



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE UNA
BEBIDA FERMENTADA DE ORIGEN MAYA, PARA SU POSIBLE EMPLEO COMO
PROBIÓTICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

GUADALUPE LILIANA FLORES CAMPUZANO



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARÍA MERCEDES PALAO RINCÓN

VOCAL: AURORA IRMA ORTEGA ÁVILA

SECRETARIO: DRA. NORMA LETICIA RAMÍREZ CHAVARÍN

1er. SUPLENTE: DRA. GLORIA DÍAZ RUIZ

2° SUPLENTE: DR. JORGE ARTURO ABURTO ANELL

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 36 DE INVESTIGACIÓN BÁSICA,
UNIDAD DE POSGRADO DE MEDICINA.**

DRA. NORMA LETICIA RAMÍREZ CHAVARÍN
ASESORA

DR. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS
ASESOR TÉCNICO

GUADALUPE LILIANA FLORES CAMPUZANO
SUSTENTANTE

ÍNDICE

1 RESUMEN.....	1
2 INTRODUCCIÓN.....	2
3 ANTECEDENTES.....	3
3.1 Características de bacterias ácido lácticas.....	3
3.2 Clasificación de bacterias ácido lácticas.....	3
3.3 Producción de metabolitos.....	5
3.3.1 Ácidos orgánicos.....	5
3.3.2 Bacteriocinas.....	5
3.3.3 Diacético (2,3 butanodiona).....	5
3.3.4 Peróxido de hidrógeno.....	6
3.3.5 Reuterina.....	6
3.4 Aplicación de bacterias ácido lácticas en alimentos.....	6
3.5 Probióticos.....	7
3.5.1 Microorganismos utilizados como probióticos.....	8
3.5.2 Mecanismos de acción.....	9
3.5.2.1 Interacción de los probióticos con la microbiota intestinal... 10	
3.5.2.2 Mejora de la función de la barrera intestinal..... 10	
3.5.2.3 Modulación de la respuesta inmune..... 10	
3.6 Estructuras relacionadas con la adherencia.....	11
3.6.1 Fimbrias.....	11
3.6.2 Adhesinas.....	11
3.6.3 Integrinas.....	12
3.6.4 Selectinas.....	12
3.6.5 Moléculas de adhesión intercelular (ICAMs).....	13
3.6.6 Unión por ácidos lipoteicoicos (ALT).....	13
3.6.7 Unión mediadas por glucanos.....	14
3.7 Pozol.....	14
3.7.1 Definición.....	14
3.7.2 Elaboración.....	14
3.7.3 Beneficios que se le atribuyen al pozol.....	15
3.8 Estreptococos.....	15

3.8.1	Morfología.....	16
3.8.2	Estructuras antigénicas.....	16
3.8.2.1	Proteína M.....	17
3.8.2.2	Proteína T y R.....	17
3.8.2.3	Factor de opacidad.....	17
3.8.3	Toxinas y enzimas.....	18
3.8.3.1	Toxinas eritrogénicas.....	18
3.8.3.2	Estreptolisina S y O.....	18
3.8.3.3	Hialuronidasa.....	18
3.8.3.4	Estreptodornasa.....	18
3.8.4	Clasificación de los estreptococos.....	19
4	JUSTIFICACIÓN.....	20
5	OBJETIVOS.....	21
5.1	Objetivo general.....	21
5.2	Objetivos específicos.....	21
6	HIPÓTESIS.....	21
7	METODOLOGÍA.....	22
8	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
8.1	Material biológico.....	23
8.2	Recuperación de cepas.....	23
8.3	Adherencia a células epiteliales.....	23
8.3.1	Obtención de a suspensión bacteriana.....	23
8.3.2	Preparación de las células.....	24
8.3.3	Preparación de la microplaca.....	24
8.3.4	Ensayo de adherencia.....	24
8.4	Microscopía electrónica de barrido.....	25
8.4.1	Obtención de la muestra.....	25
8.4.2	Técnica de microscopía electrónica de barrido.....	25
8.5	Detección de genes asociados a la virulencia.....	26
8.5.1	Gen emm (Proteína M).....	26
8.5.2	Gen speA (Toxina eritrogénica).....	27
8.5.3	Gen speC (Toxina eritrogénica).....	27

8.5.4	Gen sic (Proteína inhibidora del complemento).....	27
8.5.5	Gen sof (Factor de opacidad).....	27
9	RESULTADOS.....	28
9.1	Adherencia a células epiteliales.....	28
9.2	Microscopía electrónica de barrido.....	33
9.3	Genes de virulencia.....	35
10	DISCUSIÓN.....	36
10.1	Adherencia a células epiteliales.....	36
10.2	Microscopía electrónica de barrido.....	38
10.3	Genes de virulencia.....	39
11	CONCLUSIONES.....	41
12	REFERENCIAS.....	42
13	ANEXO.....	48
13.1	Medios de cultivo y soluciones.....	48
13.1.1	Caldo APT.....	48
13.1.2	Medio MEM.....	48
13.1.3	Puks.....	49
13.1.4	PBS 1X.....	49
13.1.5	Colorante Giemsa.....	49
13.1.6	Medio MRS.....	50
13.1.7	Agarosa 0.7%.....	50

1. RESUMEN

El pozol es una bebida fermentada de maíz que se consume principalmente en el Sureste de México. En la fermentación del pozol participa una microbiota natural constituida por diferentes bacterias, mohos y levaduras. Un microorganismo para ser considerado como probiótico debe cumplir con ciertas características como son tolerancia a pHs ácidos, bilis y capacidad para adherirse a células epiteliales por mencionar algunas. En el presente trabajo se estudió la caracterización de cepas de *Streptococcus sp* aisladas del pozol para su empleo como posible probiótico.

Se realizaron ensayos de adherencia utilizando las líneas celulares HEP-2 (Carcinoma faríngeo), HeLa (Carcinoma de cérvix), HT-29 (Adenocarcinoma de colon humano) y Caco-2 (Carcinoma de colon humano) a 35 cepas de *Streptococcus sp.* Los resultados mostraron que 89% de las cepas eran adherentes en por lo menos una línea celular (HEP-2 37 %; HeLa 29 %; HT-29 40 %; y Caco-2 69 %), además se observó que cuatro de las cepas eran adherentes a las cuatro líneas celulares. El análisis fenotípico mostró la presencia de patrones de adherencia difusa y agregativa similares a los descritos en *Escherichia coli*. La presencia de estructuras fimbriales se analizó por microscopía electrónica de barrido, en estas se observó la formación de una matriz que probablemente corresponda a la formación de exo-polisacáridos y prolongaciones entre las bacterias. En los aislados se analizó por ensayo de PCR la presencia de los genes *emm* (Proteína M), *SpeA / SpeC* (toxina eritrogénica), *sic* (proteína inhibidora del complemento) y *sof* (factor de opacidad), los resultados al respecto fueron negativos para todos los genes.

Se concluye que un porcentaje alto de las cepas fueron adherentes a las diferentes líneas celulares y que la adherencia puede estar relacionada con estructuras que pueden ser fimbrias y/o polisacáridos. Se identificó que las cepas no presentan genes relacionados con la virulencia de *Streptococcus*.

2. INTRODUCCIÓN

El consumo de bebidas con microorganismos probióticos, se ha incrementado por el beneficio que tienen para mejorar la salud. En la época prehispánica el pozol fue muy apreciado entre los antiguos habitantes por ser un nutriente que confería resistencia a los viajeros indígenas. El hecho de que esta masa se usaba para combatir diferentes padecimientos como es el caso de las diarreas, sugería que su microbiota pudiera contener microorganismos probióticos. Estudios preliminares, mostraron que entre los integrantes de la microbiota del pozol se encontraban bacterias ácido lácticas (BAL) y entre éstas el 25 y 75% son especies integrantes del género *Streptococcus*.

Para que un microorganismo pueda ser considerado como probiótico debe cumplir con ciertas características fisiológicas como son tolerancia a pHs ácidos, a la bilis y la capacidad para adherirse a células epiteliales por mencionar algunas. No obstante, la adherencia a la mucosa intestinal es una de las principales características para ser evaluadas como probióticos. Para tal efecto las bacterias producen una amplia gama de estructuras de superficie, incluyendo fimbrias que son estructuras proteicas que reconocen receptores (carbohidratos) a nivel de epitelio y/o mucosa. Sin embargo, aunque las propiedades adhesivas de bacterias Gram-negativas han sido ampliamente estudiadas, la información disponible sobre la capacidad adherente de bacterias Gram-positivas es limitada. Ante esta situación resulta relevante realizar estudios que permitan evaluar las propiedades de adherencia y las estructuras que intervienen en las bacterias Gram-positivas.

3. ANTECEDENTES

3.1 Características de bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. Son cocos o bacilos Gram-positivos, no esporuladas, no móviles, microaerofilicos, su reacción a la oxidasa y catalasa son negativas y producen ácido láctico como el principal producto de la fermentación de carbohidratos. Las BAL son ácido tolerantes, su pH de crecimiento se encuentra entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios en donde otras bacterias no soportarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos (Carr y col., 2002; Vázquez y col., 2009).

3.2 Clasificación de bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas se clasifican por características como la morfología, vías de fermentación de la glucosa, crecimiento a diferentes temperaturas, capacidad para crecer a elevadas concentraciones de sal y tolerancia acida o alcalina. En la naturaleza los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagacoccus* y *Weisella* (Axelsson, 1998; Carr y col., 2002) son los más importantes en este grupo de bacterias. Los acercamientos más recientes en la taxonomía bacteriana comenzaron basándose en estas características. Posteriormente, se amplió al incluir la composición de la pared celular, ácidos grasos celulares, quinonas y algunas otras características de las células. La clasificación aún permanece indefinida y es el centro de numerosos estudios taxonómicos que involucran ahora características filogenéticas y fenotipos de las bacterias lácticas (Stiles y Holzapfel, 1997). La diferencia destacada entre los grupos de

las bacterias ácido lácticas está entre los productos formados durante la fermentación de azúcares como homofermentativas o heterofermentativas (Figura 1).

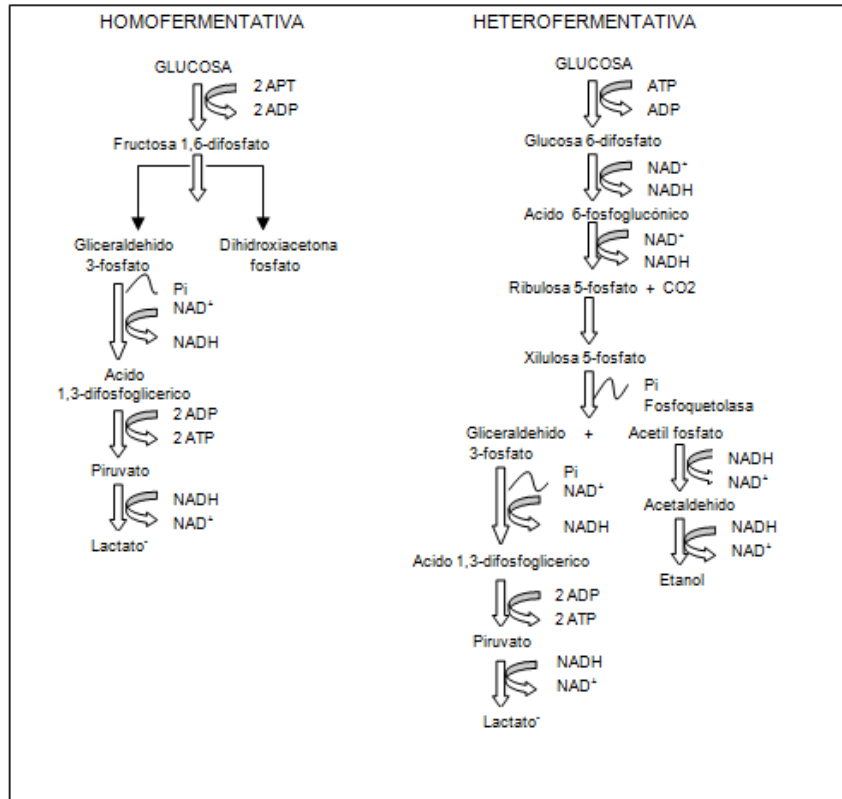


Figura 1. Fermentación de la glucosa en bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas (Madigan y col., 1999).

Las homofermentativas como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus*, poseen la enzima aldosa y producen ácido láctico como el producto principal de la fermentación de la glucosa utilizando la vía de la glucólisis (Embden-Meyerhof) (Axelsson, 1998). Mientras que, las especies del género *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunos *Lactobacillus* son heterofermentativas y convierten hexosas a pentosas, produciendo ácido láctico y otros productos como acetato, etanol y CO₂ (Carr y col., 2000).

3.3 Producción de metabolitos

Las bacterias lácticas convierten los azúcares en ácidos orgánicos, lo que hace que disminuya el pH. Sin embargo, se reconoce que estas bacterias son capaces de producir una variedad de sustancias antimicrobianas de bajo peso molecular que incluyen: ácidos orgánicos, bacteriocinas, diacetilo, peróxido de hidrógeno y reuterina (Niitynen y col., 2009).

3.3.1 Ácidos orgánicos

La reducción de pH es el principal mecanismo de antagonismo microbiano, las bacterias lácticas fermentan los carbohidratos por diferentes vías metabólicas y durante ese proceso se obtienen ácidos orgánicos principalmente ácido láctico y acético. Los ácidos orgánicos contribuyen al desarrollo del sabor, aroma y textura de los alimentos, pero también a su estabilidad mediante la inhibición de microorganismos deteriorantes (Vázquez y col., 2009).

3.3.2 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son estructuras tipo péptido o proteína biológicamente activas, las cuales presentan acción bactericida sobre receptores específicos de las células; además, la composición química de estas sustancias es muy variada y su modo de acción específico (Vázquez y col., 2009). Las bacteriocinas que producen las BAL han sido estudiadas por su actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* *Clostridium botulinum* y *Salmonella spp.*, entre otras (Holo y col., 2001 Vázquez y col., 2009).

3.3.3 Diacetilo (2,3 Butanodiona)

El diacetilo es un producto del metabolismo final de las bacterias lácticas sintetizado a partir del piruvato. Es reconocido por su actividad antimicrobiana conociéndose por su aroma a mantequilla. Es inhibitorio a

niveles de 200 µg/mL para levaduras y bacterias Gram-negativas y 300 µg/mL para bacterias lácticas Gram-positivas. Su utilidad como conservador es limitada porque se necesitan grandes cantidades para su uso como tal. La utilización del diacetilo es como líquido antimicrobiano para utensilios y superficie de trabajo debido a su volatilidad (Lebeer y col., 2008; De Vuyst y Vandame, 1994).

3.3.4 Peróxido de Hidrógeno

En presencia de oxígeno, las BAL pueden producir peróxido de hidrógeno, el cual genera radicales hidroxí que causan peroxidación a los lípidos de la membrana y susceptibilidad de la célula microbiana de muchos microorganismos (Ouwehand, 1999).

3.3.5 Reuterina

Productos de bajo peso molecular, altamente soluble, producido por una especie heterofermentativa (*Lactobacillus reuteri*), este metabolito muestra amplio espectro antimicrobiano, siendo activo contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras, hongos y protozoos. Se ha propuesto la reuterina para aplicarse en la conservación de alimentos (Helander y col., 1997).

3.4 Aplicación de bacterias lácticas en alimentos

Los alimentos fermentados son definidos como aquellos alimentos que han sido modificados por una vía deseada y por la actividad de microorganismos o enzimas. Estos alimentos son productos que se preparan a partir de materia cruda o tratada térmicamente y que, mediante un proceso en el cual se incluyen microorganismos específicos que adquieren propiedades sensoriales como: sabor, aroma, apariencia general y textura. Además, con vida de anaquel larga y seguridad higiénica mayor (Messens y De Vuyst, 2002; Schneider y col., 2006). La fermentación ácido láctica es uno de los métodos más antiguos para preservar alimentos. Es un proceso microbiano muy complejo en el cual una población de bacterias lácticas llega a ser la

microbiota predominante (Shirai y col., 1996; García y col., 1998; Schneider y col., 2006). No obstante, el uso de BAL también se utiliza en el procesamiento de lácteos, carnes, bebidas alcohólicas y vegetales para obtener productos tales como salchichas, jamones curados, vinos, cerveza, licores fortificados, aceitunas, encurtidos y col agria, entre otros.

3.5 Probióticos

La definición más completa y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la FAO de los probióticos señala que son microorganismos vivos que al ser suministrados en cantidades adecuadas promueven beneficios a la salud del organismo huésped. Para que un organismo sea evaluado como probiótico se requiere que cumplan con las características que se muestran en la Figura 2. La eficacia de los probióticos en la salud humana requiere de la identificación de los microorganismos a nivel de cepa, debido a que los efectos saludables demostrados para una cepa microbiana específica no son extrapolables o atribuibles a otras cepas de la misma especie.



Figura 2. Propiedades de bacterias probióticas (Castro y De Rovetto, 2006).

La viabilidad de los microorganismos probióticos en los productos donde se incorporan, es relevante durante la selección de cepas probióticas, las cuales deben mostrar un buen crecimiento a las condiciones de procesado y almacenamiento. El requisito de viabilidad de los probióticos implica en cierto modo que cuando estos microorganismos son ingeridos deberían sobrevivir al paso por el tracto gastrointestinal y, en cierta medida, mantener activa su capacidad para interactuar con el epitelio o la microbiota intestinal, según su mecanismo de acción. Aunque los probióticos no sean colonizadores del tracto gastrointestinal, sí es importante que puedan mantenerse funcionalmente activos en el intestino. Los procedimientos para evaluar estos requisitos han sido aportados por diversos investigadores y entre ellas destacan la capacidad para adherirse al epitelio gastrointestinal para reducir o prevenir la colonización por patógenos (Bernet y col., 1994; Sarem-Damjerdii y col., 1995; Kirjavainen y col., 1998; Ouwehand y col., 1999; Reid y Bokong, 2003; Collado y col., 2009) y la adhesión a células en cultivo como Caco-2 (Crociani y Ballongue, 1995; Crociani y col., 1995; Sarem-Damjerdii y col., 1995), crecimiento competitivo (Holzapfel y col., 1998), producción de metabolitos que inhiben microorganismos patógenos (Reid y Burton, 2003). El uso reciente de BAL genéticamente modificadas (GM-BAL) ha tenido la finalidad de mejorar la calidad, el aroma y la textura de productos alimentarios tales como el suero de la leche o el yogurt (Collado, 2009)

3.5.1 Microorganismos utilizados como probióticos

En el mundo se reconocen más de 20 especies diferentes de microorganismos probióticos, los cuales pueden ser aislado de diferentes fuentes: del tracto intestinal humano y de animales, carnes, frutas y vegetales fermentados, entre otros (Gilliland, 1990; Barboza y col., 2004). La mayoría de estos microorganismos pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas y son utilizadas por la industria alimentaria para la elaboración de productos fermentados, predominando los géneros *Lactobacillus* y *bifidobacterium* (Tabla1). (Barboza y col., 2004; Ogueke, 2010).

Tabla 1. Microorganismos empleados como probióticos y (Modificado de Álvarez-Olmos Oberhelman, 2001)

<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Lactococcus spp.</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. lacto</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>L. lacto</i>	<i>B. longum</i>	<i>L. cremoris</i>	
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. breve</i>	<i>L. diacetylactis</i>	
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. lactis/animalis</i>		
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>		
<i>L. kefri</i>			
<i>L. brevis</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. helveticus</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. salivarius</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Otras especies</i>	
<i>E. faecium</i>	<i>B. subtiles</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>E. faecalis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>	
		<i>Leuconostoc spp.</i>	

En el mercado existe gran variedad de productos probióticos que pueden venir en diferentes presentaciones, una de ellas son las leches fermentadas, siendo el yogurt la más usual. También pueden ser presentados en forma de tabletas, cápsulas, polvos o sobrecitos conteniendo la bacteria en forma liofilizada y en algunos productos cárnicos y cereales (Barboza y col., 2004; Ogueke y col., 2010).

3.5.2 Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción que permitan explicar los posibles efectos benéficos de los probióticos sobre la salud, es uno de los aspectos más dinámicos en la investigación sobre estos microorganismos. Sin embargo, debe subrayarse el carácter multifactorial de estos mecanismos de acción ya que no todos los probióticos emplean los mismos para ejercer un beneficio en el hospedador (Hart y col., 2009).

3.5.2.1 Interacción de los probióticos con la microbiota intestinal

La microbiota del intestino humano es un ecosistema complejo en la cantidad y variedad de microorganismos. Entre las funciones de la microbiota intestinal cabe destacar: (1) La capacidad metabólica, que incluyen degradación de material no digerible de la dieta y regulación del almacenamiento de energía, (2) La protección frente a agentes infecciosos y a la proliferación de especies microbianas con potencial patógeno y (3) La diferenciación del epitelio intestinal y modulación del sistema inmune. Por lo tanto, los probióticos pueden ejercer efectos beneficiosos en la salud modulando la composición de la microbiota intestinal (Dobson y col., 2012).

3.5.2.2 Mejora de la función de la barrera intestinal

La función de barrera intestinal es un mecanismo de defensa que permite mantener la integridad del epitelio intestinal, protegiendo así al organismo frente a la acción de agresiones externas. La pérdida de la integridad de la barrera epitelial puede desencadenar desórdenes como la enfermedad inflamatoria intestinal, infecciones entéricas, enfermedad celiaca y algunas enfermedades autoinmunes. Ciertos probióticos han demostrado ser capaces de contribuir al mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, así como para prevenir y reparar daños en la mucosa causados por distintos agentes como alérgenos presentes en los alimentos, microorganismos patógenos y citoquinas proinflamatorias. Los mecanismos de acción implicados en este beneficio incluyen la secreción de mucina, la modulación de la fosforilación de proteínas y el aumento de la resistencia transepitelial (Ohland y col., 2010).

3.5.2.3 Modulación de la respuesta inmune

Los probióticos poseen un amplio espectro de efectos inmunomoduladores ya que son capaces de actuar sobre la inmunidad innata y la adquirida o específica, pudiendo proteger al hospedador frente a infecciones y procesos de inflamación intestinal crónica. Las células epiteliales y las células del

sistema inmune innato poseen receptores celulares capaces de discriminar entre la microbiota comensal y la patógena, induciendo la síntesis de distintos mediadores de la respuesta inmune innata y de adecuadas respuestas adaptativas destinadas a combatir a los patógenos (Werner y Haller, 2007). En otras situaciones patológicas, los probióticos pueden actuar estimulando la respuesta inmunitaria antígeno-específica en situaciones de sensibilización a antígenos (alergias) o bien ejercer efectos intestinales claramente antiinflamatorios.

3.6 Estructuras relacionadas con la adherencia

Las moléculas de adhesión son receptores de membrana que intervienen en diversas funciones relacionadas con el tráfico celular, interacciones entre células y la adhesión de células a la matriz extracelular. Entre las cuales se encuentran: fimbrias, adhesinas, integrinas, selectinas, moléculas de adhesión intercelular (ICAMs), unión por ácidos lipoteicoicos (ALT) y uniones mediadas por glucanos.

3.6.1 Fimbrias

Son apéndices que consisten de subunidades de proteínas que están ancladas ya sea en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, o en la pared celular de las bacterias Gram-positivas. Las fimbrias pueden ser rígidas o flexibles. La función principal de las fimbrias es servir como soporte de las adhesinas, encargadas de reconocer a su receptor en la célula hospedera (Koneman y Allen, 2008).

3.6.2 Adhesinas

Las adhesinas son, por lo general lectinas (proteínas que tienen afinidad por los azúcares) y su función es la adherencia. La mayoría de las bacterias expresan más de un tipo de adhesinas. En algunos casos, la fimbria posee dos o más adhesinas distintas para dos o más receptores diferentes y se les llaman adhesinas fimbriales. Las adhesinas que no están en fimbrias son denominadas adhesinas afimbriales y algunos ejemplos son: proteínas de

membrana externa de las bacterias Gram-negativas, ácidos lipoteicoicos de bacterias Gram-positivas, glucocálix, proteínas F y M de *Streptococcus* sp. y tienen como función unirse en forma estrecha a la célula hospedera (Hillis y Flapan, 2000).

3.6.3 Integrinas

Se trata de receptores glucoproteícos compuestos por dos subunidades, denominadas cadenas α y β . Como su nombre lo sugiere, facilitan la integración celular al medio circundante mediante la adhesión de diferentes células entre sí, y entre células y la matriz extracelular, pudiendo generar diversas señales intracelulares. A diferencia de otros receptores, poseen muy baja afinidad por sus ligandos y se encuentran presentes en un número mayor. Estas características constituyen la base del efecto velcro, que permite a las células adherirse débil pero simultáneamente a un gran número de moléculas de la matriz extracelular, logrando de este modo “explorar” su medio ambiente sin perder totalmente su afinidad con el mismo (Hillis y Flapan, 2000).

3.6.4 Selectinas

Son receptores de adhesión que se caracterizan por poseer una estructura muy conservada, la cual incluye un dominio tipo lectina, un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico, dos o más dominios tipo proteína reguladora del complemento, una región transmembranal y una región intracitoplasmica corta en el extremo carboxilo terminal. Se han identificado a tres miembros de esta familia, los cuales corresponden a los antígenos de diferenciación leucocitaria CD62L (L-selectina), CD62P (P-selectina) y CD62E (E-selectina); estas tres moléculas reconocen y se unen, a través de su dominio tipo lectina, a diversos oligosacáridos, los cuales están usualmente conjugados con proteínas transmembranales (Jaitovich y Jaim, 2004).

3.6.5 Moléculas de adhesión intercelular (ICAMs)

Las moléculas de adhesión intercelular involucradas en la interacción leucocito-endotelio, corresponden a glicoproteínas que poseen dos (ICAM-2) o cinco (ICAM-1) dominios tipo inmunoglobulina, una región transmembranal y una porción intracitoplásmica corta. Los dos dominios más extracelulares son, los que determinan la interacción del ICAM-1 y -2 con la integrina leucocitaria LFA-1 (α_L/β_2), en tanto que la interacción del ICAM-1 con el heterodímero α_M/β_2 parece estar mediada por el tercer dominio de esta molécula. La porción intracelular de las moléculas de adhesión intercelular posee residuos de serina, treonina y tirosina, los cuales son fosforilados durante la activación celular. Al igual que en el caso de las integrinas, los ICAMs están asociados al citoesqueleto y participan, al interaccionar con su ligando, en la generación de señales intracelulares de activación (Adams y Shaw, 1995).

3.6.6 Unión por ácidos lipoteicoicos (ALT)

El ácido lipoteicoico es un componente único de la pared celular de las bacterias Gram-positivas, es un polímero de glicerolfosfato que contiene azúcar y dos grupos acilo, estos últimos le confieren la propiedad de anclarse en la membrana celular. El ALT también se ha identificado como el responsable de la hidrofobicidad de la superficie en los *Streptococcus* del grupo A, en los cuales participa en la adherencia de la bacteria a la fibronectina en la superficie de células epiteliales, así como la adherencia de los *Staphylococcus saprophyticus* a las células uroepiteliales, en *Staphylococcus epidermidis* a los coágulos de fibrina-plaquetas y en *Staphylococcus aureus* con las células de mucosas, epiteliales y mesoepiteliales (Carruthers y Kabat, 1983).

3.6.7 Uniones mediadas por glucanos

Los variados grados de ramificación del glucano y el predominio de enlaces alfa (1-3), ocasionan que este polisacárido presente alto grado de adhesividad. De esta forma, los glucanos adhesivos median la unión de las bacterias a la superficie del diente, así como a otras bacterias. Por lo tanto, promueven la adherencia y co-adherencia, así como la permanencia y maduración de la placa dental. Constituyen así elementos críticos en el incremento de las proporciones del *S. mutans* en la placa y de su cariogenicidad, es decir, su capacidad de producir caries dental (Banas y Vickerman, 2003).

3.7 Pozol

Las bebidas fermentadas han sido de gran importancia en la vida diaria y ceremonial de numerosos grupos indígenas de México desde la época prehispánica hasta la actualidad. Los alimentos o bebidas fermentadas son aquellos en que una etapa esencial de su procesamiento se debe al crecimiento y la actividad de microorganismos (hay fermentaciones lácticas, acéticas, alcohólicas y mixtas, entre otras). Entre las bebidas y alimentos fermentados autóctonos de México no alcohólicos de origen prehispánico, el más importante es el pozol.

3.7.1 Definición

Es una bebida fermentada de maíz, no alcohólica, ácida y refrescante, de origen maya, en algunos grupos étnicos es considerado como alimento básico (Wacher y col., 1993).

3.7.2 Elaboración

Los granos de maíz se hierven en agua con cal. El maíz cocido, llamado nixtamal se escurre y se lava con agua limpia. El nixtamal limpio se muele en metate o en molino hasta obtener una masa con la que se hacen bolas que se envuelven en hojas de plátano para mantener la humedad. En esta forma, se deja reposar por varios días para que se lleve a cabo la fermentación (1 a

30 días). Una vez fermentada la masa, se bate en agua y se bebe. La bebida puede ser adicionada de sal, azúcar, miel y chiles, modificaciones que se realizan principalmente en el pozol mestizo. Para asegurar la calidad de esta bebida, existe una opinión entre los productores y consumidores tanto mestizos como indígenas, de que el pozol descompuesto es aquel que “hace hilos” y consideran que esto puede deberse a un agriado no natural. Esto podría deberse al desarrollo de bacterias productoras de polímeros, entre las cuales se encuentran algunas bacterias lácticas de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y otras del género *Bacillus* (Cañas y col., 1993).

3.7.3 Beneficios que se le atribuyen al pozol

El pozol no solo es utilizado como una bebida refrescante, algunas personas lo usan como provisión para largos viajes, también es utilizado con fines medicinales como controlar diarreas o para reducir la fiebre. Los mayas preparaban cataplasmas de pozol enmohecido para curar infecciones superficiales, de igual manera lo utilizaban como ofrenda en ceremonias relacionadas con el cultivo y la cosecha de maíz (Wacher, 1993).

3.8 Streptococos

En la caracterización de la microbiota del pozol se identificó en diferentes estudios, que entre 25 y 75% de la misma está constituida por bacterias del género *Streptococcus*, un estudio previo del grupo de trabajo en el que se realizó la caracterización de las bacterias se identificó que correspondían a *Streptococcus bovis infantarium*. El hecho de que estas bacterias pertenecen a las BAL, plantea su posible función en los eventos de la fermentación de la bebida (pozol). Ante esta situación resulta interesante evaluar su posible empleo como probiótico.

3.8.1 Morfología

Los estreptococos son bacterias Gram-positivas, de forma esférica u ovoide que miden menos de 2 μm de diámetro. Se agrupan en pares o en cadenas, cuyas longitudes varían según la especie y están condicionadas por factores ambientales. Son inmóviles y no forman esporas. Algunas especies elaboran cápsulas, constituidas por polisacáridos como en el caso de los neumococos o por ácido hialurónico como en algunas cepas de los grupos A, B y C. Estas estructuras impiden la fagocitosis y se observan con mayor facilidad en cultivos muy jóvenes (Brooks y col., 1995).

3.8.2 Estructuras antigénica

Es variada y compleja. En una presentación estereoquímica de una célula de la especie de *Streptococcus pyogenes* encontramos a la cápsula constituida por ácido hialurónico, como la estructura más externa. Hacia el interior de la célula se halla la pared bacteriana, cuya composición es la típica de las bacterias Gram-positivas, constituidas por peptidoglucano, ácido teicoico, una gran variedad de hidratos de carbono y de antígenos proteícos de superficie (Brooks y col., 1995). Esta cubierta de tipo piloso o fimbrias están conformadas por los antígenos proteícos M, T y R (Figura 3).

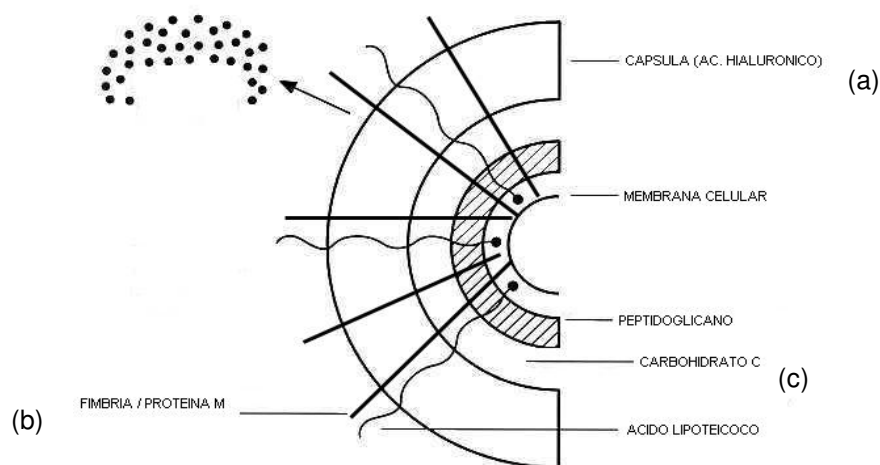


Figura 3. Estructura antigénica de las células estreptocócica grupo A. (a) Cápsula, (b) Antígenos proteícos, (c) grupo de carbohidratos (Brooks y col., 1995)

3.8.2.1 *Proteína M*

La proteína del grupo M es un destacado factor de virulencia y se ha logrado identificar 80 serotipos antigénicos. Se localiza en la superficie de la bacteria, mientras que la región carboxilo-terminal se encuentra anclada a la membrana, la región amino terminal se extiende hacia la superficie, en forma de un dímero alfa helicoidal, dando la apariencia de “fimbrias”. La proteína M esta formada por cuatro unidades de repetición (A-D), donde la variación de la unidad A (localizada en la región amino-terminal) es la mas importante debido a que en ella se encuentra la especificidad de serotipo; protege a la bacteria de la fagocitosis al unirse al factor H (proteína reguladora del complemento) y fibrinógeno, favorece la degradación del factor del complemento C3b unido a la superficie bacteriana (Brown, 2005).

3.8.2.2 *Proteínas T y R*

Estas proteínas son marcadores epidemiológicos muy útiles, estos antígenos no se relaciona con la virulencia de los estreptococos. A diferencia de la proteína M, son termo y acidolábil. La proteína T permite diferenciar algunos tipos de estreptococos por aglutinación con antisueros específicos (Bisno 1991).

3.8.2.3 *Factor de opacidad*

El factor de opacidad (FO) describe otro antígeno de la superficie celular asociado con la proteína M de los estreptococos del grupo A. El FO es una α -lipoproteínasa capaz de opacificar (volver opaco) los medios que contienen suero de mamífero. Los anticuerpos dirigidos contra OF son específicos al inhibir la reacción de opacidad del tipo M que la produce, de modo que se puede utilizar la opacificación de este factor como reacción de tipificación suplementaria o complementaria. Actualmente se reconocen alrededor de 27 tipos que producen el FO. (Koneman y Allen, 2008).

3.8.3 Toxinas y enzimas

Los estreptococos del grupo A producen mas de 20 productos extracelulares, entre los que destacan las toxinas eritrogénicas, estreptolisina S y O, hialuronidasa y estreptodornasa (Brooks y col., 1995).

3.8.3.1 *Toxinas eritrogénicas A, B y C*

Son exotoxinas antigénicas, responsables, entre otras cosas, del exantema en la escarlinata. Se producen en cepas que se encuentren en estado lisogénico, o sea, infectadas por un fago (Brooks y col., 1995).

3.8.3.2 *Estreptolisina S y O*

La estreptolisina es una exotoxina hemolítica estreptocócica, que incluye dos tipos: la estreptolisina O (SLO) que es lábil al oxígeno y la estreptolisina S (SLS) que es estable al oxígeno. Estas hemolisinas O y S destruyen las membranas de los eritrocitos y otras células (Koneman y col., 2008).

3.8.3.3 *Hialuronidasa*

Es una enzima que desdobla al ácido hialurónico, constituyente importante del tejido conjuntivo, por lo cual favorece la diseminación de los microorganismos infectantes. Las hialuronidasas son antigénicas y específicas para cada bacteria o tejido del cual se obtengan (Brooks y col., 1995).

3.8.3.4 *Estreptodornasa (desoxirribonucleasa estreptocócica)*

Es una enzima que despolimeriza el ADN y se conocen cuatro tipos A, B, C y D. Anticuerpos a las DNAsas se desarrollan después de las infecciones estreptocóccicas, especialmente después de infecciones cutáneas con pioderma (Brooks y col., 1995).

3.8.4 Clasificación de los Estreptococos

La clasificación de los estreptococos se ha basado en una serie de observaciones: morfología de la colonia y reacciones hemolíticas en agar sangre, especificidad serológica de la sustancia específica de grupo de la pared celular (clasificación de Lancefield) y de otros antígenos capsulares o de la pared celular, reacciones bioquímicas y resistencia a factores físicos y químicos (Brooks y col., 1995). Combinaciones de los métodos anteriores han permitido la clasificación de los estreptococos con propósitos de conveniencia clínica y epidemiológica (Tabla 2).

Tabla 2. Características de los estreptococos de importancia médica (Brooks y col., 1995)

Nombre	Sustancia específica de grupo ¹	Hemólisis ²	Hábitat	Criterios importantes de laboratorio	Enfermedades más frecuentes
<i>Streptococcus pyogenes</i>	A	Beta	Garganta, piel	Prueba PYR positiva ³ , inhibición por bacitracina	Faringitis, impétigo, fiebre reumática, glomerulonefritis
<i>Streptococcus agalactiae</i>	B	Beta	Vías genitales femeninas	CAMP positiva ⁴ , hidrólisis del hipurato	Sepsis y meningitis neonatal
<i>Streptococcus bovis</i>	D	Ninguna	Colon	Crece en presencia de bilis, hidroliza a esculina, no crece en NaCl al 6.5%, degrada al almidón	Endocarditis, bacteriemia en cáncer de colon
<i>Streptococcus grupos C y G</i>	C o G	Beta	Nasofaringe	Resistentes a la bacitracina, sensibles al sulfametoxazol trimetoprim	Simusitis, bacteriemia, endocarditis
<i>Streptococcus viridans</i> (múltiples especies)	En general no se tipifican	Alfa	Boca, garganta, colon, vías genitales femeninas	Resistente a optoquina, solubles en bilis. Patrones de fermentación de carbohidratos	Caries dental (<i>S. mutans</i>), endocarditis, abscesos
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ninguna	Alfa	Garganta	Susceptibles a optoquina, solubles en bilis, reacción Quellung positiva	Neumonía, sinusitis, otitis, meningitis, endocarditis, artritis séptica

- 1 Clasificación de Lancefield,
- 2 Hemólisis en 5% de agar sangre de ovejas después de incubar toda la noche
- 3 Hidrólisis de L-pirrolidonil-2-naftilamida (PYR)
- 4 CAMP- Prueba de Christie, Atkins, Munch-peterson

4. JUSTIFICACIÓN

Los efectos benéficos asociados al consumo de microorganismos probióticos, ha dado lugar que exista un incremento en el consumo de bebidas con microorganismos probióticos. El pozol es una bebida tradicional de origen prehispánico, a la cual se le atribuyen diferentes propiedades relacionadas con mejoras a la salud y el bienestar de quienes la consumen. Trabajo previo realizado por el grupo de trabajo, mostró que BAL del género *Streptococcus* constituyen un componente importante de la biota del Pozol. En este trabajo se presentan resultados relacionadas con la caracterización de dichas bacterias, con el interés primordial de conocer su posible empleo como probióticos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar si cepas de *Streptococcus sp.* aisladas del pozol presentan la capacidad para adherirse a células en cultivo y definir si portan genes relacionados con la virulencia del género, como un proceso inicial para definir su empleo como probióticos.

5.2 Objetivos específicos

- Recuperar las bacterias lácticas previamente aisladas del pozol.
- Evaluar la capacidad de adherencia sobre diferentes líneas celulares.
- Analizar por microscopía electrónica la presencia de estructuras asociadas a la adherencia.
- Analizar si las cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol, presentan genes relacionados con la virulencia del género.

6. HIPÓTESIS

Las bacterias ácido lácticas del género *Streptococcus* aisladas del pozol tienen la capacidad para adherirse a células y no presentan genes relacionados con la virulencia del género, por lo que se puede considerar que cumplen con algunas características de los probióticos.

7. METODOLOGÍA

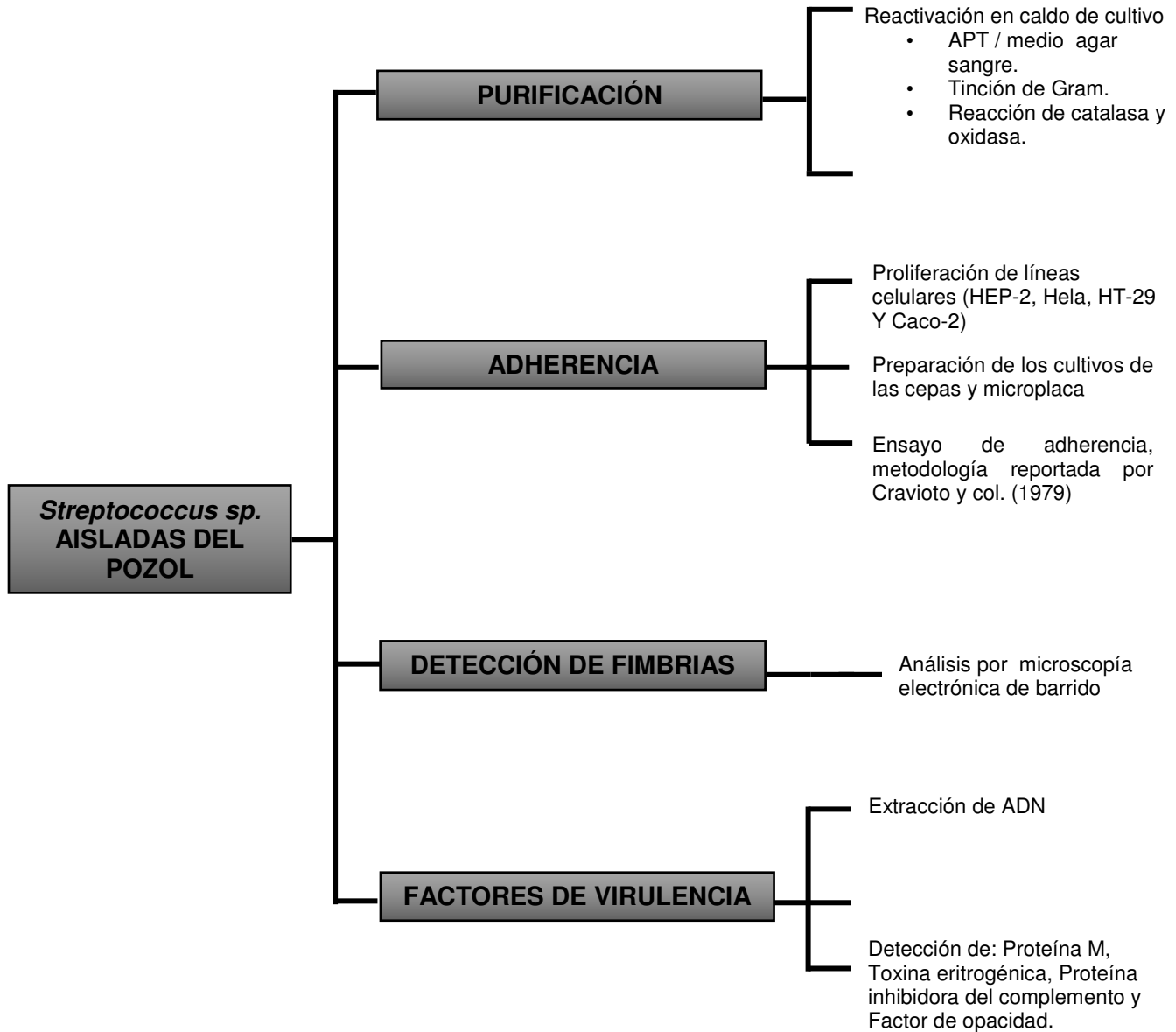


Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología que se siguió en el proyecto

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Material biológico

Se estudiaron 35 cepas de *Streptococcus sp.* aisladas del pozol, las cuáles fueron identificadas y proporcionadas por la Dra. Carmen Wachter, Laboratorio del Departamento de Alimentos y Biotecnología, conjunto E de la Facultad de Química, UNAM. Se utilizaron las cepas de *E.coli* A3EC-3 (adherencia difusa), *E coli* EPEC E2348/69 (adherencia localizada), *E. coli* EAEC 49766 (adherencia agregativa), *E. coli* HB110 (no adherente) como controles, para evaluar los patrones de adherencia en las cepas de *Streptococcus sp.*

8.2 Recuperación de las cepas

Se realizó la reactivación de las cepas de *Streptococcus sp.* en caldo APT (anexo), se incubó a 35°C durante 24 h. Pasado este tiempo se sembraron por estría en caja con agar MRS (ver anexo). Posteriormente se tomaron varias colonias y se realizó tinción de Gram, reacción de catalasa (peróxido de hidrogeno al 30%) y reacción de oxidasa, para confirmar la pureza de las cepas de *Streptococcus sp.*

8.3 Adherencia a células epiteliales

Cultivos celulares. Se utilizaron cuatro líneas celulares HEp-2 (carcinoma faríngeo), HeLa (carcinoma de cérvix), HT-29 (adenocarcinoma de colon humano) y Caco-2 (carcinoma de colon humano). Estas líneas celulares han sido extensivamente usadas para evaluar las propiedades adhesivas de cepas probióticas *in vitro*. Se utilizó la metodología descrita por Cravioto y col., (1979) con ligeras modificaciones.

8.3.1 Obtención de la suspensión bacteriana

Las cepas de *Streptococcus sp.* recuperadas, se inocularon en caldo APT con D-manosa al 1% en agitación a 37°C durante 18 h, posteriormente, se

centrifugó a 2500 rpm durante 15 min, se decantó el sobrenadante y el paquete de bacterias se resuspendió en medio mínimo esencial MEM(anexo) con D-manosa al 1% sin suero y sin antibiótico hasta obtener una concentración de bacterias de 1×10^8 UFC/mL.

8.3.2 Preparación de las células

Se propagaron las células HEp-2, HeLa, HT-29 y Caco-2 en una botella de 75 mL, utilizando medio MEM, con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 5% de antibiótico (estreptomicina). Después se incubó la botella a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ y 85% de humedad durante 24 h, hasta tener una monocapa celular con un 90% de confluencia. Ya crecidas las células se eliminó el medio y se hicieron 2 lavados con 1 mL de puks (anexo), incubando por 5 minutos para el desprendimiento de la monocapa celular. Posteriormente, se adicionó 25 mL de medio MEM y se repipeteó varias veces para homogenizar la suspensión celular.

8.3.3 Preparación de la microplaca

En condiciones estériles, se preparó una microplaca de propileno con 24 pozos, se colocó una lenteja de plástico en cada pozo de la placa con una pinza flameada. Posteriormente se adicionó 1 mL de la suspensión (2.5×10^5 células / mL) previamente preparada en cada uno de los pozos. Después se incubó a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% y de humedad del 85%, durante 24 h para obtener la monocapa al 90% de confluencia.

8.3.4 Ensayo de adherencia

Concluido el tiempo de incubación de la microplaca, se desechó el medio de cada uno de los pozos y se lavó tres veces con PBS 1X (anexo). Se resuspendió 3 veces y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se adicionó 900 µL de medio (sin suero, sin antibiótico, D-manosa al 10%, concentración final de 1%) y 100 µL de la suspensión bacteriana preparada anteriormente se resuspendió y se incubó a 37 °C durante 3 h. pasado el tiempo de incubación, se realizaron lavados con 1 mL de PBS estéril por

triplicado. Sucesivamente, se fijó con 1 mL de metanol, dejándolo reposar 1 min; posteriormente se adicionó 1 mL de colorante Giemsa, se dejó teñir durante 10 min y por último se lavó 3 veces con 1 mL de agua desionizada para eliminar el exceso de colorante. Después de hacer un deshidratado de las células, se tomó con pinzas cada lenteja y se sumergió por 30s en cada una de las siguientes soluciones: acetona, acetona / xileno (50/50), y xilol. Inmediatamente se montaron las lentejas en un portaobjetos con resina (bálsamo de Canadá), se colocó la lenteja con la monocapa celular hacia arriba y se adicionó una gota de resina sobre cada una de ellas. Se dejó secar durante 24 h. Una vez secas las preparaciones, se observaron en el microscopio y se tomaron fotografías. El ensayo se anotó positivo si más de 10 bacterias se adhieren por célula epitelial. Por otra parte se observó su patrón de adherencia.

8.4 Microscopía electrónica de barrido

El análisis microestructural de las muestras se llevó a cabo en un microscopio electrónico de barrido adaptando la metodología reportada por Julavittayanukul y col. (2006).

8.4.1 Obtención de la muestra

Para obtener la muestra, se realizó el ensayo de adherencia con la línea celular Caco-2 (carcinoma de colon humano), descrito por Cravioto y col., (1979) con las cuatro de las cepas de *Streptococcus sp.* (25245, A12203, 15124 y 25137) que fueron adherentes a las cuatro líneas celulares, como control negativo se utilizó la cepa de *Streptococcus sp.* 25209.

8.4.2 Técnica de microscopía electrónica de barrido

Una vez que se obtuvo la lenteja con la monocapa y las bacterias, la muestra se fijó con 1 mL de glutaraldehído al 5% por un tiempo de 48 h, cada lenteja posteriormente se tomó con una pinza para realizar un recorte de 4 mm de diámetro y se colocaron en un microtubo; posteriormente se lavaron con una solución de buffer de fosfatos (0.1M, pH 7.3) hasta no tener residuos de

glutaraldehído, seguido de una fijación con tetraóxido de osmio diluido (2%) en buffer de fosfatos (0.1M, pH 7.3) hasta cumplir 2 h en refrigeración, después se deshidrataron con alcohol a diferentes concentraciones, que fueron del 30% con un incremento de 10% hasta llegar al alcohol absoluto. Después las muestras se deshidrataron al punto crítico, colocándolas sobre acetato de amilo a 10°C añadiendo CO₂ líquido, posteriormente se aplicó nuevamente CO₂ (31°C, 74 bar). Finalmente, las muestras se colocaron sobre soportes, fijándolas con plata coloidal con adherente, para después someterlas a un baño de oro. Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900LV, North Billerica, MA), con un voltaje de aceleración de 13 kV, utilizando un modo de imagen SEI (Secondary Electrón Imagen).

8.5 Detección de genes asociados a la virulencia

Para la detección de genes se extrajo el ADN de las bacterias. Para lograr esto se inoculó en medio MRS (anexo), y se incubó a 37°C por 24h. Pasado el tiempo de incubación, se realizó la extracción de ADN total de cada cepa utilizando el Kit DNeasy Blood and Tissue (Quiagen). Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis empleando geles de agarosa al 1%. El ADN fue visualizado utilizando un transiluminador de luz UV tras teñir con bromuro de etidio.

8.5.1 Gen emm (Proteína M)

Se utilizó un par de primers: inicio 5' (GGGAATTCTATTSGCTTAGAAAATTAA) 3' y regreso 5'(GCAAGTTCTCAGCTTGTTT)3', con un termociclador (Gencamp, PCR System 9700). Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización a 94°C durante cinco minutos, la hibridación del cebador a 47°C durante cinco segundos y la polimerización a 72°C durante dos minutos.

8.5.2 Gen speA (toxina eritrogénica)

Se utilizó un par de primers: inicio 5' (ATGGAAAACAATAAAAAAGTATTG) 3' y regreso 5' (TACTTGGTGTTAGGTAGCTTC) 3', con un termociclador (Gene Amp, PCR System 9700). Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización a 94°C durante cinco minutos, hibridación del cebador a 47°C durante cinco segundos y la polimerización a 72°C durante dos minutos.

8.5.3 Gen speC (toxina eritrogénica)

Se utilizó un par de primers: inicio 5' (ACCTATCATCAAAGTGACTCTAAGAAAGAC) 3' y regreso 5' (CCCTTCATTTGGTGAGTCAAATAAGTCTAT) 3', con un termociclador (Gene Amp, PCR System 9700). Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización a 94°C durante cinco minutos, hibridación del cebador a 47°C durante cinco segundos y la polimerización a 72°C durante dos minutos.

8.5.4 Gen sic (Proteína inhibidora del complemento)

Se utilizó un par de primers: inicio 5' (TAAGGAGAGGTCACAAACTA) 3' y regreso 5' (TAACGTTGCTGATGGTGTAT) 3', con un termociclador (Gene Amp, PCR System 9700). Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización a 94°C durante cinco minutos, hibridación del cebador a 47°C durante cinco segundos y la polimerización a 72°C durante dos minutos.

8.5.5 Gen sof (factor de opacidad)

Se utilizó un par de primers: inicio 5' (GGTATAAACTTAGAAAGTTATCTGTAGG) 3' y regreso 5' (GGCCATAACATCGGCACCTTCGTC) 3', con un termociclador (Gene Amp, PCR System 9700). Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización a 94°C durante cinco minutos, hibridación del cebador a 47°C durante cinco segundos y la polimerización a 72°C durante dos minutos.

9. RESULTADOS

9.1 Adherencia a células epiteliales

En el ensayo de adherencia se identificó que de las 35 cepas de *Streptococcus sp.* analizadas, 32 (89%) fueron adherentes a por lo menos una de las líneas celulares utilizadas (Tabla 3). Al analizar a que línea de células se adhieren las cepas de *Streptococcus*, se encontró que cuatro de ellas (25245, 15124, 25137, A12203) fueron adherentes a las cuatro líneas celulares. Con relación a la frecuencia de adherencia a cada tipo de célula, se identificó que en células HEP-2 13 cepas (37%) fueron adherentes, en HeLa 10 (29%), 14 (40%) con HT-29 y con las células Caco-2 se observó 69% (22) de las cepas positivas.

El análisis visual de los fenotipos de adherencia mostró que por la disposición de las bacterias, se presentaban patrones parecidos a los descritos para *Escherichia coli*. Al respecto se identificaron los fenotipos de adherencia difusa (bacterias sobre toda la superficie de la célula), agregativa (en donde las bacterias se encuentran alrededor de la célula y/o núcleo, apilándose unas con otras) y localizada (las bacterias forman grupos de microcolonias en uno o varios puntos de la célula), aunque en este último solo una cepa (15414) presentó este patrón de adherencia (Tabla 4). Con respecto a la frecuencia de los distintos patrones de adherencia se identificó que en las células HEP-2 de las 13 cepas que presentaron adherencia, nueve de ellas mostraron adherencia difusa, mientras que las restantes presentaron un patrón similar al agregativo de *Escherichia coli* (Figura 5).

En la línea de células HeLa se identificó en siete de los aislados de *Streptococcus*, un patrón similar al de adherencia difusa y tres con el de agregativa (Figura 6). Con las células HT-29 se identificaron ocho aislados de *Streptococcus* con adherencia difusa, cinco con adherencia de tipo agregativo y una cepa presentó un patrón de adherencia parecido al localizado (Figura 7). En el caso de la línea celular Caco-2 se encontró que 10 cepas presentaron adherencia difusa y 12 adherencia agregativa (Figura 8). Con relación a las cepas que fueron adherentes a las cuatro líneas de células, la cepa 15124 presentó el mismo patrón de adherencia (agregativa) en todos, mientras que las cepas 25245 y A12203 presentaron el patrón de adherencia (difusa) solo en tres de las líneas celulares (Tabla 4).

Tabla 3. Adherencia a diferentes líneas celulares de aislados de *Streptococcus sp.* obtenidos del pozol.

Línea celular	HEp-2	HeLa	HT-29	Caco-2
15133	-	+	+	+
15430	-	-	-	+
15220	-	+	-	-
A46116	-	-	-	-
25245	+	+	+	+
25318	-	-	-	-
25109	-	-	-	-
15124	+	+	+	+
25113	-	-	-	+
25148	+	+	-	+
25139	-	-	+	+
25233	+	-	+	+
25421	+	-	+	+
25137	+	+	+	+
15125	-	-	-	+
15414	-	+	+	+
25124	-	+	-	+
A56203	+	-	-	-
A57103	+	-	+	+
A57206	-	-	+	+
A45208	+	-	-	-
A37103	-	-	-	+
A37202	-	-	+	-
A36111	+	-	-	-
A12203	+	+	+	+
A56101	-	-	+	-
A56201	-	-	-	+
15319	-	+	-	-
A46112	-	-	+	-
A46113	-	-	-	+
A47212	-	-	-	+
A56208	+	-	-	-
A56202	-	-	-	-
A45201	+	-	-	+
A45226	-	-	-	+

Nota: (+) adherencia positiva, (-) adherencia negativa; ● cepas positivas en las cuatro líneas celulares.

Tabla 4. Fenotipo de adherencia de aislados de *Streptococcus sp.* identificado en las distintas líneas de células.

Línea celular	HEp-2	HeLa	HT-29	Caco-2
Patrón de Adherencia				
15133	-	difusa	difusa	agregativa
15430	-	-	-	agregativa
15220	-	difusa	-	-
A46116	-	-	-	-
25245	difusa	difusa	difusa	agregativa
25318	-	-	-	-
25109	-	-	-	-
15124	agregativa	agregativa	agregativa	agregativa
25113	-	-	-	agregativa
25148	difusa	difusa	-	agregativa
25139	-	-	difusa	difusa
25233	difusa	-	difusa	agregativa
25421	difusa	-	difusa	difusa
25137	agregativa	agregativa	difusa	agregativa
15125	-	-	-	agregativa
15414	-	difusa	localizada	difusa
25124	-	difusa	-	difusa
A56203	difusa	-	-	-
A57103	difusa	-	agregativa	difusa
A57206	-	-	agregativa	difusa
A45208	agregativa	-	-	-
A37103	-	-	-	difusa
A37202	-	-	difusa	-
A36111	difusa	-	-	-
A12203	agregativa	agregativa	agregativa	difusa
A56101	-	-	agregativa	-
A56201	-	-	-	agregativa
15319	-	difusa	-	-
A46112	-	-	difusa	-
A46113	-	-	-	agregativa
A47212	-	-	-	difusa
A56208	difusa	-	-	-
A56202	-	-	-	-
A45201	difusa	-	-	agregativa
A45226	-	-	-	difusa

Nota: Patrones de adherencia similares a *Escherichia coli*.

(●) patrón similar en las cuatro líneas celulares.

(●) patrón similar en tres líneas celulares.

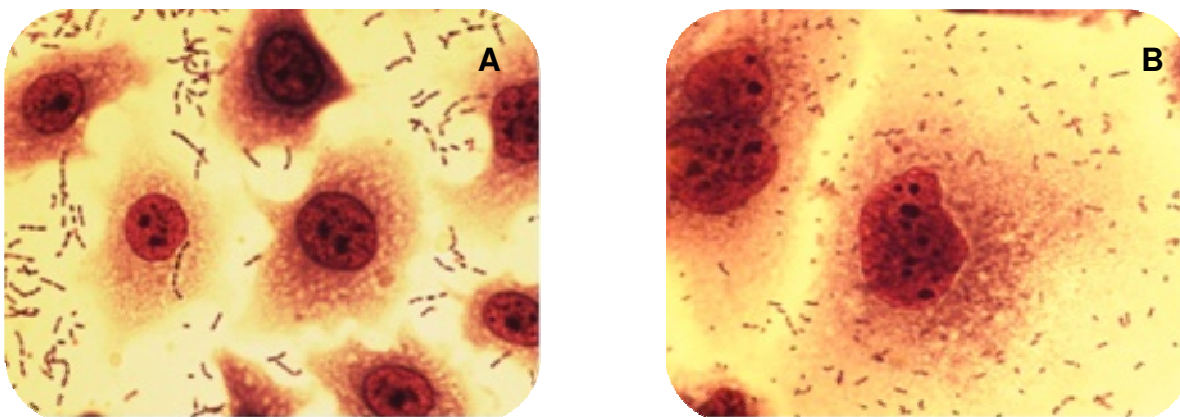


Figura 5. Ensayo de adherencia en células HEp-2: a) Adherencia difusa de *Streptococcus sp.* (25233). b) Adherencia agregativa de *Streptococcus sp.* (25137); las preparaciones se observaron en microscopio de luz a 100 x previamente teñidas con colorante Giemsa

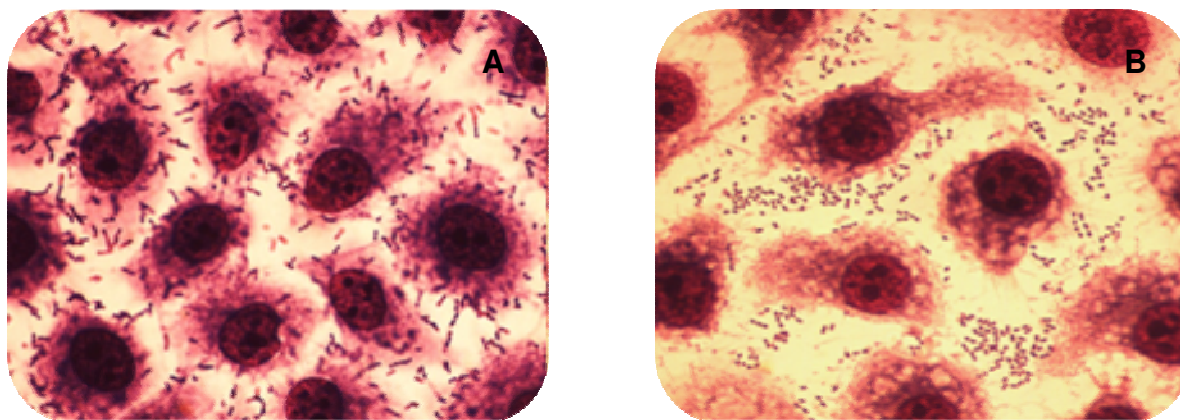


Figura 6. Ensayo de adherencia en células HeLa: a) Adherencia agregativa con formación de cadenas de *Streptococcus sp.* (25137); b) Adherencia difusa de *Streptococcus sp.* (25148); las preparaciones se observaron en microscopio de luz a 100 x previamente teñidas con colorante Giemsa.

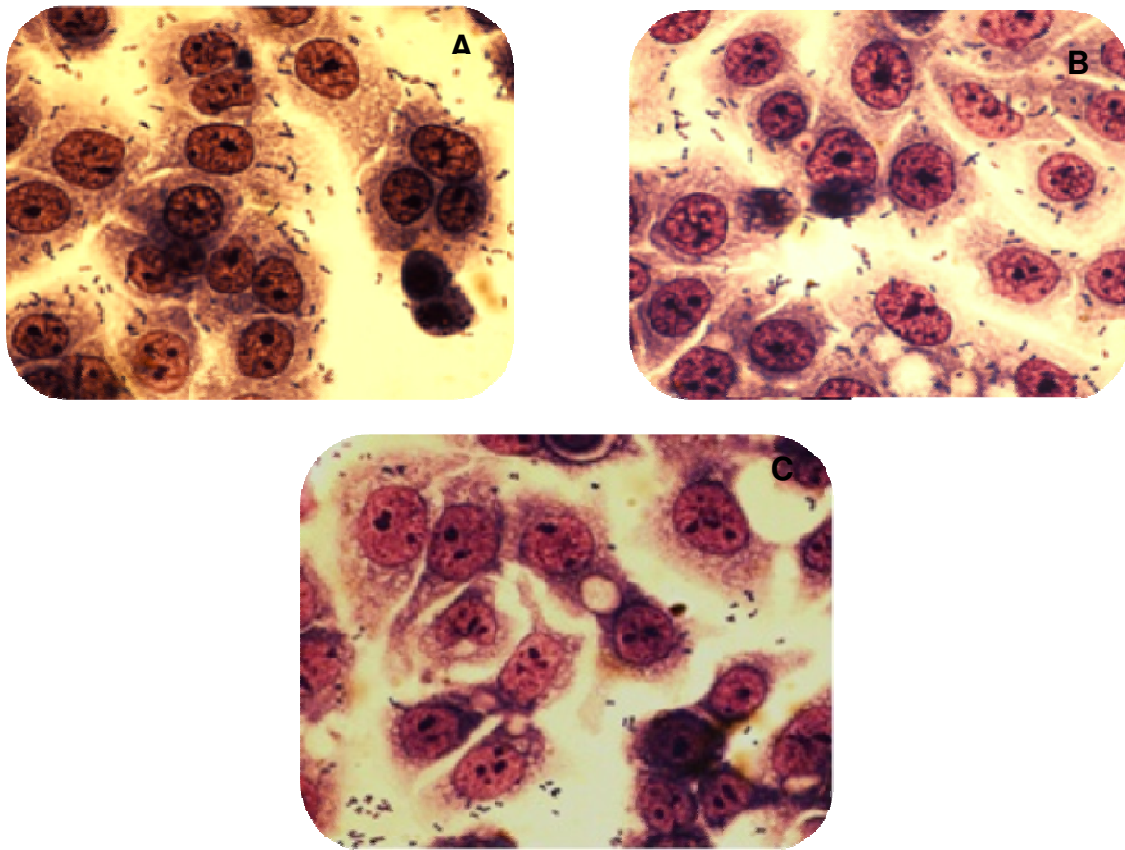


Figura 7. Ensayo de adherencia en células HT-29: a) Adherencia agregativa con formación de cadenas de *Streptococcus sp.* (A56101); b) Adherencia difusa de *Streptococcus sp.* (25421); c) adherencia parecida a la localizada de *Streptococcus sp.* (15414). Las preparaciones se observaron en microscopio de luz a 100 x previamente teñidas con colorante Giemsa.

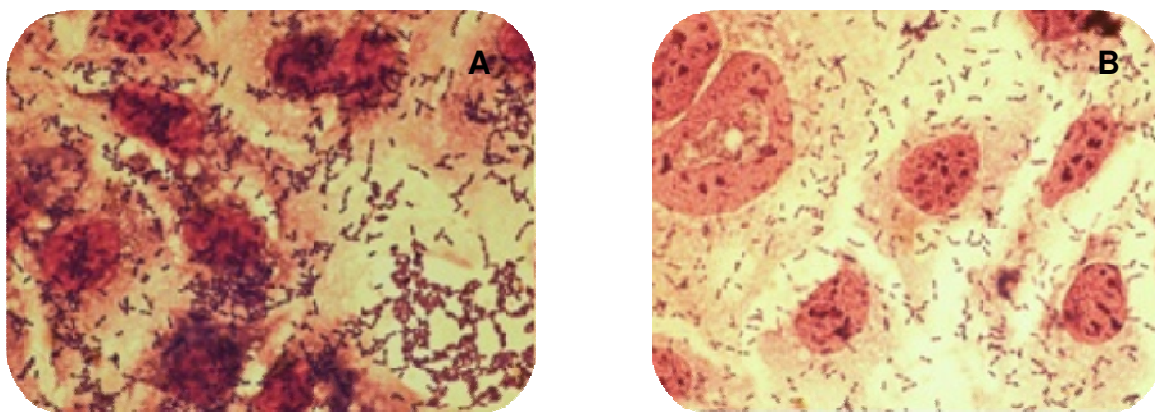


Figura 8. Ensayo de adherencia en células Caco-2: a) Adherencia agregativa con formación de cadenas de *Streptococcus sp.* (25245); b) Adherencia difusa de *Streptococcus sp.* (A12203). Las preparaciones se observaron en microscopio de luz a 100 x previamente teñidas con colorante Giemsa.

9.2 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica por barrido mostró que la cepa 25137, presenta una matriz de secreciones probablemente de exo-polisacáridos en la cual se encuentran inmersas las bacterias (Figura 9). Las cepas 25245 y A12203 presentan pequeñas prolongaciones mediante las cuales las bacterias se fijan a la célula (Figura 9b y 9d). La imagen de la cepa 15124 muestra como las bacterias emiten estructuras que unen a las bacterias entre si y otras más pequeñas que unen a las bacterias con la superficie de la célula (Figura 9c). La cepa de *Streptococcus sp.* 25209 que no mostró adherencia a las diferentes líneas celulares, en el ensayo de microscopía electrónica de barrido se confirmó que no presenta estructuras relacionadas con la adherencia (Figura 9e).

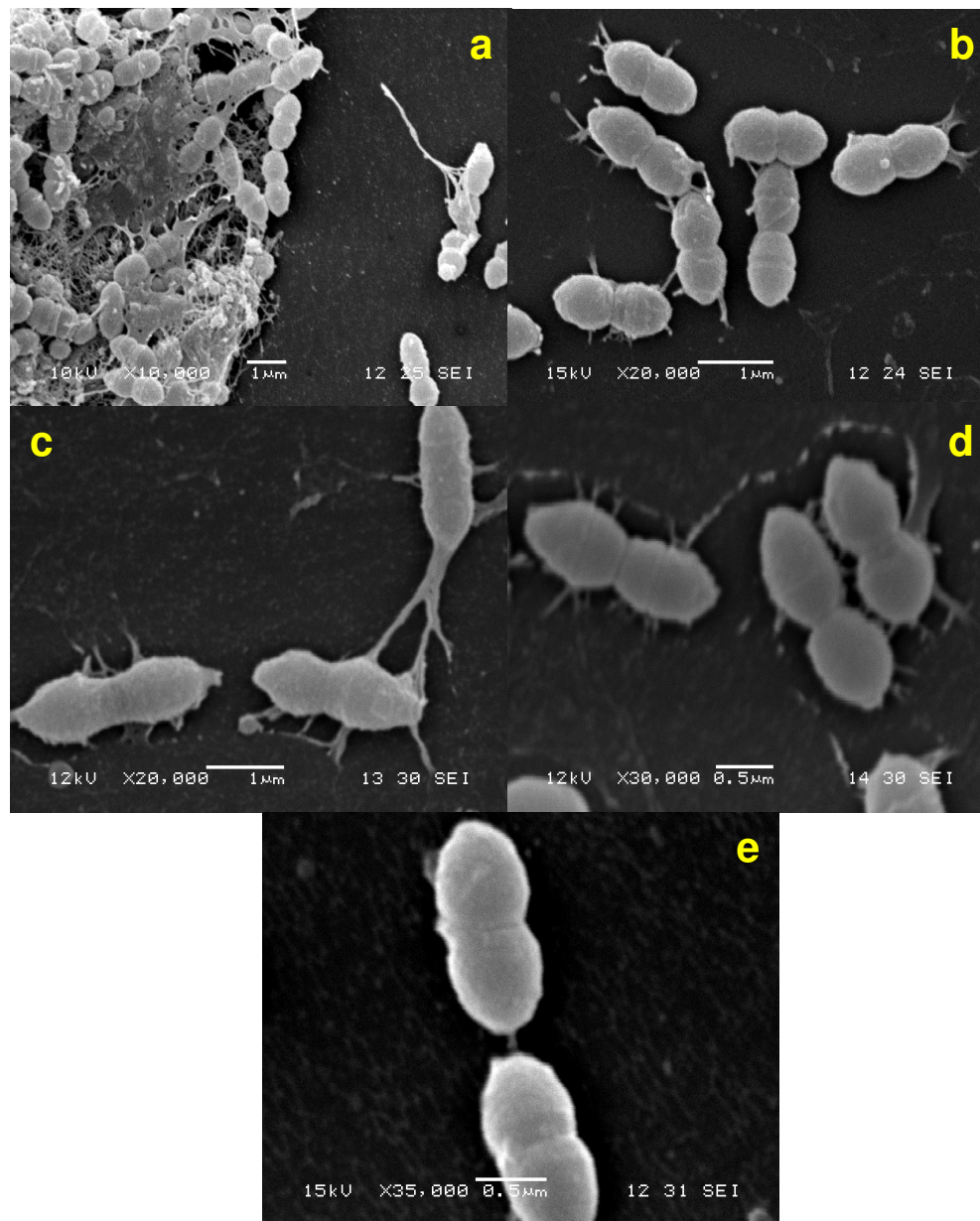


Figura 9. Microscopía electrónica de barrido de cepas de *Streptococcus sp.* aisladas del pozol adherentes a las líneas celulares HEP-2, HeLa, Caco-2 y HT-29: a) 25137. b) 25245, c) A12203 y d) 15124. e) 25209 cepa control no adherente.

9.3 Genes de virulencia

En esta parte del trabajo se evaluó si las bacterias en estudio portaban genes relacionados con la virulencia en tal género de *Streptococcus*. Se analizó las 35 cepas de *Streptococcus sp.* la presencia de genes para la proteína M y los genes *speA*, *speC* (toxina eritrogénica), *sof* (factor de opacidad) y *sic* (proteína inhibidora del complemento). Ninguna de las cepas amplificó para la proteína M (Figura 10a). En la figura se observa la presencia de dos bandas, una a 700 pb y otra a 800 pb las cuales corresponden a las cepas control utilizadas (*Streptococcus pyogenes*).

Para los genes *speA/speC* y *sic/sof* ocurrió lo mismo, las cepas en estudio no presentaron ningún gen de virulencia en su información genética, por lo tanto, solo se observaron las bandas de los controles.

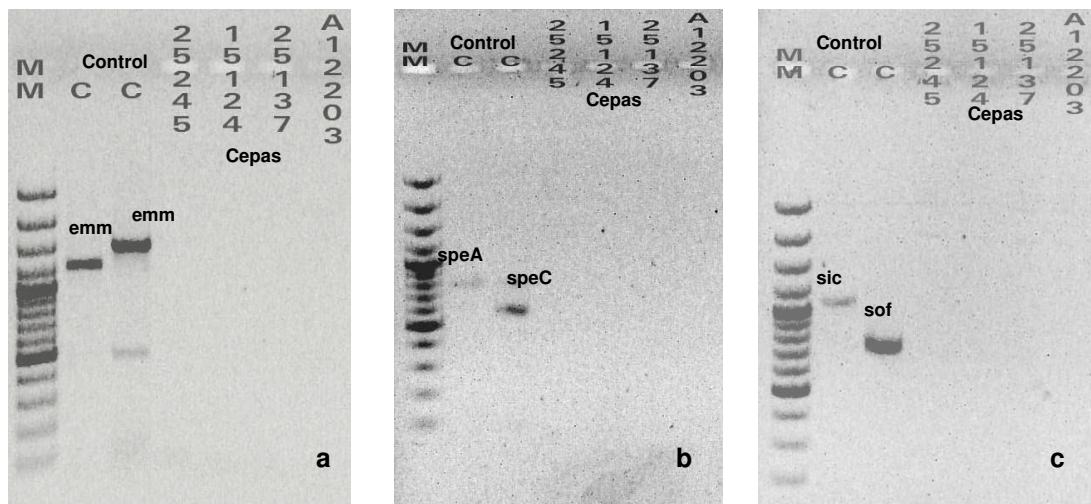


Figura 10. Amplificación por PCR de las cepas de *Streptococcus sp.* Control *S. pyogenes*. (a) Proteína M; (b) Toxinas eritrogénicas; (c) Proteína inhibidora del complemento / factor de opacidad. Marcador molecular de tamaño (1000-pb lomas)

10. DISCUSIÓN

10.1 Adherencia a células epiteliales

La capacidad de adherencia es una de las características importantes para considerar que un microorganismo tiene potencial probiótico. Lo anterior porque el probiótico además de llegar vivo al intestino, debe contar con estructuras que le permitan adherirse a la capa de mucosidad, a fin de no ser barridos con la peristálsis del colon (Fernández y col., 2003).

Como es difícil evaluar la adherencia bacteriana *in vivo*, se han desarrollado modelos *in vitro*, en particular con células del epitelio intestinal humano. Las líneas celulares que han sido utilizadas ampliamente son, HT-29 (enseña las funciones de las células secretoras de la mucosa) y Caco-2 (presenta la morfología y funciones de un enterocito). Varios receptores son potencialmente localizados en la mucosa del intestino grueso y delgado mediante una adhesión específica de cualquiera de las bacterias benéficas o patógenas (Li y col., 2008).

En el presente estudio, los ensayos de adherencia que se realizaron en las cuatro líneas celulares, se observó que no todas las cepas de *Streptococcus sp.* fueron adherentes. En la línea celular Caco-2 y HT-29, se presentó el mayor número de cepas adherentes con 63% y 43% respectivamente. Esto probablemente se debe a que las células son del epitelio intestinal y presentan los receptores específicos para permitir la colonización.

Por otro lado en la línea celular HEP-2 se observó 37% de cepas adherentes, esta línea celular pertenece a un carcinoma faríngeo, esta puede ser una explicación de la baja frecuencia de adherencia ya que aunque son células epiteliales corresponden a otro tipo. Sin embargo, se utilizaron para conocer si nuestras bacterias podían colonizar desde la faringe antes de llegar a las células del epitelio intestinal. Como se mencionó previamente cuatro de las cepas fueron adherentes a las cuatro líneas de células, tal observación plantea por un lado que estas bacterias presentan diferentes estructuras relacionadas con la adherencia y además cumplen con nuestra

propuesta de que pueden colonizar desde la faringe hasta el intestino. Otro aspecto importante de la adherencia a HEP-2, es que las cepas que se adhirieron comparten receptores con las cepas que causan diarrea como es el caso de *Escherichia coli*, que se adhieren a las células epiteliales intestinales y colonizan el intestino delgado (Smith y Longgood, 1971).

Varo-Lizeldi (2010), analizó la capacidad de adherencia en células HEP-2 con 11 cepas de bacterias lácticas aisladas de hortalizas, en dicho estudio se identificó adherencia positiva en 10 cepas presentado un patrón de adherencia agregativo similar a lo identificado por este trabajo. La capacidad de adherencia de bacterias probióticas, ha sido analizada en diferentes líneas de células en cultivo. Pennacchia y col. (2006) evaluaron la capacidad adherente de 11 cepas de *Lactobacillus* aisladas de embutidos fermentados utilizando la línea celular Caco-2; sus resultados fueron positivos en las 11 cepas y en específico 8 de ellas pertenecían al grupo de *Lactobacillus plantarum*. En otro estudio realizado por Delgado y col. (2008) quienes analizaron la adhesión de 187 cepas de *Bifidobacterium* aisladas de la mucosa y heces de un adulto sano utilizando la línea celular Caco-2, identificaron positivo el ensayo en todas las cepas evaluadas.

Estudios de Jensen y col. (2011) evaluó la capacidad de adherencia de 18 cepas de *Lactobacillus plantarum*, *L. sakei*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. farcimines* y *Pediococcus pentosaceus*, se observó que la adherencia era variable dependiendo de la cepa bacteriana y de la línea celular (Caco-2 y HT-29). En dicho trabajo se observó que cepas de *Lactobacillus plantarum* y tres cepas de *Lactobacillus reuteri* presentaron una capacidad mayor de adherencia, en comparación con las otras cepas.

Estas observaciones son parecidas a las obtenidas en nuestro trabajo, sin embargo, nuestros resultados muestran la capacidad de adherencia de cepas de *Streptococcus*, género de bacterias en las que existen pocos estudios que muestren su capacidad para adherirse a células en cultivo.

10.2 Microscopía electrónica de barrido

Los microorganismos han desarrollado diferentes mecanismos para colonizar con éxito los tejidos humanos, en términos de interacción con cualquier patógeno o comensal (Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006). La adhesión a los tejidos del huésped representa un paso crucial del proceso de colonización, y por lo general las bacterias patógenas expresan moléculas de adhesión que interactúan con receptores. Por ejemplo, en las primeras etapas de la colonización las bacterias pueden utilizar pili, fimbrias y una variedad de adhesinas para interactuar con un gran número de elementos que aparecen en la superficie de la célula huésped, ya sea unido a la membrana o secretado, incluyendo proteínas de la matriz extracelular. Entre estas la fibronectina (glicoproteína) ha demostrado ser la diana para la interacción con muchos agentes patógenos, así como con algunas bacterias probióticas (Muñoz-Provencio, 2009; Schwartz-Linek, y col., 2004).

En los resultados de microscopía electrónica de las cepas de *Streptococcus sp.* no se observaron estructuras tipo fimbria, ya que únicamente se observó una matriz probablemente de exo-polisacáridos en algunas bacterias y en otras se identificaron prolongaciones de la bacteria que fijan a las células. Existen varios estudios relacionados con la presencia de factores de colonización en *Streptococcus*, uno de estos mostró que *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus parasanguis* (Lévesque y col., 2004), microorganismo que colonizan la mucosa oral humana presentan estructuras fimbriales. Otros estudios (Castaldo y col., 2009) con *Lactobacillus plantarum* mostraron que la adhesión esta mediada por una proteína llamada alfa enolasa (EnoA1) que se une específicamente a la fibronectina humana. Sara y Uwe (2000) encontraron que *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus crispatus* presentan una capa proteica que rodea la pared celular lo que al parecer contribuye a la adherencia de dichas bacterias. El proceso de adhesión parece ser multifactorial, ya que la adhesión no se puede atribuir a un solo componente, si no que incluye interacciones electrostáticas,

hidrofóbicas y estructuras específicas tales como apéndices externos (Izquierdo y col., 2009). Nuestros resultados aunque no son concluyentes sugieren la participación de diferentes componentes de la bacteria, al respecto se están realizando ensayos para definir sus características.

10.3 Genes de virulencia

El género *Streptococcus sp.* está constituido por diferentes especies con factores de patogenicidad muy diversos. Muchas forman parte de la microbiota normal humana y producen una gran variedad de sustancias y enzimas extracelulares. Para que un microorganismo produzca patología, es necesario que posea factores que le permitan adherirse a la célula y generar una acción toxica que dañe al hospedero y así poder diseminarse a través de los tejidos o evitar la actividad defensiva de los fagocitos. En esta parte del trabajo se evaluó si las cepas en estudio presentaron factores de virulencia de los reportados para el género de *Streptococcus*, en particular los descritos para *Streptococcus pyogenes*, ya que dentro del género es considerado como importante patógeno para el humano.

La proteína M y las exotoxinas estreptocócicas, representan algunos de los principales factores de virulencia de *S. pyogenes*, por lo tanto, mediante la reacción de polimerasa (PCR) se realizó la detección de genes relacionados con la expresión de la proteína M (gen *emm*) y de los genes *speA*, *speC*, *sof*, *sic*. Los resultados obtenidos en las 35 cepas de *Streptococcus sp.* no reportaron la presencia de algunos de los factor de virulencia. El género de *Enterococcus* es utilizado en la industria alimentaria como cultivo iniciador o probiótico, sin embargo, este género ha cobrado relevancia como agente causal de infecciones hospitalarias (Forqué y col., 2006).

Marguet y col. (2008) estudiaron la virulencia potencial de ocho cepas de *Enterococcus faecium* y de dos cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas de quesos ovinos; e identificaron la presencia de los genes: *gelE* (de la gelatinasa) y *agg* (proteína de agregación) solamente en las cepas de *E. faecium* y *E. faecalis*.

Nuestro estudio involucro la búsqueda de los genes de *Streptococcus pyogenes* por la importancia química y epidemiológica que tiene la bacteria. Al respecto Inzunza-Montiel y col. (2004), realizaron un estudio sobre la prevalencia de los genes *emm*, *speA*, *speC*, *sof*, *prtF* y *sic* que están asociados a la virulencia en cepas de *Streptococcus pyogenes*; y de 248 cepas clínicas encontraron que los serotipos M1 y M12 de *S. pyogenes* continúan siendo los más prevalentes en nuestra población, la presencia del gen *speA* está asociado a los tipos M1 y M3, del gen *sic* y este gen se asoció exclusivamente a aislamientos del tipo M1. Existe una estrecha relación entre la presencia de los genes *sof* y *prtF* con los tipos M. El que nuestras cepas no hayan presentado ninguno de estos genes asegura que no son virulentos y pueden ser propuestos como probióticos.

11. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mostraron que las cepas de *Streptococcus sp.* aisladas del pozol son adherentes a las células epiteliales, siendo éste uno de los criterios de selección importante para que las bacterias puedan colonizar y efectuar beneficios a la salud del huésped. También se mostró que no presentan factores de virulencia asociados a la etiología de alguna enfermedad. Por lo que se puede considerar que estas cepas de *Streptococcus sp.* podrían ser consideradas como microorganismos probióticos.

12.REFERENCIAS

- Axelsson L., (1998). Lactic acid Bacteria: Classification and physiology in lactic acid bacteria, Microbiology and Functional aspects (Salminen, S y Wright, A von, eds). Segunda edicion, pp 1-72. Marcel Dekker Inc. New York, USA.
- Adams D. H. y Shaw S. (1995). Leucocyte-Endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet* . 343:831-836.
- Álvarez-Olmos M.I. & Oberhcliman R.A., (2001). Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infectious Diseases*. 32:1567-1576.
- Banas J.A. y Vickerman M.M. (2003). Glucan-binding of the oral streptococci. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*. 14(2):89-99.
- Barboza J.E., Vázquez H., Salcedo R. y Bautista M. (2004). Probióticos y conservadores naturales en alimentos. *Acta universitaria*. 14(3):32-38.
- Bernet H.F., Brassart D., Neeser J.R. y Servin A.L. (1994). Lactobacillus acidophilus LA 1 bind to cultures human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria, *Gut*. 35:483-489.
- Bisno A. L. (1991). Medical progress: group A streptococcal infections and acute rheumatic fever. *N Engl J Med*. 325: 783-793.
- Brooks G.F., Butel J.S., Orston L.N., Jawetz E (1995). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg 15ta ed. En español. Ed. El manual moderno México D.F. 15:231-247.
- Cañas-Urbine A.O., Barzana-García E., David-Owens J. & Wachter-Rodarte C. (1993). La elaboración del pozol en los altos de Chiapas, *Ciencia* 44:219-229.
- Carr J.F., Chill D., Maida N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey, critical reviews in microbiology. 28(4):281-370.

- Carrthers M. M. y Kabat W.J. (1983). Mediation of staphylococcal adherence to mucosal cells by lipoteichoic acid. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*. 40(1):444-446.
- Castaldo C., Vastano V., Siliciano R.A., Candela M., Vici M., Muscarielio L., M., M.arasco R. y Sacco M. (2009). Surface displaced alfa-enolasa of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. *Microbial cell factories*, 8:14.
- Castro L.A. y De Rovetto C. (2006). Probióticos: Utilidad clínica. *Colombia medica*, 37(4):308-314.
- Collado M.C., Isolaurie E., Salminen S., Sanz Y. (2009). The impact of probiotic on gut health. *Current Drug Metabolism*. 10:68-78.
- Cravioto A., Gross R.J., Scotland S.M. & Rowe B. (1979). An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Current Microbiology*. 3:95-99.
- Crociani J., Grill J.P., Huppert M. & Ballongue J. (1995). Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with in vivo study. *Letter in Applies Microbiology*. 21:146-148.
- Delgado S., O'sullivan B. E., Fitzgerald G., Mayo B. (2008). Subtractive screening for probiotic properties of *Lactobacillus* species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. *Journal of Food Science* 72:310-315
- De Vuyst y Vandame E. J. (1994). Antimicrobial potencial of lactic acid bacteria. Ed. Blackie Academic and professional, London. P.p. 91-149
- Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? *Applied and Environmental Microbiology* 78:1-6.
- Fernández, M., F. Boris, S. y Barbés, C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 449-455.

- Foulqué M., Sarantopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. (2006). The role and application of rnterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106:1-24.
- García M., Revali S. & Gómez L. (1998). Productos Lácteos. *Bioteconología Alimentaria*, Limusa noriega editores. p.p. 163-178.
- Gilliland S.E. (1990). Helath and nutritional benefits from lactis acid bacteria. *FEMS Microbiology reviews.* 87:175-188.
- Hart, A.L., Kamm, M.A., Stagg, A.J., Knight, S.C. (2009). Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases* 15:300–310.
- Helander, Y., Von Wring, A., Mattila, T. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 146-150.
- Hillis, G.S., Flapan, A.D. (2000). Cell adhesion molecules in cardiovascular disease. *Heart* 79: 429-31.
- Holo H., Jeknic Z., Daeschel M., Stevanoc S. & Nes I.F. (2001). Plantaricin w from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology* 147:643-651.
- Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. & Huis in't Vels J.H. (1998). Overvielu of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology.* 41(2):85-101.
- Izquierdo E., Horvatovich P., Marchioni E., Aoude-Werner O., Sanz Y., Ennahar S. (2009). 2-De and MS analysis of key proteinsin the adhesión of *Lactobacillus plantarum*, a first step toward early selection of probiotics basen on bacterial biomarkers, *Electrophores* 30.949-956.
- Jaitovich A. y Jaim G. (2004). Moléculas de adhesión, su papel en la fisiopatología cardiovascular. *Articulo especial, Facultad de medicina, Buenos Aires.* 64(5): 455-462

- Kirjanainen P.V., Owehand A.C., Isolauri F. & Salminen S.J. (1998). The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiology letter* 15(2):185-189.
- Koneman E. y Allen E. (2008). *Diagnostico microbiologico*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C. (2008). Genes and molecules of Lactobacilli supporting probiotics action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 72, 728-764.
- Lévesque, C., Vadeboncoeur, C. y Frenette, M. (2004). The *csp* Operon of *Streptococcus Salivarius* Encodes two Predicted Cell-surface Proteins, one of Which, CspB, is Associated with the Fimbriae. *Microbiology*. 150:189-198.
- Li X.J., Yue L.Y., Guan X.F. y Qiao S.Y. (2008). The adhesion of putative probiotic Lactobacillus to cultures epithelial cells and porcine intestinal. *Journal of Applied Microbiology*. 104(4):1082-1091.
- Mandigan M. T., Martinko J.M. y Parker J. (1999). Brock Biología de los Microorganismos, Editorial Prentice Hall Iberia.
- Messens W. y De Vuyst L. (2002). Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs-a review. *International Journal of Food Microbiology*. 72:31-43.
- Muñoz-Provencio D., Llopis M. de Torres I., Guarner F., Perez-Martinez G., Monedero V. (2009). Adhesion properties of Lactobacillus casei strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix. *Arch Microbiol*. 191(2):153-161.
- Niittynen, L., Pitkaranta, A., Korpela, R. (2009). Probiotics and otitis media in children. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 76:465–470
- Ogueke C.C., Owuamanam C.I., Inediohanma N.C. e Iwounor J.O. (2010). Probiotics and prebiotics. Unfolding prospects for better human health. *Pakistan Journal of Nutrition*. 9(9):833-843.

- Ohland, C.L., MacNaughton, W.K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 298:G807–G819.
- Ouwehand A.C., Niehi P. & Salminen S.J. (1999). The normal faecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria in vitro. *FEMS Microbiology Letters* 177 (1):35-38.
- Pennachia C. Vaughan E.E. & Villani F. (2006). Potential probiotic Lactobacillus strain from fermented sausage: further investigations of their probiotic properties. *Mest Science*. 73:90-101.
- Pizarro-Cerda J., Cossart P. (2006). Bacterial adhesión an entry into host cells. *International Journal of Food Microbiology* 124:715-727.
- Reid & Burton J. (2002). Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and infection*. 4(3):319-324.
- Sara M. & Uwe B.S. (2000). S-layer proteins. *Journal of Bacteriology*. 182(4):859-868.
- Sarem-Damjerdii L.O., Sarem F., Marchal L. & Nicolás J.P. (1995). In vitro colonization ability of human colon mucosa by exogenous Lactobacillus strain. *FEMS Microbiology letter*. 131:13
- Schneider R., Fernández F.J., Aguilar M.B., Guerrero-Legarreta I., Alpuche-Solis A. & Ponce-Alquicira E. (2006). Partial characterization of a class Ila pediocin produced by pedicoccus parvulus 133 strain isolated from meat (Mexican “Chorizo”). *Food control*. 17:909-915.
- Schwartz-Linek U., Hook M., Potts R.J. (2004). The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. *Mol Microbiol*. 52:631-641.
- Shirai K., Guerrero I, & Lara P. (1996). Bacteria láctica en alimentos fermentados. *Ciencia* 47:125-137.
- Stiles M.E., Holzapfel W.H. (1997). Review article: Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int J. Food Microbiol*. 36:1-29.

-
- Varo-Lizeldi. (2010). Caracterización parcial de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas aisladas de hortalizas. Tesis de Maestría en Ciencias Quimicobiológicas. Instituto Politécnico Nacional-Escuela de Ciencias Biológicas México, D.F.
- Vázquez S.M., Suarez H. & Zapata S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de Nutrición*. 36(1):64-71.
- Wacher C., Cañas A., Cook P.E., Barzana E., Owens J.D., (1993). Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9, 226-274.
- Werner, T., Haller, D. (2007). Intestinal epithelial cell signalling and chronic inflammation: from the proteome to specific molecular mechanisms. *Mutation Research* 1:42–57.

13. ANEXO

13.1 Medios de cultivo y soluciones

13.1.1 Caldo APT

Es un caldo empleado para cultivo de *Lactobacillus* heterofermentativos y otros organismos que requieren un alto contenido de tiamina.

- 15 g/L Agar
- 0.14 g/L Cloruro de manganeso
- 5 g/L Cloruro de sodio
- 5 g/L Citrato de sodio
- 7.5 g/L Extracto de levadura
- 5.0 Fosfato dipotásico
- 10 g/L Glucosa
- 0.2 g/L Polisorbato 80
- 0.04 g/L Sulfato ferroso
- 0.8 g/L Sulfato de magnesio
- 0.001 g/L Tiamina- HCl
- 12.5 g/L Triptona
- pH final: 6.7 ± 0.2

Suspender 61.2 g del medio en un litro de agua destilada. Dejar cinco minutos. Calentar agitando para disolver completamente. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

13.1.2 MEM (Medio Mínimo Esencial) con suero y antibiótico

- 4.7 g de MEM sólido
- 5 mL de Glutamina (1%)
- 10 mL de Bicarbonato de sodio a pH 7.1 (2%)
- 5 mL de Mezcla de antibióticos (1%)
- 50 mL de Suero fetal bobino (10%)
- 5 mL de Hepes (solución tamponadora, 1%)
- 425 mL de Agua desionizada estéril

Disolver el medio MEM en un agua desionizada estéril, posteriormente adicionar el resto de los otros reactivos. Esterilizar por filtración por membrana (Millipore) y dejar 24 horas en prueba de esterilidad.

13.1.3 Puks

- 1 L de Agua desionizada
- 0.8 g de NaCl
- 0.4 g de KCl
- 0.35 g de NaHCO₃
- 0.336 g de EDTA

Disolver las sales en agua desionizada, esterilizar por filtración por membrana con poro de 0.22 µm y envasar en frasco estéril. Poner a prueba de esterilidad durante 24h a 37°C.

13.1.4 PBS 1X (Solución buffer de fosfatos)

- 8 g de NaCl
- 0.2 g de KCl
- 1.15 g de Na₂HPO₄
- 0.2 g de KH₂PO₄

Disolver los reactivos en 800 mL de agua desionizada, ajustar a pH 7.2 y aforar a 1000 mL. Colocar en un matraz y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C.

13.1.5 Colorante de Giemsa

- 1 g de colorante de Giemsa
- 54 mL de Glicerol
- 84 mL de Metanol

Agregar el colorante al glicerol, agitar por una hora. Posteriormente agregar el metanol y continuar la agitación por una hora. Filtrar en frasco ámbar.

13.1.6 Medio MRS

Es un medio de cultivo que permite abundante desarrollo de todas las especies de Lactobacilos.

- 10 g/L Proteosa peptona N°3
- 8 g/L Extracto de carne
- 4 g/L Extracto de levadura
- 2 g/L Glucosa
- 1 mL Monoleato de sorbitan
- 2 g/L Fosfato dipotásico
- 5 g/L Acetato de sodio
- 2 g/L Citrato de amonio
- 0.2 g/L Sulfato de magnesio
- 0.05 g/L Manganeso
- 13 g/L Agar
- pH final: 6.4

Suspender 64 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar cinco minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

13.1.7 Agarosa 0.7%

- 0.7 g de Agarosa en polvo
- 100 mL de TBE 1X

En un matraz agregar la agarosa y el TBE, posteriormente fundir la agarosa (horno de microondas). Dejar que se enfríe un poco el gel y después verter en un molde para solidificar el gel y poderlo sumergir en la cámara de electroforesis.