



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**Identificación de Bacteriocinas en Microvesículas (Mvs)  
producidas por Bacterias Ácido-Lácticas (BAL), aisladas del  
tracto gastro intestinal (TGI) de *Rattus norvegicus***

**TESIS**

**Que para obtener el título de Médica Veterinaria Zootecnista**

**PRESENTA**

**Viridiana Gutiérrez Espinosa**

**ASESORA**

**Dra. Cynthia González Ruíz**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

**Identificación de Bacteriocinas en Microvesículas (Mvs) producidas por Bacterias Ácido-Lácticas (BAL), aisladas del tracto gastro intestinal (TGI) de Rattus norvegicus**

Que presenta la pasante: VIRIDIANA GUTIÉRREZ ESPINOSA

Con número de cuenta: 30910566-8 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Agosto de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate	
<b>VOCAL</b>	Dra. Esperanza García López	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Cynthia González Ruiz	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M.V.Z. Edna Maribel Legaspi Nuevo	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en C. Ernesto Marín Flamand	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

## *Agradecimientos*

Agradezco a todas las personas que estuvieron conmigo en este camino, gracias por su comprensión y apoyo, fueron parte importante del recorrido. Familia, amigas, compañero, Dra. Cynthia, fueron las columnas que me mantuvieron estable, para poder culminar con este proyecto.

Agradezco a la Dra. Mireya G. De la Garza Amaya del laboratorio de Biología Celular en el CINVESTAV por todo el apoyo brindado, así como a la Bióloga María de Lourdes Rojas Morales del Laboratorio de Microscopia Avanzada de la misma institución por su asistencia durante la experimentación del proyecto.

Agradezco al Dr. Carlos Ignacio López Zárate y al Dr. Gerardo García Tovar por toda su paciencia y conocimientos brindados, de la misma forma agradezco a todo el equipo de trabajo del Laboratorio 4 de la UIM FES-CUAUTITLÁN CAMPO 4.

Investigación realizada gracias a **Proyectos de investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IT203018** y al **Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación (PIAPI) PIAPI1639**. Agradezco a la DGAPA-UNAM por la beca recibida.

*“Pensé que el final no llegaría  
y ahora que está aquí, extraño el comienzo”*

**-VGE,2020**

## ÍNDICE

### RESUMEN

I.	INTRODUCCIÓN	
I.1.	Antecedentes.....	1
I.1.1	Importancia de <i>Rattus norvegicus</i> como transmisora de enfermedades.....	1
I.1.2	Microbiota intestinal en roedores.....	2
I.2.	Probióticos.....	3
I.2.1.	Características necesarias para considerar a un microorganismo probiótico.....	4
I.2.2.	Principales probióticos.....	4
I.2.3.	Mecanismos probióticos contra patógenos.....	5
I.2.4.	Utilidad de los probióticos en animales.....	7
I.3.	Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	8
I.3.1.	Características de las BAL.....	9
I.3.2.	Clasificación de BAL.....	9
I.3.3.	Aplicaciones biológicas de BAL en animales.....	10
1.4.	Bacteriocinas.....	12
I.4.1.	Origen celular y síntesis.....	13
I.4.2.	Bacteriocinas de BAL.....	14
I.4.3.	Clasificación de bacteriocinas.....	14
I.4.4.	Mecanismo de acción de las bacteriocinas.....	15
I.4.5.	Sustancias Parecidas a Bacteriocinas (Bacteriocin Like Sustances).....	17
I.5.	Microvesículas de membrana externa (MVs).....	17
I.5.1.	Composición.....	19
I.5.2.	Formación y liberación.....	19
I.5.3.	Funciones de las MVs.....	20
I.6.	<i>Salmonella</i> .....	21
I.6.1.	Salmonelosis.....	22
I.6.2.	Patogenia de la enfermedad.....	22
II.	JUSTIFICACIÓN.....	24
III.	OBJETIVOS.....	25

a) Objetivo General.....	25
b) Objetivos Particulares.....	25
IV.    HIPÓTESIS.....	25
V.    MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
V.1. Cepas de campo y ATCC.....	27
V.2. Condiciones de crecimiento bacteriano.....	27
V.3. Caracterización bioquímica de las cepas de BAL, mediante el sistema API 50 CHL...	27
V.4. Cinética de crecimiento ATCC y Cepa 60.....	29
V.5. Estandarización de la producción de MVs bajo condiciones de estrés.....	30
V.5.1. Uso de Antibiótico (Ampicilina 500mg AMSA).....	30
V.5.2. Uso de Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> ).....	30
V.5.3. Ausencia de Co <sub>2</sub> .....	31
V.6. Obtención de MVs.....	34
V.7. Obtención de sobrenadantes.....	34
V.8. Precipitación de proteínas por el método de purificación de proteínas en solución, en presencia de detergentes y lípidos.....	34
V.9. Cuantificación de proteínas Método de Bradford.....	35
V.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE).....	35
V.11. Tinción de Plata para SDS- PAGE.....	36
V.12 Microscopia Electrónica de Transmisión.....	36
V.12.1. Preparación de la muestra.....	36
V.12.2. Preparación de rejillas.....	36
V.12.3. Observación de las muestras.....	37
V.13. Pruebas de enfrentamiento.....	37
V.13.1 Difusión en agar con el uso de discos.....	37
V.13.2 Enfrentamiento indirecto con el uso de membrana de diálisis de las cepas ATCC <i>L. acidophilus</i> y cepa 54 la cepa de <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 154).....	38
VI.    RESULTADOS.....	39
VI.1 Identificación por sistema API 50 CHL.....	40
VI.2 Cinética de crecimiento.....	41
VI.3 Estandarización de la producción de MVs.....	42
VI.4 Microscopia Electrónica de Transmisión.....	44

VI.5. Cuantificación de proteínas método de Bradford.....	46
VI.6. Perfil electroforético de las proteínas presentes en las MVs y en los sobrenadantes.....	47
VI.7. Difusión en agar con el uso de discos.....	53
VI.8. Enfrentamiento indirecto del ATCC y cepa 64 contra el ATCC 154 <i>Salmonella typhimurium</i> .....	54
VII DISCUSIÓN.....	56
VIII CONCLUSIONES.....	62
IX LITERATURA CITADA.....	63

## RESUMEN

Las Microvesículas de membrana externa (MVes) tanto de bacterias Gram negativas como positivas, han demostrado capacidades antigénicas inmunoestimulantes y siguen siendo ampliamente estudiadas por diversos autores. Las BAL son bacterias habitantes normales de la microbiota gastrointestinal de la mayoría de mamíferos. Son consideradas microorganismos de alta estima, por su funcionalidad en la conservación y fermentación de alimentos, y al mismo tiempo por poseer una alta capacidad probiótica, además de ser productoras de bacteriocinas, péptidos de composición y tamaño variable (<10 y >30 kDa) con capacidad de inhibir bacterias patógenas y no patógenas. El presente trabajo, se enfocó en identificar bacteriocinas arrastradas en MVes de BAL; estas bacterias fueron aisladas en un trabajo previo, a partir del tracto gastrointestinal (TGI) de *Rattus norvegicus* de vida libre. Se seleccionaron 4 cepas de campo, aisladas de diferentes porciones del TGI anteriormente caracterizadas, con el género *Lactobacillus* mediante PCR e identificadas mediante el sistema API 50 CHL. En todas las cepas seleccionadas, se estandarizó la extracción de MVes, así como la composición de los sobrenadantes respectivos. Se realizaron electroforesis en geles al 12%, para las muestras de MVes y sobrenadantes, comparando entre sí todas las proteínas identificadas con el software Gene Tools, paralelamente se realizó tinción negativa de las MVes de BAL, para su visualización mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Se evaluó el efecto de MVes de BAL sobre *Salmonella typhimurium* ATCC 154, mediante la prueba de difusión en agar, a partir del uso de sensi-discos. Así mismo, se realizó un enfrentamiento indirecto utilizando membranas de 7kDa de diámetro de poro, para observar productos del metabolismo iguales o menores a este diámetro, a partir de las BAL seleccionadas, que poseían capacidad inhibitoria sobre *Salmonella typhimurium* ATCC 154. Los resultados de la MET, demostraron que todas las cepas utilizadas son productoras de MVes. Los corrimientos electroforéticos mostraron proteínas de pesos moleculares muy similares entre muestras de MVes y sobrenadantes, se evidenciaron proteínas de muy bajo peso molecular, por debajo de la banda de 10kDa del marcador de peso. Los enfrentamientos de las cepas de BAL y *S. typhimurium*, denotaron inhibición en el crecimiento de esta última, al igual que las muestras de MVes y los productos del metabolismo bacteriano. Este trabajo es el primero publicado, describiendo actividad inhibitoria de MVes de BAL, aisladas de TGI de *Rattus norvegicus* de vida libre, sobre el crecimiento de patógenos bacterianos, como *S. typhimurium*.

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1 Antecedentes

### I.1.1 Importancia de *Rattus norvegicus* como transmisora de enfermedades

Las ratas marrones (*Rattus norvegicus*) son roedores comensales que se encuentran en áreas urbanas de todo el mundo. Se han asociado con problemas higiénicos y se consideran un reservorio y vector de varios patógenos zoonóticos. Hasta el siglo XX, una de las enfermedades más temidas relacionadas con las ratas, era la peste causada por *Yersinia pestis*<sup>1,10</sup>. La rata marrón se ha adaptado a diferentes hábitats, climas y a la presencia de seres humanos, logrando vivir en zonas urbanas y agrícolas, en vida libre prefiere vivir en madrigueras que normalmente se encuentran cerca del agua. La rata noruega ha conseguido sobrevivir al ambiente, gracias a su condición omnívora y a su capacidad para equilibrar su ingesta de nutrientes bajo diferentes condiciones de alimentación<sup>2, 12</sup>.

La etología de las ratas ha hecho posible, que estos animales cohabiten con los humanos, llegando a ser poblaciones de alta densidad, aumentando de esta manera la propagación de patógenos zoonóticos<sup>10</sup>.

Algunos de los patógenos con los que se han asociado a las ratas, son *Leptospira spp.*, Toxina Shiga que produce *E.coli*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.* y *Hantavirus*. Existen numerosas formas, en que los patógenos transmitidos por roedores, pueden infectar hospedadores humanos y animales. Las principales vías de transmisión se consideran, la inhalación de aerosoles y el consumo de alimentos contaminados, así como el contacto directo, además de picaduras o infecciones a través de vectores. Incluso el agua residual contaminada con excrementos y orina de ratas infectadas en parques, ha sido identificada como una posible fuente de infección<sup>10</sup>.

### I.1.2 Microbiota intestinal en roedores.

La composición de la microbiota intestinal en la mayoría de los seres vivos es sumamente abundante y diversa. Desde décadas pasadas se ha tratado de aislar la mayor cantidad de bacterias que habitan este sistema y aunque esto no ha sido del todo exitoso, se ha logrado purificar un número reducido de éstas. La diversidad de la microbiota por porción intestinal, depende de factores ambientales externos (estrés, antibióticos, dieta y genética), así como condiciones internas (pH, disposición de nutrientes y actividad inmunitaria). Dependiendo de la porción del intestino, la colonización de bacterias se va modificando, en cuanto a su variedad y cantidad. Así podemos encontrar que, en el intestino delgado, debido a las condiciones severas, la microbiota predominante es: *Clostridium spp*, aunque también predominan los *Lactobacillus spp*, *Bacteroidetes*, *Enterococcus*, *Streptococcus Bifidobacterium spp* y *Fusobacterium spp*. Conforme se va avanzando en el tubo digestivo, la microbiota se va modificando, pues las condiciones en el intestino grueso son más favorables para bacterias anaerobias facultativas y estrictas tales como: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Peptostreptococcus* y *Ruminococcus*. Diversos agentes patógenos se han aislado del tracto gastrointestinal de ratas urbanas, gracias a esto se puede inferir que existe una convivencia entre ambos desde edades tempranas<sup>8,19</sup>.

Los principales agentes bacterianos encontrados en sistema digestivo de roedores silvestres y que representan importancia zoonótica son: *Escherichia coli* y *Salmonella spp*.<sup>17</sup> Desde 1930 se ha empleado a la rata como sujeto de experimentación, gracias a su facilidad de manejo, reproducción y mantenimiento.<sup>20</sup> El área de investigación biomédica, ha usado a la rata urbana para el estudio de síndromes y enfermedades humanas y animales. Las principales áreas de investigación incluyen la Oncología, Virología, Parasitología, Bacteriología y Endocrinología<sup>12</sup>.

La relevancia del uso de la rata urbana como modelo de estudio en diferentes áreas de investigación es debido a que son animales, como se ha mencionado anteriormente, en constante interacción con patógenos de importancia zoonótica<sup>19,20</sup>.

## I.2 Probióticos

El término probiótico deriva de la proposición latina “pro” (a favor de) y el adjetivo griego “biótico” (vida), “para la vida”. Se sabe acerca de la historia de los probióticos hace casi 10 000 años, la cual es afín a la evolución de la raza humana. El científico ruso ganador del premio Nobel, Elie Metchnikoff, a principios del siglo XX, relacionó la ingesta de leches fermentadas, con la salud y longevidad de los habitantes de una región concreta de Bulgaria. Sugirió que “la autointoxicación intestinal” y el envejecimiento resultante de la misma podrían ser suprimidos mediante la modificación de la microbiota intestinal, además desarrolló una dieta basada en leche fermentada por una bacteria a la que denominó “bacilo búlgaro”. Hasta 1965 Lily y Stilwell concretaron el término probiótico, para definir aquellos microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos de forma saludable para el individuo<sup>4,6</sup>.

En los últimos 20 años, se ha extendido el uso de probióticos en diferentes campos productivos y de investigación, gracias a los beneficios en la salud de humanos y animales. Además de su utilidad en la conservación de alimentos, disminuyendo así el uso de químicos y antibióticos en la alimentación<sup>5</sup>.

Actualmente la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), definen los microorganismos probióticos como *“microorganismos vivos que confieren efecto beneficioso para la salud del hospedador, cuando se administran en cantidad adecuada”*.<sup>4</sup> Los probióticos, son definidos como organismos “GRAS”, acrónimo de Generally Regarded As Safe., organismos generalmente reconocidos como seguros<sup>6</sup>.

Se debe establecer la diferencia entre probióticos, prebióticos y simbióticos, conceptos que, aunque parecidos, son totalmente diferentes entre sí:

- Prebióticos: ingredientes insolubles o no digeribles, fermentados selectivamente, que dan lugar a cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, confiriendo así beneficios a la salud del huésped<sup>6</sup>.
- Simbióticos: productos que contienen tanto probióticos como prebióticos<sup>6</sup>.

### **1.2.1 Características necesarias para considerar a un microorganismo probiótico.**

Los microorganismos que son considerados probióticos deben manifestar los efectos benéficos esperados, además de ser comprobados científicamente. Para ello, la FAO y OMS publicaron conjuntamente pautas que deben cumplir los microorganismos probióticos, en las que se especifican los estándares de estos productos para brindar calidad y confiabilidad adecuadas, que permitan ser consumidos<sup>6</sup>.

En primer lugar, se debe de identificar la taxonomía de la cepa y comprobar su resistencia a enzimas y pH, la adhesión al epitelio es importante para ellas ya que de esta manera logran competir con patógenos, además de tener efecto de inmunomodulación. Los probióticos deben cumplir con funciones metabólicas favorables como la fermentación de sustratos no digeribles y la formación de ácidos grasos de cadena corta, además la degradación de alérgenos y la nula actividad mutagénica. Una de las características más importantes que debe cumplir un probiótico es la inhibición de patógenos, principalmente logran esta función por la producción de sustancias antimicrobianas, así como modulando la microbiota intestinal y sus metabolitos, de esta manera resisten a una infección. Todas estas características deben ser sustentadas con estudios y evaluaciones de seguridad y eficacia<sup>6, 21</sup>.

### **1.2.2 Principales probióticos**

Los microorganismos probióticos son catalogados por género, especie y subespecie si así se da el caso. En la siguiente tabla se observa, el género y especie de las principales cepas probióticas reportadas. (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Género, especie, subespecie de los principales probióticos<sup>6,21,22</sup>.

GENERO	ESPECIE	SUBESPECIE
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus, bulgaricus, rhamnosus, casei, brevis, reuteri, herlveticus, plantarum, salivarius, johnsonii, crispatus, gasseri, paracasei, coryniformis, delbrueckii.</i>	
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	<i>lactis, cremoris</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>bifidum, longum, breve, infantis, adolescentes lactis</i>	<i>animalis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus, salivarius</i>	
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	
<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici, pentosaceous</i>	

### **I.2.3. Mecanismos probióticos contra patógenos.**

A través de los años se ha conseguido definir las acciones que los microorganismos probióticos realizan, para lograr los efectos deseados, entre estas acciones se encuentra la producción de sustancias tóxicas, reducción de pH y competición por sitios de unión. En cuanto a la acidificación, la actividad fermentativa de las bacterias ácido lácticas (BAL), reduce el pH por la producción de ácidos orgánicos, principalmente lactato, además entre la producción de sustancias tóxicas, se puede destacar la producción de bacteriocinas o peróxido de hidrógeno. Los microorganismos probióticos además de producir sustancias nocivas para las bacterias patógenas,

también compiten físicamente, este mecanismo se conoce como impedimento estérico: cuando la bacteria probiótica se une al epitelio celular, evitando que el microorganismo patógeno se una a los receptores a los que se debe adherir. En algunos casos, los nutrientes como los oligosacáridos prebióticos, juegan un papel importante para el desplazamiento de patógenos, ayudando a las bacterias probióticas en el desarrollo de probióticos endógenos. Otros nutrientes importantes como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acetato, propionato y butirato, provenientes de la fermentación llevada a cabo por las BAL, son la principal fuente de energía para los colonocitos (células epiteliales del colon, porción del intestino grueso<sup>11</sup>), los cuales regulan el desarrollo y diferenciación de los mismos<sup>4,5,6</sup>.

Otro mecanismo muy conocido de los probióticos es la producción de mucinas y la contribución a la regeneración del epitelio intestinal, cuando es sometido a algún tipo de daño. Estas acciones ayudan a la barrera intestinal donde los enterocitos y el moco, entre otras estructuras, permiten que el organismo se proteja contra microorganismos patógenos y agresiones externas<sup>6</sup>.

Además de todo lo antes mencionado, los microorganismos probióticos o sus fracciones solubles provocan la activación de la respuesta inmune innata. En cuanto estas sustancias o microorganismos llegan a la luz intestinal o bien son transportadas a través de la barrera epitelial por células M o células dendríticas (CD), comienza a darse una cascada de señales para activar dicha inmunidad. Las células inmersas en esta respuesta inmune se activan aumentando la expresión de receptores de membrana (TLR: Toll-like-Receptor) y CD206. La consecuencia de estas acciones es la producción de citosinas, interleucinas y el aumento de células secretoras de inmunoglobinas IgA<sup>6</sup>.

Si bien se sabe que las BAL en su pared celular llevan adheridos peptidoglicanos, polisacáridos y ácidos teicoicos, todos ellos con propiedades inmunoestimuladoras, no se ha descubierto cómo se lleva a cabo la interacción de estas bacterias con el epitelio intestinal para la activación del sistema inmune local<sup>6</sup>.

#### **I.2.4 Utilidad de los probióticos en animales.**

El uso indiscriminado de antibióticos, ha obligado a explorar otras alternativas con el fin de reducir su uso. Entre estas alternativas se encuentran los probióticos, prebióticos y simbióticos, los cuales representan un avance terapéutico prometedor y seguro. Se ha comprobado que estas sustancias mejoran el metabolismo, salud y producción de los animales <sup>7</sup>. Algunos de los efectos producidos por los mismos son: la estimulación de la inmunidad no específica, la inhibición de la acción tóxica y el efecto antagonista frente a microorganismos patógenos<sup>7</sup>.

Como se mencionó anteriormente, existen diversos microorganismos considerados probióticos, entre ellos se encuentran las levaduras, que en especies monogástricas, no pueden colonizar el tracto gastrointestinal pero, logran inducir efectos positivos en términos de desempeño, produciendo mananos en la estimulación de las disacaridasas, enzimas situadas en la mucosa del yeyuno, en las microvellosidades intestinales<sup>11</sup>.

El uso de antibióticos como aditivos en la alimentación animal, se consideraba una práctica habitual en décadas pasadas, se creía que de esta manera se prevenían enfermedades y se aumentaba la eficiencia alimentaria, hoy en día se sabe que este método antes de brindar beneficios altera la eubiosis del sistema gastrointestinal, además de aumentar la resistencia bacteriana, asimismo aumenta la presencia residual en carnes, leche y otros productos de origen animal <sup>8</sup>.

Diferentes investigaciones demuestran que los probióticos administrados como medicamentos o suplementos dietéticos, son eficientes en la prevención de enfermedades gastrointestinales y urogenitales. Debido a esto, se pueden encontrar diferentes presentaciones farmacéuticas de administración oral, suplementos dietéticos, soluciones de rehidratación oral, preparados para lactantes y especialidades de uso urogenital<sup>4</sup>.

### **I.3 Bacterias Ácido Lácticas (BAL).**

Desde hace miles de años, el hombre ha buscado técnicas para la preservación de alimentos. El descubrimiento de la fermentación trajo consigo el aumento de interés sobre microorganismos capaces de producir la conservación de alimentos, entre otros beneficios, por medio de productos de este proceso, donde se involucra la oxidación de los carbohidratos dando como resultado sustancias, que generalmente son, ácidos orgánicos, alcohol y CO<sub>2</sub>, las cuales limitan el crecimiento de microorganismos patógenos y deterioradores de productos alimenticios.<sup>13</sup> Existen diferentes teorías sobre cuándo se comenzó a usar a estos microorganismos como conservadores de alimentos, ya que desde el siglo XVIII, agricultores de África, Asia y Europa utilizaban la leche coagulada de días calurosos, cuando presentaba un sabor agradable, para tomarla e inocular la leche del día siguiente<sup>14</sup>.

En 1857 Louis Pasteur demostró, que todos los procesos fermentativos permitían el desarrollo de microorganismos, además señaló que cada uno de estos procesos llevaba consigo un tipo de microorganismo específico en ellos. Tiempo después en 1873, Lister dió a conocer el primer cultivo puro al que denominó "*Bacterium lactis*", por su parte Hueppe en 1884, describió la microflora responsable de la acidificación y coagulación de la leche, dándole el nombre de "Milchsauerbacillus". En 1899, Weigmamn propone el término "*Bacterium acidilactici*" para denominar a estos microorganismos fermentadores<sup>13</sup>.

Hoy en día se conoce de manera genérica, a estos microorganismos como bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales juegan un rol importante dentro diferentes áreas de la salud animal y humana, éstas han sido utilizadas desde décadas atrás como conservantes en la industria de alimentos, ya que como se mencionó anteriormente promueven la producción de sustancias antimicrobianas además de sustancias proteicas denominadas bacteriocinas<sup>6, 1</sup>.

Actualmente se comercializan cepas aisladas a partir de productos lácteos o de la leche, y muy en particular de los cultivos iniciadores artesanales.<sup>13</sup> Estos cultivos pueden clasificarse en 3 tipos: el cultivo madre, el cultivo inicial y el cultivo usual. A partir de los cultivos conocidos como estárter o puros, se da origen al cultivo madre y de éste se desarrolla el cultivo usual que es el que se utiliza en proceso fermentativos<sup>1</sup>.

### **I.3.1 Características de las BAL.**

Comúnmente la presencia de estos microorganismos en productos de origen animal, vegetales, ensilados, frutas, cerveza, vinos, derivados de panadería así como de pesca se asocia al ambiente rico de nutrientes y carbohidratos solubles, que brindan estas materias comestibles. Además, son habitantes comunes de los tractos gastrointestinales y de las mucosas de animales y humanos, así como del estiércol, aguas residuales urbanas e industriales<sup>7, 13</sup>.

Las bacterias ácido lácticas son Gram (+) por lo tanto su pared celular está formada de una capa muy gruesa de peptidoglicano, de esta manera forma múltiples capas lo que le da gran firmeza y rigidez. En su pared celular albergan ácidos teicóico y lipoteicóico<sup>24</sup>.

Es un grupo de bacterias consideradas no patógenas, no toxigénicas y fermentativas.<sup>6</sup> Su principal característica es la producción de ácido láctico como resultado de la fermentación de carbohidratos. Tienen forma de cocos o bacilos, de longitud variable de un grosor de 0.5-0.8  $\mu\text{m}$ . Son anaerobios facultativas, catalasa y oxidasa negativas y sintetizan ATP en la fermentación láctica de los glúcidos, carecen de citocromos por lo cual no tienen actividad respiratoria, y no forman esporas<sup>7, 13, 14</sup>.

### **I.3.2 Clasificación de BAL.**

En 1919 Orla-Jensen microbiólogo y químico Danés, propone la clasificación de BAL. En los últimos años se han clasificado a las bacterias ácido lácticas por diferentes características bioquímicas, temperatura de crecimiento y por el género al que pertenecen<sup>14,15</sup>.

El grupo BAL pertenece al *phylum Firmicutes* el cual es uno de los más diversos en la naturaleza teniendo alrededor de 20 géneros, Entre ellos destacan: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Streptococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulun*, *Globicatella*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*<sup>14, 6</sup>.

Aunque dentro de todos estos géneros, los más usados para la preservación de alimentos y profilaxis son: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuococcus*, *Lactobacillus* y *Carnobacterium*.<sup>6</sup> El género *Bifidobacterium* no se considera BAL ya que su taxonomía es diferente, además que no se asocia a la fermentación<sup>6</sup>.

Las bacterias ácido lácticas pueden ser clasificadas de acuerdo a sus características bioquímicas, se divide en homofermentativas y heterofermentativas. Las primeras se caracterizan por producir al final de la fermentación ácido láctico, mientras que las segundas además de ácido láctico, también originan etanol, acetato y CO<sub>2</sub><sup>7</sup>. Otra clasificación se da por la temperatura a la que estos microorganismos pueden desarrollarse , y se les denomina: mesófilos y termófilos<sup>14</sup>. En la **Tabla 2** se observa la clasificación de BAL por sus características bioquímicas y tolerancia a la temperatura.

**Tabla 2. Clasificación de BAL de acuerdo con sus características bioquímicas y tolerancia a la temperatura<sup>14, 6</sup>.**

CARACTERÍSTICA	DESCRIPCIÓN	EJEMPLO
HOMOFERMENTATIVAS	Convierten 1 mol de glucosa en 2 moles de ácido láctico, producen más del 85% a partir de glucosa	<i>Lactococcus, Pediococcus, Enterococcus, Streptococcus</i> y <i>Lactobacillus</i> . (estrictos)
HETEROFERMENTATIVAS	Producen 50% de ácido láctico, fermentan 1 mol de glucosa a un mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO <sub>2</sub> . 1 mol de ATP por 1 mol de glucosa	<i>Lactococcus, Lactobacillus (facultativos y estrictos) Enterococcus, Streptococcus, Leuconostoc</i> y <i>Pediococcus</i>
MESÓFILICAS	20-25°C temperatura ideal de incubación, en un volumen de cultivo líquido 1-2%, 18-20 horas tiempo de incubación.	<i>Lactococcus lactis, Leuconostoc mesenteroides</i>
TERMOFILAS	40-45 °C temperatura ideal de incubación. 2-3% de cultivo líquido, 24 horas de incubación.	<i>Lactobacillus lactis, L. heveticus, L acidophilus, L. casei, L. plantarum, Streptococcus salivarius subsp thermophilus.</i>

### **I.3.3. Aplicaciones biológicas de BAL en animales**

Estos microorganismos no solo son utilizados en los humanos, sino también en animales mamíferos y actualmente en peces y crustáceos<sup>7</sup>. Los animales suplementados con probióticos de BAL, muestran un incremento en la eficiencia y resistencia a patógenos.<sup>7,16</sup> Algunas de las especies mayormente estudiadas respecto a los efectos positivos brindados por las BAL, son los rumiantes, entre ellos los bovinos, ovinos y cabras. En los primeros se ha observado una mejora en la producción de leche en vacas Holstein (mezclando simbióticos y probióticos en la dieta). Así como en las demás especies, el aumento de ganancia de peso, promoción del crecimiento, disminución del estrés, estimulación de la respuesta inmune, inhibición de patógenos, tal es el caso de *Salmonella sp*, y prevención de diarrea<sup>16</sup>. Una de las sustancias más estudiadas de BAL, que forma parte de los constituyentes inhibitorios de las mismas y que por lo consiguiente logra dar algunos de los beneficios buscados de estos microorganismos, son las proteínas conocidas como bacteriocinas. Estos inhibidores requieren de rigurosos estudios sobre la forma en la que funcionan, ya que en la mayoría de los casos se han utilizado cepas asiladas del ser humano o de mamíferos, para su comercialización, usándose en otras especies animales<sup>7</sup>. Estos beneficios se dan gracias a las formas en las que los probióticos de BAL, detienen el crecimiento de agentes patógenos, además de beneficiar a las células intestinales, lo que estimula a la absorción de nutrientes, así mismo en los rumiantes el uso de probióticos lácticos incrementa las concentraciones de amoníaco en el rumen, aumenta la digestibilidad de la fibra y del nitrógeno, aumentan la purinas y los conteos de flora intestinal nativa<sup>16</sup>.

### **I.4 Bacteriocinas**

El término “bacteriocina” se ha modificado a través de los años, a pesar de ello los investigadores de este tema, han reconocido dos importantes características: son sustancias de origen proteico y tienen efectos antimicrobianos. Se sabe que las primeras bacteriocinas identificadas fueron las “colicinas”, las cuales se aislaron de una cepa de *E. coli* por Andre Gratia en 1925<sup>1, 6, 23</sup>.

En 1953, Jacob y colaboradores se refieren a las bacteriocinas como “sustancias proteicas con actividad antimicrobiana de origen bacteriano”. Años después, Tagg y colaboradores definen a las bacteriocinas como un grupo de sustancias antimicrobianas de origen bacteriano, caracterizadas

por poseer un componente proteico biológicamente activo y por ejercer un modo de acción bactericida<sup>6</sup>.

En las últimas décadas se han desarrollado diversas investigaciones para poder producir y purificar a las bacteriocinas, además de analizar sus propiedades bioquímicas, bactericidas y espectro de inhibición, ya que tanto el sector industrial como la comunidad científica han demostrado cada vez mayor interés en estos péptidos y la diversidad de beneficios que otorgan <sup>1</sup>.

#### **I.4.1 Origen celular y síntesis**

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de origen ribosomal que son secretados al medio extracelular producidos por un gran número de bacterias, se cree que aproximadamente el 99% de estos microorganismos secretan por lo menos una bacteriocina. Las modificaciones post-traduccionales hacen que el grupo de las bacteriocinas sea muy diverso en cuanto su efecto sobre bacterias del mismo género (espectro bajo o estrecho) y género diferente (amplio espectro) dándoles efectos bacteriostáticos o bactericidas según sea el caso<sup>6,1</sup>.

La bacteria productora de bacteriocinas auto limita su función para no ser agredida por el péptido producido, la producción de estas proteínas se da de forma natural durante la fase logarítmica o al final de esta y la cantidad de bacteriocinas se relaciona con la cantidad de células productoras. Aunque se sabe que en la fase logarítmica se da la mayor síntesis de bacteriocinas también es conocido que si la célula productora se encuentra bajo estrés la producción del péptido aumenta, las causas de estrés pueden ser un ambiente inadecuado, falta de oxígeno o gran cantidad de él, falta de nutrientes, pH, temperatura, etc. Las bacteriocinas pueden dejar de ser funcionales por enzimas como la tripsina y pepsina<sup>1,6</sup>.

En la célula productora las bacteriocinas se sintetizan como pre-péptidos llevando en su región N-terminal, un péptido señal, el cual mantiene inactivo al pre-péptido y de esta manera facilita su interacción con la proteína transportadora. Estas proteínas transportadoras retiran el péptido señal por medio de proteólisis durante el transporte hacia el espacio periplásmico, según sea el caso. Aunque no son las únicas que pueden removerlo, ya que en la membrana externa existen proteínas Serina-proteasa que también pueden llevar a cabo esta acción. Una vez retirado el péptido señal y llegando al espacio extracelular, se considera biológicamente activo<sup>23</sup>.

#### I.4.2 Bacteriocinas de BAL

Las bacteriocinas producidas por BAL son las que han despertado un mayor interés en la industria alimentaria y recientemente en el área biomédica, por lo cual son las más estudiadas. Un ejemplo de ello es la Nisina bacteriocina aislada de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, por Roger en 1928 siendo la primera en ser aprobada como segura y comercializada hasta 1968<sup>23,24</sup>.

Hoy en día se conoce la estructura primaria de diferentes bacteriocinas de BAL gracias a su purificación, caracterización y secuenciación genómica. La estructura de estos péptidos está basada en aminoácidos principalmente alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, prolina y triptófano, esto les confiere una naturaleza hidrofóbica. A pesar de contener en su estructura mayormente aminoácidos se debe tener en cuenta la presencia de aminoácidos modificados como la lantionina y  $\beta$ -metil lantionina, los cuales son de importancia a la hora de clasificarlas<sup>1,6,24</sup>.

#### I.4.3 Clasificación de bacteriocinas.

Para clasificar a las bacteriocinas se toma en consideración propiedades físico-químicas, tamaño, espectro de inhibición y presencia de aminoácidos modificados. De esta manera se han formado 4 grupos<sup>6,7,8,9</sup>.

**Lantibióticos (Clase I)** Péptidos termostables de bajo peso molecular (<5kDa), realizan modificaciones post-traduccionales. Esta clase se divide en dos: Tipo A péptidos largos con carga positiva, estos péptidos ejercen acción formando poros en las membranas. Tipo B péptidos globulares aún más pequeños teniendo carga negativa o sin ella, su acción sobre otras bacterias se relaciona con enzimas específicas.

- **Clase II.** Esta clase se diferencia por no contener lantionina, son termoestables y pequeños (<10 kDa), esta clase se subdivide en tres: Clase IIa, IIb y IIc.
  - Clase IIa. En esta clase se encuentra la pediocina, es uno de los grupos con mayor atención debido a que esta bacteriocina tiene actividad anti-Listeria.
  - Clase IIb. Son bacteriocinas formadas por dos péptidos, un ejemplo de esta subclase es la plantaricina.
  - Clase IIc. Contiene los demás péptidos restantes de esta clase.

- **Clase III.** Proteínas grandes (> 30 kDa), termolábiles. Estas no se encuentran bien caracterizadas.
- **Clase IV.** Bacteriocinas complejas que requieren carbohidratos o lípidos para su actividad.

Cada uno de los grupos contiene bacteriocinas representativas, como se observa en el **Tabla 3**.

**Tabla 3. Bacteriocinas representativas de cada clase<sup>24,6</sup>.**

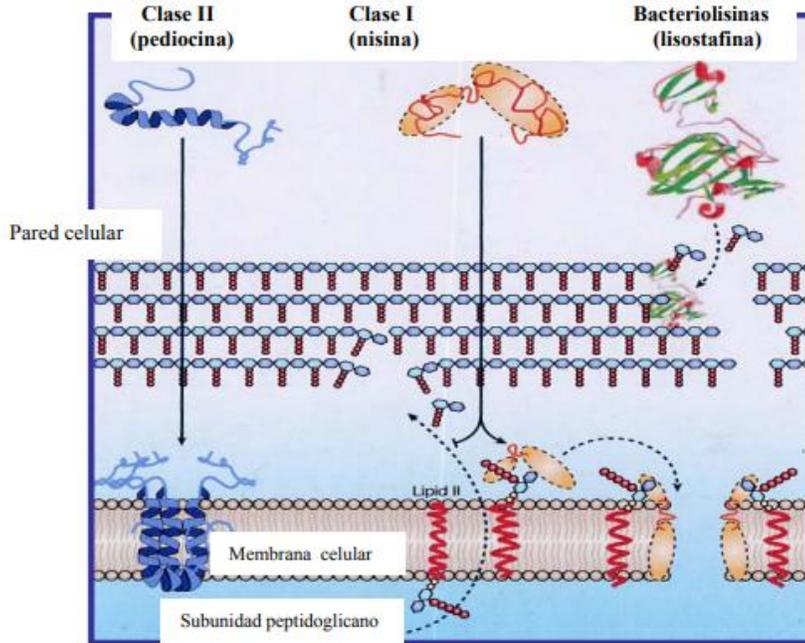
Clase	Bacteriocina	Espectro de inhibición	Microorganismo productor	Número de aminoácidos
Clase I Lantibióticos	Nisina (A yZ)	Amplio	<i>Lactococcus lactis</i>	34
	Lactocina S	Amplio	<i>Lactobacillus sake</i>	37
	Lacticina 481	Amplio	<i>L. lactis</i>	27
Clase IIa	PediocinaPA1/AcH	Amplio	<i>Pediococcus acidilactici</i>	44
	Sakacina P	Amplio	<i>L.sake</i>	41
	Enterocina A	Estrecho	<i>Enterococcus faecium</i>	44
Subclase IIb	Lactocina A	Estrecho	<i>L. lactis</i>	54
	Plantaricina A	Amplio	<i>Lactobacillus plantarum</i>	34
Subclase IIc	Enterocina P	Estrecho	<i>Enterococcus faecium</i>	44
Clase III	Helveticina J	Estrecho	<i>Lactobacillus helveticus</i>	333

Modificado: Lara (2018), Lordoño (2015)

#### **1.4.4 Mecanismo de acción de las bacteriocinas.**

Es sabido que las bacteriocinas tienen la capacidad de inhibir a microorganismos patógenos y no patógenos, dependiendo del espectro de inhibición que el péptido posea. El mecanismo de acción más conocido es la permeabilización de la membrana celular, este efecto provoca la disminución de reservas energéticas lo que desemboca en la baja de producción de macromoléculas entre ellas, proteínas, DNA y RNA. Este proceso se inicia con la realización de poros en la membrana y de esta manera se comienza a atraer bacteriocinas a la bacteria blanco gracias a fuerzas electrostáticas, ya que las bacteriocinas están cargadas positivamente e interactúan con las bacterias de carga negativa. Su naturaleza anfipática facilita su distribución en la membrana celular. La bacteriocina se une de su región N-terminal (región hidrofílica) a la región C-terminal (hidrofóbica) de la célula blanco de esta manera penetra la membrana celular, causando poros en

la membrana y generando así la pérdida de iones K, aminoácidos y moléculas de bajo peso molecular, lo cual a la larga produce la muerte celular. A pesar de que la permeabilización de la membrana es el mecanismo de acción más común de las bacteriocinas. Se sabe que la nisina (Clase I) puede atravesar la membrana por su carácter anfipático, pero además de ello se une al lípido II que es el principal transportador de las subunidades de peptidoglicano y de esta manera evita la formación de la pared celular. La clase II también utiliza la despolarización de la membrana como mecanismo de acción, pero en el caso de la clase III como la lisostafina, pueden actuar directamente en la pared celular produciendo lisis bacteriana<sup>1, 25</sup>. En la **Figura 1** se observa el proceso que sigue cada clase de bacteriocina para ejercer su acción bacteriostática o bactericida.



**Figura 1.** Mecanismo de acción de las bacteriocinas.  
Llorente., 2008.

#### **I.4.5 Sustancias Parecidas a Bacteriocinas (Bacteriocin Like Substances)**

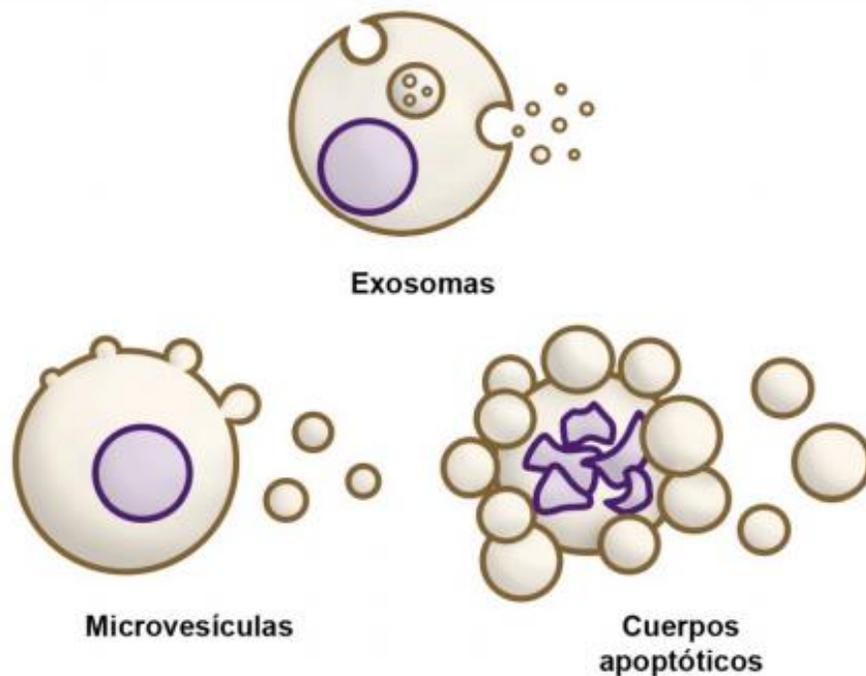
Existen muchos péptidos con un tamaño que oscila entre los 10 y 30 kDa y otras sustancias con mayor tamaño que poseen características antimicrobianas, a pesar de sus propiedades no están clasificadas dentro de ninguna de las clases de las bacteriocinas debido a lo poco caracterizadas que se encuentran, debido a esto son consideradas como “BLIS” acrónimo de Bacteriocin Like Substances o Sustancias Parecidas a Bacteriocinas. El término BLIS se utiliza para categorizar a las sustancias que tienen efectos antagónicos pero que no se tiene la suficiente caracterización para cumplir con alguna de las clases. Por lo tanto, los investigadores han reservado el término bacteriocina para sustancias que cumplan al menos dos criterios primordiales: Tener naturaleza proteica y presentar actividad antimicrobiana<sup>23</sup>.

#### **I.5 Microvesículas de membrana externa (MVs).**

Históricamente, la falta de interés en las MVs en bacterias Gram-positivas, micobacterias y hongos en comparación a las de bacterias Gram-negativas se debe principalmente a la deducción de que la gruesa pared celular de estos microorganismos, imposibilitaban su existencia<sup>2</sup>. Aunque las MVs de las Gram positivas se descubrieron 30 años después que a homologas (Gram negativas) este reciente descubrimiento ha llamado fuertemente la atención en los últimos años. Existen diferentes estudios sobre el principal papel, que éstas juegan a partir de diferentes géneros bacterianos, estableciéndose como función común, el interactuar con células procariontas y eucariotas en su entorno<sup>2,3</sup>.

Algunos autores han clasificado el tipo de vesículas externas (VE) que las células pueden producir, ya que hace algunas décadas se creía que las MVs de menor tamaño, eran remanentes de las células muertas. La Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV), sugirió utilizar el término “vesículas extracelulares” para todas las vesículas que se encuentran en el medio extracelular. De esta manera se ha compuesto una clasificación basada en el tamaño, morfología, mecanismo de liberación y composición bioquímica, con 3 grupos donde se han insertado todas las VE conocidas, en la **Figura 2** se observan ejemplos de cada grupo<sup>27</sup>.

- **Exosomas:** son la VE más pequeñas de los tres grupos, su tamaño va de los 30 – 100 nm, son liberadas por vía endosomal, su membrana presenta una mínima cantidad de fosfatidilserina. (PS)
- **MVs:** Su tamaño va desde los 100nm- 1 $\mu$  su liberación se da por una evaginación de su membrana
- **Cuerpos apoptóticos:** su tamaño fluctúa entre 1-5  $\mu$ m son liberados como vesículas después de que la célula muere, a pesar de ello los cuerpos apoptóticos poseen orgánulos celulares, así como material genético, además de presentar PS en la superficie.



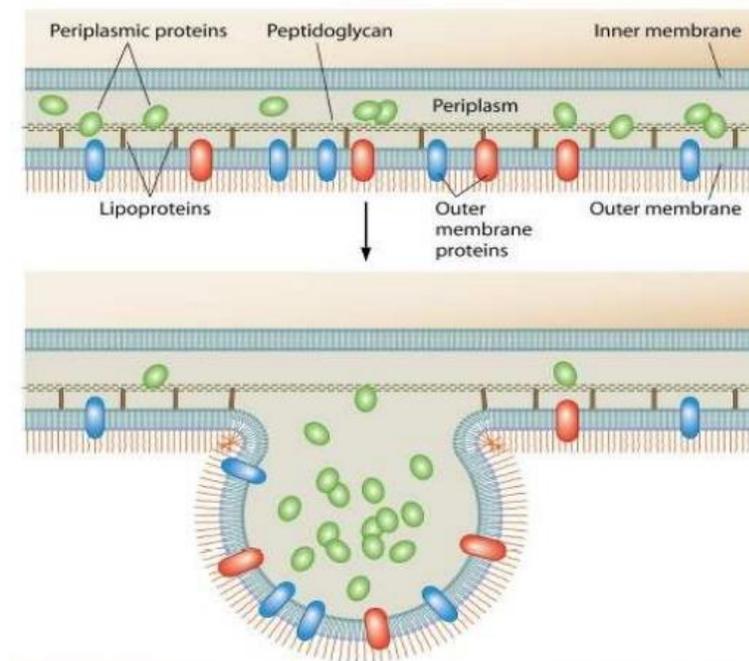
**Fig.2.** Ejemplos de cada vesícula extracelular.  
 Añón, J. C *et.al.* 2018

### **I.5.1 Composición.**

En las bacterias Gram (-) se sabe que la formación de MVs se da por una evaginación de su membrana externa y contenido periplásmico. Debido a la gruesa pared celular de las Gram (+) aún se está confirmando en su totalidad esta hipótesis ya que se considera que en el plegamiento intervienen enzimas que degradan el grueso péptidoglicano y de esta manera se facilita su liberación. Las dimensiones de estas estructuras van desde los 50 a 250 nm de diámetro, con algunas variaciones por cepa. En bacterias Gram negativas la composición es muy similar a su membrana externa, conteniendo proteínas de membrana externa, fosfolípidos y componentes del periplasma. Por esto se puede asumir que el contenido de las MVs de bacterias Gram positivas es muy similar, ya que dentro de ellas se encuentran componentes propios de la célula productora, como proteínas, lípidos y se cree que también logran contener ácidos nucleicos<sup>26, 27</sup>.

### **I.5.2 Formación y liberación**

Como se mencionó previamente las MVs son secretadas por la célula productora por evaginación lo cual implica todo un proceso para la liberación de las mismas. Este proceso se desarrolla desde el reordenamiento del citoesqueleto y de fosfolípidos, estos últimos normalmente se encuentran en la parte interna de la membrana y se reubican en la parte externa, quedando expuestos; además de esto la membrana realiza una curvatura y de esta manera el proceso concluye con la liberación de microvesícula. En la **Figura 3** se puede observar el proceso de liberación de MVs en bacterias Gram negativas. La formación de microvesículas llega a su punto máximo en la fase logarítmica de la bacteria productora, además existe mayor producción de MVs en las zonas de división celular. Se ha comprobado que la producción de MVs se ve aumentada, cuando se somete a periodos de estrés a las células productoras<sup>27</sup>.



**Figura 3.** Composición de MVs. Se observa que la microvesícula contiene material del periplasma, proteínas de membrana externa, lípidos y factores de virulencia. Modelo basado en bacterias Gram negativas. Portas Torres, 2016.

### I.5.3 Funciones de las MVs.

Se les atribuye numerosas funciones biológicas como la liberación de toxinas, la modulación del sistema inmune, el transporte de moléculas de señalización entre células bacterianas y la formación de biofilms<sup>2, 8, 9</sup>. Los factores de virulencia de las bacterias patógenas Gram (-), en la mayoría de los casos son productos secretados que ayudan a la sobrevivencia de la bacteria dentro del hospedero y permiten evadir la respuesta inmune del mismo<sup>3</sup>. Actualmente se reconoce, que las bacterias Gram (-) y Gram (+), producen vesículas de membrana externa (MV), como un sistema de secreción bacteriano en cualquiera de sus fases de crecimiento<sup>4</sup>. Las MVs son el medio natural mediante el cual se realiza el transporte intercelular directo de factores de virulencia bacterianos en células y tejidos del huésped<sup>2,3</sup>.

Se han identificado dentro de tejidos del huésped vesículas procedentes de bacterias patógenas extracelulares e intracelulares, lo cual demuestra que las MVs poseen una alta capacidad para ingresar a los tejidos. Los factores que exponen en su superficie, llegan a regular su adhesión a células eucariotas, además logran internalizar el material que se encuentra dentro de ellas, de esta manera la interacción entre la vesícula y la célula del huésped puede ocurrir mediante la unión de membranas o por uniones mediadas por receptores. La capacidad de liberar todo su contenido interno de las MVs contribuye a las infecciones de bacterias patógenas ya que produce citotoxicidad y respuestas inmunes innatas, además de adaptativas<sup>27</sup>.

Las MVs de bacterias no patógenas han sido consideradas benéficas, puesto que llegan a tener funciones protectoras, ejemplo de ello es la liberación de posibles fagos que atacan a otras células<sup>27</sup>.

Un ejemplo de bacterias no patógenas productoras de MVs son los *Lactobacillus sp*, estas bacterias son conocidas por sus beneficios probióticos y recientemente se comprobó que son productoras de MVs, las cuales ejercen de forma similar, las funciones propias de MVs patógenas. Entre las similitudes con bacterias patógenas se encuentra la estimulación del sistema inmune innato, activando TLR2 / 1 y TLR4 mientras se suprime la señalización TLR2 / 6<sup>3</sup>.

#### **1.6. *Salmonella sp.***

*Salmonella* es un habitante normal del tracto gastrointestinal de mamíferos y aves, forma parte de la familia Enterobacteriaceae, Gram negativos, la cual se caracteriza por poseer una morfología bacilar, con flagelos, lo que les confiere movilidad, aunque los serotipos *pullorum* y *gallinarum* carecen de ellos. Estos bacilos son productores de gas y fermentadores de glucosa, resultan positivos en la prueba de catalasa y negativos en oxidasa, no son esporulados y tienden a crecer bajo condiciones aerobias, aunque también se adaptan a medios parcialmente anaerobios. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, aunque pueden sobrevivir desde los 5 hasta los 47°C. Este género es sumamente sensible a temperaturas por encima de los 70°C<sup>28, 29</sup>.

Se sabe que *Salmonella* se ha agrupado en dos especies, *S. entérica* y *S. bongori*, siendo la de mayor importancia por su capacidad patogénica *S. enterica* teniendo más de 2600 serotipos descritos. *S. entérica serovar typhimurium* y *S. entérica serovar enteritidis* son dos de los serotipos

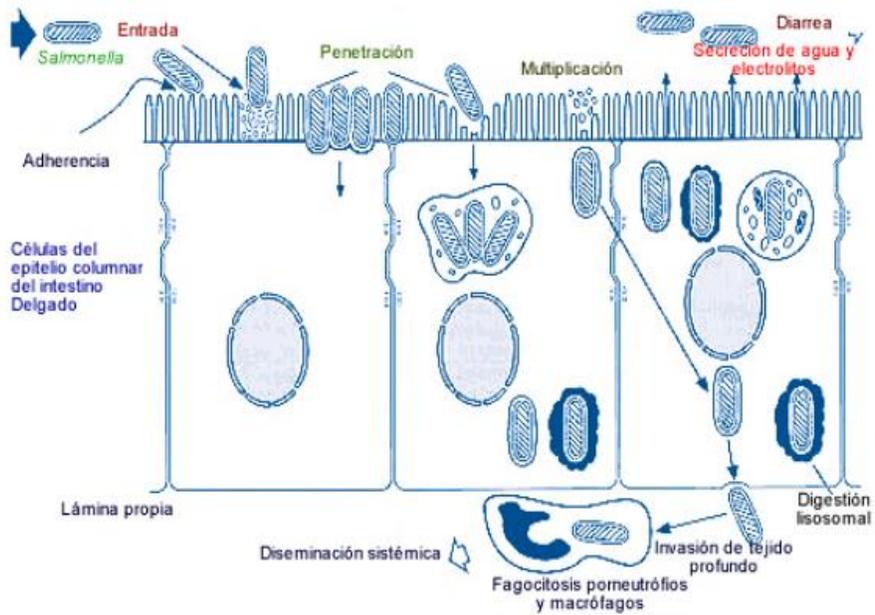
más importantes, ya que poseen un amplio rango de especies afectadas, al contrario de *S. entérica serovariedad typhi*, que es propia del humano<sup>30</sup>.

### **I.6.1 Salmonelosis**

La salmonelosis es una enfermedad entérica de gran importancia en animales y humanos. Esta enfermedad se distribuye a nivel mundial, siendo los países tercermundistas los más afectados. Se considera una de las ETA's (Enfermedades Transmitidas por Alimentos) de más relevancia por su morbilidad y mortalidad en infantes, su vía de transmisión comúnmente, es por contacto directo o por contaminación cruzada durante la manipulación de los alimentos, así como del agua. Esta enfermedad puede ser evitada si se realizan buenas prácticas de higiene y cocción en los alimentos. La enfermedad se desarrolla con mayor facilidad si el humano o animal se mantiene bajo periodos de estrés, o si existe disbiosis en la microbiota gastrointestinal, además dependerá de la virulencia de la cepa con la que se ha infectado<sup>29, 30, 31</sup>.

### **I.6.2 Patogenia de la enfermedad.**

La bacteria es ingerida por vía oral, resistiendo el pH estomacal logra atravesar el resto del tracto intestinal, por lo general realiza una adhesión e internalización en las células epiteliales del íleon, sobrevive a la fagocitosis por macrófagos y células dendríticas, evade la actividad lítica de los componentes lisosomales y de esta manera logra multiplicarse y propagarse en el tejido intestinal o en el resto del organismo, causando de esta manera una infección local o sistémica. En la **Figura 4** se observa de manera detallada la patogenia de *Salmonela*<sup>28, 3</sup>.



**Figura 4.** Patogenia de *Salmonella* sp. Se observa la vía que sigue la bacteria para lograr invadir células epiteliales y tejidos profundos, para dar lugar a una infección sistémica. Parra, M, et. al 2002.

## II.JUSTIFICACIÓN

Las BAL producen una serie de sustancias, resultado de su metabolismo durante la fermentación láctica, las cuales pueden tener efectos sobre las células blanco. Uno de estos metabolitos son las bacteriocinas, que participan en la inhibición de microorganismos patógenos, que se encuentran dentro de su entorno. Las bacteriocina se secreta en la fase logarítmica de la célula productora y en condiciones de estrés, aumenta drásticamente su síntesis.

Hoy en día se sabe que las BAL producen MVs, las cuales se liberan mediante evaginación de su membrana entre otros mecanismos, que aún no se comprueban en su totalidad. Las MVs arrastran constitutivamente, una gran cantidad de sustancias durante su proceso de formación, mismas que podrían corresponder a productos del metabolismo o bien a factores de virulencia producidas por las bacterias Gram positivas. Las MVs, son capaces de inmunoestimular, además de realizar funciones de transporte, señalización y liberación de toxinas. Estas estructuras son liberadas en mayor cantidad durante la fase logarítmica del microorganismo productor.

De tal modo que, las MVs de BAL podrían contener bacteriocinas secretadas, en su fase logarítmica. Las BAL de *Rattus norvegicus*, desarrollan protección local en esta especie principalmente contra agentes patógenos como *Salmonella sp.* y *Echerichia coli* entre otros. Esta habilidad le confiere protección, debido a la acción probiótica de las mismas. Por lo que, las MVs de BAL, podrían conservar la misma capacidad probiótica, al formarse a partir del plegamiento de la membrana de la bacteria completa. Este proyecto, pretende obtener un producto con características probióticas, a partir de MVs de BAL, que se pueda administrar a las diferentes especies, con la finalidad de desarrollar protección inmune local, y evite el desarrollo de patologías intestinales, así como del constante uso de antibióticos.

### III. OBJETIVOS

#### a) **Objetivo general**

Identificar bacteriocinas en microvesículas (MVs) producidas por bacterias ácido lácticas (BAL), aisladas del Tracto Gastrointestinal Intestinal (TGI) de *Rattus norvegicus*.

#### b) **Objetivos particulares**

- Obtención de MVs de BAL, mediante ultrafiltración y ultracentrifugación a partir de sobrenadante de cultivo bacteriano.
- Observar mediante microscopía electrónica de transmisión, MVs de BAL.
- Determinar mediante SDS-PAGE al 12%, la presencia de proteínas similares a las bacteriocinas.
- Observar el efecto de los sobrenadantes y MVs de BAL, al enfrentarlas a *Salmonella typhimurium* ATCC 154.

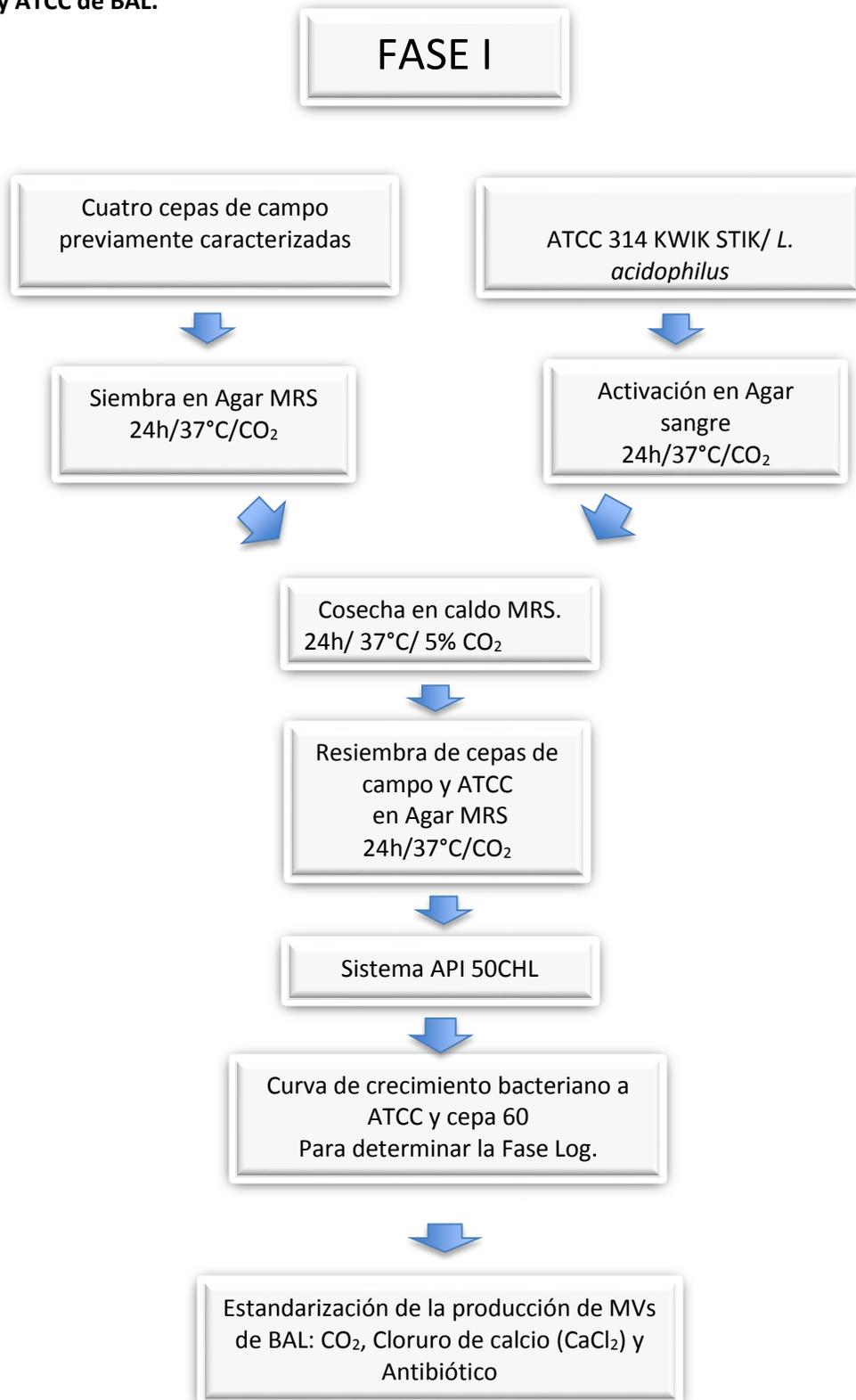
### IV. HIPÓTESIS

Las bacterias Gram (+) y (-), forman a partir del plegamiento de su membrana, estructuras denominadas microvesículas, las cuales arrastran constitutivamente factores de virulencia e inmunoestimulantes durante su proceso de formación. Si las MVs producidas por BAL, arrastran bacteriocinas, entre otros factores secretados durante su crecimiento, entonces podrían tener efecto sobre el crecimiento de enterobacterias patógenas.

### V. MATERIALES Y METODOS

La metodología del presente proyecto, se dividió en tres fases. La Fase I, se basó en la estandarización, purificación y caracterización de cuatro cepas de campo, aisladas en un trabajo previo, a partir del tracto gastrointestinal (TGI) de *Rattus norvegicus*, de vida libre. A continuación, en el **Esquema 1**, se muestra el desarrollo del proceso que siguieron las cepas de campo y la cepa ATCC de BAL.

**Esquema 1. Proceso de estandarización, purificación y caracterización de las cepas de Campo y ATCC de BAL.**



### **V.1 Cepas de campo y ATCC**

Se utilizó como control positivo, una cepa ATCC de BAL: *Lactobacillus acidophilus*, cepa 314 KWIK STIK y cuatro cepas de campo obtenidas en un trabajo previo, a partir de aislamiento del TGI de *Rattus norvegicus* de vida libre, en el cual se amplificó el gen 16S mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para determinar si las cepas concordaban con BAL.

### **V.2 Condiciones de crecimiento bacteriano.**

La cepa ATCC de BAL se sembró en medio Agar sangre 24h/ 37°C/ CO<sub>2</sub>, para posteriormente ser resembrado, en 250 ml de caldo De Man Rogosa y Sharp (MRS), creciendo bajo las mismas condiciones. A partir de ese momento, se realizaron resiembras semanales de la misma, con la finalidad de mantenerla viable para los experimentos posteriores.

Las cepas de campo fueron identificadas con números al ser aisladas de cada porción del TGI. En el presente trabajo se utilizaron las cepas 64, 60, 55 y 54; las cuales se aislaron de Recto, Colon, Ciego e íleon, respectivamente. Se recibieron en primo cultivos los cuales se sembraron en Agar MRS y posteriormente en caldo MRS al igual que con ATCC sus condiciones de crecimiento fueron 24h/ 37°C/ CO<sub>2</sub>. Las cepas de campo fueron resembradas por semana en agar MRS para conservarlas viables durante el experimento.

### **V.3 Caracterización bioquímica de las cepas de BAL, mediante el sistema API 50 CHL.**

Una vez que las cepas se mantuvieron constantes en su crecimiento, se sembraron en 7ml de caldo MRS, en tubos cónicos de poliestireno de 15 ml (Falcon Corning), sometiendo el cultivo a 24h, 37°C con CO<sub>2</sub>. Al término de este periodo, se realizó tinción de Gram (KIT/marca) para confirmar su pureza y morfología al mismo tiempo se realizaron pruebas para afirmar sus características, catalasa y oxidasa negativas. Los tubos se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min a 4°C, y al término de ésta, el sobrenadante se decantó, conservando el botón celular para ser resuspendido en medio API (**Tabla 3**), bajo condiciones de esterilidad.

Se prepararon las cámaras de incubación del sistema API 50 CHL repartiendo aproximadamente 10 ml de agua destilada para llenar los recipientes de fondo y así crear una atmosfera húmeda. Posteriormente se colocaron las tiras que contienen los tubos de cada fila, hasta llenar la galera, la cámara se marcó con el número de cepa.

El botón celular se homogenizó mediante agitación en vortex y se procedió a llenar los tubos hasta la marca establecida, evitando formar burbujas dentro del mismo. Finalmente, los tubos, se sellaron agregando aceite mineral estéril hasta cubrir por completo la cúpula. Las cámaras de incubación se mantuvieron con 37°C/ CO<sub>2</sub>. Se realizó la primera lectura, a las 24 horas marcando como positivo, negativo e inconcluso cada tubo, los datos fueron ingresados al APIweb™. Para un resultado previo. La incubación a 37°C con CO<sub>2</sub> avanzó hasta las 48h, los resultados se vaciaron en el software antes mencionado y de esta manera se obtuvo el género y especie de cada cepa, siguiendo la guía de colorimetría presentada por el software (**Imagen 1**)

**Tabla 4. Composición del medio API 50 CHL**

API 50 CHL Medium 10 ml	Polipeptona	10g (origen
	bovino/porcino)	
	Extracto de levadura	5 g
	Tween80	1 ml
	Fosfato dipotásico	2 g
	Acetato sódico	5 g
	Citrato diamónico	2 g
	Sulfato de magnesio	0.20 g
	Sulfato de manganeso	0.05 g
	Purpura de bromocresol	0.17 g
	Agua desmineralizada	1000 ml
	pH 6.7-7.1	



**Imagen 1.** Ejemplo de la reacción colorimétrica resultante de pruebas positivas y negativas, a la prueba bioquímica API 50 CHL (APIweb™). A la izquierda pruebas negativas y a la izquierda positivas.

#### V.4 Cinética de crecimiento Cepa 60 y ATCC

La cepa 60 y cepa ATCC fueron sembradas por estría cerrada en Agar MRS 24h/37°C/CO<sub>2</sub>. Una vez que se confirmó que las cepas estaban puras mediante tinción de Gram, se cosecharon agregando 2 ml de medio MRS estéril a la caja y con el asa se recolectó todo el crecimiento bacteriano, mediante micropipeta en condiciones estériles y éste se colocó en un matraz Erlenmeyer que contenía previamente 50 ml del medio MRS estéril. Posteriormente se reincubó el cultivo en las constantes ya mencionadas. De ese último cultivo, se tomó 1 ml y se agregó a 12 tubos cónicos de poliestireno de 15 ml (Falcon Corning) previamente cargados con 7 ml de MRS. Los tubos fueron marcados del 1-12 y se incubaron a 37°C en presencia de CO<sub>2</sub>. El tubo número 1, fue leído mediante espectrofotometría, inmediatamente después de ser cultivado, a una longitud de onda de 540nm.

Cada media hora se realizó la lectura de los siguientes tubos, siguiendo un orden ascendente para concluir con el tubo 12. Los resultados se graficaron para determinar el tiempo en el que cada cepa,

alcanzaba su fase logarítmica de crecimiento franco. En esta gráfica, se utilizó como blanco, caldo MRS sin cultivar.

En el presente trabajo, se determinó evaluar diferentes variables para inducir estrés en los cultivos de las cepas utilizadas, alterando mínimamente su crecimiento, con la finalidad de aumentar la producción de MVs. Lo anterior, debido a que está ampliamente reportado, que las bacterias Gram negativas, al someterse a estímulos estresantes durante su crecimiento, induce una mayor producción de MVs. En el presente proyecto, las BAL de campo y la cepa ATCC, se sometieron a una dosis subléctica de antibiótico, presencia de  $\text{CaCl}_2$  y ausencia de  $\text{CO}_2$ . Además de las variables mencionadas, se usó como control positivo el crecimiento de ambas cepas sin agregar ninguna variable, es decir se evaluaron al tener las condiciones óptimas de crecimiento.

## **V.5 Estandarización de la producción de MVs bajo condiciones de estrés.**

### **V.5.1 Uso de Antibiótico (Ampicilina 500mg AMSA)**

Se sembró la cepa 60 y la cepa ATCC / *L. acidophilus*, en cajas de Agar MRS por estría cerrada, se incubaron por 24h /37°C/  $\text{CO}_2$ , transcurrido ese tiempo se cosecharon en 250 ml de caldo MRS agregando 5µg/5µl de Ampicilina, a la 5<sup>ta</sup> hora de cultivo y se mantuvo bajo las mismas condiciones de cultivo hasta cumplir las 24h. Al término de éste, se tomó una alícuota de 50µl, con la finalidad de hacer una dilución doble en 5 tubos con 5ml de caldo MRS. Posteriormente, de cada tubo se tomaron 100µl y se sembraron en cajas con agar MRS, marcadas previamente con el número de tubo que le correspondía (**Esquema 2**). Las cajas se crecieron bajo las condiciones antes descritas.

### **V.5.2 Uso de Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )**

En la variable de  $\text{CaCl}_2$ , el proceso de crecimiento, dilución y cuenta viable fue exactamente el mismo que el del puntoV.4.1, siendo la única modificación, la adición de 2ml de  $\text{CaCl}_2$  0.5 M a la 5<sup>ta</sup> hora de crecimiento del cultivo.

### V.5.3 Ausencia de CO<sub>2</sub>

Los cultivos de la cepa 60 y la ATCC *L. acidophilus*, se incubaron a 24h /37°C/ en ausencia de CO<sub>2</sub>. Una vez obtenidos los cultivos, se realizaron las diluciones y la cuenta viable, en las mismas condiciones que en las variables evaluadas anteriormente.

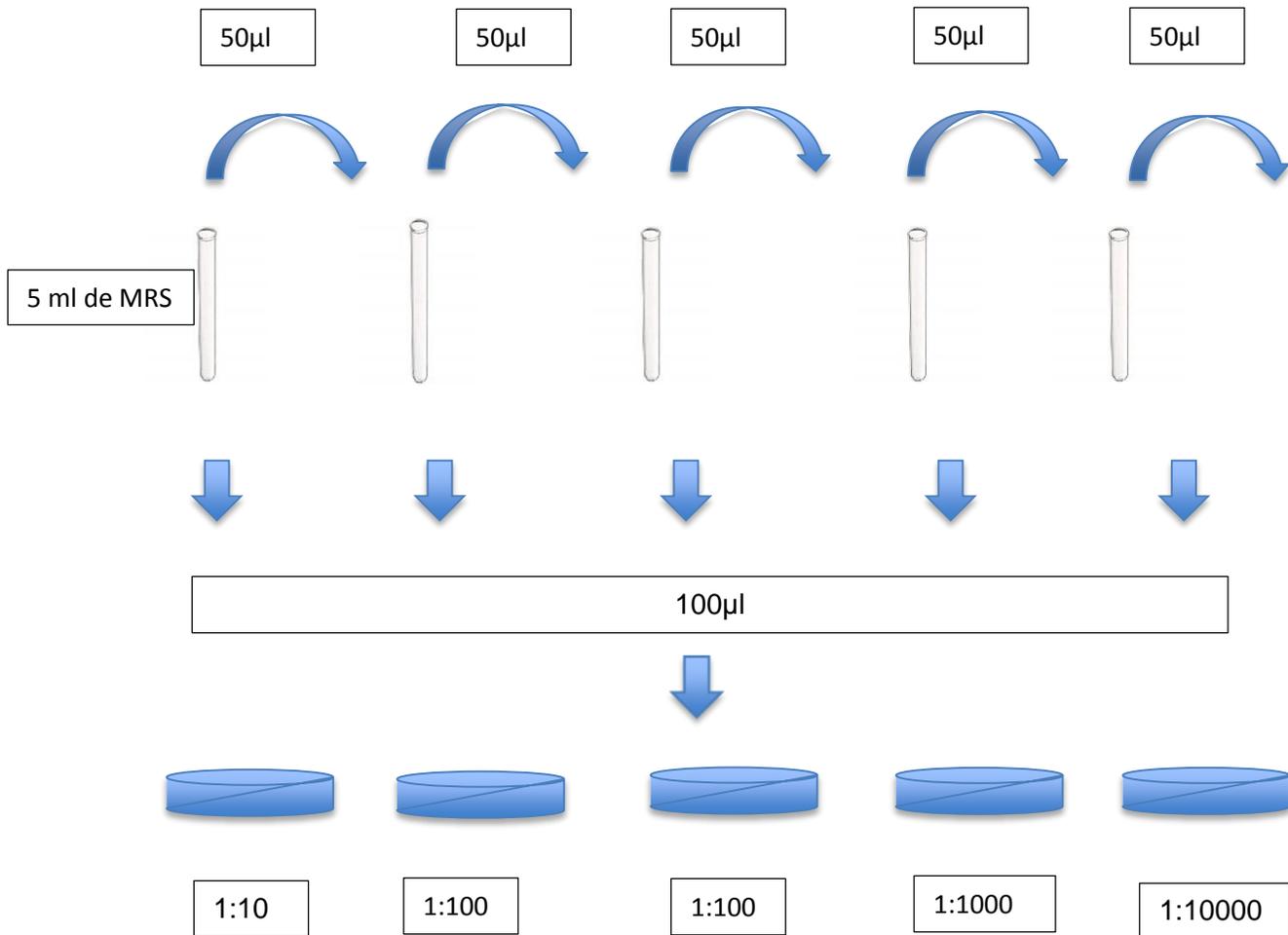
Al término del período de crecimiento del cultivo en agar, se realizó la cuenta de las colonias. Esta cuenta determinó cuál de las tres variables, modifica en menor proporción su crecimiento, comparándolas con él control positivo.

Se utilizó la siguiente fórmula para obtener las unidades formadores de colonias.

$$UFC/ml = \frac{\# \text{ de colonias presentes } \times \text{ la dilución}}{\text{cantidad de inóculo}}$$

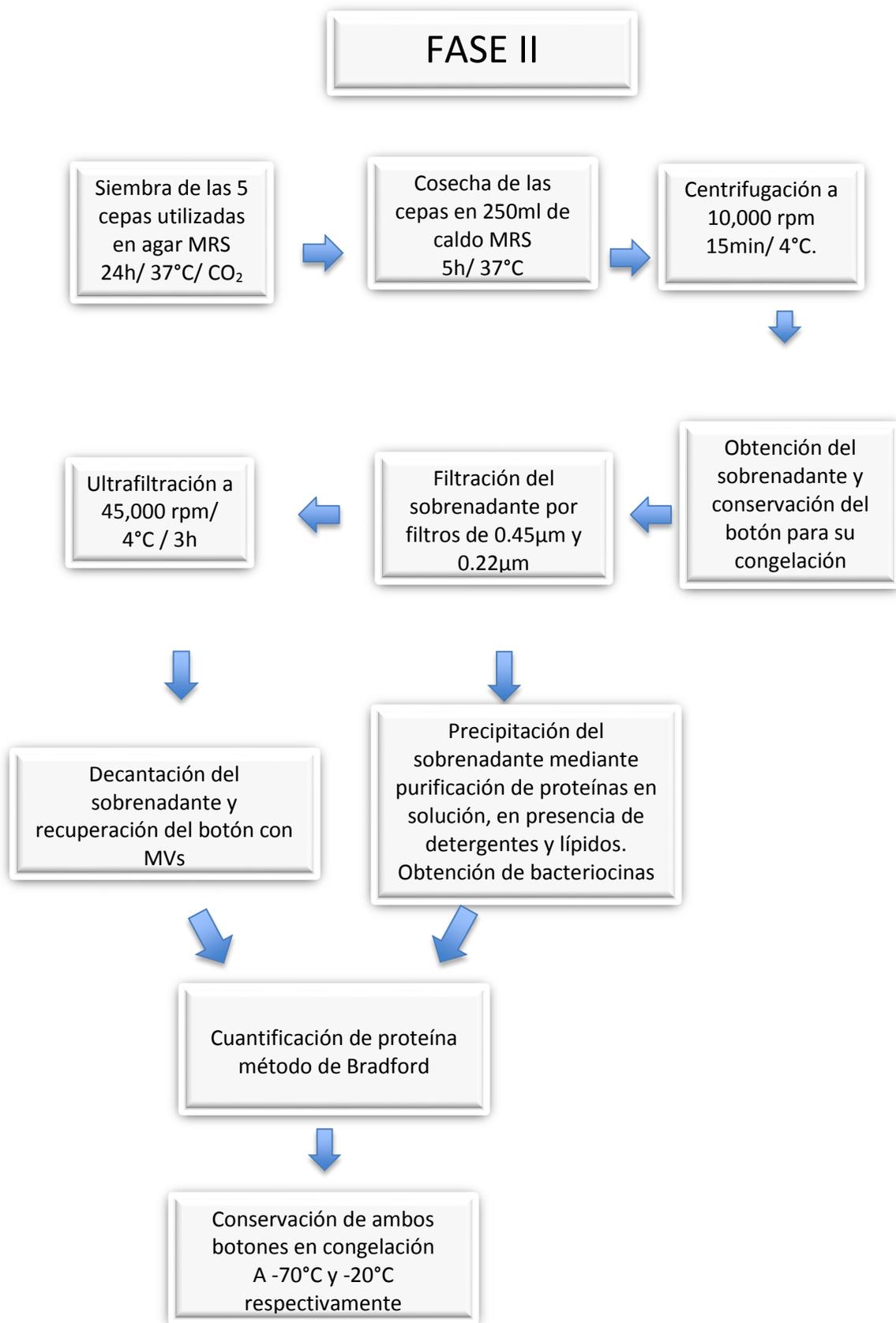
En el siguiente esquema se representa el proceso que se siguió para realizar las diluciones.

### Esquema 2. Proceso de diluciones con factor



La siguiente fase del proceso, se enfocó a la obtención de MVs y bacteriocinas de cada cepa. En el siguiente esquema se explica el desarrollo de la misma.

Esquema 3. Obtención de MVs y Bacteriocinas



## **V.6 Obtención de MVs**

Las cepas utilizadas se crecieron en agar MRS por 24h/37°C/CO<sub>2</sub>. Terminando el periodo de incubación, se cosecharon en 250ml de caldo MRS 5h/ 37°C en ausencia de CO<sub>2</sub>. El cultivo se agregó a tubos cónicos Falcon de 50ml para centrifugar a 10,000 rpm/15 min/4°C, el sobrenadante se depositó al sistema de filtrado millipore, pasando por un filtro de 0.45µm de diámetro y posterior a este, por uno de 0.22µm. El botón se resuspendió con 1 ml de PBS 1x estéril, y conservó a -20°C. Una vez filtrado el sobrenadante, se ultracentrifugó a 45,000 rpm/3h /4°C. Pasando las 3h, se recuperó el botón de cada tubo en 1ml de PBS 1x estéril y se conservó en criotubos a -70°C. Este proceso se desarrolló para cada una de las 5 cepas (ATCC, 64, 60, 55,54) realizando dos rondas de ultracentrifugación por cepa.

## **V. 7 Obtención de sobrenadantes**

Las cepas se crecieron en agar MRS por 24h/37°C/CO<sub>2</sub> y se cosecharon en 250ml de caldo MRS, para posteriormente incubarlas nuevamente 5h/37°C/ en ausencia de CO<sub>2</sub>. Terminando el período, se vertió el cultivo a tubos cónicos de poliestireno de 50 ml (Falcon Corning) para centrifugar a 10, 000 rpm/15 min/4°C, el sobrenadante se depositó al sistema de filtrado Millipore pasando por un filtro de 0.45µm de diámetro y posteriormente a uno de 0.22µm.

## **V.8. Precipitación de proteínas por el método de purificación de proteínas en solución, en presencia de detergentes y lípidos.**

El sobrenadante se precipitó por medio de purificación de proteínas en solución, en presencia de detergentes y lípidos. Tomando 500µl del sobrenadante, este se repartió en 5 tubos de poliestireno ependorff de 2 ml con 100µl cada uno. Posteriormente, se agregó 400µl de metanol a cada uno, mezclando el contenido mediante agitación en vortex y se centrifugó 10 seg. /6000 rpm, enseguida se adicionaron 100µl de cloroformo, de la misma manera, se mezcló y se centrifugó con las mismas variables. Posterior a ello, se tomaron 300µl de agua destilada y se agregaron a cada tubo, agitando mediante vortex y el contenido se centrifugó 1 min/ 6000 rpm. Al terminar, en el tubo se observó la formación de tres fases, la fase superior se elimina y se adicionaron 300µl de metanol, para posteriormente volver a centrifugar por 2 min con las mismas constantes antes

mencionadas. Por último, se decantó y se conservó el botón formado en el fondo del tubo, éste se dejó abierto para que el resto del metanol se evaporara. Cada botón se resuspendió en 50µl de PBS 1x estéril y se conservó -20°C.

#### **V.9 Cuantificación de proteínas Método de Bradford**

Para la cuantificación de proteína, se utilizó el kit de Bradford Protein Determination Kit, 704002, utilizando Albumina Sérica Bovina (ASB), desarrollando la curva estándar, según las especificaciones propias del kit. La absorbancia de las muestras, se obtuvo agregando 100 µl de agente revelador (Assay reagent) y 100µl de la muestra, en una placa de 96 pozos por triplicado, dejando incubar a 37°C /5min, para posteriormente leer en un lector de placa de ELISA con una longitud de onda de 595nm.

Al obtener la lectura de la absorbancia, se sacó el promedio de los tres pozos donde se encuentra la muestra problema y a partir de ahí, se realizó una ecuación de regresión lineal para calcular la proteína.

La última fase de la experimentación se enfocó en las técnicas moleculares y de microscopía, así como de enfrentamiento, utilizando los productos de la Fase II.

#### **V.10 Electroforesis en geles de poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE)**

Para realizar la electroforesis, se usó el Kit de Bio-Rad Mini-Protean,<sup>R</sup> Tetra Cell, 4- Gel System 1658004 . Con geles pre-cast de 12% y 10%. Se tomaron 60µl de la muestra problema y se le adicionaron 20 µl de Buffer de muestra (450µl de Laemmli y 50 µl de βME), sometiéndose a ebullición a 95°C/ 5 min. Una vez hervida la muestra, se cargaron 25µl en cada carril, dejando siempre en el primer carril, el marcador de peso molecular (Dual color standards, Bio-rad, 1610374TGX) del cual se colocaron 6µl. EL gel de SDS – PAGE, se corrió a 100 volts / 2.5 hrs.

## **V.11 Tinción de Plata para SDS-PAGE**

Terminando el tiempo de corrimiento, el gel se tiñó con el kit Silver Stain, Pierce,<sup>TM</sup> Thermo Scientific.

Para la tinción, se inició por lavar el gel en agua ultra pura, dos veces por 5 minutos, al terminar, el gel se fijó en una solución al 30% de etanol y 10% de ácido acético, haciendo recambios 2 veces cada 15 minutos, se continuo lavando el gel en una solución de etanol al 10% recambiándola 2 veces cada 5 minutos, posterior a esto el gel se lavó con agua ultra pura dos veces por 5 minutos cada una. Las 3 soluciones que fueron utilizadas para los pasos posteriores se prepararon al momento siguiendo las instrucciones propias del kit. Se mantuvo el gel con la primera solución (Sensitizer Working Solution) durante 1 minuto y consecutivamente se lavó con agua, 2 veces, por 1 minuto cada una, posteriormente se empleó la segunda solución (Stain Working Solution), manteniendo el gel durante 30 minutos en ella, al terminar el tiempo se lavó el gel 2 veces por 20 segundos con agua ultra pura e inmediatamente se añadió la tercera solución (Developer Working Solution) por 2 o 3 minutos hasta que las bandas aparecieran. El proceso de revelado se detuvo, agregando una solución al 5 % de ácido acético, por 10 minutos.

## **V.12 Microscopia Electrónica de Transmisión**

### **V.12.1 Preparación de la muestra**

Las cepas se crecieron en 7 ml de caldo MRS a 37°C / 5h /en ausencia de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se centrifugaron a 6,000 rpm / 4°C, y el sobrenadante se decantó y el botón se re suspendió en 1 ml de PBS 1x estéril.

### **V.12.2 Preparación de rejillas.**

Las rejillas de níquel, se colocaron en una membrana de fombar (0.75g y 25ml de cloroformo) con la cara clara en contacto con la membrana, dejando la cara oscura hacia arriba. Las rejillas se recogieron con un trozo de papel parafilm. Se observaron en el microscopio electrónico de transmisión marca Jeol, modelo JEM -1400, para comprobar que en la membrana no

existieran poros. Al observar que la membrana estaba en buen estado, se continuó a sombrear con carbón y se mantuvieron cubiertas e identificadas hasta su uso.

### **V.12.3 Observación de las muestras**

Para la observación de las muestras se prepara ácido fosfotúngstico al 1% pH 6.0 manteniéndose a 4 °C y se tempera para su uso, filtrándolo con filtros de jeringa de PES Corning™ de 0.22µm.

Se tomó una gota de la muestra y se colocó en la cara oscura de la rejilla dejando pasar 3 min. El exceso se seca con papel absorbente, a continuación se agregó una gota de ácido fosfotúngstico, dejándolo sobre la rejilla durante 1 min. El exceso se retira y se observa la rejilla en el microscopio.

### **V.13 Pruebas de enfrentamiento**

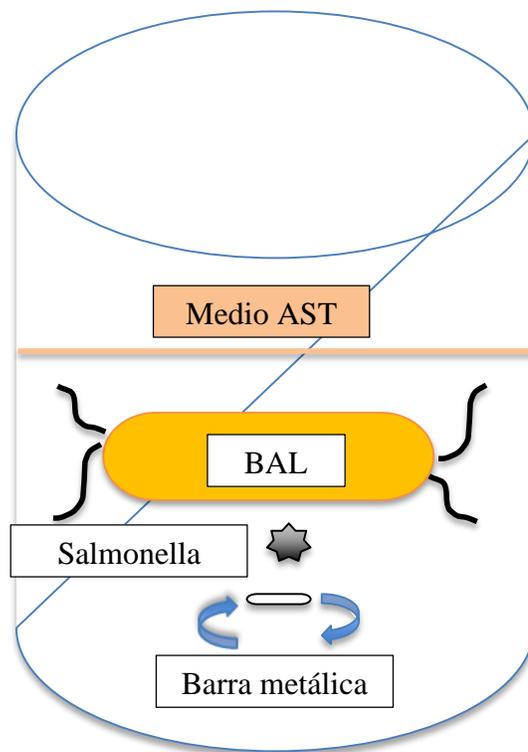
Estas pruebas se realizaron con el fin de comprobar la capacidad inhibitoria de las MVs producidas por las cepas seleccionadas, así como las moléculas de menos de 7kDa, capaces de atravesar la membrana de diálisis (SnakeSkin Dialysis Tubing), en el enfrentamiento indirecto. Para tal efecto, se utilizó la cepa ATCC de *Salmonella typhimurium* 154, para emplearla como cepa de desafío durante las pruebas de enfrentamiento.

#### **V.13.1 Difusión en agar con el uso de discos**

La cepa de *Salmonella typhimurium*, se creció en agar Salmonella- Shigella a 37°C durante 24 h. Utilizando el tubo de Mcfarland 0.5 ( $1 \times 10^8$ ), se estandarizó la turbidez de crecimiento de *S. typhimurium*, para la prueba de enfrentamiento. Esta cepa, se sembró en forma de pasto con un hisopo estéril sobre una caja de agar Muller Hinton, cubriendo toda la superficie de la misma. Se procedió a colocar discos *Oxid Antimicrobial Susceptibility Test discs* TSMX7215, impregnados con 100 µl de MVs de ATCC de *L. acidophilus* y de la cepa 54 por separado. Los discos se ubicaron sobre el agar, alejados unos de otros para evitar la mezcla de MVs. Se mantuvieron incubando por 24h a 37°C, para después medir los halos de inhibición formados por cada cepa.

### V.13.2 Enfrentamiento indirecto con el uso de membrana de diálisis de las cepas ATCC *L. acidophilus* y cepa 64 contra la cepa de *Salmonella typhimurium* (ATCC 154)

Se sembraron las cepas de BAL en cajas de agar MRS, incubándose a 37°C /24h en presencia de CO<sub>2</sub>. Se realizó una cosecha en 50 ml de caldo MRS de cada cepa por separado, este cultivo se incubó a 3h /37°C en ausencia de CO<sub>2</sub>, al cabo del período de incubación, el cultivo se pasó a una membrana SnakeSkin Dialysis Tubing de 7 kDa previamente hidratada con agua destilada, sujetándola de cada extremo con un hilo a manera de formar una “salchicha”. En un vaso de precipitado de 1 litro de capacidad, se esterilizaron 500ml de caldo Soya y Trypticaseina (AST), donde se sembró una colonia de *Salmonella*. Dentro de este medio, se colocó la membrana con la BAL sembrada y el cultivo se mantuvo en agitación, con barra magnética a 37°C por 48 h. Terminando el tiempo de incubación, se realizó tinción de Gram para revisar la morfología y viabilidad de *Salmonella* y se sembró del mismo medio, una asada por estría abierta en agar *Salmonella- Shigella*. Este proceso se desarrolló, con las dos cepas de BAL seleccionadas. En la **Figura 5.**, se aprecia la representación del enfrentamiento entre BAL y *Salmonella*.



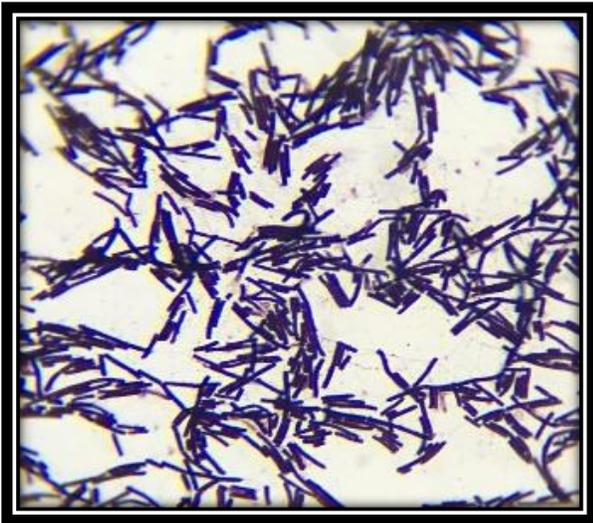
**Figura 5. Representación del enfrentamiento indirecto entre BAL y *Salmonella***

## VI. RESULTADOS

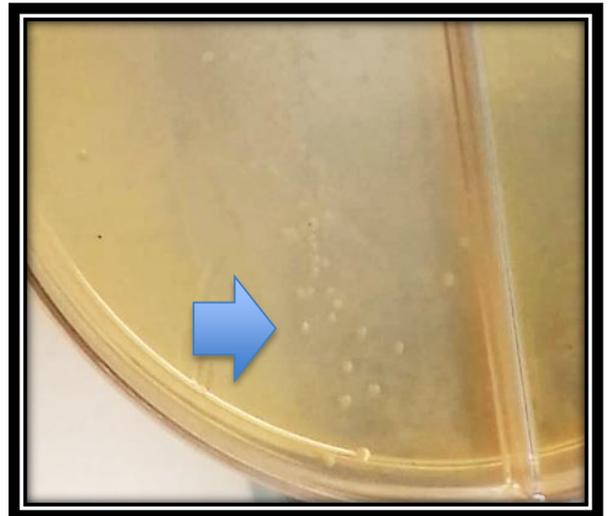
### VI.1 Adaptación de las cepas de campo

En un trabajo previ6, se obtuvieron Las cepas ATCC, 54,55, 60 y 64, se adaptaron al medio MRS, presentando caracter6sticas propias de BAL.

En las siguientes im6genes se pueden observar algunas de las particularidades de BAL.



**Imagen 2.** ATCC de *L. acidophilus*. Tinci6n de Gram 100x. Se observan bacilos alargados y delgados te6idos de violeta. Morfolog6a cl6sica.



**Imagen 3.** ATCC agar MRS, colonias peque6as y gris6ceas. Incubaci6n 24h/37°C/ CO2

## VI.2 Identificación bacteriana mediante sistema API 50 CHL.

Todas las cepas utilizadas en este trabajo, presentaron un alto porcentaje (más del 80%) de identidad en la prueba de API 50 CHL, coincidiendo con la morfología de su género y especie, además que todas resultaron negativas a la prueba de catalasa y oxidasa.

Los resultados de las 5 cepas sometidas al sistema de identificación API 50 CHL se observan en la siguiente **tabla 5**.

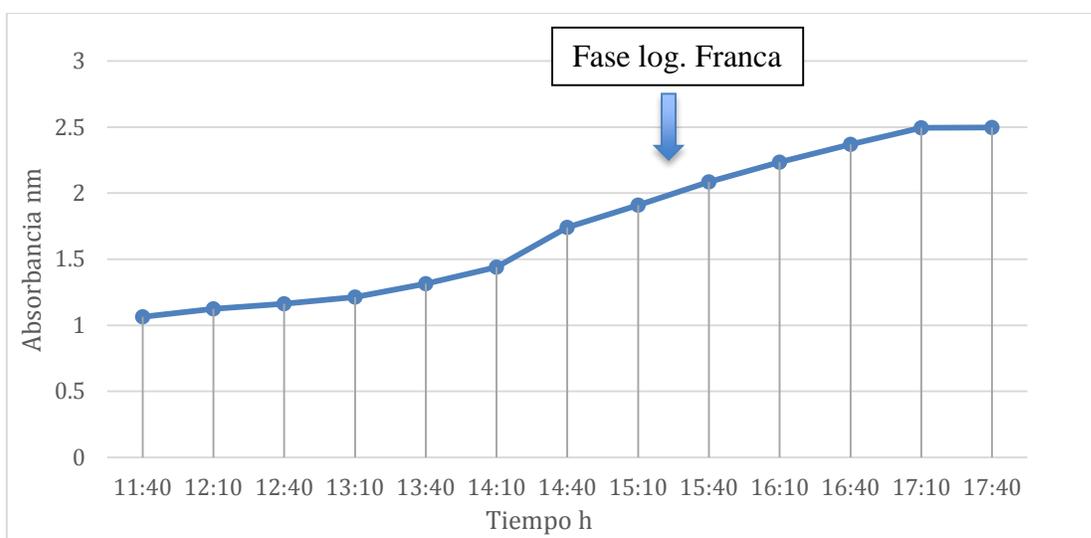
**Tabla 5. Características de las 5 cepas usadas en la experimentación.**

N° de cepa	% de Identificación API	Género y Especie	Morfología	Origen	Catalasa y Oxidasa
ATCC	94.6%	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bacilos alargados	ATCC 314	(-)
54	94.2%	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bacilos alargados	Íleon	(-)
55	84.3%	<i>Lactobacillus brevis</i>	Bacilos cortos, encorvados	Ciego	(-)
60	99.9%	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos anchos y cortos	Colon	(-)
64	99.5%	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos anchos y cortos	Recto	(-)

### VI.3 Cinética de crecimiento.

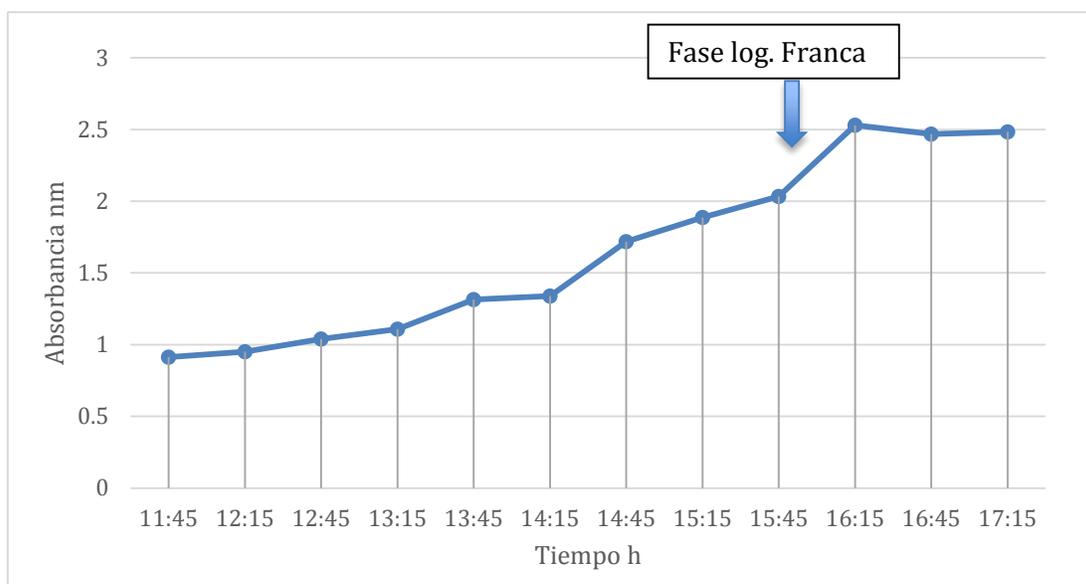
Las cinéticas de crecimiento, se realizaron para determinar el momento en que las cepas alcanzaron su fase de crecimiento logarítmica franca, momento en el que las bacterias producen una mayor cantidad de microvesículas y bacteriocinas. Para tal efecto, se utilizó la cepa de campo 60 *Lactobacillus plantarum*, y la ATCC 314 *Lactobacillus acidophilus* **Gráfica 1 y 2.**

**Gráfica 1. CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA 60.**



Como se observa en la **Gráfica 1**, la fase logarítmica franca de la cepa 60, se alcanza entre las 15:10 y las 15:40 de crecimiento.

**Grafica 2. CINETICA DE CRECIMIENTO ATCC**



La fase logarítmica franca del ATCC 314 *L. acidophilus* se alcanzó entre las 15:45 y 16:45 de crecimiento.

#### **VI.4 Estandarización de la producción de MVs.**

Para la estandarización de la producción de MVs, las cepas bacterianas se sometieron a diferentes variables que generan estrés durante su crecimiento, con la finalidad de hacerlas producir una mayor cantidad de MVs. Para tal efecto, se usaron 3 variables:  $\text{CaCl}_2$  y antibiótico adicionado en el medio de cultivo, así como ausencia de  $\text{CO}_2$ . Las tres variables se evaluaron por separado en todas las cepas. Observándose una mayor producción de MVs, cuando el crecimiento bacteriano se sometió a la ausencia de  $\text{CO}_2$ . Se realizaron diluciones a las cepas incubadas sin variables, para comparar el crecimiento.

En los **Cuadros 1 y 2**, se plasman los resultados de las 3 variables tanto en la ATCC, como en la cepa 60.

**Cuadro 1. UFC/ml en la cepa ATCC *L. acidophilus*.**

VARIABLES	DILUCIÓN				
	1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:100000
Ausencia de CO <sub>2</sub>	INCONTABLE	INCONTABLE	50	0	0
CaCl <sub>2</sub>	0	0	0	0	0
Antibiótico	INCONTABLE	INCONTABLE	51	0	0
Sin variables	INCONTABLE	INCONTABLE	86	1	1

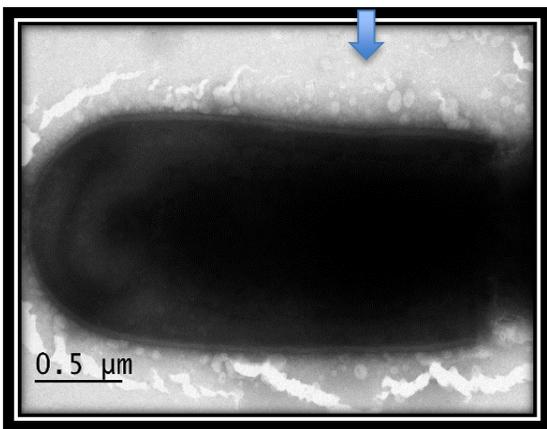
**Cuadro 2. UFC/ml en la cepa 60 *L. plantarum*.**

VARIABLES	DILUCIÓN				
	1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:100000
Ausencia de CO <sub>2</sub>	INCONTABLE	INCONTABLE	INCONTABLE	390	13
CaCl <sub>2</sub>	INCONTABLE	INCONTABLE	23	0	0
Antibiótico	INCONTABLE	INCONTABLE	INCONTABLE	65	22
Sin variables	INCONTABLE	INCONTABLE	INCONTABLE	449	28

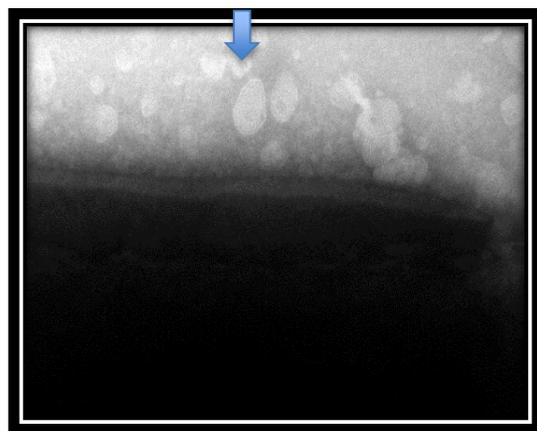
En ambas cepas, la ausencia de CO<sub>2</sub> fue la mejor en inducir estrés, sin interferir de manera significativa en su crecimiento. A partir de los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento, así como en la estandarización de la obtención de MVs, induciendo estrés, se decidió que las mejores condiciones para obtener MVs y bacteriocinas de BAL, fueron a las 5 h /37°C/ ausencia de CO<sub>2</sub>.

## VI.5 Microscopia Electrónica de Transmisión.

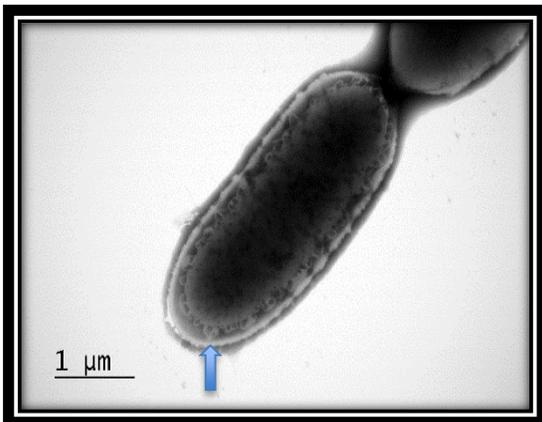
Mediante microscopia electrónica de transmisión, se observaron las 5 cepas utilizadas en este trabajo y se visualizaron estructuras esféricas, de tamaño variable (de 50 hasta 250 nm de diámetro), que se aprecian adheridas a la membrana de la bacteria, y otras más en forma satelital. Coincidiendo con la morfología y formación clásica de MVs, reportadas en otros trabajos. En las siguientes imágenes (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) se observan con detalle las MVs de cada una de las cepas mencionadas.



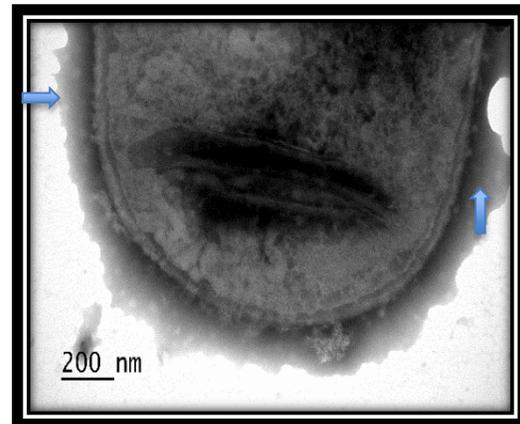
**Imagen 4.** Bacteria de ATCC *L. acidophilus* liberando MVs.



**Imagen 5.** Acercamiento a MVs. Cepa ATCC *L. acidophilus*.



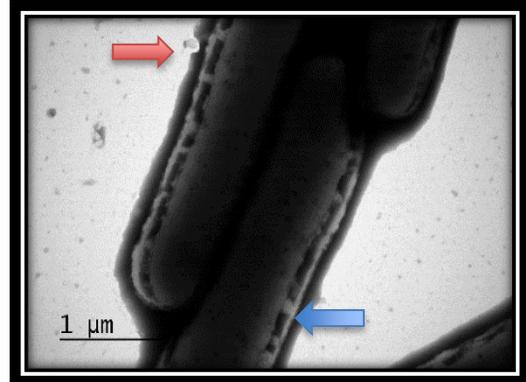
**Imagen 6.** Cepa 64 *L. plantarum*.  
Porción: recto Apunto de liberar MVs.



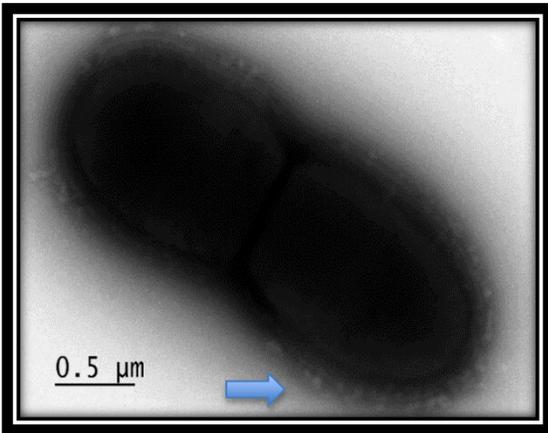
**Imagen 7.** Cepa 64 *L. plantarum*.  
Porción: recto Liberando MVs



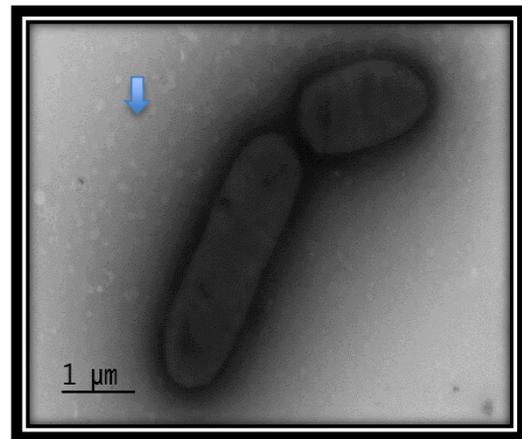
**Imagen 8.** Cepa 54 *L. acidophilus*.  
Porción: ileon



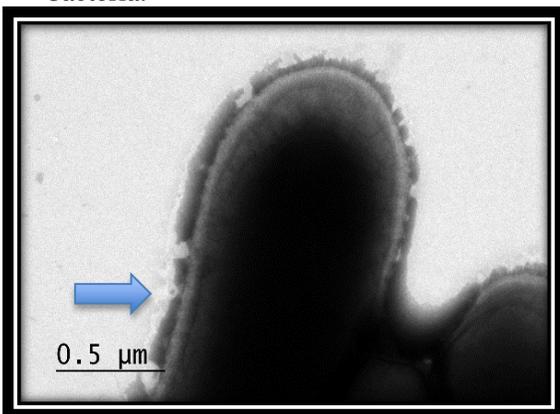
**Imagen 9.** Cepa 54 *L. acidophilus*. MVs liberadas flecha roja y a punto de ser liberada. flecha azul



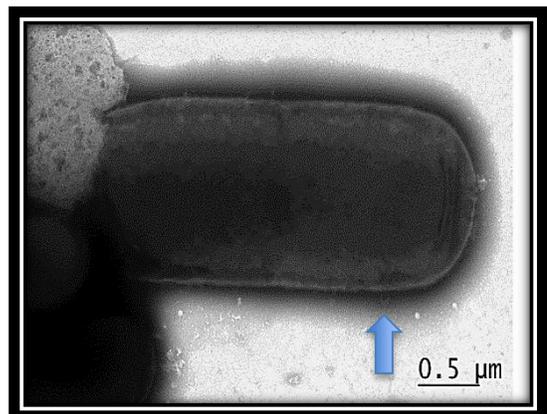
**Imagen 10.** Cepa 55 *L. brevis*  
Porción: ciego. MVs rodeando a la bacteria.



**Imagen 11.** Cepa 55 *L. brevis*. MVs en el medio.



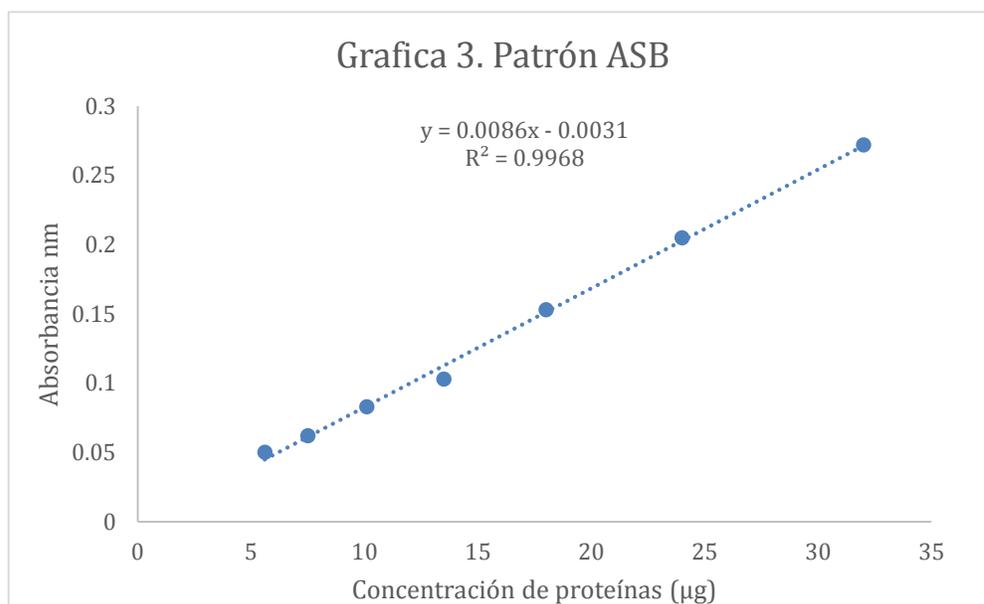
**Imagen 12.** Cepa 60 *L. plantarum*.  
Porción: colon. Bacteria a punto de liberar MVs



**Imagen 13.** Cepa 55 *L. plantarum* MVs liberada por la bacteria

### VI.5. Cuantificación de proteínas método de Bradford.

Para establecer la cantidad de proteína a partir de las muestras obtenidas de las diferentes cepas trabajadas, se realizó el método de Bradford. En la **Grafica 3**, se observa la curva patrón que se utilizó para calcular la proteína a partir de las muestras problema de este trabajo.

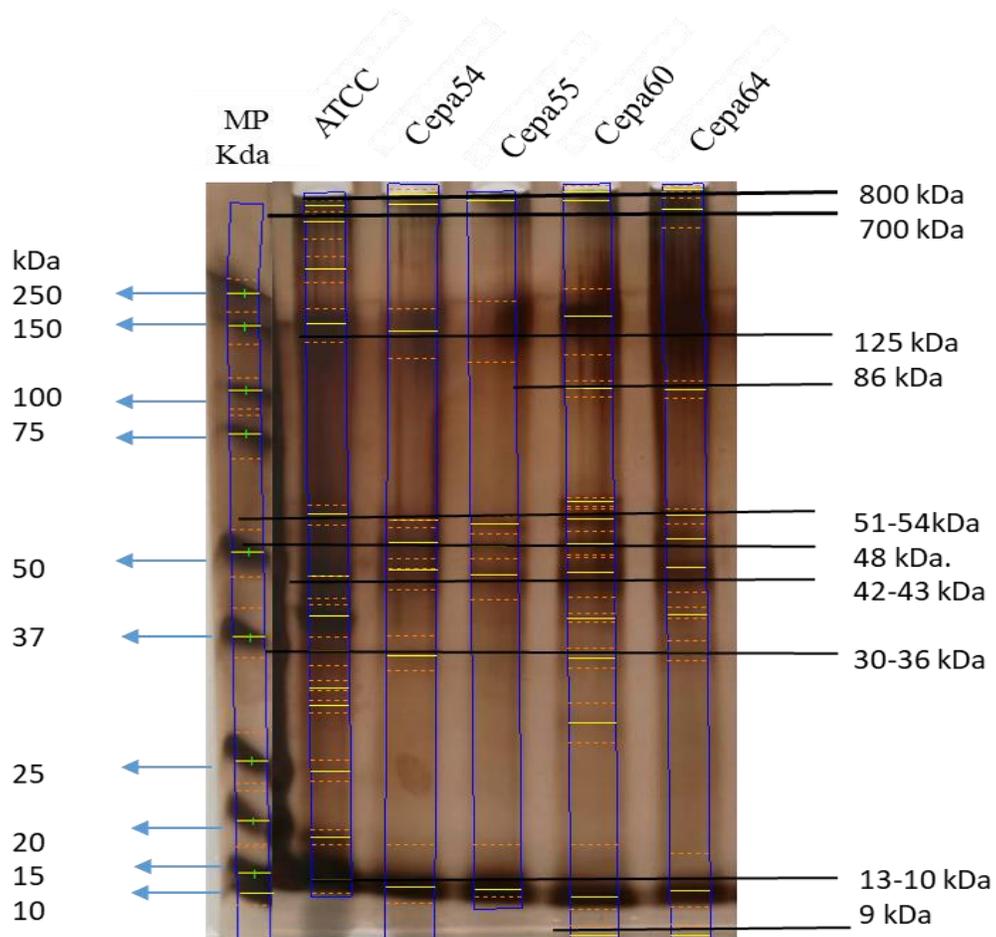


**Grafico 3.** Curva patrón BSA. En el grafico se observa que  $R^2$  es superior al 95% por lo cual es una curva confiable.

### VI.6 Perfil electroforético de las proteínas presentes en las MVs y en los sobrenadantes.

A partir de la cuantificación de proteínas de las muestras de las diferentes cepas a trabajar, se corrieron geles de poliacrilamida al (SDS-PAGE) al 12% /100volt /2.5h. De esta manera, fue posible observar las principales proteínas que arrastran y componen las MVs y las posibles bacteriocinas contenidas en las mismas. En cada carril, se depositaron 25  $\mu\text{l}$  de cada muestra, con un promedio de 10.4  $\mu\text{g}$  de proteína. En la **imagen 14**, se observa el resultado del corrimiento electroforético de los sobrenadantes.

**Imagen. 14** SDS-PAGE al 12%, tinción de plata. Sobrenadantes. Análisis de imagen mediante software Gene Tools from SynGene, England; Cambridge.

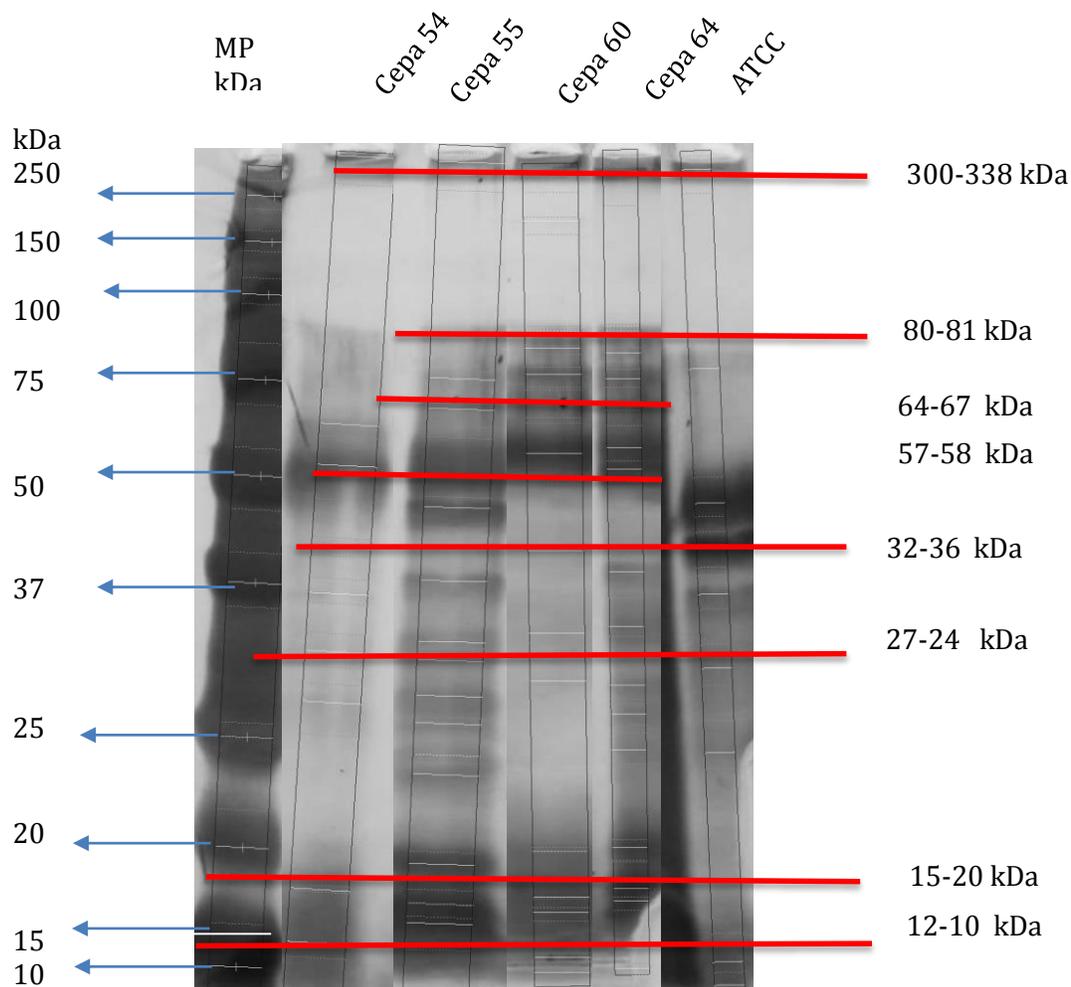


Como se observa en el gel SDS-PAGE 12% **Imagen 14**, las muestras en cada carril, comparten bandas de proteínas (**Tabla 6.**) entre las diferentes cepas de BAL de campo, así como con la cepa ATCC. Lo que indica, que el sobrenadante de estas cepas contiene proteínas de pesos muy similares entre sí. Cabe mencionar, que al fondo de los carriles se observan proteínas de bajo peso molecular, las cuales podrían corresponder a bacteriocinas.

**Tabla. 6.** Pesos moleculares de proteínas identificadas por el software Gene Tools from SynGene, England; Cambridge. Únicamente en los sobrenadantes de las cepas utilizadas

<b>MPM (kDa)</b>	<b>Cepa ATCC</b>	<b>Cepa 54</b>	<b>Cepa 55</b>	<b>Cepa 60</b>	<b>Cepa 64</b>
	700.01	800.15	818.84	800.80	800.96
	542.36	705.98	705.98	729.64	699.07
<b>250</b>	262.67				
<b>150</b>					
<b>100</b>	132.82	125	125.83	138.32	
<b>75</b>				86.91	86.70
<b>50</b>	53.01	51.67	51.67	54.98	
	42.69	43.34	47.79	42.85	48.15
		48.79	42.34	51.67	52.24
				47.43	
<b>37</b>	37.00			35.50	32.65
	33.10	33.54	32.54	32.10	36.75
	30.50				44.50
<b>25</b>	27.86	25.83		26.21	
<b>20</b>	22.23				
<b>15</b>	16.29	12.43	12.36		
		13.00	11.34		12.00
<b>10</b>	10.98	10.98	10.32	12.00	
				9.90	9.00

**Imagen. 15** SDS- PAGE al 12%. Tinción de plata. Microvesículas. Análisis de imagen mediante software (version) Gene Tools from SynGene, England; Cambridge.



En el gel SDS-PAGE 12% **Imagen 15**, las muestras en cada carril, comparten bandas de proteínas (**Tabla 7.**) entre las diferentes cepas de BAL de campo, así como con la ATCC. Lo que indica que las Microvesículas de estas cepas, contiene proteínas de pesos muy similares entre sí. Las proteínas identificadas por el Software Gene Tools, van desde los 300 kDa hasta los 10 kDa, lo que nos sugiere, que las MVs arrastran constitutivamente proteínas de composición estructural (interna y externa) de las células bacterianas de origen. En la **Tabla 7** se identifican todas las proteínas contenidas en las muestras de MVs de BAL, por el software antes mencionado.

**Tabla. 7.** Proteínas detectadas por el software Gene Tools from SynGene, england; Cambridge.  
Únicamente de Microvesículas de las cepas utilizadas

<b>KDa</b>	<b>Cepa</b>	<b>Cepa</b>	<b>Cepa</b>	<b>Cepa</b>	<b>Cepa</b>
<b>MP</b>	<b>54</b>	<b>55</b>	<b>60</b>	<b>64</b>	<b>ATCC</b>
	367.86	332.96	305.15	300.64	320.74
<b>250</b>					
<b>150</b>			161.64		
<b>100</b>					
<b>75</b>		81.12	80.52 75.28	73.61 81.73 80.22	80.15
<b>50</b>	58.86 48.38	67.38 58.59 42.25 47.41	47.14 58.31 66.75	48.87 57.77 44.71 64.91	46.99
<b>37</b>	39.00	32.38	35.90	32.83	42.89
<b>25</b>	25.99 29.62 33.42	26.87 28.25	27.63	28.10	24.94
<b>20</b>	17.05	24.50 20.63 21.53 23.07	24.34	24.02 22.51 20.73	
<b>15</b>	13.92 11.78	16.38 14.76 14.03 12.78	15.91 14.07 13.48 12.93	16.03 14.34 13.88 12.55	15.04 15.91 11.01
<b>10</b>	10.87		10.06	10.56	

La siguiente tabla (**Tabla 8**), muestra los pesos moleculares de las proteínas identificadas por el Gene tools, tanto en MVs, como en sobrenadantes, describiendo a través de un código de colores, aquellas proteínas con pesos similares, que se comparten entre cepas y muestra analizadas.

**Tabla 8.** Proteínas compartidas entre MVs y sobrenadantes de BAL

Marcador de PM	54 MVs	54 S	55 MVs	55 S	60 MVs	60 S	64 MVs	64 S	MVs ATCC	S ATCC
kDa	kDa	kDa	kDa	kDa	kDa	kDa	kDa	kDa	kDa	kDa
250.00	367.86	800.15	332.96	818.84	305.15	800.80	300.64	800.96	320.74	700.01
150.00	58.86	705.98	81.12	705.98	161.64	729.64	81.73	699.07	80.15	542.36
100.00	48.38	125.83	67.38	125.83	80.52	138.32	80.22	86.70	46.99	262.67
75.00	39.00	51.67	58.59	51.67	75.28	86.91	73.61	52.24	42.89	132.82
50.00	33.42	48.79	47.41	47.79	66.75	54.98	64.91	48.15	36.69	53.01
37.00	29.62	43.34	42.25	42.34	58.31	51.67	57.77	44.50	30.63	42.69
25.00	25.99	33.54	32.38	32.54	47.14	47.43	48.87	36.75	24.94	37.00
20.00	17.05	13.00	28.25	12.36	35.90	42.85	44.71	32.65	15.91	33.10
15.00	13.92	12.43	26.87	11.34	27.63	35.50	32.83	12.00	15.04	30.50
10.00	11.78	10.98	24.50	10.32	24.34	32.10	28.10	9.00	11.01	27.86
	10.87		23.07		15.91	26.21	24.02			22.23
			21.53		14.07	12.00	22.51			16.29
			20.63		13.48	9.90	20.73			10.98
			16.38		12.93		16.03			
			14.76		10.06		14.34			
			14.03				13.88			
			12.78				12.55			
							10.56			

 Proteínas que comparte las muestras de MVs y Sobrenadantes

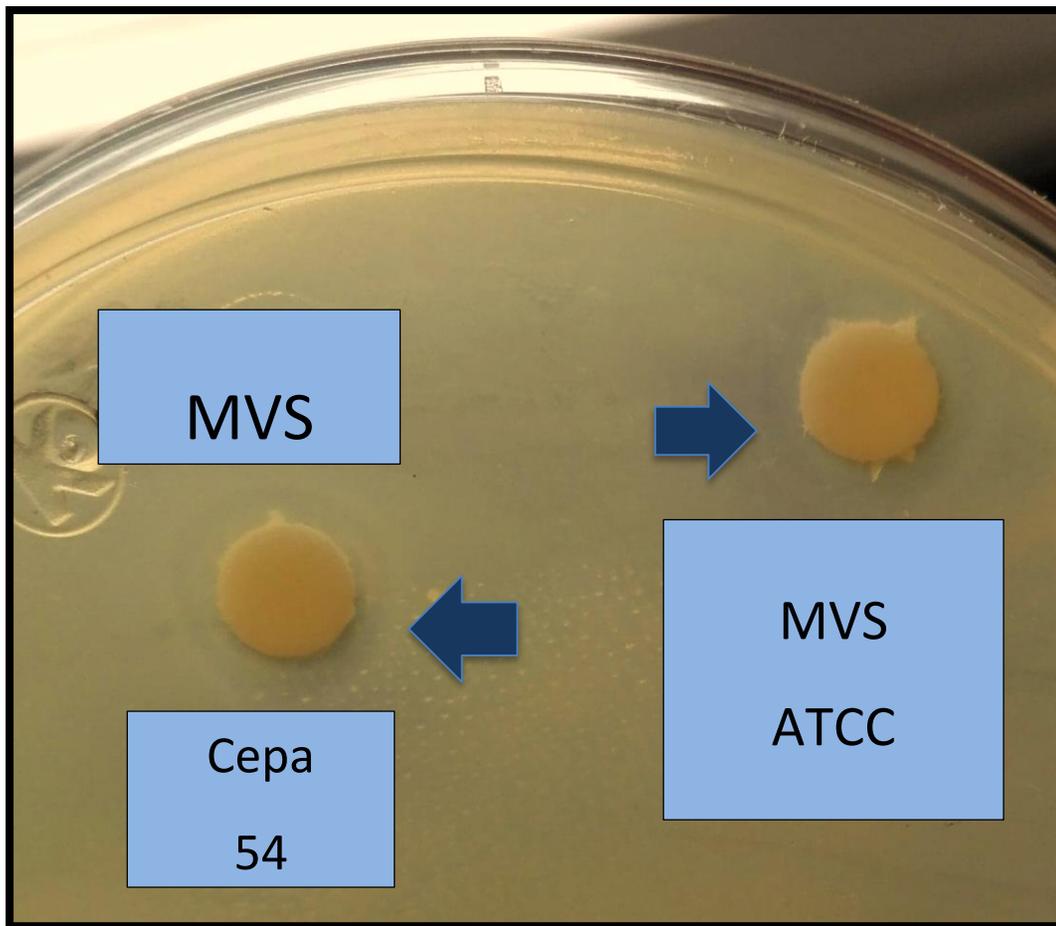
 Proteínas que comparten todas las muestras de Sobrenadantes

 Posibles bacteriocinas

 Proteínas que comparten todas las muestras de MVs

### VI.7. Difusión en agar con el uso de discos.

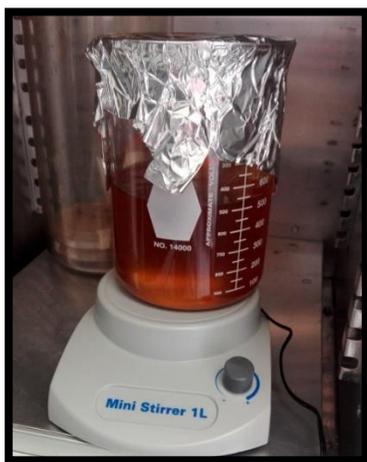
En el enfrentamiento entre *Salmonella typhimurium* y las MVs de la cepa 54 (*L. acidophilus*) y ATCC (*L. acidophilus*), se utilizó 41.4 µg de proteína promedio. Se observaron halos de inhibición de 8 mm, en el agar alrededor del disco, mostrando capacidad inhibitoria de ambas cepas. Mostrando de esta manera capacidad inhibitoria sobre dicho patógeno. **En la Imagen 16** se pueden observar los halos de inhibición, en el agar Muller Hinton.



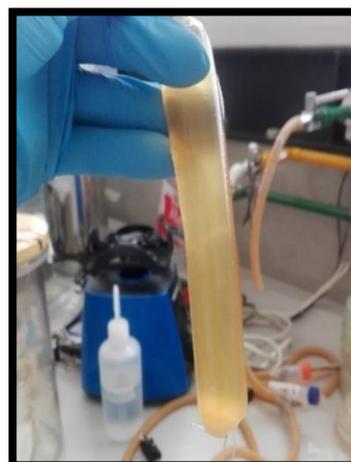
**Imagen 16.** Halos de inhibición formados en el agar Muller Hinton, al contacto de los discos impregnados con MVs del ATCC y la cepa 54. (*L. acidophilus*).

**V.I.8. Enfrentamiento indirecto de cepa ATCC y cepa 64 contra el ATCC 154 *Salmonella typhimurium*.**

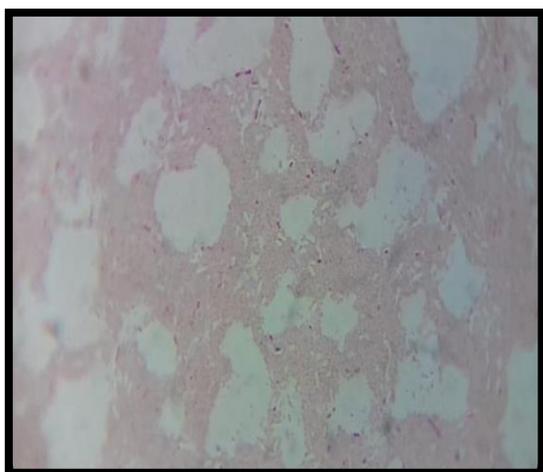
Durante este enfrentamiento se otorgó igualdad de condiciones para su crecimiento a las cepas de BAL y de *S. typhimurium*, se observó capacidad inhibitoria sobre la cepa patógena por parte de las BAL utilizadas. De esta manera se considera que los productos metabólicos de las BAL, menores a 7kDa, logran ejercer ésta inhibición.



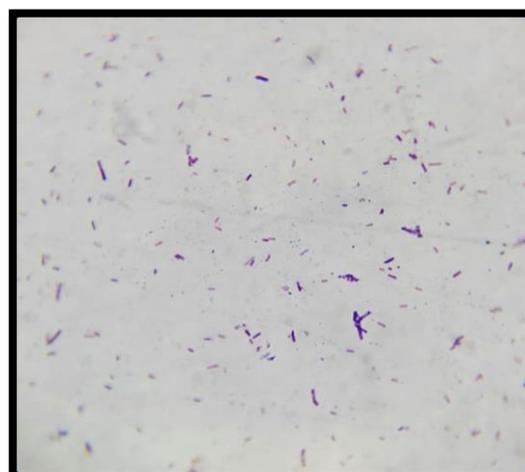
**Imagen 17.** Cultivo de *S. typhimurium*, en contacto con la membrana de diálisis con BAL, después de 48 h de incubación/ 37°C en agitación.



**Imagen 18.** Membrana de diálisis con BAL, incubación durante 48h en cultivo de *S. typhimurium*, en donde se observa crecimiento.



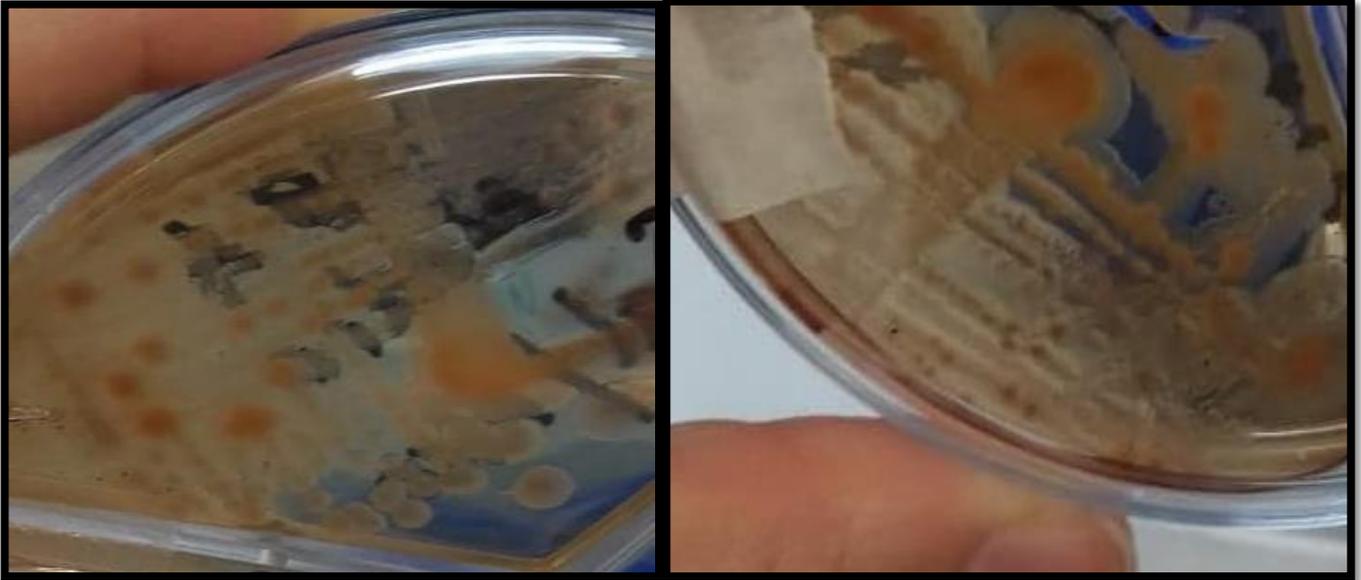
**Imagen 19.** Tinción de Gram a las 48h del cultivo de *S. typhimurium*, enfrentado a la cepa 54. Se observó abundante detrito celular, así como muy pocas células bacterianas.



**Imagen 20.** Tinción de Gram a las 48h del cultivo de *S. typhimurium*, enfrentado a la ATCC de BAL. Se observó un número reducido de bacterias completas, así como hinchadas y de coloración violeta.

A

B



**Imagen 21:** **A** Siembra en agar Salmonella- Shigella, del cultivo enfrentado contra la ATCC de BAL, de 48 h. Se observa crecimiento de *S. typhimurium*.  
**B** Siembra en agar Salmonella- Shigella, cultivo enfrentado contra cepa 54 de BAL, de 48 h. Se observa crecimiento de *S. typhimurium*.

## VII. DISCUSIÓN

Las funciones que desempeñan las porciones del TGI son bien conocidas, tanto el intestino delgado como grueso, desempeñan roles que son de suma importancia para el correcto funcionamiento del organismo. Las criptas del ileon, ciego y colon son las principales zonas en las que habita la microbiota intestinal. Algunos de los géneros bacterianos más abundantes, son los *Lactobacillus sp.*, los cuales son sumamente reconocidos como probióticos. El género *Lactobacillus* es un probiótico importante dentro de la industria farmacéutica, las principales especies de *Lactobacillus*, son: *acidophilus*, *brevis*, *plantarum*, *rhamnosus*, *casei*, *paracasei* y *reuteri*<sup>33, 34, 35</sup>.

Las funciones vitales realizadas por la porción gruesa del TGI son: absorción de iones (Ca, Mg, Fe), fermentación de sustratos no digeridos, producción de vitamina K, proliferación y diferenciación epitelial, desarrollo del sistema inmune y protección contra microorganismos patógenos. Como se mencionó anteriormente, un gran número de cepas bacterianas son habitantes del TGI, capaces de producir una gran cantidad de moléculas que interactúan con el epitelio, entre ellas las bacteriocinas, que en conjunto con la función de cada cepa nativa ayudan a controlar la proliferación de cepas patógenas y a mantener en proporciones adecuadas a los demás microorganismos. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos, susceptibles a los cambios bruscos de pH, así como a enzimas como la tripsina y a las sales biliares, por lo que es sencillo regular su producción, y más fácil aún, encontrarlas activas en las últimas porciones del TGI<sup>33, 34</sup>.

En el presente trabajo, se seleccionaron cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *plantarum* y *brevis*, aisladas de las últimas porciones del TGI, ilion, ciego, colon y recto, respectivamente. Se seleccionaron de esta manera, por la capacidad probiótica de los *Lactobacillus sp.* reportada ampliamente, así como por la facilidad de producir bacteriocinas. Las porciones del intestino de las que se obtuvieron, fueron seleccionadas por sus condiciones micro ambientales tales como la ausencia de sales biliares, y ausencia de enzimas gástricas. Dichas condiciones, destacan por la capacidad de las BAL, para producir de manera eficaz, péptidos con capacidad inhibitoria para patógenos intestinales., así como funciones claves para el equilibrio del organismo<sup>33, 34</sup>.

Las BAL, son productoras de diferentes moléculas que permiten su coexistencia con el medio que las rodea, un ejemplo de ello son las MVs, capaces de servir como fuente de comunicación entre las células, así como ayudar a la activación del sistema inmune. Es bien sabido, que las MVs son secretadas durante el crecimiento de células bacterianas, aunque se ha definido que la mayor producción de MVs se da en la fase logarítmica. Un punto importante para la producción de MVs, es el factor de estrés al que son sometidas las bacterias, ya que se ha descrito, que la falta de nutrientes, disminución y aumento de temperatura o pH, ausencia o presencia de CO<sub>2</sub>, permiten un incremento en la producción de MVs<sup>36, 37</sup>.

La mayoría de los autores que han trabajado con MVs de BAL, no reportan el uso de algún factor estresante, que induzca un aumento en la producción de MVs<sup>38, 39</sup>. Aunque en bacterias Gram (-) como *M. haemolytica*, se ha descrito el uso de Gentamicina a dosis subléxicas, además de la adición de CaCl<sub>2</sub> en el cultivo durante el crecimiento de la bacteria, con la finalidad de inducir estrés y favorecer la producción de un mayor número de MVs<sup>40</sup>.

En el presente trabajo de investigación, se modificaron las condiciones de crecimiento de las BAL, para inducir estrés sin alterar el desarrollo bacteriano y así obtener una mayor cantidad de MVs. El factor que determinó un mayor efecto en la producción de MVs de BAL, fue la ausencia de CO<sub>2</sub>. Las cepas trabajadas, crecieron en condiciones aerobias, ya que al ser bacterias anaerobias facultativas, éstas no alteraron significativamente su crecimiento. Para comprobar dicha situación, se realizó una cuenta viable, donde se observó una disminución en las UFC de cultivos mantenidos con esta variable, comparándola con la cuenta viable de un crecimiento bacteriano, sin adición de variables. Paralelamente, se observó y confirmó, que a la revisión mediante MET, las cepas que crecieron en ausencia de CO<sub>2</sub>, mostraron una gran cantidad de microvesículas claramente visibles, en todas las muestras.

Para evidenciar las proteínas contenida en los sobrenadantes de cultivo de BAL's, se realizó electroforesis SDS-PAGE 12% a las cuatro cepas de campo y la ATCC de *L. acidophilus*, de esta forma se demostró que los sobrenadantes de cultivo, liberan al medio una gran cantidad de proteínas, que podrían ser resultado del metabolismo bacteriano, incluyendo bacteriocinas. Los resultados obtenidos en este trabajo, demostraron que los sobrenadantes de estas 4 cepas de campo y la ATCC, comparten proteínas de pesos moleculares variables, que van desde los 700 a 800 kDa y proteínas

de muy bajo peso de 12 y hasta 9 kDa. De manera similar, otros estudios reportan, que el análisis de sobrenadantes de BAL mediante corrimiento electroforético, han observado bajo diferentes tinciones, bandas proteicas que se encuentran en un amplio rango de pesos, identificando proteínas con pesos menores o iguales a los 10 kDa, mismas que sugieren la presencia de bacteriocinas<sup>41, 42, 43,54</sup>. Comúnmente las BAL, son productoras de péptidos antimicrobianos, los cuales se clasifican de acuerdo a su estructura bioquímica y peso molecular. Uno de los grupos de clasificación abarca péptidos que tienen un peso molecular >30 kDa y otro de ellos <10 kDa. Como ya se ha mencionado anteriormente, estos péptidos tienen la capacidad de inhibir bacterias patógenas y no patógenas, lo que otorga a las BAL, una gran utilidad probiótica<sup>54</sup>. En los sobrenadantes de las 5 cepas evaluadas, se visualizaron proteínas de >30 a <10 kDa, las cuales podrían corresponder a bacteriocinas o BLIS.

Paralelamente se realizó un corrimiento electroforético (SDS-PAGE 12%) de MVs de BAL y ATCC. Los pesos moleculares de las bandas observadas en los diferentes carriles, muestras bandas proteicas que abarcan un amplio rango de pesos moleculares, que van desde los 300 hasta los 10 kDa. Cabe mencionar, que, en otras investigaciones en torno al aislamiento e identificación de las bacteriocinas, nunca se ha reportado la presencia de las mismas, en MVs bacterianas identificadas mediante SDS-PAGE.

Estudios sobre MVs de BAL, han logrado visualizar proteínas de alto peso molecular que van desde los 400 hasta 200 kDa, mediante SDS-PAGE. Estas proteínas, están asociadas con la producción de moco (Mub) así como a proteínas de superficie de membrana (FmtB), mismas que también se visualizaron en los corrimientos electroforéticos de las MVs de BAL. Así mismo, se identificó una proteína de 82kDa, que ha sido caracterizada como proteína de dominio S1 que une un ARN. De la misma forma, se identificaron proteínas transportadoras que van de los 54 a los 59 kDa, una proteína de 32 kDa, asociada a la división celular, así como proteínas de 40 y hasta 75 kDa, que están asociadas a funciones probióticas de las mismas, como la p40 y p75<sup>38</sup>. Proteínas de bajo peso molecular, se han relacionado con péptidos señal, y algunos autores se sugieren que este péptido está sumamente relacionado con la secreción de bacteriocinas, además la presencia de las mismas<sup>38, 41-43,55</sup>. Todas las bandas reportadas en la bibliografía consultada, fueron identificadas en las muestras de MVs de BAL y ATCC.

El análisis de los resultados del SDS-PAGE 12%, tanto de MVs como de sobrenadantes de BAL y ATCC, registraron proteínas de pesos moleculares similares entre cada cepa. Al mismo tiempo se observaron proteínas, que por su peso molecular, podrían corresponder a BLIS, así como proteínas de membrana, transporte y división celular entre otras. Cabe mencionar que el principal objetivo del trabajo, fue evidenciar el arrastre de bacteriocinas en MVs de BAL y ATCC, por lo que se compararon los corrimientos electroforéticos, evidenciando proteínas de pesos moleculares similares entre las muestras evaluadas.

Este análisis denota la presencia de proteínas de pesos moleculares que van desde los 59 hasta los 10 kDa, compartidas por ambas muestras. Dichas proteínas, están caracterizadas como proteínas transportadoras de ATP asociadas a la membrana, así como asociadas al transporte de glutamina, proteínas de división celular, y algunas otras, están sin caracterizar<sup>55</sup>.

Las proteínas de mayor relevancia para este trabajo, son aquellas de pesos moleculares de >30 a <10kDa, tanto de MVs como de sobrenadantes, las cuales ambas comparten. Como se discutió anteriormente, estas proteínas podrían corresponder por sus pesos moleculares, a bacteriocinas o BLIS. Lo cual nos acerca más a la posibilidad de que las MVs arrastren péptidos antimicrobianos durante su evaginación.

Para evaluar el efecto de MVs de BAL y ATCC, sobre el crecimiento bacteriano de *S. typhimurium*, se realizaron pruebas de difusión en agar, las cuales son ampliamente utilizadas para probar el efecto inhibitorio de diferentes sustancias. En el presente proyecto, esta prueba se realizó en agar Muller-Hinton, con MVs de BAL y ATCC, utilizando sensidiscos en blanco impregnados con las mismas, observándose halos inhibitorios evidentes de la ATCC y la cepa 54 ambas de *L. acidophilus*, sobre ATCC 154 de *Salmonella typhimurium*.

En otras investigaciones, se han enfrentado BAL's sobre *Listeria monocytogenes*, para probar su efecto inhibitorio. Lo anterior, debido a la alta patogenicidad de *L. monocytogenes*, así como su relevancia en la industria alimentaria<sup>46, 47, 48</sup>. Sin embargo, en otras investigaciones las enterobacterias, suelen ser utilizadas para enfrentarlas a BAL y de esta manera, comprobar la capacidad inhibitoria de las mismas. En estos experimentos se han utilizados sobrenadantes de cultivos de BAL, que suelen ser normalmente filtrados<sup>49,50</sup>.

Los resultados de este método nos permitieron observar claramente halos de inhibición, alrededor de los discos impregnados con las MVs. Esto evidencia la capacidad inhibitoria de las MVs, lo cual podría atribuirse a los componentes de la pared celular de las bacterias Gram (+), los peptidoglicanos y ácidos lipoteicóicos de la misma, ya que están involucrados en la inducción de citocinas. Esta habilidad ha sido ampliamente reportada y se ha determinado incluso que cepas de BAL, son potentes inductores de la síntesis de TNF- $\alpha$ , en cantidades mucho más altas de las que induce el LPS de las Gram (-). En ese sentido, la estructura de las MVs de BAL, tienen una alta capacidad inhibitoria de crecimiento de bacterias patógenas, debido a la composición de su estructura, así como de los componentes que arrastra de manera interna.<sup>49</sup>

De esta forma, se sugiere que alguno de estos componentes internos como es el caso de las bacteriocinas, o bien factores de patogenicidad externa o la mezcla de ambos, son los que confieren la actividad inhibitoria de las MVs de BAL sobre ATCC 154 *Salmonella typhimurium*.

Este documento, es el primer reporte de la capacidad inhibitoria de las MVs de BAL, aisladas de TGI de *Rattus norvegicus* de vida libre, sobre el crecimiento de patógenos bacterianos, como *S. typhimurium*.

Para comprobar que las BAL son productoras de bacteriocinas o BLIS, se realizó un ensayo de enfrentamiento indirecto, el cual tiene por objetivo comprobar la presencia de moléculas de bajo peso molecular (menos de 7 kDa) con capacidad inhibitoria. Los resultados demostraron, que las cepas de BAL dentro de la membrana, crecieron sin problemas, respecto a la presencia de *Salmonella typhimurium* inoculada en el caldo AST. Al término de 48 h, se observó a la tinción de Gram, degradación de *Salmonella* después del enfrentamiento. Las bacterias, se aprecian hinchadas y con un tono violeta y fue evidente la poca cantidad de células bacterianas en el frotis. Para corroborar la viabilidad de *Salmonella typhimurium*, debido a las alteraciones morfológicas que se evidenciaron, esta se sembró por 24 hrs /37°C, mostrando un crecimiento reservado. La apariencia microscópica de *Salmonella*, se atribuye a dos cuestiones: *Salmonella* modifica su peptidoglicano para adaptarse a las diferentes condiciones ambientales, y por otro lado la presencia de bacteriocinas en el sobrenadante, podrían estar alterando la membrana bacteriana creando poros y modificando la permeabilidad de la misma hasta producir choque osmótico y destruirla<sup>52,53</sup>.

En un experimento similar al realizado en este trabajo, se obtuvieron resultados muy parecidos, con *E. coli* utilizando como BAL, *Pediococcus acidilactici*. La membrana se sustituyó por filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  y de manera similar se comprobó un efecto bacteriostático, la cepa de *Pediococcus acidilactici* creció de forma constante<sup>51</sup>.

Las MVs de BAL, aisladas de TGI de *Rattus norvegicus* de vida libre, resultaron ser estructuras con una alta posibilidad de tener efectos bacteriostáticos similares a los que muestra las células completas de origen. Lo anterior debido a la gran cantidad de proteínas que arrastran en su estructura, así como por los elementos que la conforman. Abriendo un campo de investigación en el uso de MVs de BAL, como moléculas con capacidad probiótica en las diferentes especies.

## VIII. CONCLUSIONES

- Todas las cepas de BAL aisladas de TGI de *Rattus norvegicus* de vida libre, utilizadas en este proyecto, son productoras de MVs.
- Las BAL aisladas de TGI de *Rattus norvegicus* de vida libre, producen una mayor cantidad de MVs en ausencia de CO<sub>2</sub>.
- Las MVs y los sobrenadantes de todas las cepas de BAL, comparten múltiples proteínas de diferentes pesos moleculares.
- No se purificaron bacteriocinas, sin embargo, se purificaron BLIS (sustancias parecidas a las bacteriocinas), en función de los pesos moleculares analizados.
- La ATCC 314 de *L. acidophilus* y la cepa 54 de *L. acidophilus* aislada de Íleon de *Rattus norvegicus*, producen sustancias inhibitorias menores a 7kDa que tienen efectos bacteriostáticos sobre *Salmonella typhimurium* ATCC 154.
- Las MVs de BAL: ATCC 314 de *L. acidophilus* y la cepa 54 de *L. acidophilus* aislada de Íleon del TGI de *Rattus norvegicus* de vida libre, tiene capacidad inhibitoria sobre el crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 154.
- Este documento, es el primer reporte de la capacidad inhibitoria de las MVs de BAL, aisladas de TGI de *Rattus norvegicus* de vida libre, sobre el crecimiento de patógenos bacterianos, como *S. typhimurium*.

## IX. LITERATURA CITADA

1. Heredia-Castro, Priscilia Y.; Hernández-Mendoza, Adrián; González Córdova, Aarón F.; Vallejo-Cordoba, Belinda. (2017). Bacteriocinas de Bacterias Ácido Lácticas: mecanismos de acción Y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*. 42(6): 340-346
2. Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through The Wall: extracellular vesicles in Gram-Positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 620.
3. Liu, Y., Defourny, K. A., Smid, E. J., & Abee, T. (2018). Gram-Positive Bacterial Extracellular Vesicles and their impact on health and disease. *Frontiers In Microbiology*, 9, 1502.
4. Sánchez Rodríguez, M. T. (2018). Formas farmacéuticas sólidas destinadas a la bioterapia con microorganismos probióticos. Granada: Universidad De Granada, [Http://Hdl.Handle.Net/10481/51117]
5. Crespo Narváez, K. A. (2018). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos (Bachelor's thesis, Universidad del Azuay). <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/8595>
6. Londoño, N. A., Taborda, M. T., López, C. A., & Acosta, L. V. (2015). Bacteriocinas producidas por Bacterias Ácido Lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Alimentos Hoy*, 23(36):186-205.
7. Monroy, M., Castro, T., Fernández, F. J., Mayorga, L. (2009). Revisión Bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contacto S*, 73: 63-72.
- 8 Castro, M., & De Souza Rodríguez, F. (2005). Levaduras: Probióticos y prebióticos que mejoran la producción animal. *Revista Corpoica: Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 6(1), 26-38.

9 Vega-Cañizares, E., Pérez-Ruano, M., Armenteros-Amaya, M., Hernández-García, J. E., Rodríguez-Fernández, J. C., & Valdez-Paneca, G. (2018). Eficacia de un probiótico sobre *Escherichia Coli* K88 en cerdos. *Revista De Salud Animal*, 40(1), 00-00.

10 Guenther, S., Bethe, A., Fruth, A., Semmler, T., Ulrich, R. G., Wieler, L. H., & Ewers, C. (2012). Frequent combination of antimicrobial multiresistance and extraintestinal pathogenicity in *Escherichia coli* isolates from urban rats (*Rattus norvegicus*) in Berlin, Germany. *Plos One*, 7(11), E50331.

11. Rodríguez, H., Sastre, G., (1999), Tratado de nutrición, Editorial Díaz De Santos S.A. Juan Bravo, 3-A, 28006 Madrid. ISBN: 84-7978-387-7. Pág. 131-132.

12. Molina Galicia (2017). Aislamiento e identificación mediante el uso de pruebas bioquímicas de bacterias ácido lácticas del tracto digestivo de ratas (*Rattus norvegicus*), (Tesis pregrado) Universidad Nacional Autónoma de México. FES Cuautitlán.

13. Gorbeña, J. C. R., & Sáenz, T. A. (2017). Bacterias Ácido Lácticas. *Biotempo*, 8, 54-64.

14. Huertas, R. A. P. (2010). Bacterias Ácido Lácticas: papel funcional en los alimentos. *Ingresar A La Revista*, 8(1), 93-105.

15. S. Orla-Jensen. La Classification des Bactéries Lactiques.. *Le Lait*, Inra Editions, 1924, 4 (36), Pp.468-474.

16. Galina, M. A., Delgado-Pertiñez, M., Ortíz-Rubio, M. A., Pineda, L. J., & Puga, D. C. (2009). Cinética ruminal y crecimiento de cabritos suplementados con un probiótico de bacterias ácido lácticas. *pastos y forrajes*, 32(4), 1-1.

17. Oliveira, F. S., Frias, D. F. R., Kozusny-Andreani, D. I., Martins, L. L., Delfini, A., & Toniollo, G. H. (2009). Microbiota intestinal em cutias criadas em cativeiro. *Ciência animal brasileira*, 10(2), 660-662.

18. Terán Ventura, D. E. (2010). Influencia del ambiente sobre la microbiota comensal del intestino de la rata implicaciones en la inflamación y en mecanismos sensoriales. Universidad Autónoma de Barcelona, <https://hdl.handle.net/10803/5408>.
19. Robles-Sánchez, C. (2017). Efecto De *Lactobacillus paracasei* Cncm I-4034, *Lactobacillus rhamnosus* Cncm I-4036 Y *Bifidobacterium breve* Cncm I-4035 sobre la expresión génica de la mucosa intestinal de ratas obesas, <http://hdl.handle.net/10481/48945>.
20. Mamani, J. J. V. (2018). Sustancias para inducción de enfermedades en ratas: Revisión De Literatura. Revista Médica Basadrina, 12(2), 47-50.
21. Ferrer, J. D., Parra, V., Bendaño, T., Montes, P., & Solorzano, P. (2017). Utilidad del suplemento de probióticos (*Lactobacillus acidophilus* Y *Bulgaricus*) en el tratamiento del síndrome de intestino irritable. Revista De Gastroenterología Del Perú, 32(4), 387-93.
22. Guarner, F., Sanders, M. E., Eliakim, R., Fedorak, R., Gangl, A., Garisch, J., & De Paula, J. A. (2017). Probióticos Prebióticos. Guía Mundial De La World Gastroenterology Organization.(Wgo) global guidelines: probiotics and prebiotics october 2011. *Journal of clinical gastroenterology*, 46(6), 468-481.
23. Salazar Marroquín, E. L. (2016). Detección y caracterización de bacteriocinas producidas por cepas de *Bacillus thuringiensis* y su potencial como agentes antibacterianos (Doctoral Dissertation, Universidad Autónoma De Nuevo León).
24. Lara González, Elizabeth Berenice, Sustentante (2018). Producción y caracterización de compuestos similares a bacteriocinas de una cepa de *Streptococcus sp.* aislada de alimentos fermentados tradicionales. (Tesis pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.
25. Llorente Bousquets, Adriana, Sustentante (2008). Caracterización de la actividad antibacteriana de *Pediococcus acidilactici* Atcc 8042. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.

26. Portas Torres, I. (2016). Implicación de las vesículas de membrana externa de *Klebsiella pneumoniae* en la resistencia frente a péptidos antimicrobianos. <http://hdl.handle.net/11201/1717>.
27. Añón, J. C., Corpas, I., Alique, M., Ramírez-Carracedo, R., & Ramírez, R. (2018, March). Papel de las microvesículas como biomarcadores y futuras dianas farmacológicas de enfermedades cardiovasculares. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 84(1).
28. Barreto, M., Castillo-Ruiz, M., & Retamal, P. (2016). Salmonella enterica: una revisión de la tríada agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista chilena de infectología*, 33(5), 547-557.
29. Carmen, A., & Luciana, N. (2019). Efecto inhibitorio de *Lactobacillus sp.* sobre el crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Piura, Perú, 2018. <http://repositorio.unp.edu.pe/handle/UNP/1956>.
30. Chero, A., Rosadio, R., Marcelo, G., Díaz, G., Jiménez, R., Castro, Y., & Maturrano, L. (2017). Identificación molecular de *Salmonella typhimurium* en cuyes al primer parto mediante la técnica de PCR múltiple. *revista de investigaciones veterinarias del Perú*, 28(3), 679-686.
31. Parra, M., Durango, J., & Máttar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *Revista MVZ Córdoba*, 7(2), 187-200.
32. Li, M., Lee, K., Hsu, M., Nau, G., Mylonakis, E., & Ramratnam, B. (2017). *Lactobacillus*-derived extracellular vesicles enhance host immune responses against vancomycin-resistant enterococci. *BMC microbiology*, 17(1), 66.
33. Benaprés, J. R. M., & Guarner, F. (2003). La flora bacteriana del tracto digestivo. *Gastroenterología y hepatología*, 26(1), 1-5.

34. Castañeda Guillot, C. (2018). Microbiota intestinal y salud infantil. *Revista Cubana de Pediatría*, 90(1), 94-110.
35. Cachay, M. V., & Acosta, H. V. (2012). Desarrollo del epitelio del tracto intestinal y su participación en la defensa del organismo en mamíferos. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 13(7), 1-40.
36. Leal Bohórquez, A. F. (2017) Propiedades electrofisiológicas y producción de óxido nítrico en macrófagos murinos durante su interacción con OMVs de *E. coli* JC8031 (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá).
37. Fandiño, J. M. (2010). Complejos proteicos de membrana externa de "*Neisseria meningitidis*": análisis estructural y capacidad antigénica (Doctoral dissertation, Universidade de Santiago de Compostela).
38. Domínguez Rubio, A. P., Martínez, J. H., Martínez Casillas, D. C., Coluccio Leskow, F., Piuri, M., & Pérez, O. E. (2017). *Lactobacillus casei* BL23 produces microvesicles carrying proteins that have been associated with its probiotic effect. *Frontiers in microbiology*, 8, 1783. doi:10.3389/fmicb.2017.01783
39. Grande Rossella, Celia Christian, Mincione Gabriella, Stringaro Annarita, Di Marzio Luisa, Colone Marisa, Di Marcantonio Maria C., Savino Luca, Puca Valentina, Santoliquido Roberto, Locatelli Marcello, Muraro Raffaella, Hall-Stoodley Luanne, Stoodley Paul. Detection and Physicochemical Characterization of Membrane Vesicles (MVs) of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 *JOURNAL Frontiers in Microbiology*. 8:1040.
40. Nativitas Esquivel, Ana Lisset, (2017). Sustentante. Evaluación de un inmunógeno a base de microvesículas (MVs) de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2, de aplicación en ovinos del Estado de México, (Tesis pregrado), Universidad Nacional Autónoma de México.

41. Cañas Pacheco, M. A. (2017). Comunicación microbiota-huésped: Internalización y señalización intracelular de vesículas de membrana externa de cepas probióticas y comensales de *E. coli* en células de epitelio intestinal. <http://hdl.handle.net/2445/121346>.
42. Aguirre, Gabriela Edith (2017) Evaluación de la actividad antibacteriana de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis bovina. (Tesis Doctoral), Universidad Católica de Córdoba.
43. Botina A., B., Zimmermann, B. H., & Vanegas, M. (2008). Caracterización preliminar de compuestos antilisteriales producidos por bacterias ácido lácticas nativas. *Revista MVZ Córdoba*, 13(3).
44. Lee, E. Y., Choi, D. Y., Kim, D. K., Kim, J. W., Park, J. O., Kim, S., ... & Gho, Y. S. (2009). Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics*, 9(24), 5425-5436.
45. Nicholas, A., Jeon, H., Selasi, G. N., Na, S. H., Kwon, H. I., Kim, Y. J., Lee, J. C. (2017). *Clostridium difficile* -derived membrane vesicles induce the expression of pro-inflammatory cytokine genes and cytotoxicity in colonic epithelial cells in vitro. *Microbial Pathogenesis*, 107,11. doi:10.1016/j.micpath.2017.03.006
46. Olvera-García, M., Serrano, E., & Quirasco, M. (2015). Detección de proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas. *Revista de la SMBB (Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería)*, 25-27.
47. Rivera, C. A., & Vanegas, M. C. (2011). Inhibición de *Listeria monocytogenes* con Bacterias Ácido Lácticas productoras de bacteriocinas. *Alimentos Hoy*, 12(12), 36-40.
48. Gámez, H. J., Martínez-Benavides, J., & Paz, C. (2015). Caracterización del proceso de fermentación y del efecto de inhibición de *Lactobacillus lactis* en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. *Revista de Medicina Veterinaria*, (30), 15-29.

49. Maldonado, A. C. E. (2005). Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* contra *Salmonella sp.* y *Escherichia coli*. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 58(1), 2601-2609.
50. Zea, J. M. V., Ramírez, L. A. G., & Campuzano, O. I. M. (2015). Evaluación de la actividad bactericida de bacterias ácidolácticas aisladas en calostro de cerdas frente a *Salmonella typhimurium*. Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín, 68(1), 7481-7486.
51. Ortuño de la O, Eridani Noemi, sustentante (2018) Efecto de *Pediococcus acidilactici* (ATCC 8042) sobre *Escherichia coli* O157:H7 (EDL 933) en medio infusión carne modificado. (Tesis de grado Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, FES Cuautitlán.
52. Rico Pérez, G. (2015). Metabolismo del peptidoglicano de *Salmonella* en el interior de células eucariotas. <http://hdl.handle.net/10486/669431>.
53. Apaza Chayña, A. (2019). Actividad antimicrobiana de las Bacteriocinas del *Lactobacillus* sobre bacterias del Genero *Staphylococcus sp.* . <http://repositorio.uancv.edu.pe/handle/UANCV/4134>.
54. Simonetti Covarrubias, G. (2018). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libre de células enriquecidos en proteínas producidos por *Lactobacillus Acidophilus*, *L. Casei*, *L. Fermentum* y *L. Rhamnosus*, sobre el patógeno humano *Neisseria Gonorrhoeae* (Doctoral dissertation, Universidad Andrés Bello, Facultad de Medicina).
55. Dean, S. N., Leary, D. H., Sullivan, C. J., Oh, E., & Walper, S. A. (2019). Isolation and characterization of *Lactobacillus*-derived membrane vesicles. Scientific reports, 9(1), 1-11.