



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**  
**CUAUTITLÁN**

**EVALUACIÓN DE LA ADHERENCIA DE PROBIÓTICOS DE  
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN CÉLULAS DE EPITELIO  
INTESTINAL (Caco-2, HT-29) Y SU ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA A PATÓGENOS.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**P R E S E N T A:**

**Raúl Adrián Meléndez Carvajal**

Asesora: Dra. Luz María Rocha Ramírez

Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas.

Hospital Infantil de México Federico Gómez.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación en Enfermedades  
Infecciosas del Hospital Infantil de México Federico Gómez

Esta tesis fue financiada por el apoyo a Proyectos de Investigación (**Fondos Federales**) de  
la Secretaria de Salud con número de registro **HIM/2014/013 SSA 1120**

# Índice General

<b>I. INDICE DE FIGURAS</b> .....	I
<b>II. INDICE DE TABLAS</b> .....	II
<b>III. ABREVIATURAS</b> .....	III
<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>2.1</b> LA MICROBIOTA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL HUMANO.....	3
<b>2.2</b> DE LA MICROBIOTA A LOS PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y PARAPROBIÓTICOS.....	5
<b>2.3</b> PROBIÓTICOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS- <i>Lactobacillus</i> .....	6
<b>2.4</b> COMPLEJO DEL GRUPO DE <i>Lactobacillus casei</i> (LCG).....	8
<b>2.5</b> ASPECTOS CRÍTICOS EN LA INTERRELACIÓN DE PROBIÓTICOS Y EL HOSPEDERO.....	11
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	19
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	23
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	25
<b>6.1</b> OBJETIVO GENERAL.....	25
<b>6.2</b> OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	26
<b>7.1</b> CEPAS DE <i>Lactobacillus</i> PROBIÓTICAS AISLADAS DE PRODUCTOS COMERCIALES.....	26
<b>7.2</b> CEPAS PATÓGENAS INDICADORAS.....	27
<b>7.3</b> OBTENCIÓN DE SOBRENADANTES LIBRES DE CÉLULAS BACTERIANAS (SLB) DE <i>Lactobacillus</i> .....	29

7.4 EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE SUPERFICIE HIDROFOBICIDAD, AUTO-AGREGACIÓN DE CEPAS DE <i>Lactobacillus</i> .....	29
7.5 CULTIVO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE INTESTINO HUMANO Caco-2 y HT-29.....	31
7.6 ENSAYOS DE ADHERENCIA DE <i>Lactobacillus</i> A CÉLULAS EPITELIALES DE INTESTINO Caco-2, HT-29.....	33
7.7 INTERFERENCIA DE ADHESION A PATOGENOS INDICADORES POR <i>Lactobacillus</i> EN CÉLULAS Caco-2, HT-29.....	36
7.8 ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD ANTI-MICROBIANA DE SOBRENADANTES LIBRE DE CÉLULAS DE <i>Lactobacillus</i> (SLB) A PATÓGENOS INDICADORES.....	37
7.9 ANALISIS ESTADISTICO.....	38
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
8.1 CARACTERÍSTICAS DE HIDROFOBICIDAD SUPERFICIAL DE CEPAS PROBIÓTICAS DE <i>Lactobacillus</i> .....	39
8.2 AUTO-AGREGACIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS DE <i>Lactobacillus</i> .....	40
8.3 PROPIEDADES DE ADHESION DE CEPAS DE <i>Lactobacillus</i> EN MODELO in vitro DE CÉLULAS EPITELIALES Caco-2, HT-29 HUMANAS.....	41
8.4 INHIBICIÓN DE LA ADHERENCIA DE CEPAS PATÓGENAS SOBRE CÉLULAS EPITELIALES HT-29 Y CACO-2 POR AISLADOS DE <i>Lactobacillus</i> .....	44
8.5 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS SOBRENADANTES LIBRES DE CÉLULAS BACTERIAS (SLB) DE <i>Lactobacillus</i> SOBRE DE CEPAS PATÓGENAS INDICADORAS.....	47
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>11. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>57</b>
<b>12. REFERENCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>13. ANEXOS.....</b>	<b>75</b>

# I. Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Microbioma del tracto gastrointestinal humano.....	4
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de acción por <i>Lactobacillus</i> del grupo (LCG).....	10
<b>Figura 3.</b> Efectos benéficos de probióticos y sus principales mecanismos de acción.....	12
<b>Figura 4.</b> Mecanismos de acción de los probióticos en su interacción con células del Hospedero.....	13
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de acción directos e indirectos de bacterias probióticas.....	15
<b>Figura 6.</b> Mecanismos anti-adherentes de probioticos, prebióticos contra toxinas Bacterianas .....	22
<b>Figura 7.</b> Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC)/ml en cepas patógenas Indicadoras .....	27
<b>Figura 8.</b> Evaluación de hidrofobicidad en células bacterianas de <i>Lactobacillus</i> por tratamiento con xileno.....	30
<b>Figura 9.</b> Imágenes de Referencia de células epiteliales humanas HT-29 (ATCC HTB-38), y Caco-2 ( ATCC HTB-37).....	32
<b>Figura 10.</b> Ensayo de adherencia de <i>Lactobacillus</i> en células HT-29 y Caco-2.....	34
<b>Figura 11.</b> Estrategia experimental para determinar la actividad antimicrobiana de <i>Lactobacillus</i> .....	38
<b>Figura 12.</b> Auto-agregación (%) de <i>Lactobacillus</i> .....	40
<b>Figura 13.</b> Adhesión de <i>Lactobacillus</i> a células de epitelio intestinal humano HT-29, Caco-2.....	41
<b>Figura 14.</b> Visualización Microscópica de adhesión de <i>Lactobacillus</i> a células HT-29 .....	42
<b>Figura 15.</b> Visualización Microscópica de adhesión de <i>Lactobacillus</i> a células Caco-2 .....	43
<b>Figura 16.</b> Inhibición de adherencia de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 por <i>Lactobacillus</i> en células epiteliales humanas HT-29, Caco-2.....	44
<b>Figura 17.</b> Inhibición de adherencia de <i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028 por <i>Lactobacillus</i> en células epiteliales humanas HT-29, Caco-2.....	45

**Figura 18.** Inhibición de adherencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213  
por *Lactobacillus* en células epiteliales HT-29, Caco-2 .....46

**Figura 19.** Efectos reguladores de las cepas probióticas de bacterias ácido lácticas como  
*L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* KLDS, *L. helveticus* IMAU70129, *L. casei*  
Shirota y *L. casei* IMAU60214.....55

## II. INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Microorganismos probióticos utilizados en la Nutrición humana.....	8
<b>Tabla 2.</b> Características de las cepas probióticos de <i>Lactobacillus</i> de estudio.....	26
<b>Tabla 3.</b> Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) de los patógenos Indicadores.....	28
<b>Tabla 4.</b> Determinación de la hidrofobicidad superficial de cepas probióticas de <i>Lactobacillus</i> .....	39
<b>Tabla 5.</b> Actividad Antimicrobiana de Sobrenadantes Libres de Células (SLB) de <i>Lactobacillus</i> en contra de cepas patógenas indicadoras, <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218, <i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 23219 por método de difusión en pozos de Agar Mueller-Hinton (Halos de inhibición del crecimiento, en mm).....	47

### III. ABREVIATURAS

<i>Abreviatura</i>	<i>Descripción</i>
ADN	Acido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico.
ATB	Antibiótico.
ATR	Respuesta de tolerancia a los ácidos
BAL	Bacterias ácido lácticas.
BHI	Infusión cerebro-corazón
Ca	Calcio
Dil	Dilución.
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium.
EAEC	<i>E. coli enteroagregativa.</i>
E. coli	<i>Escherichia coli.</i>
EF-Tu	Factor de alargamiento termoestable.
EIEC	<i>E. coli enteroinvasiva.</i>
EII	Enfermedades inflamatorias del intestino.
EPEC	<i>E. coli enteropatógena.</i>
ETEC	<i>E. coli enterotoxigénica.</i>
FAO	Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación.
Fbp	Proteína de unión a fibronectina.
Fe	Hierro.
GABA	Ácido gamma-aminobutírico.
GRAS	Generalmente considerado como seguro.
HRM	Análisis de fusión de alta resolución.
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10

<i>Abreviatura</i>	<i>Descripción</i>
IL-12	Interleucina 12
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>
LPS	Lipopolisacárido
MapA	Proteína promotora de adhesión de moco
Mg	Magnesio
μL	Microlitros
mL	Mililitros
MRS	Manosa, Rugosa y Sharpe
Mub	Proteína de unión a mucina
NK	Natural Killer Cell
OMS	Organización mundial de la salud
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SFB	Suero fetal bovino.
SLB	Sobrenadante libre de bacterias
SPI-1	Isla de patogenicidad 1 de salmonella.
SSF	Solución salina fisiológica
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>
TGF-β	Factor de crecimiento transformante
TNF-α	Factor de necrosis tumoral

# 1. RESUMEN

Las bacterias probióticas son reconocidas por sus propiedades promotoras a la salud del hospedero, entre ellas mantenimiento de la integridad del epitelio intestinal y la homeostasis del sistema inmune. Los criterios importantes al tamizaje potencial de probióticos involucran la hidrofobicidad, auto-agregación, adherencia a epitelio, anti-adhesión contra patógenos y su actividad anti-microbiana. En el presente tesis se realizó un estudio comparativo de estas propiedades en cinco cepas del género de *Lactobacillus* aisladas de productos comerciales de leches fermentadas: (*L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* KLDS, *L. helveticus* IMAU70129, *L. casei* IMAU60214, y *L. casei* Shirota). La hidrofobicidad de superficie celular de estas cepas fue evaluada por el descenso de su absorbancia a 600 nm de la fase acuosa, en mezclas de células bacterianas probióticas en volumen 1:1 con p-xileno, después de agitación vigorosa durante 2 minutos. La auto-agregación en las células bacterianas de *Lactobacillus* se determinó por la diferencia de absorbancia a 600 nm, a 2 y 5 horas de incubación a 37°C. Su capacidad de adhesión ( $1 \times 10^8$  *Lactobacillus*/célula) se evaluó en modelo *in vitro* con monocapas de células epiteliales humanas (HT-29, Caco-2) adheridas a cubreobjetos redondos de 12 cm de diámetro después de 2 h de incubación a 37°C en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. El conteo de adhesión *Lactobacillus*/100 células epiteliales se realizaron por tinción con colorante de Giemsa. En las mismas condiciones experimentales se analizó la anti-adhesión contra patógenos indicadores *E. coli* (ATCC 35218), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) mediante método de exclusión usando relaciones 1:1 (bacteria-patógena/*Lactobacillus*), después de interacción de 1 h a 37°C en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Así mismo, se evaluó el efecto de sobrenadantes libres de células (SLB) obtenidos del cultivo de 48 h de las cepas de *Lactobacillus* (filtrado en membrana de poro de 0.22 μ, pH = 6.5). Después 100 μl de este filtrado fue adicionado sobre orificios de 8 mm de diametro en placas de agar Muller-Hinton en placas previamente inoculadas con las cepas patógenas e incubadas por 24 h a 37°C. Los halos de inhibición observados sobre las placas de crecimiento de las cepas patógenas indicadoras fueron medidos en milímetros.

Los resultados de la presente tesis mostraron que la hidrofobicidad de la superficie celular fue relativamente similar entre las cepas estudiadas con porcentajes de ( $22.8 \pm 2.3$ ,  $24.8 \pm 2.1$ ,  $36.5 \pm 3.2$ ,  $38 \pm 2.34$ ,  $32 \pm 2.1$ ) en *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* KLDS, *L. helveticus* IMAU70129, *L. casei* IMAU60214, y *L. casei* Shirota respectivamente. Además, todas las cepas mostraron mayor auto-agregación con respecto al tiempo. Sin embargo, *L. casei* IMAU60214 mostró el (%) más alto de auto-agregación ( $36 \pm 2.3\%$ ) en comparación a las otras cepas: *L. rhamnosus* GG ( $22.8\% \pm 2.3$ ), *L. rhamnosus* KLDS (36.5%), *L. helveticus* IMAU70129 ( $32\% \pm 2.1$ ), *L. casei* Shirota (32%). Con respecto, a la capacidad de adhesión en células epiteliales (HT-29, Caco-2), las cepas de *Lactobacillus* mostraron buena adherencia: *L. casei* Shirota con valores de ( $345 \pm 15$  células bacterianas/100 células), en comparación de *L. rhamnosus* GG ( $250 \pm 22$ ), *L. rhamnosus* KLDS ( $280 \pm 30$ ), *L. helveticus* IMAU70129 ( $300 \pm 23$ ), y *L. casei* IMAU60214 ( $250 \pm 15$ ) respectivamente. Sin embargo, las cepas de *Lactobacillus* se adhieren en un número mayor de *Lactobacillus* en las células de HT-29 a diferencia de las células Caco-2 con valores de adhesión de (100 a 150 *Lactobacillus*/100 células). Además, todas las cepas mostraron actividades anti-adhesión contra los patógenos de *E. coli*, (ATCC 35218), *S. typhimurium* (ATCC 14028) y *S. aureus* (ATCC 29213) en grados variables. De igual forma, (SLB) obtenido de los *Lactobacillus* exhibieron actividad anti-microbiana con rangos en halos de inhibición de (de 8 a 14 mm de diámetro) al comparar con testigo positivo de antibiótico de tetraciclina ( $16 \pm 0.53$ ) así como un testigo negativo (MRS pH=6.5 con ausencia de efecto inhibitorio).

En conclusión, todos estos resultados demuestran el potencial probiótico de estas cepas, *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* KLDS, *L. helveticus* IMAU70129, *L. casei* IMAU60214, comparado a una cepa más ampliamente estudiada como es *L. casei* Shirota, sugiriendo que estas cepas podrían ser importantes candidatos como agentes de acción bio-terapéutica y un papel importante como alimentos funcionales.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 . La microbiota del tracto gastrointestinal humano.

El término de microbiota intestinal se introdujo por primera vez en la comunidad científica por Joshua Lederber quién lo llamo “lo ecológico” (comunidad de comensales, simbióticos o microorganismos ignorados como causa de enfermedades (**Joshua Lederberg, et al, 2006**).

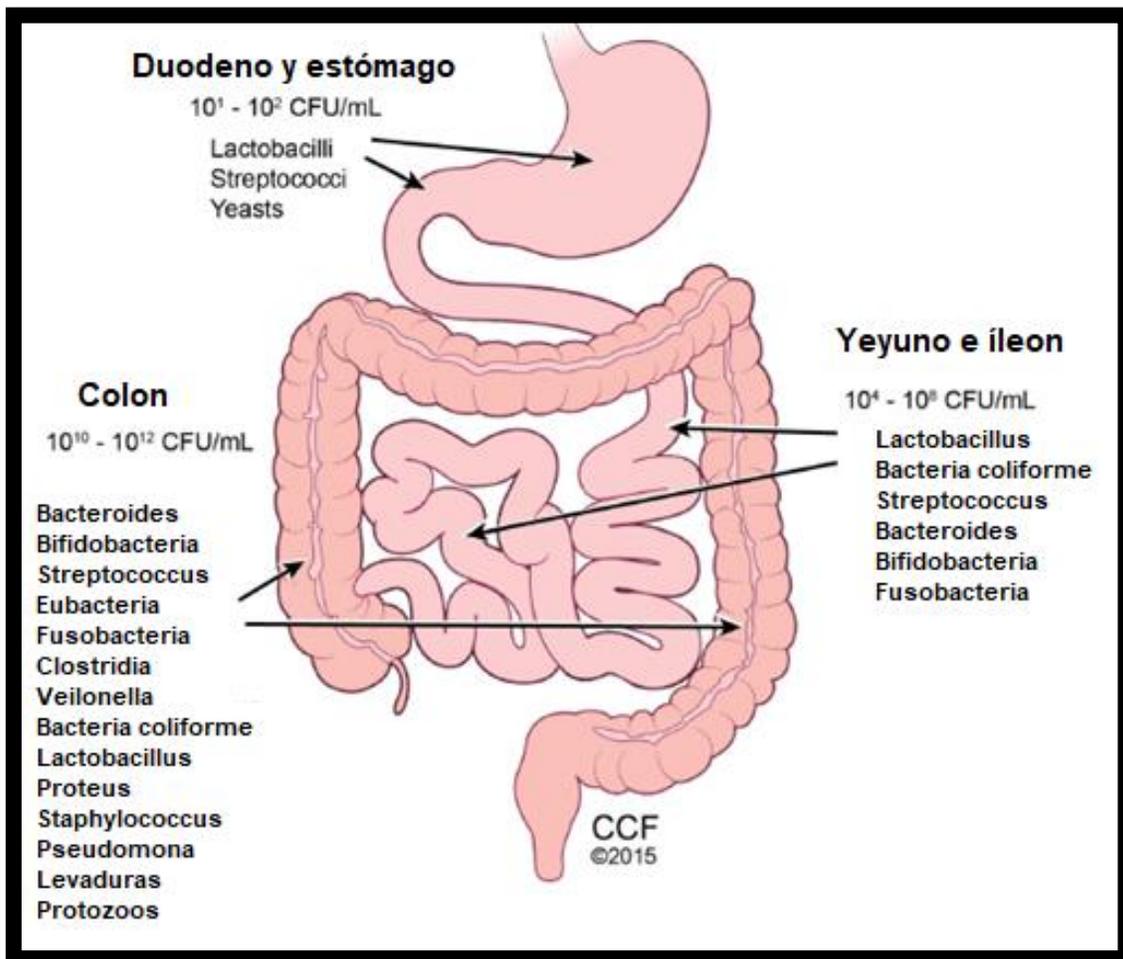
La microbiota del tracto gastrointestinal humano tiene un papel importante, en la salud intestinal y es definida como un ecosistema complejo con aproximadamente 300 a 500 especies bacterianas que comprenden casi dos millones de genes (“*Microbioma*”). En el tracto gastrointestinal (por ejemplo, intestino delgado y colón) la cantidad de bacterias es aproximadamente 10 veces mayor en comparación a las células del cuerpo humano. Una comparación al peso de referencia del humano (70 Kg) sugiere que la microbiota tiene un peso de 0.2 Kg por  $3.8 \times 10^{13}$  millones de microorganismos (**Cresci GA, et al, 2015**).

Esta reportado que, al nacimiento, todo el tracto gastrointestinal es estéril y las primeras bacterias que entran al intestino son introducidas por el primer alimento; después en la infancia, la composición de la microbiota permanece relativamente constante. Así mismo, se ha sugerido que la microbiota entre un individuo y otro es tan distintiva que podría utilizarse como una alternativa de “*huella digital*” (**Deering KE, et al, 2019**).

En la microbiología del íleon terminal, esta zona de transición al yeyuno presenta captura de microbiota particularmente de anaerobios facultativos. Sin embargo, la población densa de anaerobios es encontrada en el colón; con elevado recuento de unidades formadoras de colonias (CFs) ( $10^{12}$ /ml CFU) (**Stewart CJ, et al, 2018**).

Las bacterias de anaerobios del microbioma intestinal humano incluyen principalmente tres grupos de fylum: *Bacteriodes*, (*Porphyromonas*, *Prevotella*), *Firmucutes* (*Ruminococcus*,

*Clostridium*, *Eubacteria*), y Actinobacteria (*Bifidobacterium*), *Lactobacillum*, *Streptococcus* y *Escherichia coli* que se encuentran en pequeñas cantidades (**Figura 1**).



**Figura 1. Microbioma Humano del tracto gastrointestinal.** El proyecto del genoma humano identifica trillones de microorganismos en el tracto gastrointestinal humano de individuos sanos. Este sistema está constituido de bacterias, hongos y virus localizados en nichos ecológicos

*Tomado de: Cresci GA. Nutr Clin Pract, 2015 ; 30(6): 734–746.*

La microbiota normal entérica influye en varias funciones del intestino con efectos biológicos sobre nutrición, integridad de barrera del epitelio intestinal (células epiteliales) y en inmunidad de la mucosa. Así mismo, azúcares dietéticos no absorbidos como la lactosa y los alcoholes son rescatados por disacaridasas bacterianas que los transforman en ácido grasos libres de cadena corta (SCFAs) (Meijer K, et al, 2010).

Estos SCFAs pueden utilizarse como fuente de energía por la mucosa del colón para favorecer crecimiento y diferenciación de las células epiteliales intestinales (Li M, van Esch, et al, 2018). La microbiota también es fuente de nutrientes, vitaminas, (como folatos y vitamina K): su interacción con el sistema inmune del hospedero es importante a la protección de varios microorganismos patógenos (Murugesan S, et al, 2018).

En dicho contexto, la microbiota intestinal produce una variedad de sustancias, que van de los relativamente no específicos como (SCFA, peróxidos) hasta componentes altamente específicos como las bacteriocinas, que pueden inhibir o eliminar bacterias potencialmente patógenas (Le Poul E, et al 2003). Parte de la microbiota incluyen géneros de bacterias que por sus acciones benéficas al hospedero se han denominan como cepas probióticas, los cuales muchas de ellas han sido aislados de tracto gastrointestinal del hospedero (Butel MJ et, al, 2014).

## **2.2 De la microbiota a los probióticos, prebióticos y paraprobióticos**

Los probióticos fueron descritos por primera vez por Elie Metchnikoff en 1908, basado en la longevidad observada en personas de zonas de Bulgaria que ingerían de forma regular leches fermentadas (Cavaillon, J. M, et al, 2016). Los probióticos derivan del vocablo griego que significa “*para la vida*” están definidos como microorganismos vivos que cuando son consumidos en cantidades adecuadas tienen efecto benéfico a la salud del hospedero.

Sin embargo, a los microorganismos probióticos se han adicionado también las propiedades biológicas de los pre-bióticos y simbio-probióticos, nutri-probióticos, fármaco-probióticos así como los para-probióticos. Los prebióticos se definen como alimentos no ingeribles, pero fermentables que afectan beneficiosamente al huésped al estimular selectivamente el crecimiento y la actividad de una especie o un número limitado de especies de bacterias en el colón.

Por el contrario, los simbióticos son la combinación de probióticos y un prebiótico, al que generalmente se le atribuye un efecto potencial al aumentar la sobrevivencia de los probióticos en eficacia *in vivo*, así también como estimuladores de bifidobacterias, y *Lactobacillus* indígenas (Sanders ME, et al 2019). Recientemente los “*probióticos fantasmas*” o para-probióticos que conservan su potencia inmunomoduladora más allá, de sus características de viabilidad (Deshpande G et al 2018).

Los para-probióticos integran componentes de células o fracciones derivadas de bacterias probióticas, muertas por calor que administradas por vía oral tienen efectos positivos en la inmunidad del hospedero, los cuales ofrecen menor riesgo, ya que representan componentes no-viables, por tratamiento por calor (Taverniti V, et al 2011). La mayoría de las especies de bacterias probióticas en la investigación biomédica incluyen al grupo de bacterias ácido lácticas (BAL) (Khalid K, et al 2011).

### **2.3. Probióticos de Bacterias ácido Lácticas- *Lactobacillus***

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se encuentran clasificadas en el phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, y en el orden de los *Lactobacillus* (Zuñiga M et al, 1993, Naidu A.S et al, 1999). Son bacterias Gram positivos, no esporuladas, en forma de bastillo, son catalasa y oxidasa negativo y la mayoría de ellos no son móviles. El pH óptimo para el crecimiento de estas bacterias es de 5.5 a 5.8. La característica principal de las BAL es la producción de

ácido láctico, sin embargo, pueden clasificarse según su fermentación en tres grupos principales:

a) Homofermentativos: ((*Lactococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* y *Lactobacillus*, grupo I) Transforman las hexosas en ácido láctico por la vía de Embden-Meyerhof, cuya enzima clave es la fructosa-1,6-difosfato aldolasa. Carecen de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, por lo que no fermentan las pentosas ni el gluconato (**Alkema W et al, 2016**).

b) Heterofermentativos: (*Carnobacterium*, *Lactobacillus*, grupo II). Este grupo de bacterias fermentan las hexosas por la ruta Embden-Meyerhof, produciendo ácido láctico (ciertas cepas, además producen otros componentes como ácido acético, etanol y ácido fórmico; también fermentan las pentosas hasta ácido láctico y acético por acción de una fosfocetolasa inducible (**Ringo et al, 2018**).

c) Heterofermentativos estrictos: (*Leuconostoc*, que son cocos no homofermentativos, de *Lactobacillus* del grupo III). Fermentan las hexosas hasta ácido láctico, ácido acético o etanol, CO<sub>2</sub>, las pentosas hasta ácido láctico y ácido acético. En ambas rutas está implicada una fosfocetolasa (carecen de fructosa-1,6-difosfato aldolasa).

La mayoría de las BAL, como se describió anteriormente son del grupo de *Lactobacillus*, en sus diferentes especies, entre ellas la especie de *L. casei* presentes en la mayoría de los productos fermentados utilizadas, así como en formulaciones farmacéuticas, aditivos de alimentos, y en la nutrición de humano (**Tabla1**). Sin embargo, otras especies no menos importante se agrupan también en estos productos como *L. acidophilus*, así como bifidobacterias.

**Tabla 1.** Microorganismos probióticos utilizados en la nutrición humana.

Tipo de <i>Lactobacillus</i>	Tipo de <i>Bifidobacterium</i>	Otras bacterias ácido lácticas	Otros microorganismos
<i>L. acidophilus</i> <sup>(a)*</sup>	<i>B. adolescentis</i> <sup>(a)</sup>	<i>Enterococcus</i>	
<i>L. amylovorus</i> <sup>(b)*</sup>	<i>B. animalis</i> <sup>(a)*</sup>	<i>Faecium</i> <sup>(a)</sup>	
<i>L. casei</i> <sup>(a,b)*</sup>	<i>B. fibidum</i> <sup>(a)</sup>	<i>Lactococcus</i>	<i>Bacillus clausii</i> <sup>(a)</sup>
<i>L. gasseri</i> <sup>(a)*</sup>	<i>B. breve</i> <sup>(b)</sup>	<i>Lactis</i> <sup>(b)*</sup>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. helveticus</i> <sup>(a)*</sup>	<i>B. infantis</i> <sup>(a)</sup>	<i>Streptococcus</i>	<i>Nissle 1917</i> <sup>(a)</sup>
<i>L. johnsoni</i> <sup>(a)*</sup>	<i>B. longun</i> <sup>(a)*</sup>	<i>Termophilus</i> <sup>(a)*</sup>	
<i>L. pentosus</i> <sup>(b)*</sup>			<i>Sacharomyces</i>
<i>L. plantarum</i> <sup>(b)*</sup>			<i>cerevisae</i>
<i>L. reuteri</i> <sup>(a)*</sup>			<i>(boulardi)</i> <sup>(a)*</sup>
<i>L.rhamnosus</i> <sup>(a,b)*</sup>			

(a) Principalmente como productos farmacéuticos (b) Principalmente como aditivos alimentarios \* PCS (Presunción calificada de seguridad) microorganismos,

*Tomado de: Markowiak, Nutrients, et al 2017, 9(9), 1021*

#### **2.4 Dentro del Grupo de las BAL destaca el grupo de *Lactobacillus casei* (LCG).**

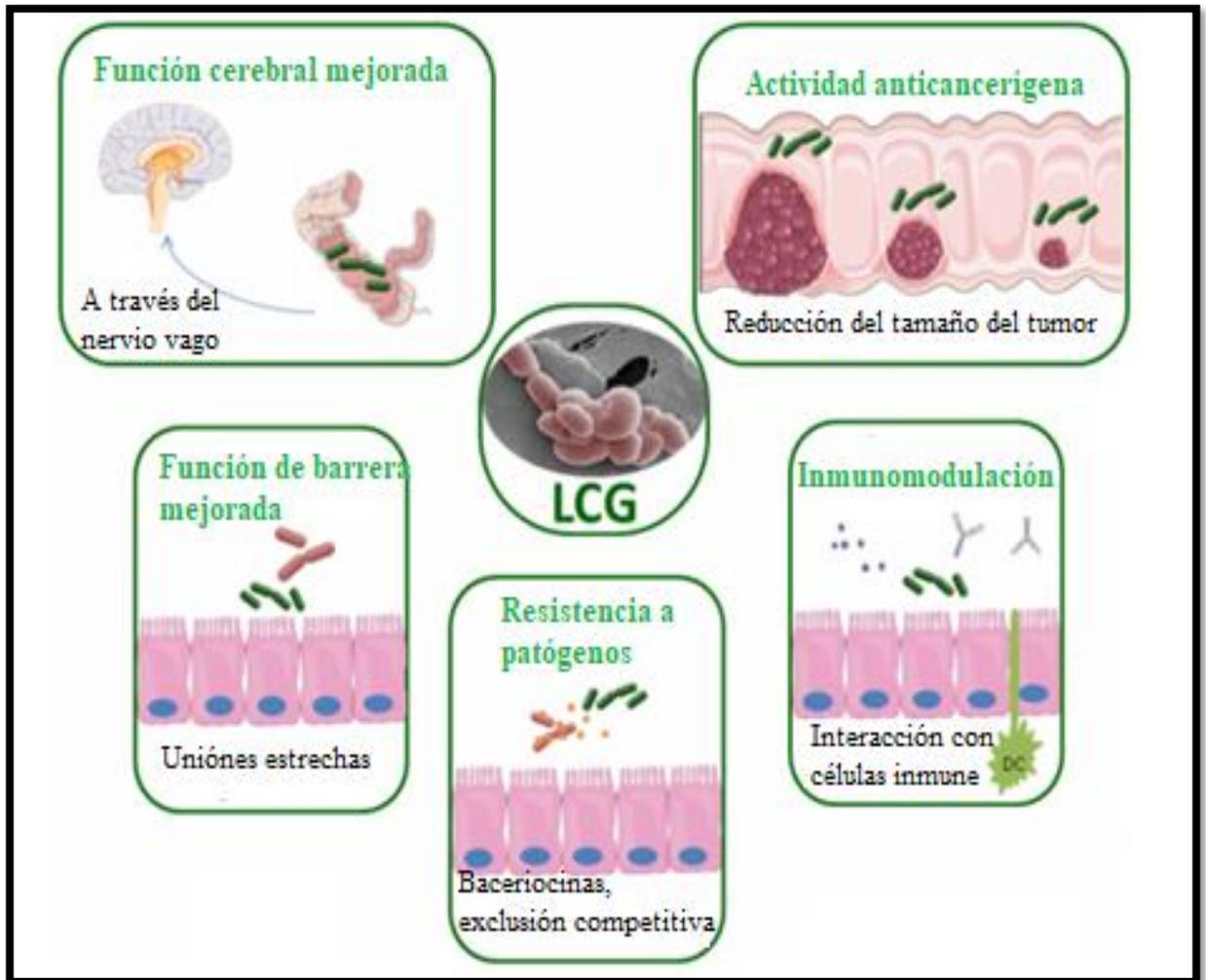
El complejo de LCG describe a varias cepas de BAL con características heterogéneas (fenotipo y genotipo) capaces de colonizar ambientes naturales y artificiales.

El grupo de (LCG) está compuesto por las cepas probióticas más relacionadas entre ellas *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, y *Lactobacillus rhamnosus*, se encuentran entre las cepas de probióticos más estudiadas debido a su potencial de salud, comercial, industrial y aplicada (**Hill, et al, 2018**).

Comercialmente se utilizan para productos lácteos, fermentados a menudo produciendo alimentos con mejor sabor y textura. También se ha descrito que producen varios metabolitos bio-activos con actividades anti-oxidantes que pueden conferir beneficios al hospedero cuando se consumen (**Hill, et al, 2018**). Como tal muchas cepas del Grupo de LCG se caracterizan por acciones probióticas, en diferentes sitios del hospedero, parte de estas se resumen en la (**Figura 2**). Un miembro de este grupo *L. rhamnosus* GG (LGG) es quizás una de las cepas bacterianas más estudiadas en relación con aplicaciones para la salud. LGG fue la primera cepa incluida dentro del género de *Lactobacillus* y patentada en 1989 (**Carpuso, et al, 2019**).

Diferentes estudios demuestran que LGG es recomendable en la prevención y tratamiento de una diarrea similar a la causada por antibióticos, pero cuyo origen es por *Clostridium difficile*, así también en enfermedades inflamatorias crónicas (por ejemplo, Chron), Dermatitis entre otras (**Mantegazza, C., et al, 2018**).

Estudios previos, han documentado que *L. rhamnosus* GG inhibe la formación de biopelículas por diferentes patógenos como *Salmonella sp*, *Escherichia coli* uropatogena, mediante la producción de proteínas tipo lectinas Llp1, Llp2; estas proteínas tienen un papel importante en la capacidad de adhesión de LGG tanto en células epiteliales como vaginales (**Petrova, MI., et al, 2016**).



**Figura 2. Mecanismos de acción por *Lactobacillus* del grupo (LCG)**

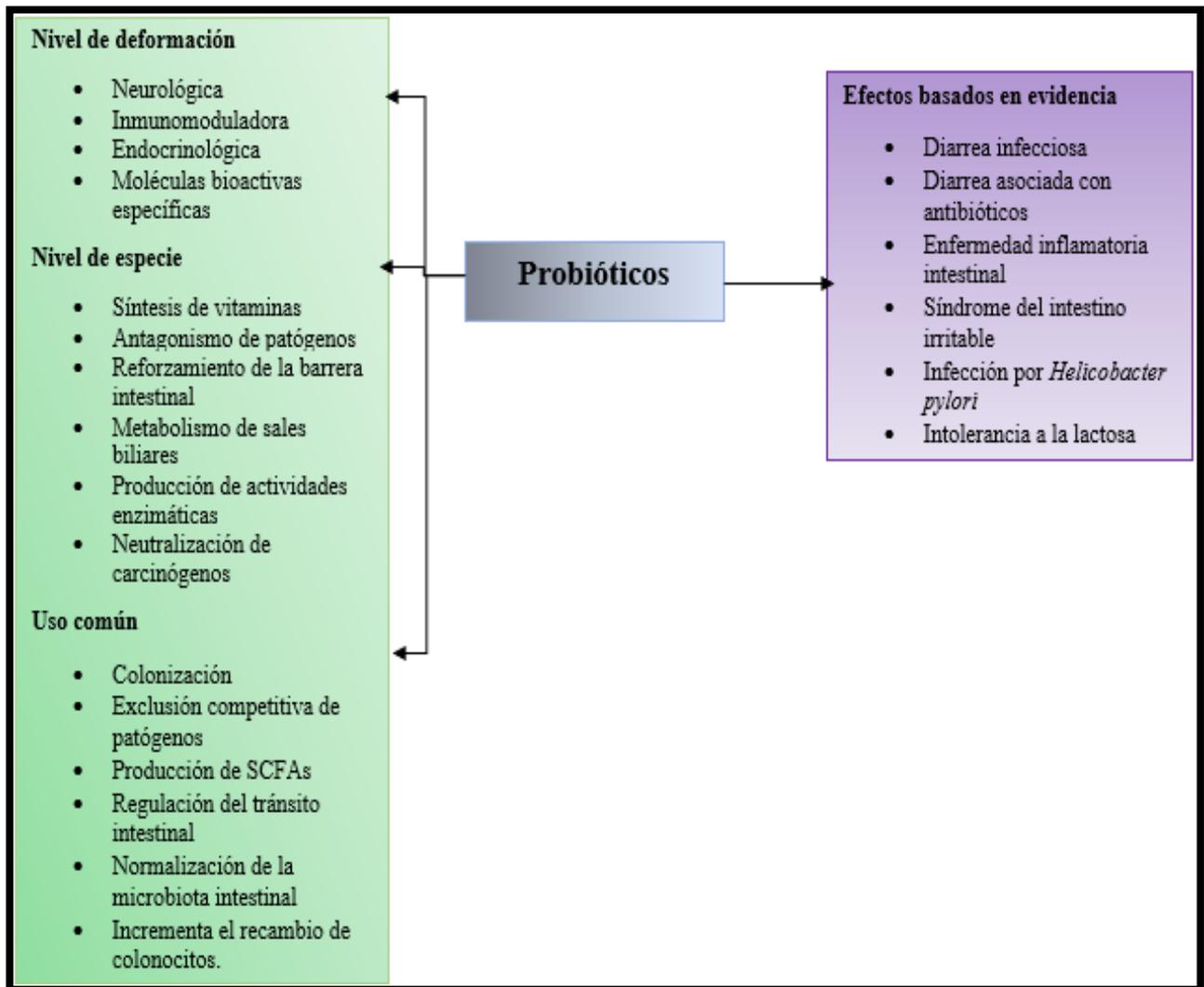
*Tomado de: Hill, et al, Front microbiology, 2018(9), 210*

Las cepas de *L. rhamnosus* GG están caracterizadas por producción de catalasa que ayuda a la resistencia del stress oxidativo (Carpuso, et al, 2019). Otras cepas del LCG, particularmente *L. casei* y *L. paracasei* activan mecanismos de tolerancia inmunológica tal es el caso de diferenciación de células T reguladoras (CD4+ CD25+ FoxP3+), síntesis de IL-10; demostrado por estudios de interacción sobre modelos *in vitro* de co-cultivo de células epiteliales humanas/células mononucleares de sangre periférica (Peluso, I., et al, 2007). En un análisis más de cerca, la interacción de las cepas del grupo LCG, han evidenciado varias células blancas del sistema inmunitario a través de mecanismos directos e indirectos, sugiriendo acciones importantes como alternativa de tratamiento (de Moreno, et al, 2008)

## **2.5 Aspectos críticos en la interrelación entre los probióticos y el hospedero.**

Los microorganismos probióticos más comúnmente usados en la nutrición humana son ciertas cepas que pertenecen al género de *Lactobacillus* (Heeney, DD., et al, 2018). En estudios previos, utilizando modelos animales e intervenciones clínicas se ha documentado el potencial benéfico de los probióticos en la salud (Gareau, MG., et al, 2010). Los probióticos ejercen efectos benéficos a través de 4 principales mecanismos: (i) interferencia de bacterias patógenas por competencia de nutrientes, e interferencia de sitios de adhesión, (ii) mejora de la barrera epitelial y en la viabilidad epitelial (iii) Inmunomodulación del sistema inmune (iv) producción de neurotransmisores tales como amino butírico GABA. (Figura 3)

Así mismo existen diferentes suplementos alimenticios combinados con varias especies de microorganismos probióticas principalmente *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y levaduras no patógenas entre otras que tienen acciones reguladoras sobre varios sistemas del hospedero, entre ellos la homeostasis de la respuesta inflamatoria y regulación de la microbiota intestinal (Butel, MJ., et al, 2014). Las bacterias con propiedades probióticas, han sido también propuestas para el uso en procesos inflamatorios, trastornos neoplásicos y alergias (West, CE., et al, 2016, Amer, M., et al, 2018, Hill, D., et al, 2018).



**Figura 3. Mecanismos principales de los probióticos para tener efectos benéficos.**

*Tomado de: Sanchez Borja, et al, Mol. Nutr. Food Res. 61(1), 2011*

Sin embargo, el efecto beneficioso más importante y documentado de los probióticos incluye la prevención de diarrea, constipación, cambios en la conjugación de sales biliares, aumento de actividad anti-bacteriana, efectos anti-inflamatorios. (Ritchie, ML., et al, 2012, Allen, SJ., et al, 2010, McFarland, LV., et al, 2007). Así también, algunos probióticos, ejercen actividades anti-oxidantes en la forma de células o lisados intactos (Adams, CA., et al, 2010) (Figura 4).

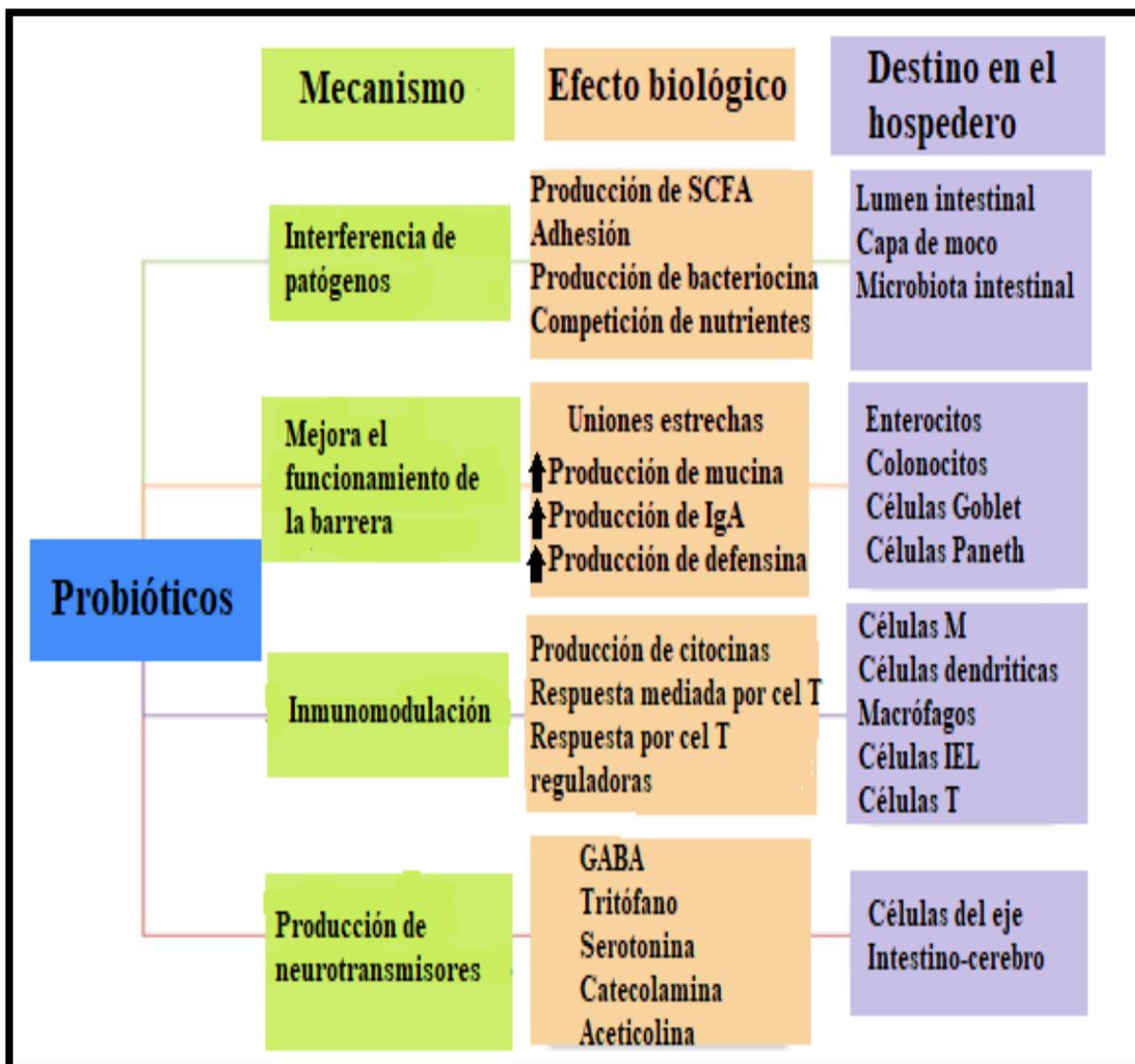


Figura 4. Principales mecanismos de acción de los probióticos, en su interacción con las células del hospedero.

Tomado de: Sanchez Borja, et al, Mol. Nutr. Food Res. 61(1),2017

Otros estudios, han demostrado efectos inherentes en la mejora de síntomas relacionados con la alergia, cáncer, SIDA, infecciones del tracto respiratorio y urinario (Ceccarelli, G., et al, 2019, Rondanelli, M., et al, 2017, Hill, D., et al, 2018, West, CE., et al, 2016).

Parte de los efectos benéficos de las cepas probióticas son atribuibles a sus mecanismos de interacción con el hospedero, particularmente con el tracto gastrointestinal (TGI) a través de tres diferentes niveles: en la parte baja del TGI; una de ellas es la capa de moco, la capa de células epiteliales y el tejido linfoide asociado a intestino (GALT).

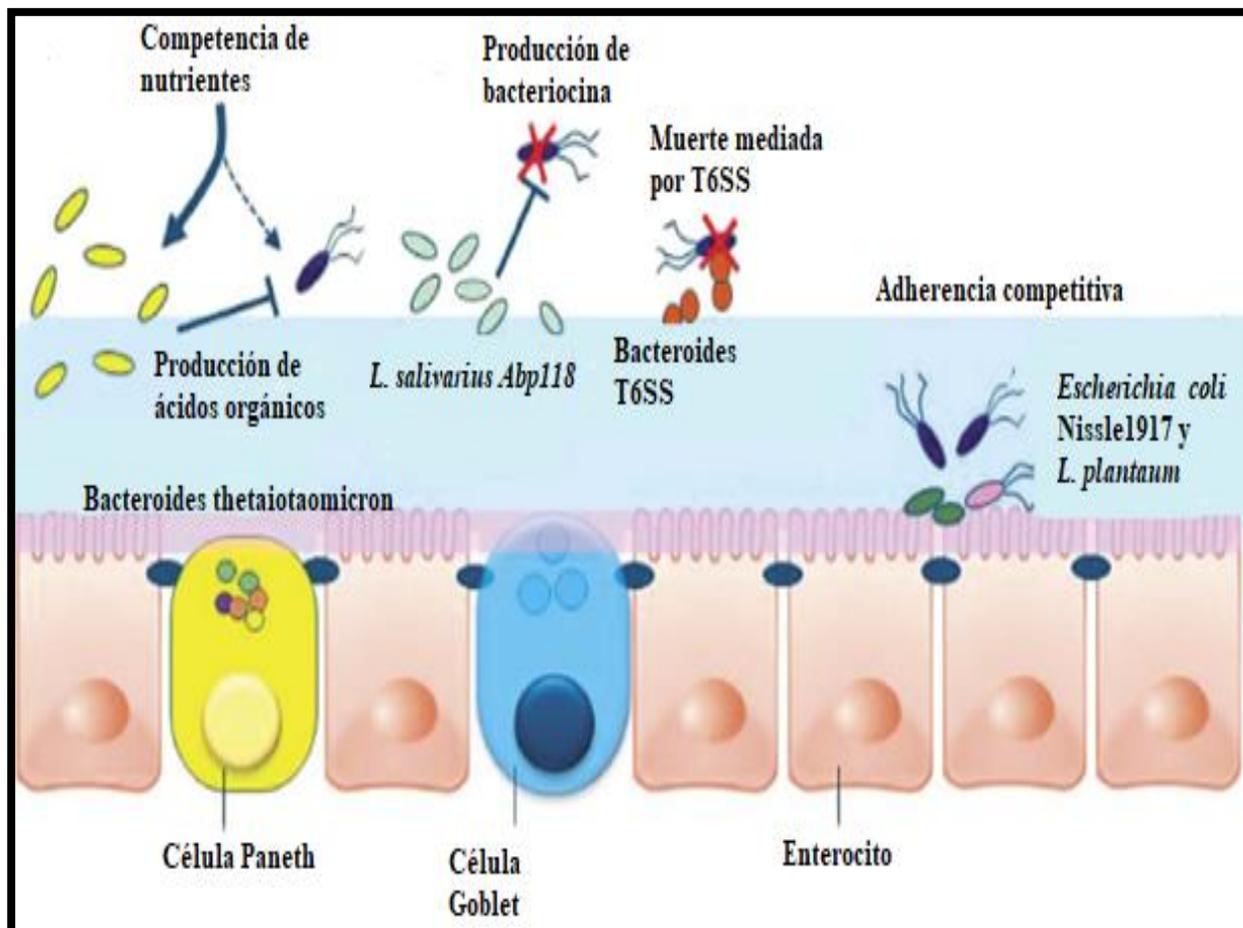
En el caso de capa de moco esta a su vez se subdivide en dos principales secciones: una subcapa interna en donde las moléculas forman a superficie muy relajada en forma de gel que sostiene un microambiente homeostático con la presencia de un número relativamente elevado de bacterias, así como la presencia de péptidos antimicrobianos e inmunoglobulina IgA secretora. Estos componentes ejercer efectos muy importantes para limitar el número de bacterias comensales que colonizan este sitio (Sanchez, Borja, et al, 2017).

En contraste, en forma adyacente las células epiteliales junto con la capa interna de mucina integran una barrera de restricción a través de uniones muy estrechas mediadas por un complejo de proteínas como zonula (ZO-1, ZO2, ZO.3), claudinas, cingulinas y cadherinas (Aureli, P., et al, 2011). Esta integridad por las células epiteliales condiciona que generalmente sean observados pocos o ningún microorganismo (Ohland, CL., et al, 2010).

El segundo nivel de interacción de probióticos con el hospedero humano son las células epiteliales. Diferentes subpoblaciones de células epiteliales integran de la mucosa del tracto intestinal que en línea a la totalidad de las células del lumen intestinal incluyen principalmente: enterocitos y colonocitos (células especializadas en adsorción de nutrientes) (Figura 5).

Además, las células Goblet con función especializada para la secreción de moco, un componente principal de la mucosa, que junto con las células Paneth, liberan un set de moléculas antimicrobianas tal es caso de las defensinas (por ejemplo, el péptido antimicrobiano Reg III y lisozima) y finalmente las células M; las cuales representan un punto clave de mediador celular entre las moléculas/ microorganismos presentes en el lumen

intestinal, siendo además un componente de la inmunidad innata, favoreciendo el transporte transepitelial (Goto, Y., et al, 2013).



**Figura 5. Mecanismos directos e indirectos de bacterias probióticas.** El efecto antagonista de bacterias comensales o probióticas puede ejercer sus acciones a través de una vía directa, por ejemplo, mantenimiento de la barrera epitelial, competencia de carbohidratos de la dieta entre estas bacterias y los patógenos. *L. salivarius Abp 118* produce una bacteriocina *in vivo* que protege en contra de la infección por *Listeria monocytogenes*

Tomado de: Bron P.A Br.J, Nutri 2017, 117(1) 93-107

La interacción de probióticos a este nivel es muy importante para mantener la función de la barrera intestinal reforzando las uniones estrechas, especialmente entre células epiteliales continuas.

El tercer nivel de interacción de las bacterias probióticas lo constituye el tejido linfoide asociado a intestino (GALT) integrado por las placas de Peyer (PP), los linfocitos que están distribuidos de forma difusa a través de la mucosa intestinal; así mismo las PP están organizadas como agregados o en forma de folículos de células B con centros germinales rodeados de células T (**Kamada, N., et al, 2013**).

Por otro lado, uno de los efectos potenciales de los probióticos es la supresión de la respuesta inflamatoria. Reportes previos de tratamiento de enfermedades a través de la modulación de mediadores inflamatorios, entre ellos las citocinas, han sido explorados como una estrategia terapéutica. Sin embargo, algunos probióticos del grupo de LCG tienen la capacidad de activar respuestas de citocinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ) y anti-inflamatoria tal es caso de IL-10 y TGF- $\beta$  (**Azad, MAK., et al, 2018, Archer, AC., et al, 2018**).

Resultados similares se han observado en componentes derivados de pared celular de las bacterias probióticas incluidos peptidoglicanos, LTA, proteínas de la superficie celular y exopolisacaridos (**Matsuguchi Tet al 2003, Sun J et al 2005, Suzuki S, et al 2019, Castro-Bravo N**).

Además del efecto de regulación e inducción de citocinas por cepas probióticas; es posible inducir una respuesta de estimulación sobre células B (aumento de inmunidad humoral) y células T (aumento y mejora de la inmunidad celular) y en las células fagocíticas (principalmente células polimorfonucleares), también con el uso de blancos específicos de

cepas probióticas, se ha observado inmunoprofilaxis del tracto respiratorio durante épocas invernales y más generalmente sobre la mejora de inmune específica a diferentes patógenos como virus, bacterias y hongos (**Frei, R., et al, 2015, Rinne, M., et al, 2005, Quinteiro-Filho WM, et al, 2015, Kim DH, et al, 2018, Shim YH, et al, 2016, Rossoni RD, et al, 2018**).

Estudios recientes han demostrado resultados positivos sobre el efecto de probióticos en el sistema respiratorio, especialmente con respecto a prevención y reducción de la severidad de infecciones respiratorias con asociación al aumento de células secretoras de IgA en la mucosa de bronquios (**Ashraf R, et al, 2014**). Efectos reguladores positivos se observaron en población de fumadores regulares que se sabe tienen actividad reducida de células NK (**Reale M., et al, 2012**).

En población infantil, la aplicación de los probióticos es un blanco de estudios debido a la importancia de limitar la extensión de enfermedades especialmente en épocas invernales, así como el disminuir la aplicación de antibióticos (**Hao Q, et al, 2015**).

En el mismo contexto, formas viables de las células probióticas, células muertas por calor y otros componentes liberados como los exopolisacáridos (EPS) tienen la capacidad de inducir la producción de citocinas en líneas celulares humanas (**Bermudez-Brito M, et al, 2014, Muñoz VL, et al, 2019**).

Además, está bien documentado que la pared de la bacteria probiótica está compuesta de una capa lipídica, con proteínas embebidas en la misma pared celular; las cuales también están involucradas en los mecanismos de agregación de estas bacterias. Algunas especies de *Lactobacillus* exponen una capa adicional de proteínas rodeando la capa de la macromolécula de peptidoglicano llamada capa S. Las características de agregación pueden

involucrar el grueso de las células (auto-agregación, de la misma cepa), o diferentes cepas (co-agregación). La característica de agregación en las bacterias probióticas está relacionada a su capacidad de interactuar entre ellas y a la capacidad de inhibir microorganismos patógenos al epitelio intestinal (**Polak-Berecka, M., et al, 2014, Damodharan, K., et al, 2015**).

Las características de superficie de los *Lactobacillus* pueden contribuir por varias vías para su interacción con el tracto gastrointestinal del hospedero afectando su sobrevivencia, adherencia a tejido del hospedero y su interacción con otros componentes (**Duary, RK., et al, 2011**). Está descrito que las interacciones no-específicas de bacteria probiótica con su microambiente son gobernados por las propiedades fisicoquímicas de la envoltura de la pared celular y otros constituyentes internos (**Deepika, G., et al, 2010, Pelletier, C., et al, 1997**).

Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, ambos caracterizados como bacterias Gram positivas que presentan moléculas comunes de superficie como es el caso de ácidos lipoteicoicos (LTA), proteínas asociadas a la superficie (SLAP) y proteínas de unión a mucinas (MUbs), estas desarrollan un papel importante en la interacción con los componentes de moco (**Sánchez, B., et al, 2010, Bönisch, E., et al, 2018, Nishiyama, K., et al, 2019**).

### 3. ANTECEDENTES

Los probióticos han sido observados como potentes inmunomoduladores en el funcionamiento del intestino y en la respuesta inmune especialmente en las condiciones de disbiosis (desbalance de la microbiota), observado en diferentes condiciones del hospedero como son las respuestas inflamatorias de grado crónico leve, tal el caso de obesidad, diabetes y síndrome metabólico, entre otros (**Fontané, L., et al, 2018, Tonucci, LB., et al, 2017, Festi, D., et al, 2014**).

Algunas de las cepas probióticas tienen acciones benéficas a través del mantenimiento de la homeostasis en el intestino, exclusión competitiva de patógenos y en la modulación de la respuesta inmune del hospedero.

Parte de los efectos benéficos de las cepas probióticas son atribuibles a las especies-cepa específicas de bacterias probióticas, en combinación de los mecanismos de interacción con el hospedero, por lo tanto, no pueden generalizar a todas las cepas probióticas.

Aunado a lo anterior, las propiedades de adhesión de las bacterias probióticas al epitelio intestinal es un importante criterio para la selección de microorganismo probióticos siendo la primera fase de iniciación y colonización, en el hospedero.

La capacidad de adherencia a la mucosa intestinal, modulada por la unión a las células epiteliales se ha propuesto como un importante mecanismo de criterio de selección de cepas probióticas potenciales. La adhesión de microorganismos al epitelio también es un factor primario de contacto con el hospedero.

La capacidad de bacterias probióticas de adherirse a la mucosa intestinal, también conduce a sus posibles interacciones con las células de la mucosa intestinal, así como las posibles implicaciones de funcionalidad (**Pickard, JM., et al, 2017**).

La capacidad de adhesión de cepas probióticas ha sido previamente estudiada en modelos de sistemas *in vitro*, los cuales son comúnmente usados para la selección y posteriores ensayos de cepas probióticas para estudios futuros *in vivo*. Las cepas probióticas deseables

también presentan resistencia a diferentes antibióticos, así como patrones de antagonismo de distintos microorganismos patogénicos potenciales. (Monteagudo-Mera A, et al, 2019)

La adhesión de cepas probióticas es variable entre las diferentes cepas, dependiendo de las propiedades de superficie celular, tal como la hidrofobicidad, así como perfiles de proteínas extracelulares como proteínas de unión a mucina (Mub) proteínas de unión a fibronectina, proteínas de unión a colágena, ácidos lipoteicoicos (LTA), proteína de adhesión a moco (MapA) , elongación de factor termo no estable (EF- tu) entre otros (Lebeer, S., et al, 2010).

Así mismo, la mayoría de los cuales podrían estar involucrados en la adhesión de bacterias al epitelio intestinal en forma directa o indirecta o por componentes específicos presentes en el epitelio (Haddaji, N., et al, 2015).

Sin embargo, el conocimiento es muy limitado con respecto a las moléculas de adhesión presentes en el género comensal de *Lactobacillus*, donde se han reportado capas S en varias especies de *Lactobacillus*, como: *L. brevis*, *L. helveticus* y *L. acidophilu*, con una similitud de 7 al 100% (Bobeth M, et al, 2011, Vilen H, et al, 2009)

Las características per-se de adhesión de cada cepa probiótica para adherirse a la mucosa intestinal temporalmente también sustenta su interacción con las células de la mucosa intestinal y puede ser considerado como pre-requisito para exclusión competitiva de bacterias enteropatógenas (Chauvière, G., et al, 1992, Gueimonde, M., et al, 2007).

Estudios previos han sugerido que varias cepas probióticas pueden interferir con la adhesión de patógenos, tal como *Salmonella*, *Clostridium difficile* (Ostad, SN., et al, 2009, Mills, JP., et al, 2018). Pruebas *in vitro* de evaluación de su capacidad de adherencia de cepas como *Lactobacillus plantarum* AC131 sobre líneas celulares de Hela (Rositsa T. et al, 2011).

Así mismo, protocolos de laboratorio usando células intestinales de epitelio de colón como Caco-2 y HT-29 han sido desarrollados para analizar la adhesión de algunas BAL en sus efectos de exclusión competitiva de patógenos bacterianos (Wang, S., et al, 2008).

Las células Caco-2 han sido también invaluable para la obtención de resultados sobre los mecanismos que mantienen la integridad de la barrera epitelial y su papel en el control de la respuesta inflamatoria e interacción con cepas probióticas en modelos de co-cultivo con diferentes células del sistema inmune (células dendríticas, macrófagos, entre otras) (Zoumpoulou, G., et al, 2009, Bermudez-Brito, M., et al, 2013).

Así mismo, el uso de líneas celulares de epitelio intestinal ha sido extremadamente útil para la identificación de los mecanismos de adhesión y las moléculas involucradas. Por ejemplo, trabajos previos, por Wang y colaboradores (Wang, R., et al, 2017) usando la línea celular HT-29 recientemente identificaron una nueva proteína de superficie (proteína A de unión a colina) esencial para la adherencia de la cepa probiótica *L. salivarius* REN. (Wang, R., et al, 2017)

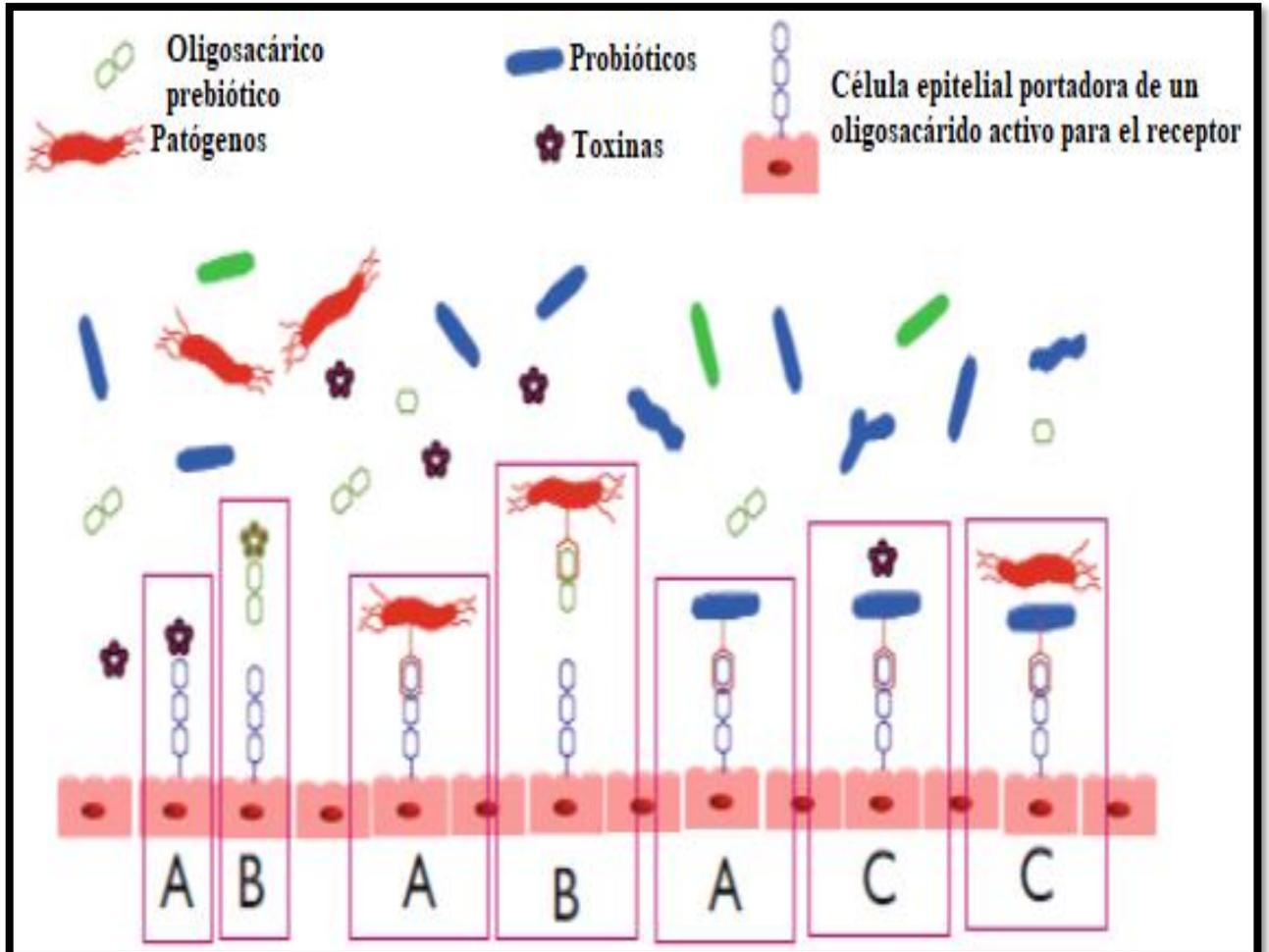
Sin embargo, es importante tomar en consideración que, si bien los estudios *in vitro* ayudan a comprender los mecanismos de adhesión y la selección de candidatos probióticos con potencial de adherencia *in vivo*, a veces es difícil de extrapolar estos resultados al tracto intestinal humano donde otros factores, entre ellos el movimiento peristáltico, el sistema de defensa del hospedero o la competencia con la microbiota residente pueden interferir en las propiedades de adherencia.

Además, es importante conjuntar los datos de tamizaje en líneas celulares humanas para después establecer ensayos de sistemas de co-cultivo que nos proporcionan una mayor información sobre las interacciones de estas bacterias y la respuesta inmune causada por los probióticos y/o la infección bacteriana (Trapecar, M., et al, 2014; Noel, G., et al, 2017).

Algunas cepas probióticas tienen buena capacidad de adhesión, la cual les permite interferir con la adherencia de patógenos por competición de los sitios de unión tamizados por estudios *in vitro* con líneas celulares infectadas previamente con patógenos (Walsham, AD., et al 2016; Jessie Lau and Chye, et al, 2018; Tuo, et al, 2018).

Algunos reportes clínicos han documentado la efectividad del próbico de *L. rhamnosus* GG contra enterococcus resistente a vancomicina en pacientes colonizados (Szachta, P., et al, 2011; Manley, KJ., et al, 2007).

Esta actividad anti-patógena es multifactorial incluyendo la producción de componentes antimicrobianos y exclusión competitiva, que favorecen que los patógenos no puedan unirse a los sitios de uniones específicas en las células huésped (**Figura 6**).



**Figura 6. Representación esquemática de las propiedades anti-adherentes de probióticos y prebióticos patógenos, probiótico y toxinas bacterianas adheridas a la superficie. (A)** es la unión de los patógenos, probióticos y toxinas bacterianas a los oligosacáridos de la superficie celular transportados por glicolípidos y glicoproteínas. **(B)** son los galacto-oligosacáridos que ayudan a inhibir la adhesión de toxinas y patógenos a las células. **(C)** nos muestra la inhibición de la adhesión de las toxinas y patógenos cuando se encuentra la bacteria probiótica en el receptor de la superficie celular.

*Tomado de: Monteagudo-Mera, A. Appl Microbiol Biotechnol, 2019*

## 4. JUSTIFICACIÓN

Los efectos biológicos del género de *Lactobacillus* han sido ampliamente explorados en sus acciones como: la estabilización de microbiota indígena, protección contra la infección intestinal, atenuación de intolerancia a la lactosa, aumento del valor nutricional de los alimentos, reducción de los niveles de colesterol sérico y mejora en los mecanismos no-específicos y específicos del sistema inmunológico. En la actualidad, varias especies de *Lactobacillus* entre ellas el grupo de *L. casei* actúan como bacterias probióticas, las cuales se han explorado actualmente como nuevos agentes terapéuticos biológicos. El entender como contribuyen estas bacterias en su acción probiótica sobre el epitelio nos permitirá obtener información de sus propiedades (adhesión, actividad anti-microbiana). Debido a que no todas las cepas de *Lactobacillus* poseen la capacidad de conferir beneficios a la salud del hospedero, por lo que se hace necesario tamizar y caracterizar nuevas cepas para obtener probióticos ideales; lo que nos permitirá obtener información sobre su potencial probiótico.

## **5. HIPÓTESIS**

Las propiedades fisicoquímicas de la pared celular como (hidrofobicidad, auto-agregación), capacidad de adhesión, e interferencia de la adhesión por patógenos a células epiteliales de colon como (Caco-2, HT-29) así como su actividad antimicrobiana es dependiente de la especie probiótica.

## 6. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL.

6.1 Analizar las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* aisladas de productos de leches fermentadas comerciales.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

6.2 Evaluar las propiedades fisicoquímicas (hidrofobicidad, auto-agregación) de la pared de células bacterianas de cinco cepas de *Lactobacillus*: *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LKSD, *L. helveticus* IMAU70129, *L. casei* IMA60214 y *L. casei* Shirota,

6.3 Analizar la capacidad de adherencia de las cepas de *lactobacillus* en modelo *in vitro* de células epiteliales humanas (Caco-2 y HT-29).

6.4 Establecer el efecto de células viables de *Lactobacillus* sobre la adherencia de patógenos bacterianos indicadores como *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

6.5 Determinar la actividad anti-microbiana de sobrenadantes libres de células bacterias (SLB) de las cinco cepas de *Lactobacillus* sobre el crecimiento de las cepas patógenas indicadoras, como *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 Cepas de *Lactobacillus* probióticas aisladas de productos comerciales.

En esta tesis se emplearon cinco cepas de *Lactobacillus*, aisladas de productos comerciales de leches fermentadas: *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* KSLD, *Lactobacillus helveticus* IMAU70129, *Lactobacillus casei* IMAU60214 y *Lactobacillus casei* Shirota su aislamiento fue desarrollado por (Cruz-Guerrero, et al, 2014) del (Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa). Las características de estas cepas se describen en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Características de las cepas probióticas de *Lactobacillus*.**

Producto comercial	Cepa identificada *	Gen Bank
Capsulas Culturelle ®	<i>L. rhamnosus</i> GG	GU550100
NAN de Nestlé S.A.®	<i>L. rhamnosus</i> KLDS	GU 550102
Chamito de Nestlé S.A ®	<i>L. helveticus</i> IMAU70129	GU 550099
Bio 4® de Grupo Lala S.A	<i>L. casei</i> IMAU60214	GU550098
Yakult® de Yakult S.A de C.V	<i>L. casei</i> Shirota	GU550103

\*La identificación de las cepas se realizó por extracción de DNA y ensayos de PCR. Brevemente la extracción de DNA genómico total se realizó con Kit comercial Wizard de Promega (USA). Los ensayos de amplificación para la PCR se realizaron en un termociclador Corbett Research conforme a lo reportado por (Cruz-Guerrero, et al, 2014)

Las bacterias de *Lactobacillus* fueron cultivadas en medio MRS (De Man et al, 1960) pH 5.2 a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 1500 rpm/5 minutos y lavadas tres veces con una solución de PBS pH=7.2 a las mismas condiciones de centrifugación. La concentración del paquete bacteriano se ajustó a una absorbancia de 1 medida en espectrofotómetro a 600 nm, esta absorbancia corresponde a  $1 \times 10^9$  UFC/ml. A la par de los ensayos experimentales un stock de cepas bacterianas congeladas fue almacenados en medio MRS conteniendo 10% de glicerol (v/v) a -70°C.

### 7.1 Cepas patógenas indicadoras

Los microorganismos indicador de patógenos utilizadas en este trabajo fueron: *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Samonella Typhimuriun* (ATCC 14028) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). Estas cepas bacterianas patógenas fueron crecidas en Brain Heat Infusión (BHI) caldo a 37° por 18 horas. Después los paquetes bacterianos fueron concentrados por centrifugación a 5000rpm/5 min, su cuantificación se realizó por conteode dilución en base 10, en placas de agar (BHI) en muestras por duplicado. Después de 24 horas de incubación a 37°C, el número de unidades formadoras de colonias se contaron para cada una de las cepas patógenas (Figura 7).



Figura 7. Conteo de UFC/ml en cepas patógenas indicadoras.

Las UFC/ml se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula matemática.

$$\frac{\text{Número de colonias} \times (1/\text{Dilución})}{\text{alícuota sembrada (ml)}} = \text{UFC/ml}$$

En la **Tabla 3** se resumen el número de colonias observadas en los experimentos realizados:

**Tabla 3. Unidades Formadoras de colonias (UFC/ml)**

Cepas patógenas indicadoras	*UFC/ml
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	1.99x10 <sup>7</sup>
<i>Salmonella Serovar Typhimurium</i> (ATCC 14028)	4.9x10 <sup>6</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	1.66x10 <sup>9</sup>

\*Ensayos realizados en muestras por triplicados, en un total de 3 experimentos.

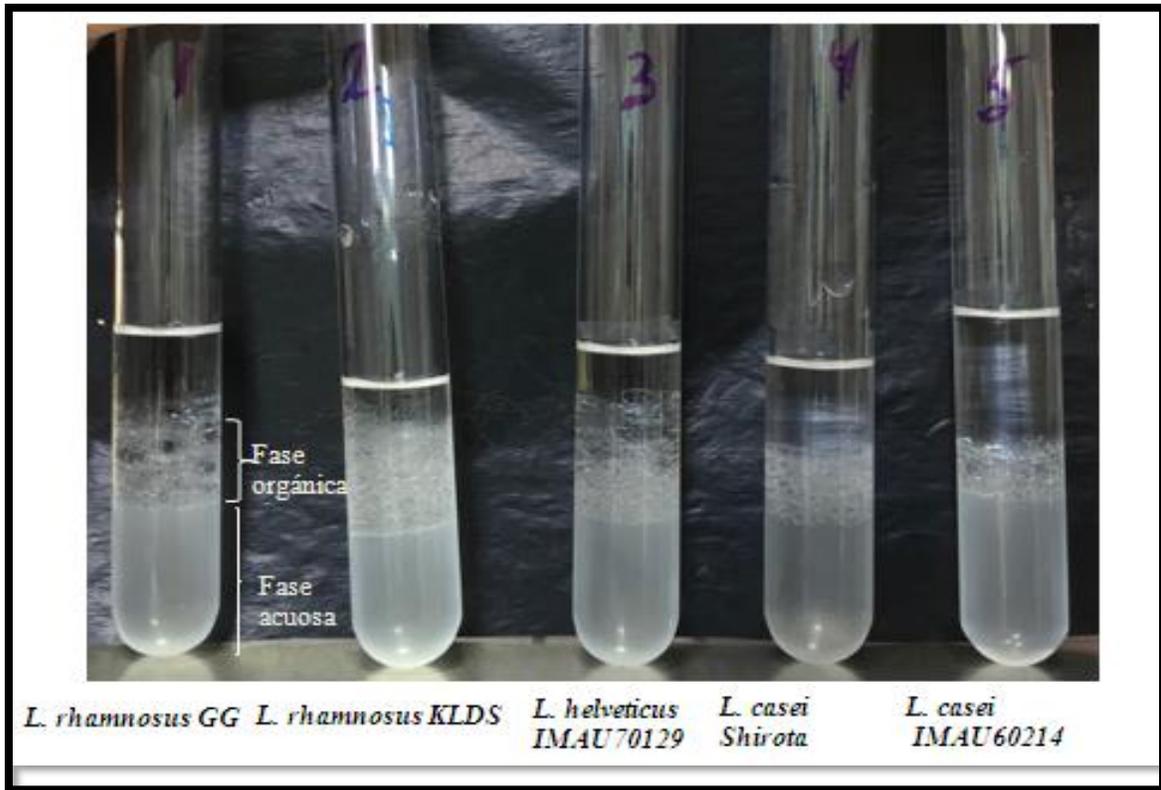
## **7.2 Obtención de sobrenadantes libres de células bacterianas (SLB) de *Lactobacillus*.**

Las bacterias de *Lactobacillus* crecidas en fase logarítmica se cosecharon después de 24 horas de cultivo en medio MRS pH= 5.2, se cosecharon por centrifugación a 5000rpm/5 minutos a temperatura ambiente. El paquete bacteriano obtenido fue retirado y el SLB fue recolectado en tubos de polipropileno, este SLB fue filtrado en membrana de 0.22µm para su utilización en los ensayos de actividad antimicrobiana de estas cepas.

## **7.3 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas (hidrofobicidad, auto-agregación) de la pared de células bacterianas de las cepas de *Lactobacillus*.**

A partir de cultivos obtenidos de las cinco cepas de estudio de *Lactobacillus* se prepararon suspensiones de células bacterianas ajustadas a concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml, en las cuales se evaluó las propiedades de hidrofobicidad superficial mediante la medición de la afinidad por el disolvente orgánico que presentaron las células cultivadas en el sistema de dos fases (agua disolvente orgánico) como una medida predictiva de su capacidad de adhesión a los epitelios de acuerdo a lo reportado por (Sanchez Lilian, et al, 2014).

Brevemente, la hidrofobicidad se determinó en cada una de las cepas crecidas en cultivo fresco en caldo MRS pH= 5.2 después de 24 horas de incubación a 37°C se lavaron con solución de PBS pH= 7.2 y se ajustaron a una densidad óptica de 0.6-0.7 a 600 nm, equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml como fue señalado anteriormente se mezclaron suspensiones en volúmenes iguales con xileno a temperatura ambiente. Posteriormente se agitaron en vortex por 6 minutos, dejándose reposar durante 60 minutos (Figura 8).



**Figura 8. Ensayo de hidrofobicidad en células bacterianas de *Lactobacillus* con xileno.**

El porcentaje de hidrofobicidad se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Hidrofobicidad} = \frac{\text{DO 600nm antes de mezclar} - \text{DO 600nm después de mezclar}}{\text{D. O antes de mezclar}} \times 100$$

Así mismo, la actividad de hidrofobicidad de las cepas evaluadas se clasificó como alta (51-100%), media (30-50%) y baja (0-29%), de acuerdo a lo propuesto por (Nader-Macias, et al 2008).

Con respecto a las propiedades de auto-agregación celular esta fue monitoreada durante un tiempo de (2 y 5 horas). Por lo que las cepas lavadas con la solución de PBS pH= 7.2 como fue mencionado para el ensayo de hidrofobicidad fueron ajustadas a una densidad óptica de 0.7. Una suspensión de 4 ml de esta suspensión de cada cepa de *Lactobacillus* del presente estudio fue depositada en un tubo de vidrio y mantenida a 37°C durante el monitoreo de la medición de auto-agregación celular a cada tiempo señalado se tomó una alícuota de la parte superior y la absorbancia fue medida a 600 nm. La propiedad fisicoquímica de auto-agregación de las cepas de *Lactobacillus* fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula matemática:

$$\text{Auto - agregación \%} = \frac{\text{Abs inicial} - \text{Abs final}}{\text{Abs inicial}} \times 100$$

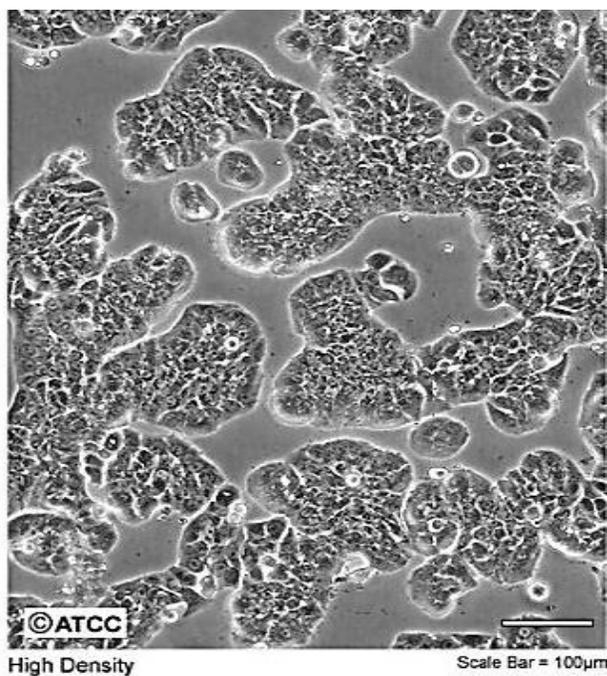
\*Ensayos realizados por duplicado en donde la Abs inicial es el valor de densidad óptica de 0.7 y la Abs final como el valor obtenido después de las 2 y 5 horas de incubación.

### **7.5 Cultivo de las células epiteliales de intestino humano HT-29, Caco-2.**

Un modelo experimental *in vitro* con células epiteliales HT-29 y CaCo-2 fue utilizada en este trabajo. Las células HT-29 (ATCC HTB-38) y CaCo-2 (ATCC HTB-37) fueron obtenidas por donación del Dr. Carlos Eslava Campos del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México Federico Gómez. La línea celular HT-29 es una línea tumoral humana derivada de adenocarcinoma de colón humano, con capacidad de diferenciación *in vitro* hacia un fenotipo de secreción de moco con características de células

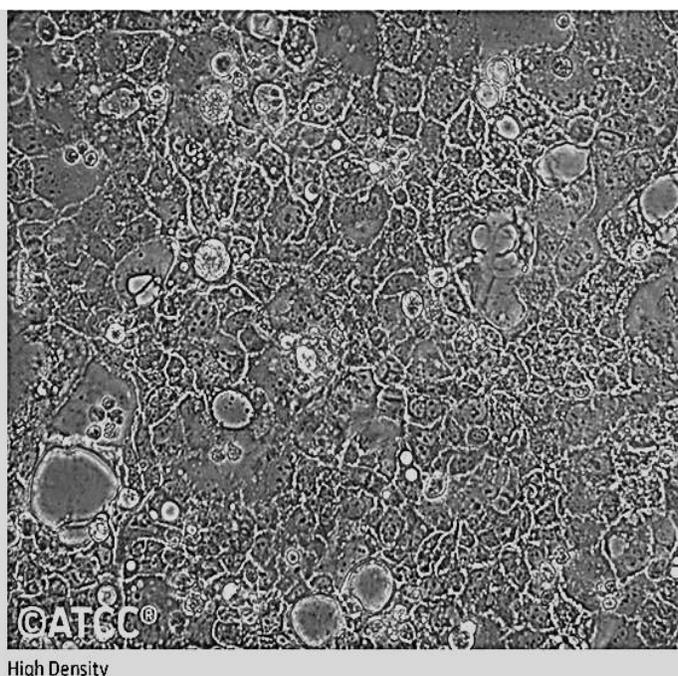
adherentes. Así mismo, la línea celular Caco-2 son células de morfología heterogéneas de adenocarcinoma de colón epitelial humano, la cual es la más utilizada para la evaluación de la permeabilidad gastrointestinal *in vitro*, también como células adherentes, pero no productoras de moco (**Figura 9**).

### **HT-29 (ATCC HTB-38)**



**Confluencia  
> 90%**

### **Caco-2 (ATCC HTB-37)**



**Confluencia  
100 %**

**Figura 9. Imágenes de referencia de las líneas celulares epiteliales de colon humano de <https://www.atcc.org>, donde se muestran las líneas celulares recién sembradas y cuando alcanzan su máxima confluencia.**

Ambas líneas celulares fueron crecidas en medio de Dulbecco Modificado Eagle's (DMEM, Gibco) suplementado con 10% de (v/v) de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (30 minutos, 56 °C), penicilina / streptomina (1X) a 37°C en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%; en cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> a una concentración de 500,000 células/ml. Así

también, las células fueron mantenidas hasta su confluencia del 75% al 80% durante 7 a 8 días con cambios de medio cada tercer día.

#### **7.6 Ensayo de Adherencia de *Lactobacillus* a células epiteliales de intestino CaCo-2, HT-29**

Para los ensayos de adherencia, las células HT-29 y Caco-2 mantenidas en cultivo con 80% de confluencia fueron desprendidas mediante tratamiento con 1 ml de tripsina- EDTA (Gibco) al 0.25% durante 10 minutos.

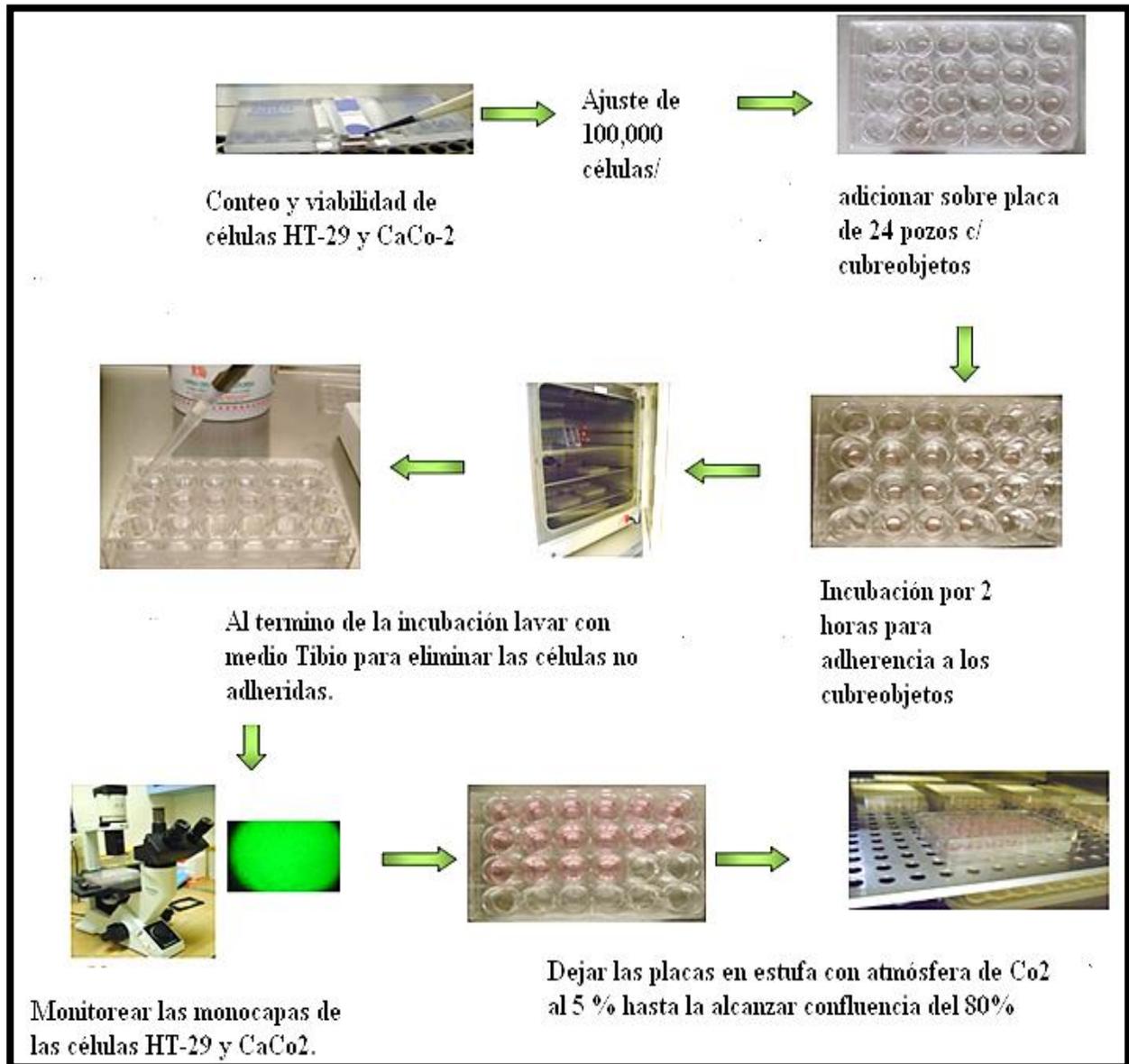
Posteriormente, el desprendimiento de la monocapa fue observado en microscopio invertido CK40 (Olympus) y las células desprendidas fueron concentradas en tubo de polipropileno, conteniendo 5 ml de medio DMEN/10%/antibiótico para neutralizar la tripsina.

Las células fueron centrifugadas a 1500 rpm/ 5 minutos (Centrifuga Universal 32 R, Hettich Zentrifugan). El paquete celular fue lavado dos veces con solución de PBS pH=7.2, las cuales fueron resuspendidas en 2 ml de PBS para su conteo en cámara de Neuvauver, así como la determinación de viabilidad por método de exclusión con azul de tripano al 0.4 % (Gibco). Una vez cuantificadas las células, estas fueron ajustadas a  $1 \times 10^5$  células/ml y colocadas en placas de 24 pozos conteniendo cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro.

Las placas fueron incubadas durante 2 horas para permitir la adherencia de las células a los cubreobjetos, en seguida fueron lavados con medio tibio y mantenidas en cultivo por 7 días más en atmósfera de CO<sub>2</sub>, 5 % Una vez obtenidas las monocapas de células epiteliales HT-29 y CaCo-2, en las condiciones ya señaladas se llevó a cabo la interacción con las cepas de *Lactobacillus* de cultivo fresco obtenido de 24 horas.

Estas cepas fueron centrifugadas a 5000rpm/ 5 minutos a temperatura ambiente en medio de DMEN a una concentración de  $10^8$  UFC/ml (OD 600=1) sin antibiótico. Una relación de

500:1 (*Lactobacillus: células*) fue adicionada de cada una de las cepas en muestras por duplicado. Las placas fueron incubadas durante 2 horas a 37°C en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Todo lo anterior como es indicado en la (Figura 10).



**Figura 10.** Preparación de las células epiteliales HT-29 y CaCo-2 para los ensayos de adherencia sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro dentro de placas de cultivo de 24 pozos.

Después de esta incubación los pozos de las placas fueron suavemente lavados cuatro veces con 400µl de solución de PBS tibio para remover las bacterias lácticas no adheridas. Las células fueron fijadas con metanol al 70% (Merck) durante 10 minutos a temperatura ambiente, en seguida fue adicionado una solución de colorante de Giemsa (Merck) diluido 1:20, incubándose durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, las placas fueron lavadas con agua destilada hasta la eliminación del colorante y los cubreobjetos conteniendo la interacción de las células epiteliales con las bacterias lácticas fueron retirados de las placas. Así mismo, los cubreobjetos fueron secados al aire; las preparaciones se montaron sobre un portaobjetos utilizando resina Entellan (Merck).

El porcentaje de adherencia fue expresado de acuerdo a la siguiente expresión matemática:

$$\% \text{ de adherión} = \frac{\text{número de bacterias adheridas}}{\text{total de bacterias adicionadas}} \times 100$$

### **7.7 Interferencia de la adherencia de cepas patógenas indicador a células HT-29 y CaCo-2 por cepas de *Lactobacillus*.**

Los cultivos de bacterias patógenos utilizadas en este trabajo fueron crecidas en caldo BHI durante 18 horas previ6 al ensayo de adhesión. Las bacterias pat6genas *E. coli* (ATCC 35218), *S. Typhimurium* (ATCC 28140) y *S. aureus* (ATCC 29213) fueron lavadas tres

veces con solución de PBS y ajustadas en una relación de 500:1 (*Bacteria patógena: células*) para el análisis de su capacidad de adherencia a las células epiteliales.

El protocolo que se siguió para este ensayo es el mismo que fue aplicado para la determinación con las cepas de *Lactobacillus*. Así mismo, el resultado de adherencia fue expresado como porcentaje.

En este ensayo se determinó la capacidad de las cepas de *Lactobacillus* para inhibir la adhesión del patógeno indicador utilizado en este trabajo. Brevemente, las células epiteliales humanas HT-29 y CaCo-2 fueron incubadas con las diferentes cepas de *Lactobacillus* viables en una relación de 500:1 (*Lactobacillus: células*) durante 2 horas a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Después de esta incubación las monocapas de células epiteliales fueron lavadas suavemente con solución de PBS tibio para eliminar las bacterias de *Lactobacillus* no adheridos. Una suspensión de bacterias patógenas indicador fue adicionada también en una relación de 500:1, las placas fueron nuevamente incubadas por 2 horas.

Al término de este tiempo de incubación, las placas se lavaron 4 veces con 400µl de PBS tibio para la eliminación de las bacterias no patógenas adheridas. El número de bacterias adheridas se determinó por conteo de ambas bacterias (*Lactobacillus/* patógeno indicador) después de tinción con solución colorante de Giemsa, a la par de estos ensayos experimentales se prepararon controles de bacterias patógenas indicador sin pre-incubación con cepas de *Lactobacillus* (adherencia Basal, control).

Las diferencias de adherencia antes y después del pre-tratamiento con las cepas de *Lactobacillus* fueron expresadas como porcentaje de la inhibición de adherencia de acuerdo a la siguiente fórmula matemática:

$$IA = (\% B.A. \text{ en ausencia de BAL} - \% \text{ adhesión en presencia de BAL})(100)$$

Donde

IA= Inhibición de la adhesión.

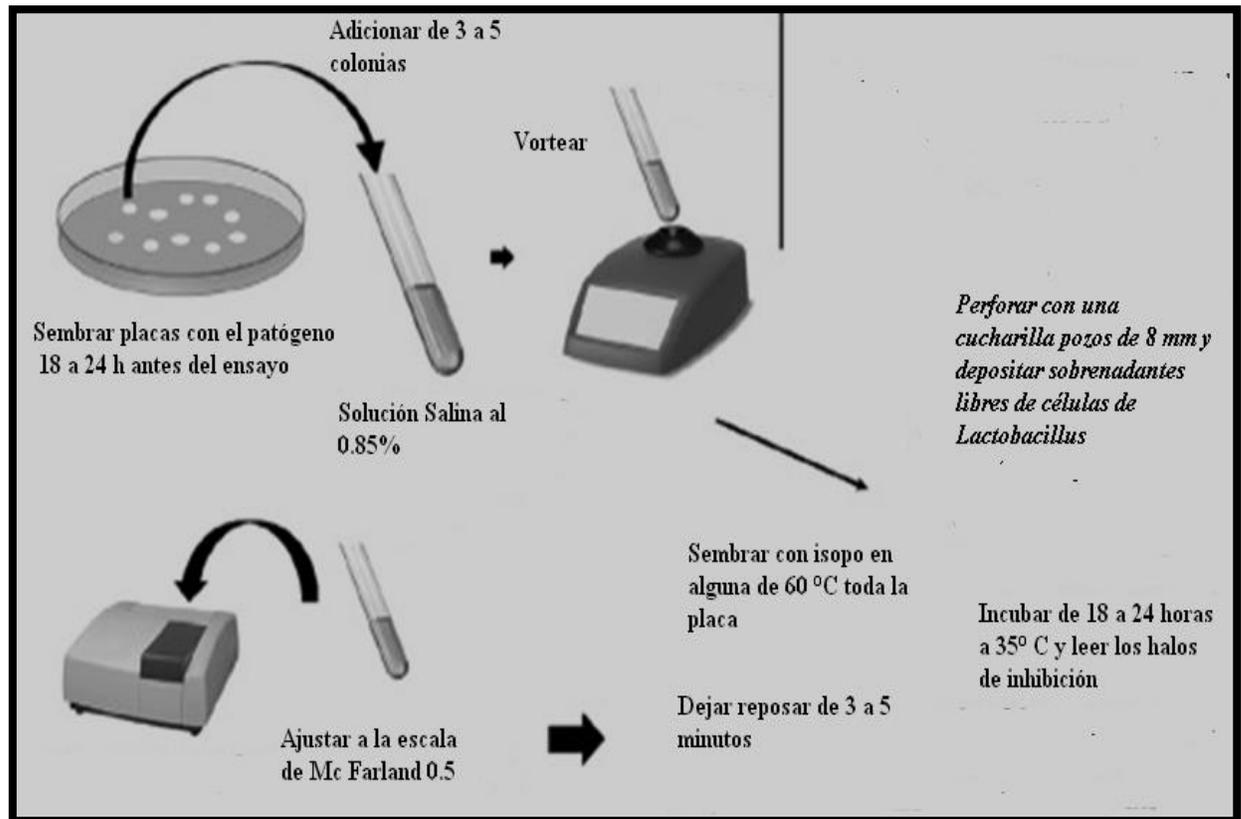
BA = Bacterias adheridas

BAL= Bacterias ácido lácticas

\*Esta fórmula fue aplicada para cada uno de los patógenos indicadores.

### **7.8 Ensayo de la actividad antimicrobiana en Sobrenadantes libres de bacterias (SLB).**

Los preparados de SLB fueron obtenidos como se describe en el apartado 7.3 de material y métodos. El ensayo de la actividad antimicrobiana se realizó de acuerdo al método de difusión en pozo, con algunas modificaciones (Georgieva et al, 2015). Cultivos en fresco de las bacterias patógeno indicador fueron crecidas en caldo BHI, las mismas fueron ajustadas a una concentración de 0.5 de Mac Farland, las cuales fueron sembradas en placa mediante sembrado por isopo en ángulos de 60°C para cada una de las cepas patógenas utilizadas en este trabajo, las cuales incluyeron: *E. coli* (ATCC 35218), *S. typhimurium* (ATCC 28140) y *S. aureus* (ATCC 29213). Subsecuentemente, después de 3 a 5 minutos se realizaron orificios con una punta amarilla de micropipeta Eppendorf de aproximadamente 6.8 mm de diámetro, en donde fueron colocados 100 µl de del SLB de cada cepa de *Lactobacillus* utilizada en este trabajo. Después de la incubación de las placas por 24 horas a 35°C, el diámetro de la zona de inhibición fue medido. A la par se prepararon controles positivos (pozos con antibiótico, tetraciclina 30µg/ml, control positivo, y control negativo caldo de MRS pH=5.2)



**Figura 11. Estrategia experimental para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las especies de *Lactobacillus***

### 7.9 Análisis estadístico.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado en un total de 3 experimentos. Así mismo, para establecer las diferencias de adherencia en el modelo experimental con células epiteliales (HT-29 y Caco-2), interferencia de adherencia y actividad antimicrobiana del SLB se aplicó prueba no paramétrica de Wilcoxon, donde las diferencias significativas se consideraron a una  $p < 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Características de hidrofobicidad superficial de cepas probióticas de *Lactobacillus*.

Las propiedades fisicoquímicas de superficie celular de cinco cepas de bacterias probióticas de *Lactobacillus* fueron evaluadas por tratamiento frente a solvente no-polares (en este caso específico xileno). La determinación de hidrofobicidad superficial en cepas aisladas se ha considerada como una pre-prueba predictiva del nivel de adhesión de un probiótico a células epiteliales. Los resultados del ensayo de hidrofobicidad superficial se muestran en la (Tabla 4). La hidrofobicidad para las cepas de probióticos de *Lactobacillus* analizadas fue altamente variable, entre  $28.8 \pm 2.3$  % (para *L. rhamnosus* GG) y  $38.5 \pm 2.4$  (*L. helveticus* IMAU70129). Las cepas *L. helveticus* IMAU70129 y *L. casei* IMAU60214 mostraron hidrofobicidad superficial media (30-50%) mientras que *L. rhamnosus* GG y *L. rhamnosus* KLDS tuvieron el menor porcentaje de hidrofobicidad, con valores de ( $28.8\% \pm 2.3$  y  $25.8 \pm 2.4$  %) respectivamente, en comparación a lo exhibido por la cepa de *L. helveticus* IMAU70129 que mostro mayor grado de hidrofobicidad ( $38.5 \pm 3.2$ ). Esta última se clasifico como una cepa de media hidrofobicidad

**Tabla 4. Determinación de la hidrofobicidad superficial de cepas probióticas de *Lactobacillus*.**

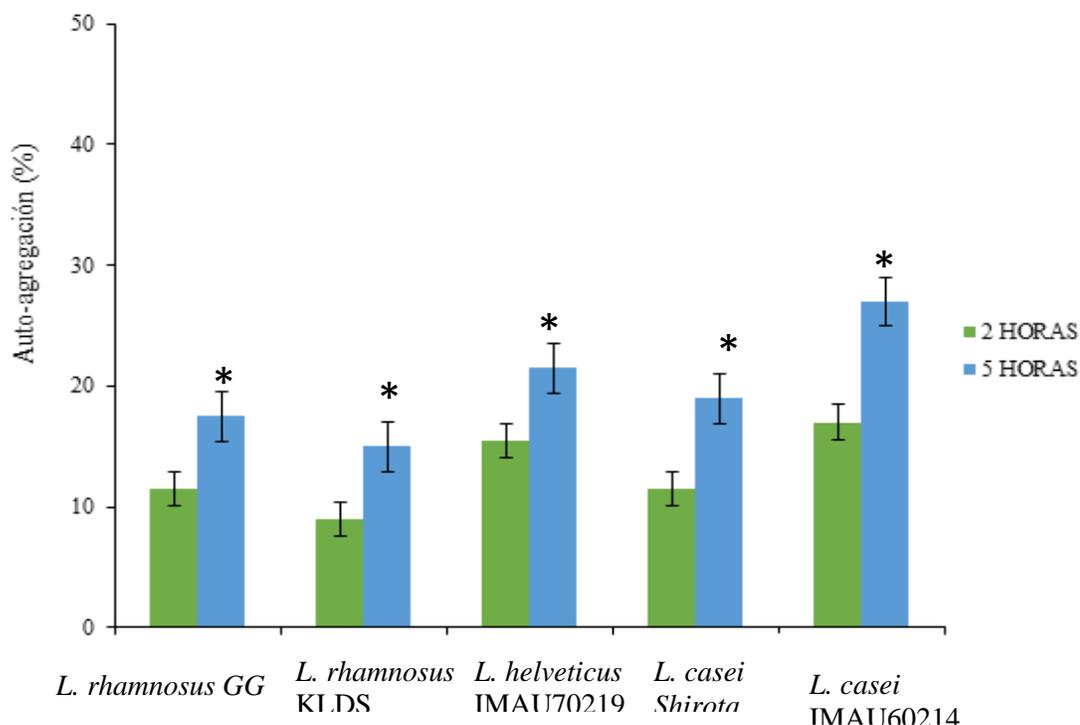
Cepa	Hidrofobicidad (%) *	Clasificación de hidrofobicidad **
<i>L. rhamnosus</i> GG	$28.8\% \pm 2.3$	Baja (0-29%)
<i>L. rhamnosus</i> KLDS	$25.8 \pm 2.4$	Baja (0-29%)
<i>L. helveticus</i> IMAU70129	$38.5 \pm 3.2$	Media (30-50%)
<i>L. casei</i> IMAU60214	$35.5 \pm 2.1$	Media (30- 50%)
<i>L. casei</i> Shirota	$33.5 \pm 2.34$	Media (30- 50%)

\*La hidrofobicidad superficial de las células bacterianas fue realizada en muestras por triplicado y expresada en porcentaje  $\pm$  desviación estándar.

\*\* La actividad de hidrofobicidad superficial de las cepas evaluadas se clasificó como alta, media y baja según lo propuesto por (Nader, et al, 2008).

## 8.2 Auto-agregación de las cepas probióticas de *Lactobacillus*.

La propiedad fisicoquímica de auto-agregación de las cepas probióticas de *Lactobacillus* fue analizada en varios tiempos de incubación siendo la mayor agregación observada después de 5 horas. La actividad de auto-agregación que mostraron estas cepas fue variable, siendo la máxima actividad auto-agregativa observada con la cepa *L. casei* IMAU60214. Por el contrario, las cepas *L. rhamnosus* GG, *L. helveticus* IMAU70129 y *L. casei* Shirota mostraron menores porcentajes de auto-agregación respectivamente (**Figura 12**). Se describe que la auto-agregación es referida como las proteínas presentes en el sobrenadante del cultivo y las proteínas y lipoproteínas localizadas en la superficie de las células bacterianas que están involucradas en la auto-agregación.

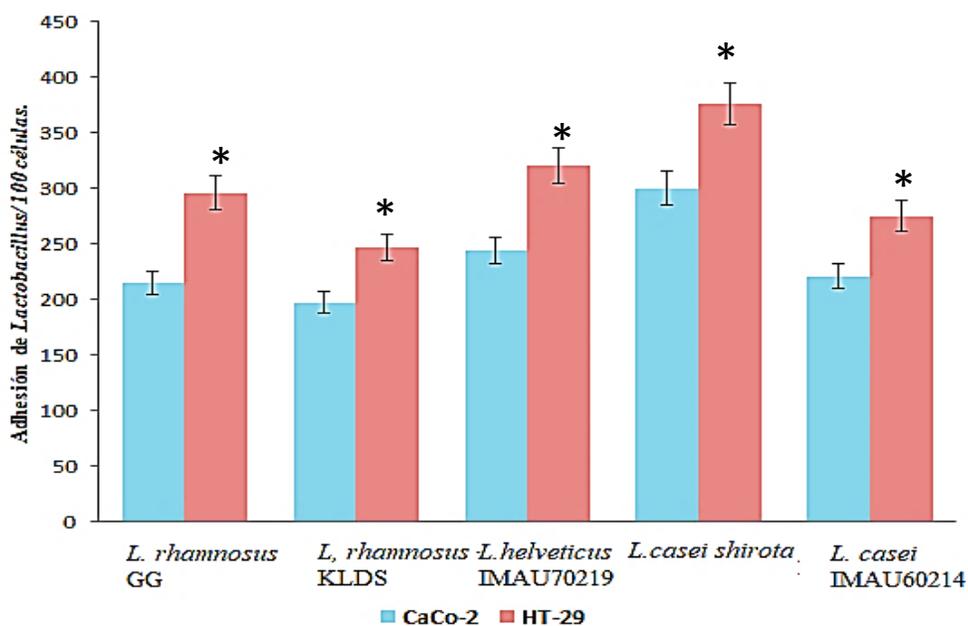


**Figura 12. Auto-agregación (%) de *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* KLDS, *L. helveticus* IMAU60129, *L. casei* IMAU60214 a 37°C.** La auto-agregación se evaluó en muestras por duplicado en tiempos de 2 y 5 horas, las diferencias significativas de las medias  $\pm$  desviación estándar fueron observadas después de 5 h en comparación de 3 horas

\*( $p < 0.05$ ) Tiempo de auto-agregación (2 vs 5 horas)

### 8.3 Propiedades de adhesión de las cepas de *Lactobacillus* en modelo *in vitro* de células epiteliales de HT-29, Caco-2 humanas.

La capacidad de adherencia de cinco cepas de *Lactobacillus* fue analizada *in vitro* en modelo de células epiteliales HT-29 y Caco-2 (**Figura 13**). Los resultados muestran que cada cepa probiótica de *Lactobacillus* tiene una capacidad variable de adhesión, aun a pesar de que estas bacterias pertenecen al mismo grupo de género. En ambas células epiteliales (HT-29, Caco-2) la cepa con propiedades más adherentes fue *L. casei* cepa *Shirota* con valores de  $376 \pm 15$  células bacterianas/100 células, en comparación de *L. rhamnosus* GG ( $296 \pm 22$ ), *L. rhamnosus* KLDS ( $247 \pm 30$ ), *L. helveticus* IMAU70129 ( $320 \pm 23$ ), y *L. casei* IMAU60214 respectivamente. Ambas cepas de *L. helveticus* IMAU70129 y *L. casei* IMAU60214 mostraron menor actividad para adherirse a las células HT-29 en comparación con las células Caco-2. Por el contrario, es importante mencionar que estas bacterias BAL se adhieren en un número menor de bacterias de hasta dos veces ( $125 \pm 20$ ) en células HT-29 en comparación de los valores observados en su capacidad de adhesión en las células Caco-2.



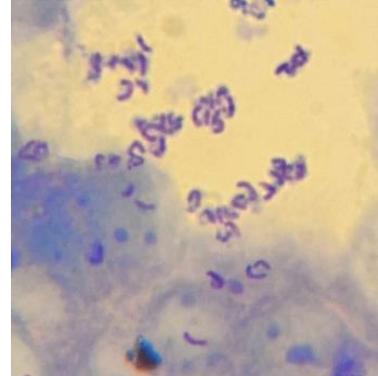
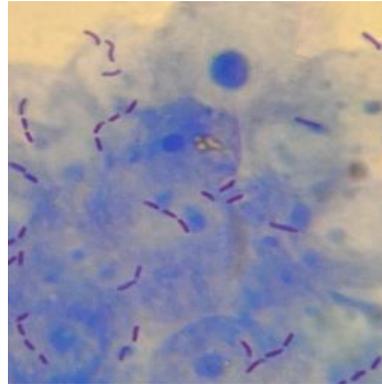
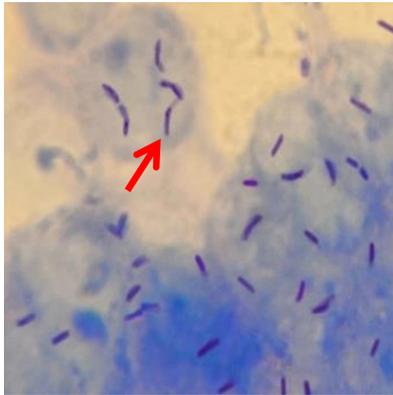
**Figura 13.** Adhesión de *Lactobacillus* a células epiteliales de colon humano HT-29, Caco-2.

La capacidad de adhesión de diferentes cepas de bacterias ácido láctico fue evaluada en monocapas de células Caco-2 después de 2 horas de incubación. Las barras de error (desviación estándar (DS) de tres experimentos independientes son mostrados. \*  $p < 0.05$  comparado entre HT-29 y Caco-2.

a) *L. rhamnosus* GG

b) *L. rhamnosus* KLDS

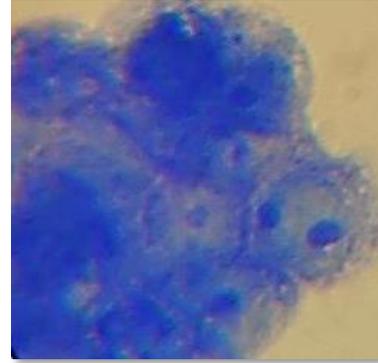
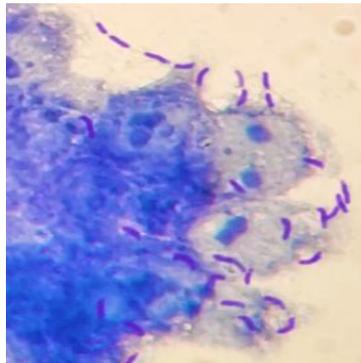
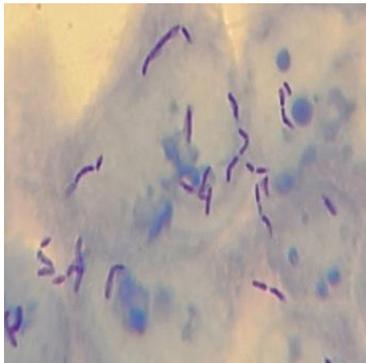
c) *L. helveticus* IMAU70219



d) *L. casei* Shirota

e) *L. casei* IMAU60214

f) Células HT-29

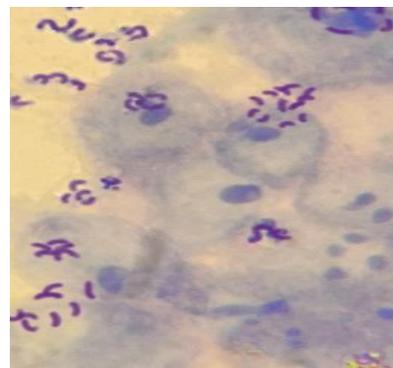
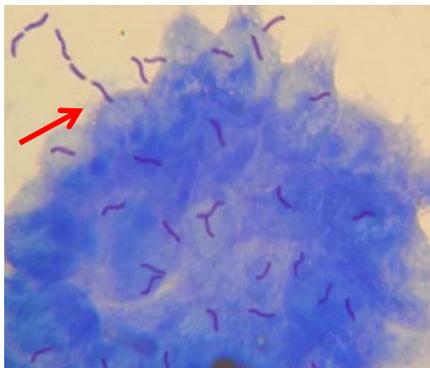


**Figura 14. Adherencia de 5 aislados de *Lactobacillus* sobre monocapas de células epiteliales HT-29** a) *L. rhamnosus* GG, b) *L. rhamnosus* KLDS, c) *L. helveticus* IMAU70129 d) *L. casei* Shirota e) *L. casei* IMAU60214 f) células HT-29. Las flechas rojas indican los *Lactobacillus* adheridos a las células, observados por microscopía de luz después de tinción de Giemsa,

a) *L. rhamnosus* GG

b) *L. rhamnosus* KLDS

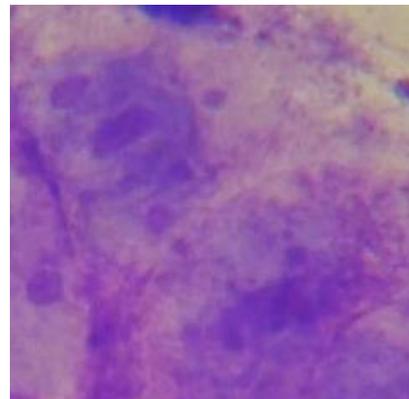
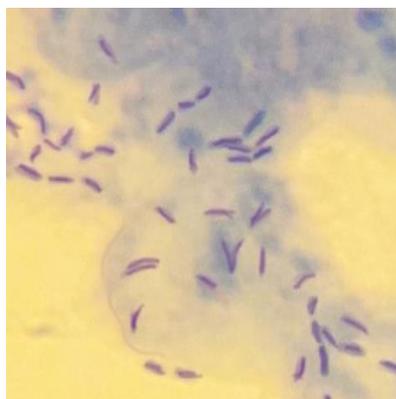
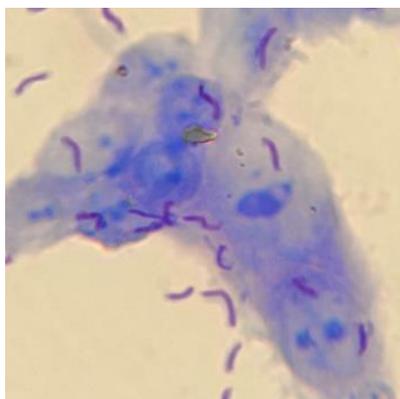
c) *L. helveticus* IMAU70129



d) *L. casei* Shirota

e) *L. casei* IMAU60214

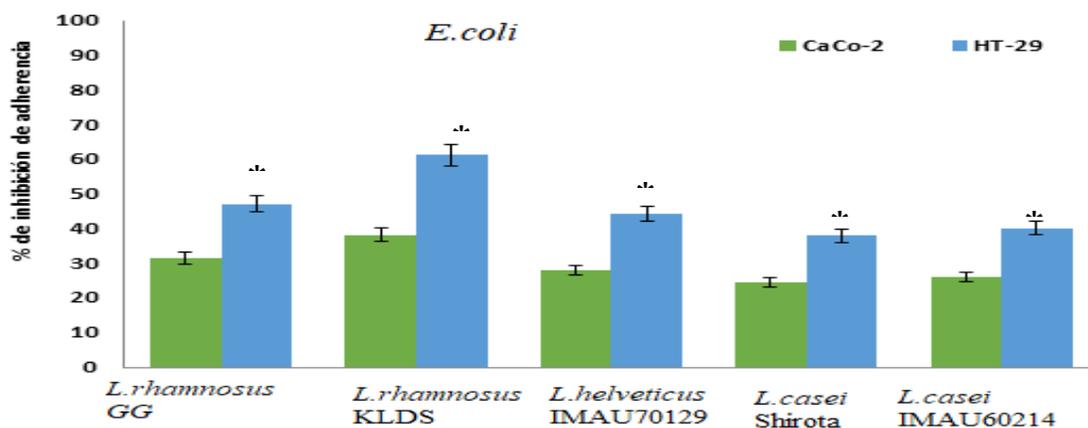
f) Células Caco-2



**Figura 15. Adherencia de *Lactobacillus* sobre monocapas de las células epiteliales Caco-2. a) *L. rhamnosus* GG, b) *L. rhamnosus* KLDS, c) *L. helveticus* IMAU70129 d) *L. casei* Shirota e) *L. casei* IMAU60214, f) Caco-2. Las flechas indican los *lactobacillus* adheridos, observados a microscopía de luz después de tinción de Giemsa.**

#### 8.4 Inhibición de la adherencia de cepas patógenas sobre células epiteliales HT-29 y Caco-2 por aislados de *Lactobacillus*

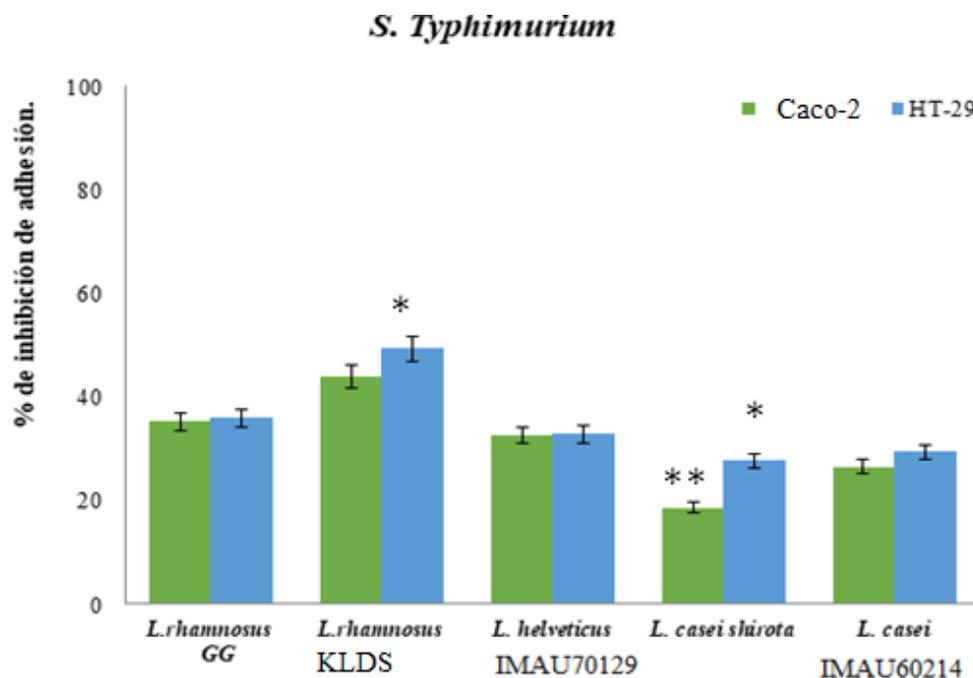
Las propiedades de diferentes especies de *Lactobacillus* para prevenir la adherencia de cepas patógenas como es *Escherichia coli*, (ATCC 35218), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) fue evaluado por el método de exclusión. Primeramente, en la (Figura 16) se muestran los porcentajes de inhibición obtenidos sobre la adherencia a *Escherichia coli*, (ATCC 35218) tanto en células epiteliales HT-29 y Caco-2, donde el pre-tratamiento con *L. rhamnosus* KLDS exhibe efectos beneficios altamente positivos al reducir en más del 40% la adherencia de esta bacteria en comparación al tratamiento con las otras especies de *Lactobacillus*, estos últimos porcentajes de inhibición oscilaron entre (40±3-5, 37±3.2, 42±2-4, 35±3-5) para *L. rhamnosus* GG, *L. helveticus* IMAU70129, *L. casei* Shirota y *L. casei* IMAU60214 respectivamente. En un mismo comportamiento pero en menor grado se observó este efecto en las células Caco-2 (Figura 16).



**Figura 16. Inhibición de la adherencia de *Lactobacillus* vs *E. coli*, en células HT-29 y Caco-2.** Efecto inhibitorio de la adhesión de la cepa patógena *E. coli* vs diferentes cepas ácido lácticas, se evaluó en monocapas de células Caco-2 y HT-29. Las barras de error (desviación estándar (DS)) de tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$  comparado entre Caco-2 y HT-29. Estos resultados se calcularon mediante la fórmula:

$$IA = (\% B. A. en ausencia de BAL - \% adhesión en presencia de BAL)(100)$$

Así mismo, como se muestra en la (Figura 17), el efecto sobre la inhibición de adherencia contra *S. Typhimurium* fue observada con todas las cepas de *Lactobacillus* analizadas, sin embargo, estos porcentajes fueron variables entre los *Lactobacillus*. Altos porcentajes de inhibición fueron observados bajo pre-tratamiento con la cepa de *L. rhamnosus* KLSD en comparación a las otras cepas de *Lactobacillus* (55%) vs *L casei* IMAU60214 (26.93 %).

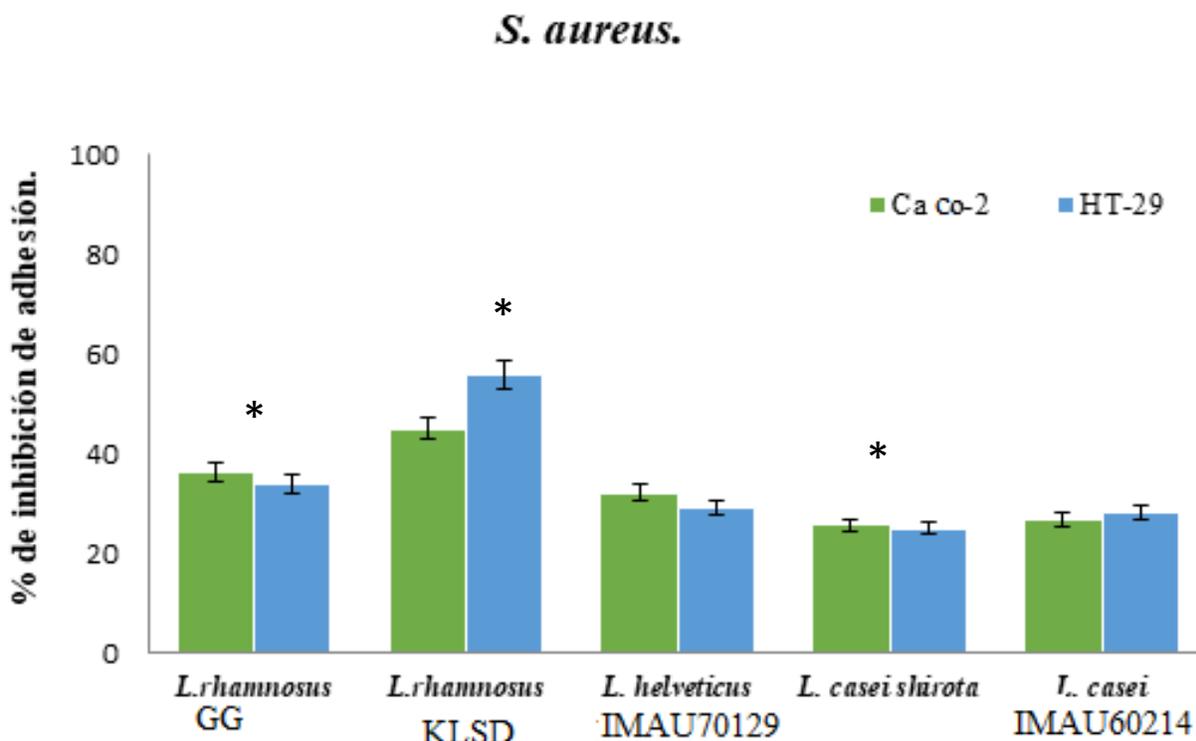


**Figura 17. Inhibición de la adherencia de *Lactobacillus* vs *S. typhimurium*, en células HT-29 y Caco-2.** Efecto inhibitorio de la adhesión de la cepa patógena *S. typhimurium* vs diferentes cepas ácido lácticas, se evaluó en monocapas de células Caco-2 y HT-29. Las barras de error (desviación estándar (DS)) de tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$  comparado entre *Lactobacillus*. \*\*  $p < 0.05$  en comparación a la línea celular HT-29 vs Caco-2

Estos resultados se calcularon mediante la fórmula:

$$IA = (\% B. A. en ausencia de BAL - \% adhesión en presencia de BAL)(100)$$

Con respecto al efecto inhibitorio sobre la adherencia de bacteria Gram positiva tal es el caso de *S. aureus*, los resultados mostraron que también *L. rhamnosus* KLDS produce un porcentaje mejor de inhibición (**Figura 18**), comparado a las otras especies de *Lactobacillus*. Además es importante mencionar que el efectos son en menor nivel de porcentaje a los observados para patógenas Gram negativos como *E. coli* y *S. Typhimuirum.*,



**Figura 18. Inhibición de la adherencia de *Lactobacillus* vs *S. aureus*, en células HT-29 y CaCo-2.** Efecto inhibitorio de la adhesión de la cepa patógena *S. aureus* vs diferentes cepas ácido lácticas, se evaluó en monocapas de células Caco-2 y HT-29. Las barras de error (desviación estándar (DS)) de tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$  comparado entre especies de *Lactobacillus*. Estos resultados se calcularon mediante la fórmula:

$$IA = (\% B. A. en ausencia de BAL - \% adhesión en presencia de BAL)(100)$$

### 8.5 Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células bacterias (SLB) de *Lactobacillus* sobre el crecimiento de cepas patógenas indicadoras.

Cinco cepas de *Lactobacillus* fueron evaluadas en su actividad antibacteriana contra cepas indicadoras, las cuales incluyeron dos cepas de bacterias Gram negativas *Escherichia coli*, (ATCC 35218), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) y una cepa Gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) usando el método de difusión en pozo. La evaluación de actividad antimicrobiana de SLB se muestra en la **Tabla 5**. Los resultados muestran que todos los SLB fueron gradualmente efectivos para interferir en el crecimiento microbiano; sin embargo, la cepa de *L. casei* cepa *Shirota* produjo el efecto más potencial contra los patógenos evaluados demostrado por los diámetros de inhibición del crecimiento. Así mismo, *L. rhamnosus* GG mostró buena actividad en comparación con las otras cepas (*L. rhamnosus* KLDS, *L. helveticus* IMAU70129, y *L. casei* IMAU60214) respectivamente.

**Tabla 5. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes libres de células (SLB) producidos por diferentes *Lactobacillus* en contra de diferentes cepas patógenas realizado por el método de difusión en pozos de agar.**

SLBs	Zona de Inhibición (mm±DS)		
	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC 29213
<i>L. rhamnosus</i> GG	10± 0.35	10±0.33	10±0.42
<i>L. rhamnosus</i> KLDS	8± 0.3	10± 0.24	9±0.43
<i>L. helveticus</i> IMAU70219	9±0.34	10±0.33	10±0.55
<i>L. casei</i> <i>Shirota</i>	14±0.45	12±0.45	10±.0.5
<i>L. casei</i> IMAU60214	15±0.35	14±0.23	15±0.3
Control Positivo	16± 0.53	16±0.4	15±0.55

Control Positivo: Tetraciclina 30µg/ml, Control Negativo: Medio de cultivo solo MRS.

## 9. DISCUSIÓN

La interacción de los componentes inmunitarios del hospedero con la microbiota intestinal es una importante vía a la homeostasis de la mucosa intestinal e influye positivamente en salud del hospedero (Thaiss, CA., et, al. 2016). En una mucosa intestinal sana se ha descrito que la respuesta inflamatoria producida es una “*inflamación llamada fisiológica*” debido a la presencia de varios linfocitos efectores, que localmente responden al daño inducido por los antígenos al entran en contacto con la mucosa intestinal, pero que a la vez regulan su respuesta por su interacción con la microbiota intestinal (Okumura, R., et, al. 2018). Así mismo, las interrupciones de estas interacciones (microbio-hospedero) pueden resultar en un desbalance microbiano que puede llevar a desordenes inflamatorios del tracto gastrointestinal como IBD o en su caso gastroenteritis causada por infecciones con patógenos entéricos (Salim, SY., et, al. 2010).

En este contexto, en años recientes se ha generado un gran interés, por evaluar los mecanismos de la microbiota hacia la modulación del sistema inmune del intestino a través de la introducción de microorganismos benéficos tal es el caso de bacterias probióticas. Las bacterias probióticas actúan terapéuticamente por desplazamiento de la bacteria patógena con un potencial benéfico al hospedero, sin embargo, está reportado que estos efectos benéficos son dependientes de la bacteria probiótica (cepa, especie específica, aún dentro del mismo género); es decir no se pueden generalizar las propiedades funcionales a todas las cepas probióticas descritas en la literatura. Así también, es muy importante la selección de la cepa probiótica de acuerdo al blanco específico de enfermedad del hospedero. La cepa de *Lactobacillus rhamnosus* LGG aislada de la microbiota indígena del tracto gastrointestinal del hospedero ha sido extensamente estudiada siendo una de las principales cepas probióticas, la cual está considerada como un agente terapéutico efectivo contra algunas infecciones asociadas al intestino, así como en desordenes inflamatorios, sin embargo la comunidad científica se ha encaminada a la búsqueda de otras bacterias con acciones probióticas de acciones benéficas no solo a nivel intestinal sino también como alimentos funcionales (Capurso, L., et, al. 2019).

En la presente tesis se evaluaron las propiedades probióticas potenciales de cinco cepas de *Lactobacillus* aisladas de leches fermentadas contenidas en productos comerciales fermentados, dos de ellas utilizadas como comparativo a cepas de referencia (*L. rhamnosus* GG, *L. casei* Shirota) tres nuevas cepas poco estudiadas como (*L. rhamnosus* KLDS, *L. helveticus* IMAU70129 y *L. casei* IMAU60214), las cuales se analizaron mediante el estudio *in vitro* de sus características de hidrofobicidad, autoa-gregación, adhesión y sus efectos funcionales como su capacidad para antagonizar a la adhesión de patógenos entéricos sobre modelos muy utilizados de células epiteliales HT-29, Caco-2.

En los ensayos de sus propiedades de hidrofobicidad evaluada por el tratamiento con Xileno, las cepas mostraron similitudes en los rangos de hidrofobicidad entre ellas (30-40%). Los valores de hidrofobicidad de las cepas analizadas fueron muy similares a las reportadas por otros estudios. De acuerdo a los porcentajes de hidrofobicidad, esta propiedad de la superficie podría considerarse como de hidrofobicidad moderada ya que los rangos de cepas de moderada hidrofobicidad están entre (30-50%) a diferencia de hidrofobicidad baja (10-25%) o alta hidrofobicidad (50-90%). Las características de hidrofobicidad de una cepa probiótica es parte importante de inferencia de su acción probiótica, esta característica fisicoquímica de la hidrofobicidad de su superficie celular ha sido implicada en las propiedades de la adhesión de la bacteria a los tejidos del hospedero, la cual le puede conferir una ventaja competitiva muy importante para mantener la homeostasis en tracto gastrointestinal del hospedero. La examinación de la hidrofobicidad con solventes no polares por ejemplo n-hexadecano, xileno y tolueno puede dar una estimación de una capacidad de una cepa para adherirse a las células epiteliales, siendo una pre-prueba del nivel de adhesión de un probiótico a las células epiteliales.

(De souza, BMS., et al, 2019) han sustentado que la hidrofobicidad es una de las características fisicoquímicas, que median el primer contacto entre la cepa probiótica con las células del hospedero. Los autores reportan que las bacterias con alta o mediana hidrofobicidad (30 a 68,81%) tienen mayor potencial a unirse con células de la mucosa intestinal, los autores además citan a *L. fermentums* como una de estas cepas (Aziz, K., et al, 2019). En la presente tesis, los resultados en los porcentajes de hidrofobicidad de las nuevas cepas en estudio: *L. rhamnosus* KLDS, *L. helveticus* IMAU70129 y *L. casei*

IMAU60214 demuestran una buena hidrofobicidad sugiriendo la probabilidad de adhesión a las células epiteliales.

Esta reconocido que los microorganismos tienen componentes hidrofóbicos sobre su superficie tal es caso de proteínas, polisacáridos, ácido lipoteicoicos (bacterias gram positivas), los cuales son capaces de unirse de forma covalentemente a superficie del epitelio intestinal. Reportes previos han documentado que la capacidad de las cepas LAB para unirse con fuentes de hidrocarbano es causada por uniones de enlaces covalentes. Así también, los residuos hidrofóbicos contribuyen a la adhesión entre las cepas probióticas y las células epiteliales intestinales para reconocer residuos de carbohidratos similares a galactosa, fucosa, manosa de glicolípidos y glicoproteínas presentes sobre las superficies celulares (**Valdillo-Rodríguez, V., et al, 2004**). En concordancia, con el presente estudio se menciona que el grado de hidrofobicidad de las cepas de *Lactobacillus* es mayor al de otros Lactococci (**Collado, MC., et al, 2007**). Asimismo, el nivel de hidrofobicidad tiene un importante papel en la industria de los alimentos ya que esta propiedad asociada a un cultivo o como co-cultivo en productos fermentados favorece la alta afinidad a la grasa de la leche, además proporciona aroma y favorece la estabilidad de emulsiones.

Otro resultado importante de esta tesis su capacidad de auto-agregación que también es un tamizaje para sugerir las probabilidades de adhesión de una cepa probiótica a células epiteliales intestinales contrario a la co-agregación que se refiere a la interacción con los patógenos la cual está más relacionada a los mecanismos antagonistas, siendo importante como efecto preventivo a la adhesión de patógenos en el tracto gastrointestinal (**Kimoto, H., et al, 1999**).

Los factores que promueven la salud por prevención de la adhesión de patógenos al epitelio incluyen la presencia física del probiótico, así como su función en la innumodulación del sistema inmune (**Tuson, HH., et al, 2013**). Los porcentajes de auto-agregación de las cepas en estudio mostraron dependencia del tiempo ya que los porcentajes mayores se obtuvieron después de 5 horas. La cepa probiótica de *L. casei* IMAU60214 mostro los porcentajes mayores de auto-agregación en comparación a las otras cepas (*L. rhamnosus* KLDS y *L. helveticus* IMAU70129), sugiriendo que estas cepas podrían presentar una mejor adherencia al epitelio intestinal.

Al respecto diferentes estudios han discutido que la auto-agregación junto con la hidrofobicidad puede resultar en una apropiada capacidad de adherencia y colonización sobre el epitelio intestinal (**Chen, S., et al, 2019 y Singh, VP., et al, 2013**). En contraste, la propiedad de co-agregación entre pares de microorganismos se considera altamente específica, la cual es más relacionada a la fuerza de adhesión a una célula complementaria mediado por la interacción de un receptor disacárido presente en otra célula (**Suez, J., et al, 2019 y Del Re, B., et al, 2000**). Adicionado a lo anterior, se ha sugerido que porcentajes bajos de co-agregación con distintos patógenos podrían tener una contribución importante en la inhibición de bio-film así como en la eliminación de los patógenos en el tracto gastrointestinal del hospedero. Estudios recientes por (**Armas, F., et al, 2017**) han reportado que la cepa por ejemplo *L. Lactis* LMG 7930 se caracteriza por presentar bajos valores de auto-agregación junto con baja co-agregación para la mayoría de patógenos en interacción sugiriendo propiedades específicas asociadas a esta cepa. En este mismo contexto, otras investigaciones reportan que después del análisis de 22 cepas del género de *Lactobacillus*, las propiedades como la auto-agregación, hidrofobicidad y también la co-agregación sobre la selección de cepas potenciales probióticas de *Lactobacillus* podrían ser utilizadas al tamizaje selectivo, sin embargo tanto la auto-agregación y la hidrofobicidad no siempre correlacionan con la habilidad de capacidad de adherencia de cepas probióticas al epitelio; por lo que se tienen que tamizar otras características de evaluación entre ellas, su capacidad de adherencia al epitelio intestinal sustentados en modelos *in vitro* con diferentes líneas celulares de epitelial intestinal (**Tuo, Y., et al, 2013**).

Por consiguiente, en esta tesis, también analizamos la capacidad de adherencia a células epiteliales HT-29 y células Caco-2. Los resultados obtenidos demuestran porcentajes de adherencia muy similares a las cepas de referencia utilizadas en este estudio. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en los porcentajes de adherencia entre los dos modelos de células epiteliales. Las cepas de *Lactobacillus* presentaron mayor capacidad de adherirse a las células epiteliales productoras de moco HT-29 con respecto a enterocitos maduros Caco-2; estas diferencias posiblemente se puedan atribuir a la presencia de mucina en las células HT-29 la cual podría favorecer con la adhesión de estas cepas a diferencia de las células Caco-2 que no son productoras de moco. Información previa ha documentado que la adherencia puede variar según los sustratos, por ejemplo, poliestireno, presencia de

enzimas como colágena, mucina y es característico también de cada cepa, especie-específica. Diferentes trabajos también han reportado diferencias en los patrones de adherencia de acuerdo a condiciones de la cepa probiótica, condiciones de concentración bacteria: célula epitelial, así como formas viables o no viables de las cepas probióticas asociado también al origen de la línea celular empleada (polarizadas o no polarizadas, Hela, Hep-2). Es innegable que la adherencia es una fase inicial de contacto temprano entre la bacteria probiótica y constituyentes celulares del epitelio intestinal, la propiedad de adhesión constituye un proceso complejo que involucra el contacto temprano entre la cepa probiótica y el moco, complicando la interacción en un rango amplio de interacciones de fuerzas electrostáticas, fuerzas de Van der Waals y otras varias interacciones de rango corto. La característica de adhesión de una cepa probiótica tiene ventajas similares a la estimulación de crecimiento bacteriano ya que las bacterias adheridas pueden favorecer la producción de una matriz de bio-film consistente de proteínas extracelulares DNA, polisacáridos, los cuales ejercen acciones protectoras. Así mismo la producción de exopolisacáridos extracelulares (EPS) secretados por las células bacterianas probióticas favorece la resistencia a la bacteria probiótica evitando su daño por acción de proteasas enzimáticas y antibióticos.

Los datos sobre los porcentajes de adherencia de las cepas estudiadas demuestran porcentajes muy similares a los reportados por otros autores con otras cepas probióticas de *Lactobacillus* como *L. rhamnosus* KLDS (Konieczna, C., et al, 2018). Aunado a la importancia de la adherencia de las cepas probióticas como un criterio importante de selección de la cepa probiótica “ideal” también es necesario conocer sus propiedades funcionales. Distintos trabajos han reportado que varios grupos de cepas probióticas pueden proteger en contra de la infección por patógenos especialmente a través de efectos anti-adhesión sobre los patógenos (Reid, G., et al, 2002). En esta tesis esta actividad de anti-adhesión fue analizado contra varias cepas patógenas indicadoras, dos bacterias gram negativas como *E. coli*, (ATCC 35218), *Salmonella typhimurium* (ATCC 12840) así como una bacteria gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 23219). Los resultados demuestran que la mayoría de ellas tienen efecto anti-adherente por desplazamiento en contra de los patógenos, los efectos de inhibición de la adherencia que se obtuvieron en rangos de 30 a 35 % de inhibición de los patógenos, por ejemplo, el grado de reducción a

*Escherichia coli* fue del 35%, el cual es similar a lo reportado por estudios previos de Falah (Alizadeh, B., et al, 2019), otros autores observan los mismos rangos de reducción de *E. coli* en células Caco-2 (García-Ruiz, A., et al, 2012). Resultados similares han sido reportados a otros patógenos como *Salmonella* Typhimurum; en la inhibición de adherencia con cepas de la especie *L. paracasei* (Lim, SM., et al, 2012).

Por otra parte, también la funcionalidad de las cepas probióticas se sostiene en la habilidad de estas cepas para antagonizar con los diferentes patógenos principalmente por dos mecanismos: 1) Actividades antimicrobianas moduladas por la secreción de diferentes moléculas derivadas del metabolismo de estas bacterias que pueden tener una actividad anti-microbiana al inhibir el crecimiento de bacterias patógenas. 2) Actividades con efectos inmunoestimulantes o inmunomoduladores sobre el sistema inmune del hospedero.

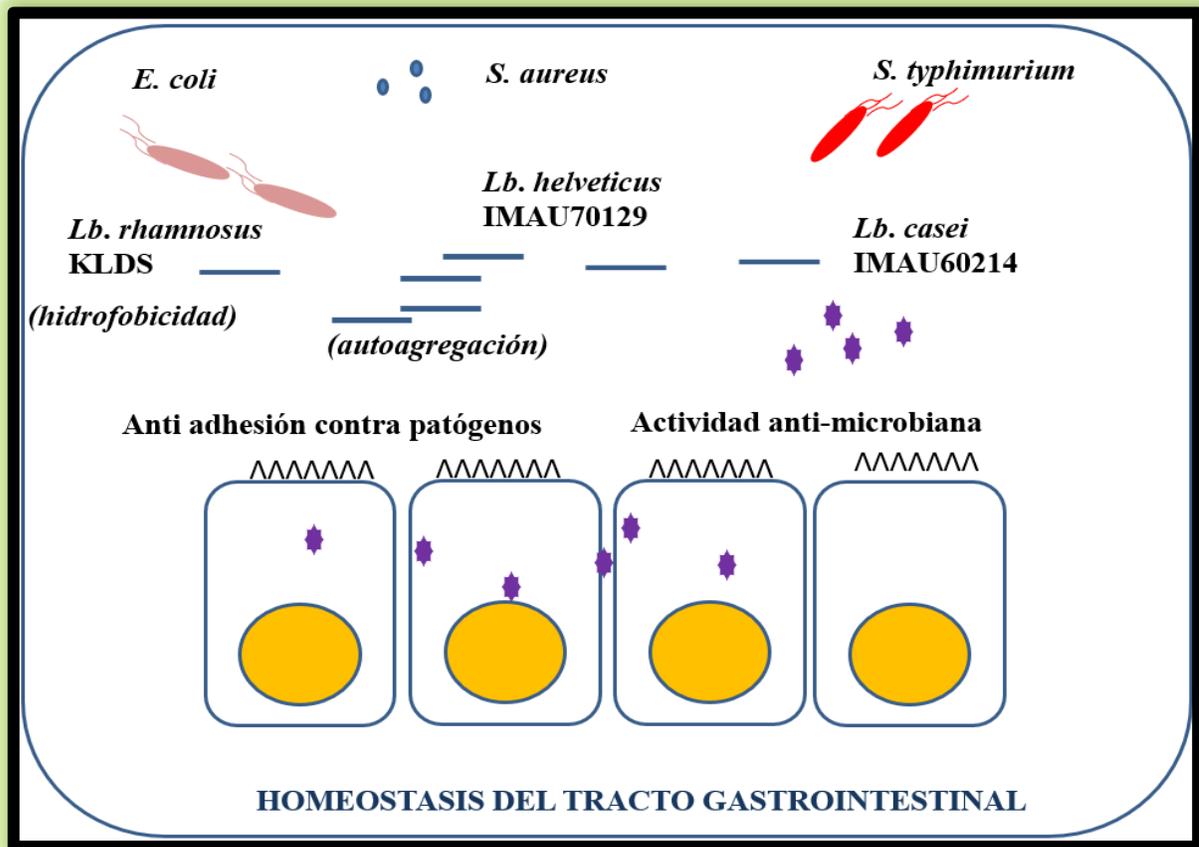
Al respecto del primer mecanismo, también se demostraron actividades anti-microbianas para los patógenos seleccionados. Esta actividad fue evidenciada por los halos de inhibición observados con los sobrenadantes libres de células de bacterias probióticas para cada una de las cepas estudiadas, los diámetros de los halos de inhibición oscilaron entre 10.5 a 20.5 mm de diámetro representando una actividad antimicrobiana moderada contra los tres. Todas las bacterias probióticas mostraron rangos de inhibición, pero es notorio mencionar que los halos de mayor diámetro fueron con *L. casei* IMAU60214 y *L. helveticus* IMAU70129. Estudios previos de cepas de *Lactobacillus* han mostrado un rango variable de resultados desde la ausencia de actividad anti-microbiana hasta una fuerte actividad anti-microbiana, por ejemplo *L. reuteri* derivado de humano tiene una moderada inhibición a diversos microorganismos patógenos entérico *E. coli* (con zonas de inhibición de 7 a 10 mm de diámetro), Por el contrario, *L. delbeueki* subespecie *bulgaris* ejerce una sustancial inhibición (zonas de inhibición de 21.1 mm de diámetro) contra *E. coli* (Thangavel, G., et al, 2019). Así mismo, *L. plantarum* B7 aislados de pacientes dispépticos inhibe moderadamente el crecimiento de *Helicobacter pylori* (zonas de inhibición de 11 a 13 mm) siendo dosis-dependiente (Sunanliganon, C., et al, 2012).

Los resultados del presente trabajo en este punto son alentadores debido a que la mayoría de estas cepas exhibieron actividad antagónica contra las patógenos entéricos, aún más contra *S. aureus* un patógeno asociado a infecciones por alimentos contaminados. Las

explicaciones de estos efectos de inhibición observados se podrían sugerir a componentes ácidos ya que no realizamos tratamientos enzimáticos como tripsina o purificaciones de componentes de pared celular de estas bacterias. Estos componentes ácidos incluyen obviamente a la producción de ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogeno, etanol, diacetil, acetaldehído, acetoina, reuterina, reuteriicina y bacteriocinas entre otras. Sin embargo es necesario caracterizar en un futuro los componentes responsables de estos efectos a nivel molecular para caracterizar las propiedades funcionales de estas cepas probióticas

En resumen, los resultados de esta tesis sustentan el potencial probiótico de *L. rhamnosus* KLDS, *L. helveticus* IMAU70219 y *L. casei* IMAU60214 en comparación a cepas de referencia como *L. rhamnosus* GG así como *L. casei* Shirota) en sus propiedades de hidrofobicidad, auto-agregación, adherencia y su capacidad de adherencia a células del epitelio intestinal tanto HT-29 como células Caco-2 con actividades antimicrobianas significativas a través de mecanismos de exclusión al inhibir la adhesión de patógenos entéricos, los cuales se integran en la (**Figura 19**). En donde se muestran parte de las importantes acciones biológicas de estas bacterias probióticas al epitelio intestinal basados en los resultados de este estudio.

Finalmente, las propiedades específicas de las bacterias probióticas son relevantes y nos orientan a sugerir a este grupo de bacterias del grupo de LCG con efectos potenciales importantes a la homeostasis del epitelio intestinal.



**Figura 19. Efectos reguladores de cepas probióticas de bacterias lácticas en el epitelio intestinal.** Las bacterias lácticas como *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* KLDS, *L. helveticus* IMAU70129, *L. casei* IMAU60214 y *L. casei* Shirota se adhieren al epitelio intestinal e interfieren con la adhesión de patógenos gram positivos (*S. aureus*) y gram negativos (*S. typhimurium* y *E. coli*) por mecanismos de competencia. Esta interferencia conduce a mantener la integridad de mucosa intestinal y a la homeostasis del epitelio intestinal.

## 10. CONCLUSIONES

1.- Los probióticos de *L. rhamnosus* KLDS, *L. helveticus* IMAU70129 y *L. casei* IMAU60214 exhiben propiedades potenciales probióticas en sus características de hidrofobicidad de superficie, auto-agregación muy similares a las cepas de referencia *L. rhamnosus* GG y *L. casei* Shirota.

2.- *L. rhamnosus* KLDS, *L. helveticus* IMAU70129 y *L. casei* IMAU60214, *L. rhamnosus* GG, *L. casei* Shirota tienen la capacidad de adherirse a las células epiteliales tanto HT-29 como CaCo-2, considerándose un marcador estándar para sus propiedades funcionales.

3. El análisis potencial de este grupo de bacterias ácido-lácticas en sus propiedades antimicrobianas tienen la capacidad de interferir con la adhesión *in vitro* a patógenos gastrointestinales, así como exhibir un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de patógenos gastrointestinales como *E.coli*, *S. typhimirium* y *S. aureus*.

4. Los criterios de tamizaje evaluados en esta tesis, sustentan que están cepas de *Lactobacillus* podrían ser fuertes candidatos a la prevención y/o control de infecciones.

## 11. PERSPECTIVAS

Con base en la información obtenida de la presente tesis, surgen nuevas oportunidades de Investigación.

- ❖ Analizar las propiedades funcionales de estas cepas de *Lactobacillus* como la interferencia de adherencia en modelos *in vivo*.
- ❖ Evaluar el efecto de los sobrenadantes libres de células (SLC), sobre las condiciones de inflamación para definir si sus componentes son capaces de exhibir mecanismos de inmunomodulación e inmunoestimulación bajo sistema de modelos de interacción trans-wells (célula-epitelial/células inmunes)
- ❖ Evaluar el papel de estas bacterias ácido-lácticas en células epiteliales bajo estimulación de activadores de respuesta inflamatoria a componentes como LPS además de conocer si estas bacterias podrían tener acciones reguladoras sobre la secreción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en estas células epiteliales.
- ❖ Caracterizar, molecularmente los componentes responsables de las actividades anti-adhesión, anti-microbiana de este grupo de bacterias ácido-láctica (Por ejemplo, componentes de ácidos grasos de cadena corta, o bacteriocinas)

## 12. REFERENCIAS

- **Adams CA.** The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr Res Rev.* 2010;23(1):37–46. [doi:10.1017/S0954422410000090](https://doi.org/10.1017/S0954422410000090) (NO ESTA DISPONIBLE)
- **Alizadeh Behbahani B,** Noshad M, Falah F. Inhibition of Escherichia coli adhesion to human intestinal CaCo-2 cells by probiotic candidate Lactobacillus plantarum strain L15. *Microb Pathog.* 2019 Nov;136:103677. [doi:10.1016/j.micpath.2019.103677.](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103677)
- **Alkema W.,** Boekhorst J., Wels M., van Hijum S.A.F.T. Microbial bioinformatics for food safety and production. *Brief. Bioinform.* 2016;17:283–292. [doi:10.1093/bib/bbv034.](https://doi.org/10.1093/bib/bbv034)
- **Allen SJ,** Martinez EG, Gregorio GV, Dans LF. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;2010(11):CD003048. Published 2010 Nov 10. [doi:10.1002/14651858.CD003048.pub3](https://doi.org/10.1002/14651858.CD003048.pub3)
- **Amer M,** Nadeem M, Nazir SUR, et al. Probiotics and Their Use in Inflammatory Bowel Disease. *Altern Ther Health Med.* 2018;24(3):16–23. (NO ESTA DISPONIBLE)
- **Archer AC,** Kurrey NK, Halami PM. In vitro adhesion and anti-inflammatory properties of native Lactobacillus fermentum and Lactobacillus delbrueckii spp. *J Appl Microbiol.* 2018;125(1):243–256. [doi:10.1111/jam.13757](https://doi.org/10.1111/jam.13757)

- **Armas F**, Camperio C, Marianelli C. In Vitro Assessment of the Probiotic Potential of *Lactococcus lactis* LMG 7930 against Ruminant Mastitis-Causing Pathogens. *PLoS One*. 2017 Jan 9;12(1):e0169543. [doi:10.1371/journal.pone.0169543](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169543).
- **Ashraf R**, Shah NP. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;54(7):938–956. [doi:10.1080/10408398.2011.61967](https://doi.org/10.1080/10408398.2011.61967)
- **Aureli P**, Capurso L, Castellazzi AM, et al. Probiotics and health: an evidence-based review. *Pharmacol Res*. 2011;63(5):366–376. [doi:10.1016/j.phrs.2011.02.006](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.02.006)
- **Azad MAK**, Sarker M, Wan D. Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles. *Biomed Res Int*. 2018;2018:8063647. Published 2018 Oct 23. [doi:10.1155/2018/8063647](https://doi.org/10.1155/2018/8063647)
- **Aziz K**, Haseeb Zaidi A, Fatima HN, Tariq M. *Lactobacillus fermentum* strains of dairy-product origin adhere to mucin and survive digestive juices. *J Med Microbiol*. 2019 Dec;68(12):1771-1786. [doi:10.1099/jmm.0.001090](https://doi.org/10.1099/jmm.0.001090).
- **Bermudez-Brito M**, Muñoz-Quezada S, Gomez-Llorente C, Romero F, Gil A. *Lactobacillus rhamnosus* and its cell-free culture supernatant differentially modulate inflammatory biomarkers in *Escherichia coli*-challenged human dendritic cells. *Br J Nutr*. 2014; 111(10):1727–1737. [doi:10.1017/S0007114513004303](https://doi.org/10.1017/S0007114513004303)
- **Bermudez-Brito M**, Plaza-Díaz J, Fontana L, Muñoz-Quezada S, Gil A. In vitro cell and tissue models for studying host-microbe interactions: a review. *Br J Nutr*. 2013;109 Suppl 2:S27–S34. [doi:10.1017/S0007114512004023](https://doi.org/10.1017/S0007114512004023)
- **Bobeth M**, Blecha A, Blüher A, et al. Formation of tubes during self-assembly of bacterial surface layers. *Langmuir*. 2011; 27(24):15102–15111. [doi:10.1021/la203430q](https://doi.org/10.1021/la203430q)

- **Bönisch E**, Oh YJ, Anzengruber J, et al. Lipoteichoic acid mediates binding of a Lactobacillus S-layer protein. *Glycobiology*. 2018;28(3):148–158. [doi:10.1093/glycob/cwx102](https://doi.org/10.1093/glycob/cwx102)
- **Bron PA**, Kleerebezem M, Brummer RJ, et al. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function?. *Br J Nutr*. 2017; 117(1):93–107. [doi:10.1017/S0007114516004037](https://doi.org/10.1017/S0007114516004037)
- **Butel MJ**. Probiotics, gut microbiota and health. *Med Mal Infect*. 2014;44(1):1–8. [doi:10.1016/j.medmal.2013.10.002](https://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.10.002).
- **Capurso L**. Thirty Years of Lactobacillus rhamnosus GG: A Review. *J Clin Gastroenterol*. 2019;53 Suppl 1:S1–S41. [doi:10.1097/MCG.0000000000001170](https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001170)
- **Castro-Bravo N**, Wells JM, Margolles A, Ruas-Madiedo P. Interactions of Surface Exopolysaccharides From *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* Within the Intestinal Environment. *Front Microbiol*. 2018;9:2426. Published 2018 Oct 11. [doi:10.3389/fmicb.2018.02426](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02426).
- **Cavaillon, J. M.**, & Legout, S. (2016). Centenary of the death of Elie Metchnikoff: a visionary and an outstanding team leader. *Microbes and infection*, 18(10), 577–594. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.05.00>
- **Ceccarelli G**, Statzu M, Santinelli L, et al. Challenges in the management of HIV infection: update on the role of probiotic supplementation as a possible complementary therapeutic strategy for cART treated people living with HIV/AIDS. *Expert Opin Biol Ther*. 2019;19 (9):949–965. [doi:10.1080/14712598.2019.1638907](https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1638907)
- **Chauvière G**, Coconnier MH, Kerneis S, Darfeuille-Michaud A, Joly B, Servin AL. Competitive exclusion of diarrheagenic Escherichia coli (ETEC) from human enterocyte-like CaCo-2 cells by heat-killed Lactobacillus. *FEMS Microbiol Lett*. 1992;70(3):213–217. [doi:10.1016/0378-1097\(92\)90700-x](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90700-x)

- **Chen S**, Cao P, Lang F, Wu Z, Pan D, Zeng X, Lian L. Adhesion-Related Immunomodulatory Activity of the Screened *Lactobacillus plantarum* from Sichuan Pickle. *Curr Microbiol*. 2019 Jan;76(1):29-36. [doi:10.1007/s00284-018-1580-3](https://doi.org/10.1007/s00284-018-1580-3).
- **Collado MC**, Surono I, Meriluoto J, Salminen S. Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. *J Food Sci*. 2007 Apr;72(3):M89-93. [doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00294.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00294.x).
- **Cresci GA**, Bawden E. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. *Nutr Clin Pract*. 2015;30(6):734–746. [doi:10.1177/0884533615609899](https://doi.org/10.1177/0884533615609899).
- **Cruz-Guerrero A**, Hernández-Sánchez H, Rodríguez-Serrano G, Gómez-Ruiz L, García-Garibay M, Figueroa-González I. Commercial probiotic bacteria and prebiotic carbohydrates: a fundamental study on prebiotics uptake, antimicrobials production and inhibition of pathogens. *J Sci Food Agric*. 2014 Aug;94(11):2246-52. [doi: 10.1002/jsfa.6549](https://doi.org/10.1002/jsfa.6549).
- **Damodharan K**, Palaniyandi SA, Yang SH, Suh JW. In vitro probiotic characterization of *Lactobacillus* strains from fermented radish and their anti-adherence activity against enteric pathogens. *Can J Microbiol*. 2015;61(11):837–850. [doi:10.1139/cjm-2015-0311](https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0311)
- **de Moreno de LeBlanc A**, Dogi CA, Galdeano CM, Carmuega E, Weill R, Perdígón G. Effect of the administration of a fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN-114001 on intestinal microbiota and gut associated immune cells of nursing mice and after weaning until immune maturity. *BMC Immunol*. 2008;9:27. Published 2008 Jun 13. [doi:10.1186/1471-2172-9-27](https://doi.org/10.1186/1471-2172-9-27)
- **de Souza BMS**, Borgonovi TF, Casarotti SN, Todorov SD, Penna ALB. *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* Strains Isolated from Mozzarella Cheese: Probiotic Potential, Safety, Acidifying Kinetic Parameters and Viability under Gastrointestinal Tract Conditions. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019 Jun;11(2):382-396. [doi: 10.1007/s12602-018-9406-y](https://doi.org/10.1007/s12602-018-9406-y).

- **Deepika G**, Charalampopoulos D. Surface and adhesion properties of lactobacilli. *Adv Appl Microbiol.* 2010;70:127–152. [doi:10.1016/S0065-2164\(10\)70004-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70004-6)
- **Deering KE**, Devine A, O'Sullivan TA, Lo J, Boyce MC, Christophersen CT. Characterizing the Composition of the Pediatric Gut Microbiome: A Systematic Review. *Nutrients.* 2019;12(1): E16. Published 2019 Dec 19. [doi:10.3390/nu12010016](https://doi.org/10.3390/nu12010016).
- **Del Re B**, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett Appl Microbiol.* 2000 Dec;31(6):438-42. [doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x).
- **Deshpande G**, Athalye-Jape G, Patole S. Para-probiotics for Preterm Neonates-The Next Frontier. *Nutrients.* 2018;10(7):871. Published 2018 Jul 5. [doi:10.3390/nu10070871](https://doi.org/10.3390/nu10070871).
- **Duary RK**, Rajput YS, Batish VK, Grover S. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *Indian J Med Res.* 2011;134(5):664–671. [doi:10.4103/0971-5916.90992](https://doi.org/10.4103/0971-5916.90992)
- **Festi D**, Schiumerini R, Eusebi LH, Marasco G, Taddia M, Colecchia A. Gut microbiota and metabolic syndrome. *World J Gastroenterol.* 2014;20(43):16079–16094. [doi:10.3748/wjg.v20.i43.16079](https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.16079)
- **Fontané L**, Benaiges D, Goday A, Llauradó G, Pedro-Botet J. Influence of the microbiota and probiotics in obesity. Influencia de la microbiota y de los probióticos en la obesidad. *Clin Investig Arterioscler.* 2018;30(6):271–279. [doi:10.1016/j.arteri.2018.03.004](https://doi.org/10.1016/j.arteri.2018.03.004)
- **Frei R**, Akdis M, O'Mahony L. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence. *Curr Opin Gastroenterol.* 2015;31(2):153–158. [doi:10.1097/MOG.000000000000151](https://doi.org/10.1097/MOG.000000000000151)

- **García-Ruiz A**, González de Llano D, Esteban-Fernández A, Requena T, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiol.* 2014 Dec;44:220-5. [doi:10.1016/j.fm.2014.06.015](https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.015).
- **Gareau MG**, Sherman PM, Walker WA. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7(9):503–514. [doi:10.1038/nrgastro.2010.117](https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.117)
- **Goto Y**, Ivanov II. Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal-host immune crosstalk. *Immunol Cell Biol.* 2013;91(3):204–214. [doi:10.1038/icb.2012.80](https://doi.org/10.1038/icb.2012.80)
- **Gueimonde M**, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG, Salminen S. Competitive exclusion of enteropathogens from human intestinal mucus by Bifidobacterium strains with acquired resistance to bile--a preliminary study. *Int J Food Microbiol.* 2007;113(2):228–232. [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.017](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.017)
- **Haddaji N**, Mahdhi AK, Krifi B, Ismail MB, Bakhrouf A. Change in cell surface properties of Lactobacillus casei under heat shock treatment. *FEMS Microbiol Lett.* 2015;362(9):fzv047. [doi:10.1093/femsle/fzv047](https://doi.org/10.1093/femsle/fzv047)
- **Hao Q**, Dong BR, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(2):CD006895. Published 2015 Feb 3. [doi:10.1002/14651858.CD006895.pub3](https://doi.org/10.1002/14651858.CD006895.pub3)

- **Heeney DD**, Gareau MG, Marco ML. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride?. *Curr Opin Biotechnol.* 2018;49:140–147. [doi:10.1016/j.copbio.2017.08.004](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.004)
- **Hill D**, Sugrue I, Tobin C, Hill C, Stanton C, Ross RP. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Front Microbiol.* 2018;9:2107. Published 2018 Sep 10. [doi:10.3389/fmicb.2018.02107](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02107)
- **Jessie Lau LY**, Chye FY, et al. Antagonistic effects of *Lactobacillus plantarum* 0612 on the adhesion of selected foodborne enteropathogens in various colonic environments. *Food Control.* 2018;91:237-247. [doi:10.1016/j.foodcont.2018.04.001](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.001)
- Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(5):321–335. doi:10.1038/nri3430
- **Khalid K**. An overview of lactic acid bacteria. *Int. J. Biosci.* 2011;1:1–13.
- **Kim DH**, Chung WC, Chun SH, Han JH, Song MJ, Lee KW. Enhancing the natural killer cell activity and anti-influenza effect of heat-treated *Lactobacillus plantarum* nF1-fortified yogurt in mice. *J Dairy Sci.* 2018;101(12):10675–10684. [doi:10.3168/jds.2018-15137](https://doi.org/10.3168/jds.2018-15137)
- **Kimoto H**, Kurisaki J, Tsuji NM, Ohmomo S, Okamoto T. Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like CaCo-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Lett Appl Microbiol.* 1999 Nov;29(5):313-6. [doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00627.x.](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00627.x)

- **Konieczna C**, Słodziński M, Schmidt MT. Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus rhamnosus* KL 53A and *Lactobacillus casei* Fyos Affect Their Adhesion to Enterocytes. *Pol J Microbiol.* 2018;67(3):273-281. [doi: 10.21307/pjm-2018-032](https://doi.org/10.21307/pjm-2018-032).
- **Le Poul E**, Loison C, Struyf S, et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem.* 2003;278(28):25481–25489. [doi:10.1074/jbc.M301403200](https://doi.org/10.1074/jbc.M301403200).
- **Lebeer S**, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(3):171–184. [doi:10.1038/nrmicro2297](https://doi.org/10.1038/nrmicro2297)
- **Lederberg J**. The microbe's contribution to biology--50 years after. *Int Microbiol.* 2006;9(3):155–156.
- **Li M**, van Esch BCAM, Wagenaar GTM, Garssen J, Folkerts G, Henricks PAJ. Pro- and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2018;831:52–59. [doi:10.1016/j.ejphar.2018.05.003](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.05.003).
- **Lim SM**, Ahn DH. Factors affecting adhesion of lactic acid bacteria to CaCo-2 cells and inhibitory effect on infection of *Salmonella typhimurium*. *J Microbiol Biotechnol.* 2012 Dec;22(12):1731-9. [doi: 10.4014/jmb.1208.08049](https://doi.org/10.4014/jmb.1208.08049).
- **Manley KJ**, Fraenkel MB, Mayall BC, Power DA. Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomised controlled trial. *Med J Aust.* 2007;186(9):454–457.

- **Mantegazza C**, Molinari P, D'Auria E, Sonnino M, Morelli L, Zuccotti GV. Probiotics and antibiotic-associated diarrhea in children: A review and new evidence on *Lactobacillus rhamnosus* GG during and after antibiotic treatment. *Pharmacol Res.* 2018;128:63–72. [doi:10.1016/j.phrs.2017.08.001](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.08.001)
- **Markowiak P**, Śliżewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients.* 2017;9(9):1021. Published 2017 Sep 15. [doi:10.3390/nu9091021](https://doi.org/10.3390/nu9091021)
- **Matsuguchi T**, Takagi A, Matsuzaki T, et al. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(2):259–266. [doi:10.1128/cdli.10.2.259-266.2003](https://doi.org/10.1128/cdli.10.2.259-266.2003).
- **McFarland LV**. Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Med Infect Dis.* 2007;5(2):97–105. [doi:10.1016/j.tmaid.2005.10.003](https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2005.10.003) (NO ESTA DISPONIBLE)
- **Meijer K**, de Vos P, Priebe MG. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health?. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(6):715–721. [doi:10.1097/MCO.0b013e32833eebe5](https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32833eebe5)
- **Mills JP**, Rao K, Young VB. Probiotics for prevention of *Clostridium difficile* infection. *Curr Opin Gastroenterol.* 2018;34(1):3–10. [doi:10.1097/MOG.0000000000000410](https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000410)
- **Monteagudo-Mera A**, Rastall RA, Gibson GR, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103(16):6463–6472. [doi:10.1007/s00253-019-09978-7](https://doi.org/10.1007/s00253-019-09978-7)

- **Muñoz VL**, Porsch EA, St Geme JW 3rd. *Kingella kingae* Surface Polysaccharides Promote Resistance to Neutrophil Phagocytosis and Killing. *mBio*. 2019;10(3):e00631-19. Published 2019 Jun 25. [doi:10.1128/mBio.00631-19](https://doi.org/10.1128/mBio.00631-19)
- **Murugesan S**, Nirmalkar K, Hoyo-Vadillo C, García-Espitia M, Ramírez-Sánchez D, García-Mena J. Gut microbiome production of short-chain fatty acids and obesity in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(4):621–625. [doi:10.1007/s10096-017-3143-0](https://doi.org/10.1007/s10096-017-3143-0).
- **Naidu A.S.**, Bidlack W.R., Clemens R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB) *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 1999;38:13–126. [doi:10.1080/10408699991279187](https://doi.org/10.1080/10408699991279187).
- **Nishiyama K**, Mukai T. Adhesion of *Lactobacillus* to Intestinal Mucin. *Methods Mol Biol*. 2019;1887:159–166. [doi:10.1007/978-1-4939-8907-2\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8907-2_14)
- **Noel G**, Baetz NW, Staab JF, et al. A primary human macrophage-enteroid co-culture model to investigate mucosal gut physiology and host-pathogen interactions [published correction appears in *Sci Rep*. 2017 May 03;7:46790]. *Sci Rep*. 2017;7:45270. Published 2017 Mar 27. [doi:10.1038/srep45270](https://doi.org/10.1038/srep45270).
- **Noel G**, Baetz NW, Staab JF, et al. A primary human macrophage-enteroid co-culture model to investigate mucosal gut physiology and host-pathogen interactions [published correction appears in *Sci Rep*. 2017 May 03;7:46790]. *Sci Rep*. 2017;7:45270. Published 2017 Mar 27. [doi:10.1038/srep45270](https://doi.org/10.1038/srep45270)

- **Ohland CL**, Macnaughton WK. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;298(6):G807–G819. [doi:10.1152/ajpgi.00243.2009](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00243.2009)
- **Okumura R**, Takeda K. Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers. *Inflamm Regen*. 2018 Apr 2;38:5. [doi: 10.1186/s41232-018-0063-z](https://doi.org/10.1186/s41232-018-0063-z).
- **Ostad SN**, Salarian AA, Ghahramani MH, Fazeli MR, Samadi N, Jamalifar H. Live and heat-inactivated lactobacilli from feces inhibit *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* adherence to CaCo-2 cells. *Folia Microbiol (Praha)*. 2009;54(2):157–160. [doi:10.1007/s12223-009-0024-7](https://doi.org/10.1007/s12223-009-0024-7)
- Pelletier C, Bouley C, Cayuela C, Bouttier S, Bourlioux P, Bellon-Fontaine MN. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(5):1725–1731
- **Peluso I**, Fina D, Caruso R, et al. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 suppresses human T-cell proliferation. *Infect Immun*. 2007;75(4):1730–1737. [doi:10.1128/IAI.01172-06](https://doi.org/10.1128/IAI.01172-06)
- **Petrova MI**, Imholz NC, Verhoeven TL, et al. Lectin-Like Molecules of *Lactobacillus rhamnosus* GG Inhibit Pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* Biofilm Formation. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161337. Published 2016 Aug 18. [doi:10.1371/journal.pone.0161337](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161337)
- **Pickard JM**, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev*. 2017;279(1):70–89. [doi:10.1111/imr.12567](https://doi.org/10.1111/imr.12567)

- **Polak-Berecka M**, Waśko A, Paduch R, Skrzypek T, Sroka-Bartnicka A. The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2014;106(4):751–762. [doi:10.1007/s10482-014-0245-x](https://doi.org/10.1007/s10482-014-0245-x)
- **Quinteiro-Filho WM**, Brisbin JT, Hodgins DC, Sharif S. *Lactobacillus* and *Lactobacillus* cell-free culture supernatants modulate chicken macrophage activities. *Res Vet Sci*. 2015;103:170–175. [doi:10.1016/j.rvsc.2015.10.005](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.10.005)
- **Quinto E.J.**, Jiménez P., Caro I., Tejero J., Mateo J., Girbés T. Probiotic lactic acid bacteria: A review. *Food Nutr. Sci*. 2014;5:1765–1775. [doi:10.4236/fns.2014.518190](https://doi.org/10.4236/fns.2014.518190).
- **Reale M**, Boscolo P, Bellante V, et al. Daily intake of *Lactobacillus casei* Shirota increases natural killer cell activity in smokers. *Br J Nutr*. 2012;108(2):308–314. [doi:10.1017/S0007114511005630](https://doi.org/10.1017/S0007114511005630)
- **Reid G**, Burton J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect*. 2002 Mar;4(3):319-24. [doi: 10.1016/s1286-4579\(02\)01544-7](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01544-7).
- **Ringø E**, Hoseinifar SH, Ghosh K, Doan HV, Beck BR, Song SK. Lactic Acid Bacteria in Finfish-An Update. *Front Microbiol*. 2018;9:1818. Published 2018 Aug 10. [doi:10.3389/fmicb.2018.01818](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01818)
- **Rinne M**, Kalliomaki M, Arvilommi H, Salminen S, Isolauri E. Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. *J Pediatr*. 2005;147(2):186–191. [doi:10.1016/j.jpeds.2005.03.053](https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.03.053)

- **Ritchie ML**, Romanuk TN. A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. *PLoS One*. 2012;7(4):e34938. [doi:10.1371/journal.pone.0034938](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034938)
- **Rondanelli M**, Faliva MA, Perna S, Giacosa A, Peroni G, Castellazzi AM. Using probiotics in clinical practice: Where are we now? A review of existing meta-analyses. *Gut Microbes*. 2017;8(6):521–543. [doi:10.1080/19490976.2017.1345414](https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1345414)
- **Rositsa Tropcheva**, Ralitsa Georgieva & Svetla Danova (2011) Adhesion Ability of Lactobacillus plantarum AC131, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25:sup1, 121-124, [doi: 10.5504/BBEQ.2011.0123](https://doi.org/10.5504/BBEQ.2011.0123)
- **Rossoni RD**, de Barros PP, de Alvarenga JA, et al. Antifungal activity of clinical Lactobacillus strains against Candida albicans biofilms: identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. *Biofouling*. 2018;34(2):212–225. [doi:10.1080/08927014.2018.1425402](https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1425402)
- **Salim SY**, Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Jan;17(1):362-81. [doi: 10.1002/ibd.21403](https://doi.org/10.1002/ibd.21403).
- **Sánchez B**, Delgado S, Blanco-Míguez A, Lourenço A, Gueimonde M, Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(1):10.1002/mnfr.201600240. [doi:10.1002/mnfr.201600240](https://doi.org/10.1002/mnfr.201600240).
- **Sánchez B**, Urdaci MC, Margolles A. Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions. *Microbiology*. 2010;156(Pt 11):3232–3242. [doi:10.1099/mic.0.044057-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.044057-0)

- **Sanders ME**, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic [published correction appears in *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Aug 9;:]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(10):605–616. [doi:10.1038/s41575-019-0173-3](https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3).
- **Shim YH**, Lee SJ, Lee JW. Antimicrobial activity of lactobacillus strains against uropathogens. *Pediatr Int*. 2016;58(10):1009–1013. [doi:10.1111/ped.12949](https://doi.org/10.1111/ped.12949)
- **Singh VP**, Sharma J, Babu S, Rizwanulla, Singla A. Role of probiotics in health and disease: a review. *J Pak Med Assoc*. 2013 Feb;63(2):253-7.
- **Stewart CJ**, Ajami NJ, O'Brien JL, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature*. 2018;562(7728):583–588. [doi:10.1038/s41586-018-0617-x](https://doi.org/10.1038/s41586-018-0617-x).
- **Suez J**, Zmora N, Segal E, Elinav E. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nat Med*. 2019 May;25(5):716-729. [doi: 10.1038/s41591-019-0439-x](https://doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x).
- **Sun J**, Shi YH, Le GW, Ma XY. Distinct immune response induced by peptidoglycan derived from *Lactobacillus* sp. *World J Gastroenterol*. 2005;11(40):6330–6337. [doi:10.3748/wjg.v11.i40.6330](https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i40.6330).
- **Sunanliganon C**, Thong-Ngam D, Tumwasorn S, Klaikeaw N. *Lactobacillus plantarum* B7 inhibits *Helicobacter pylori* growth and attenuates gastric inflammation. *World J Gastroenterol*. 2012 May 28;18(20):2472-80. [doi: 10.3748/wjg.v18.i20.2472](https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i20.2472).
- **Suzuki S**, Yokota K, Igimi S, Kajikawa A. Comparative analysis of immunological properties of S-layer proteins isolated from *Lactobacillus* strains. *Microbiology*. 2019;165(2):188–196. [doi:10.1099/mic.0.000766](https://doi.org/10.1099/mic.0.000766).

- **Szachta P**, Ignyś I, Cichy W. An evaluation of the ability of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG to eliminate the gastrointestinal carrier state of vancomycin-resistant enterococci in colonized children. *J Clin Gastroenterol*. 2011;45(10):872–877. [doi:10.1097/MCG.0b013e318227439f](https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e318227439f)
- **Taverniti V**, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr*. 2011;6(3):261–274. [doi:10.1007/s12263-011-0218-x](https://doi.org/10.1007/s12263-011-0218-x).
- **Thaiss CA**, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature*. 2016 Jul 7;535(7610):65-74. [doi: 10.1038/nature18847](https://doi.org/10.1038/nature18847).
- **Thangavel G**, Thiruvengadam S. Microorganisms Isolated from Stored Meat in India, with Potential Antimicrobial Activity against Food Pathogens. *Curr Pharm Biotechnol*. 2019;20(5):401-409. [doi:10.2174/1389201020666190314125534](https://doi.org/10.2174/1389201020666190314125534).
- **Tonucci LB**, Olbrich Dos Santos KM, Licursi de Oliveira L, Rocha Ribeiro SM, Duarte Martino HS. Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clin Nutr*. 2017;36(1):85–92. [doi:10.1016/j.clnu.2015.11.011](https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.11.011)
- **Trapezar M**, Goropevsek A, Gorenjak M, Gradisnik L, Slak Rupnik M. A co-culture model of the developing small intestine offers new insight in the early immunomodulation of enterocytes and macrophages by *Lactobacillus* spp. through STAT1 and NF-κB p65 translocation. *PLoS One*. 2014; 9(1):e86297. [doi:10.1371/journal.pone.0086297](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086297).
- **Tuo Y**, Song X, Song Y, et al. Screening probiotics from *Lactobacillus* strains according to their abilities to inhibit pathogen adhesion and induction of pro-inflammatory cytokine IL-8. *J Dairy Sci*. 2018;101(6):4822–4829. [doi:10.3168/jds.2017-13654](https://doi.org/10.3168/jds.2017-13654)
- **Tuo Y**, Yu H, Ai L, Wu Z, Guo B, Chen W. Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *J Dairy Sci*. 2013 Jul;96(7):4252-7. [doi:10.3168/jds.2013-6547](https://doi.org/10.3168/jds.2013-6547)

- **Tuson HH**, Weibel DB. Bacteria-surface interactions. *Soft Matter*. 2013 May 14;9(18):4368-4380. [doi: 10.1039/C3SM27705D](https://doi.org/10.1039/C3SM27705D).
- **Vadillo-Rodríguez V**, Busscher HJ, Norde W, de Vries J, van der Mei HC. Dynamic cell surface hydrophobicity of *Lactobacillus* strains with and without surface layer proteins. *J Bacteriol*. 2004 Oct;186(19):6647-50. [doi: 10.1128/JB.186.19.6647-6650.2004](https://doi.org/10.1128/JB.186.19.6647-6650.2004).
- **Vilen H**, Hynönen U, Badelt-Lichtblau H, et al. Surface location of individual residues of SlpA provides insight into the *Lactobacillus brevis* S-layer. *J Bacteriol*. 2009;191(10):3339–3349. [doi:10.1128/JB.01782-08](https://doi.org/10.1128/JB.01782-08)
- **Walsham AD**, MacKenzie DA, Cook V, et al. *Lactobacillus reuteri* Inhibition of Enteropathogenic *Escherichia coli* Adherence to Human Intestinal Epithelium. *Front Microbiol*. 2016;7:244. Published 2016 Mar 1. [doi:10.3389/fmicb.2016.00244](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00244)
- **Wang R**, Jiang L, Zhang M, et al. The Adhesion of *Lactobacillus salivarius* REN to a Human Intestinal Epithelial Cell Line Requires S-layer Proteins. *Sci Rep*. 2017;7:44029. Published 2017 Mar 10. [doi:10.1038/srep44029](https://doi.org/10.1038/srep44029)
- **Wang S**, Ng LH, Chow WL, Lee YK. Infant intestinal *Enterococcus faecalis* down-regulates inflammatory responses in human intestinal cell lines. *World J Gastroenterol*. 2008;14(7):1067–1076. [doi:10.3748/wjg.14.1067](https://doi.org/10.3748/wjg.14.1067)
- **West CE**. Probiotics for allergy prevention. *Benef Microbes*. 2016;7(2):171–179. [doi:10.3920/BM2015.0073](https://doi.org/10.3920/BM2015.0073) (NO ESTA DISPONIBLE)

- **Zoumpopoulou G**, Tsakalidou E, Dewulf J, Pot B, Grangette C. Differential crosstalk between epithelial cells, dendritic cells and bacteria in a co-culture model. *Int J Food Microbiol.* 2009;131(1):40–51. [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.037](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.037)
- **Zúñiga M.**, Pardo I., Ferrer S. An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 1993;18:31–42. [doi: 10.1016/0168-1605\(93\)90005-2.](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90005-2)

## 13. ANEXOS

### ❖ Medios de cultivo para bacterias.

- Medio de cultivo MRS caldo.

Difco™ *Lactobacillus* MRS caldo (1L)

<b>Proteasa peptona N.3</b>	<b>10.0g</b>
<b>Extracto de carne</b>	<b>10.0g</b>
<b>Extracto de levadura</b>	<b>5.0g</b>
<b>Dextrosa</b>	<b>20.0g</b>
<b>Polisorbato 80</b>	<b>1.0g</b>
<b>Citrato de amonio</b>	<b>2.0g</b>
<b>Acetato de sodio</b>	<b>5.0g</b>
<b>Sulfato de magnesio</b>	<b>0.1g</b>
<b>Sulfato de manganeso</b>	<b>0.005g</b>
<b>Fosfato dipotásico</b>	<b>2.0g</b>

Suspender 70g del polvo en 1L de agua destilada y disolver completamente. Ajustar el pH a 5.2 posteriormente esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

- **Medio de cultivo BHI caldo (1L).**

<b>Infusión de cerebro de ternera</b>	<b>200.0g</b>
<b>Infusión de corazón</b>	<b>250.0g</b>
<b>Peptona</b>	<b>10.0g</b>
<b>Cloruro de sodio</b>	<b>5.0g</b>
<b>Glucosa</b>	<b>2.0g</b>
<b>Fosfato disódico</b>	<b>2.5g</b>

Disolver 52g del polvo en 1 litro de agua destilada. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición hasta su disolución total. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

- **Medio de cultivo soya-tripticaseina agar.**

Cloruro de sodio	10.0g
Dextrosa	10.0g
Fosfato dipotásico	5.0g
Peptona de casina	20.0g
Peptona de soya	1.0g
Agar	15.0g

Se rehidrataron 40g del medio en 1 litro de agua destilada para disolver por completo el medio. En un matraz se esterilizo el medio por autoclave a 121 °C por 15 minutos. Posterior a esto, se vertió el medio en las cajas Petri (15 mL aproximadamente).

❖ **Medio para células.**

- **Medio DMEM (1X) + GlutaMAX™-I / 5% SFB.**

<b>D-Glucosa</b>	<b>4.5g</b>
<b>Piruvato de sodio</b>	<b>110.0mg</b>

Colocar en tubos Falcon de 50 ml estériles en la campana de flujo laminar.

❖ **Soluciones.**

- **Solución Salina Fisiológica (SSF) (1L).**

<b>NaCl</b>	<b>9.0g</b>
-------------	-------------

Pesar 9g de NaCl y disolver en 1 litro de agua destilada, posteriormente se ajusta el pH a 7.2 y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

- **Buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4 (1L).**

NaCl	8.0g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.16g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2g

Pesar 8.0g de NaCl, 1.16g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> para disolverlos en 1 litro de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.4 con ayuda de un potenciómetro. Después se esterilizo en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

- **Tinción de Giemsa.**

<b>Giemsa</b>	<b>0.35g</b>
<b>Metanol 50%</b>	<b>100ml</b>
<b>Glicerina 50%</b>	<b>100ml</b>

Agregar a los 0.35 g de Giemsa, 100ml de metanol y glicerina.

- **Fijación de las preparaciones.**

Se lavan los discos donde se formó la monocapa celular con solución PBS 3 veces. Posteriormente se fijan con metanol grado reactivo por 10 minutos y se tiñen con colorante de Giemsa con una dilución de 1:20 con agua destilada. Fijamos los discos en un porta objetos con ayuda de resina Bálamo de Canadá.