



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

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

**Evaluación del efecto de microvesículas (MVs) de  
Bacterias Ácido Lácticas (BAL), en cultivos de  
*Salmonella typhimurium* ATCC 154 y *Escherichia  
coli* de campo**

**PRESENTA**

**Cristal Dafne Lonngi Sosa**

**TESIS**

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

**ASESORA**

**Dra. Cynthia González Ruiz**

**Coasesora**

**Dra. Marisela Leal Hernández**

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2022**



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.

## *Agradecimientos*

La presente investigación llevó consigo muchas dificultades y adversidades, pero a pesar de ellas la Dra. Cynthia González Ruiz siempre estuvo dispuesta a ayudarme a resolver los problemas proactivamente; así mismo se volvió mi modelo a seguir intelectualmente, por lo que mi gratitud hacia ella es difícil de expresar en simples palabras.

A mi Coasesora, la Dra. Marisela Leal Hernández, quien dio las bases para realizar este proyecto al brindarme las cepas enteropatógenas.

Agradezco a las personas que me brindaron ayuda con los equipos que fueron necesarios para la realización de este proyecto. Al Dr. Roberto Díaz Torres y a la Dra. Patricia Ramírez Noguera del laboratorio 8 por su disposición al prestarnos la ultracentrífuga.

Al Dr. Abraham Méndez Albores y a todo el equipo del laboratorio 14, por su paciencia, accesibilidad y por todas las veces que nos prestó la centrífuga.

Al Dr. Alejandro Vargas Ruíz y a su equipo, por proporcionarnos su equipo y un espacio en su laboratorio cuando lo necesitamos. Al Dr. Gerardo García Tovar y a todo el equipo del laboratorio 4, por brindar su apoyo incondicional.

Retribuyo infinitamente a la Dra. Mireya de la Garza Amaya del laboratorio de Biología Celular por todo el apoyo brindado, a la Bióloga María de Lourdes Rojas Morales del laboratorio de Microscopía Avanzada por su paciencia y asistencia en el proyecto. Así como a la Dra. Christian Ávalos Gómez y a sus compañeros, por prestarnos sus instalaciones y equipo, en el momento en el que parecía que el proyecto tendría que detenerse.

A Jonathan Barrera García y a Viridiana Gutiérrez Espinoza, al ser quienes me llevaron de la mano desde el Servicio Social, hasta que fui capaz de valerme por mí misma, gracias por enseñarme todo lo que sé, no solo se convirtieron en grandes amigos para mí, sino también en mis “hermanos mayores”.

A Arturo Hernández Palacios y a Héctor Longines Espinosa, quienes me apoyaron y fungían como alivio cómico, haciendo las jornadas de trabajo más livianas.

A mi madre, el pilar fundamental de mi vida, a quien no tengo palabras para expresarle su apoyo incondicional, porque gracias a ti puede lograr una de mis metas para que ambas tengamos un futuro brillante. Y a mi padre, quien a pesar de la distancia no ha dejado de apoyarme.

A mi pareja Elihu David Villegas Mondragón, tu amor, apoyo y palabras son lo que me mantuvieron fuerte, porque este pequeño logro es uno de muchos que tendremos juntos, por un futuro espléndido a tu lado lleno de ciencia.

Investigación realizada gracias al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IT302018** y al **Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación (PIAPI) PIAPI1639**. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida

## ***Dedicatorias***



Le dedico este trabajo y mis futuros éxitos a Sasha y a Jengibre, quienes estuvieron a mi lado en todo momento y aunque hoy ya no lo estén, siempre vivirán en mi corazón.

## Contenido

Resumen.....	5
I. Introducción.....	6
1.1 Bacterias Gram positivas.....	6
1.1.1 Estructuras externas y Pared celular.....	6
1.1.2 Membrana celular.....	8
1.1.3 Estructuras citoplasmáticas.....	8
1.1.4 Ribosomas.....	8
1.2 Bacterias ácido lácticas (BAL).....	8
1.2.1 O-acetilación de cadenas de glicano.....	9
1.2.2 N-Deacetilación de las cadenas de glicano.....	9
1.2.3 Amidación de aminoácidos.....	9
1.2.4 Degradación por peptidoglicano hidrolasas (PGH).....	10
1.3 Usos de las BAL.....	10
1.3.1 BAL en la biopreservación de alimentos.....	10
1.3.2 BAL como probióticos.....	11
1.4 Microvesículas (MVs) ¿Qué son y cómo se forman?.....	13
1.4.1 Contenido de las MVs.....	14
1.4.2 Factores de virulencia que arrastran las MVs.....	15
1.4.3 Lípidos.....	17
1.4.4 Ácidos nucleicos.....	17
1.4.5 Rol de las MVs en la comunicación inter-bacteriana.....	17
1.5 Enfermedades gastrointestinales.....	18
1.5.1 Colibacilosis.....	18
1.5.2 Salmonelosis.....	20
1.6 Antecedentes.....	21
II. Justificación.....	22
III. Objetivos.....	22
IV. Hipótesis.....	22
V. Material y metodología experimental.....	23
5.1 Microorganismos.....	23
5.2 Medios de cultivo de cepas BAL de referencia y de campo.....	23
5.2.1 Medios de cultivo para Bacterias enteropatógenas.....	23
Diagrama 1. Proceso de metodología experimental.....	24

5.3 Sensibilización. ....	24
5.4 Sembrado de cepas: BAL de referencia y de campo. ....	24
5.4.1 Sembrado de cepas Enteropatógenas. ....	25
5.5 Tinción de Gram. ....	25
5.6 Sensibilización de cepa control (Lactobacillus acidophilus ATCC 314) a Salmonella typhimurium ATCC 154 y Escherichia coli de campo. ....	25
5.6.1 Obtención de las Microvesículas (MVs) de Lactobacillus acidophilus ATCC 314. ....	27
5.6.2 Cuantificación de proteína por el método de Bradford. ....	29
5.7 Sensibilización de cepas de campo a partir de la cepa control Lactobacillus acidophilus ATCC 314. ....	29
5.7.1 Preparación del Pool de MVs de BALs de campo. ....	29
5.8 Evaluación de MVs bacterianas mediante microscopía electrónica de transmisión (Tinción negativa). ....	29
5.9 Evaluación de MVs bacterianas mediante SDS-PAGE. ....	30
5.9.1 Prueba de inhibición de difusión en agar semisólido. ....	30
VI. Resultados. ....	33
6.1 Sensibilización de BAL de referencia y de campo. ....	33
6.2 Cuantificación de proteína por el método de Bradford. ....	36
6.3 Microscopía electrónica. ....	37
6.4 Evaluación de MVs bacterianas mediante SDS-PAGE. ....	43
6.4.1 Cepas expuestas a E.coli. ....	43
6.4.2 Cepas expuestas a S. enterica serovar Typhimurium. ....	47
6.4.3 Diferencias entre MVs enfrentadas a E.coli con MVs enfrentadas a S. enterica serovar Typhimurium. ....	51
6.5 Prueba de inhibición de difusión en agar semisólido de cepas enteropatógenas contra MVs de BAL. ....	56
VII. Discusión. ....	63
VIII. Conclusiones. ....	68
IX. Referencias bibliográficas. ....	69

## Resumen

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL), son un amplio grupo de microorganismos utilizados en la elaboración de una gran variedad de productos fermentados destinados al consumo humano (lácteos, vegetales, cárnicos, de panadería, bebidas alcohólicas) y animal (ensilados). Estos microorganismos son mayormente utilizados como probióticos. Un probiótico es un microorganismo vivo que, administrado en cantidades adecuadas, ejerce un efecto benéfico sobre la salud del hospedador. A estos microorganismos les son atribuidas diferentes características como: inmunomodulación, capacidad de reducir el riesgo de infección y muerte de patógenos en el tracto gastrointestinal. Los mecanismos de acción de estas bacterias incluyen segregar sustancias naturales con un amplio espectro de actividad. Todas las bacterias en general, producen MVs en cualquiera de sus etapas de crecimiento. Las MVs, son estructuras esféricas provenientes de la membrana celular, que durante su formación, arrastran una gran cantidad de compuestos, dentro de los que se incluyen: ácidos nucleicos, toxinas, lipoproteínas, enzimas y bacteriocinas, las cuales desarrollan importantes roles en la fisiología microbiana y patogénesis. Las MVs, han demostrado secretar factores de virulencia mucho más potentes, en comparación con la bacteria completa de origen. En el presente estudio se utilizaron 4 cepas de BAL de campo aisladas del tracto gastrointestinal de *Rattus norvegicus* de vida libre (*Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. plantarum* de colon y *L. plantarum* de recto), de las cuales se obtuvieron MVs, posteriormente se les realizó una tinción negativa para visualizar dichas estructuras, mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), así como también se realizaron corrimientos electroforéticos (SDS-PAGE al 12%), para establecer los perfiles de proteínas producidas por cada cepa. Además, se evaluó la actividad inhibitoria en pruebas de difusión en agar, utilizando 3 diferentes concentraciones de las MVs. Los resultados de la MET demostraron, que las 4 cepas de campo son capaces de producir MVs, mientras que los corrimientos electroforéticos, evidenciaron que estas arrastran componentes de la pared celular, así como posibles transportadores ABC relacionados con la exportación de bacteriocinas. Por último, las pruebas de inhibición demostraron que las MVs de BAL, son capaces de formar un halo de inhibición, el cual está relacionado con la cantidad de MVs administradas. Las MVs de las cepas evaluadas, fueron más eficientes en su capacidad de inhibir, cuando se evaluaron solas.

# I. Introducción.

## 1.1 Bacterias Gram positivas.

Las bacterias son microorganismos procariotas, que poseen un tamaño entre 0.5 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro. Pueden clasificarse con base a diferentes criterios, por ejemplo: estructura celular, metabolismo o determinados componentes como ADN. La identificación de bacterias en el laboratorio es de gran relevancia en la medicina en general. Por ello, la necesidad de identificar a los patógenos en humanos ha dado lugar a un potente desarrollo de técnicas para la identificación de bacterias. La técnica de tinción de pared celular de Gram, desarrollada por Hans Christian Gram, es empleada como primer paso en la distinción de diferentes especies de bacterias; la cual consiste en pigmentar con tintes específicos diversas muestras bacterianas, considerándose una Gram positiva, si se torna de un color violeta, las cuales poseen una pared más gruesa de diversos componentes proteicos o una Gram negativa, si se torna de color rojo al disponer de una pared más delgada y una composición diferente (Maroley, 2014).

### 1.1.2 Estructuras externas y Pared celular.

La pared celular de una bacteria Gram positiva, consiste en un sáculo de peptidoglicano que rodea la membrana citoplásmica. La pared celular tiene múltiples funciones durante el crecimiento bacteriano, incluyendo mantener la integridad celular y forma, así como la resistencia a la presión interna. Además, debe permanecer flexible para el remodelamiento, requerido en la división y crecimiento celular (Chapot, 2014).

Dicha estructura, está formada por una única capa homogénea de peptidoglicano o mureína (PG), situada por fuera de la membrana celular. En la microscopía electrónica, en bacterias Gram negativas, se observa un espacio entre la membrana plasmática y la pared celular, dicho espacio se denomina espacio periplásmico y está ocupado por un gel; el periplasma. Es posible que las bacterias Gram positivas, no tengan un espacio periplásmico visible. Sin embargo, es aquí donde secretan enzimas denominadas exoenzimas, así como también contienen enzimas que participan en la síntesis de peptidoglicano. El peptidoglicano, es un elemento clave para la estructura, replicación y supervivencia de la célula, en condiciones normalmente hostiles en las que proliferan las bacterias (Murray, 2013).

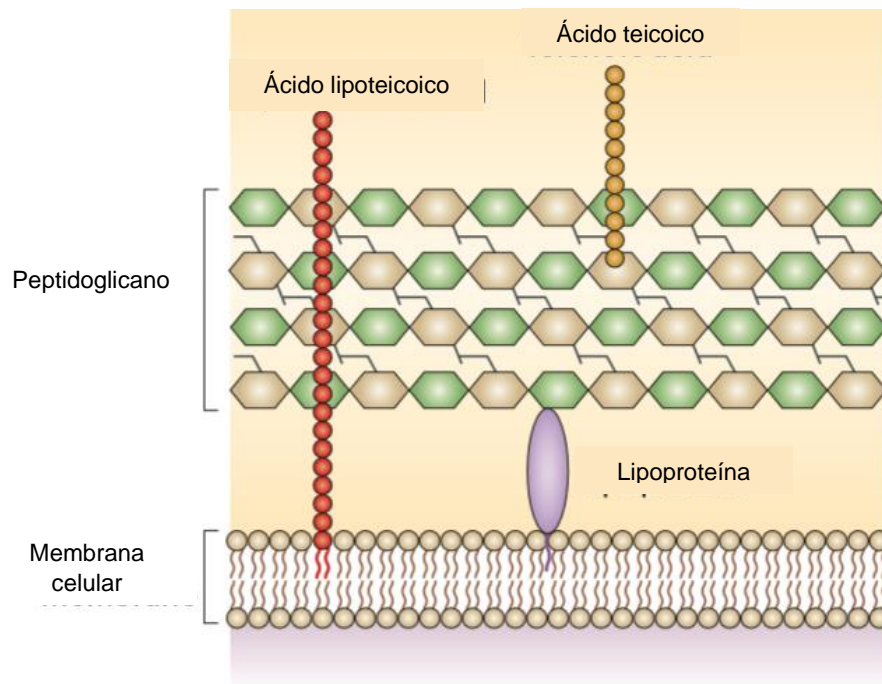
El PG, es un gran polímero compuesto por muchas subunidades idénticas. El esqueleto de este polímero está formado por residuos alternantes de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, unidos entre sí por puentes peptídicos en la posición  $\beta$ 1-4. Existen diferencias en el espesor de esta capa de PG. Las bacterias Gram positivas, tienen una capa gruesa de 0.02 a 0.06  $\mu\text{m}$ , en forma de capas múltiples, mientras que las bacterias Gram negativas y las ácido alcohol resistentes, tienen una capa fina de 0.01  $\mu\text{m}$  aproximadamente (Pírez, 2006).

La gruesa pared de PG, en bacterias Gram positivas contiene también una gran cantidad de ácidos teicoicos (TAs) y ácidos lipoteicoicos (LTA). Los TAs, son polímeros hidrosolubles de fosfatos de poliol que están unidos al peptidoglicano, mediante enlaces



covalentes y son fundamentales para la viabilidad celular (Murray, 2013), como lo muestra la **Ilustración 1**.

### Ilustración 1. Estructura celular de una bacteria Gram positiva



Se aprecia la gruesa capa de Peptidoglicano conformada por ácidos teicoicos, los cuales se encuentran anclados a esta por medio de enlaces covalentes; mientras que los ácidos lipoteicoicos se unen por medio de una lipoproteína a la membrana celular, la cual está formada por una bicapa lipídica de fosfolípidos.

(Brown, 2015)

Estos, proporcionan un depósito de iones cerca de la pared celular, que pueden ser necesarios para que las enzimas funcionen correctamente; además desempeñan otras funciones como: controlar las autolisinas, mantener la morfología de las células bacterianas, reconocer los bacteriófagos, interactuar con el sistema inmune del huésped y participar en la colonización del huésped (Chapot, 2014).

Por otro lado, los LTA, poseen un ácido graso y se encuentran unidos a la membrana citoplásmica. Estas moléculas, son antígenos de superficie que diferencian los serotipos bacterianos y favorecen la fijación de otras bacterias a receptores específicos, localizados en la superficie de las células de los mamíferos (adherencia). Estos son expulsados hacia el medio circundante y al medio intercelular del organismo hospedador y, aunque débiles, son capaces de desencadenar respuestas inmunitarias del hospedador, semejantes a las de las endotoxinas de las Gram negativa (LPS) (Murray, 2013).

### ***1.1.3 Membrana celular.***

La membrana celular, se encuentra compuesta por una bicapa lipídica formada por fosfolípidos y proteínas, no posee esteroides a diferencia de las eucariotas, con la excepción de *Micoplasmas spp.*, contienen hopanoides, los cuales tienen un papel similar a los esteroides, encargándose de brindar rigidez y estabilidad a la membrana. También se encuentra estabilizada por puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y cationes como el calcio y el magnesio que se combinan con los fosfolípidos cargados negativamente. Insertas en la membrana celular, se encuentran múltiples proteínas transmembranales, que facilitan el transporte de sustancias hidrofílicas, a través de ésta. Como las bacterias no poseen membranas internas, todos los sistemas de fosforilación, oxidación y transporte de electrones (citocromos), para la producción de energía se encuentran a nivel de la membrana celular. La membrana celular cumple la función de barrera osmótica, permeabilidad selectiva y permite el ingreso de nutrientes y salida de desechos, por mecanismos de transporte activo y pasivo. Finalmente, la membrana contiene moléculas receptoras especiales que ayudan a las bacterias a detectar y responder a sustancias químicas del medio externo (Pírez, 2006).

### ***1.1.4 Estructuras citoplasmáticas.***

El citoplasma de la célula bacteriana contiene ADN cromosómico, ARN mensajero (ARNm), ribosomas, proteínas y metabolitos. A diferencia del cromosoma de las células eucariotas, el cromosoma bacteriano se compone de una única molécula circular de doble cadena, que no está contenida en un núcleo, sino en una zona definida conocida como nucleoide. Este cromosoma carece de histonas que mantengan la conformación del ADN y no forma nucleosomas. También puede poseer plásmidos, unas moléculas extracromosómicas circulares más cortas de ADN. Por regla general, no son esenciales para la supervivencia de la célula, pero proporcionan a menudo una ventaja selectiva (Murray, 2013).

### ***1.1.5 Ribosomas.***

Los ribosomas, constan de dos subunidades de 30s y 50s, que forman un ribosoma de 70s. Su función es la síntesis proteica y su cantidad aumenta, cuando la bacteria crece en medios ricos (Murray, 2013). Su alto contenido de sustancias ácidas, los hace sensibles a la tinción con colorantes positivos o básicos, como el cristal violeta y el azul de metileno (Pírez, 2006).

## **1.2 Bacterias ácido lácticas (BAL).**

Las BAL, se clasifican según su morfología en cocos o bacilos, o según el modo de fermentar la glucosa en homofermentativos, dando como resultado solamente la producción de ácido láctico o heterofermentativos los cuales producen además otros compuestos como acetato, CO<sub>2</sub> o succinato. Son bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas, catalasa negativas, no esporuladas, ácido tolerantes, con un pH óptimo de crecimiento entre 5.5 a

6.2 y estrictamente fermentativas, presentes tanto en la naturaleza, como en el intestino humano y animal. Las BAL son un amplio grupo de microorganismos, utilizados en la elaboración de una gran variedad de productos fermentados, destinados al consumo humano (lácteos, vegetales, cárnicos, de panadería, bebidas alcohólicas) y animal (ensilados). Estos microorganismos son mayormente utilizados como probióticos. Al ser bacterias utilizadas en la alimentación, tienen un *status* de GRAS (Generally Regarded As Safe) (Lucena, 2016).

Aunque las estructuras generales y las vías de biosíntesis se conservan entre las bacterias Gram positivas, los estudios han revelado que las paredes celulares de las BAL demuestran propiedades únicas (Chapot, 2014).

En las BAL, la estructura básica del PG está parcialmente modificada: Las cadenas de glicano, sufren N-desacetilación u O-acetilación o los grupos carboxilo libres, de los aminoácidos en las cadenas peptídicas están amidadas. Estas modificaciones, tienen consecuencias funcionales como modular la actividad de las Peptidoglicano hidrolasas (PGH), tanto endógenas como exógenas, en bacterias patógenas, esto les permite escapar del sistema inmune innato del huésped (Vollmer, 2008).

### 1.2.1 O-acetilación de cadenas de glicano.

En muchos patógenos Gram positivos la O- acetilación de ácido N-acetilmurámico (MurNAc) es asociada con la resistencia contra la lisozima. El primer MurNAc O-acetiltransferasa fue nombrado OatA; residuos han sido detectados en BAL, en los siguientes porcentajes: *L. lactis* MG1363 3.2%, *L. casei* BL23 30%, *L. plantarum* NZ7100 39%, *L. rhamnosus* GG 37%. En *L. lactis* los genes OatA está regulado a nivel transcripcional en respuesta al estrés de la envoltura celular, el cual puede ser provocado por una lisozima u otros antimicrobianos dirigidos a la pared celular como la bacitracina, la vancomicina y la plantaricina; la actividad de la OatA aumenta la resistencia de PG a la lisozima, por lo tanto, contrarresta el estrés de la pared celular. En *L. plantarum*, el gen OatA juega un rol antagónico, al modular la actividad de las autolisinas endógenas y no inhibir la actividad de la lisozima (Chapot, 2014).

### 1.2.2 N-Deacetilación de las cadenas de glicano.

La deacetilación ha sido encontrada cerca de un 9% en *L. lactis*, en esta especie protege al peptidoglicano de la hidrólisis por la autolisina AcmA y aumenta la resistencia a la lisozima; no ha sido observada en *L. casei*, *L. rhamnosus* o *L. plantarum* bajo condiciones de laboratorio (Chapot, 2014).

### 1.2.3 Amidación de aminoácidos.

En *L. plantarum*, la amidación es mediada en el citoplasma por aminotransferasas llamadas ASnB1, el cual es codificado por el gen *asnB1*, se ha encontrado que este gen juega un papel esencial, ya que un cultivo mutante con un defecto de amidación el crecimiento y la morfología celular se vieron fuertemente afectados, observándose en forma de filamentos (Chapot, 2014).

#### 1.2.4 Degradación por peptidoglicano hidrolasas (PGH).

Las peptidoglicano hidrolasas (PGH) son enzimas que pueden hidrolizar enlaces específicos en el peptidoglicano de la pared celular. Se necesita un peptidoglicano fuerte para mantener la forma de la célula y para contrastar tanto la alta presión de turgencia como el estrés de la pared celular relacionado con factores ambientales. Al mismo tiempo, el crecimiento y la separación de las células bacterianas también requieren un alto grado de elasticidad. Estas dos demandas opuestas requieren la acción coordinada y equilibrada de las enzimas de degradación. La pérdida de este equilibrio puede causar detención del crecimiento y lisis celular. Dicho equilibrio se logra principalmente mediante la regulación de la actividad de las enzimas autolíticas potencialmente letales que son las PGH (Chapot, 2014).

### 1.3 Usos de las BAL.

#### 1.3.1 BAL en la biopreservación de alimentos.

Diferentes estudios han utilizado a las BAL en la biopreservación de alimentos, haciendo uso de sus propiedades antibacterianas, atribuidas a los productos finales de su metabolismo. La utilización de los carbohidratos disponibles en el alimento y la reducción del pH a causa de los ácidos orgánicos producidos, son el principal mecanismo de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas (Milena, 2009). No obstante, estas bacterias también producen otras sustancias antagonistas dentro de las cuales, se destacan el ácido acético, ácido láctico, diacetilo, peróxido de hidrógeno, acetaldehído, compuestos no proteicos de bajo peso molecular y las bacteriocinas (Londoño, 2015).

Los ácidos orgánicos, contribuyen al desarrollo de sabor, aroma y textura de los alimentos, pero también a su estabilidad mediante la inhibición de microorganismos alterantes. Estas moléculas pueden ejercer dos efectos: por un lado, interfieren con funciones celulares, como puede ser la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa. Por otro lado, la disociación de los ácidos orgánicos provoca el incremento de protones en el interior celular. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma, se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones se detiene provocando el descenso del pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad (Milena, 2009).

En el caso de los compuestos no proteicos, estos los producen las BAL durante su crecimiento, entre ellos se encuentra la reuterina. Esta sustancia a diferencia de las bacteriocinas y el peróxido, es producida por *Latobacillus reuteri*. Su actividad antimicrobiana es extraordinariamente amplia, afectando a bacterias Gram positivas, Gram negativas, levaduras, mohos, y protozoos. La reuterina, se forma durante la utilización anaerobia del glicerol e inhibe la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa involucrada en la síntesis del DNA, lo que determina su amplio espectro antimicrobiano (Milena, 2009).

El crecimiento de BAL en medios aerobios, conduce a la formación de varios metabolitos del oxígeno como: peróxido de hidrógeno, aniones super óxido y radicales libres, que poseen un efecto bacteriostático y bactericida frente a microorganismos tolerantes al ácido láctico como no tolerantes al ácido láctico. El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), funciona como un oxidante produciendo radicales libres que atacan los componentes celulares esenciales, lípidos, proteínas y DNA (Milena, 2009).

Las bacteriocinas, son péptidos biológicamente activos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros miembros de la misma especie productora o miembros de distintos géneros bacterianos. En general, el espectro de acción antibacteriano de las bacteriocinas de bacterias Gram positivas, se restringen a este grupo de bacterias. Sin embargo, existen numerosas bacteriocinas con un amplio límite de acción, inhibiendo el crecimiento de especies de bacterias Gram positivas y negativas, hongos patógenos de humanos y virus. Incluso pueden tener actividad contra de diversas células eucariotas, tales como eritrocitos humanos y de bovino.

Las bacteriocinas de bacterias Gram positivas poseen una carga netamente positiva, favoreciendo así su interacción con la carga negativa de los lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias Gram negativas, o con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram positivas, llevando así a cabo su actividad antimicrobiana (López, 2008).

### 1.3.2 BAL como probióticos.

Un probiótico es un microorganismo vivo que administrado en cantidades adecuadas ejerce un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador (FAO/OMS, 2006). La mayor parte de los probióticos para el consumo humano son BAL, residentes habituales del tracto gastrointestinal, que pertenecen fundamentalmente a los géneros *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.*

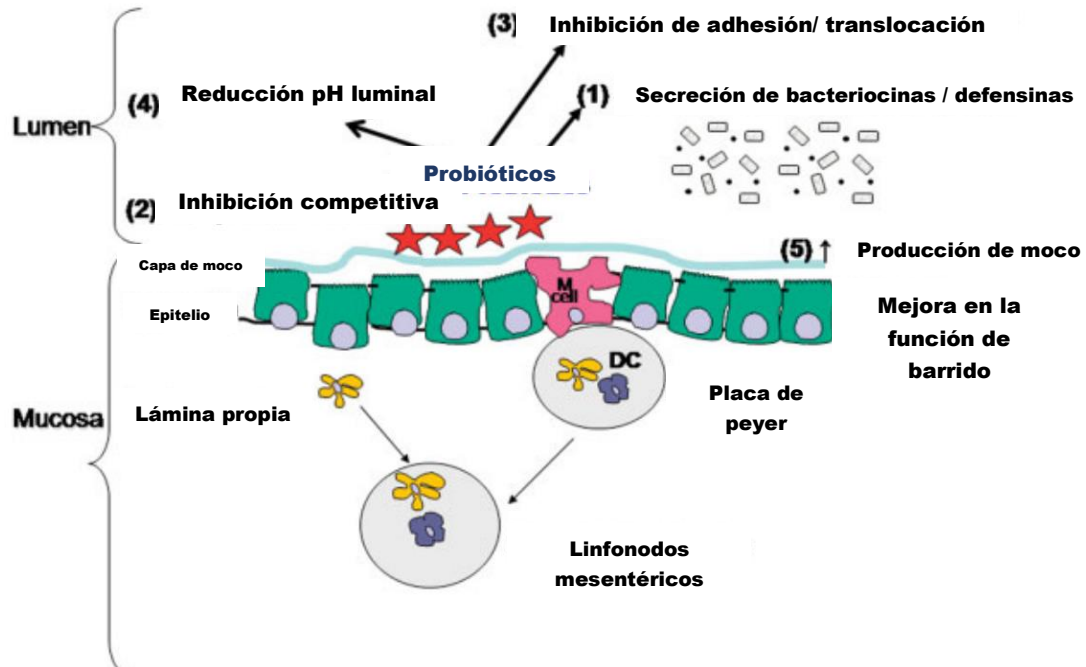
Las especies de *Lactobacillus* que han sido aisladas incluyen: *Lactobacillus acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri* y *L. reuteri*. Dentro de las especies de *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum* y *B. infantis*. Además, se emplean otros géneros como *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Bacillus spp.* y *Saccharomyces spp.*

A estos microorganismos les son atribuidas diferentes características como: inmunomodulación, capacidad de reducir el riesgo de infección, modificación del metabolismo del hospedador, respuesta inflamatoria, muerte de patógenos en el tracto gastrointestinal, absorción de nutrientes, disminución del riesgo de contraer ciertas enfermedades (Lucena, 2016) y aumento en la producción de moco (Hart, 2009).

Pero; ¿cómo logran hacer esto los probióticos? Los mecanismos de acción incluyen la inducción a un pH inferior a 4, inhibición del crecimiento de bacterias patógenas, producción de ácido láctico, disminución de la permeabilidad intestinal, efecto competitivo en otras bacterias patógenas, efectos sobre la inmunidad, además de segregar sustancias

naturales con un amplio espectro de actividad (Rondon, 2015). Tal como lo muestra la **Ilustración 2**.

**Ilustración 2.** Mecanismos de acción de los probióticos



Esquemización del efecto de acción de las BAL en el epitelio intestinal. Dentro de la actividad antimicrobiana de los probióticos encontramos 1) Producción de bacteriocinas 2) Inhibición competitiva 3) Inhibición de la adherencia o translocación bacteriana 4) Reducción del pH luminal y 5) Aumento en la producción de moco que puede mejorar la función de la barrera intestinal

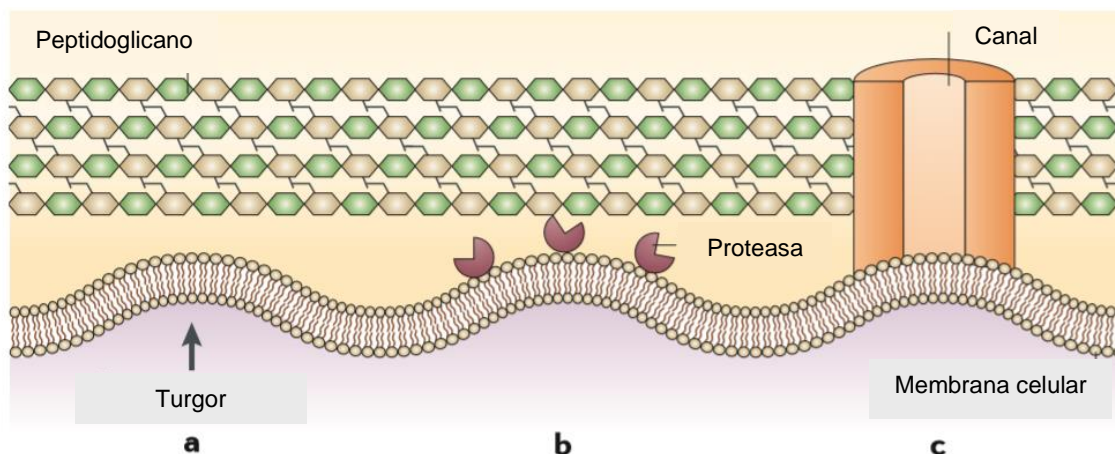
(Hart, A. 2009)

En *L. casei BL23* se encontró la producción de 2 proteínas, la p40 y la p75, a las cuales se les han descrito efectos anti- apoptóticos en las células epiteliales intestinales humanas. Por otro lado, el sobrenadante de *L. rhamnosus GG*, mejoró la resistencia a una infección sistémica por *E. coli* K1, al incrementar la defensa en neonatos, los autores no mencionaron directamente el efecto de las microvesículas (MVs) producidas por la bacteria, pero afirmaron que en un futuro identificarían los componentes activos y estructurales del sobrenadante, para permitir una mejor comprensión sobre la maquinaria subyacente al efecto de los probióticos. Sin embargo, en 2017 y continuando la línea de investigación de *L. casei BL23*, fue posible demostrar que esta cepa produce MVs, las cuales se encuentran en el sobrenadante y acarrean las proteínas p40 y p75 asociadas a su efecto probiótico (Dominguez, 2017)

## 1.4 Microvesículas (MVs) ¿Qué son y cómo se forman?

Las MVs, son estructuras esféricas provenientes de la membrana celular. Estas, como entidades celulares, ayudan a las bacterias a adaptarse a diversos nichos, a competir con otras bacterias para proteger a los miembros de las especies productoras y a desempeñar un papel crucial en la interacción huésped-patógeno (Tasleem, 2017). Están formadas por una bicapa lipídica en forma de esfera, que varían de tamaño, desde 20 nm hasta 500 nm de diámetro. Las hipótesis para la producción de MVs en microorganismos con pared celular, se basan principalmente en datos proteómicos de vesículas aisladas (Kaparakis, 2020). Por lo que surgen tres hipótesis no mutuamente excluyentes en la literatura; tal y como lo muestra la **Ilustración 3**, las MVs pueden ser forzadas a atravesar la pared, por la presión de turgencia, en este caso su liberación puede estar regulada por el tamaño o grosor de los poros de la pared celular. Alternativamente, las enzimas modificadoras de la pared celular liberadas con MVs, pueden facilitar el debilitamiento de la pared para permitir la liberación de estas; tales enzimas se han encontrado en purificaciones tanto de MVs fúngicas como bacterianas. Finalmente, las MVs pueden transitar a través de canales, estas son guiadas por tubulina y/o actina propias de la bacteria, las cual han sido encontradas en muchas preparaciones proteómicas (Brown, 2015)

**Ilustración 3. Formación y liberación de MVs: tres hipótesis no mutuamente excluyentes.**



**Hipótesis de formación de MVs:** **a.** Las MVs son forzadas a pasar a través de la pared por la presión de la turgencia. **b.** Enzimas modificadoras de pared, que facilitan la liberación de Mvs. **c.** Los canales de actina y/o tubulina donde transitan las Mvs.

(Brown, 2015)

Sin embargo, Kaparakis en 2020, menciona que las enzimas modificadoras de la pared celular pueden alterar el grosor de esta, facilitando la liberación de las MVs. Lo anterior se observó, a través del descubrimiento de MVs aisladas de *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis*, las cuales contenían enzimas degradantes de peptidoglicano.

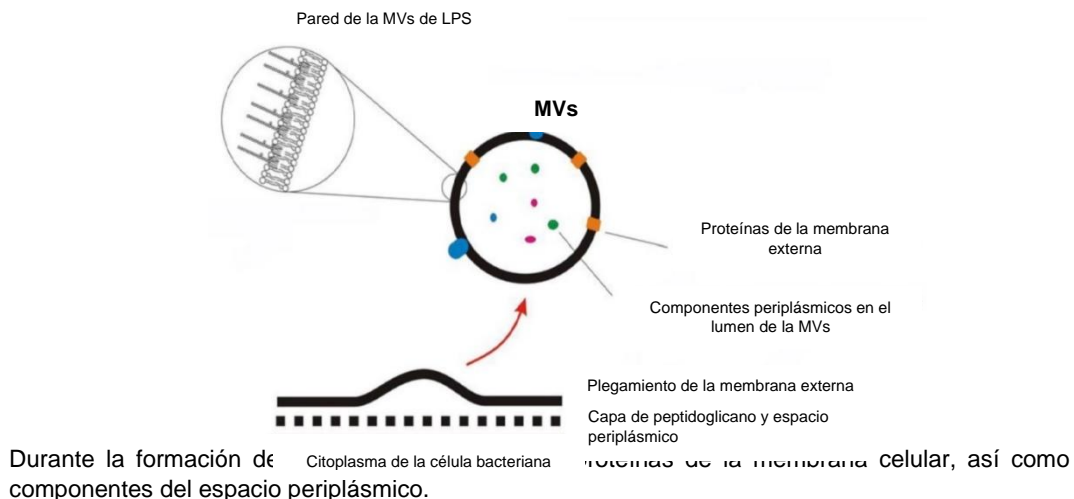
Además, se ha visto que la producción de MVs, se ve aumentada durante condiciones de estrés, sugiriendo que los factores ambientales pueden regular su biogénesis.

### 1.4.1 Contenido de las MVs.

La identificación de la composición de las MVs, es crítica para entender su rol en diferentes procesos biológicos. (Karakakis, 2020). Dichas estructuras, arrastran una gran cantidad de compuestos durante su formación, dentro de los que se incluyen: ácidos nucleicos, toxinas, lipoproteínas, enzimas (Brow, 2015) y bacteriocinas (Dean, et. al, 2020) los cuales desarrollan importantes roles en la fisiología microbiana y patogénesis (Brow, 2015).

La primera identificación de MVs en bacterias Gram positivas, fue en *Staphylococcus aureus*, estas contenían una variedad de proteínas que pueden cumplir funciones biológicas en la comunicación interbacteriana, la resistencia a los antibióticos, factores de virulencia, así como acarreamiento de proteínas patógenas como Beta-lactamasas y regulación de la biogénesis de MVs. Además, este estudio mostró un enriquecimiento de proteínas específicas, en comparación con sus bacterias progenitoras, lo que indica un empaque selectivo de la carga de proteínas y el suministro de proteínas biológicamente activas. Las proteínas que han sido identificadas en las MVs, corresponden principalmente a proteínas citoplasmáticas, extracelulares y asociadas a la membrana (Karakakis, 2020). Tal como lo esquematiza la **Ilustración 4**.

**Ilustración 4.** Componentes que arrastra una MVs durante su formación en una bacteria Gram negativa.



(Yáñez, M. 2015)



### 1.4.2 Factores de virulencia que arrastran las MVs

Los factores de virulencia son parte importante de la carga proteica que es acarreada por las Mvs (Kaparakis, 2020).

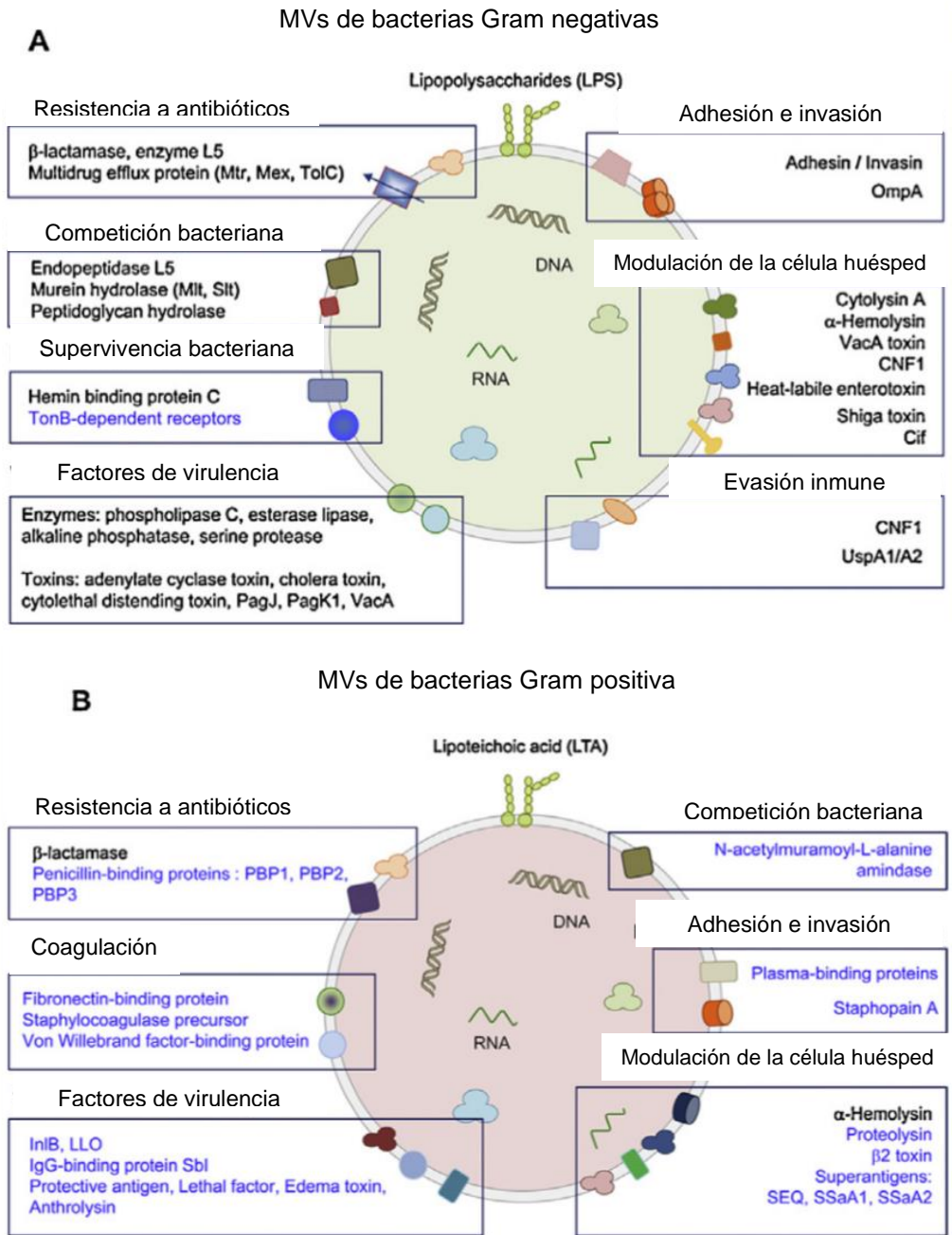
En Gram negativas, las MVs de *Pseudomonas aeruginosa* acarrean  $\beta$ -lactamasa, proteína que media la supervivencia de bacterias vecinas sensibles a los antibióticos. Estudios *in vitro*, demostraron que también contienen factores de adherencia, por ejemplo, en *Moraxella catarrhalis* se identificó la UspA1, en el caso de *Helicobacter pylori*, estas arrastraban BabA, SabA y VacA, mientras que las de *P. aeruginosa* albergaban aminopeptidasa.

Se ha demostrado que las MVs de Gram negativas, ejercen efectos citotóxicos con los factores de virulencia que arrastran como: leucotoxina, adenilato ciclasa-hemolisina y citolisina A. Además, las MVs de *Legionella pneumophila* y *P. aeruginosa* poseen propiedades proteolíticas y lipolíticas. Cabe destacar que las leucotoxinas de estas, son más potentes que las de la bacteria progenitora en su forma soluble. Las MVs acarrean múltiples factores de virulencia, que podrían afectar al huésped de diversas formas, por ejemplo, en *P. aeruginosa* acarrean Cif, fosfatasa alcalina y PclH, factores que pueden inducir citotoxicidad en células del epitelio bronquial en humanos. (Kaparakis, 2020).

Por otra parte, en Gram positivas las MVs de *Staphylococcus aureus* incluyen factores como  $\beta$ -lactamasa, coagulasa, hemolisina, proteína Sbi (la cual tiene una región de unión a IgG) y N-acetilmuramoil-L-alanina-amidasa (Kim, 2015). Mientras que las MVs aisladas de *Bacillus anthracis*, las cuales contienen toxinas biológicamente activas que incluyen el factor de edema, factor letal y antígeno protector. También se han identificado MVs que contienen  $\alpha$ -hemolisina y varias toxinas formadoras de poros en otras bacterias Gram positivas, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*. Por otro lado, las MVs de *Mycobacterium ulcerans*, mostraron un efecto más tóxico que las células no fagocitadas, en relación con la toxina pura. Cabe resaltar, que las MVs no solo sirven como armas de ataque, sino también en roles defensivos; al poder ligarse a los antibióticos o ayudar a seleccionar micronutrientes del entorno extracelular como el hierro (Kaparakis, 2020). Tal como lo representa la **Ilustración 5 B**.

En Gram negativas, se han reportado estudios en donde las MVs ayudan a la supervivencia bacteriana actuando como señuelo. Por ejemplo, en *Moraxella catarrhalis* promovieron la supervivencia de *Haemophilus influenzae*, durante los ataques mediados por el complemento. Por otro lado, pueden actuar como arsenales al matar bacterias competidoras; por ejemplo, las MVs de *P. aeruginosa* eliminan tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas, al degradar el peptidoglicano mediante la administración de mureína hidrolasa. *Lysobacter sp.* secreta MVs que contienen endopeptidasa L5 bacteriolítica, que mata a otras bacterias Gram negativas competidoras (Kim,2015). Estos factores de virulencia se representan en la **Ilustración 5 A**.

**Ilustración 5. Factores de virulencia involucrados en las MVs en bacterias Gram negativas y Gram positivas**



Se muestran los componentes de las MVs en Gram negativas (A) y Gram positivas (B), así como el papel que juegan estos factores en el huésped.

(Kim,2015)

### 1.4.3 Lípidos.

El análisis lipídico de MVs aisladas de *Bacillus anthracis* y *Streptococcus pneumoniae*, mostró un enriquecimiento de ácidos grasos saturados de cadena corta, en relación con las membranas celulares correspondientes. Considerando que estos lípidos, son enriquecidos en los microdominios de membrana, su presencia en los aislamientos de MVs, podría sugerir que su liberación puede ocurrir en estas regiones de la membrana (Kaparakis, 2020).

### 1.4.4 Ácidos nucleicos.

Recientemente se demostró, que las MVs de diferentes especies de Gram positivas contienen DNA y RNA. Sin embargo, existen diferencias en cuanto a la cantidad de ARN en las MVs, en comparación con sus bacterias progenitoras, lo que sugiere que el ARN puede empaquetarse selectivamente. No está claro cómo se empaqueta el DNA, ya que la cantidad de este, en las MVs de *Streptococcus* spp. cambia en diferentes etapas de crecimiento, pudiendo ser regulado por su bacteria progenitora, durante el crecimiento bacteriano (Kaparakis, 2020). Así mismo se encontró, que el DNA de estas MVs contribuía a la formación, integridad y estabilidad del biofilm (Kim,2015).

### 1.4.5 Rol de las MVs en la comunicación inter-bacteriana.

El contenido de las MVs, sugiere que están involucradas en la comunicación interbacteriana y el suministro de moléculas. En las MVs de *S. aureus*, se han identificado proteínas con función bacteriolítica, que facilitan la transferencia de moléculas entre bacterias. Lo anterior, demuestra el importante papel que juegan las MVs en la comunicación interbacteriana y con el medio ambiente que las rodea promoviendo la supervivencia de estas.

Las MVs pueden interactuar con las células eucariotas, incluidas las células epiteliales y las células inmunes ya que estas acarrean patrones moleculares asociados a antígenos (MAMPs).

Las MVs de bacterias Gram negativas, han demostrado la producción de quimiocinas y citocinas. Las MVs de *Helicobacter pylori*, son capaces de modular la proliferación y producción de interleucina 8 (IL-8), por las células de adenocarcinoma gástrico. Investigaciones posteriores, demostraron que la producción de IL-8 dependía de la detección de su peptidoglicano, por el dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD1) intracelular. De manera similar, se encontró que las MVs de *Vibrio cholerae*, inducen la producción de IL-8 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) de una manera dependiente al NOD1. Adicionalmente se encontró que las MVs de *Legionella pneumophila*, inducen la producción de una serie de quimiocinas y citocinas por células epiteliales alveolares humanas. Por último, las MVs derivadas de la bacteria comensal *Bacteroides fragilis*, pueden modificar la expresión de receptores Toll-like 2 (TLR2) y Toll-like 4 (TLR4) en células epiteliales, además de incrementar la expresión de

citocinas antiinflamatorias. Por otro lado, las MVs de *Escherichia coli* probiótico y comensal, demostraron que pueden interactuar con las células epiteliales y activar el NOD1, lo que lleva a la liberación de citocinas proinflamatorias como la interleucina 6 (IL-6) e IL-8. Estos estudios han demostrado el complejo rol de las MVs de las bacterias Gram negativas en la tolerancia inmune, y al mismo tiempo el inicio de la respuesta inmune innata.

Sin embargo, el conocimiento sobre la respuesta inmune innata y adaptativa que inducen las MVs de las Gram positivas, es limitado. Los primeros informes sobre las MVs que activan la vía inmune innata, fue en *S.aureus* al activar el receptor Toll- like 2 (TLR2) y el dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2 (NOD2), lo que lleva a la producción de citocinas proinflamatorias. Por otro lado, en cuanto a la respuesta inmune adaptativa, se reportó que *Clostridium perfringens* producía una alta respuesta de IgG1 en ratones, mientras que *Bacillus anthracis*, produce una robusta respuesta de IgM en ratones cuando se encuentran con las toxinas transportadas en las MVs (Kaparakis, 2020).

En el presente trabajo, utilizaremos MVs de BAL aisladas del tracto gastrointestinal de *Rattus norvegicus*. Lo anterior con la finalidad de evaluar el efecto de las MVs sobre bacterias enteropatógenas, como lo son *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

## 1.5 Enfermedades gastrointestinales.

En medicina humana, las enfermedades gastrointestinales, son uno de los principales problemas de salud pública en México, ya que es la segunda causa de morbilidad a nivel nacional (COFEPRIS y SENASICA, 2017).

Los agentes patógenos involucrados son virus, parásitos y bacterias. La búsqueda e identificación de estos en los laboratorios clínicos, se centra en patógenos clásicos como: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Escherichia spp.*, *Vibrio spp.*, *Campylobacter spp.* y *Yersinia spp.* Estos patógenos, se transmiten, ya sea por vía fecal-oral, o bien por el consumo de agua y alimentos contaminados. (Hernández, 2011).

### 1.5.1 Colibacilosis.

*Escherichia coli* es una bacteria zoonótica, que se encuentra en el tracto gastrointestinal de todos los seres humanos. En la mayoría de los animales de sangre caliente, forma parte de la microbiota normal. Sin embargo, algunas cepas patógenas de *E. coli*, pueden causar enfermedades y provocar infecciones graves a través del consumo de alimentos contaminados por éstas (Colegio oficial de veterinarios de Madrid, 2016).

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: **Enterotoxigénica** (ETEC) cuyo principal mecanismo de patogenicidad es la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas

llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST), **Enterohemorrágica** (EHEC) la cuál produce "shiga-like toxin" o toxina semejante a shiga (STX) con sus dos variantes STX1 y STX2, **Enteroinvasiva** (EIEC) su mecanismo de patogenicidad es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posteriormente multiplicarse, **Enteropatógena** (EPEC) siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad seguida de la destrucción de la microvellosidad, **Enteroadgregativa** (EAEC) la cual cuenta con diversos mecanismos de patogenicidad como lo son, adherencia agregativa, caracterizada por autoaglutinación de las bacterias entre sí, además de aumentar la producción y secreción de moco del epitelio intestinal y por último el patotipo de **Adherencia difusa** (DAEC), se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa (Rodríguez, 2002). En medicina veterinaria los patotipos, ETEC, EPEC y EHEC pueden causar enfermedades en distintas especies animales y se asocian con la presencia de diarreas en neonatos (Umpiérrez, 2018).

En el ámbito de salud pública, en México las enfermedades diarreicas son la segunda causa de morbilidad en niños menores de cinco años. En un estudio que duró cuatro años, en la búsqueda intencionada de patógenos causantes de diarrea aguda en niños y que requirieron hospitalización, se observó que los patotipos de *Escherichia coli*, son los patógenos más frecuentemente identificados con un 30.9% (Ríos, 2019), siendo el patotipo Enterotoxigénico el que se aísla con mayor frecuencia (Rodríguez, 2002).

Vidal (2007), menciona que en países subdesarrollados la letalidad de colibacilosis en humanos es de 20 a 50%. Sin mencionar, el alto porcentaje que presenta esta bacteria a la resistencia a antibióticos, como la ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol y ácido nalidíxico, lo cual supone grandes complicaciones en el tratamiento (Mosquito, 2011).

Sin embargo, esta enfermedad no solo causa repercusiones en el ser humano, el sector ganadero se ve ampliamente afectado; los procesos entéricos son uno de los principales problemas a los que tienen que enfrentarse los productores. El costo de los tratamientos y prevención, aunado a resultados no siempre satisfactorios que terminan con la muerte del animal, hacen que este grupo de enfermedades contribuyan a elevar los costos de producción (Cerviño, 2002).

Por ejemplo, en terneros la incidencia es mayor en animales menores de 3 semanas de vida, aunque animales mayores pueden también sufrir el problema. El riesgo de padecer diarrea se incrementa en animales con un pobre estado sanitario, estresados o hacinados, dándose situaciones en las que un 80 a 100% de los terneros de un rebaño, se ven afectados con mortalidades de hasta el 60% (Cerviño, 2002).

Mientras que, en corderos de una semana de vida, se estima una mortalidad hasta del 50% (Méndez, 2004).

En cerdos, la colibacilosis es una de las primeras causas de mortalidad infecciosa en neonatos, provocando una pérdida anual hasta de un 10%, traducándose en una gran pérdida para el sector pecuario. De estas pérdidas la gran mayoría son provocadas por la debilidad y el incremento en la predisposición de contraer otras enfermedades en el animal

que logra sobrevivir, aunado a el costo de los fármacos y el personal relacionado con el manejo del animal (Lazo, 2010).

### 1.5.2 *Salmonellosis.*

La salmonelosis, es una enfermedad bacteriana de gran importancia, por ser una zoonosis que presenta elevada frecuencia (Gil, 2004); además del impacto socioeconómico que ocasiona, tanto en los países en desarrollo como en los desarrollados. Es una enfermedad transmitida por los alimentos, los cuales causan en su mayor parte brotes que afectan a centenares de personas y, aunque puede ser causada por cualquiera de los casi 2 500 serotipos que existen hasta hoy, los que se aíslan con mayor frecuencia en humanos en México son *Salmonella enterica* serovar Enteritidis y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Gutiérrez, 1999).

Se sabe que este género bacteriano posee gran especificidad de huésped, por ejemplo *S. typhi* afecta solo al hombre, mientras que *S. cholerae suis* infecta solo a porcinos. Sin embargo, *S. enterica* serovar Typhimurium carece de especificidad, por lo que se encuentra frecuentemente asociada a enfermedades en diversos huéspedes (Flores, 2000).

Los animales domésticos, son los mayores reservorios de *Salmonella spp.*, cuya producción de carnes y derivados son los vehículos mayormente reportados en brotes de salmonelosis transmitida por alimentos (Contreras, 2019).

Entre 2003 y 2004, se colectaron muestras de diferentes especies, con la finalidad de hacer los aislamientos respectivos de los posibles patógenos involucrados. Se tomaron 2,893 muestras fecales de pacientes con diarrea, 5,334 muestras de carne de pollo, puerco y res, y 1,882 muestras de intestinos de pollo, cerdo y bovino en rastros. Las dos serovariedades más frecuentes fueron *S. enterica* serovar Typhimurium (22.2%) y *S. enterica* serovar Enteritidis (14.5%). La primera se encontró en los tres tipos de animales y sus carnes crudas, siendo el cerdo el reservorio principal (10.2%), seguido por el bovino (6.8%) y el pollo (4.6%). Mediante la técnica de electroforesis de campos pulsados, las dos cepas aisladas eran genéticamente idénticas o muy relacionadas a aquellas aisladas en las carnes crudas. Cabe mencionar, que durante el periodo de estudio los hospitales participantes, reportaron 26 casos de bacteremia y meningitis, de los cuales destacaron las serovariedades Enteritidis (seis), Typhi (seis) y Typhimurium (siete). En los últimos años, los aislamientos de *Salmonella* presentan un aumento progresivo de la resistencia a los antibióticos. En la serovariedad *S. enterica* serovar Typhimurium, se detectó resistencia a diez antibióticos, tales como ampicilina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, aminoglucósidos, ácido nalidíxico y cefalosporinas de espectro extendido. (Zaidi, 2006).

En el sector pecuario; la mortalidad en bovinos puede ser superior al 50%, especialmente cuando los animales no reciben tratamiento. En contraste, cuando se aplican los tratamientos adecuados, la mortalidad es inferior al 10%. Las hembras gestantes, pueden abortar en consecuencia a la infección. En becerros, los porcentajes de morbilidad y mortalidad varían considerablemente dependiendo de las condiciones de manejo a las que estén sometidos los animales; en explotaciones intensivas puede llegar a producirse

una infección clínica, en más del 75% de los animales y tener una mortalidad que fluctúa entre el 10 y 20%, pero en ocasiones llega hasta el 50 y 60% (Flores, 2000).

El cuadro clínico de salmonelosis en el cerdo se presenta de tres maneras: aguda, subaguda y crónica. En la forma aguda la mayoría de los animales muere durante las primeras 48 horas, mientras que la forma subaguda transcurre con una alta morbilidad, pero con baja mortalidad, finalmente en la forma crónica, los animales que llegan a morir a consecuencia de la infección son pocos, mientras que los animales que se recuperan permanecen como portadores asintomáticos.

En aves, la paratifoidea causada principalmente por *S. enterica* serovar Typhimurium, la mortalidad durante las primeras tres semanas de vida suele ser superior al 60%, sin embargo, las aves que se recuperan continúan excretando por algunas semanas, en ocasiones pueden persistir como excretoras durante toda su vida. Los pavos son sumamente susceptibles a la enfermedad, por lo cual pueden alcanzar una mortalidad de hasta 80% en las primeras semanas de vida (Flores, 2000).

## 1.6 Antecedentes.

Ha casi un siglo, el Doctor Elie Metchnikoff creía que existían bacterias “amigables” presentes en los alimentos fermentados y estos podían contribuir con un papel importante en la salud y el bienestar. De él deriva el primer concepto de probiótico, el cual menciona, que la ingestión de microorganismos benéficos era un excelente mecanismo de control contra el establecimiento de microorganismos patógenos. Sin embargo, solo en las últimas dos décadas, el papel de estas bacterias “amigables” que colonizan el intestino para facilitar el correcto funcionamiento de los sistemas fisiológicos ha sido completamente apreciado (Cross, 2002; Guillian, 2001). Todas las bacterias en general producen MVs en cualquiera de sus etapas de crecimiento. Las primeras MVs fueron reportadas en *Escherichia coli* en la década de 1960 y hasta 1973, se propuso por primera vez la existencia de MVs en hongos (Liu, 2018). Pero fue hasta 1976, que se informó de la producción de MVs en bacterias Gram positivas. Sin embargo, estos hallazgos fueron descartados por darle mayor importancia a las MVs de las Gram negativas. En 2009, la microscopía electrónica mostró por primera vez, la liberación de estas estructuras provenientes de una bacteria Gram positiva, *Staphylococcus aureus*. Esto renovó el interés y pronto surgieron informes de otras especies Gram positivas, incluyendo *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* y *Streptococcus sp.* Pero fue hasta 2012, que se tuvieron los primeros informes de MVs, producidas por bacterias de la microbiota (Kaparakis, 2020).

Sin embargo, en las últimas décadas, las investigaciones de MVs en bacterias Gram negativas ha aumentado sustancialmente, con relación a las investigación de Gram positivas y hongos (Liu, 2018).

En un trabajo realizado por Gutiérrez en 2020, donde fueron empleadas las cepas de *L. acidophilus* proveniente de íleon, *L. pentosus* de ciego, *L. plantarum* de colon y *L. plantarum*, de recto, aisladas del tracto gastrointestinal de *Rattus norvegicus*, se encontró que estas cepas son capaces de producir MVs y estas acarrean BLIS (sustancias parecidas a las bacteriocinas).

## II. Justificación.

Numerosos estudios han demostrado que una microbiota sana, tanto en cantidad como en variedad, tiene un papel importante en la salud del hospedero, al producir sustancias que inhiben a posibles microorganismos invasores, así como ocupan un nicho ecológico preponderante en el epitelio del aparato gastrointestinal. Las BAL, son microorganismos que producen diferentes sustancias con características antimicrobianas, dentro de las cuales destacan el ácido acético y el ácido láctico, los cuales resultan posteriores a la fermentación de los carbohidratos (Londoño, 2015). En los últimos años, se ha reconocido que las MVs, arrastran productos de secreción bacteriana, potencialmente activos (Muraca, 2015). Estos hallazgos, han generado interesantes avances médicos, los cuales incluyen estrategias para la vacunación y tratamiento antibacterianos, a través del uso de MVs.

Sin embargo, aún no existe investigación sobre del efecto inhibitor de las MVs de BAL en microorganismos enteropatógenos, los cuales afectan ampliamente al sector pecuario debido a los costos del tratamiento, la muerte de animales susceptibles y los resultados no siempre satisfactorios que pueden traducirse en una baja en la producción. Además, de ser comprobado el efecto inhibitor de estas, se abre un nuevo horizonte, no solo para su uso en animales, sino también para humanos que padecen enfermedades gastroentéricas y/o enfermedades inflamatorias de curso crónico gastrointestinal.

## III. Objetivos.

### Objetivo general.

Evaluar el efecto de microvesículas (MVs) de bacterias ácido lácticas (BAL), en cultivos de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 154 y *Escherichia coli* de campo.

### Objetivos particulares.

1. Obtener y caracterizar molecularmente las microvesículas (MVs) de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 así como BALs de campo.
2. Evaluar mediante microscopía electrónica y SDS-PAGE, MVs de BAL.
3. Determinar el efecto de diferentes concentraciones de MVs de BAL, y de *L. acidophilus* ATCC 314 de sobre cultivos bacterianos de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC154 y *Escherichia coli* de campo bajo condiciones *in vitro*.

## IV. Hipótesis.

Si las células completas de las bacterias ácido lácticas (BAL), tienen efecto inhibitorio contra bacterias patógenas, entonces sus MVs podrían inhibir el crecimiento bacteriano *in vitro*, de bacterias enteropatógenas, cuando se enfrentan a éstas.



## V. Material y metodología experimental.

### 5.1 Microorganismos.

Para el desarrollo de este trabajo, se utilizó la cepa *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 (BAL de referencia), las BAL de campo se obtuvieron a partir de un trabajo previo del tracto gastrointestinal de *Rattus norvegicus* de vida libre. Los aislamientos se caracterizaron molecularmente, mediante PCR y bioquímicamente mediante el sistema Apiweb 50CHL. A partir de estos cultivos, se obtuvieron 4 cepas: # 54 *L. acidophilus* cuyo origen es íleon, #55 *L. pentosus* la cual viene de ciego, # 60 *L. plantarum* la cual procede de colon y # 64 *L. plantarum* proveniente de recto (BAL de campo).

Por otro lado, para las pruebas de inhibición se utilizó una cepa de *Escherichia coli* de campo y una cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 154 (bacterias enteropatógenas), las cuales fueron donadas por el Instituto de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

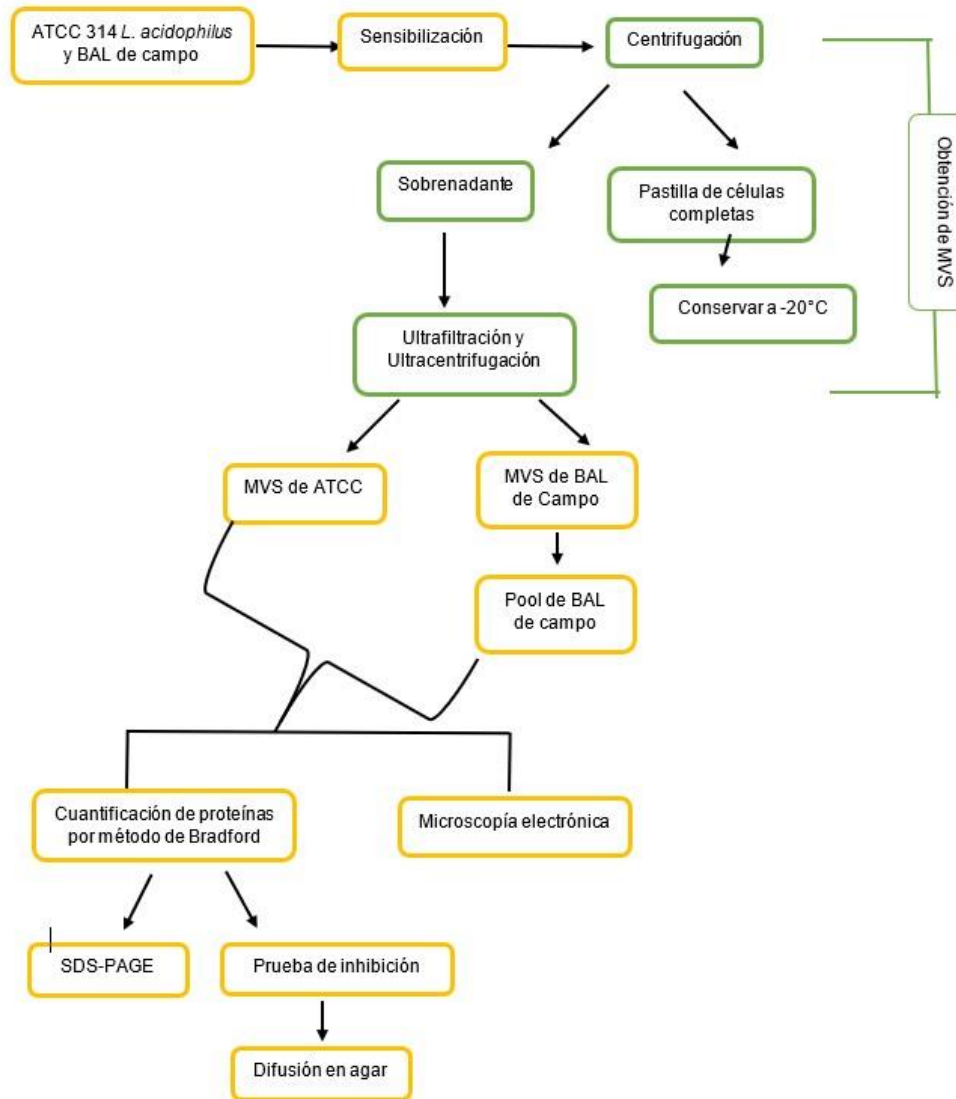
### 5.2 Medios de cultivo de cepas BAL de referencia y de campo.

Para realizar las siembras, se utilizó el medio *Lactobacilli* MRS Agar, mientras que para la elaboración de caldos, se utilizó el medio *Lactobacilli* MRS Broth. Se prepararon 500ml de caldo, en un matraz Erlenmeyer con tapón de rosca y de capacidad de 1000 ml, según las especificaciones del fabricante. Se esterilizaron los medios en autoclave durante 15min/121°C/15lbs. La esterilidad de los medios se probó en estufa bacteriológica a 37.5°C/ 24 h.

#### 5.2.1 Medios de cultivo para Bacterias enteropatógenas.

Para el crecimiento de las cepas *E. coli* de campo y *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 154, se utilizó agar MacConkey, el cual se preparó según las especificaciones del fabricante, esterilizando los medios en autoclave durante 15min/121°C/15lbs. La esterilidad de los medios se probó en estufa bacteriológica a 37.5°C/ 24 h.

Diagrama 1. Proceso de metodología experimental.



### 5.3 Sensibilización.

Para las pruebas de sensibilización, se utilizó el medio Tripticasa soya caldo (TSB), se prepararon 35ml de caldo en tubos cónicos de poliestireno de 50ml, preparados según las especificaciones del fabricante y colocándolos en autoclave a 15min/121°C/15lbs. La esterilidad de los medios, se probó en estufa bacteriológica a 37.5°C/ 24 h.

### 5.4 Sembrado de cepas: BAL de referencia y de campo.

Se tomó una colonia de cultivos mantenidos en agar MRS, y se resembró por estría cerrada en el medio Lactobacilli MRS Agar. Posteriormente, se colocaron en una jarra de anaerobiosis (BD BBL GasPak) junto con un GasPak Co<sub>2</sub> al 5% (BD GasPak anaerobic

container system) y se incubó en estufa bacteriológica durante 24hrs/ 37.5°C. Para identificar la colonia, se realizó una tinción de Gram (Gram Stain Kit, BD), visualizando las características microscópicas de la cepa.

#### 5.4.1 Sembrado de cepas Enteropatógenas.

Para las bacterias enteropatógenas, se tomó una colonia de los cultivos tanto de *S. enterica* serovar Typhimurium como de *E. coli*, se sembraron en el medio MacConkey Agar, mediante estría cerrada respectivamente, ambos incubándose en estufa bacteriológica 18-24hrs/37.5°C.

En este medio, las colonias de *E. coli* se observan de forma redonda, de 2 a 4 mm, de color rosado, alrededor del crecimiento se forma un halo transparente, mientras que, en *S. enterica* serovar Typhimurium, las colonias son redondas, de 2 a 3 mm, de color beige a incoloras (BD, 2014). En ambos casos para identificar las colonias, se realizó una tinción de Gram (Gram Stain Kit, BD) permitiendo visualizar las características microscópicas de ambas cepas.

#### 5.5 Tinción de Gram.

Para identificar las colonias y asegurarse que no estuvieran contaminadas las cepas (tanto BALs, como enteropatógenas), se utilizó el Gram Stain Kit, BD. Se tomó una colonia de cultivo fresco y se colocó en un portaobjetos limpio, fijando la muestra cerca de la flama y se procedió a teñir con cristal violeta, durante 30segundos. Inmediatamente la muestra se lavó con agua destilada y se cubrió con Lugol (solución yodo-yoduro al 4%) durante 30segundos, posteriormente se decoloró con una solución de alcohol-acetona y se lavó nuevamente con agua destilada, por último, se tiñó con safranina durante 30segundos y se retiró el exceso con agua destilada. Los frotis se dejaron secar a temperatura ambiente y se observaron a 100x al microscopio óptico de luz.

#### 5.6 Sensibilización de cepa control (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 314) a *Salmonella typhimurium* ATCC 154 y *Escherichia coli* de campo.

Se sembró una colonia de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, en 35ml de caldo MRS tal y como lo muestra la **Ilustración 6**. (Paso 1) y se incubó 24hrs/CO<sub>2</sub>/37.5°C (Paso 2), posteriormente se tomó una asada de una colonia sembrada en caldo MRS y se resembró en 35ml de Trypticase Soya Caldo (TSB) por 5hrs/CO<sub>2</sub>/37.5°C (Paso 3). Durante este tiempo, se monitoreó el pH del medio con la finalidad de asegurar que el efecto bactericida estuviera directamente asociado a los productos del metabolismo bacteriano y no a la acidez del medio, el cual nunca bajó de 5.4.

Por otro lado, se realizaron diluciones seriadas de las bacterias entoropatógenas, tomando como referencia la mínima dosis infectante (DMI), siendo las siguientes:

<i>E.coli</i>	10 <sup>10</sup> *Equivalente a 18UFC/ml* 10 <sup>8</sup> *Equivalente a 79UFC/ml* 10 <sup>6</sup> *Incontables UFC/ml*	<i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i>	10 <sup>9</sup> *Equivalente a 56UFC/ml* 10 <sup>7</sup> *Equivalente a 197UFC/ml* 10 <sup>4</sup> *Incontables UFC/ml*
---------------	---	--	---

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD/ OMS

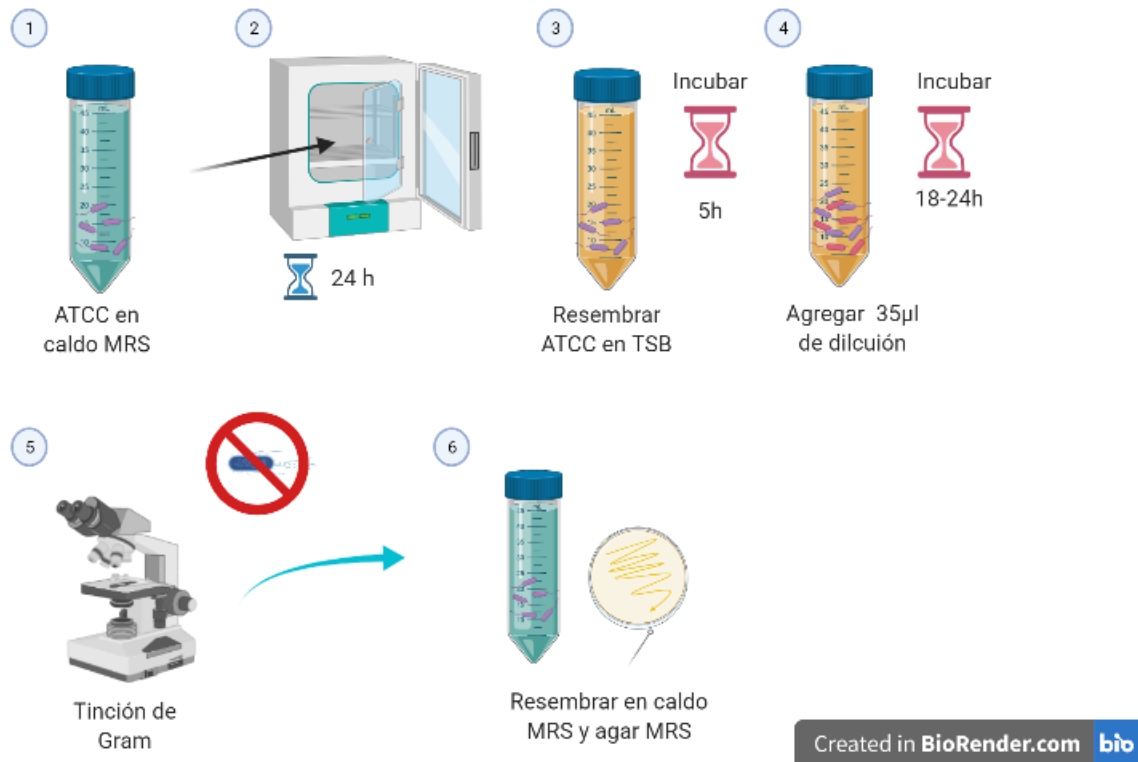
\*DATOS OBTENIDOS A PARTIR DE REALIZAR DILUCIONES DOBLES Y POSTERIOR INCUBACIÓN DE ESTAS\*

De tal manera que se agregaron 35µl de la dilución más baja (por ejemplo, *E. coli* 10<sup>10</sup>), fue la primera que se agregó al medio TSB, con la cepa de referencia. Una vez pasadas las 5 horas, se incubó durante 18 a 24hrs/CO<sub>2</sub>/37.5°C (Paso 4). Transcurrido este tiempo, se realizó una tinción de Gram para comprobar la inhibición (contando el número de bacterias en el microscopio óptico de luz, considerándose que hubo inhibición cuando el conteo de Gram negativas es igual a 0, como lo muestra el paso 5) y posteriormente se resembró en 35ml de caldo (*Lactobacilli* MRS Broth) y en agar (*Lactobacilli* MRS Agar) por estría cerrada (Paso 6) y se incubó 24hrs/CO<sub>2</sub>/37.5°C Una vez pasado el tiempo de incubación, la muestra que se sembró en agar, se guarda en refrigeración a 4°C. La muestra sembrada en 35ml de caldo (*Lactobacilli* MRS Broth) y se resembró en 35ml de caldo TSB por 5hrs/CO<sub>2</sub>/37.5°C (Paso 3), posteriormente se agregaron 35µl de la siguiente concentración (por ejemplo, *E. coli* 10<sup>8</sup>) y se incubó durante 18 a 24hrs/CO<sub>2</sub>/37.5°C (Paso 4). Se repitieron de nuevo los pasos 5 a 6.

El propósito de esta metodología, es llegar a la máxima dosis infectante de manera gradual, garantizando la supervivencia de la mayor cantidad de BAL, por lo que se continuó con la misma metodología hasta llegar a la máxima dosis infectante (*E.coli* 10<sup>6</sup> y *Salmonella* 10<sup>4</sup>), teniendo finalmente 6 cepas de referencia, 3 de ellas expuestas a las diferentes concentraciones de *E. coli* y otras tres expuestas a *S. enterica serovar Typhimurium*

Por último, con fines de identificación las cepas de referencia y de campo una vez sensibilizadas, las cepas que fueron expuestas a *E.coli* se identificaron anexando una “e” al final, mientras que las expuestas a *S. enterica serovar Typhimurium* se les anexó una “s”.

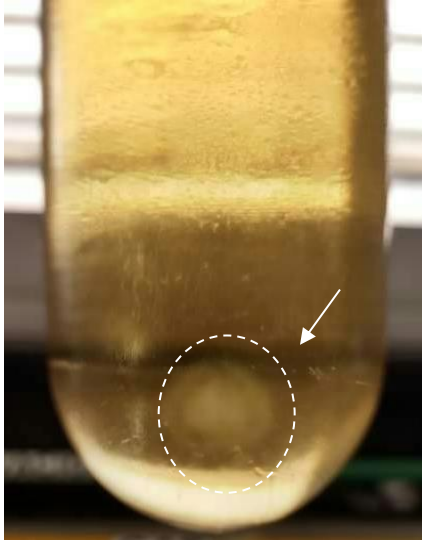
### Ilustración 6. Sensibilización de cepas



#### 5.6.1 Obtención de las Microvesículas (MVs) de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314.

Se siguió el método mencionado por Prados (2014), con algunas variaciones. Las cepas de referencia se sembraron en agar MRS a 37°C / CO<sub>2</sub> al 5% /24hrs. y se realizó una tinción de Gram para comprobar su pureza, posteriormente se cosecharon las colonias bacterianas con 2 ml de caldo MRS estéril y se adicionaron a 500ml de MRS estéril. El cultivo se incubó por 5hrs, hasta alcanzar su fase de crecimiento logarítmico (Gutiérrez, 2020), se incubó en ausencia de CO<sub>2</sub>, con la finalidad de estresar el cultivo y aumentar la producción de MVs (Klimentová, 2015). Posteriormente se centrifugó a 6000 rpm /15 min /4°C y la biomasa obtenida se resuspendió en 1ml de PBS estéril y se congeló a -20°C, dicha pastilla contenía células completas (C.C). Por otro lado, el sobrenadante de cultivo se recuperó, y se filtró empleando membranas Millipore de 0.45 y 0.22 µm de diámetro. El sobrenadante, se ultracentrifugó a 45 000 rpm /3 hrs. /4°C (**Ilustración 7**). Finalmente se recuperó la pastilla de MVs, en un total de 1 ml de PBS estéril (**Ilustración 8**) y esta se congeló a -20°C hasta su uso (**Ilustración 9**). Este procedimiento se repitió para las cepas de referencia como para las cepas de campo.

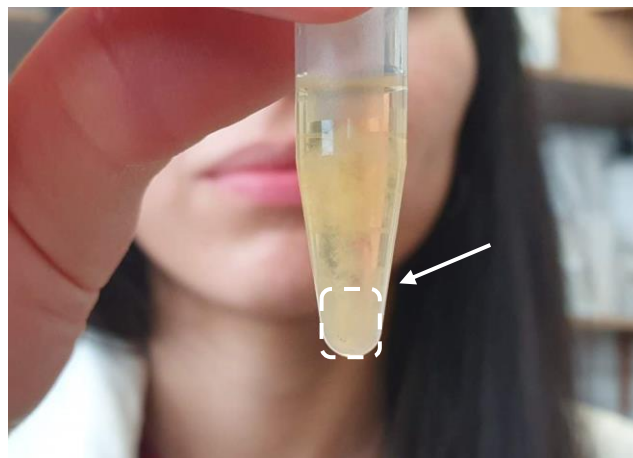
**Ilustración 7.** Pastilla de MVs de ATCC, posterior a la ultracentrifugación



**Ilustración 8.** Pastilla de MVs de la cepa 54 *L. acidophilus*, una vez decantado el sobrenadante



**Ilustración 9.** Pastilla de MVs resuspendido en 1ml de PBS estéril y lista para congelar



### 5.6.2 Cuantificación de proteína por el método de Bradford.

Una vez obtenidas las MVs, se determinó la concentración de proteína de cada muestra. En una placa de ELISA con pozos de fondo plano, se colocó en el pozo A1, 100  $\mu$ l de la solución reveladora de Bradford y a partir del pozo B1, se colocó la muestra problema, pipeteando 100  $\mu$ l de esta, y agregando 100  $\mu$ l más del líquido revelador de Bradford, las muestras se hicieron por triplicado; posteriormente se incubó por 5 minutos en la estufa a 37.5°C. Finalmente, la placa se leyó en un lector de ELISA (BIO-TEK ELX 808) a 590 nm y por regresión lineal se calculó la cantidad de  $\mu$ g de proteína por cada  $\mu$ l contenidos en la muestra problema (Winkler, 2017). Esta metodología se aplicó tanto para las cepas de campo como para las cepas de referencia.

### 5.7 Sensibilización de cepas de campo a partir de la cepa control *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314.

A partir de los resultados obtenidos de la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, se eligió la DMI con la que se obtuvo la mayor cantidad de proteínas para sensibilizar a las cepas de campo. En el caso de *E.coli*, la concentración  $10^8$  fue la que obtuvo el mayor número de proteína real (535.78 $\mu$ g/ml), por lo que cada una de las cepas de campo se sensibilizó hasta llegar a una concentración de  $10^8$ , siguiendo la metodología antes mencionada para la cepa control.

Por otro lado, en el caso de *S. enterica* serovar Typhimurium la concentración  $10^9$ , fue la que obtuvo el mayor número de proteína real (819.75 $\mu$ g/ml) por lo que cada una de las cepas de campo se sensibilizó a esta concentración, siguiendo la metodología antes mencionada.

#### 5.7.1 Preparación del Pool de MVs de BALs de campo.

Una vez que se obtuvieron las MVs de las 4 cepas de campo (54 *L. acidophilus*, 55 *L. pentosus*, 60 *L. plantarum* y 64 *L. plantarum*), se tomaron 250  $\mu$ l de cada cepa y se colocaron en un microtubo de 15ml estéril, el cual se congeló a -20°C hasta su uso.

### 5.8 Evaluación de MVs bacterianas mediante microscopía electrónica de transmisión (Tinción negativa).

A partir de las MVs obtenidas, estas se colocaron en rejillas de cobre de 200 mesh, se recubrieron de formvar y se sombrearon con carbón. Colocando de 10 a 15  $\mu$ l de la muestra sobre la rejilla por su cara más oscura y se dejó reposar por 15 minutos. Acto seguido, se retiró el exceso con un papel filtro, secando cuidadosamente la rejilla, agregando de 10 a 15 $\mu$ l de ácido fosfotúngstico al 1%/ pH 6.0/ 1 min.

Posteriormente, para la tinción con uranilo; una vez que se retiró el exceso de muestra con papel filtro, se agregó 10 a 15 $\mu$ l de uranilo al 2 %y se secó inmediatamente con un papel filtro. Después, nuevamente se colocaron 15  $\mu$ l de uranilo durante 30 segundos, se retiró el exceso con papel filtro y se colocó una última gota de 15  $\mu$ l de uranilo por 2 minutos y se secó con papel filtro.

## 5.9 Evaluación de MVs bacterianas mediante SDS-PAGE.

Mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE, se observó el patrón de proteínas arrastradas por las MVs, las cuales fueron comparadas con el patrón de proteínas previamente identificadas en células completas de BAL.

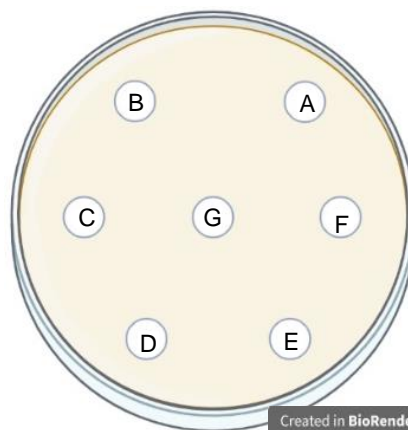
Según las especificaciones del fabricante (Bio-Rad 12% Precast TGX Stain free #4568043), primero se prepararon los amortiguadores: para el amortiguador de corrida 1X, se tomaron 100 ml (10X) de este y se adicionaron a 900 ml de agua destilada. El amortiguador de muestra 4X, se preparó en 50  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol, adicionando 450  $\mu$ l del amortiguador de muestra. El gel se sometió a 100volts / 2 hrs. aproximadamente. Una vez finalizada la electroforesis, se realizó la tinción de los geles con tinción de plata. Se utilizó el kit de Thermo Fisher Scientific "Pierce Silver Stain Kit" (#24612) y se siguió la metodología del proveedor. Para su conservación los geles se mantuvieron en una solución de ácido acético glacial al 10%.

### 5.9.1 Prueba de inhibición de difusión en agar semisólido.

Se siguió la metodología de Fuentes et al., (2017), con algunas modificaciones. En cajas de vidrio estériles, se colocó una cama de agar Muller-Hinton y se dejó gelificar. Por otro lado, el medio semisólido SIM una vez que salió de la autoclave, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó la dilución  $10^2$  de la bacteria enteropatógena; una vez realizada la dilución se agregó encima del agar Muller-Hinton y se llevó a refrigeración (4°C) durante 2 horas. Una vez gelificado, se colocaron 7 sensidiscos, tomándose como controles positivos las MVs y células completas (C.C) de la cepa *L. acidophilus* ATCC 314. La **Tabla 1.0** muestra la manera en la que identificaron las diferentes cepas.

**Tabla 1.0** Identificación de las cepas de BAL en sensidiscos colocados sobre agar semisólido SIM

Letra	Cepa
A	54 <i>L. acidophilus</i>
B	55 <i>L. pentosus</i>
C	60 <i>L. plantarum de colon</i>
D	64 <i>L. plantarum de recto</i>
E	<i>L. acidophilus</i> ATCC 314 MVs (+)
F	<i>L. acidophilus</i> ATCC 314 C.C (+)
G	Pool de MVs



Created in BioRender.com 



Se realizaron 3 cajas, por cada cepa enteropatógena, con el fin de evaluar el efecto inhibitorio a diferentes concentraciones. A la primera caja se le adicionaron 25µg de MVs, la segunda con 50µg y la tercera con 75µg.

La **Tabla 2.0** muestra la cantidad de µl que se administraron a las cepas expuestas a *E.coli*, para alcanzar las diferentes concentraciones de MVs, mientras que la **Tabla 3.0** muestra las cantidades administradas a las cepas expuestas a *S. enterica* serovar Typhimurium.

**Tabla 2.0** Cantidad de µl administradas de las diferentes cepas expuestas a *E. coli*, de acuerdo con la concentración de proteína deseada

<b><i>Escherichia coli</i> de campo</b>				
		Concentración		
Letra	Cepas	Caja 1 25µg	Caja 2 50µg	Caja 3 75µg
A	<b>54e</b> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	20µl	40 µl	60 µl
B	<b>55e</b> <i>Lactobacillus pentosus</i>	20µl	40 µl	60 µl
C	<b>60e</b> <i>Lactobacillus plantarum</i>	20µl	40 µl	60µl
D	<b>64e</b> <i>Lactobacillus plantarum</i>	17µl	34 µl	51 µl
E	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <b>ATCEc</b> 314 MVs	15µl	30 µl	45 µl
F	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <b>ATCEc</b> 314 Células completas	10µl	20 µl	30 µl
G	<b>POOLE</b>	20µl	40 µl	60 µl

**Tabla 3.0** Cantidad de  $\mu\text{l}$  administradas de las diferentes cepas expuestas a *S. typhimurium* de acuerdo con la concentración de proteína deseada

<b><i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 154</b>				
<b>Letra</b>	<b>Cepas</b>	<b>Concentración</b>		
		<b>Caja 1 25<math>\mu\text{g}</math></b>	<b>Caja 2 50<math>\mu\text{g}</math></b>	<b>Caja 3 75<math>\mu\text{g}</math></b>
<b>A</b>	<b>54s</b> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	24 $\mu\text{l}$	47 $\mu\text{l}$	70 $\mu\text{l}$
<b>B</b>	<b>55s</b> <i>Lactobacillus pentosus</i>	25 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	75 $\mu\text{l}$
<b>C</b>	<b>60s</b> <i>Lactobacillus plantarum</i>	25 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	75 $\mu\text{l}$
<b>D</b>	<b>64s</b> <i>Lactobacillus plantarum</i>	20 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$	60 $\mu\text{l}$
<b>E</b>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <b>ATSa 314 MVs</b>	25 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	75 $\mu\text{l}$
<b>F</b>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <b>ATSa 314 Células completas</b>	8 $\mu\text{l}$	16 $\mu\text{l}$	24 $\mu\text{l}$
<b>G</b>	<b>POOLSa</b>	23 $\mu\text{l}$	46 $\mu\text{l}$	69 $\mu\text{l}$

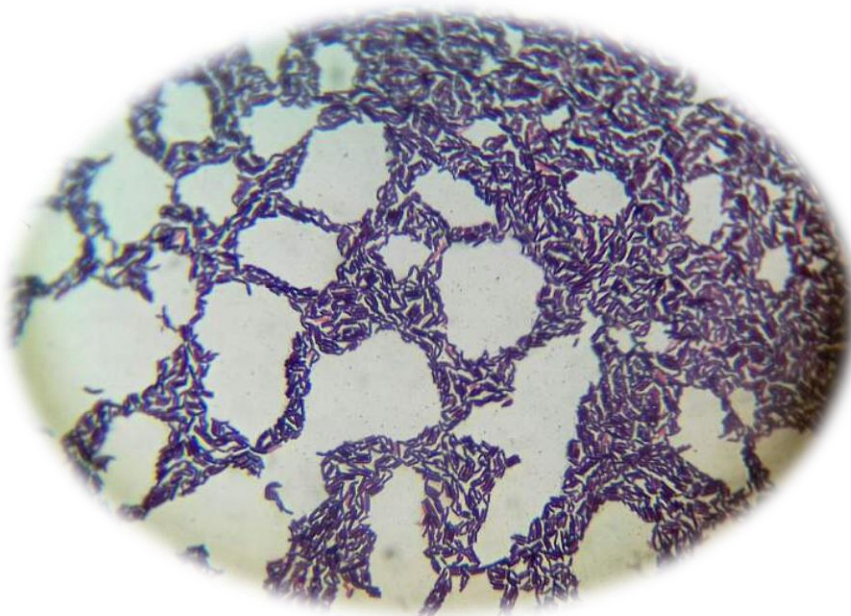
Finalmente, todas las cajas de cultivo se colocaron en la estufa de incubación durante 18 a 24hrs/37°C, tiempo en el que se realizó una primera evaluación y posteriormente se colocaron en el refrigerador para evaluar a las 48hrs.

## VI. Resultados.

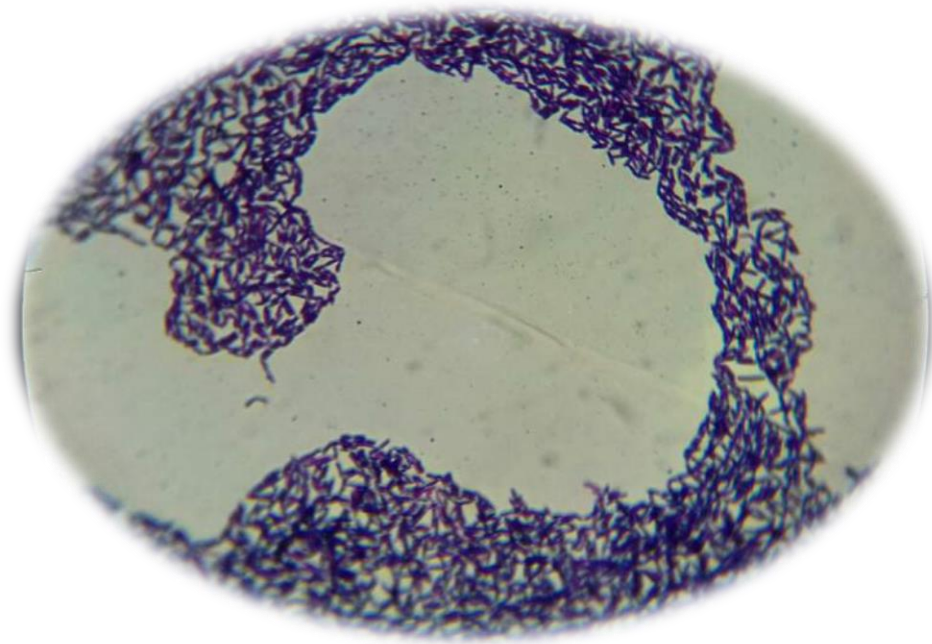
### 6.1 Sensibilización de BAL de referencia y de campo.

Después de sensibilizar las cepas de BAL de referencia y de campo con *E. coli*  $10^8$  y *S. enterica* serovar Typhimurium  $10^9$ , estas fueron capaces de inhibir los cultivos de dichas bacterias enteropatógenas en las diferentes concentraciones que se probaron para tal efecto, tanto en el medio líquido TSB, como en la resiembra en MRS caldo y agar. Para corroborar dicha inhibición se realizó una tinción de Gram de los cultivos y a la inspección al microscopio, no se evidenció la presencia de bacterias Gram negativas. Tal como se observan en la **Ilustración 10** e **Ilustración 11**.

**Ilustración 10.** Tinción de Gram de la cepa *L. acidophilus* ATCC 314 en MRS agar, posterior a sensibilizarla con *E.coli*  $10^8$  (100x)

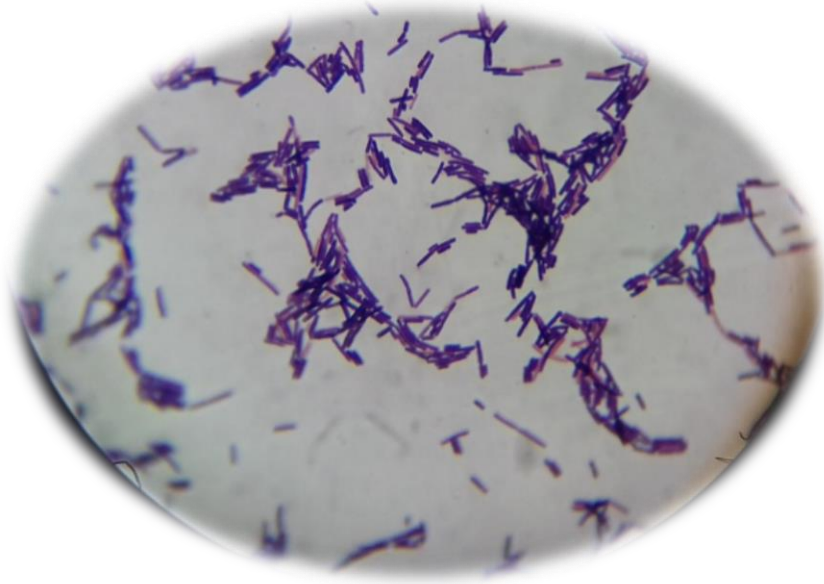


**Ilustración 11.** Tinción de Gram de la cepa 54e (*L.acidophilus*) en MRS Agar posterior a la sensibilización con *E.coli* 10<sup>8</sup> (100x)

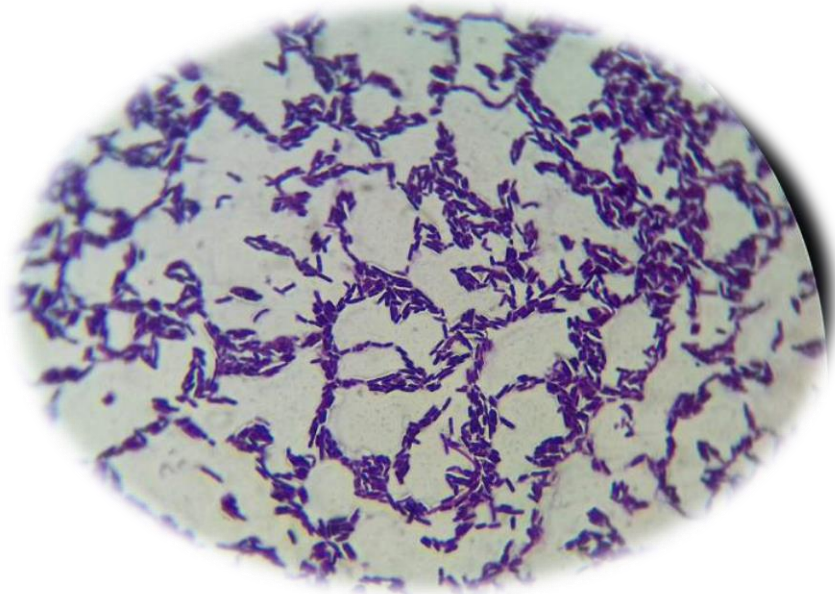


Por otro lado, en el microscopio óptico y con aumento de 100x se observaron cambios morfológicos evidentes en las cepas revisadas. La cepa de *L. acidophilus* ATCC 314, fue la que evidenció más cambios, una vez finalizada su sensibilización con la dilución de *E.coli* 10<sup>8</sup>, su pared celular se engrosó notoriamente, su forma larga y delgada se volvió pequeña y gruesa. De igual manera sucedió con esta ATCC, sensibilizada desde la primera dilución hasta la dilución 10<sup>4</sup> de *S. enterica* serovar Typhimurium, mostrando los mismos cambios en su morfología. Se aprecian en las **Ilustraciones 12 a 14**.

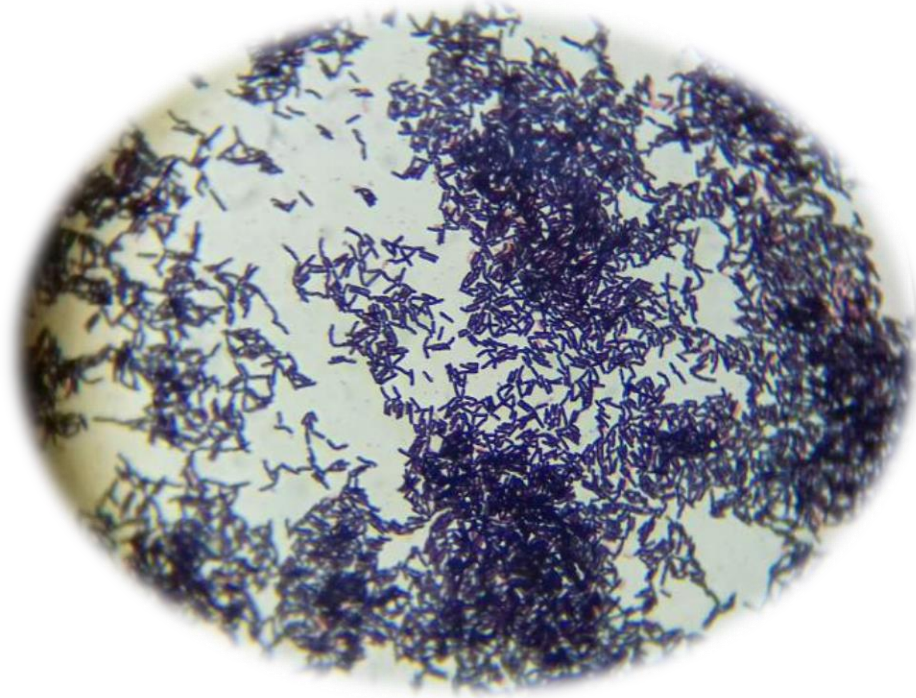
**Ilustración 12.** Tinción de Gram de la cepa *L. acidophilus* ATCC 314 previa a la sensibilización con cepas enteropatógenas (100x)



**Ilustración 13.** Tinción de Gram de la cepa *L. acidophilus* ATCC 314 posterior a la sensibilización con *E.coli*  $10^8$  (100x)



**Ilustración 14.** Tinción de Gram de la cepa *L.acidophilus* ATCC 314 posterior a la sensibilización con *S. enterica* serovar Typhimurium  $10^4$  (100x).



## 6.2 Cuantificación de proteína por el método de Bradford.

Una vez que las cepas de referencia, fueron expuestas a diferentes concentraciones de *E.coli* y *S. enterica* serovar Typhimurium, se obtuvieron las siguientes cantidades de proteína, representadas en la **Tabla 4.0**

**Tabla 4.0** Cuantificación de proteína de la cepa de referencia *L. acidophilus* ATCC 314 posterior a la sensibilización con cepas enteropatógenas a diferentes concentraciones

Cepa	DIM	Proteína en 100µl	Proteína real (1ml)
<i>L. acidophilus</i> ATCC 314	<i>E.coli</i> $10^{10}$	39.57 µg/µl	395.73 µg/ml
	<i>E. coli</i> $10^8$	53.57 µg/µl	535.78 µg/ml
	<i>E.coli</i> $10^6$	49.33 µg/µl	493.36 µg/ml
<i>L. acidophilus</i> ATCC 314	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium $10^9$	81.99 µg/µl	819.95 µg/ml
	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium $10^7$	78.97 µg/µl	789.73 µg/ml
	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium $10^4$	76.30 µg/µl	763.00 µg/ml

Para sensibilizar las cepas de campo, se eligió la concentración con mayor cantidad de proteína; en el caso de *E.coli* la dilución de  $10^8$ , obtuvo la mayor cantidad de proteína (535.78µg/ml), mientras que para *S. enterica* serovar Typhimurium la dilución  $10^9$  (819.95µg/ml), arrojó los mejores resultados.

Tras exponer las cepas de campo de BAL (54, 55, 60 y 64) a las bacterias enteropatógenas y realizar la cuantificación de proteína por el método de Bradford, se obtuvieron los siguientes resultados, que se muestran en la **Tabla 5.0**

**Tabla 5.0** Cuantificación de proteína de BAL de campo posteriores a la sensibilización con cepas enteropatógenas

Cepa	Proteína en 100µl	Proteína real (1ml)
<b>54e</b>	83.73 µg/µl	837.39 µg/ml
<b>55e</b>	79.90 µg/µl	799.03 µg/ml
<b>60e</b>	78.50 µg/µl	785.09 µg/ml
<b>64e</b>	149.05 µg/µl	1490.57 µg/ml
<b>PoolE</b>	125.46 µg/µl	1254.63 µg/ml
<b>C.C ATEC</b>	286.43 µg/µl	2864.34 µg/ml
<b>54s</b>	107.91 µg/µl	1079.13 µg/ml
<b>55s</b>	103.55 µg/µl	1035.55 µg/ml
<b>60s</b>	100.70 µg/µl	1007.07 µg/ml
<b>64s</b>	131.62 µg/µl	1316.23 µg/ml
<b>PoolSa</b>	110.35 µg/µl	1103.54 µg/ml
<b>C.C ATSa</b>	313.28 µg/µl	3132.82 µg/ml

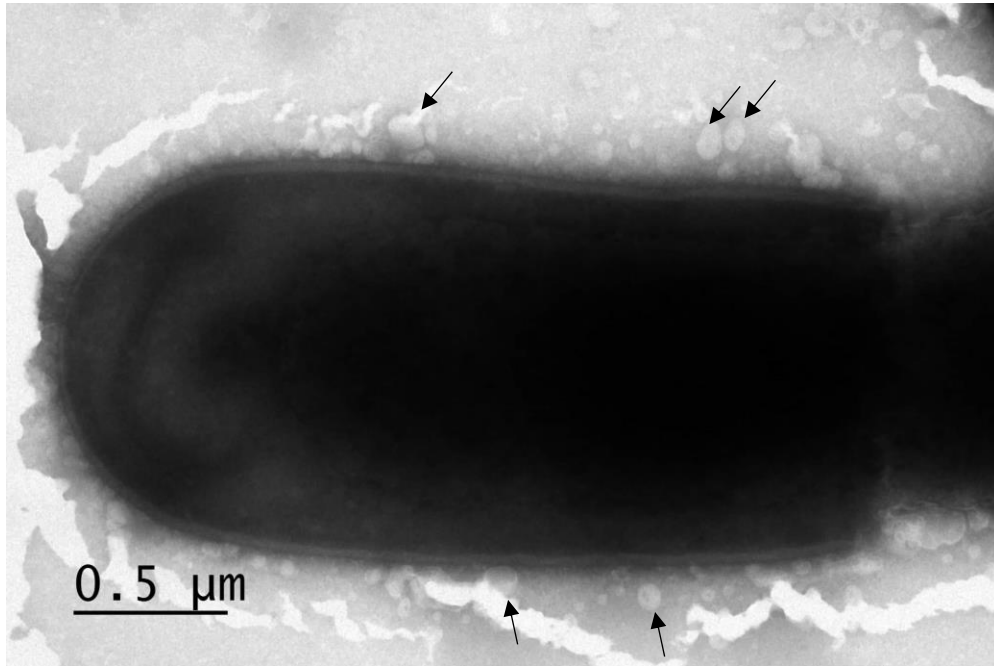
Cepas de referencia: #54 *L. acidophilus* de íleon, #55 *L. pentosus* de ciego, #60 *L. plantarum* de colon y #64 *L. plantarum* de recto

Las cepas de referencia con una “e”, “E” y “EC” al final son las cepas expuestas a *E.coli*  $10^8$  mientras que las cepas con una “s” y “Sa” al final fueron expuestas a *S. typhimurium*  $10^9$

### 6.3 Microscopía electrónica.

La microscopía electrónica de las muestras evidenció la morfología de la cepa 54 de *Lactobacillus acidophilus*, donde se aprecia la membrana celular y la gruesa capa de peptidoglicano que esta bacteria desarrolló. De esta última, se evidencian incontables MVs, de forma esférica con diferentes diámetros, saliendo de la superficie bacteriana hacia el exterior. Tal como se aprecia en la **Ilustración 15**.

**Ilustración 15.** Microscopía electrónica de la cepa 54 de *L. acidophilus*, con tinción negativa



Las flechas señalan las múltiples MVs alrededor de la pared celular de la cepa 54 de *L.acidophilus*.



La **Ilustración 16**, muestra un acercamiento a la pared celular de la cepa 54 *L. acidophilus*, en donde se aprecia con mayor nitidez la presencia de múltiples MVs con diferentes diámetros congregándose en la superficie de la bacteria con diferentes diámetros.

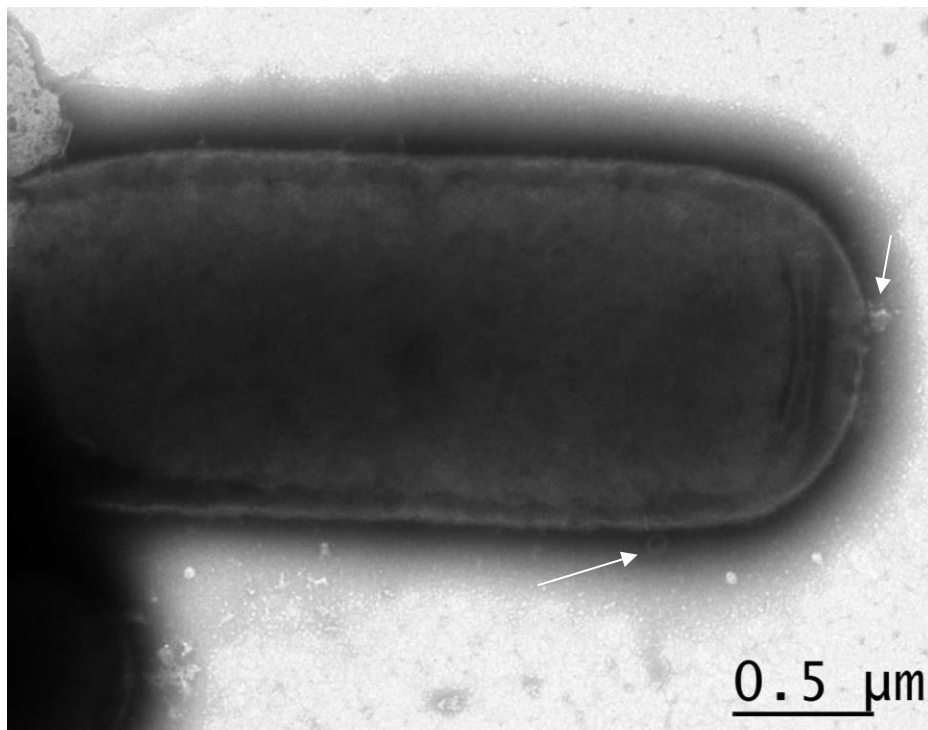
**Ilustración 16.** Microscopía electrónica de la cepa 54 de *L. acidophilus*, con tinción negativa



Las flechas señalan las múltiples MVs alrededor de la pared celular de la cepa 54 de *L. acidophilus*.

La **Ilustración 17**, muestra a la cepa de campo 55 de *L. pentosus*, con MVs saliendo de la pared celular esta cepa. Esta es la primera imagen que reporta que este género de *Lactobacillus* es capaz de producir MVs.

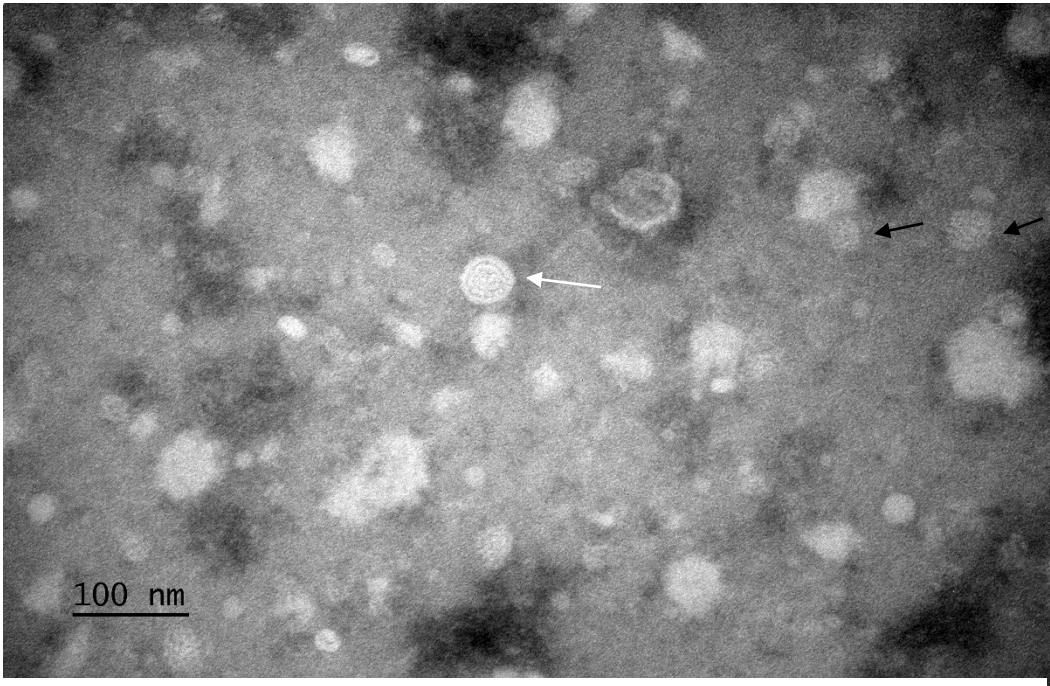
**Ilustración 17.** Microscopía electrónica de la cepa 55 de *L. pentosus*, con tinción negativa



Las flechas señalan las MVs alrededor de la pared celular de la cepa 55 de *L. pentosus*.

Por otro lado, en la **Ilustración 18** la microscopía electrónica de la cepa 64s, reveló múltiples MVs de diferentes diámetros que evidencian claramente una doble membrana (**flecha blanca**) en su estructura, que denota el origen de las mismas.

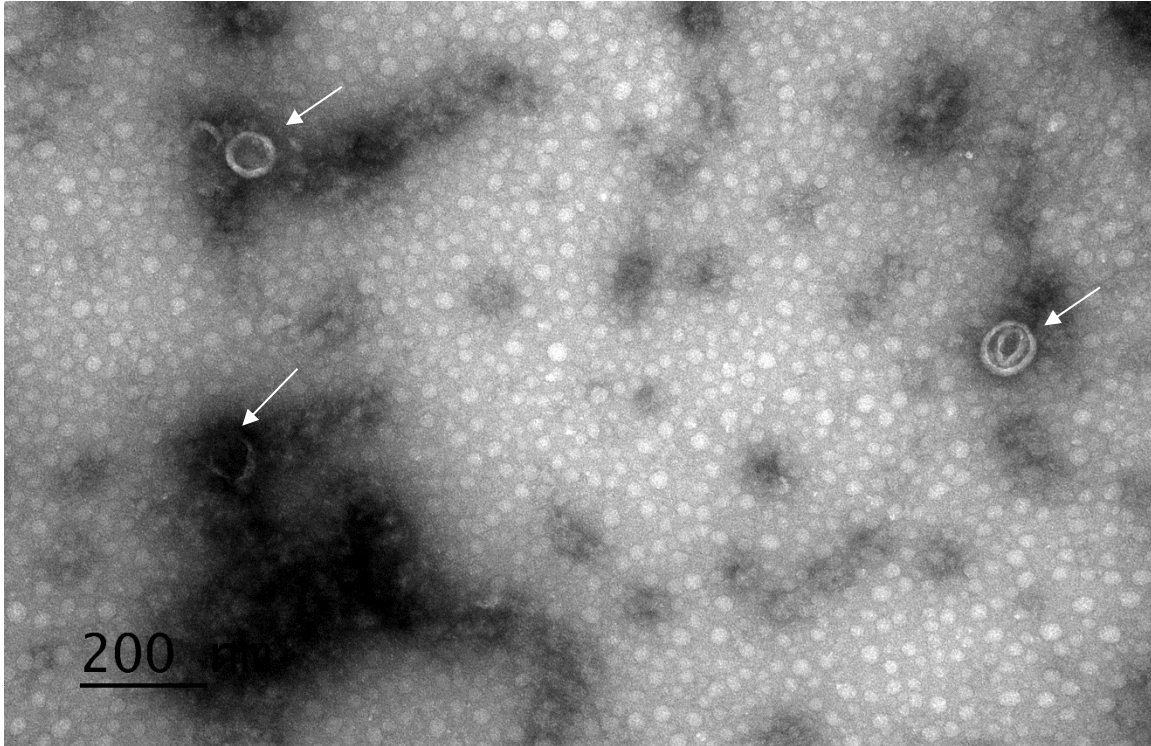
**Ilustración 18.** Microscopía electrónica de la cepa 64s de *L. plantarum*, con tinción negativa



Las flechas negras señalan las múltiples MVs de la cepa 64s de *L. plantarum*, mientras que la flecha blanca señala una MVs en la cual se aprecia la doble membrana de esta.

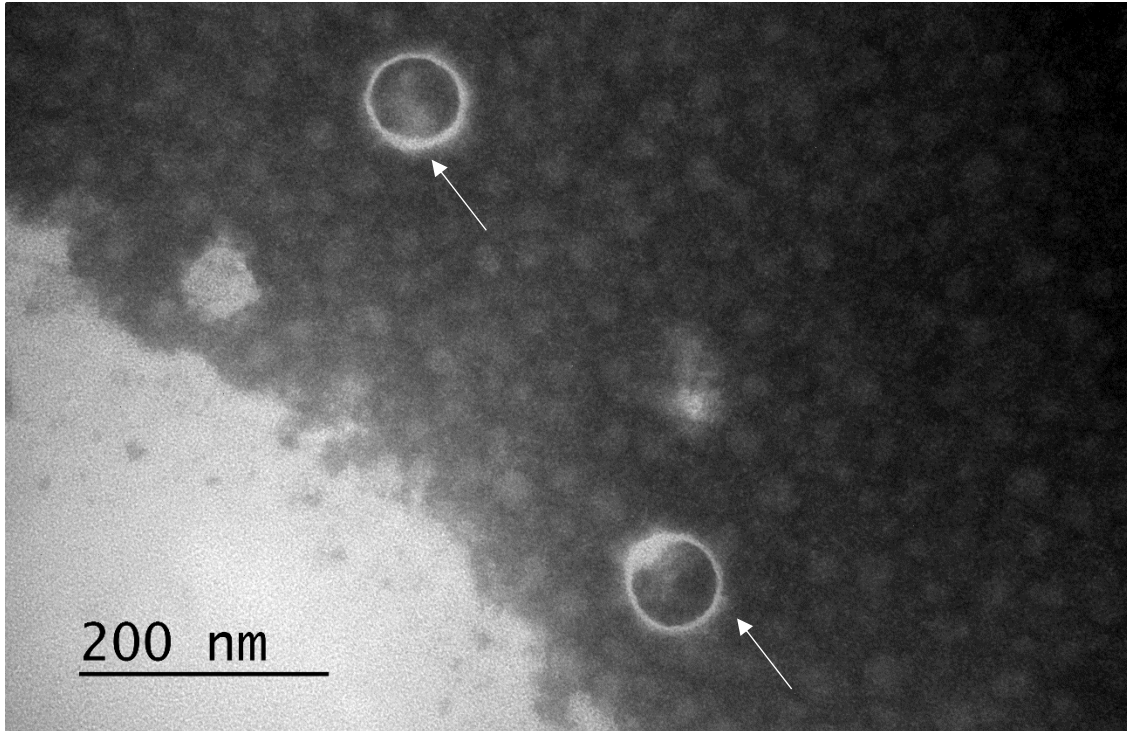
Mientras que las muestras de MVs de *L. acidophilus* ATCC 314, se tiñeron con 2% de uranilo. La **Ilustración 19 y 20**, muestran diversas MVs de esta cepa, con una forma esférica bien definida de aproximadamente 100nm de diámetro.

**Ilustración 19.** Microscopía electrónica de la cepa *L. acidophilus* ATCC 314 con tinción de uranilo al 2%



Las flechas blancas señalan la múltiples MVs de la cepa *L.acidophilus* ATCC 314

**Ilustración 20.** Microscopía electrónica de la cepa *L. acidophilus* ATCC 314 con tinción de uranilo al 2%



Las flechas blancas señalan las múltiples MVs de la cepa *L. acidophilus* ATCC 314

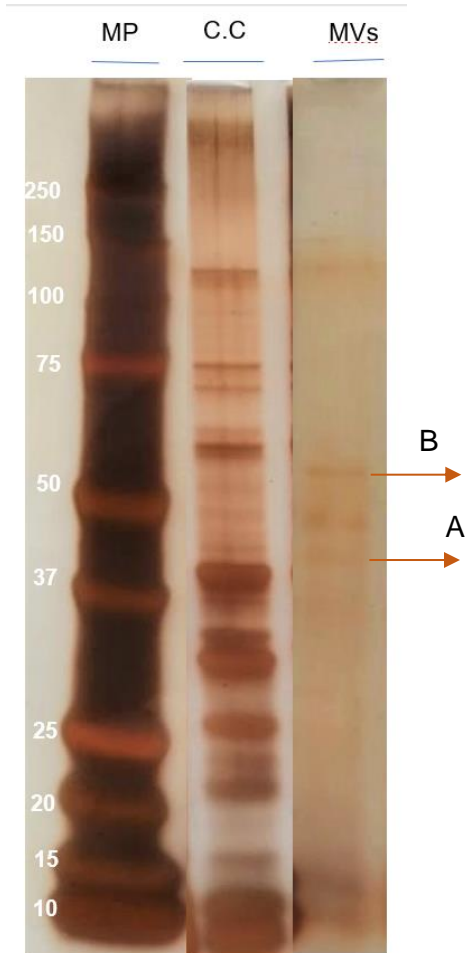
## 6.4 Evaluación de MVs bacterianas mediante SDS-PAGE.

### 6.4.1 Cepas expuestas a *E.coli*.

La **Ilustración 21**, muestra los patrones de corrimiento electroforético de la cepa de campo 54e de *L. acidophilus de íleon*, tanto las C.C como las MVs, comparten proteínas de pesos similares que van desde los 10, 15, 37, 44, 54 y hasta los 110 kDa. Dean y colaboradores en 2019 mencionan que la proteína con un peso de 44 kDa arrastrada en MVs, corresponde a una permeasa transportadora ABC de maltosa (**Letra A**), mientras que la que tienen un peso de 54 kDa, pueden ser una proteína de la capa superficial XSlpX o una proteína permeasa transportadora ABC de Glutamina (**Letra B**).

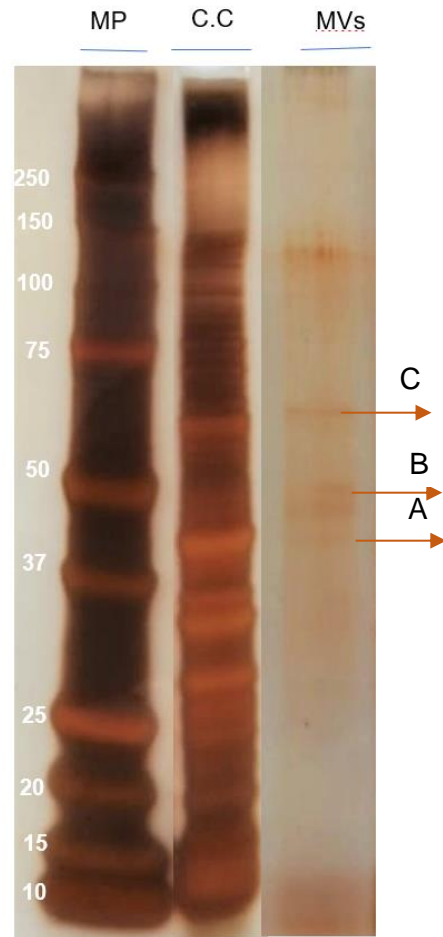
La **Ilustración 22**, muestra los patrones proteicos de la cepa de referencia *L. acidophilus* ATCC 314, expuesta a *E.coli* 10<sup>8</sup> (ATEc) en la cual se observó un bandeo de proteínas similar al descrito para la cepa 54e. A diferencia de la descrita anteriormente en este corrimiento electroforético se observó además una proteína de 59 kDa, la cual corresponde a una proteína transmembranal (**Letra C**).

**Ilustración 21.** SDS-PAGE 12% con tinción de plata de la cepa de campo 54e *L.acidophilus* de ileon expuesta *E.coli* 10<sup>8</sup>



Se ilustran con letras las diferentes proteínas arrastradas por MVs según su peso molecular: (A) Proteína transportadora ABC de Maltosa, (B) puede tratarse de 2 proteínas, Proteína de la capa superficial XslpX o Proteína transportadora ABC de Glutamina.

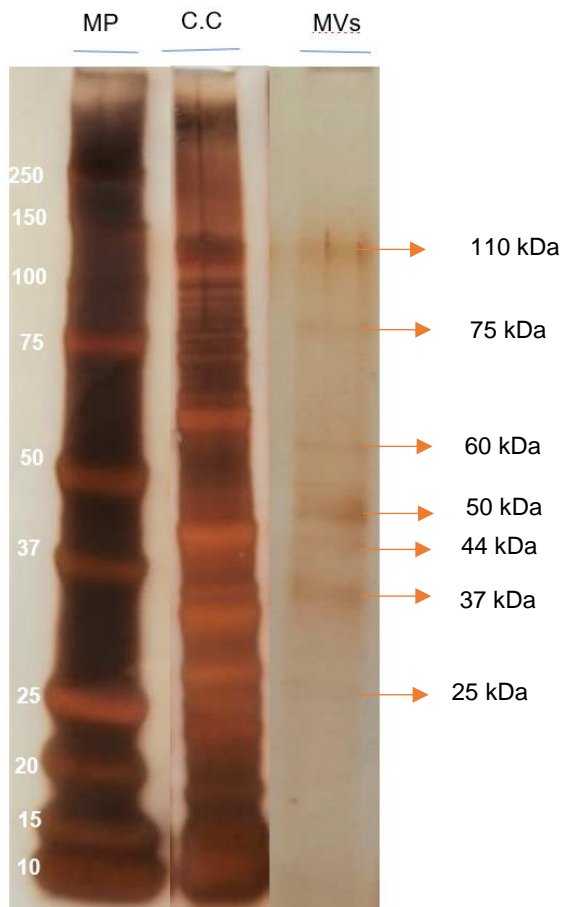
**Ilustración 22.** SDS-PAGE 12% con tinción de plata de la cepa de referencia *L.acidophilus* ATCC 314 expuesta a *E.coli* 10<sup>8</sup>(ATEc)



Se ilustran con letras las diferentes proteínas arrastradas por MVs según su peso molecular: (A) Proteína transportadora ABC de Maltosa, (B) puede tratarse de 2 proteínas, Proteína de la capa superficial XslpX o Proteína transportadora ABC de Glutamina y (C) Transportador ABC de unión ATP y proteína que atraviesa la membrana.

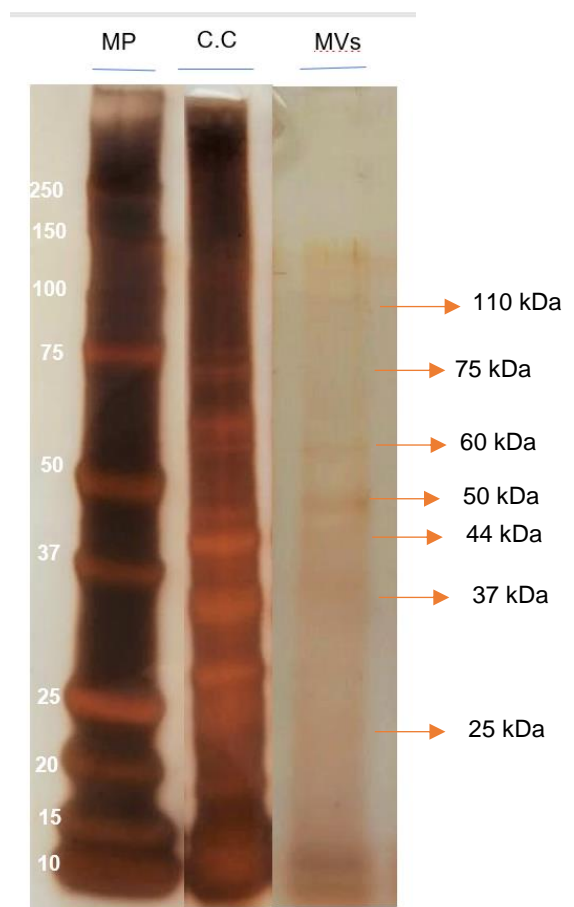
Por otro lado, la **Ilustración 23** muestra el patrón de la cepa de campo 60e de *L. plantarum* aislada de colon, mientras la **Ilustración 24** corresponde a la cepa de campo 64e de *L. plantarum* aislada de recto. Ambas cepas, tanto sus C.C, como sus MVs poseen los mismos patrones de proteínas, donde se evidencian las proteínas con pesos de 25, 37, 44, 50, 60, 75 y hasta 110 kDa.

**Ilustración 23.** SDS-PAGE 12% con tinción de plata de la cepa de campo 60e *L. plantarum* de colon expuesta a *E.coli* 10<sup>8</sup>



Las flechas señalan las bandas con sus diferentes pesos

**Ilustración 24.** SDS-PAGE 12% con tinción de plata de la cepa de campo 64e *L. plantarum* de recto expuesta a *E.coli* 10<sup>8</sup>

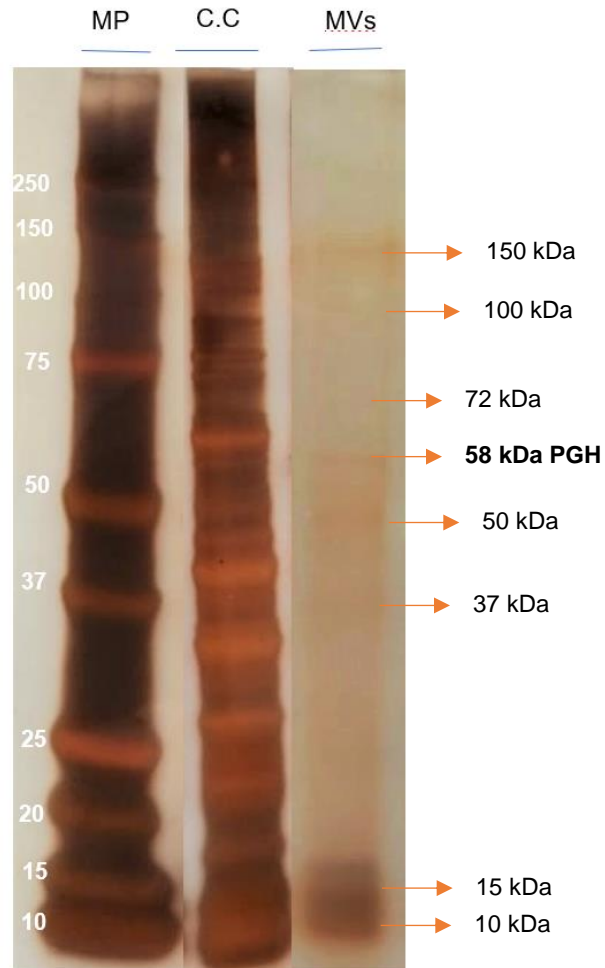


Las flechas señalan las bandas con sus diferentes pesos

Por último, se encontró que la cepa 55e de *L. pentosus*, es capaz de producir MVs y estas acarrean proteínas pertenecientes de la bacteria completa, lo cual se visualiza en la **Ilustración 25**, tanto las C.C, como las MVs acarrean proteínas con un peso molecular de 10, 15, 37, 50, 58, 72, 100 y 150 kDa. Cibik y Chapot en 2004, caracterizaron las PGH

presentes en las C.C de *L. pentosus*, mencionando que una de ellas posee un peso de **58kDa**. En el presente trabajo, observamos una proteína con este mismo peso molecular, el cual se encuentra presente tanto en las C.C como en sus MVs, lo cual podría sugerir la presencia de PGH.

**Ilustración 25.** SDS-PAGE 12% con tinción de plata de la cepa de campo 55e *L. pentosus* de ciego



Las flechas señalan las bandas con sus diferentes pesos moleculares. La abreviatura PGH corresponde a Peptidoglicano hidrolasas

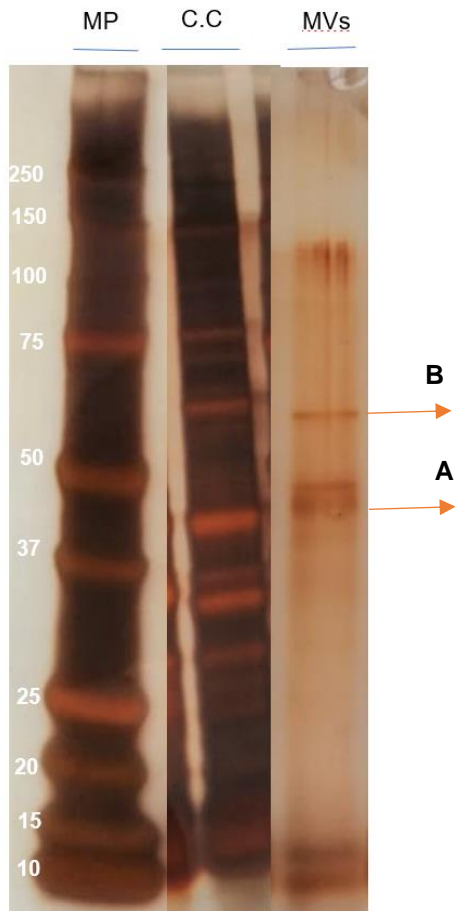


#### 6.4.2 Cepas expuestas a *S. enterica* serovar Typhimurium.

La cepa de referencia *L. acidophilus* ATCC 314 expuesta a *S. enterica* serovar Typhimurium 10<sup>9</sup> (ATSa), mostraron que sus C.C así como sus MVs comparten patrones proteicos con los siguientes pesos: 10, 15, 44, 50 y 59 kDa, tal como se aprecia en la **Ilustración 26**. Dean y colaboradores en 2019 mencionan que la proteína con un peso de 44kDa, se trata de una proteína transportadora ABC de maltosa (**Letra A**), mientras que la proteína con un peso de 59kDa pertenece a un transportador de unión ATP transmembranal (**Letra B**).

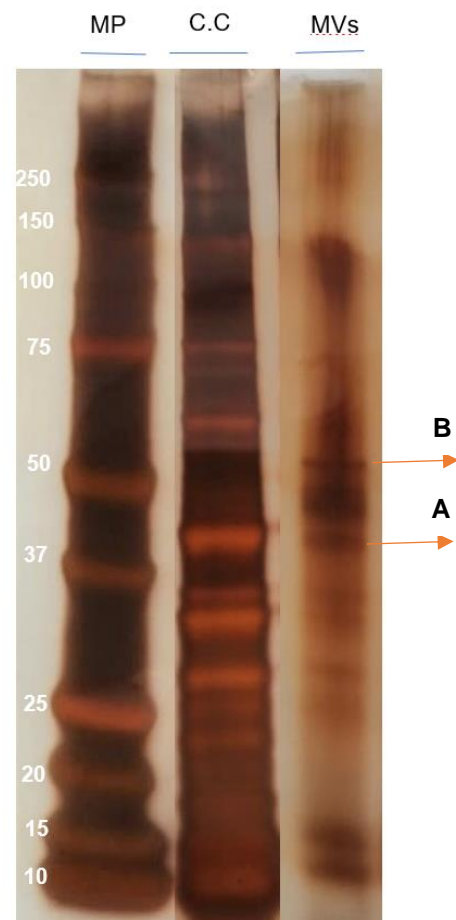
Por otro lado, la **Ilustración 27**, en la cepa de campo 54s de *L. acidophilus*, se observó un bandeo de proteínas similar al descrito para la cepa de referencia. De igual manera, cuenta con la proteína transportadora ABC de maltosa con un peso de 44kDa (**Letra A**) y el transportador de unión ATP transmembranal, con un peso de 59kDa (**Letra B**).

**Ilustración 26.** SDS-PAGE 12% con tinción de plata de la cepa de referencia ATCC de *L. acidophilus* expuesta a *S. enterica* serovar Typhimurium 10<sup>9</sup>



Se ilustran con letras las diferentes proteínas arrastradas por MVs según su peso molecular **(A)** Proteína transportadora ABC de Maltosa, **(B)** Transportador ABC de unión ATP transmembranal

**Ilustración 27.** SDS-PAGE 12% con tinción de plata de la cepa de campo 54s de *L. acidophilus* expuesta a *S. enterica* serovar Typhimurium 10<sup>9</sup>

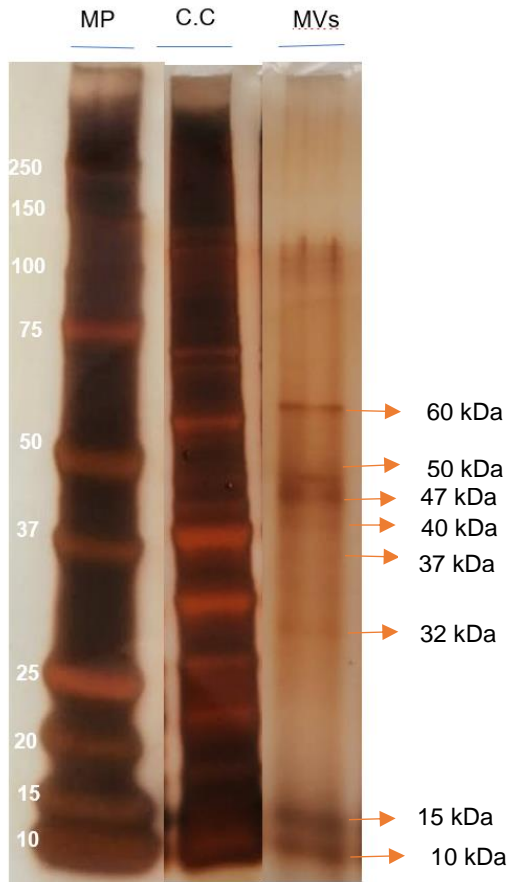


Se ilustran con letras las diferentes proteínas arrastradas por MVs según su peso molecular **(A)** Proteína transportadora ABC de Maltosa, **(B)** Transportador ABC de unión ATP transmembranal

Por otro parte, la **Ilustración 28**, muestra el patrón electroforético de la cepa de campo 60s de *L. plantarum* de colon, la cual muestra proteínas con un peso de 10, 15, 32, 37, 40, 47, 50 y 60 kDa, que comparten las C.C con sus respectivas MVs.

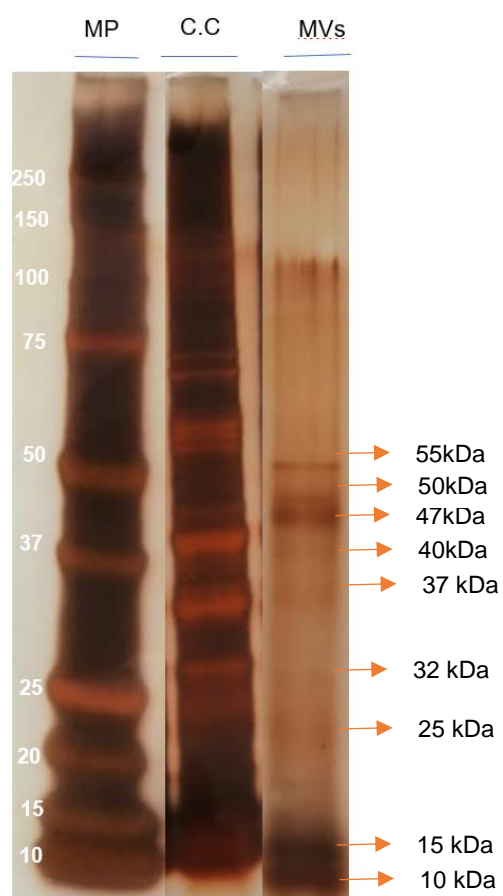
Mientras que la cepa de campo 64s de *L. plantarum* de recto, se visualiza en la **Ilustración 29**, la cual acarrea proteínas que están presentes tanto en las C.C como en las MVs, las cuales tienen un peso de 10, 15, 25, 32, 37, 40, 47, 50 y 55 kDa.

**Ilustración 28.** SDS-PAGE 12% con tinción de plata de la cepa de campo 60s de *L. plantarum* expuesta a *S. enterica* serovar Typhimurium 10



Las flechas señalan las bandas con sus diferentes pesos

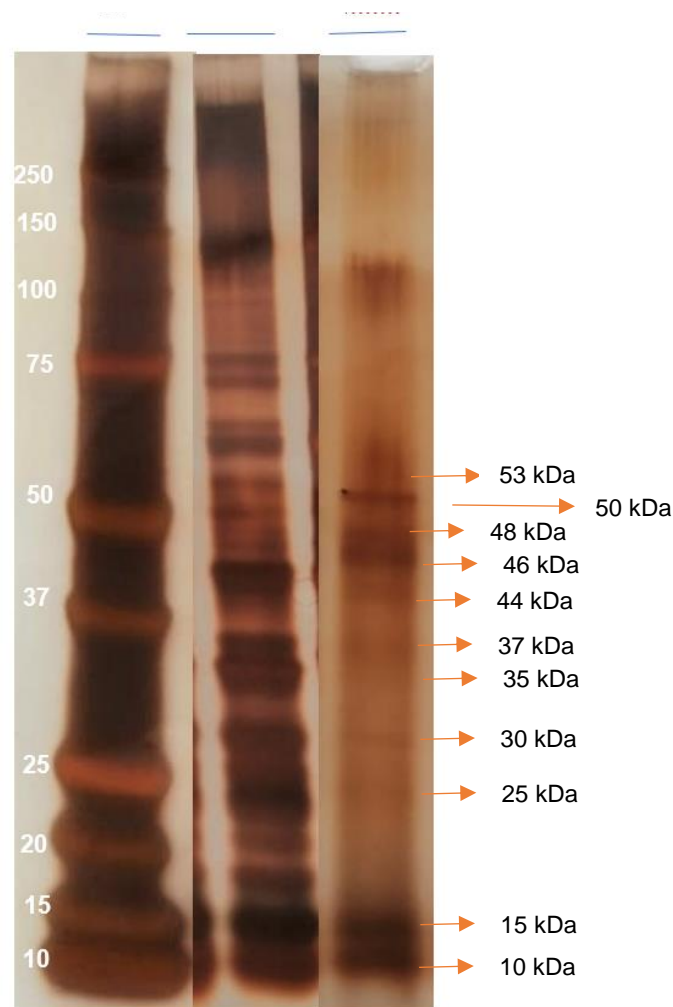
**Ilustración 29.** SDS-PAGE 12% con tinción de plata de la cepa de campo 64s de *L. plantarum* expuesta a *S. enterica* serovar Typhimurium 10<sup>9</sup>



Las flechas señalan las bandas con sus diferentes pesos

Por último, la **Ilustración 30** muestra los patrones de la cepa 55s de *L. pentosus* aislada de ciego, que como se mencionó anteriormente, es la primera vez que se documenta la producción de MVs en esta especie. Tanto sus C.C como en sus MVs, evidencian proteínas de 10, 15, 25, 30, 35, 37, 44, 46, 48, 50 y 53 kDa.

**Ilustración 30.** SDS-PAGE 12% con tinción de plata de la cepa de campo 55s de *L. pentosus* expuesta a *S. enterica* serovar Typhimurium  $10^9$

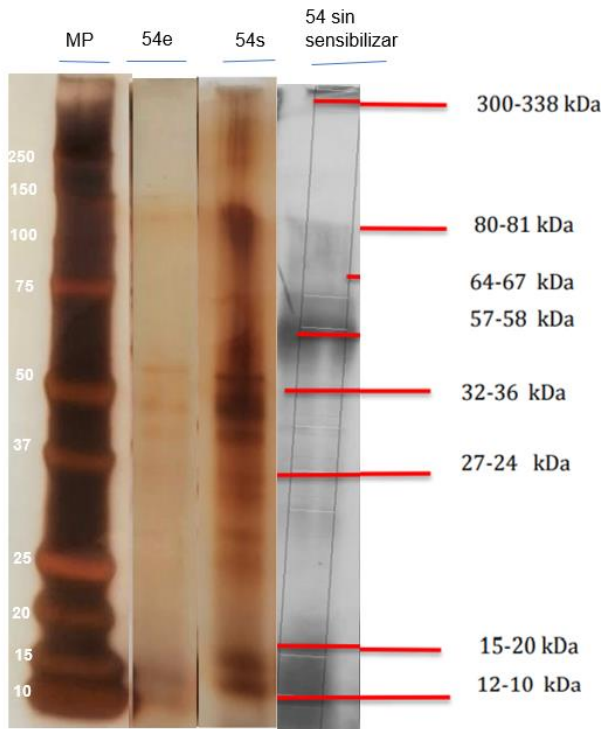


Las flechas señalan las bandas con sus diferentes pesos

### 6.4.3 Diferencias entre MVs enfrentadas a *E.coli* con MVs enfrentadas a *S. enterica* serovar Typhimurium.

La **Ilustración 31**, muestra las diferencias en los patrones proteicos de las MVs de la cepa de campo 54 de *L. acidophilus*, expuesta a *E. coli* 10<sup>8</sup> (54e), expuesta a *S. enterica* serovar Typhimurium 10<sup>9</sup> (54s) y la cepa sin exponer a estas bacterias enteropatógenas. Mientras que la **Tabla 6.0** muestra con color verde, los pesos moleculares de las proteínas que se expresaron cuando *L. acidophilus* fue sensibilizada a *E. coli* y *S. enterica* serovar Typhimurium respectivamente.

**Ilustración 31.** SDS-PAGE 12% con tinción de plata de MVs de la cepa de campo 54 de *L. acidophilus*



La ilustración de la cepa sin sensibilizar se tomó de Guitiérrez, V. 2020

**Tabla 6.0** Diferencias en los patrones proteicos de las cepas sensibilizadas

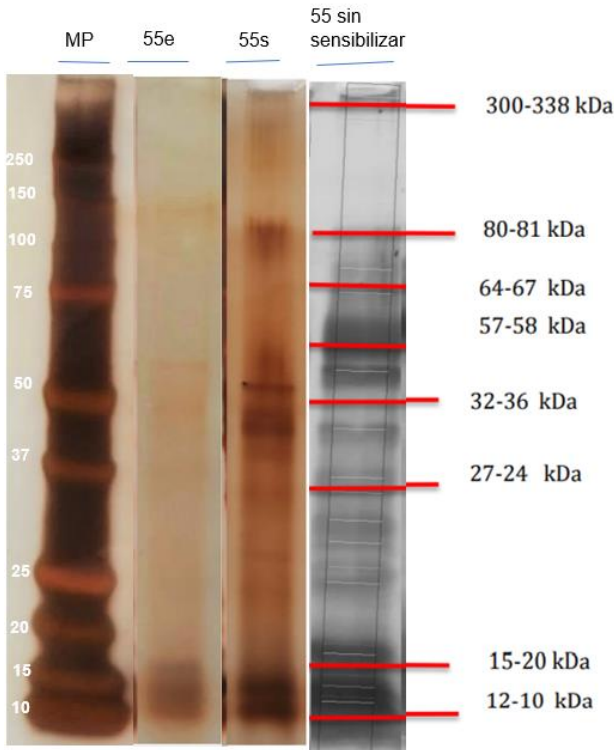
CEPA	
54	
54e	54s
10	10
15	15
	25
	33
	35
37	37
44	44
54	
	59
	70
	150

Los patrones proteicos diferentes se muestran coloreados de verde

Los patrones identificados en la cepa de campo *L. acidophilus* previa a la sensibilización, coinciden con los de la cepa expuesta a *S. enterica* serovar Typhimurium 10<sup>9</sup>. Así mismo, se observa una menor cantidad de proteínas expresadas en la cepa expuesta a *E. coli* 10<sup>8</sup>.

La **Ilustración 32** muestra las diferencias en los patrones electroforéticos de las MVs de la cepa de campo 55 de *L. pentosus* expuestas a *E. coli* 10<sup>8</sup> (55e), expuesta a *S. enterica* serovar Typhimurium 10<sup>9</sup> (55s) y la cepa sin sensibilizar. Mientras que la **Tabla 7.0**, marca con color rosa las proteínas expresadas por *L. pentosus* expuesta a *E. coli* y *S. enterica* serovar Typhimurium.

**Ilustración 32.** SDS-PAGE 12% con tinción de plata de MVs de la cepa de campo 55 de *L. pentosus*



La ilustración de la cepa sin sensibilizar se tomó de Guitiérrez, V. 2020

**Tabla 7.0** Diferencias en los patrones proteicos de las cepas sensibilizadas

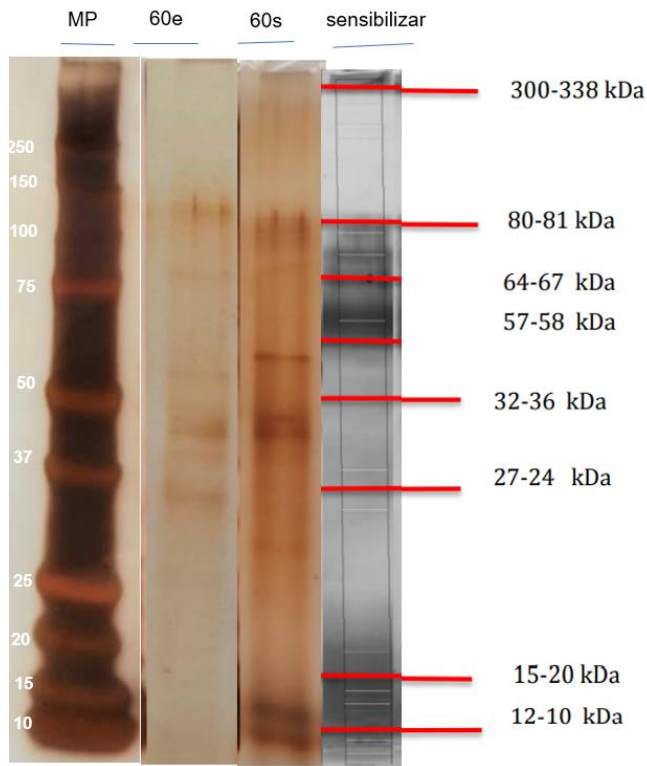
CEPA	
55	
55e	55s
10	10
15	15
	25
	30
	35
37	37
	44
	46
	48
50	50
	53
	58
	72
	100
	150

Los patrones proteicos diferentes se muestran coloreados de rosa

En este caso, las cepas de BAL expuestas a bacterias enteropatógenas, comparten la expresión de ciertas proteínas, con la cepa previamente sensibilizada. Sin embargo, las cepas sensibilizadas muestran proteínas únicas, que no comparten con ninguna otra.

Por otro lado, la **Ilustración 33**, muestra las diferencias de los patrones proteicos de las MVs de la cepa de campo 60 de *L. plantarum* de colon, respecto a las cepas sensibilizadas con *E. coli* 10<sup>8</sup>, *S. enterica* serovar Typhimurium 10<sup>9</sup> y la cepa sin sensibilizar. La expresión de proteínas diferentes entre estas, se marcaron de color gris en la **Tabla 8.0**.

**Ilustración 33.** SDS-PAGE 12% con tinción de plata de MVs de la cepa de campo 60 de *L. plantarum* de colon



La ilustración de la cepa sin sensibilizar se tomó de Gutiérrez, V. 2020

**Tabla 8.0** Diferencias en los patrones proteicos de las cepas sensibilizadas

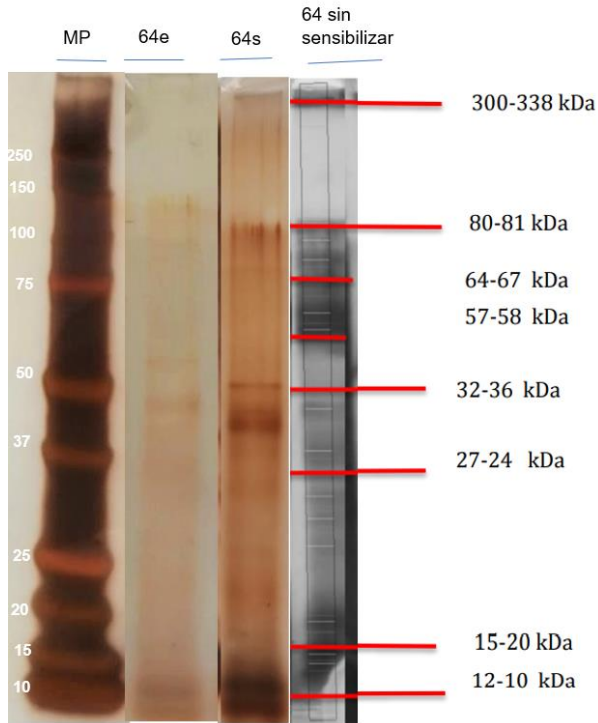
60	
60e	60s
10	10
15	15
25	25
37	37
44	40
50	50
60	60
75	75
110	110

Los patrones proteicos diferentes se muestran coloreados de gris

Se encontraron grandes diferencias en la expresión de proteínas, entre las cepas expuestas a bacterias enteropatógenas. La cepa previa a la sensibilización; comparte algunos patrones proteicos, sin embargo, las cepas sensibilizadas cuentan con patrones únicos respectivamente.

La **Ilustración 34**, muestra las diferencias en los corrimientos electroforéticos de las MVs de la cepa de campo 64 de *L. plantarum* de recto, expuestas a *E. coli* 10<sup>8</sup>, *S. enterica* serovar Typhimurium 10<sup>9</sup>, con las cepas no sensibilizadas. La **Tabla 9.0** marca con color azul, las diferentes proteínas.

**Ilustración 34.** SDS-PAGE 12% con tinción de plata de MVs de la cepa de campo 64 de *L. plantarum* de colon



La ilustración de la cepa sin sensibilizar se tomó de Gutiérrez, V. 2020

**Tabla 9.0** Diferencias en los patrones proteicos de las cepas sensibilizadas

64	
64e	64s
10	10
15	15
25	25
	<b>32</b>
37	37
	<b>40</b>
<b>44</b>	<b>47</b>
50	50
	<b>55</b>
<b>60</b>	
<b>75</b>	
<b>110</b>	

Los patrones proteicos diferentes se muestran coloreados de azul

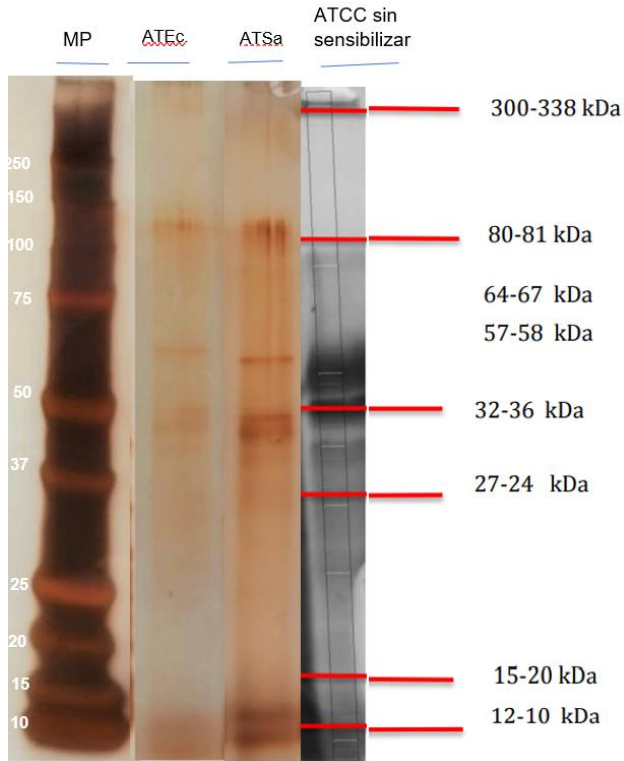
Las cepas de BAL expuestas a las bacterias enteropatógenas, contienen patrones proteicos diferentes entre sí y también diferentes a la cepa previa a la sensibilización.



Por último, la **Ilustración 35** muestra los diferentes patrones electroforéticos de la cepa de referencia *L. acidophilus* ATCC 314 expuesta a *E.coli* 10<sup>8</sup> (ATEc), *S. enterica* serovar Typhimurium 10<sup>9</sup> (ATSa), con la cepa de referencia sin sensibilizar. Mientras que la **Tabla 10.0**, muestra en color amarillo la diferencia en las proteínas expresadas.

**Ilustración 35.** SDS-PAGE 12% con tinción de plata de MVs de la cepa de referencia *L. acidophilus* ATCC 314

**Tabla 10.0** Diferencias en los patrones proteicos de las cepas sensibilizadas



ATCC	
ATEc	ATSa
10	10
15	15
37	
44	44
54	50
59	59

Los patrones proteicos diferentes se muestran coloreados de azul

La ilustración de la cepa sin sensibilizar se tomó de Gutiérrez, V. 2020

Las MVs de la cepa de referencia, al igual que las cepas de campo sensibilizadas expresaron proteínas únicas, que no posee la cepa sin sensibilizar. Así mismo, existe una diferencia en los patrones obtenidos entre las cepas expuestas a *E. coli*, con respecto a la cepa expuesta a *S. enterica* serovar Typhimurium.

### 6.5 Prueba de inhibición de difusión en agar semisólido de cepas enteropatógenas contra MVs de BAL.

Una vez que las MVs de BAL previamente estimuladas, se administraron al medio SIM adicionado con *S. enterica* serovar Typhimurium  $10^2$  y *E. coli*  $10^2$ , se incubaron 24hrs/37.5°C para posteriormente mantenerse 48hrs. a 4°C, observándose los siguientes resultados.

Tanto las cepas inoculadas con *S. enterica* serovar Typhimurium  $10^2$  como las inoculadas con *E. coli*  $10^2$ , mostraron diferentes halos de inhibición, observándose zonas circulares translúcidas de aproximadamente 1-3cm de diámetro, alrededor de los sensidiscos. Estos halos variaron de tamaño, según la concentración de MVs administradas, los sensidiscos adicionados con 25µg de proteína, muestran halos de inhibición de menos de 1cm de diámetro a diferencia de los sensidiscos adicionados con 75 µg de proteína, los cuales desarrollaron halos de más de 3cm de diámetro.

Por otro lado, las C.C de *L. acidophilus* ATCC 314, ya sea expuesta a *E. coli* (ATEc) o a *S. enterica* serovar Typhimurium (ATSa), mostraron un efecto inhibitorio total sin importar la concentración a la que se sometiera. Las MVs de la cepa que mostró tener un efecto inhibitorio mayor, sin importar la concentración adicionada y tomando como criterio el tamaño del halo, fue la cepa 54 de *L. acidophilus* de íleon, enfrentada tanto a *S. enterica* serovar Typhimurium como a *E. coli*. Mientras que el "Pool", no mostró diferencias significativas comparado con la evaluación de cada cepa.

**Ilustración 36.** Medio SIM con *E.coli* y sensidiscos adicionados con 25µg de MVs de BAL, a 48hrs a 4°C.



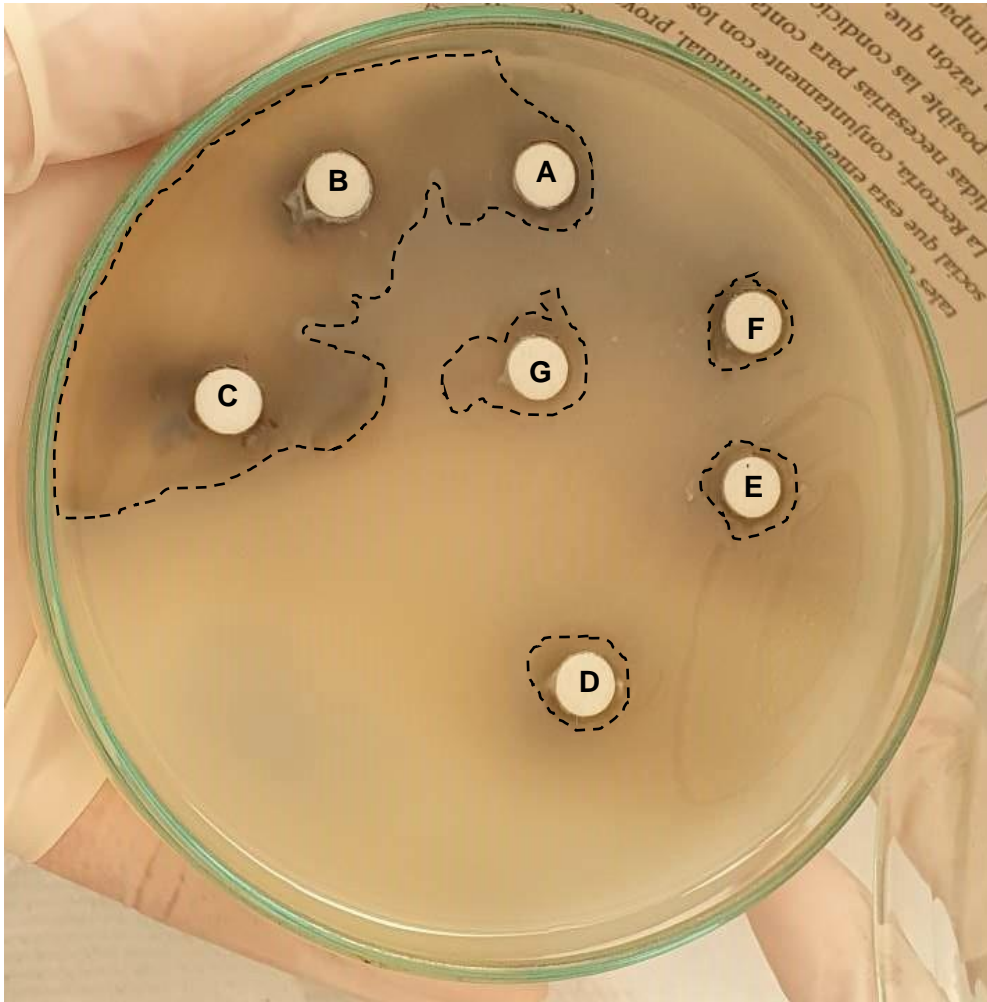
**A)** MVs de 54e de *L. acidophilus* de íleon **B)** MVs de 55e de *L. pentosus* de ciego  
**C)** MVs de 60e de *L. plantarum* de colon **D)** MVs de 64e de *L. plantarum* de recto  
**E)** MVs de *L. acidophilus* ATEc **F)** C.C de *L. acidophilus* ATEc **G)** MVs de POOL

**Ilustración 37.** Medio SIM con *E.coli* y sensidiscos adicionados con 50 µg de MVs, 48hrs post refrigeración.



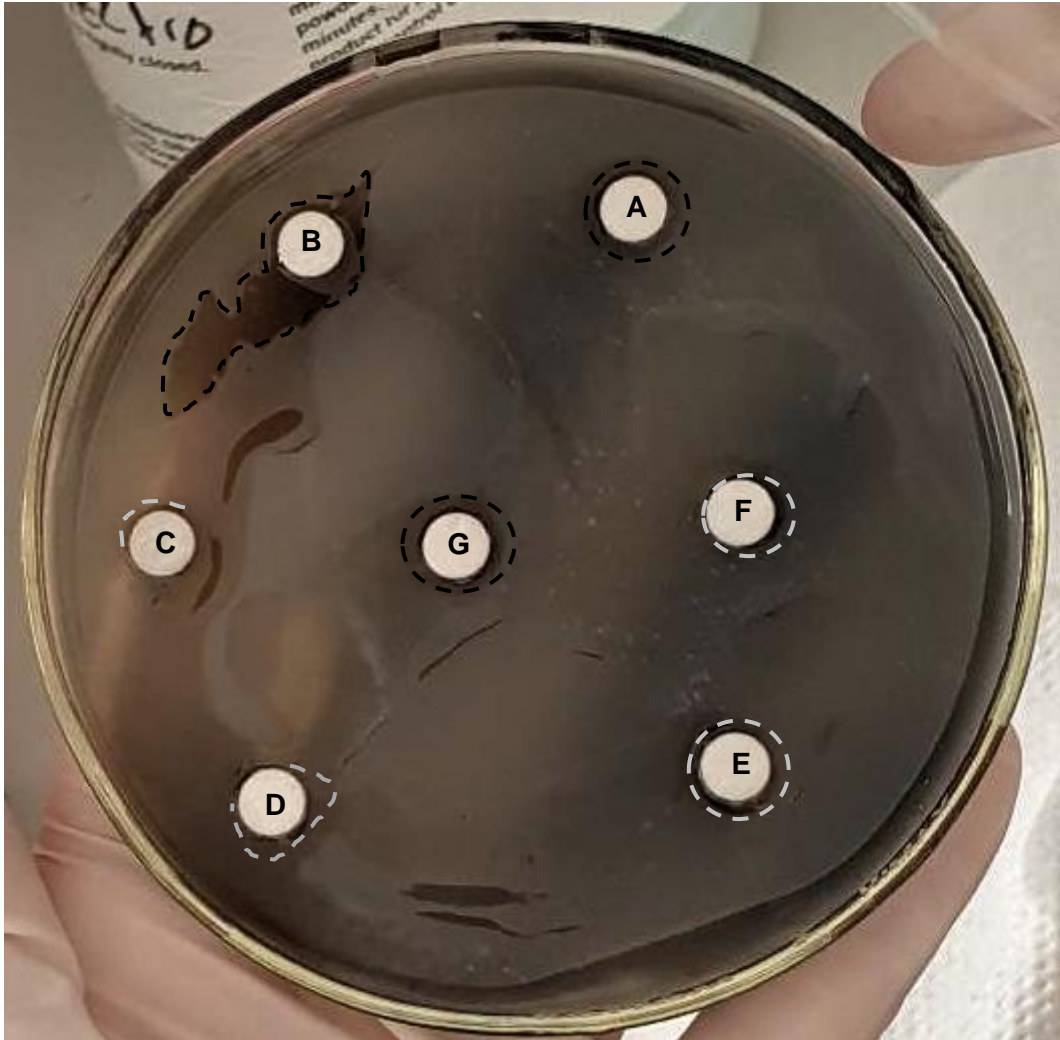
**A)**MVs de 54e de *L. acidophilus* de íleon **B)**MVs de 55e de *L. pentosus* de ciego  
**C)**MVs de 60e de *L. plantarum* de colon **D)**MVs de 64e de *L. plantarum* de recto  
**E)**MVs de *L. acidophilus* ATEc **F)**C.C de *L. acidophilus* ATEc **G)** MVs de POOL

**Ilustración 38.** Medio SIM con *E.coli* y sensidiscos adicionados con con 75µg de MVs 48hrs. post refrigeración.



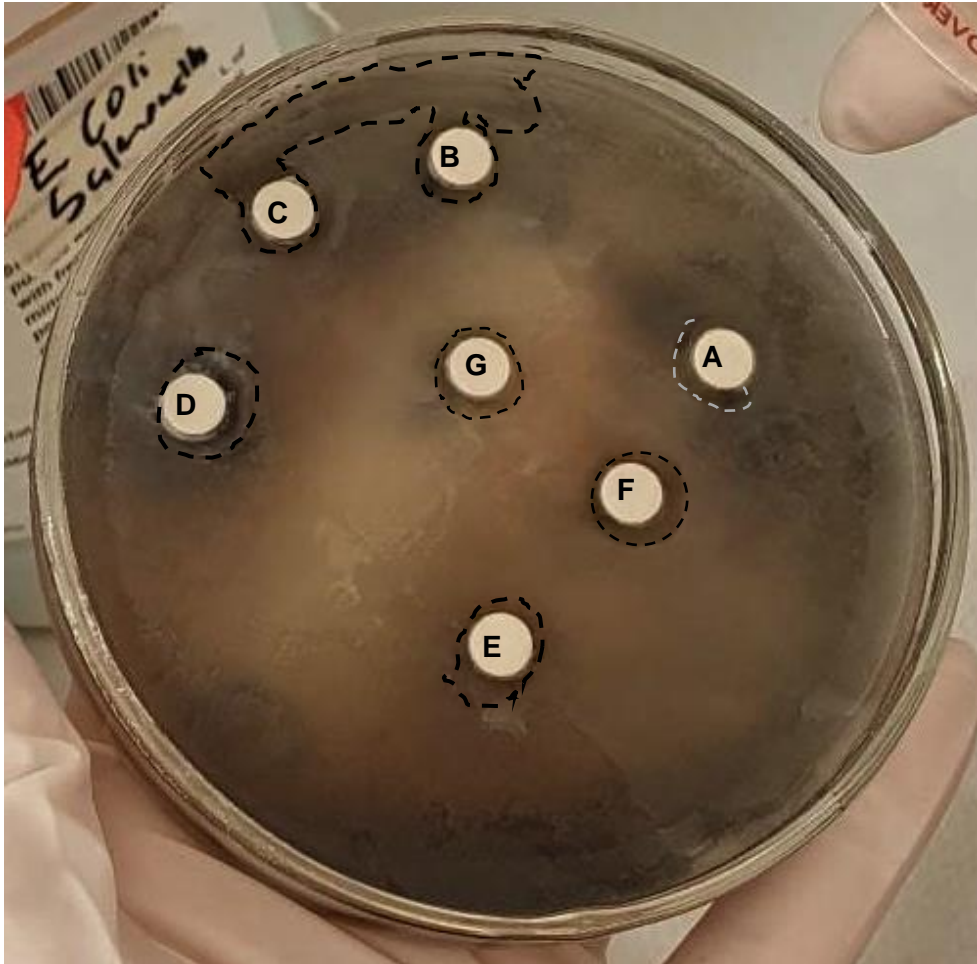
**A)** MVs de 54e de *L. acidophilus* de íleon **B)** MVs de 55e de *L. pentosus* de ciego **C)** MVs de 60e de *L. plantarum* de colon **D)** MVs de 64e de *L. plantarum* de recto **E)** MVs de *L. acidophilus* ATEc **F)** C.C de *L. acidophilus* ATEc **G)** MVs de POOL

**Ilustración 39.** Medio SIM con *S. enterica* serovar Typhimurium y sensidiscos adicionados con con 25µg de MVs 48hrs. post refrigeración.



**A)** MVs de 54s de *L. acidophilus* de íleon **B)** MVs de 55s de *L. pentosus* de ciego  
**C)** MVs de 60s de *L. plantarum* de colon **D)** MVs de 64s de *L. plantarum* de recto  
**E)** MVs de *L. acidophilus* ATSa **F)** C.C de *L. acidophilus* ATSa **G)** MVs de POOL

**Ilustración 40.** Medio SIM con *S. enterica* serovar Typhimurium y sensibilizados con 50 µg de MVs 48hrs. post refrigeración.



**A)** MVs de 54s de *L. acidophilus* de íleon **B)** MVs de 55s de *L. pentosus* de ciego  
**C)** MVs de 60s de *L. plantarum* de colon **D)** MVs de 64s de *L. plantarum* de recto  
**E)** MVs de *L. acidophilus* ATSa **F)** C.C de *L. acidophilus* ATSa **G)** MVs de POOL

**Ilustración 41.** Medio SIM con *S. enterica* serovar Typhimurium y sensidiscos adicionados con 75µg de MVs 48hrs. post refrigeración.



**A)** MVs de 54s de *L. acidophilus* de íleon **B)** MVs de 55s de *L. pentosus* de ciego  
**C)** MVs de 60s de *L. plantarum* de colon **D)** MVs de 64s de *L. plantarum* de recto  
**E)** MVs de *L. acidophilus* ATSa **F)** C.C de *L. acidophilus* ATSa **G)** MVs de POOL



## VII. Discusión.

Como se ha mencionado a lo largo del presente trabajo experimental, las MVs de las bacterias en general, han demostrado similitudes estructurales con respecto a las células completas de origen. Ya que estas derivan de la membrana externa y durante su formación, los componentes periplasmáticos de la bacteria, así como proteínas y biomoléculas quedan atrapadas en la luz de las MVs (Yáñez y colaboradores, 2015). En ese sentido, todas las cepas de BAL de campo utilizadas en este trabajo, 54 *L. acidophilus* de íleon, 55 *L. pentosus* de ciego, 60 *L. plantarum* de colon y 64 *L. plantarum* de recto producen MVs, bajo condiciones de ausencia de CO<sub>2</sub>, como factor estresor. Demostrando que dichas estructuras, tienen efecto inhibitorio sobre las cepas de *E.coli* y *S. enterica* serovar Typhimurium similar a la reportada por las células completas de origen.

Otros autores reportan las facultades benéficas de las BAL, privilegiando su efecto inhibitorio sobre patógenos gastrointestinales. Piper y Leyva en 2009, demostraron que las células vivas de diferentes especies de *Lactobacillus*, entre ellas *L. acidophilus* ATCC 314, son capaces de inhibir a bacterias enteropatógenas, al utilizar una técnica de sándwich, en la cual incubaron en 5 ml de caldo MRS la cepa *L. acidophilus* ATCC 314, al que posteriormente agregaron 9 ml de MRS derretido, conteniendo aproximadamente  $1.0 \times 10^8$  microorganismos/ml. Una vez que esta capa solidificó, se agregó una segunda capa de agar derretido y se dejó incubar por 24hrs. Se agregó 1 ml de una suspensión de *E.coli* con aproximadamente  $1 \times 10^9$  microorganismos/ml en medio TSB y se incubó por 24hrs. Demostrando que las cepas de BAL pueden inhibir en pruebas *in vitro*, tanto a *E. coli* enterotoxigénica como a *E. coli* enterohemorrágica.

Por otra parte, Konings en 2002, menciona que las BAL en su membrana citoplasmática, poseen mecanismos de defensa para enfrentar medios hostiles y sobrevivir a ellos, parte de estos mecanismos consisten en la expresión de genes que sintetizan proteínas, por ejemplo las proteínas PBP (penicilin- binding proteins), las cuales influyen en la síntesis de PG.

Por lo anterior, uno de los experimentos desarrollados en el presente trabajo, fue sensibilizar BALs con *S. enterica* serovar Typhimurium y *E. coli* respectivamente, utilizando un medio no específico para BAL, con la finalidad de estresarla, para favorecer la expresión de proteínas antigénicas en dichas condiciones. Con este experimento se observó, que tanto las cepas de referencia, como las de campo, fueron capaces de inhibir el crecimiento de las cepas enteropatógenas, posiblemente por la expresión de genes y la producción de proteínas que les permite enfrentar el medio hostil en el que se desarrollan. Esto es un punto importante para la producción de MVs, ya que esto constituye el acarreo de componentes estructurales, tanto de la membrana celular, como de aquellas proteínas que se encuentren en tránsito entre el citoplasma y la membrana externa. (Yáñez y colaboradores, 2015)

Por otro lado, las cepas de BAL que se sometieron a la presencia de *S. enterica* serovar Typhimurium y *E. coli*, desarrollaron alteraciones morfológicas evidenciadas mediante tinción de Gram. En todos los casos, los bacilos alargados y delgados en su estructura, se modificaron a bacilos cortos y gruesos posterior a la sensibilización con las cepas enteropatógenas antes mencionadas. En ese sentido, Piuri y colaboradores en 2004,

sometieron a *L. casei* ATCC 393 a estrés, agregando cloruro de sodio al medio de cultivo. Al visualizar la bacteria con un microscopio electrónico de transmisión, notaron que se formó una tercera capa externa a la que llamaron “capa de no peptidoglicano”, asimismo, con el software de análisis de imagen Fuji LAS 1000 CCD, midieron el diámetro de las células, las cuales aumentaron su tamaño, pasando de  $415\pm 20$  nm de contorno celular de diámetro a  $660\pm 60$  nm de diámetro. Lo cual evidenció la capacidad de las BAL, para desarrollar modificaciones morfológicas que les permitan adaptarse a un medio hostil y sobrevivir, tal y como se observó en el presente trabajo, al realizar los ensayos de sensibilización. Estos autores mencionan, que las bacterias experimentan transformaciones morfológicas, como parte de su ciclo de vida normal, factores como el estrés conducen a variaciones similares. La modificación observada tras someter a la bacteria a una osmolaridad alta, es una adaptación que puede estar relacionada con la presencia de grupos O-acetilo, ya que estos están relacionados a la resistencia de lisis por hidrolasas; estos protegen a las hebras de PG de la actividad lítica de autolisinas, contrarrestando el estrés a la pared celular. A su vez, estas alteraciones externas conllevan a una modificación en la composición bioquímica de la membrana, ya que las proteínas PBP (penicilin- binding proteins) se translocan a través de la membrana y acarrear glicotransferasas y transpeptidasas, que se requieren para la síntesis de peptidoglicano y de este modo cambian la estructura de su pared, en función de la osmolaridad externa. Lo anterior, explica los cambios observados en la morfología de las cepas de BAL utilizadas en este experimento.

La producción de MVs en todas las cepas de BAL evaluadas, se determinó en función de la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. En ese sentido, en este trabajo se observó, una diferencia de proteína obtenida a partir de MVs recuperadas de cepas en condiciones normales con respecto a MVs recuperadas a partir de cepas estresadas por el método de sensibilización. La cantidad de proteína obtenida de la cepa de referencia bajo condiciones normales de cultivo, fue de  $559.03 \mu\text{g/ml}$ . Tras haber realizado la sensibilización con *S. enterica* serovar Typhimurium  $10^9$ , la cuantificación de proteína resultó de  $819.95 \mu\text{g/ml}$ . Las cepas de campo no fueron la excepción, pues la cepa 54 en condiciones normales se obtuvieron  $269.05 \mu\text{g/ml}$  y tras la sensibilización con *S. enterica* serovar Typhimurium  $10^9$ , se obtuvieron  $1079.13 \mu\text{g/ml}$ . Estos resultados se deben, a que las bacterias bajo estrés producen una mayor cantidad de MVs (Karapakis, 2020). Este efecto está bien reportado en Gram negativas, González en 2007 demostró que estresar a los cultivos de *M. haemolytica* serotipo 1, al adicionar  $20\mu\text{l/ml}$  de gentamicina, se exacerbó la producción y liberación de las MVs. Sin embargo, para las Gram positivas no existe reporte de factores estresores en el medio de cultivo que favorezcan el aumento de la producción de MVs. El presente trabajo es el primer reporte del efecto de la ausencia de  $\text{CO}_2$ , así como de la sensibilización de las células completas de BAL con *E. coli* y *S. enterica* serovar Typhimurium para inducir una mayor producción de MVs.

Min-Hye y colaboradores en 2018, mencionan que las MVs de *L. plantarum* se aprecian en la microscopia electrónica de transmisión (MET), como una bicapa lipídica en forma de esfera, cuyo diámetro oscila entre los 20 y los 100nm de diámetro. En este trabajo, dicha información se corroboró, ya que la MET evidenció la doble membrana de estas estructuras, además de observarse múltiples MVs con un diámetro menor a los 100nm. Mientras que para las cepas de *L. acidophilus*, Dean en 2020 menciona que estas tienen un diámetro entre 10 a 300nm, en el presente trabajo observamos que tanto la cepa de

referencia como la cepa de campo, cumplen con este criterio, ya que las MVs que se obtuvieron eran de un diámetro menor a los 200nm.

Cabe mencionar, que este proyecto es el primer reporte de producción de MVs de *L. pentosus* aislada de ciego de *Rattus norvegicus* de vida libre y evidenciada mediante MET. Esta bacteria se identificó mediante API Web 50CHL, resultando en un 99% de identidad para este género y especie. Uña y colaboradores en 2017, señalan que *L. pentosus* se omitió de las Listas Acreditadas de Nombres Bacterianos y fue incluida como *L. plantarum*. Sin embargo, en 1987, se demostró a través de estudios moleculares y bioquímicos, que las cepas aisladas del forraje de maíz conservado en silo, designadas como *L. pentosus*, eran distintas de *L. plantarum*. Asimismo, agregan que los probióticos más empleados en la producción animal son *L. acidophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que *L. pentosus* solo se menciona para el caso de equinos. Dicha situación, explica porque no se encontró bibliografía que reporte la producción de MVs por parte de esta especie bacteriana. Sin embargo, es importante no olvidar que en todos los dominios de la vida, Eucarionte, Archaea y Procarionte, las células producen y liberan material unido a la membrana, recibiendo diferentes nombres como, exosomas o microvesículas. (Schwechheimer y Kuehn, 2015, Brown y colaboradores, 2015).

Los sistemas de transporte de tipo ABC, presentes en bacterias Gram positivas y Gram negativas, se encargan tanto de la internalización como de la secreción de muchas sustancias, como antibióticos, aminoácidos, péptidos y proteínas, azúcares y bacteriocinas; además de intervenir en numerosos procesos celulares y de regulación. Estos sistemas de transporte poseen una proteína accesoria localizada en el citoplasma, de la cual no se conoce la función exacta. Sin embargo, se sabe que en Gram positivas, resultan indispensables para la secreción de algunas bacteriocinas. (Campanero, 2018)

El planteamiento anterior queda corroborado, con la evidencia arrojada en la electroforesis, de la cepa *L. acidophilus* tanto de referencia como de campo, en donde se observaron bandas proteicas de 44, 54 y 59 kDa, que de acuerdo con el experimento realizado por Dean y colaboradores en 2019, son coincidentes con la presencia de transportadores ABC, que transportan bacteriocinas. Asimismo, esto confirma lo mencionado nuevamente por Dean y colaboradores en 2020, quienes mencionan que las MVs de la cepa *L. acidophilus*, son capaces de acarrear bacteriocinas.

Por otra parte, Cibik y Chapot en 2004, caracterizaron las PGH de las C.C de *L. pentosus* mediante corrimiento SDS-PAGE 10% y usando células de *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato, en el cual obtuvieron una PGH con un peso molecular de 58kDa. Durante este experimento, tanto las C.C como las MVs de esta BAL, mostraron un componente del mismo peso molecular; este hecho también evidencia que las MVs son capaces de acarrear componentes de las C.C en su interior. Esto último queda confirmado por Li y colaboradores en 2017, quienes realizaron un análisis ontológico genético a las MVs de *L. plantarum* y encontraron que más de la mitad de las proteínas que esta contenía, estaban asociadas a la membrana de la bacteria de la cual se originaban.

Maldonado y colaboradores en 2003, mencionan que el género *Lactobacillus* posee varios componentes antibacterianos, entre ellos las bacteriocinas. Se ha sugerido que los factores ambientales pueden jugar un papel importante en la regulación y en la producción de bacteriocinas, este efecto de inducir mecanismos para la producción de péptidos ha sido

reportado en *L. sakei*, *L. plantarum*, *Carnobacterium piscícola* y *Enterococcus faecium*. En su trabajo llegaron a la conclusión que *L. plantarum* NC8 a través de un co-cultivo con *Lactococcus lactis* MG1363, logró producir la plantaricina NC8.

Por otra parte, Castro en 2020, realizó un co-cultivo de *L. reuteri* con *E. coli*, al sembrar una colonia de *L. reuteri* en TSB, con *E. coli*, resultando en una disminución en la población de *E. coli*. Así mismo, el co-cultivo alcanzó el máximo crecimiento en 10.77 hrs, mientras que un cultivo de *E. coli* solitario, lo alcanzó en 1.89 hrs.

El presente trabajo, mostró una diferencia en las proteínas expresadas mediante de SDS-PAGE al 12% tanto en las cepas expuestas, como las cepas sin exponer. Esto puede deberse a que en las pruebas de sensibilización, las C.C al encontrarse en un medio ambiente hostil con las cepas enteropatógenas, generó una respuesta de supervivencia en las BAL, que fue sintetizar proteínas (Konings, W. 2002) y péptidos capaces de inhibir a las cepas enteropatógenas; las BAL al producir MVs, arrastraron componentes del citoplasma en su interior.

Las bacterias del género *Lactobacillus*, pueden producir sustancias antimicrobianas para inhibir el crecimiento de diversos patógenos (Li, M. 2017); un trabajo en ese sentido, es el realizado por Larrea en 2007, quién evaluó el potencial antimicrobiano de diferentes cepas de BAL, entre ellas *L. acidophilus* y *L. plantarum* sobre *E. coli*, *S. enteritidis* y *S. dysenteriae*, las cuales mostraron tener, en concentraciones bajas, un efecto bacteriostático y a dosis altas un efecto bactericida. Entre los componentes que generan este efecto antibacteriano se encuentran las bacteriocinas, las cuales forman poros en la membrana de microorganismos patógenos (Li, M. 2017). En este trabajo, encontramos que las MVs de BAL son capaces de tener un efecto inhibitorio, dependiente de la cantidad de MVs administrada, en donde a mayor cantidad, mayor es el halo de inhibición. Como se mencionó anteriormente, las MVs de la cepa *L. acidophilus* son capaces de acarrear bacteriocinas (Dean et. al, 2020), este experimento confirma que las MVs de las cepas de *L. plantarum* y *L. pentosus*, también son capaces de acarrear dichos componentes. Sin embargo, en este proyecto solo se identificaron las proteínas acarreadas por MVs de BAL, mediante SDS-PAGE al 12%, y se definió su función con base a los pesos moleculares reportados en la bibliografía.

En ese sentido, Hong y colaboradores en 2020, reportaron que las MVs de *L. plantarum* al ser administradas en diferentes concentraciones sobre filetes de atún y sobre pruebas de difusión en agar, se observó que en ambos casos, las concentraciones de MVs de *L. plantarum*, inhibieron el crecimiento de *Shewanella putrefaciens*, observándose un efecto inhibitorio mucho más contundente, cuando aumentaba la concentración de MVs, siendo esta proporcional al tamaño del halo desarrollado en el agar.

Larrea en 2007, al exponer sobrenadantes de 24hrs. de incubación de *L. plantarum* y *L. acidophilus*, obtuvo que la cepa *L. acidophilus*, posee un mayor efecto bactericida contra *S. enteritidis* en comparación a *L. plantarum*. El presente proyecto de investigación arrojó resultados similares, al ser *L. acidophilus* la cepa que presentó un mayor tamaño en sus halos de inhibición, cuando esta se probó en una cama de agar Muller-Hinton, con una capa de medio semisólido SIM sembrado con una dilución de  $10^2$  de *E. coli* y *S. enterica* serovar Typhimurium.

Por otro lado, el POOL de MVs el cual contenía a las 4 cepas de campo (54 *L. acidophilus* de íleon, 55 *L. pentosus* de ciego, 60 *L. plantarum* de colon y 64 *L. plantarum* de recto) no tuvo un efecto inhibitorio exacerbado, en comparación a los halos que desarrollaron las cepas evaluadas de forma individual. La hipótesis era, que la suma de MVs de los diferentes géneros de BAL evaluados, podrían tener un efecto potencialmente inhibitorio sobre los cultivos de *E. coli* y *S. enterica* serovar Typhimurium, situación que no sucedió. Esto puede deberse, a que los componentes arrastrados en las MVs de los diferentes géneros de BAL evaluados, podrían haber generado un efecto inhibitorio entre ellas mismas. Lonvaud y Joyeux en 1993, cultivaron en caldo *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Leuconostoc oenos*, resultando en una disminución de la densidad celular. Sin embargo, las células no murieron, por lo que se entiende que solo inhibieron su crecimiento de forma mutua.

Por último, los halos de inhibición desarrollados en los cultivos de *E. coli* y *S. enterica* serovar Typhimurium, enfrentados a las MVs de BAL, evidenciaron un halo de aproximadamente 3 cm a 5 cm de diámetro. Cabe mencionar que el volumen de MVs, en algunos casos rebasó el fondo de los pozos, ocasionando un derrame en la superficie de la caja. Sin embargo, fue clara la inhibición de crecimiento de los patógenos evaluados, sobre del área en la cual se esparció el contenido de MVs. Así mismo es importante mencionar, que después 6 meses, las cajas de cultivo de este experimento no desarrollaron ningún tipo de contaminación bacteriana, ni fungal, manteniéndose intactos los pozos que contenían las MVs de las diferentes cepas de BAL. De este experimento en particular, se intentaron realizar repeticiones, sin embargo, debido a la situación actual de la pandemia COVID 19, esto fue imposible. Por otro lado, se hizo un estimado del tamaño del halo de inhibición y se comparó con las pruebas de difusión en agar de los antibióticos que comúnmente son utilizados, para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Para considerar que una bacteria enteropatógena es susceptible a 250-300µg de sulfonamidas, se debe desarrollar un halo de inhibición igual o mayor a 17mm (CLSI, 2017). En el presente proyecto se tomó como punto de comparación, la cepa *L. pentosus* (**Letra B**) en medio SIM con *E. coli*, enfrentado a 75 µg/60 µl de MVs en un pozo (**Ilustración 38**), obteniendo un halo de inhibición de 25mm, es decir que a mayor concentración de MVs, posee mayor actividad bactericida. Esto se traduce en una enorme ventaja, en relación al uso continuo de antibióticos, que generan el desarrollo de alta resistencia a los mismos, además que la eliminación de estos al medio ambiente, es escasamente biodegradable (Wolf, 2004). Como se mencionó anteriormente, las BAL ofrecen grandes beneficios al organismo que colonizan, pero la presencia de estos puede verse afectada por la administración indiscriminada de antibióticos (Satokari, 2002).

## VIII. Conclusiones.

- Las BAL sometidas a sensibilización de *E. coli* 10<sup>8</sup> y *S. enterica* serovar Typhimurium 10<sup>9</sup>, son capaces de cambiar su morfología para sobrevivir al medio y producir una mayor cantidad de MVs.
- Las MVs de BAL obtenidas a partir de C.C previamente sensibilizadas por *E. coli* 10<sup>8</sup> y *S. enterica* serovar Typhimurium 10<sup>9</sup>, expresaron un mayor número de proteínas a diferencia de las que no fueron sensibilizadas.
- Este es el primer artículo que demuestra que la cepa de campo número 55 de *L. pentosus*, es capaz de producir MVs.
- Las MVs acarrean componentes presentes en las Células completas de origen, entre ellos se encuentran los sistemas de transporte de tipo ABC, los cuales juegan un papel importante para la secreción de bacteriocinas.
- Las MVs, tanto de las cepas de campo como de referencia, fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* de campo y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 154 mediante prueba de difusión en agar.
- El efecto inhibitorio de las MVs de BAL es proporcional a la concentración administrada.
- El efecto inhibitorio de las MVs de BAL, se anula cuando se administran de manera conjunta.

## IX. Referencias bibliográficas.

BD.; “Instrucciones de uso- BD MacConkey II agar”. 2014. Disponible en: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8770>

Brown, L., Wolf, J., Prados, R., Casadevall, A.; “Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi”. Nature Reviews Microbiology. 2015.

Campanero, C.; “Caracterización bioquímica y genética de la infantaricina A: una nueva bacteriocina antineumocócica producida por la cepa de origen lácteo *Streptococcus infantarius* subesp. *Infantarius LP90*” Memoria para optar al grado de Doctora. Universidad Complutense de Madrid. 2018.

Castro, Al.; “Cultivo de *Lactobacillus reuteri* en solitario y en cocultivo con *Escherichia coli* a 37°C”. Trabajo de fin de grado. Universidad de Valladolid. 2020

Cerviño, M., Guijarro, R., Calvo, E.; “Eficiencia clínica del florfenicol en el tratamiento de la diarrea del ternero joven”. Mundo ganadero. 2002

Chapot, M., Kulakauskas, S.; “Cell wall structure and function in lactic acid bacteria” Microbial cell factories. 2014.

Cibik, R. & Chapot, C.; “Characterisation of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*”. Letters in Applied Microbiology. Vol. 38. Pp 459-463. 2004.

CLSI.; “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing”. Edición 27. 2017.

COFEPRIS Y SENASICA; “Secuenciación genómica de cepas de *Salmonella* spp. Aisladas por la red nacional de laboratorios”. 2017. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225247/4\\_Programa\\_de\\_secuenciacion\\_genomica\\_de\\_salmonella\\_en\\_Mexico-\\_COFEPRIS\\_SENASICA.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225247/4_Programa_de_secuenciacion_genomica_de_salmonella_en_Mexico-_COFEPRIS_SENASICA.pdf)

Colegio oficial de veterinarios de Madrid.; “Zoonosis alimentarias, *E.coli* patogénico”. 2016

Contreras, M., Medrano, J., Ibarra, J., et al.; “Los últimos 50 años de salmonella en México: Fuentes de aislamiento y factores que influyen en su prevalencia y diversidad”. Revista Bio Ciencias. 2019.

Cross, L.; “Microbes Versus Microbes: Immune Signal Generated by Probiotic *Lactobacilli* and Their Role In Protection Against Microbial Pathogens”. FEMS Immunology and Medical Microbiology. Vol. 34, p.p 245-253. 2002.

Dean, S., Leary, D., Sullivan, C., et. Al; “Isolation and characterization of *Lactobacillus*-derived membrane vesicles”. SCIENTIFIC REPORT. 2019.

Dean, S., Rimmer, M., Turner, K., et. al.; "*Lactobacillus acidophilus* membrane vesicles as a vehicle of bacteriocin delivery". *Frontiers in Microbiology*. 2020. Disponible en: 10.3389/fmicb.2020.00710

Del Castillo, Y. "*Evaluación in vitro del efecto inhibitorio del sobrenadante de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 15313*". Tesis que para optar por el grado de maestra en Ciencias de la producción y de la salud animal. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. 2017.

Domínguez, P., Martínez, J., Marínez, D.; et. al.; "*Lactobacillus casei* BL23 produces microvesicles carrying proteins that have been associated with its probiotic effect". *Frontiers in Microbiology*. 2017.

FAO/ OMS.; "*Probióticos en los alimentos: propiedades saludables y nutricionales de directrices para la evaluación*". 2006. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf>

Flores, R.; "*Epizootiología de las salmonelosis en bovinos, porcinos y aves*". Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. 2000.

Fuentes, M., Londoño, A., Durango, M., et al.; "*Capacidad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas autóctonas aisladas de queso doble crema y quesillo colombiano*". *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. N° 1, Vol.15. Pp 45-52. 2017.

Gil, M., García, R., Castelló, R. "*Síndrome diarreico de corderos en explotaciones extensivas*". *Revista ganadera*. 2004.

Gullian, M.; "*Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus Vannamei**". Requisito Para Optar Al Grado De Magister En Ciencias Especialidad Acuicultura Marina. Escuela Superior Politécnica Del Litoral. Facultad De Ingeniería Marítima Y Ciencias Del Mar. 2001.

Gutiérrez, L., Montiel, E., Aguilera, P., González, M.; "*Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México*". *Salud Pública de México*. 1999. Disponible en: <http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/6270/7497>

Gutiérrez, V.; "*Identificación de bacteriocinas en Microvesículas (MVs) producidas por Bacterias Ácido-Lácticas (BAL), aisladas del tracto gastro intestinal (TGI) de *Rattus norvegicus**". Tesis que para optar por el título de Médica Veterinaria Zootecnista. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Autónoma de México. 2020.

Hernández, C., Aguilera, M., Castro, G.; "*Situación de las enfermedades gastrointestinales en México*". *Enfermedades infecciosas y microbiología*. Vol. 32, N° 4. Pp 137-145. 2011.

Hernández, L.; "Revisión bibliográfica. Agentes antimicrobianos". S.f. Disponible en: [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lia/hernandez\\_p\\_ld/capitulo4.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/hernandez_p_ld/capitulo4.pdf)

Hong, B., Ching, S., Long, T., et. al.; "*The applications of *Lactobacillus plantarum*-derived extracellular vesicles as a novel natural antibacterial agent for improving quality and safety in tuna fish*". *ELSEVIER. Food Chemistry*. 2020.



Kaparakis, M., Kufer, T.; "*Bacterial Membrane Vesicles: biogénesis, functions and applications*". Springer. Suiza. 2020.

Kim, J., Lee, J., Park, J., Song, Y. "*Gram-negative and Gram positive bacterial extracellular vesicles*". ELSEVIER. 2015

Kim, W., Jung, E., Hong, I., et. al.; "*Lactobacillus plantarum-derived extracellular vesicles induce anti-inflammatory M2 macrophage polarization in vitro*". Journal of Extracellular Vesicles. 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1793514>

Klimentová, J. "*Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria*". ELSEVIER. 2015.

Konings, W.; "*The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria*". University of Groningen, Department of Microbiology. 2002.

Larrea, H., Flórez, M. & Huapaya, J.; "*Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Parte I*". Horizonte Médico. Vol7, N°1. Pp 16-22. 2007.

Lazo, L.; "*Colibacilosis entérica porcina*". Feijóo. 2010

Li, M., Lee, K., Hsu, M., et. al.; "*Lactobacillus-derived extracellular vesicles enhance host immune responses against vancomycin-resistant enterococci*". BMC Microbiology. 2017. Disponible en: [10.1186/s12866-017-0977-7](https://doi.org/10.1186/s12866-017-0977-7)

Liu, Y.; Defourny, K.; Smid, E.; Abee, T.; "*Gram-Positive Bacterial Extracellular Vesicles and Their Impact on Health and Disease*". Front Microbiol. 2018.

Londoño. N.; Torres, M.; Áñvarés, C.; "*Bacteriocinas Producidas Por Bacterias Ácido Lácticas Y Su Aplicación En La Industria De Alimentos*". Alimentos Hoy, Revista De La Asociación Colombiana De Ciencia Y Tecnología De Alimentos. 2015.

Lonvaud, A. & Joyeux, A.; "*Antagonism between lactic acid bacteria of wines: inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus**". Food Microbiology. 1993.

López, J., Ochoa, A., Santoyo, G., et al.; "*Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos*". Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Vol. 39, N°3. Pp 49-57. 2008.

Lucena, M.; "*Respuesta del sistema inmune a bacterias probióticas*". Trabajo fin de Master. Universidad de Oviedo. 2016.

Maldonado, A., Jiménez, R. & Ruiz, L.; "*Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific Gram-positive bacteria is mediated by autoinduction mechanism*". Journal bacteriology. 2004.

Maroley, L., Espinoza, H.; "*Estructura bacteriana*". Revista de actualización clínica investiga, Vol.49. 2014.

Méndez, A., Maldonado, A., Ruíz, E., et al.; "*Enfermedades neonatales*". Unidad nacional de Ovinocultores. 2004.

Milena, S., Suárez,H., Zapata,S.; “Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne”. Revista chilena de nutrición. Vol.36, N°1. Pp 64-71. 2009.

Min-Hye, K., Jin, S., Pyo, J., et. al.; “Lactobacillus plantarum-derived extracellular vesicles protect atopic dermatitis induced by Staphylococcus aureus-derived extracellular vesicles”. Allergy, Asthma & Immunology Research. 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.4168/aaair.2018.10.5.516>

Mosquito, S., Ruíz, J., Bauer, J., Ochoa, T.; “Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en Escherichia coli asociadas a diarrea”. 2011. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v28n4/a13v28n4.pdf>

Muraca, M.; “Gut microbiota-derived Outer Membrane Vesicles: Under-recognized major player in health and disease?”. Discovery Medicine. (2015).

Murray,P., Rosenthal, K., Pfaller,M.; “Microbiología médica” 7ª edición. Ed. ELSEVIER SAUNDERS. Barcelona, España. Pp 109-113. 2013.

Olvera, M., Serrano, C., Quirasco, M.; “Detección de proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas”. Revista de la sociedad mexicana de biotecnología y bioingeniería A.C.Vol.19, N°1. Pp 25-40. 2015.

Organización Panamericana de la Salud; “Inocuidad de los alimentos- Control Sanitario HACCP”. Organización Mundial de la Salud. Disponible en: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10835:2015-peligros-introduccion&Itemid=41449&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10835:2015-peligros-introduccion&Itemid=41449&lang=es)

Piper, E. & Leyva, J.; “Growth inhibition of gastrointestinal strains of Escherichia coli by Lactobacillus species “. Journal of the Arizona- Nevada academy of Science. 2009. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2181/036.041.0203>

Pírez,M.; “Temas de bacteriología y virología médica”. Ed. Oficina del libro FEFMUR. Pp 24-36. 2006.

Piuri, M., Sanchez, C. & Ruzal, S.; “Cell wall modifications during osmotic stress in Lactobacillus casei”. Journal of Applied Microbiology. 2005.

Prados, R., Brown, L., Casadevall, A., et al; “Isolation and identification of membrane vesicle-associated proteins in Gram-positive bacteria and mycobacteria”. ELSEVIER. 2014.

Ríos, D., Cerna, J., Morán, N., et al.; “Escherichia coli enterotoxigénica y enteroagregativa: prevalencia, patogénesis y modelos murinos”. Gaceta médica de México. 2019.

Rodríguez, G.; “Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli”. Scielo. 2002.

Rondon,L., Añez, R., Salvatierra, A., et. al.; “Probióticos: generalidades”. Archivos Venezolanos de Puericultura y pediatría. Vol.78, N°4.2015.

Sanz, S.; “Prácticas de microbiología”. Universidad de la Rioja, Servicio de publicaciones. 2011.

Satokari, R.; “*Molecular identification and characterisation of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract*”. Hoogleraar in de Microbiologie. 2002.

Schwechheimer, C. & Kuehn, M.; “*Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogénesis and functions*”. Nat Rev Microbiol. 2015.

Tasleem,J.; “*Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative bacteria: a perspective update*”. Frontiers in microbiology. 2017.

Umpiérrez, A.; “*Identificación y caracterización de Escherichia coli asociada a diarrea neonatal de Terneros en Uruguay*”. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad de la República. 2018.

Uña, F., Sánchez, I., Pedraza, R. & Arenal, A.; Lactobacillus pentosus en la alimentación animal. Revista de producción animal. Vol.29, N° 1. Pp. 7-15. 2017.

Vidal, J., Canizález, A., Gutiérrez, J., Navarro, F.; “*Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de Escherichia coli enteropatógena*”. Salud pública de México. Vol. 49, N° 5. 2007.

Vollmer, W.; “*Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan*”. FEMS Microbiol Rev.2008.

Winkler; “*Kit para determinación de proteínas Método de Bradford*”. 2017. Disponible en: <http://winklerltda.cl/quimicav2/wp-content/uploads/2017/04/kit-proteinas-bradfor.pdf>

Wolff, M.; “*Uso y abuso de antibióticos. Momento de su evaluación, más allá del ser humano*”. Revista de Medicina Chile. 2004.

Yáñez, M., Siljander, P., Andreu, Z., et. al.; “*Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions*”. Journal of Extracellular Vesicles. Vol4. 2015. Disponible en: <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>

Zaidi, M., López, C. & Calva, E.; “*Estudios mexicanos sobre Salmonella: epidemiología, vacunas y biología molecular*”. Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol48, N°2. Pp.121-125. 2006.