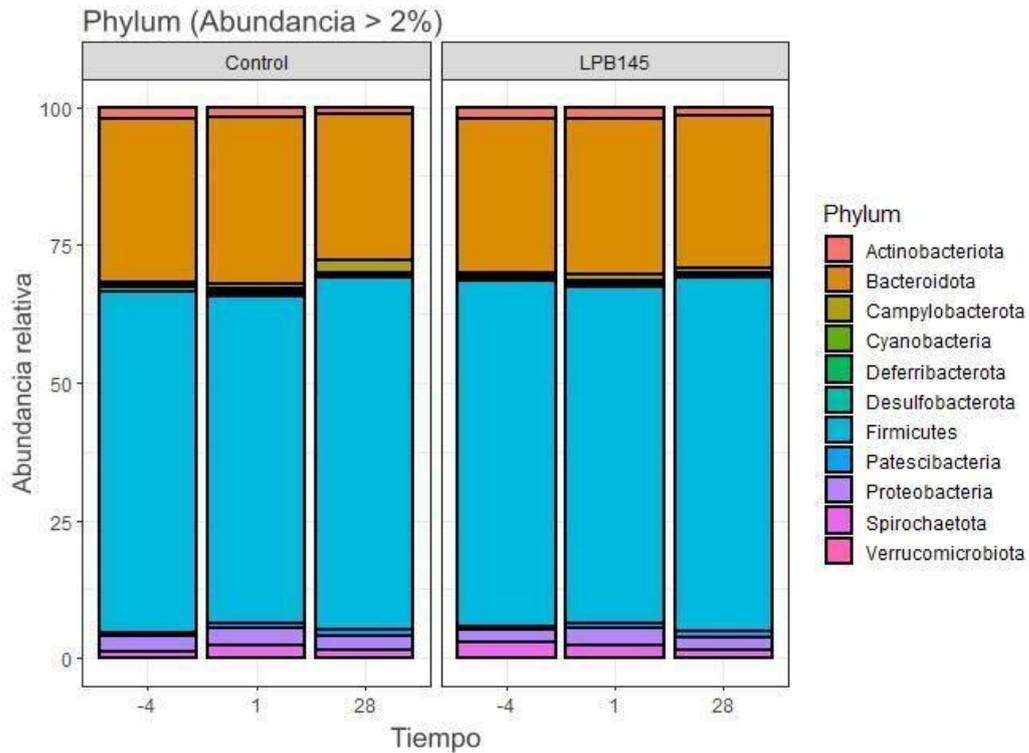


Figura 17: Abundancia relativa de filos bacterianos a lo largo del tiempo en cada grupo experimental. Se presenta la abundancia relativa de los filos más abundantes (más de 2%) en los tres momentos de muestreo diferentes. Los datos se presentan por tratamiento (referencia en la parte superior) y momento de muestreo (referencia en la parte inferior).

Si estudiamos a nivel de género vemos que aquellos más abundantes fueron *Lactobacillus*, *Rombustia*, *Prevotellaceae*, *Ligilactobacillus*, *Alloprevotella* y *Turicibacter*, y en esta escala filogenética tampoco se encontraron diferencias significativas entre grupo tratado y control (Figura 18).

	Relative abundance (genus)					
	Control			LPB145		
<i>Lactobacillus</i> -	14.9	13.7	13.7	14.8	12.6	14.5
<i>Romboutsia</i> -	6.6	6.3	7.8	8.2	6.2	7.7
<i>Prevotellaceae NK3B31 group</i> -	7.1	7.8	5.6	6.5	6.6	5.8
<i>Ligilactobacillus</i> -	5.4	5.2	3	6.4	7.4	3.5
<i>Alloprevotella</i> -	4.2	4.8	3.6	3.1	3.6	3.4
<i>Turicibacter</i> -	1.8	1.2	3.3	3.2	2.9	3.3
<i>Prevotella_9</i> -	3	2.8	2.7	2.5	2.7	2.4
<i>Prevotellaceae UCG-003</i> -	2.1	2.4	2.4	2.4	2.1	1.9
<i>Lachnospiraceae NK4A136 group</i> -	1.8	2.1	1.9	2.1	2.5	2.1
<i>Ruminococcus</i> -	1.5	1.8	2.1	2	2.4	2.4
<i>Quinella</i> -	2.5	2.2	2	1.5	2	1.7
<i>Rikenellaceae RC9 gut group</i> -	1.6	1.8	2.1	1.8	2.1	1.9
<i>Treponema</i> -	1	2.1	1.1	2.6	2.1	1.2
<i>Clostridium sensu stricto 1</i> -	1.5	0.6	0.9	2.7	2	2.1
<i>HT002</i> -	1.6	2	1.5	2.1	1.5	1.2
<i>Bacteroides</i> -	1.4	1.3	1.7	1.7	1.2	1.3
<i>Allobaculum</i> -	2.4	1.2	1	1.4	1.2	1
<i>UCG-005</i> -	1.2	1.3	1.6	1.2	0.8	2.1
<i>Roseburia</i> -	1.5	2	0.8	1	1.1	1.1
<i>Helicobacter</i> -	0.7	0.8	2.4	0.4	1.1	0.8
	-4	1	28	-4	1	28

Figura 18: Abundancia relativa de géneros bacterianos a lo largo del tiempo. Se presenta la abundancia relativa de los 20 géneros más abundantes en los tres momentos de muestreo diferentes. Los datos se presentan por tratamiento (referencia en la parte superior) y momento de muestreo (referencia en la parte inferior).

Los gráficos NMDS fueron construidos utilizando diferentes métodos de cálculo de distancias utilizando parámetros de diversidad beta (Figura 19), para analizar la distribución de las muestras.

La diversidad alfa se calculó mediante los índices de Riqueza, Shannon, Simpson y Equitatividad, los cuales se calcularon y analizaron como descriptores de la comunidad microbiana (Figura 20). No hubo diferencias significativas en la riqueza, ni en ninguno de los índices entre los grupos tratados y el grupo control en ninguno de los tiempos.

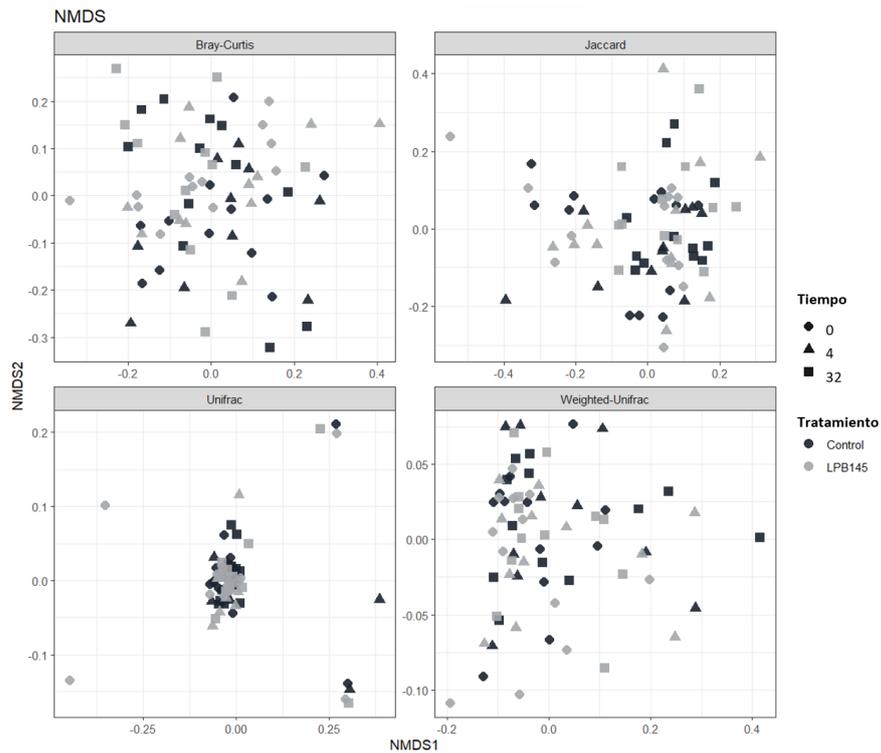


Figura 19: Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de diferentes matrices de distancias de disimilitud. Los diferentes colores representan los diferentes tratamientos y las diferentes formas representan el tiempo de muestreo.

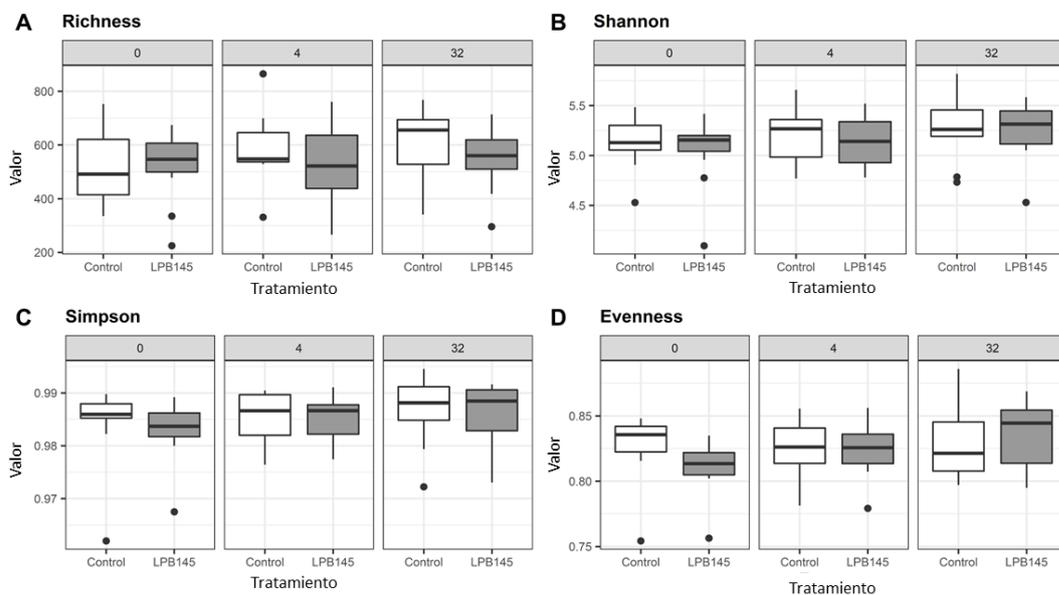


Figura 20: Índices de diversidad alfa (Riqueza, Shannon, Simpson y Equidad) en cada momento de muestreo (Días 0, 4 y 32) El grupo tratado se comparó con el grupo control mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

Se utilizó PERMANOVA para evaluar diferencias estructurales generales en las comunidades. La matriz de distancia utilizada para el modelo matriz~Tratamiento y matriz~Tiempo para la comparación de tratamientos y tiempos respectivamente, fueron calculadas con el método de Bray-Curtis. Posteriormente, los datos se separaron por día para comparar de forma pareada las comunidades bacterianas del grupo tratado con el grupo control en cada momento (día 0, 4, 32). La comparación en los días 0 y 4 (previo al tratamiento) se realizó para determinar que ambos grupos comenzaron el período de administración con comunidades similares. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en ningún punto de muestreo (Tabla 3). Luego se realizó una comparación en cada grupo experimental para ver qué diferencias estructurales hubo entre los distintos tiempos analizados.

Tabla 3. Comparaciones pareadas con PERMANOVA, parametros del modelo y p-valor de test de homogeneidad

Variable					
Comparación de tratamientos	Tiempo	F. model	R2	p-value	permutest
LPB145 vs Control	Día 0	1.286	0.048	0.7	0.155
LPB145 vs Control	Día 4	1.274	0.047	0.154	0.99
LPB145 vs Control	Día 32	1.015	0.036	0.413	0.9201

Variable					
Comparación de tiempos	Tratamiento	F. model	R2	p-value	permutest
Día 0 vs día 4	Control	1.225	0.048	0.293	0.388
Día 4 vs día 32	Control	1.757	0.063	0.109	0.6763
Día 0 vs día 32	Control	2.558	0.08	0.02	0,127
Día 0 vs día 4	LPB145	1.293	0.033	0.259	0.745
Día 4 vs día 32	LPB145	1.766	0.056	0.083	0.755
Día 0 vs día 32	LPB145	2.156	0.06	0.046	0.650

Variable: Variables explicativas utilizadas para el análisis PERMANOVA de comunidades bacterianas y su importancia (matriz~Tratamiento para la comparación de tiempos y matriz~Tiempo para la comparación de tratamientos); el p-valor se estableció en <0,05 para lograr significancia estadística.

Abundancias diferenciales de ASV inducidas por la administración de LPB145

La abundancia diferencial de ASV específicos, se infirió utilizando la herramienta DESeq2 para evaluar cambios específicos en la comunidad bacteriana, asociados con el tratamiento (Figura 21).

Se observaron varios cambios en la composición microbiana entre los grupos tratados y control al final del tratamiento (día 32) (valores de p ajustados $< 0,10$). ASV pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium*, *Alistipes*, *Fusicatenibacter* y *Roseburia* fueron significativamente más abundantes en el grupo tratado (Figura 22).

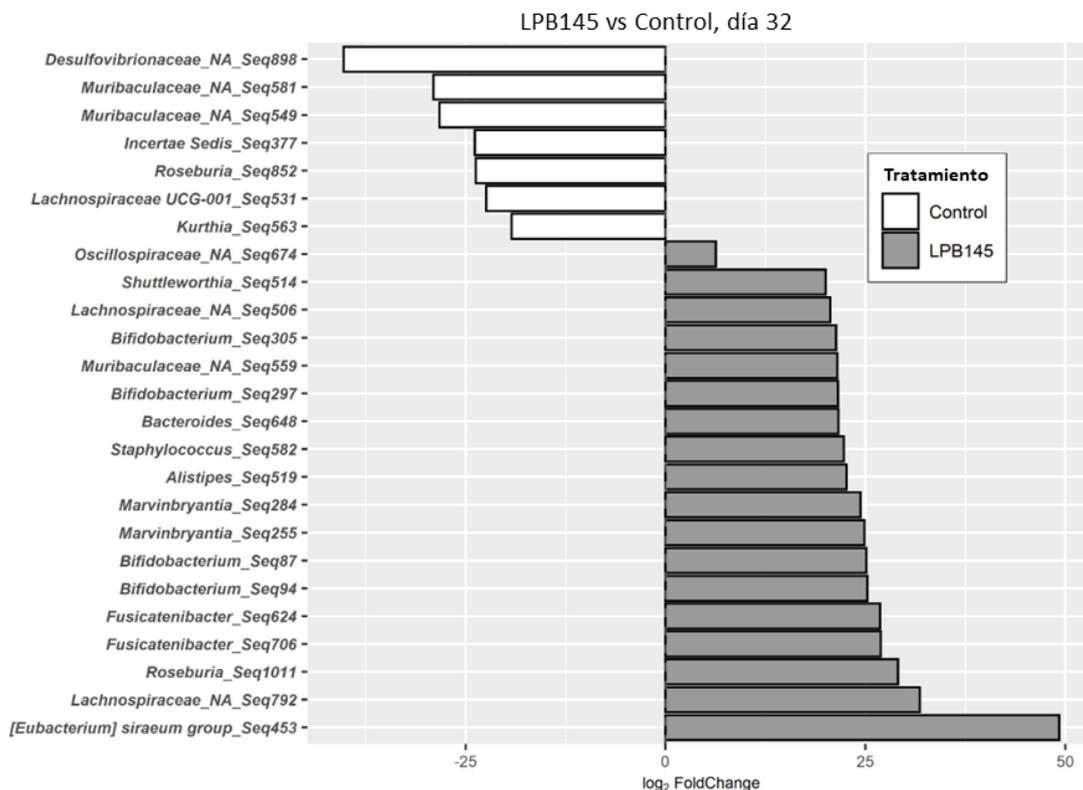


Figura 21: Abundancias diferenciales de ASV entre los grupos tratados con LPB145 y el grupo control. Un valor negativo de log₂ FoldChange significa una abundancia significativamente mayor en el grupo de control para ese ASV. Los nombres de ASV se presentan con el género asignado. Cuando no había disponible ningún nombre de género, se presenta la familia asignada seguida de "NA" y el nombre de la ASV.

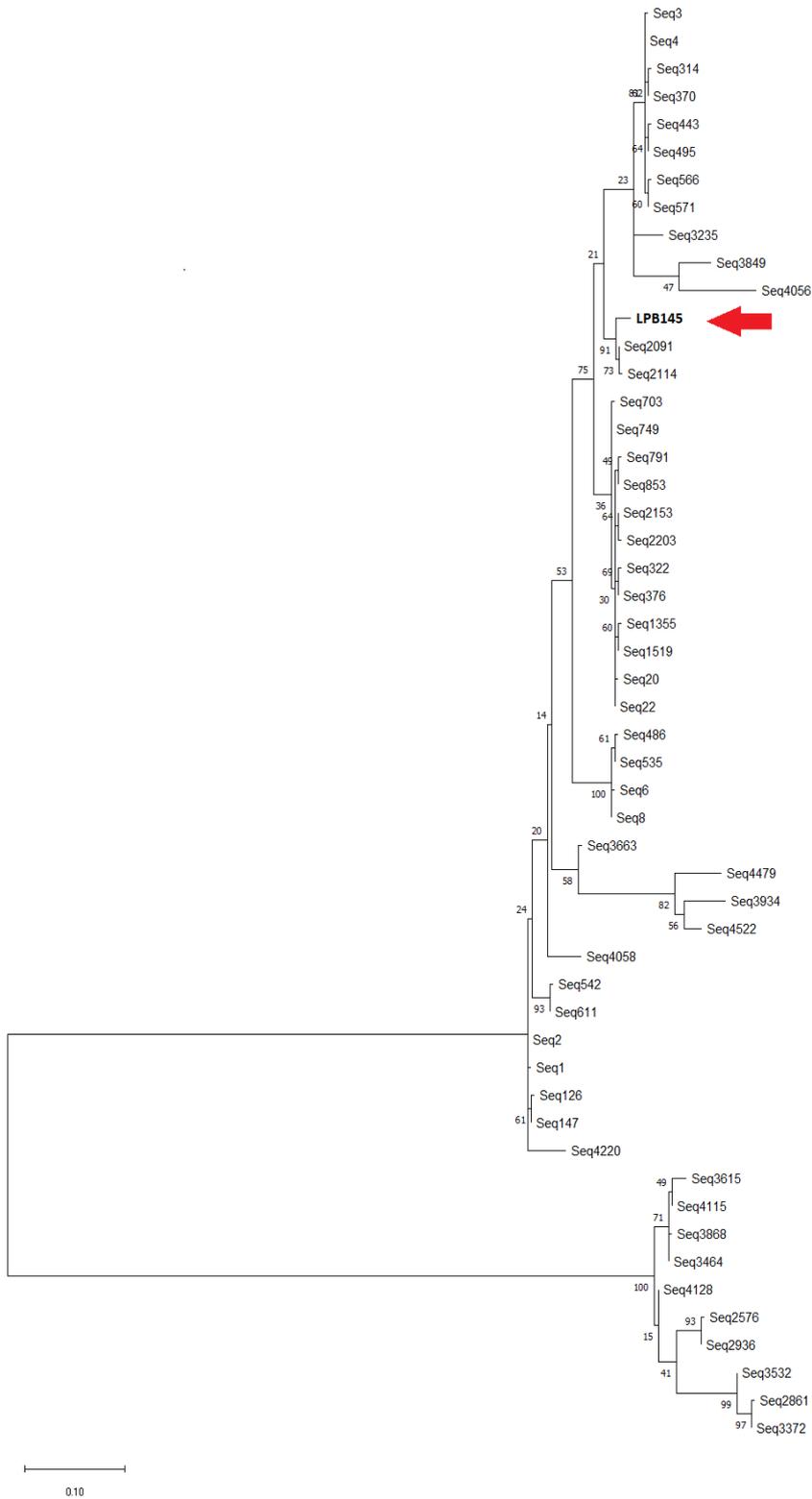


Figura 22: Relaciones filogenéticas entre la cepa LPB145 y ASV pertenecientes al género lactobacilos. Las secuencias alineadas se analizaron con el método de Máxima Verosimilitud y los valores de *bootstrap* (500 réplicas), utilizando un modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros.

No se encontraron diferencias en la abundancia relativa de ASV relacionados con el género lactobacilos, al que pertenece LPB145, particularmente la ASV asignada el nombre Seq2091 en este trabajo, la cual posee un 99% de homología con la secuencia 16S de la cepa LPB145 (Figura 22).

Discusión

El protocolo de administración oral de la cepa bacteriana y del vehículo (control), propuesta por Tillman y colaboradores (Tillmann & Wegener, 2018), se pudo realizar con éxito en este estudio. Esta forma de administración tiene ventajas con respecto a la administración con sonda intragástrica, ya que el animal no sufre de manera física tanto al sacarlo de la jaula, así como por la sujeción y el posible trauma por la inserción repetida de la vía rígida que se emplean la maniobra. Este método permitió la administración de dosis precisas, evitando el uso de estrategias estresantes que potencialmente podrían modificar los resultados comportamentales, provocando un efecto que sería difícil descifrar.

El consumo de la cepa LPB145 redujo significativamente la inmovilidad en el test de nado forzado. En este test, la inmovilidad revela en las ratas un estado comparable a la depresión (Yunes et al., 2020). Estos resultados fueron validados por el test de campo abierto, donde no se vieron diferencias significativas entre la actividad locomotora de los dos grupos experimentales. Por lo tanto, el efecto de tipo antidepressivo observado en la TNF es probablemente específico y no está relacionado con la estimulación de la actividad motora general.

Este tipo de resultados donde disminuye la inmovilidad en el grupo tratado es característico de tratamientos con drogas antidepressivas tanto inhibidores de la recaptación de serotonina, así como inhibidores de la recaptación de norepinefrina (Cyran et al., 2005), por lo cual, los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento crónico de esta cepa potencialmente probiótica, productora de GABA tuvo efectos tipo-antidepressivos.

Se han informado resultados similares cuando se usaron otros tipos de bacterias aisladas de alimentos fermentados. Por ejemplo, la cepa *Lactiplantibacillus plantarum* R6-3

aislada de Sayram Ketteki, un yogur fermentado natural tradicional chino, mostró un claro efecto antidepresivo en un modelo de depresión inducida por estrés leve crónico impredecible en ratones (Zhao et al., 2023). Este campo de investigación presenta un escenario atractivo para el desarrollo de alimentos funcionales naturales con posibles efectos en la salud, incluyendo aspectos vinculados con la salud mental.

También se evaluó un posible efecto tipo ansiolítico asociado con la administración de LPB145 utilizando los modelos LCE y CA (Kraeuter et al., 2019). Sin embargo, en este caso no se observaron efectos sobre los comportamientos asociados a la ansiedad experimental en ninguno de los dos ensayos. Diferentes causas se pueden atribuir a este resultado. Una podría ser la cantidad de GABA liberado, el cual puede no haber sido suficiente para generar un efecto tipo ansiolítico. De todas formas, para descartar un posible efecto tipo-ansiolítico del tratamiento con LPB145, sería necesario realizar estudios en animales estresados bajo modelos experimentales como los planteados en el modelo de separación maternal y el modelo de estrés crónico impredecible (Lezak et al., 2017).

Se ha constatado que la administración de bacterias productoras de GABA puede inducir un efecto tipo antidepresivos en roedores. Diversos estudios realizados probaron que bacterias productoras de GABA inducen un efecto de tipo antidepresivo en ensayos similares al que se describe en este trabajo (Ko et al., 2013; Yunes et al., 2020).

Los mecanismos subyacentes a los efectos del GABA producido por bacterias en el sistema nervioso central aún no se han dilucidado. En base a la literatura y en particular a nuestros resultados, podríamos sugerir que el GABA de origen bacteriano también podría tener efectos sobre el sistema nervioso. Aunque tradicionalmente se ha considerado que el GABA no puede atravesar la barrera hematoencefálica (Kakee et al., 2001), diversos estudios han reportado efectos asociados a su administración oral. Es probable que su influencia se ejerza también a través del nervio vago, el eje hipotalámico-pituitario-adrenal o el sistema nervioso entérico, así como cambios en miembros específicos de la microbiota específicos en el intestino (Bravo et al., 2011; Gao et al., 2023).

Para evaluar el papel de la MI en estos procesos, se analizó la comunidad bacteriana de las heces de cada animal (del grupo control y el tratado) a través de la secuenciación del gen ribosomal 16S de las heces de rata a lo largo del período experimental.

Bacillota fue el filo más abundante y lactobacilos fue el género más abundante en ambos grupos experimentales a lo largo del ensayo. Hallazgos similares se han reportado en estudios sobre la microbiota de ratas sanas (García-Legorreta et al., 2020). Los índices de diversidad alfa no se vieron afectados entre los tratamientos, por lo que la administración de la cepa de interés no generó un impacto deletéreo en la diversidad de la comunidad. Resultados similares se observaron en gráficos exploratorios donde no se vio ningún patrón de distribución espacial en análisis multidimensional NMDS. Con el fin de analizar otras diferencias en la composición de las poblaciones bacterianas entre tratamientos, evaluamos la diversidad beta usando PERMANOVA, pero no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales (día 32). Por otro lado, se determinó que el período de adaptación con la administración oral del vehículo no afectó significativamente la microbiota (0 vs 4), pero sí se observaron diferencias entre los tiempos 0 y 32 en ambos grupos, implicando que hubo cambios en la microbiota a lo largo del período experimental. Estas diferencias podrían estar dadas por el desarrollo natural hacia un microbioma adulto durante ese período crucial de desarrollo en ratas (Meng et al., 2022), o un efecto tardío de la administración constante del vehículo. Para poder determinar la causa de estos cambios y poder controlarlos en próximos ensayos, se debería contar con un grupo control verdadero, al cual no se le administre vehículo. Estos resultados mostraron que el efecto antidepresivo no se asoció con cambios significativos en la estructura de la población microbiana intestinal.

Coincidentemente con nuestros resultados, un estudio de Lyte et al. reportó que ratones tratados con fluoxetina (un antidepresivo inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, ampliamente utilizado en pacientes) no mostraron cambios en la riqueza y diversidad de su MI, aunque sí se vieron cambios en ASV específicos (Lyte et al., 2019). Siguiendo una dirección similar, en este estudio analizamos cambios en la abundancia de ASV para evaluar el posible papel de ciertos microorganismos seleccionados de la microbiota en los cambios de comportamiento. Para ello se utilizó la herramienta bioinformática DESeq2 y se observaron algunas diferencias significativas entre animales

tratados y no tratados, particularmente, géneros asociados a efectos relacionados con el eje MIC.

Varios ASV del género *Bifidobacterium* fueron más abundantes en el grupo tratado con LPB145 en comparación con el grupo control. La presencia de bacterias de este género en la MI está relacionada con una variedad de beneficios a la salud, como son el desarrollo saludable del lumen intestinal, la prevención del cáncer colorrectal y la exclusión competitiva por nichos frente a patógenos (Gueimonde et al., 2007; Le Leu et al., 2010; Patole et al., 2016).

Este género en particular tiene relevancia con respecto a su capacidad de modular el eje MIC. Se ha observado que cepas específicas de *Bifidobacterium* spp. llevan a generar modulaciones en la actividad cerebral de pacientes (Pinto-Sánchez et al., 2017; Wang et al., 2019) e incluso en otros estudios se evidenció la modulación de la secreción de serotonina en roedores (Engevik et al., 2021).

ASVs del género *Alistipes* también aumentaron significativamente en el grupo LPB145. Lyte y colaboradores también observaron un aumento de ASVs de este género en animales tratados con fluoxetina (Lyte et al. 2019). Es un género recientemente descrito y se determinó que se encontraba disminuido en casos de colitis ulcerosa (Dziarski et al., 2016). En otro estudio, el tratamiento con cepas de este género estimuló la secreción de citoquinas antiinflamatorias, modulando la inflamación intestinal (Shen et al., 2017). A su vez, se ha demostrado la capacidad de producir metabolitos neuroactivos como indol, GABA y sulfobacina B que tienen el potencial de aliviar comportamientos ansiosos y depresivos (Dhaliwal., 2019).

Otra diferencia en el grupo tratado con LPB145 fue un aumento en los ASV del género *Roseburia*. Diferentes estudios han demostrado que la disminución de *Roseburia* spp. en la población de la MI está asociada a la patología del trastorno depresivo mayor (Kovtun et al., 2022). Otros estudios también han propuesto un efecto positivo de *Roseburia* spp. En un estudio realizado por Xu y colaboradores, *R. intestinalis* pudo funcionar en la modulación del eje intestino-cerebro, aliviando los comportamientos similares a la depresión en ratones modelo de colitis (Xu et al., 2021).

Fusicatenibacter, un género descrito hace 10 años (Takada et al., 2013) fue más abundante en el grupo tratado con LPB145. Se ha observado que los pacientes con trastorno depresivo mayor y trastorno de ansiedad general tuvieron una disminución en

las poblaciones de *Fusicatenibacter* spp. en su MI en comparación con controles sanos (Dong et al., 2021).

Distintos trabajos proponen que la modulación de las poblaciones de la MI es la vía principal para ejercer un cambio de comportamiento en el hospedero, por ejemplo, a través de tratamientos como el trasplante fecal y el uso de antibióticos (Berding & Cryan, 2022), nuestros hallazgos mostraron que no hubo cambios significativos en la estructura general de la población bacteriana como consecuencia del consumo repetido de la cepa LPB145. Sin embargo, se observaron cambios sutiles en ciertos taxones bacterianos mencionados previamente con atributos particulares vinculados con la salud mental y el eje MIC. Asimismo, el tratamiento administrado mostró un efecto similar al antidepressivo en las ratas. Esto podría explicarse, al menos en parte, por la influencia del tratamiento en la función y actividad de la comunidad bacteriana, aspecto que no se evaluó en este estudio.

Un valor agregado que surge de estos resultados es la posibilidad del uso de la cepa LPB145 para la formulación de alimentos funcionales con repercusión en la salud. Se pudo comprobar que esta cepa cumple con diversos atributos para ejercer su función como probiótico. Su consumo prolongado genera efectos beneficiosos en el hospedero sin llegar a generar cambios en la estructura de la población bacteriana de la MI, y posee el beneficio agregado que esta cepa es resistente a los procesos de manufactura de alimentos fermentados por su origen de SFN de queserías.

No se descartan otros efectos potencialmente probióticos de LPB145, como la exclusión competitiva de patógenos, la recuperación de la población bacteriana luego de una disbiosis o la mejora del proceso digestivo, aspectos que no fueron estudiados en estos trabajos.

Conclusiones

En este estudio se caracterizó el potencial probiótico de una colección de cepas aisladas de SFN de queserías artesanales de los departamentos de San José y Colonia, Uruguay.

De esta colección se seleccionó la cepa LPB145, perteneciente al género *Lactiplantibacillus*, por su potencial para actuar como probiótico, además de su

sobresaliente capacidad de producir GABA. Tomando en cuenta estas características, se procedió a realizar una evaluación de su potencial probiótico *in vivo* en ratas, su capacidad para modular el eje MIC y el efecto sobre la MI.

Se demostró que su administración, de manera crónica por 28 días, generó efectos tipo-antidepresivos en ratas. La identificación de cepas con este tipo de potencial puede contribuir a abordar el desafío que presentan los efectos secundarios de los antidepresivos convencionales. Su capacidad para producir GABA y su origen alimentario abren un escenario atractivo para su uso como componente psicobiótico en productos alimenticios funcionales.

Actualmente, buscamos generar una revalorización del papel de los alimentos y la nutrición como herramientas de promoción de la salud. Contar con cepas bacterianas de estas características benéficas y resistentes desde el punto de vista tecnológico es de gran valor en el campo alimentario.

Los resultados sugieren, qué variaciones sutiles en la composición de la MI podrían asociarse con cambios de comportamiento, sin alterar la estructura general de la comunidad. Esta situación se ha reportado en una variedad de ensayos similares, tanto en seres humanos como en animales. Sin embargo, es importante reconocer que nuestro estudio podría expandirse mediante más pruebas de comportamiento en diferentes modelos animales y condiciones de dosificación. Un análisis funcional de la MI también ayudaría a aclarar los mecanismos de acción intrínsecos dentro de la MI.

De esta manera se demostró el gran potencial como repositorio biotecnológico que poseen ambientes como los SFN, no solo para la industria alimenticia, sino también para la búsqueda de bacterias con actividades específicas como lo es la producción de GABA. Nuestro estudio se suma al creciente cuerpo de investigación sobre el potencial impacto positivo de cepas probióticas en la salud mental por medio de la modulación del eje MIC. Nuestros hallazgos proporcionan una base para una mayor investigación sobre el uso de probióticos como tratamiento complementario para la depresión y el posible desarrollo de alimentos funcionales con efectos beneficiosos sobre la salud del consumidor.

Los resultados de esta Tesis han sido publicados en los siguientes artículos:

Lozano, J., Fernández-Ciganda, S., González Revello, Á., Hirigoyen, D., Martínez, M., Scorza, C., & Zunino, P. (2022). Probiotic potential of GABA-producing lactobacilli isolated from Uruguayan artisanal cheese starter cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 133(3), 1610–1619. <https://doi.org/10.1111/jam.15664>

Abstract

Aims: In this study, we sought to identify and characterize a collection of 101 lactobacilli strains isolated from natural whey starters used in Uruguayan artisan cheese production, based on their capacity to produce gamma-aminobutyric acid (GABA) and their probiotic potential.

Methods and Results: The probiotic potential was assessed using low pH and bile salt resistance assays; bacterial adhesion to intestinal mucus was also evaluated. Selected strains were then identified by 16S sequencing, and their GABA-producing potential was confirmed and quantified using a UHPLC–MS system. Twenty-five strains were identified and characterized as GABA-producing lactobacilli belonging to the phylogenetical groups *Lactiplantibacillus* (n = 19) and *Lacticaseibacillus* (n = 6). Fifteen strains of the *Lactiplantibacillus* group showed a significantly higher GABA production than the rest. They showed the predicted ability to survive the passage through the gastrointestinal tract, according to the in vitro assays.

Conclusions: A set of promising candidate strains was identified as potential probiotics with action on the gut-brain axis. Further studies are needed to assess their possible effects on behaviour using in vivo assay.

Significance and Impact of the Study: This study shows the potential of strains isolated from local natural whey starters as probiotics and for biotechnological use in functional GABA-enriched foods formulation.

Lozano, J., Fabius, S., Fernández-Ciganda, S., Jessika Urbanavicius, J., Piccini, C., Scorza, C., Zunino, P., (2023). Beneficial effect of GABA-producing *Lactiplantibacillus* strain LPB145 isolated from cheese starters evaluated in anxiety- and depression-like behaviours in rats. Enviado a Beneficial Microbes.

Abstract

In a previous study, we reported the *in vitro* potential probiotic and gamma-aminobutyric acid (GABA) production of several strains from a collection of *Lactiplantibacillus* (Lpb) strains within the community of natural whey starters from the artisanal cheese industry. GABA is a non-protein amino acid widely distributed in nature, produced in animals, plants and by microorganisms. However, the best-known role of GABA is its function as the major inhibitory neurotransmitter of the central nervous system. Preclinical and clinical evidence suggests that the GABA system has a relevant role in mental health disorders like anxiety and major depression, suggesting their modulation as a potential strategy for treatment. Production of GABA by microbes is a health-beneficial property with very high interest for preclinical and clinical researchers, and also for the food industry. The present study was designed to investigate the *in vivo* probiotic potential of LPB145, a *Lactiplantibacillus* selected strain of the previous collection. Therefore, we evaluated the behavioural effects of LPB145 chronic and oral administration on anxiety- and depression-like behaviours using the elevated plus maze, open field, and the forced swimming test in rats. The impact of LPB145 strain treatment on the gut microbiota structure was also assessed.

Our results showed that LPB145 administration induced an antidepressive-like behaviour without changes in locomotor activity. In contrast, the treatment did not modify the experimental anxiety. The structure and diversity of the intestinal microbiota remained unaffected by the treatment although the abundance of specific ASVs could be implicated in the behavioral changes. These findings provide evidence of the potential of probiotic strains isolated from alimentary sources to modulate the gut-brain axis and positively impact mental health.

Bibliografía

- Akkasheh, G., Kashani-Poor, Z., Tajabadi-Ebrahimi, M., Jafari, P., Akbari, H., Taghizadeh, M., Memarzadeh, M. R., Asemi, Z., & Esmailzadeh, A. (2016). Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition*, *32*(3), 315–320. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.09.003>
- Anderson, M. J., Ellingsen, K. E., & McArdle, B. H. (2006). Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecology Letters*, *9*(6), 683–693. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00926.x>
- Archer, J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal behaviour*, *21*(2), 205–235.
- Barros-Santos, T., Silva, K. S. O., Libarino-Santos, M., Cata-Preta, E. G., Reis, H. S., Tamura, E. K., De Oliveira-Lima, A. J., Berro, L. F., Uetanabaro, A. P. T., & Marinho, E. A. V. (2020). Effects of chronic treatment with new strains of *Lactobacillus plantarum* on cognitive, anxiety- And depressive-like behaviors in male mice. *PLoS ONE*, *15*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234037>
- Bayliss, J. A., & Andrews, Z. B. (2013). Ghrelin is neuroprotective in Parkinson's disease: Molecular mechanisms of metabolic neuroprotection. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, *4*(1), 25–36. <https://doi.org/10.1177/2042018813479645>
- Berding, K., & Cryan, J. F. (2022). Microbiota-targeted interventions for mental health. *Current opinion in psychiatry*, *35*(1), 3. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000758>
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. In *International Dairy Journal*, *11*(4-7), 259-274.
- Bezkorovainy, A. (2001). Probiotics: Determinants of survival and growth in the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, *73*(2), 399–405. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.399s>
- Bottari, B., Santarelli, M., Neviani, E., & Gatti, M. (2010). Natural whey starter for Parmigiano Reggiano: Culture-independent approach. *Journal of Applied Microbiology*, *108*(5), 1676–1684. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04564.x>
- Brandl, K., Plitas, G., Schnabl, B., DeMatteo, R. P., & Pamer, E. G. (2007). MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIIIγ and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Experimental Medicine*, *204*(8), 1891–1900. <https://doi.org/10.1084/jem.20070563>
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V, Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., Bienenstock, J., & Cryan, J. F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve Author. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(38), 16050–16055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102999>

- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016a). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Callahan, B. J., Sankaran, K., Fukuyama, J. A., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2016b). Bioconductor workflow for microbiome data analysis: From raw reads to community analyses. *F1000Research*, *5*. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.8986.1>
- Carobrez, A. P., & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *29*(8), 1193–1205. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.017>
- Chen, X., D'Souza, R., & Hong, S. T. (2013). The role of gut microbiota in the gut-brain axis: Current challenges and perspectives. In *Protein and Cell*, *4*, 403-414. Higher Education Press. <https://doi.org/10.1007/s13238-013-3017-x>
- Choi, A. R., Patra, J. K., Kim, W. J., & Kang, S. S. (2018). Antagonistic activities and probiotic potential of lactic acid bacteria derived from a plant-based fermented food. *Frontiers in Microbiology*, *9*(1963). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01963>
- Claesson, M. J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., De Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J. R., Falush, D., Dinan, T., Fitzgerald, G., Stanton, C., Van Sinderen, D., O'Connor, M., Harnedy, N., O'Connor, K., Henry, C., O'Mahony, D., Fitzgerald, A. P., Shanahan, F., ... O'Toole, P. W. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(1), 4586–4591. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000097107>
- Collins, S. M., Surette, M., & Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. In *Nature Reviews Microbiology*, *10*(11), 735-742. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2876>
- Cryan, J. F., & Kaupmann, K. (2005). Don't worry "B" happy!: A role for GABA B receptors in anxiety and depression. In *Trends in Pharmacological Sciences* *26*(1), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.11.004>
- Cryan, J. F., Markou, A., & Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. In *TRENDS in Pharmacological Sciences*, *23*(5). [http://tips.trends.com/0165-6147/02/\\$-see-frontmatter](http://tips.trends.com/0165-6147/02/$-see-frontmatter)
- Cryan, J. F., O, K. J., M Cowan, C. S., Sandhu, K. V, S Bastiaanssen, T. F., Boehme, M., Codagnone, M. G., Cussotto, S., Fulling, C., Golubeva, A. V, Guzzetta, K. E., Jaggar, M., Long-Smith, C. M., Lyte, J. M., Martin, J. A., Molinero-Perez, A., Moloney, G., Morelli, E., Morillas, E., ... Dinan, T. G. (2019). The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev*, *99*, 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018.-The>

- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Lawson, M. A., & Kelley, K. W. (2011). Inflammation-associated depression: From serotonin to kynurenine. In *Psychoneuroendocrinology*, *36*(3), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.09.012>
- Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Kiely, B., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2010). Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience*, *170*(4), 1179–1188. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.005>
- Detke, M. J., Rickels, M., Lucki, I., Rickels, M., & Detke, M. J. (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. In *Psychopharmacology*, *121*, 66-72.
- Dhaliwal, G. K. (2019). *Alistipes*: The influence of a commensal on anxiety and depression. *Catalyst: Facets of Biochemistry and Biomedical Sciences*, *3*(1), 2-10.
- Dinan, T. G., Stanton, C., & Cryan, J. F. (2013). Psychobiotics: A novel class of psychotropic. In *Biological Psychiatry*, *74*(10), 720-726. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.001>
- Dockray, G. J. (2014). Gastrointestinal hormones and the dialogue between gut and brain. *Journal of Physiology*, *592*(14), 2927–2941. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.270850>
- Dong, Z., Shen, X., Hao, Y., Li, J., Li, H., Xu, H., Yin, L., & Kuang, W. (2021). Gut Microbiome: A Potential Indicator for Differential Diagnosis of Major Depressive Disorder and General Anxiety Disorder. *Frontiers in Psychiatry*, *12*, 651536. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.651536>
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., & Lanctôt, K. L. (2010). A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. *Biological Psychiatry*, *67*(5), 446–457. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.033>
- Ducatelle, R., Eeckhaut, V., Haesebrouck, F., & Van Immerseel, F. (2014). A review on prebiotics and probiotics for the control of dysbiosis: Present status and future perspectives. *Animal*, *9*(1), 43–48. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002584>
- Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., M Quigley, E. M., O, G. C., Shanahan, F., & Kevin Collins, J. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. In *Antonie van Leeuwenhoek*, *76*, 279-292.
- Dziarski, R., Park, S. Y., Kashyap, D. R., Dowd, S. E., & Gupta, D. (2016). Pglyrp-Regulated gut microflora *prevotella falsenii*, *parabacteroides distasonis* and *bacteroides eggerthii* enhance and *alisticipes finegoldii* attenuates colitis in mice. *PLoS ONE*, *11*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146162>
- Elfil, M., Kamel, S., Kandil, M., Koo, B. B., & Schaefer, S. M. (2020). Implications of the Gut Microbiome in Parkinson's Disease. In *Movement Disorders*, *35*(6), 921-933. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/mds.28004>

- Engevik, M. A., Luck, B., Visuthranukul, C., Ihekweazu, F. D., Engevik, A. C., Shi, Z., Danhof, H. A., Chang-Graham, A. L., Hall, A., Endres, B. T., Haidacher, S. J., Horvath, T. D., Haag, A. M., Devaraj, S., Garey, K. W., Britton, R. A., Hyser, J. M., Shroyer, N. F., & Versalovic, J. (2021). Human-Derived *Bifidobacterium dentium* Modulates the Mammalian Serotonergic System and Gut–Brain Axis. *CMGH*, *11*(1), 221–248. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.08.002>
- Feehily, C., & Karatzas, K. A. G. (2013). Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. In *Journal of Applied Microbiology*, *114*(1), 11-24.. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05434.x>
- Fernández, S., Fraga, M., Silveyra, E., Trombert, A. N., Rabaza, A., Pla, M., & Zunino, P. (2018). Probiotic properties of native *Lactobacillus* spp. strains for dairy calves. *Beneficial Microbes*, *9*(4), 613–624. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0131>
- Fraga Cotelo, M., Perelmuter Schein, K., Giacaman Salvo, S. S., Zunino Abirad, P. M., & Carro Techera, S. B. (2013). Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from Uruguayan artisan cheese. *Food Science and Technology*, *33*(4), 801–804. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000400029>
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology*, *66*(5), 365-378.
- Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *9*(5), 286-294. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>
- Gao, J., Zhao, L., Cheng, Y., Lei, W., Wang, Y., Liu, X., Zheng, N., Shao, L., Chen, X., Sun, Y., Ling, Z., & Xu, W. (2023). Probiotics for the treatment of depression and its comorbidities: A systemic review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*, 1167116. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1167116>
- García-Legorreta, A., Soriano-Pérez, L. A., Flores-Buendía, A. M., Medina-Campos, O. N., Noriega, L. G., Granados-Portillo, O., Nambo-Venegas, R., Tovar, A. R., Mendoza-Vargas, A., Barrera-Oviedo, D., Pedraza-Chaverri, J., & Palacios-González, B. (2020). Effect of dietary magnesium content on intestinal microbiota of rats. *Nutrients*, *12*(9), 1–11. <https://doi.org/10.3390/nu12092889>
- Gatti, M., Bottari, B., Lazzi, C., Neviani, E., & Mucchetti, G. (2014). Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. In *Journal of Dairy Science*, *97*(2), 573–591. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7187>
- Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2011). Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Frontiers in Physiology*, *2*, 94. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00094>
- Gueimonde, M., Delgado, S., Mayo, B., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., & De Los Reyes-Gavilán, C. G. (2004). Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research International*, *37*(9), 839–850. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.04.006>

- Gueimonde, M., Margolles, A., G. de los Reyes-Gavilán, C., & Salminen, S. (2007). Competitive exclusion of enteropathogens from human intestinal mucus by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile - A preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, *113*(2), 228–232. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.017>
- Guilloux, J. P., Douillard-Guilloux, G., Kota, R., Wang, X., Gardier, A. M., Martinowich, K., Tseng, G. C., Lewis, D. A., & Sibille, E. (2012). Molecular evidence for BDNF-and GABA-related dysfunctions in the amygdala of female subjects with major depression. *Molecular Psychiatry*, *17*(11), 1130–1142. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.113>
- Heidarzadeh-Rad, N., Gökmen-Özel, H., Kazemi, A., Almasi, N., & Djafarian, K. (2020). Effects of a psychobiotic supplement on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressive patients: A post hoc analysis of a randomized clinical trial. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, *26*(4), 486–495. <https://doi.org/10.5056/jnm20079>
- Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The *Lactobacillus casei* group: History and health related applications. In *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2107. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02107>
- Hiraga, K., Ueno, Y., & Oda, K. (2008). Glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*: Activation by ammonium sulfate. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *72*(5), 1299–1306. <https://doi.org/10.1271/bbb.70782>
- Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *science*, *336*(6086), 1268-1273.
- Hooper, L. V., & MacPherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. In *Nature Reviews Immunology* *10*(3), 159–169. <https://doi.org/10.1038/nri2710>
- Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G., & Gordon, J. I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, *291*(5505), 881–884. <https://doi.org/10.1126/science.291.5505.881>
- Huang, C. H., Chang, M. T., Huang, M. C., & Lee, F. L. (2011). Rapid identification of *Lactobacillus plantarum* group using the SNaPshot minisequencing assay. *Systematic and Applied Microbiology*, *34*(8), 586–589. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.02.006>
- INALE. (2017). *Desarrollo de la quesería artesanal en Uruguay*. inale.org/proyectos/desarrollo-de-la-queseria-artesanal-en-uruguay-proyecto-de-reconversion-de-los-generadores-de-vapor-irregulares-a-calderas-de-agua-caliente/. Consultado, 2023.
- Izquierdo, E., Medina, M., Ennahar, S., Marchioni, E., & Sanz, Y. (2008). Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for *Bifidobacterium longum* strains. *Current Microbiology*, *56*(6), 613–618. <https://doi.org/10.1007/s00284-008->

- Johansson, M. E. V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., Hansson, G. C., & Greenberg, E. P. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the national academy of sciences*, *105*(39), 15064-15069. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0803124105
- Kakee, A., Takanaga, H., Terasaki, T., Naito, M., Tsuruo, T., & Sugiyama, Y. (2001). Efflux of a suppressive neurotransmitter, GABA, across the blood–brain barrier. *Journal of neurochemistry*, *79*(1), 110-118.
- Kandpal, M., Indari, O., Baral, B., Jakhmola, S., Tiwari, D., Bhandari, V., Pandey, R. K., Bala, K., Sonawane, A., & Jha, H. C. (2022). Dysbiosis of Gut Microbiota from the Perspective of the Gut–Brain Axis: Role in the Provocation of Neurological Disorders. In *Metabolites*, *12*(11). <https://doi.org/10.3390/metabo12111064>
- Kawee-ai, A., & Seesuriyachan, P. (2019). Optimization of fermented *Perilla frutescens* seeds for enhancement of gamma-aminobutyric acid and bioactive compounds by *Lactobacillus casei* TISTR 1500. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *49*(10), 997–1009. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1650377>
- Kelly, J. R., Allen, A. P., Temko, A., Hutch, W., Kennedy, P. J., Farid, N., Murphy, E., Boylan, G., Bienenstock, J., Cryan, J. F., Clarke, G., & Dinan, T. G. (2017). Lost in translation? The potential psychobiotic *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) fails to modulate stress or cognitive performance in healthy male subjects. *Brain, Behavior, and Immunity*, *61*, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.11.018>
- Ko, C. Y., Lin, H. T. V., & Tsai, G. J. (2013). Gamma-aminobutyric acid production in black soybean milk by *Lactobacillus brevis* FPA 3709 and the antidepressant effect of the fermented product on a forced swimming rat model. *Process Biochemistry*, *48*(4), 559–568. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.021>
- Komatsuzaki, N., Nakamura, T., Kimura, T., & Shima, J. (2008). Characterization of glutamate decarboxylase from a high γ -aminobutyric acid (GABA)-producer, *Lactobacillus paracasei*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *72*(2), 278–285. <https://doi.org/10.1271/bbb.70163>
- Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H., & Kimura, T. (2005). Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiology*, *22*(6), 497–504. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.01.002>
- Kovtun, A. S., Averina, O. V., Angelova, I. Y., Yunes, R. A., Zorkina, Y. A., Morozova, A. Y., Pavlichenko, A. V., Syunyakov, T. S., Karpenko, O. A., Kostyuk, G. P., & Danilenko, V. N. (2022). Alterations of the Composition and Neurometabolic Profile of Human Gut Microbiota in Major Depressive

- Disorder. *Biomedicines*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092162>
- Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. In *Methods in Molecular Biology*, 1916, 69–74. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_4
- Lagos, P., Urbanavicius, J., Scorza, M. C., Miraballes, R., & Torterolo, P. (2011). Depressive-like profile induced by MCH microinjections into the dorsal raphe nucleus evaluated in the forced swim test. *Behavioural Brain Research*, 218(2), 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.10.035>
- Le Leu, R. K., Hu, Y., Brown, I. L., Woodman, R. J., & Young, G. P. (2010). Synbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. *Carcinogenesis*, 31(2), 246–251. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp197>
- Lebeer, S., Verhoeven, T. L. A., Vélez, M. P., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2007). Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 6768–6775. <https://doi.org/10.1128/AEM.01393-07>
- Lebeer, S., Claes, I. J. J., Verhoeven, T. L. A., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2011). Exopolysaccharides of *Lactobacillus rhamnosus* GG form a protective shield against innate immune factors in the intestine. *Microbial Biotechnology*, 4(3), 368–374. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00199.x>
- Lezak KR, Missig G, & Carlezon WA. (2017). Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Translational Research*, 181–191.
- Li, H., Wang, P., Huang, L., Li, P., & Zhang, D. (2019). Effects of regulating gut microbiota on the serotonin metabolism in the chronic unpredictable mild stress rat model. *Neurogastroenterology and Motility*, 31(10). <https://doi.org/10.1111/nmo.13677>
- Logan, A. C., & Katzman, M. (2005). Major depressive disorder: Probiotics may be an adjuvant therapy. *Medical Hypotheses*, 64(3), 533–538. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.08.019>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lozano, J., Fernández-Ciganda, S., González Revello, Á., Hirigoyen, D., Martínez, M., Scorza, C., & Zunino, P. (2022). Probiotic potential of GABA-producing lactobacilli isolated from Uruguayan artisanal cheese starter cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 133(3), 1610–1619. <https://doi.org/10.1111/jam.15664>
- Lucki, I. (1997). The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behavioural pharmacology*, 8(6), 523-532.
- Luczynski, P., Neufeld, K. A. M. V., Oriach, C. S., Clarke, G., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). Growing

- up in a bubble: Using germ-free animals to assess the influence of the gut microbiota on brain and behavior. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 19(8), 1–17. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw020>
- Luscher, B., Shen, Q., & Sahir, N. (2011). The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. In *Molecular Psychiatry* 16(4), 383–406. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.120>
- Lyte, M., Daniels, K. M., & Schmitz-Esser, S. (2019). Fluoxetine-induced alteration of murine gut microbial community structure: Evidence for a microbial endocrinology-based mechanism of action responsible for fluoxetine-induced side effects. *PeerJ*, 2019(1), e6199. <https://doi.org/10.7717/peerj.6199>
- Macpherson, A. J., & Uhr, T. (2004). Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria. *Science*, 303(5664), 1662–1665. <https://doi.org/10.1126/science.1091334>
- Manyevitch, R., Protas, M., Scarpiello, S., Deliso, M., Bass, B., Nanajian, A., Chang, M., Thompson, S. M., Khoury, N., Gonnella, R., Trotz, M., Moore, D. B., Harms, E., Perry, G., Clunes, L., Ortiz, A., Friedrich, J. O., & Murray, I. V. J. (2018). Evaluation of Metabolic and Synaptic Dysfunction Hypotheses of Alzheimer’s Disease (AD): A Meta-Analysis of CSF Markers. *Current Alzheimer Research*, 15(2), 164–181. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170921122458>
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16(3), 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.02.009>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Meng, C., Feng, S., Hao, Z., Dong, C., & Liu, H. (2022). Changes in gut microbiota composition with age and correlations with gut inflammation in rats. *PLoS ONE*, 17(3), e0265430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265430>
- Messaoudi, M., Violle, N., Bisson, J. F., Desor, D., Javelot, H., & Rougeot, C. (2011). Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes*, 2(4). <https://doi.org/10.4161/gmic.2.4.16108>
- Misra, S., & Mohanty, D. (2019). Psychobiotics: A new approach for treating mental illness? In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(8), 1230–1236. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1399860>
- Möhler, H. (2012). The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology*, 62(1), 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.040>
- Montgomery, K. C., & Monkman, J. A. (1955). The relation between fear and exploratory behavior.

- Journal of comparative and physiological psychology, 48(2), 132.
- Morelli, L. (2000a). In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1(2), 59–67.
- Morelli, L. (2000b). Selection of Probiotic Lactobacilli 59 Curr. In *Issues Intest. Microbiol*, 1(2).
- Morgan, A. H., Rees, D. J., Andrews, Z. B., & Davies, J. S. (2018). Ghrelin mediated neuroprotection - A possible therapy for Parkinson's disease? In *Neuropharmacology*, 136, 317-326. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.12.027>
- Morita, H., Toh, H., Oshima, K., Murakami, M., Taylor, T. D., Igimi, S., & Hattori, M. (2009). Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. *Journal of Bacteriology*, 191(24), 7630–7631. <https://doi.org/10.1128/JB.01287-09>
- Ouweland, A. C., Kirjavainen, P., Isolauri, E., & Salminen, S. J. (1999). Adhesion of probiotic strains to human intestinal mucus. *International Dairy Journal*, 9(9), 623-630.
- Parente, F. F., McSweeney, P. L., Cogan, T. M., & Guinee, T. P. (Eds.). (2004). *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Volume 1: General aspects. Elsevier.
- Park, S. H., Lovejoy, K., Grosse, S., De Pra, M., Meding, S., & Steiner, F. (2019). Underivatized amino acid analysis in wine by HILIC separation and mass detection. *Thermo Scientific Application Note*, 73151.
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. In *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1171–1185. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x>
- Patole, S. K., Rao, S. C., Keil, A. D., Nathan, E. A., Doherty, D. A., & Simmer, K. N. (2016). Benefits of bifidobacterium breve M-16V Supplementation in preterm neonates -A retrospective cohort study. *PLoS ONE*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150775>
- Pellow, S., & File, S. E. (1986). Anxiolytic and Anxiogenic Drug Effects on Exploratory Activity in an Elevated Plus-Maze: a Novel Test of Anxiety in the Rat. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 24(3), 525-529.
- Pinna, G., Costa, E., & Guidotti, A. (2009). SSRIs act as selective brain steroidogenic stimulants (SBSSs) at low doses that are inactive on 5-HT reuptake. In *Current Opinion in Pharmacology*, 9(1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.12.006>
- Pinto-Sanchez, M. I., Hall, G. B., Ghajar, K., Nardelli, A., Bolino, C., Lau, J. T., Martin, F. P., Cominetti, O., Welsh, C., Rieder, A., Traynor, J., Gregory, C., De Palma, G., Pigrau, M., Ford, A. C., Macri, J., Berger, B., Bergonzelli, G., Surette, M. G., Bercik, P. (2017). Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 Reduces Depression Scores and Alters Brain Activity: A Pilot Study in Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, 153(2), 448-459.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.05.003>

- Porsolt, R. D., Anton, G., Blavet, N., & Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. In *European Journal of Pharmacology*, 47(4), 379-391.
- Porsolt, R. D., Brossard, G., Hautbois, C., & Roux, S. (2001). Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Current protocols in neuroscience*, 14(1), 8-10.
- Pym, L. J., Cook, S. M., Rosahl, T., McKernan, R. M., & Atack, J. R. (2005). Selective labelling of diazepam-insensitive GABA A receptors in vivo using [3H]Ro 15-4513. *British Journal of Pharmacology*, 146(6), 817–825. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706392>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., ... Zoetendal, E. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Reginensi, S. M., González, M. J., & Bermúdez, J. (2013). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from cow, ewe and goat dairy artisanal farmhouses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 427-430.
- Reid, G., Gadir, A. A., & Dhir, R. (2019). Probiotics: reiterating what they are and what they are not. *Frontiers in microbiology*, 10, 424. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00424>
- Reinheimer, J. A., Quiberoni, A., Tailliez, P., Binetti, A. G., & Sukeza, V. B. (1996). The Lactic Acid Microflora of Natural Whey Starters used in Argentina for Hard Cheese Production. In *ht. Dairy Journal*, 6(8-9), 869-879.
- Reinheimer, J. A., Suarez, V. B., Bailo, N. B., & Zalazar, C. A. (1995). Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for argentinian hard-cheese production. *Journal of Food Protection*, 58(7), 796–799. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.7.796>
- Riaz Rajoka, M. S., Mehwish, H. M., Siddiq, M., Haobin, Z., Zhu, J., Yan, L., Shao, D., Xu, X., & Shi, J. (2017). Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. *LWT*, 84, 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.055>
- Rodgers, R. J., & Dalvi, A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(6), 801-810.
- Salonen, A., Lahti, L., Salojärvi, J., Holtrop, G., Korpela, K., Duncan, S. H., Date, P., Farquharson, F., Johnstone, A. M., Lobley, G. E., Louis, P., Flint, H. J., & De Vos, W. M. (2014). Impact of diet and individual variation on intestinal microbiota composition and fermentation products in obese men. *ISME Journal*, 8(11), 2218–2230. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.63>
- Sarasa, S. B., Mahendran, R., Muthusamy, G., Thankappan, B., Selta, D. R. F., & Angayarkanni, J. (2020). A Brief Review on the Non-protein Amino Acid, Gamma-amino Butyric Acid (GABA): Its Production and Role in Microbes. *Current Microbiology*, 77(4), 534–544.

<https://doi.org/10.1007/s00284-019-01839-w>

- Sarawagi, A., Soni, N. D., & Patel, A. B. (2021). Glutamate and GABA Homeostasis and Neurometabolism in Major Depressive Disorder. In *Frontiers in Psychiatry*, *12*, 637863. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.637863>
- Sarkar, A., Lehto, S. M., Harty, S., Dinan, T. G., Cryan, J. F., & Burnet, P. W. J. (2016a). Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria–Gut–Brain Signals. In *Trends in Neurosciences*, *39*(11), 763–781. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.09.002>
- Schliep, K. P. (2011). phangorn: Phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, *27*(4), 592–593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>
- Schmitz, A. (2016). Benzodiazepine use, misuse, and abuse: A review. In *Mental Health Clinician*, *6*(3), 120–126. <https://doi.org/10.9740/mhc.2016.05.120>
- Schroeder, D. A., Stephens, E., Colgan, D., Hunsinger, M., Rubin, D., & Christopher, M. S. (2018). A Brief Mindfulness-Based Intervention for Primary Care Physicians: A Pilot Randomized Controlled Trial. *American Journal of Lifestyle Medicine*, *12*(1), 83–91. <https://doi.org/10.1177/1559827616629121>
- Selhub, E. M., Logan, A. C., & Bested, A. C. (2014). Fermented foods, microbiota, and mental health: ancient practice meets nutritional psychiatry. *Journal of physiological anthropology*, *33*, 1-12.
- Shan, Y., Man, C. X., Han, X., Li, L., Guo, Y., Deng, Y., Li, T., Zhang, L. W., & Jiang, Y. J. (2015). Evaluation of improved γ -aminobutyric acid production in yogurt using *Lactobacillus plantarum* NDC75017. *Journal of Dairy Science*, *98*(4), 2138–2149. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8698>
- Shen, L., Liu, L., & Ji, H. F. (2017). Regulative effects of curcumin spice administration on gut microbiota and its pharmacological implications. *Food and Nutrition Research*, *61*. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361780>
- Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R., & Gobbetti, M. (2007). Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(22), 7283–7290. <https://doi.org/10.1128/AEM.01064-07>
- Stefanovic, E., Fitzgerald, G., & McAuliffe, O. (2017). Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. In *Food Microbiology*, *61*, 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.08.009>
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. In *Journal of Methods Microbiological Journal of Microbiological Methods*, *40*(2), 175-179.
- Stilling, R. M., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbial genes, brain & behaviour - epigenetic regulation of the gut-brain axis. *Genes, Brain and Behavior*, *13*(1), 69–86. <https://doi.org/10.1111/gbb.12109>

- Su, M. S., Schlicht, S., & Gänzle, M. G. (2011, December). Contribution of glutamate decarboxylase in *Lactobacillus reuteri* to acid resistance and persistence in sourdough fermentation. *Microbial Cell Factories*, *10*, 1-12.
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X. N., Kubo, C., & Koga, Y. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *Journal of Physiology*, *558*(1), 263–275. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388>
- Sugimura, Y., Hagi, T., & Hoshino, T. (2011). Correlation between in vitro mucus adhesion and the in vivo colonization ability of lactic acid bacteria: Screening of new candidate carp probiotics. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *75*(3), 511–515. <https://doi.org/10.1271/bbb.100732>
- Sun, X., Zhang, H. F., Ma, C. L., Wei, H., Li, B. M., & Luo, J. (2021). Alleviation of Anxiety/Depressive-Like Behaviors and Improvement of Cognitive Functions by *Lactobacillus plantarum* WLPL04 in Chronically Stressed Mice. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, *2021*. <https://doi.org/10.1155/2021/6613903>
- Takada, T., Kurakawa, T., Tsuji, H., & Nomoto, K. (2013). *Fusicatenibacter saccharivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *63*(Pt_10), 3691–3696. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.045823-0>
- Teixeira, J. S., Seeras, A., Sanchez-Maldonado, A. F., Zhang, C., Su, M. S. W., & Gänzle, M. G. (2014). Glutamine, glutamate, and arginine-based acid resistance in *Lactobacillus reuteri*. *Food Microbiology*, *42*, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.015>
- Temel, Y., Boothman, L. J., Blokland, A., Magill, P. J., M Steinbusch, H. W., Visser-Vandewalle, V., & Sharp, T. (2007). Inhibition of 5-HT neuron activity and induction of depressive-like behavior by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(43), 17087-17092.
- Tillisch, K., Labus, J., Kilpatrick, L., Jiang, Z., Stains, J., Ebrat, B., Guyonnet, D., Legrain-Raspaud, S., Trotin, B., Naliboff, B., & Mayer, E. A. (2013). Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology*, *144*(7). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.02.043>
- Tillmann, S., & Wegener, G. (2018). Syringe-feeding as a novel delivery method for accurate individual dosing of probiotics in rats. *Beneficial Microbes*, *9*(2), 311–315. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0127>
- van Tassel, M. L., & Miller, M. J. (2011). *Lactobacillus* adhesion to mucus. In *Nutrients*, *3*(5), 613-636. <https://doi.org/10.3390/nu3050613>
- Vázquez Zeballos, S. E. (2014). Identificación y caracterización de un aislamiento nativo del género *Lactobacillus* con propiedades probióticas y su potencial uso en la industria láctea. Maestría en

- Vinderola, G., Gueimonde, M., Gomez-Gallego, C., Delfederico, L., & Salminen, S. (2017). Correlation between in vitro and in vivo assays in selection of probiotics from traditional species of bacteria. In *Trends in Food Science and Technology*, 68, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.005>
- Wall, R., Cryan, J. F., Paul Ross, R., Fitzgerald, G. F., Dinan, T. G., & Stanton, C. (2014). Bacterial neuroactive compounds produced by psychobiotics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 817, 221–239. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_10
- Wang, H., Braun, C., Murphy, E. F., & Enck, P. (2019). *Bifidobacterium longum* 1714™ Strain Modulates Brain Activity of Healthy Volunteers during Social Stress. *American Journal of Gastroenterology*, 114(7), 1152–1162. <https://doi.org/10.14309/ajg.000000000000203>
- Wang, Y., Liang, Q., Lu, B., Shen, H., Liu, S., Shi, Y., Leptihn, S., Li, H., Wei, J., Liu, C., Xiao, H., Zheng, X., Liu, C., & Chen, H. (2021). Whole-genome analysis of probiotic product isolates reveals the presence of genes related to antimicrobial resistance, virulence factors, and toxic metabolites, posing potential health risks. *BMC Genomics*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07539-9>
- Weiss, S. M., Wadsworth, G., Fletcher, A., & Dourish, C. T. (1998). Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23(2), 265-271.
- Wessels, S., Axelsson, L., Bech Hansen, E., De Vuyst, L., Laulund, S., Lähteenmäki, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S., & Von Wright, A. (2004). The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. In *Trends in Food Science and Technology*, 15(10), 498–505. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.03.003>
- Wright, E. S. (2015). DECIPHER: Harnessing local sequence context to improve protein multiple sequence alignment. *BMC Bioinformatics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0749-z>
- Wu, C. H., Hsueh, Y. H., Kuo, J. M., & Liu, S. J. (2018). Characterization of a potential probiotic lactobacillus brevis RK03 and efficient production of γ -aminobutyric acid in batch fermentation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010143>
- Wu, Q., & Shah, N. P. (2015). Gas release-based prescreening combined with reversed-phase HPLC quantitation for efficient selection of high- γ -aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 98(2), 790–797. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8808>
- Xu, F., Cheng, Y., Ruan, G., Fan, L., Tian, Y., Xiao, Z., Chen, D., & Wei, Y. (2021). New pathway ameliorating ulcerative colitis: focus on *Roseburia intestinalis* and the gut–brain axis. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 14. <https://doi.org/10.1177/17562848211004469>
- Yunes, R. A., Poluektova, E. U., Vasileva, E. V., Odorskaya, M. V., Marsova, M. V., Kovalev, G. I., &

- Danilenko, V. N. (2020). A Multi-strain Potential Probiotic Formulation of GABA-Producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with Antidepressant Effects. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *12*(3), 973–979. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09601-1>
- Zhang, H., Dibaise, J. K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y., Parameswaran, P., Crowell, M. D., Wing, R., Rittmann, B. E., & Krajmalnik-Brown, R. (2008). *Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(7), 2365-2370.
- Zhao, L., Li, D., Bimal, C., Li, C., Zhang, N., Zhang, S., Wang, X., Wang, M., Tian, H., & Luo, Y. (2023). Study on *Lactiplantibacillus plantarum* R6-3 from Sayram Kettek to prevents chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice through microbe-gut-brain axis. *Food & Function*, *14*(7), 3304-3318. <https://doi.org/10.1039/d2fo03708d>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhuang, Z., Yang, R., Wang, W., Qi, L., & Huang, T. (2020). Associations between gut microbiota and Alzheimer's disease, major depressive disorder, and schizophrenia. *Journal of Neuroinflammation*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01961-8>