



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4  
Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.

## **TESIS**

Que para optar por el grado de:

### **MAESTRA EN CIENCIAS**

**Evaluación *in vitro* del efecto inmunoestimulante de  
Microvesículas de Bacterias Ácido-Lácticas de *Rattus  
norvegicus* de vida libre, sobre la línea celular RAW 264.7  
gamma NO (-) ATCC CRL- 2278**

*Presenta*

M. V. Z. Viridiana Gutiérrez Espinosa

**Tutor principal:**

Dra. Cynthia González Ruíz

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Comité tutorial

Dra. G. Mireya De la Garza Amaya

Programa Maestría en Ciencias de la Producción y  
de la Salud Animal.

Dr. Alejandro Vargas Ruiz

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, Junio 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue financiado por el proyecto **Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)**  
**IT201521**

Agradezco a **CONACYT** por la beca otorgada en el periodo en el que realice mi posgrado

Agradezco a mi pareja quien fue la persona quien me mantuvo a flote en este periodo.

Agradezco a los Doctores que me apoyaron desde el inicio hasta el fin de mi trabajo,  
brindándome su apoyo moral e intelectual.

### **FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUATILÁN**

M C. Francisco Rodolfo González Díaz, Dr. Gerardo García Tovar, Dra. Gabriela  
Bárceñas, Dr. Ernesto Marín Flamad, Dr. Alejandro Vargas Ruíz.

### **CINVESTAV**

Dra. Mireya de la Garza Amaya, Dra. Cristian Ávalos Gómez, B. María de Lourdes Rojas  
Morales.

*“Los finales solo son comienzos”*  
VGE,2023



# Índice

## Resumen

### I. Introducción

I.1. Importancia de <i>Rattus norvegicus</i> como transmisora de enfermedades.....	1
I.2 Microbiota intestinal en roedores.....	2
I.3 Probióticos.....	2
I.3.1 Principales probióticos.....	3
I.3.2 Probióticos y su efecto en la homeostasis intestinal.....	5
I.3.3 Uso de probióticos en animales.....	6
I.3. Bacterias ácido- lácticas (BAL) .....	7
I.3.1 Características de las BAL.....	8
I.3.2 Las BAL y sus múltiples aplicaciones.....	10
I.3.3 BAL en la salud animal	11
I.4. Microvesículas (MVs) de membrana externa .....	12
I.4.1 Antecedentes Gram (-) y Gram (+).....	15
I.4.2 Composición.....	16
I.4.3. Formación y liberación .....	17
I.4.4. Funciones y posibles usos terapéuticos de las MVs.....	19
I.5. Sistema inmunológico.....	20
I.5.1 Inmunidad innata .....	21
I.5.2 Inmunidad adquirida.....	23
I.5.3 Macrófagos.....	25
I.6. Inmunidad intestinal.....	26
I.6.1 Respuesta del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) ante antígenos	
I.    Justificación.....	31
II.    Hipótesis .....	31

<b>III.</b>	Objetivo general.....	31
<b>IV.</b>	Objetivos particulares.....	31
<b>V.</b>	Diseño experimental.....	33
<b>VI.</b>	Materiales y métodos.....	33
<b>VII.1</b>	FASE I. Caracterización de las cepas, obtención y análisis de MVs.....	35
<b>VII.1.1</b>	Cuantificación de proteínas por el Método de Bradford.....	35
<b>VII.1.2.</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida con Dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).	35
<b>VII 1.3.</b>	Tinción de Plata para SDS-PAGE.....	36
<b>VII.1.4.</b>	Microscopia Electrónica de Transmisión.....	37
<b>VII.1.4.1</b>	Observación de las muestras.....	38
<b>VII.2</b>	FASE II. Estimulación de la línea celular RAW 264.7 mediante MVS de BAL	40
<b>VII.3</b>	FASE III. Cuantificación de Interleucinas mediante qRT-PCR.....	40
<b>VIII</b>	Resultados.....	41
<b>VIII.1</b>	Caracterización de las cepas.....	46
<b>VIII.1.1</b>	.1 Pruebas físicas para las cepas probióticas de BAL.....	46
<b>VIII.2</b>	Perfil electroforético de las proteínas presentes en las MVs, células completas y sobrenadantes.....	47
<b>VIII.2.1</b>	Análisis del gel SDS-PAGE con el software KODAK Gel-Logic 100 system.....	48
<b>VIII.2.2</b>	Cálculo de la movilidad relativa y obtención de los pesos moleculares del perfil electroforético .....	50
<b>VIII.3.</b>	Microscopía electrónica de transmisión.....	51

<b>VIII.4.</b> Estimulación de la línea celular <i>RAW 264.7</i> MVs de las cepas ATCC y 54 ambas de <i>L. acidophilus</i>	54
<b>VIII.5</b> Cuantificación de RNA mediante qRT-PCR en la línea celular ( <i>RAW 264.7</i> ) estimuladas por medio de MVs de BAL cepa ATCC y 54.....	56
<b>VIII.5.1</b> Estandarización de la amplificación de los primers.....	56
<b>VIII.5.2</b> Resultados de la qPCR.....	57
<b>VII.5.2.1</b> Las MVs de BAL estimulan a la línea celular ( <i>RAW 264.7</i> ) ...	59
<b>VIII 5.2.2</b> Expresión relativa IL1 $\beta$ .....	59
<b>VIII 5.2.2</b> Expresión relativa IL1 $\beta$ .....	60
<b>VII.5.2.3</b> Expresión relativa de TNF $\alpha$ .....	
<b>IX.</b> Discusión.....	62
<b>X.</b> Conclusiones .....	68
<b>XI.</b> Literatura consultada.....	69

## Resumen

Las microvesículas de membrana externa (MVs), tanto de bacterias Gram negativas como positivas, han demostrado capacidades antigénicas inmunoestimulantes y siguen siendo ampliamente estudiadas por diversos autores. Las bacterias ácido- lácticas (BAL) son parte de la microbiota normal del sistema gastrointestinal de la mayoría de los mamíferos. Son consideradas microorganismos de alta estima, por su funcionalidad en la conservación y fermentación de alimentos, y al mismo tiempo por poseer una alta capacidad probiótica, además de ser productoras de bacteriocinas, péptidos de composición y tamaño variable (<10 y >30 kDa) con capacidad para inhibir bacterias patógenas y no patógenas. El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto inmunoestimulante de las MVs de BAL sobre macrófagos de la línea celular *RAW 264.7* en condiciones *in vitro*, obteniendo la expresión relativa de la IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  por medio de la técnica molecular de la qPCR , además mediante electroforesis (SDS-PAGE) se destacaron proteínas de interés que arrastran las MVs, con posibles efectos probióticos y a través de microscopía electrónica de transmisión (MET) se observaron con detalle las MVS producidas por las BAL. De esta manera, continuamos la evaluación de un probiótico acelular enriquecido con MVs de BAL, que brinda todos los beneficios de las bacterias completas de origen.



# I. Introducción

## I.1 Importancia de *Rattus norvegicus* como transmisora de enfermedades

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

La etología de las ratas ha hecho posible, que estos animales cohabiten con los seres humanos, desarrollando poblaciones de alta densidad, aumentando de esta manera la propagación de patógenos zoonóticos <sup>3</sup>.

Algunos de los patógenos transmitidos por las ratas, son *Leptospira spp.*,

*Escherichia coli*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.* y *Hantavirus*. Existen numerosas formas en que los patógenos transmitidos por roedores, pueden infectar hospedadores humanos y animales. Las principales vías de transmisión son, la inhalación de aerosoles y el consumo de alimentos contaminados, el contacto directo, además de picaduras o infecciones a través de vectores. Incluso el agua residual contaminada con excrementos y orina de ratas infectadas ha sido identificada como una posible fuente de infección <sup>3</sup>.

## 1.2 Microbiota intestinal en roedores

La microbiota intestinal en la mayoría de los seres vivos es sumamente abundante y diversa. Desde décadas pasadas, se ha tratado de aislar la mayor cantidad de bacterias que habitan este sistema, esto no ha sido del todo exitoso, debido a que solo se han purificado una mínima proporción de ellas, en comparación con la gran población que habita en este sistema. La diversidad de la microbiota por porción del tracto gastrointestinal, depende de factores ambientales externos: estrés, ingesta de antibióticos, dieta y genética, así como condiciones internas: pH, disposición de nutrientes y actividad inmunitaria. Dependiendo de la porción del tracto gastrointestinal, la colonización de bacterias se va modificando, en cuanto a su variedad y cantidad. Así podemos encontrar que, en el intestino delgado, debido a las condiciones microambientales, la microbiota predominante es: *Clostridium spp*, aunque también predominan los *Lactobacillus spp*, *Bacteroidetes*, *Enterococcus*, *Streptococcus Bifidobacterium spp* y *Fusobacterium spp*. Conforme se va avanzando en el tubo digestivo, la microbiota se va modificando, pues las condiciones en el intestino grueso son más favorables para bacterias anaerobias facultativas y estrictas tales como: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacteroidetes*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* y *Ruminococcus*, de esta manera se puede entender la gran diversidad de microorganismos habitantes, del tracto gastrointestinal <sup>4</sup>.

## 1.3 . Probióticos

El término probiótico deriva de la proposición latina “pro” (a favor de) y el adjetivo griego “biótico” (vida), “para la vida”. La historia de los probióticos data desde hace casi 10, 000 años, la cual es afín a la evolución de la raza humana. El científico ruso ganador del premio Nobel, Elie Metchnikoff, a principios del siglo XX, relacionó la ingesta de leches fermentadas, con la salud y longevidad de los habitantes de una región concreta de Bulgaria. Sugirió que “la autointoxicación intestinal” y el envejecimiento resultante de la misma podrían ser suprimidos mediante la modificación de la microbiota intestinal, además desarrolló una dieta basada en leche fermentada por una bacteria a la que denominó “bacilo búlgaro”. Hasta 1965 Lily y Stilwell concretaron el término probiótico, para definir aquellos microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos de forma saludable para el individuo <sup>5,6</sup>.

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

Actualmente la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), definen los microorganismos probióticos como “microorganismos vivos que confieren efecto beneficioso para la salud del hospedador, cuando se administran en cantidad adecuada” Los probióticos, son definidos como organismos “GRAS”, acrónimo de Generally Regarded As Safe., organismos generalmente reconocidos como seguros <sup>6</sup>. Cuando se habla de probióticos no se puede dejar de lado los prebióticos y simbióticos, conceptos que, aunque parecidos, son totalmente diferentes entre sí, a continuación se describen dichos conceptos.

- Prebióticos: ingredientes insolubles o no digeribles, fermentados selectivamente, que dan lugar a cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, confiriendo así beneficios a la salud del huésped <sup>6</sup>.
- Simbióticos: productos que contienen tanto probióticos como prebióticos <sup>6,5</sup>.

### **1.3.1 Principales probióticos**

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

En primer lugar, se debe identificar la taxonomía de la cepa y comprobar su resistencia a enzimas y pH. La adhesión al epitelio es importante para ellas, ya que de esta manera logran competir con patógenos, además de tener efecto de inmunomodulación. Los probióticos deben cumplir con funciones metabólicas favorables como la fermentación de sustratos no digeribles y la formación de ácidos grasos de cadena corta, además la degradación de alérgenos y la nula actividad mutagénica. Una de las características más importantes que debe cumplir un probiótico es la inhibición de patógenos, principalmente logran esta función por la producción de sustancias

antimicrobianas, así como modulando la microbiota intestinal y sus metabolitos, de esta manera logran contrarrestar una infección. Todas estas características deben ser sustentadas con estudios y evaluaciones de seguridad y eficacia <sup>6, 7</sup>.

Los microorganismos probióticos son catalogados por género, especie y subespecie, si ese fuera el caso. En la siguiente tabla (**Tabla 1**) se observa, el género y especie de los principales géneros bacterianos probióticos reportados <sup>8 -10</sup>.

**Tabla 1.** Género, especie y subespecie de los principales géneros bacterianos probióticos.

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

### **1.3.2. Probióticos y su efecto en la homeostasis intestinal**

El uso de probióticos como tratamiento contra enfermedades en mucosas, ha generado que la investigación en estos aumente. Las nuevas tecnologías, han permitido desarrollar nuevos productos donde el principal componente, son organismos vivos que confieren beneficios a la salud de quien los ingiere. Estos productos, deben cumplir con parámetros establecidos para ser considerados como seguros y eficaces, dentro de las principales acciones y beneficios que debe de ejercer un probiótico en general se ha determinado: efecto antimicrobiano, contribución al equilibrio de la microbiota intestinal, resistencia a las condiciones microambientales del sistema gastrointestinal, mejora en la biodisponibilidad de nutrientes, reducción de enfermedades gastrointestinales y estimulación inmune no específica. Cada una de estas acciones, es desarrollada por los probióticos mediante diversos mecanismos, como la liberación de peróxidos, bacteriocinas y ácidos orgánicos, que inhiben el crecimiento de organismos patógenos, además de los efectos mecánicos que ejercen, hablando propiamente de las bacteriocinas. Las demás sustancias provocan una disminución de pH en el ambiente, afectando directamente el crecimiento de microorganismos patógenos. Entre las acciones ejercidas por estos microorganismos para inhibir el crecimiento bacteriano y mantener un equilibrio en la microbiota intestinal, destacan, la competencia por nutrientes y aumento de la secreción de mucina que facilita la unión a sitios en el epitelio intestinal, evitando de esta forma que microorganismos patógenos se agreguen a receptores sobre la superficie de las células. La adición de estos probióticos causa un aumento en la secreción de mucina, además tienen la capacidad de regular la permeabilidad intestinal y por tanto limitan la colonización de microorganismos patógenos. Un efecto similar provocado por los probióticos en beneficio a la salud intestinal es la modificación de receptores de toxinas, de esta manera se logran contrarrestar las enfermedades mediadas por estas sustancias. Otro beneficio brindado por microorganismos probióticos es la estimulación no específica del sistema inmune, incluyendo entre sus efectos la proliferación de células inmunes, incremento en la actividad fagocítica a partir de macrófagos y de la misma forma aumento en la producción de inmunoglobulinas IgM e IgA. Además, se ha comprobado que los probióticos estimulan la secreción de citocinas como el IFN $\gamma$  IL-2, IL-12 e IL-8. Las bacterias probióticas, pueden estimular el tejido linfoide del intestino y la inmunomodulación de este <sup>11,12</sup>.

### **1.3.1. Uso de probióticos en animales**

El uso indiscriminado de antibióticos ha obligado a explorar otras alternativas con el fin de reducir su uso. Entre estas alternativas se encuentran los probióticos, prebióticos y simbióticos, los cuales representan un avance terapéutico prometedor y seguro. Se ha comprobado que estas sustancias mejoran el metabolismo, salud y producción de los animales. Algunos de los efectos producidos por los mismos son: la estimulación de la inmunidad no específica, la inhibición de la acción tóxica y el efecto antagonista frente a microorganismos patógenos <sup>13</sup>.

Como se mencionó anteriormente, existen diversos microorganismos considerados probióticos, entre ellos se encuentran las levaduras que en especies monogástricas, no pueden colonizar el tracto gastrointestinal, pero logran inducir efectos positivos en términos de desempeño, produciendo mananos en la estimulación de las disacaridasas, enzimas situadas en la mucosa del yeyuno, en las microvellosidades intestinales <sup>15</sup>.

El uso de antibióticos como aditivos en la alimentación animal, se consideraba una práctica habitual en décadas pasadas, se creía que de esta manera se prevenían enfermedades y se aumentaba la eficiencia alimentaria. Hoy en día se sabe que este método en lugar de brindar beneficios altera la eubiosis (cuando la microbiota está en equilibrio con el sistema gastrointestinal), además de aumentar la resistencia bacteriana, asimismo aumenta la presencia residual de antibióticos en carnes, leche y otros productos de origen animal <sup>14</sup>.

Diferentes investigaciones demuestran que los probióticos administrados como medicamentos o suplementos dietéticos, son eficientes en la prevención de enfermedades gastrointestinales y urogenitales. Debido a esto, se pueden encontrar diferentes presentaciones farmacéuticas de administración oral, suplementos dietéticos, soluciones de rehidratación oral, preparados para lactantes y especialidades de uso urogenital <sup>5</sup>.

### **I.3 Bacterias ácido lácticas (BAL)**

Desde hace miles de años, el hombre ha buscado técnicas para la preservación de alimentos. El descubrimiento de la fermentación trajo consigo el aumento de interés sobre microorganismos capaces de producir la conservación de alimentos, entre otros beneficios,

por medio de diversos productos donde se involucra la oxidación de los carbohidratos dando como resultado sustancias que generalmente son ácidos orgánicos, alcohol y CO<sub>2</sub>, estas sustancias limitan el crecimiento de microorganismos patógenos y deterioradores de productos alimenticios <sup>8</sup>.

Existen diferentes teorías sobre cuándo se comenzó a usar a estos microorganismos como conservadores de alimentos, ya que desde el siglo XVIII, agricultores de África, Asia y Europa utilizaban la leche coagulada en días calurosos, cuando presentaba un sabor agradable, para tomarla e inocular la leche del día siguiente. En 1857 Louis Pasteur demostró, que todos los procesos fermentativos permitían el desarrollo de microorganismos, además señaló que cada uno de estos procesos llevaba consigo un tipo de microorganismo específico en ellos. Tiempo después en 1873, Lister dio a conocer el primer cultivo puro al que denominó "*Bacterium lactis*", por su parte Hueppe en 1884, describió la microflora responsable de la acidificación y coagulación de la leche, dándole el nombre de "*Milchsauerbacillus*". En 1899, Weigmann propone el término "*Bacterium acidilactici*" para denominar a estos microorganismos fermentadores <sup>17</sup>.

Hoy en día se conoce de manera genérica, a estos microorganismos como bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales juegan un rol importante dentro diferentes áreas de la salud animal y humana. Estas han sido utilizadas desde décadas atrás como conservantes en la industria de alimentos, ya que como se mencionó anteriormente promueven la producción de sustancias antimicrobianas además de sustancias proteicas denominadas bacteriocinas<sup>10</sup>.

Actualmente se comercializan cepas aisladas a partir de productos lácteos o de la leche, y muy en particular de los cultivos iniciadores artesanales. Estos cultivos pueden clasificarse en 3 tipos: el cultivo madre, el cultivo inicial y el cultivo usual. A partir de los cultivos conocidos como estárter o puros, se da origen al cultivo madre y de éste se desarrolla el cultivo usual que es el que se utiliza en proceso fermentativos <sup>8,10,17</sup>.

### **1.3.1 Características de las BAL**

Las bacterias ácido lácticas, son bacterias Gram (+) y por lo tanto su pared celular está formada de una gruesa capa de péptidoglicano, que consiste en múltiples capas que le dan gran firmeza y rigidez. Su pared celular alberga ácidos teicoicos y lipoteicos. Las BAL son un grupo de bacterias consideradas no patógenas, no toxigénicas y fermentativas. Su

principal característica es la producción de ácido láctico, como resultado de la fermentación de carbohidratos. Tienen forma de cocos o bacilos, de longitud variable, con un grosor de 0.5-0.8  $\mu\text{m}$ . Son anaerobias facultativas, catalasa y oxidasa negativas y sintetizan ATP en la fermentación láctica de los glúcidos. Carecen de citocromos, por lo cual no tienen actividad respiratoria y no forman esporas <sup>13,16</sup>.

Comúnmente la presencia de estos microorganismos en productos de origen animal, vegetales, ensilados, frutas, cerveza, vinos, derivados de panadería, así como de pesca se asocia al ambiente rico de nutrientes y carbohidratos solubles, que brindan estas materias comestibles. Además, son habitantes comunes del tracto gastrointestinal y de las mucosas de animales y seres humanos, así como del estiércol y de aguas residuales urbanas e industriales <sup>13, 17</sup>.

En 1919 Orla-Jensen microbiólogo y químico danés, propuso la clasificación de las BAL. En los últimos años las BAL se han clasificado por sus diferentes características bioquímicas, temperatura de crecimiento y por el género al que pertenecen <sup>17, 18</sup>.

El grupo BAL pertenece al *phylum Firmicutes*, el cual es uno de los más diversos en la naturaleza, incluyendo alrededor de 20 géneros, entre los que destacan: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Streptococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulun*, *Globicatella*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. Los géneros más usados para la preservación de alimentos y profilaxis son: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leucoccus*, *Lactobacillus* y *Carnobacterium*. El género *Bifidobacterium*, no se considera BAL ya que su taxonomía es diferente, además que no se asocia a la fermentación <sup>8, 18</sup>.

Las BAL se clasifican de acuerdo con sus características bioquímicas, en homofermentativas y heterofermentativas. Las primeras se caracterizan por producir al final de la fermentación ácido láctico, mientras que las segundas además de ácido láctico también originan etanol, acetato y  $\text{CO}_2$ . Otra forma de clasificación para estas bacterias es por la temperatura a la que estos microorganismos pueden desarrollarse, y dependiendo de la misma se les denomina: mesófilos y termófilos <sup>8, 18</sup>. En la **Tabla. 2** se observa la clasificación de BAL por sus características bioquímicas y tolerancia a la temperatura <sup>6,8,10,19</sup>.



**Tabla 2.** Clasificación de BAL de acuerdo con sus características bioquímicas y tolerancia a la temperatura

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

### I.3.2 Las BAL y sus múltiples aplicaciones

La capacidad probiótica de las BAL es bien conocida, pues son consideradas los principales microorganismos con capacidades benéficas para la conservación alimentaria, así como para la salud humana y animal. Las BAL tienen múltiples aplicaciones en la industria alimentaria y recientemente han tomado importancia, en los tratamientos médicos contra enfermedades alérgicas y gastrointestinales <sup>10</sup>.

En cuanto a su uso en el área alimentaria, podemos resaltar sus funciones más conocidas, preservación de alimentos o fermentación de éstos. Aunque estas funciones son las más requeridas dentro del proceso de manufactura alimentaria, no son los únicos beneficios que aportan estas bacterias, ya que su adición en los alimentos genera características organolépticas en los subproductos de origen animal, como son la leche, carne, queso o el yogurt, entre otros, brindando texturas, olores, sabores y aporte nutricional. El uso de las BAL, no se limita a la conservación de alimentos para el consumo humano, estos cultivos son usados para el ensilaje de forraje para la alimentación animal. El mecanismo que ejercen estos microorganismos sobre el ensilado es la disminución del pH, esto es ocasionado por las bacterias nativas del propio forraje, o la adición de cultivos iniciadores, de esta manera se limita el crecimiento de bacterias no deseadas en los ensilados, evitando infecciones gastrointestinales en los animales, además de proveer características sensoriales agradables, facilitando la ingesta y la digestión en el ganado<sup>12,20</sup>.

Fuera de la industria alimentaria, el empleo de las BAL se enfoca en el tratamiento o prevención de enfermedades. Estas últimas son aquellas que afectan principalmente al aparato gastrointestinal, estos padecimientos van desde estreñimiento, diarreas e incluso afecciones como el cáncer de colon. Esto no quiere decir, que el aparato gastrointestinal sea el único que ha adoptado el uso de BAL, también se utilizan en enfermedades como la rinitis alérgica y tratamientos conjuntos contra infecciones urogenitales. En cuanto al control de diarreas infecciosas y no infecciosas, como lo son la diarrea del viajero, diarrea por el uso de antibióticos o la diarrea aguda infecciosa infantil, las BAL que han demostrado mejores resultados son *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. bulgaricus*; entre otras. Para enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn, se ha tratado de disminuir sus síntomas con ingesta de BAL, aunque aún no hay evidencia suficiente para comprobar si hay una remisión de los síntomas o de la enfermedad como tal. En el síndrome de intestino

irritable, una de las enfermedades más comunes, los resultados de los estudios han observado que síntomas como flatulencias, dolor e hinchazón abdominal, disminuyen con el uso de tratamientos prolongados con *Bifidobacterium infantis*, *L. rhamnosus* y *L. plantarum*. En cuanto a enfermedades oncológicas, como el cáncer de colon, estudios han demostrado que ha mayor presencia de poblaciones de BAL como Bifidobacterias y disminución de *Clostridium perfringens*, la incidencia de la enfermedad disminuye. En otro tipo de malestares, como la intolerancia a la lactosa, se han desarrollado tratamientos con BAL y está comprobado que el uso de alimentos fermentados como el yogurt, disminuyen o incluso desaparecen los síntomas de dicha afección. Las áreas de la salud en las que se ha experimentado con el uso de BAL como posibles herramientas terapéuticas, han aumentado, pues se han utilizado incluso en el área odontológica, para comprobar si existe disminución en la presencia de caries en infantes, evidenciando así, la gran gama de utilidad que brindan las BAL <sup>12, 20, 21</sup>.

### **I.3.3 BAL en la salud animal**

Estos microorganismos no solo son utilizados en los seres humanos, sino también en animales mamíferos y actualmente en peces y crustáceos. Los animales suplementados con probióticos de BAL, muestran un incremento en la resistencia y eficiencia en la eliminación de patógenos. Algunas de las especies mayormente estudiadas respecto a los efectos positivos brindados por las BAL, son los rumiantes, entre ellos los bovinos, ovinos y caprinos. En los primeros, se ha observado una mejora en la producción de leche en vacas Holstein, mezclando prebióticos y probióticos en la dieta. En otras especies, se ha observado el aumento de ganancia de peso, promoción del crecimiento, disminución del estrés, estimulación de la respuesta inmune, inhibición de patógenos, tal es el caso de *Salmonella spp*, y en la prevención de diarrea. Una de las sustancias más estudiadas de BAL, que forma parte de los constituyentes inhibitorios de las mismas y que por consiguiente promueve algunos de los beneficios de estos microorganismos, son los péptidos conocidos como bacteriocinas. Estos inhibidores requieren de rigurosos estudios sobre la forma en la que funcionan, ya que en la mayoría de los casos se han utilizado cepas aisladas del ser humano o de mamíferos para su comercialización, utilizándose en tratamiento en otras especies animales. Estos beneficios se dan gracias a las formas en las que los probióticos de BAL, detienen el crecimiento de agentes patógenos, además de beneficiar a las células intestinales, lo que estimula la absorción de nutrientes, así mismo

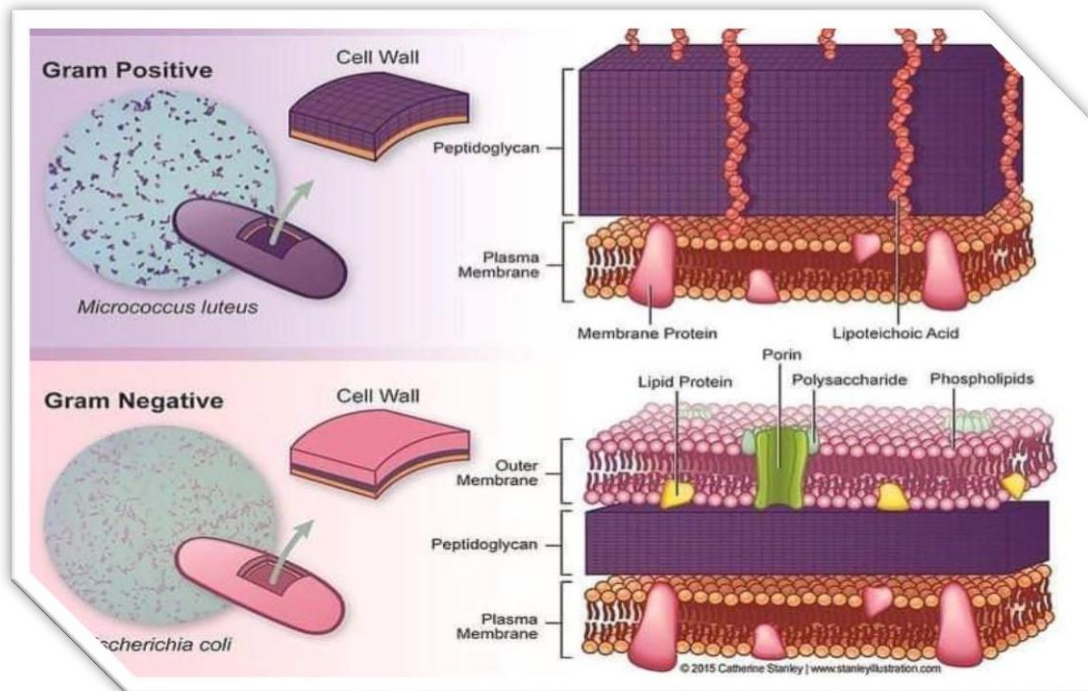
en los rumiantes el uso de probióticos lácticos, incrementa las concentraciones de amoníaco en el rumen, aumenta la digestibilidad de la fibra y del nitrógeno, así como también aumentan las purinas y los conteos de flora intestinal nativa <sup>9,18</sup>.

## **I.4 Microvesículas de membrana externa (MVs)**

### **1.4.1 Antecedentes de MVs de bacterias Gram (-) y Gram (+)**

Se sabe que las microvesículas (MVs) de membrana externa son producidas por diferentes microorganismos como son archeas, bacterias, hongos y células eucariotas en mamíferos. Las MVs son utilizadas por la célula productora, para la comunicación intercelular. Las investigaciones sobre MVs de membrana externa, se han enfocado principalmente a bacterias Gram (-). Desde hace más de 40 años, se han estudiado estas vesículas, conocidas como *vesículas de membrana externa por sus siglas en inglés* OMVs, que fueron descritas como nanovesículas esféricas con un diámetro que varía desde los 20 nm y hasta los 200nm de diámetro. Compuestas principalmente en su exterior por una doble membrana propia de las bacterias Gram negativas que contiene lípidos, proteínas, LPS, y en su interior puede arrastrar entre otras cosas ADN y ARN. En las investigaciones realizadas para hallar las funciones de estas OMVs, se les atribuyó el transporte de factores de virulencia, comunicación intercelular, activación del sistema inmune y participación en la patogenia de la enfermedad que provocan, esto último debido a que las OMVs estudiadas, han sido en mayor cantidad las que provienen de bacterias patógenas. La inmunogenicidad producida por las propias OMVs, ha sido y sigue siendo la principal fuente de estudio, ya que en diferentes bacterias Gram (-) patógenas como lo son *Actinobacter baumannii*, *Manhemia haemolytica*, entre otras, se ha comprobado que sus OMVs tienen capacidad de producir activación del sistema inmune innato y son participes activos en la patogenia de la enfermedad. Estos mecanismos fueron comprobados tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*. En general las investigaciones sobre OMVs de bacterias Gram (-), refieren la gran capacidad que tienen para reproducir todas las facultades patogénicas de la célula productora. Esto se explica, pues la OMVs están formadas por la membrana del microorganismo que las produjo, por lo tanto, es correcto pensar que las OMVs de una bacteria Gram (-), produce los mismos efectos de la célula completa de origen <sup>22, 23</sup>.

En cuanto a las investigaciones sobre MVs de bacterias Gram (+), éstas se dejaron de lado por muchos años, principalmente por las diferencias en la estructura de la membrana (**Figura 1**), entre las bacterias Gram (+) y Gram (-).



**Figura 1.** Diferencias estructurales entre la pared de bacterias Gram (-) y Bacterias Gram (+) Tomada de: [www.stanleyillustration.com](http://www.stanleyillustration.com) (2015)

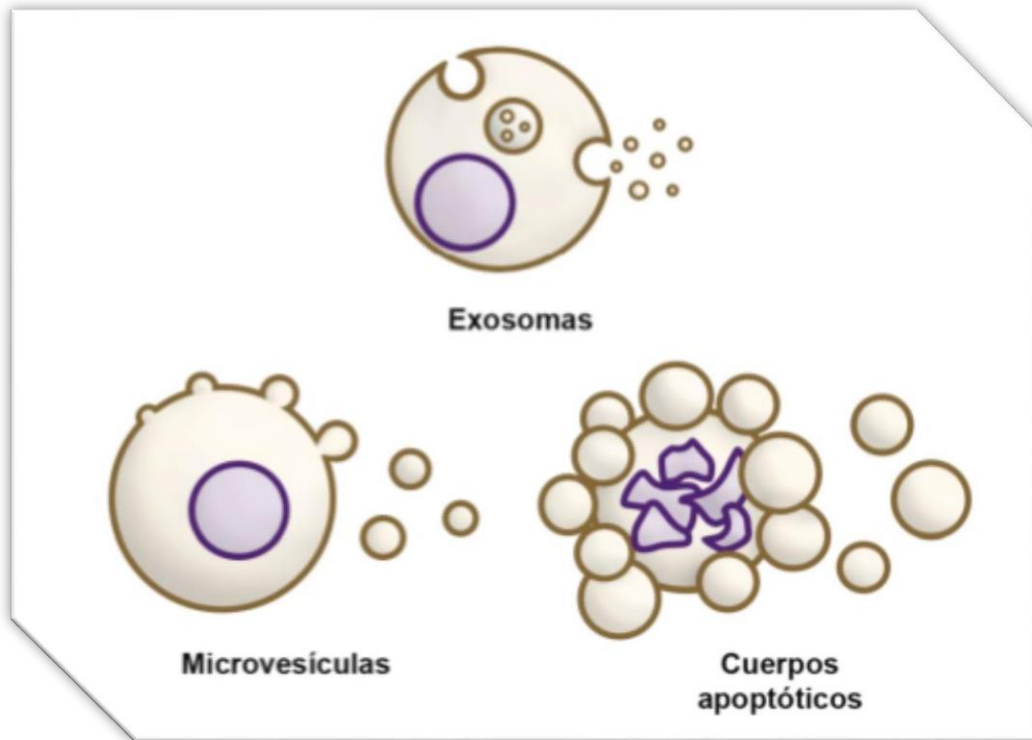
Anteriormente, la falta de interés en las MVs de bacterias Gram (+), Mycobacterias y hongos en comparación a las OMVs de las Gram (-), se debía principalmente a la gruesa pared celular de estos microorganismos, por lo cual se pensaba que la producción de MVs era imposible. Aunque las MVs de las Gram (+) se descubrieron 30 años después de sus homólogas las Gram (-), este hallazgo ha llamado la atención de forma relevante en los últimos años. Existen diferentes estudios sobre el papel principal que juegan las MVs, de diferentes géneros bacterianos, estableciéndose como función común, interactuar con células procariontas y eucariotas en su entorno<sup>23, 24</sup>.

El estudio de las bacterias Gram (+) comenzó en el 2009, cuando se obtuvo el proteoma de *S. aureus*, en el cual se comprobó que las MVs de este tipo de bacterias son casi idénticas a las descritas en las Gram (-). Durante la investigación de MVs de bacterias

(+), se descubrió la capacidad para transportar sustancias vitales para el funcionamiento de la propia bacteria. Además se demostró que las MVs de *S. aureus*, contenían en su membrana factores de virulencia propios de la bacteria completa, los cuales tienen la capacidad de aumentar la virulencia y la resistencia antibiótica. Estos estudios están basados en las MVs de bacterias Gram (+) patógenas, por lo cual sus componentes están ligados a la patogenia que causa la bacteria de origen, demostrándose de esta manera que poseen componentes capaces de desencadenar la formación de coágulos, resistencia a la metilicina y antígenos que provocan sepsis en el huésped. Este estudio abrió las puertas a nuevas investigaciones sobre MVs de bacterias Gram (+), incluyendo recientemente a las bacterias ácido-lácticas. El estudio de MVs a partir de BAL es relativamente reciente, pues se ha logrado comprobar que poseen cualidades propias de la bacteria completa, como lo es su capacidad inhibitoria sobre otros géneros bacterianos, así como la capacidad para producir motilidad intestinal <sup>25</sup>.

Las bacterias no son las únicas que pueden secretar MVs. Existen otras vesículas extracelulares que algunos autores han estudiado y clasificado como vesículas externas (VE), estas VE son secretadas por las células eucariotas. Se decidió clasificarlas ya que hace algunas décadas se creía que las VE de menor tamaño, eran remanentes de las células muertas. La Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV), sugirió utilizar el término “vesículas extracelulares”, para todas las vesículas que se encuentran en el medio extracelular. De esta manera, se ha compuesto una clasificación (**Figura. 2**) basada en el tamaño, morfología, mecanismo de liberación y composición bioquímica, con tres grupos donde se han insertado todas las VE conocidas <sup>26</sup>.

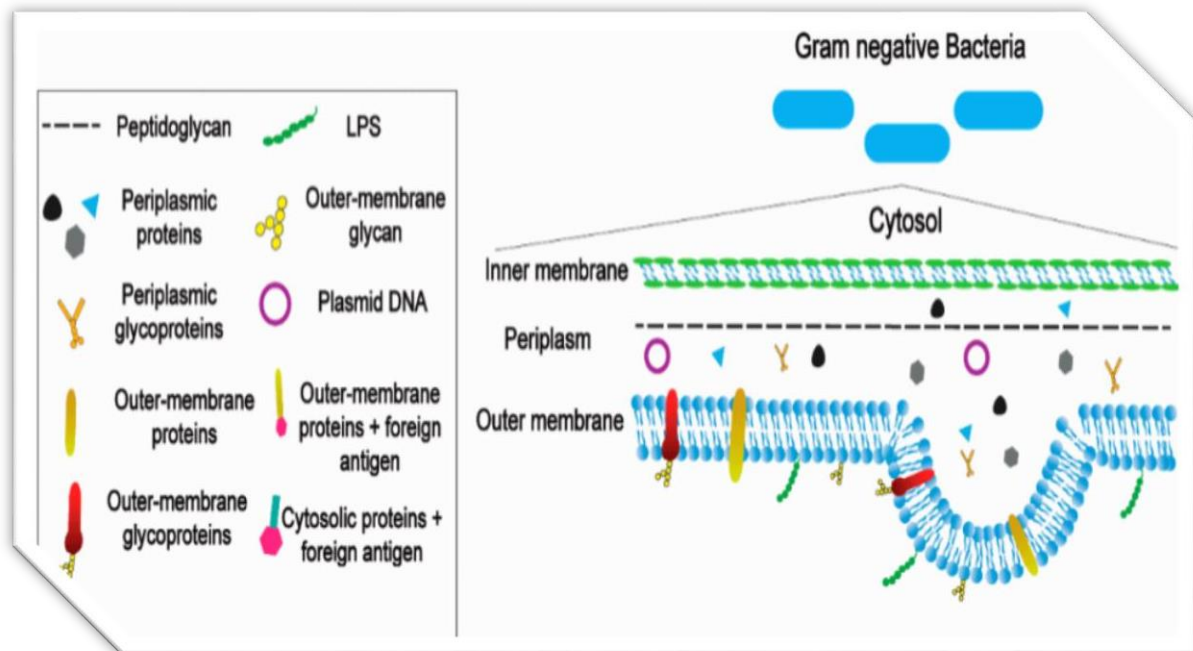
- **Exosomas:** son la VE más pequeñas de los tres grupos, su tamaño va de los 30 – 100 nm, son liberadas por vía endosomal, su membrana presenta una mínima cantidad de fosfatidilserina (PS).
- **MVs:** Su tamaño va desde los 100 nm-1µm su liberación se da por una evaginación de su membrana.
- **Cuerpos apoptóticos:** su tamaño fluctúa entre 1-5 µm, son liberados como vesículas después de que la célula muere, a pesar de ello los cuerpos apoptóticos poseen orgánulos celulares, así como material genético, además de presentar fosfatidilserina (PS) en la superficie <sup>26</sup>.



**Figura.2** Ejemplos de vesículas extracelulares. Añón, J. C *et.al.* (2018)

#### I.4.2 Composición de las MVs

Se sabe que la formación de MVs en las bacterias Gram (-), se da por un plegamiento de su membrana externa y arrastre del contenido periplásmico. Debido a la gruesa pared celular de las Gram (+), aún se está confirmando en su totalidad esta hipótesis ya que se está considerando que en el plegamiento pudieran intervenir enzimas que degradan el grueso péptidoglicano y de esta manera facilitar su liberación. Las dimensiones de estas estructuras van desde los 50 y hasta los 250 nm de diámetro, con algunas variaciones por cepa. En bacterias Gram (-), la composición es muy similar a su membrana externa, conteniendo proteínas de membrana externa, fosfolípidos y componentes del periplasma en tránsito (**Figura. 3**). Por lo anterior, se puede asumir que el contenido de las MVs de bacterias Gram (+) es muy similar, ya que dentro de ellas se encuentran componentes propios de la célula productora, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos <sup>26, 27</sup>.

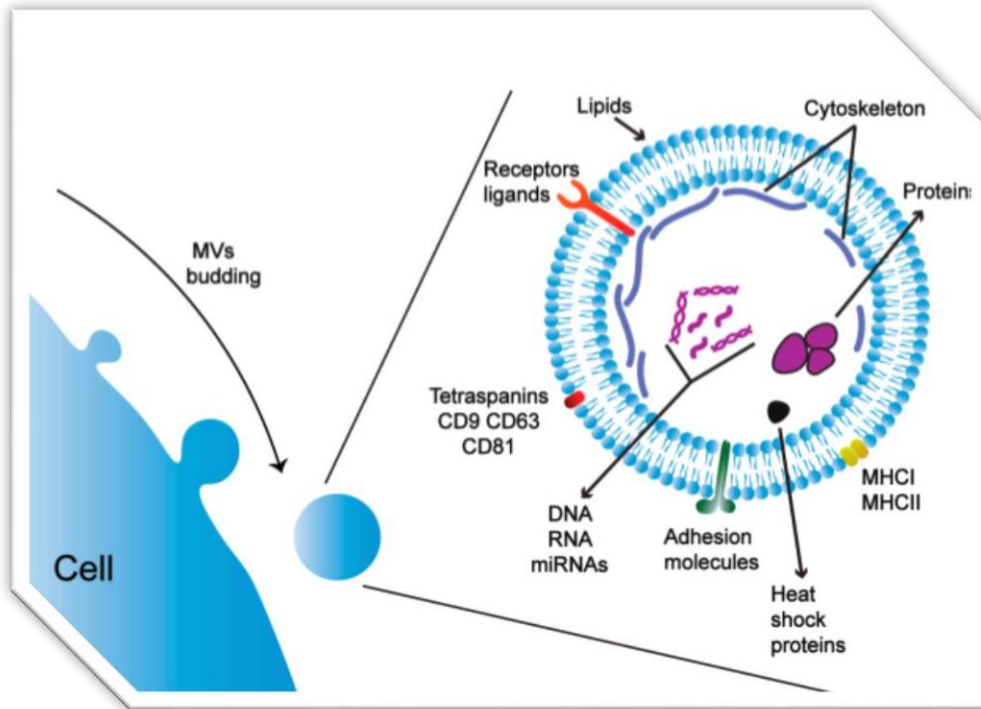


**Figura. 3** Componentes de las OMVS de una bacteria Gram (-). Layaly Shkair, *et.al.*, 2021

### I.4.3 Formación y liberación de MVs

Como se mencionó previamente, las MVs son secretadas por la célula eucariota productora mediante plegamiento de su membrana (**Figura. 4**). lo cual implica todo un proceso para la liberación de las mismas. Este proceso se desarrolla desde el reordenamiento del citoesqueleto y de fosfolípidos, estos últimos normalmente se encuentran en la parte interna de la membrana y se reubican en la parte externa, quedando expuestos; además de esto la membrana realiza una curvatura y de esta manera el proceso concluye con la liberación de MVs. La formación de MVs llega a su punto máximo en la fase logarítmica de la bacteria productora, además existe mayor producción de MVs en las zonas de división celular. Se ha comprobado que la producción de MVs se ve aumentada, cuando se somete a las células productoras, a periodos de estrés <sup>27</sup>.





**Figura 4.** Composición de MVs. Se observa que la microvesícula contiene, proteínas de membrana externa, lípidos, DNA, RNA miRNAs y factores de adhesión. Layaly Shkair, *et.al.*, 2021

#### I.4.4 Funciones y posibles usos terapéuticos de las MVs

Como se mencionó anteriormente, las células eucariotas, arqueas, hongos, y bacterias son capaces de producir MVs, sus funciones y capacidades dependen del microorganismo productor, por ejemplo las MVs provenientes de células eucariotas son de las más estudiadas debido a las funciones de sus progenitoras, se sabe que incluso células de defensa como los polimorfonucleares y células NK, secretan MVs, y estas son capaces de contener, interleucinas, granzimas y perforinas, además de activar otras células de defensa mediante la presencia de receptores. Otro ejemplo de estas MVs, son las fabricadas por las plaquetas y células madre mesenquimales, incluso células tumorales son capaces de producirlas, cada una de ellas con funciones variadas, como formación de coágulos, acciones regenerativas y capacidad oncogénica, respectivamente <sup>22</sup>.

Respecto a las MVs bacterianas, a estas se les atribuyen numerosas funciones biológicas, como la liberación de toxinas, la modulación del sistema inmune, el transporte

de moléculas de señalización entre células bacterianas y la formación de Biofilms. Los factores de virulencia de las bacterias patógenas Gram (+), en la mayoría de los casos son productos secretados que favorecen la sobrevivencia de la bacteria dentro del hospedero y permiten evadir la respuesta inmune del mismo <sup>3</sup>. Actualmente se reconoce, que las bacterias Gram (-) y Gram (+), producen vesículas de membrana (MVs) en cualquiera de sus fases de crecimiento, como un sistema de secreción bacteriano alterno <sup>4</sup>. Las MVs son el medio natural mediante el cual se realiza el transporte intracelular directo de factores de virulencia bacterianos en células y tejidos del huésped <sup>23, 24</sup>.

Se han identificado dentro de tejidos del huésped, vesículas procedentes de bacterias patógenas extracelulares e intracelulares, lo cual demuestra que las MVs poseen una alta capacidad para ingresar a los tejidos. Los factores que exponen en su superficie llegan a regular su adhesión a células eucariotas, además logran internalizar el material que se encuentra dentro de ellas, de esta manera la interacción entre la vesícula y la célula del huésped, puede ocurrir mediante la fusión de membranas o por uniones mediadas por receptores. La capacidad de las MVs de liberar todo su contenido interno contribuye a las infecciones de bacterias patógenas, ya que produce citotoxicidad y respuestas inmunes innatas, además de adaptativas. Las MVs de bacterias no patógenas, han sido consideradas benéficas, puesto que llegan a tener funciones protectoras, ejemplo de ello es la liberación de posibles fagos que atacan a otras células <sup>27</sup>.

Un ejemplo de bacterias no patógenas productoras de MVs, son los *Lactobacillus spp*, estas bacterias son conocidas por sus beneficios probióticos y recientemente se comprobó que son productoras de MVs, las cuales ejercen de forma similar, las funciones propias de la bacteria completa, como la capacidad inhibitoria de bacterias patógenas como *S. typhimurium*. Además de la liberación de factores de protección, estas MVs de bacterias nativas tienen capacidad de activación del sistema inmune, lo cual vuelve a este tipo de MVs un atractivo modelo inmunoestimulante que comparte componentes internos y externos de la célula bacteriana productora, de esta forma su origen le brinda capacidades benéficas al huésped. En algunos estudios se ha comprobado que incluso las MVs de *L. reuteri*, tiene la capacidad para activar el sistema nervioso entérico, así como modular la motilidad intestinal. En diferentes estudios, se ha sugerido que las MVs pueden brindar una gran variedad de funciones, algunas de ellas son: vehículos de transporte para medicamentos, biomarcadores, marcadores para diagnóstico médico, vacunas acelulares, inmunoestimulantes y probióticos acelulares <sup>10, 28</sup>.

## 1.5. Sistema Inmunológico

El sistema inmune, es una compleja red interconectada entre órganos, células, moléculas y sustancias. Su principal objetivo es la protección del individuo frente a antígenos propios y extraños, la preservación de la salud y la vida. Este sistema es uno de los más intrincados que opera en los seres vivos complejos, está conformado por distintas células, sustancias y moléculas que mantienen intercomunicación por vía directa o por diferentes mediadores. Este gran sistema se puede dividir en 2 partes organizadas (**Cuadro 1**), que se encuentran en constante comunicación entre sí, de esta manera interactúan el sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo, ambas con funciones y componentes diferentes, pero con un fin común<sup>29</sup>.

**Cuadro 1.** Funciones y componentes del sistema inmune innato y adaptativo.

Modificado Cambroner, M. R (2017)

Actividad principal	Sistema inmune innato (Primera línea de defensa)	Sistema inmune adaptativo (Segunda línea de defensa)
Tiempo de respuesta	Rápida hora/ días	Lenta Días/semanas
Memoria inmunológica	No	Si
Especificidad	Receptores de reconocimiento a patrones (PRR)	Receptores específicos
Elementos celulares principales	Fagocitos, células dendríticas, células NK.	Linfocitos B, Células plasmáticas linfocitos T
Proteínas sanguíneas efectoras	Sistema del complemento	Anticuerpos

### I.5.1 Inmunidad innata

La inmunidad innata se considera el vínculo hacia la respuesta inmune adaptativa, además de ser la primera línea de defensa encargada de lidiar con antígenos patógenos y

no patógenos. La mayoría de estos antígenos vienen del medio ambiente en el que este inmerso el huésped. Sin embargo, no solo podemos pensar en ello, ya que algunos antígenos provienen del interior del organismo, provenientes de traumatismos o daño tisular entre otros. Para que la respuesta innata comience debe existir un estímulo que inicie con el reconocimiento del antígeno detectado, este reconocimiento se lleva a cabo por receptores, los cuales son denominados Receptores de Reconocimiento a Patrones (PRR), si estos receptores reconocen patrones moleculares asociados a patógenos se les conoce como PAMP. Por el contrario, si estos receptores reconocen señales de daño o peligro se les denomina DAMP. Las células presentadoras de antígeno (APC) como las células dendríticas y los macrófagos, son células que expresan en su membrana una gran variedad de PRR, los más importantes de estos receptores son los llamados tipo Toll y los receptores de lectina tipo C (CLR). En la actualidad se han identificado 13 TLR entre ellos 10 son de humanos. Un ejemplo de las funciones de los TLR se puede analizar en el receptor TLR2, el cual reconoce ácidos lipoteicoicos abundantes en bacterias Gram (+), así como el TLR4, el cual reconoce el lipopolisacárido (LPS) bacteriano con la ayuda del CD14, la proteína que une al LPS y la molécula accesoria MD2 <sup>30</sup>.

Además de expresar receptores como los antes mencionados, los fagocitos tienen gran importancia en la síntesis de citocinas IL1, IL6, IL8, IL12 y TNF $\alpha$ , entre otras moléculas como óxido nítrico, peróxido, prostaglandinas y leucotrienos. Las interleucinas son proteínas solubles de peso molecular variable, alcanzando hasta los 70 kDa y son mediadoras de la inflamación, diferenciación y reparación, entre otras actividades. Estas citocinas son producidas tanto en la inmunidad innata, como en la adquirida y funcionan como medio de comunicación intercelular ante una invasión contra los antígenos de diversos patógenos. Algunas funciones de las citocinas como la IL1, es promover la respuesta inflamatoria en la inmunidad innata, su producción en el fagocito comienza con la presencia estimulante de bacterias y sus subproductos. En cuanto el TNF $\alpha$ , esta citocina es un mediador de la respuesta a bacterias Gram (-) principalmente y es liberado por fagocitos y células T entre otros. Paralelamente ésta interleucina puede ser liberada en presencia de IL-1, IL-3, IFN $\gamma$  y GM-CSF. Algunas citocinas, tienen la capacidad de regular la respuesta inmune, tal es el caso de la IL10, la cual es liberada por macrófagos, linfocitos T y B entre otros. Las interleucinas proinflamatorias, estimulan la liberación de esta citocina y es secretada por macrófagos activados <sup>31</sup>.

### 1.5.3 Inmunidad adquirida

Por otro lado, la respuesta inmune adaptiva comienza en el momento que un antígeno es reconocido por receptores específicos de células especializadas, considerando como antígenos, aquellas moléculas propias del huésped o externas. Dichas células son las conocidas células presentadoras de antígenos (CPA) y dan comienzo a toda esta respuesta. Tras el primer contacto con los antígenos, existen dos opciones de respuesta, dependiendo si este primer contacto es protagonizado por una CPA o no. La primera está mediada por linfocitos T, los cuales son los encargados de la respuesta inmune celular frente a patógenos intracelulares, reconociendo a un antígeno presentado por una CPA a través de receptores de la célula T (TCR). Las CPA, son las encargadas de presentar antígenos en su superficie mediante las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase II (CMH-II) y CD1, a los linfocitos T. Esta presentación permite al linfocito T, se polarizarse en subtipos con diferentes funciones propias para cada antígeno y de esta forma montar una respuesta adecuada. Si la presentación del antígeno se hace mediante una molécula del MHCII de una CPA entonces el linfocito T que reconocerá a ese antígeno será un linfocito CD4+ Helper (Cooperador), pero si la presentación se hace por medio de la molécula MHCI, el linfocito que reconocerá este antígeno será un CD8+ citotóxico. El linfocito T CD4+ puede dividirse en subgrupos, conocidos como Th1 y Th2, clasificados de acuerdo con el tipo de interleucinas que secretan. Los Th1 se caracterizan por secretar principalmente  $IFN\gamma$ , potente estimulante de macrófagos, que limitan la supervivencia del patógeno. En cuanto a la secreción de interleucinas de las células Th2, éstas comprenden a la IL-4, IL-5 e IL-13, responsables de la activación de eosinófilos y provocan principalmente la proliferación de los linfocitos B, estimulando la producción de anticuerpos. Además de estos subtipos, se conocen a otros más como el Th17, este tipo de linfocitos estimulan neutrófilos y se caracterizan por secretar interleucinas proinflamatorias como la IL-17, IL-9, IL-22 e IL-23, otro de los subtipos conocidos son el Th9, Th22, Tfh y iTreg, este último conocido por su capacidad reguladora, caracterizada por la secreción de IL10. En cuanto a la respuesta inmune del linfocito B, estas se diferencian por no tener la necesidad de reconocer al antígeno mediante una CPA, pues esta célula cuenta con su receptor de célula B (BCR), capaz de reconocer por sí solo al antígeno. Una vez que el antígeno tiene contacto con el linfocito B, este dejará de ser virgen (*naive*) y se activará en un linfocito B que posteriormente se diferenciará a célula plasmática secretora de anticuerpos y células B de memoria. Las inmunoglobulinas

secretadas, dependen del tipo antígeno y su localización, ya que cada una de éstas tiene diferentes funciones, y se encuentran en mayor o menor proporción dependiendo de la región del cuerpo afectada (**Cuadro. 2**). El éxito de la respuesta adaptativa yace en el buen funcionamiento de las células involucradas durante la presentación del antígeno, mediante las CPA y el reconocimiento de los linfocitos (**Figura. 5**), pues este mecanismo dará pauta a las consecuentes respuestas del organismo <sup>30,32</sup>.

**Cuadro 2.** Funciones y tipos de inmunoglobulinas. Escudero, *et al.*, 2017

Función	Isotipo de inmunoglobulinas							
	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Neutralización	+	-	+	+	+	+	+	-
Opsonización	-	-	+++	-	++	+	+	-
Citotoxicidad celular	-	-	++	-	++	-	-	-
Desgranulación de mastocitos	-	-	-	-	-	-	-	+++
Activación del complemento	+++	-	++	+	+++	-	+	-

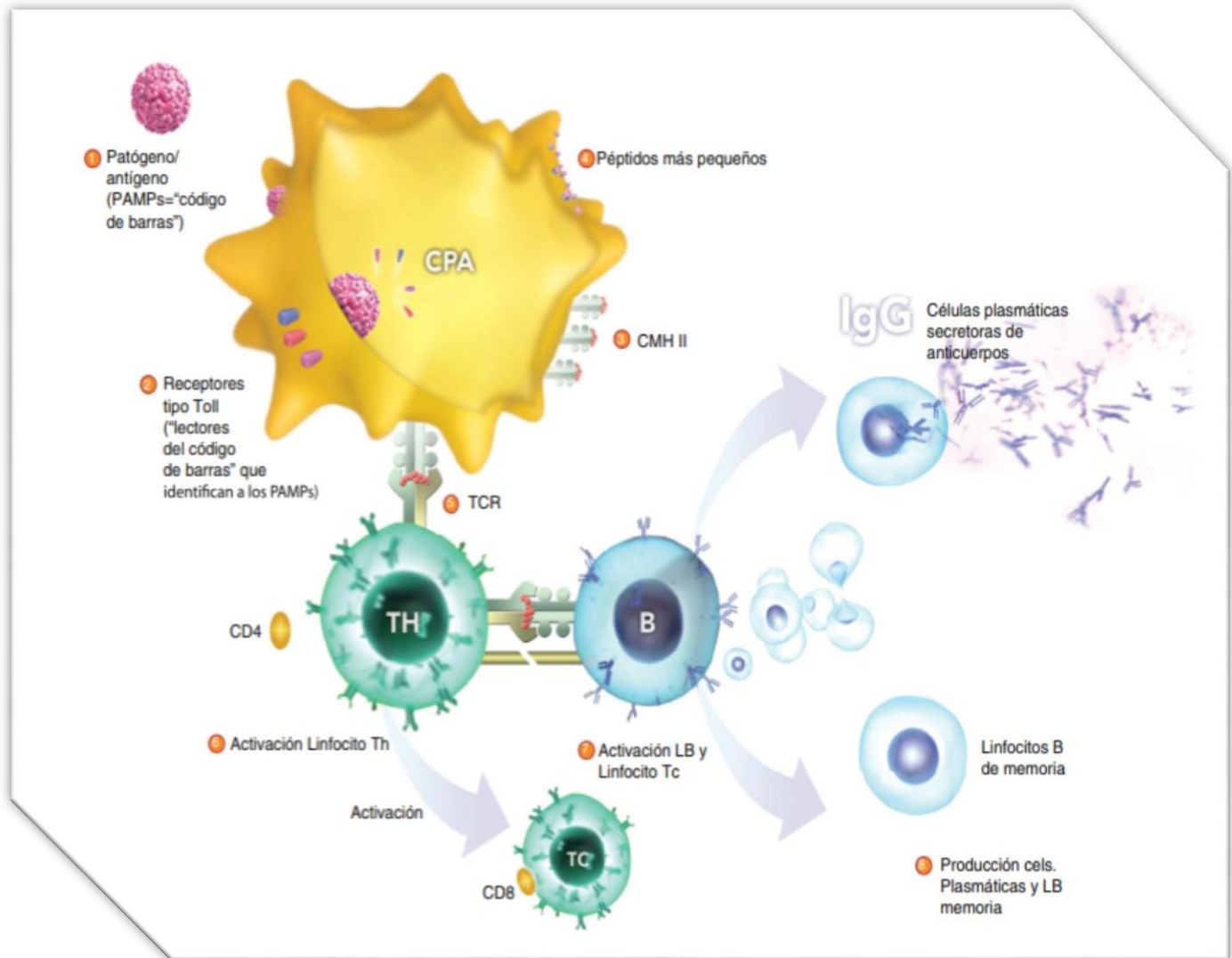
#### Acotación

(-). No realiza la función

(+) Baja actividad de la función

(++) Actividad media de la función

(+++) Alta actividad de la función



**Figura. 5** Esquematización de la respuesta inmune, reconocimiento y presentación del antígeno. Escudero, *et al.*, 2017

### I.5.4 Macrófagos

Los macrófagos, son células que forman parte del sistema inmune, son consideradas células fagocíticas. Originadas en médula ósea como monoblastos, pasando por pre-monocitos hasta llegar a monocitos, pueden residir al interior y al exterior de los órganos linfoides. Los macrófagos son una de las poblaciones celulares más importantes

en el sistema inmune, ya que juegan un papel determinante en la inmunidad innata, son capaces de secretar diversas sustancias y contener en su membrana más de 100 receptores de superficie celular. Algunas de sus funciones más conocidas son la fagocitosis de microorganismos y algunos desechos celulares, regulación de la hematopoyesis, presentación de antígenos, actividad antitumoral, eliminación de partículas de origen extraño y reclutamiento de neutrófilos a través de secreción de interleucinas proinflamatorias <sup>33</sup>.

La migración de los monocitos a partir de sangre o bien de macrófagos tisulares a los sitios de inflamación, inician principalmente por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), propios de los patógenos invasores, y por patrones moleculares asociados a daño (DAMP), por parte de las células dañadas. Las células T de memoria que se encuentran de manera latente en tejidos, son activadas por antígenos que pueden desencadenar el reclutamiento de macrófagos, mediante citocinas y quimiocinas inflamatorias, como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1). Los macrófagos, son células inmunitarias que requieren de cierta activación para lograr desarrollar su máximo potencial fagocítico y secretor. Se sabe que este efecto se provoca mediante interleucinas, el  $IFN\gamma$  es la principal interleucina activadora de macrófagos, seguidas por otras como la IL-4. Las acciones de los macrófagos dependen de citocinas que se encuentran en el medio y por cuales son activados. Esta diferencia en mecanismos de acción se conoce como polarización del macrófago, lo cual se refiere a que esta célula fagocítica, se va a categorizar en dos subtipos conocidos como M1 y M2. Los macrófagos M1, son previamente activados por citocinas Th1 proinflamatorias principalmente  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  y/o por el reconocimiento del LPS bacteriano. Este subtipo de macrófagos produce y secretan en mayor cantidad, citocinas proinflamatorias como IL-1a, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23y ciclooxigenasa-2 (COX-2), y bajos niveles de IL-10. Los macrófagos M1, tienen un papel importante en la eliminación de patógenos mediante el sistema nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa y por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Es por ello que los M1, tienen fuerte actividad antimicrobiana y antitumoral, además de inducir daño tisular por ROS y repercutir en la regeneración tisular y en la cicatrización de heridas. Hablando de los macrófagos M2, se puede mencionar que son antiinflamatorios y que son polarizados mediante las citocinas de tipo Th2, como lo son la IL-4 e IL-13, aunque la IL-10 también puede dirigir la polarización M2. Los macrófagos M2, tienen un perfil de citocinas antiinflamatorias, por lo tanto, existe alta producción de IL-10 y de TGF- $\beta$  y baja producción de IL-12. Funcionalmente los M2, poseen una alta capacidad fagocítica,



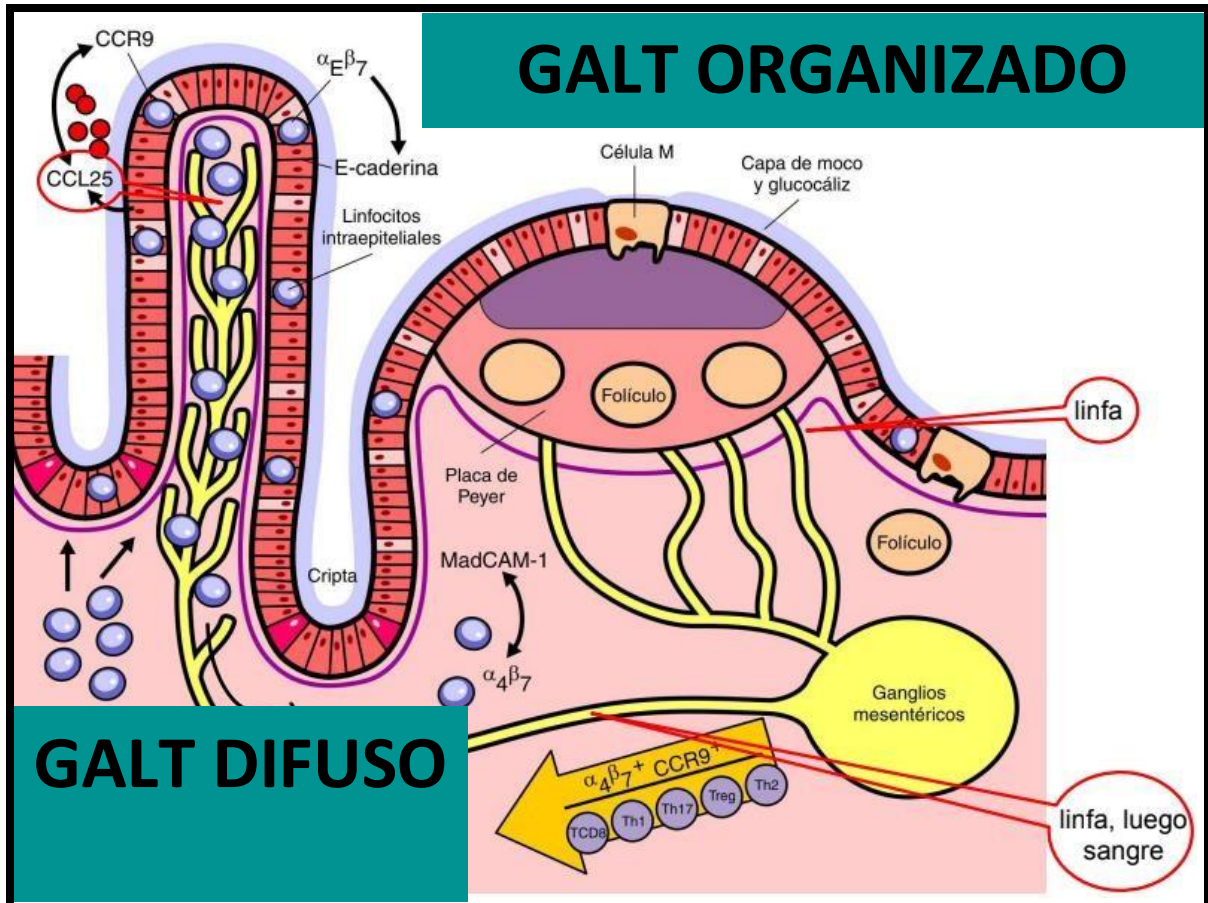
eliminan los desechos y células apoptóticas, promueven la reparación de tejidos y la cicatrización de heridas, además poseen capacidades proangiogénicas y profibróticas. Se sabe que los macrófagos M2, se subcategorizan en los grupos M2a, M2b, M2c y M2d., dependiendo del estímulo de activación. Se ha sugerido que el subconjunto M2a, se activa por la inducción de las interleucinas IL-4 e IL-13, la activación de este subconjunto produce elevados niveles del receptor CD206, relacionado con la IL-1. Por otro lado, se sabe que el subconjunto M2b es activado por inmunocomplejos y agonistas del receptor tipo-Toll, este subconjunto secreta citocinas antiinflamatorias y también proinflamatorias como lo son IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ . El subconjunto M2c es polarizado por glucocorticoides o por la IL-10, se le asocian altas actividades antiinflamatorias contra células apoptóticas, esta función se explica por la liberación de grandes cantidades de IL-10 y TGF- $\beta$ . El último subconjunto, es el M2d, diferenciado por agonistas del TLR a través del receptor de adenosina. Algo destacable de la diferenciación entre macrófagos M1 y M2, es que si las señales que activan al M1 están en presencia de un M2, este puede repolarizarse y de la misma forma si las señales activadoras de un M2 se mantienen en presencia de un M1, ocurre la repolarización. Esta actividad nos habla de la gran plasticidad funcional que poseen estas células, la cual podría ser utilizada de manera terapéutica <sup>34,35</sup>.

## I.6 Inmunidad intestinal

El sistema inmunitario intestinal constituye la parte más extensa y compleja del sistema inmune. Recibe diariamente una enorme carga antigénica y es capaz de distinguir entre patógenos invasivos y antígenos inocuos procedentes de los alimentos y de bacterias comensales. El intestino posee mecanismos de defensa que limitan el acceso de sustancias nocivas al organismo. Esta barrera intestinal está integrada por diversos elementos como enzimas digestivas pancreáticas, el epitelio intestinal y las bacterias que constituyen la flora intestinal. Sin embargo, la barrera más efectiva está constituida por el tejido linfoide asociado al intestino o GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*). Para comprender cómo se desarrolla y se regula la respuesta inmunitaria en el intestino y cómo esta se extiende en el de mucosas y del organismo, es importante conocer la composición y organización del GALT (**Figura. 6**). El GALT, está organizado anatómicamente en dos compartimientos, el primero conocido como GALT *organizado*, es el responsable de inducir la respuesta inmunitaria, dentro de sus componentes encontramos folículos linfoides aislados, folículos linfoides asociados o también llamados placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos.

Las placas de Peyer contienen folículos, áreas interfoliculares y a las células M. El segundo compartimento, es conocido como GALT *difuso*, este es el tejido efector de la respuesta inmune, y está formado por colonias de linfocitos, dispersas en el entramado epitelial, (intraepithelial lymphocytes -IEL) o en la lámina propia, (lamina propria lymphocytes -LPL)

36.

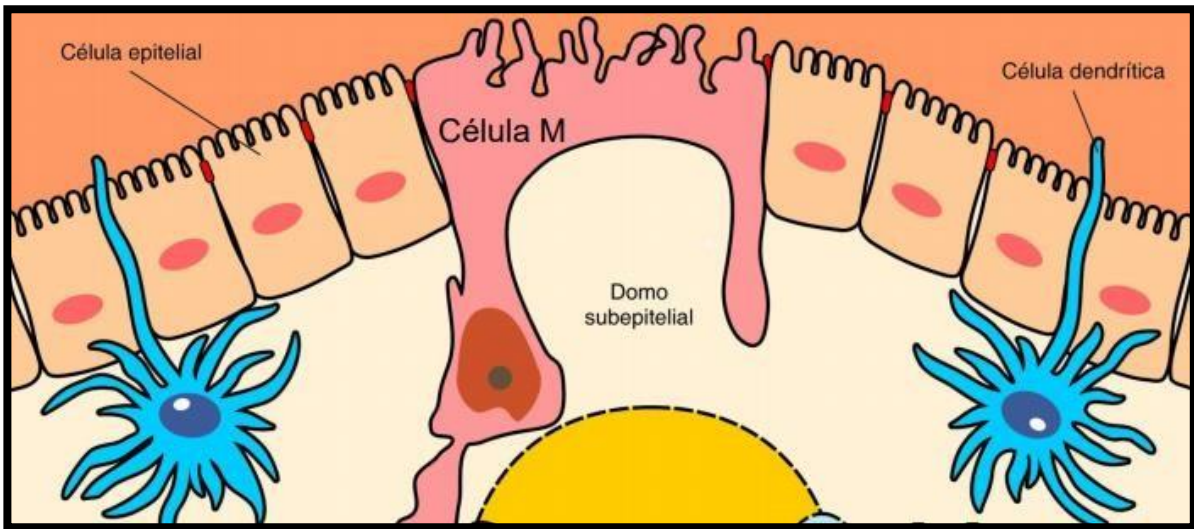


**Figura.6.** Estructuras conformacionales del tejido linfoide asociado a mucosas (GALT), difuso y organizado. Seminario 09, Inmunidad de mucosas (2019). Modificada

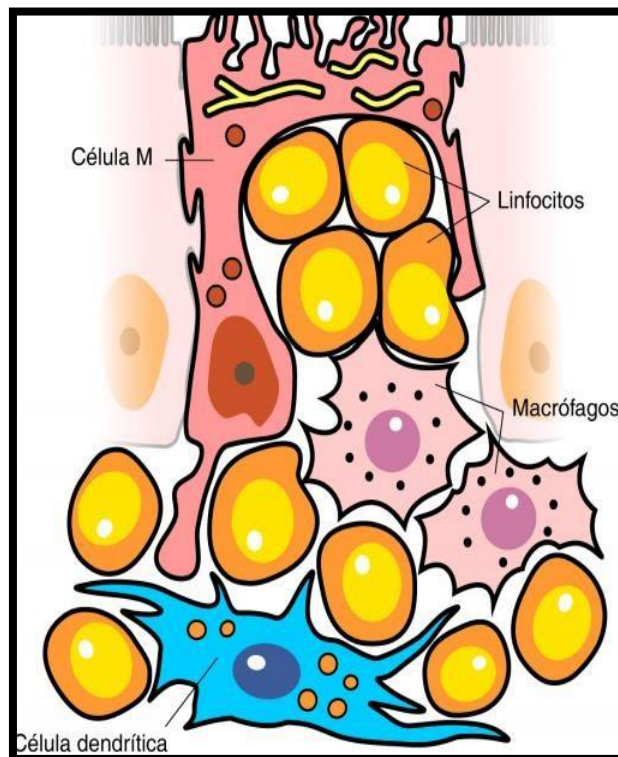
### I.6.1 Respuesta del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) ante antígenos

Los antígenos que llegan hasta el GALT suelen ser interiorizados, la manera más común en la que esto se realiza es por medio de las células M (**Figura. 7**), las cuales son enterocitos especializados en captar antígenos que se encuentran en el lumen. Su delgada capa de glicocálix y la ausencia de microvellosidades, facilitan la unión de los antígenos a su superficie. Es conocido que las células M, no son la únicas con capacidad de captar y presentar antígenos del lumen intestinal. Los enterocitos tienen desarrollada esta función, aunque con menor accesibilidad debido a sus características anatómicas, otra vía de acceso de los antígenos es por medio del espacio intercelular, donde las células dendríticas proyectan sus prolongaciones para captarlos. Una vez que las células M captan un antígeno, que puede ser patógeno o no (proteínas), comienza el proceso de interiorización, para ser presentados a las células presentadoras de antígenos (CPA) (**Figura. 8**). A través de sus vesículas, son llevados a la membrana basolateral, la cual presenta una invaginación, conocida como bolsillo intraepitelial (*intrephitelial packet*), en este sitio se encuentran linfocitos y macrófagos, encargados de procesar y presentar el antígeno <sup>36, 37</sup>.

Las CPA, procesarán los antígenos hasta fraccionarlos en péptidos antigénicos, mismos que se expresarán en su membrana plasmática asociadas al complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHCII) para que los reconozcan los receptores de células T (TCR). Cuando los linfocitos T son activados, se dividen en subpoblaciones denominadas Th1 y Th2 con una función que dependerá de las citocinas secretadas. Algo que hace muy interesante a los linfocitos T activados en el GALT, es que presentan un patrón de moléculas de adhesión, así como receptores de quimiocinas, diferentes a los linfocitos activados en otros órganos linfoides periféricos, y de esta manera su movilización se dirigirá hacia el sitio de lesión en la mucosa. Tanto los linfocitos Th, Tc, y las células plasmáticas, las cuales finalizan su maduración secretando IgA, se mantienen distribuidos en diferentes puntos de la lámina propia del intestino y el epitelio. Estas células se mantienen en estado latente, para que, en una segunda interacción con el antígeno, ejerzan sus funciones efectoras anteriores. La IgA es la inmunoglobulina más abundante en la mucosa intestinal y toma un papel muy importante en la protección de esta. La IgA secretora ejerce tres funciones muy importantes: 1. No desencadena inflamación, 2. Resiste proteólisis y 3. Forma inmunocomplejos con antígenos intraluminales, evitando el ingreso de estos. Estas características hacen a la IgA, ideal para la protección intestinal <sup>36</sup>.

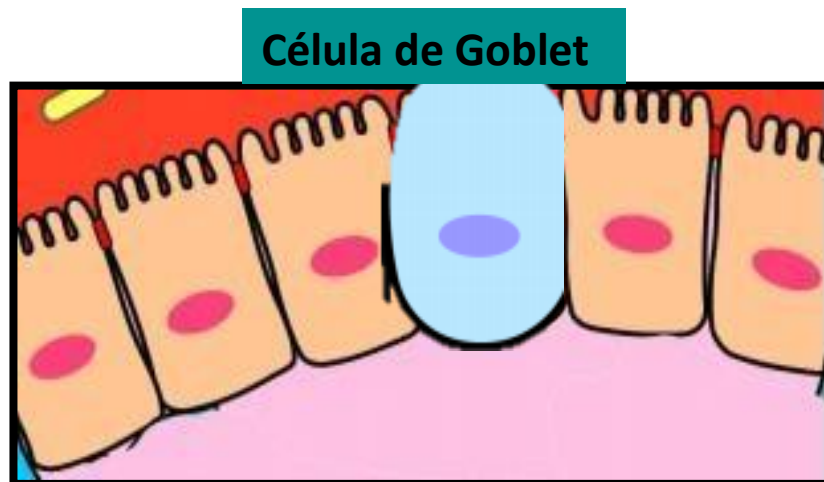


**Figura.7** Enterocitos, Células dendríticas y Células M.  
 Seminario 09 Inmunidad en mucosas, (2019)

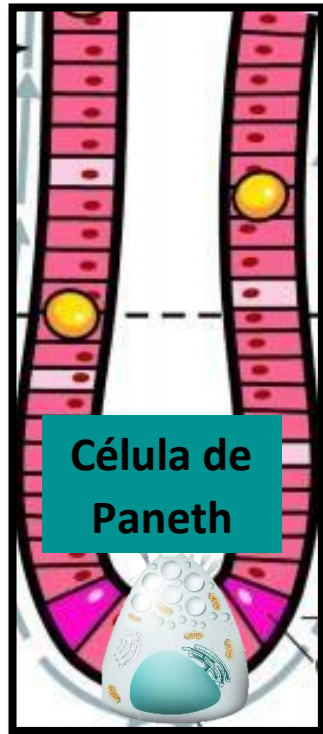


**Figura.8** CPA, en la parte inferior de la célula M.  
 Seminario 09 Inmunidad en mucosas, (2019)

Además de todas las estructuras mencionadas anteriormente, existen otro tipo de células que intervienen en la protección intestinal, directa o indirectamente, un ejemplo de ellas son las células de Goblet (**Figura. 9**). Estas células son las encargadas de producir el moco que recubre al epitelio intestinal, protegiéndolo de la deshidratación y del daño mecánico que pueden producir ciertos patógenos. A pesar de servir como una barrera, el moco permite la entrada de moléculas de bajo peso molecular y por tanto de los nutrientes. La mucina secretada por las células de Goblet, está compuesta de iones, IgA, nutrientes, agua y péptidos antimicrobianos. Aunque el moco secretado por las células antes mencionadas, contienen péptidos antimicrobianos, no son estas la fuente principal de los mismos. Las células de Paneth (**Figura 10**), son las encargadas de la producción de estos péptidos, estas células se ubican en el intestino delgado y la producción de estas moléculas se lleva a cabo de manera ribosomal, el estímulo necesario para la secreción de los péptidos antimicrobianos está sujeto a la presencia de agonistas colinérgicos, ácidos lipoteicoicos y lipopolisacárido (LPS), abundantes en bacterias Gram (+) y Gram (-) respectivamente, aunque no son estimuladas por parásitos ni hongos. Las defensinas, son los péptidos antimicrobianos más abundantes en el intestino y principalmente la  $\alpha$ -defensina, aunque no son las únicas sustancias con capacidad antimicrobiana, las Células de Paneth también secretan lisozima C, fosfolipasa, lectinas tipo C y ribonucleasas, todos estos relacionados con la defensa del hospedero <sup>38</sup>.



**Figura .9** Esquemización de una Célula de Goblet entre células epiteliales. Seminario 09 Inmunidad en mucosas, (2019). Modificada



**Figura.10** Esquematización de una Célula de Paneth en el fondo de una cripta intestinal. Seminario 09 Inmunidad en mucosas, (2019). Modificada

## II. Justificación

Las enfermedades gastrointestinales, son procesos patológicos en los que intervienen diferentes microorganismos, estrés, alimentación y medio ambiente. Estos procesos infecciosos y no infecciosos concluyen en mermas para la salud de los animales y por ende pérdidas económicas para el productor. A consecuencia de estas enfermedades y del uso indiscriminado de antibióticos, se ha generado un problema tanto para la salud como para el medio ambiente. Debido a ello, se han implementado diversas estrategias, que pretenden desplazar el uso de antibióticos para combatir estas enfermedades. El presente trabajo de investigación, busca evaluar el efecto inmunoestimulante de las MVs de BAL aisladas de *Rattus norvegicus* de vida libre, lo anterior para dar seguimiento al uso de MVs como probióticos acelulares, que demostraron en un trabajo previo, la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos gastrointestinales en condiciones *in vitro*. La consolidación del uso terapéutico de las MVs, permitirá obtener grandes beneficios en los animales de producción, ya que se pretende que disminuya la presentación de enfermedades del tracto digestivo, se reduzca el uso de antibióticos y los costos de tratamiento, así como reducción en el número de muertes y secuelas que deja el síndrome de malabsorción.

## III. Hipótesis

Si las MVs producidas por BAL, arrastran antígenos de superficie, así como aquellos que se encuentran en tránsito, entonces estas podrán ejercer un efecto inmunoestimulante sobre macrófagos mantenidos en condiciones *in vitro*, tal y como lo hacen las células completas de BAL.

## IV. Objetivo general

Evaluar *in vitro* el efecto inmunoestimulante de las Microvesículas (Mvs) de *L. acidophilus* cepa 54, aislada de íleon de *Rattus norvegicus* de vida libre, y de una cepa ATCC 314 de *L. acidophilus*, sobre la línea celular RAW. 264.7

## V. Objetivos particulares

1. Obtener MVS de BAL a partir de sobrenadante de cultivo e identificarlas mediante SDS-PAGE y microscopía electrónica.
2. Establecer cultivos de la línea celular RAW. 264.7, para llevar a cabo la estimulación de éstas con diferentes concentraciones de MVs de BAL y a diferentes tiempos de exposición.
3. Cuantificar mRNA de citocinas: IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , a partir de Macrófagos previamente estimulados con MVS y células completas de BAL, mediante qRT-PCR.

## VI. Diseño Experimental

En el experimento se utilizará una cepa de BAL aisladas del tracto gastrointestinal de *Rattus norvegicus* de vida libre, caracterizada mediante PCR y sistema API 50CHL obtenida de un trabajo previo, así como una cepa de referencia ATCC, su género y especie, así como su origen, se observan en la **Tabla 4**. Estas cepas han sido utilizadas en trabajos de investigación previos y se ha comprobado su capacidad de producir MVs.

**Tabla 4.** Origen de las cepas seleccionadas para el estudio

N° de cepa	Género y Especie	Origen
ATCC	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 314 KWIK STIK.
54	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Íleon de <i>Rattus norvegicus</i>

El experimento estará dividido en tres fases, en la Fase I, se obtendrán las MVs, paralelamente se realizará microscopia electrónica de transmisión a cada una de las cepas, para asegurar que estas son productoras de MVs, simultáneamente se realizará SDS-PAGE al 12% a las muestras de MVs obtenidas de cada cepa, para visualizar los diferentes patrones de proteínas que acarrean las MVs. La Fase II, consistirá en montar los cultivos celulares de la línea celular RAW. 264.7 para su posterior enfrentamiento con diferentes concentraciones de MVs de BAL, obtenidas previamente. Finalmente, en la Fase III las



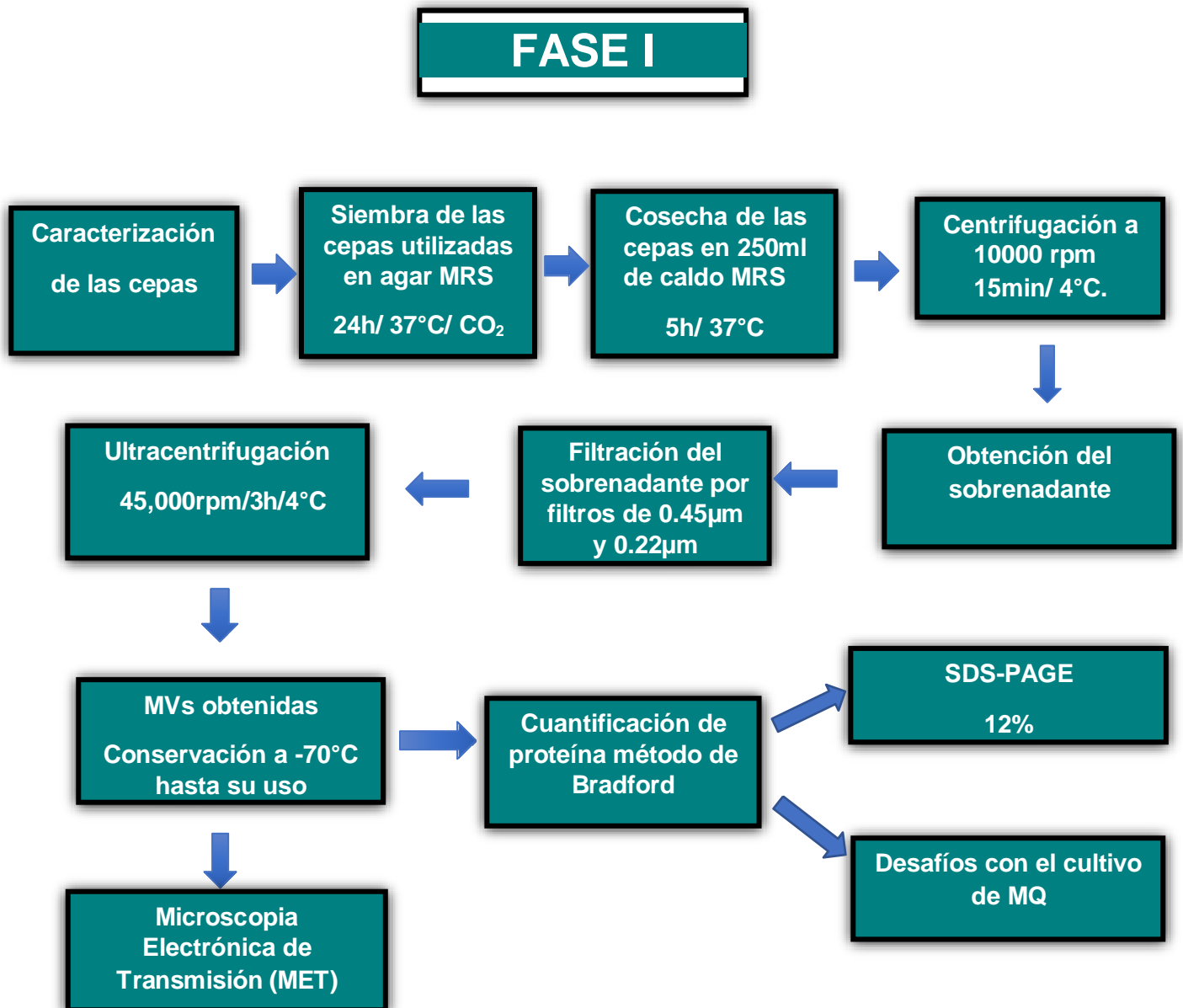
células en cultivo se recuperarán para realizar la técnica de qRT-PCR y de esta manera evaluar la expresión de citocinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ .

## **VII. Materiales y Métodos**

### **VII.1 FASE I Caracterización de las cepas, obtención, y análisis de MVS**

La metodología del presente proyecto se dividirá en tres fases. La Fase I, se basa en la obtención de MVs de una cepa de BAL de campo, aisladas a partir del tracto gastrointestinal (TGI) de *Rattus norvegicus* de vida libre, en un trabajo previo, además de una ATCC utilizada en el mismo trabajo. Ambas cepas fueron caracterizadas mediante sistema API 50CHL, además de comprobar su capacidad probiótica mediante pruebas físicas como pH, temperatura y resistencia a sales biliares. En el siguiente esquema (**Esquema. 1**), se describe el proceso para la obtención y el análisis de las MVS.

## Esquema 1. FASE I.



Para la caracterización de las cepas, mediante el sistema API 50 CHL se siguieron las instrucciones del fabricante. Las cepas seleccionadas se mantuvieron en crecimiento por 5h/37°C/CO<sub>2</sub>, en tubo cónicos de 15 ml, posteriormente se centrifugó el cultivo para obtener el pellet, el cual se utilizó para mezclarlo con el medio API, se colocó en las galeras en ambiente estéril, se cubrieron los pozos con aceite mineral estéril, y se mantuvo en incubación para dar lectura a las 24 y 48 horas. Los resultados se interpretaron en la página

APIweb™. Para ampliar la caracterización bioquímica se emplearon pruebas de catalasa y oxidasa.

Durante el proceso de caracterización, se realizaron pruebas físicas como resistencia al pH de 5, resistencia a sales, en este caso se utilizó hidróxido de sodio NaOH a 10N y a diferentes temperaturas, 15°C y 45°C. Para estas pruebas, se utilizó ácido clorhídrico HCL a 10N para disminuir el pH hasta 5. Se comenzó por adecuar el pH del medio de crecimiento MRS, en el cual se sembraron las cepas seleccionadas, el NaOH se agregó hasta llegar a un pH de 7.4, una vez establecidos los medios de crecimiento, se inocularon las cepas de campo y ATCC por separado y se mantuvieron en incubación a 37°C/CO<sub>2</sub>. Para el crecimiento con diferencia de temperatura, se sembraron las cepas en caldo MRS y aumentando la temperatura de la estufa de incubación hasta los 45°C, para la temperatura de 15°C se adaptó una hielera para mantener dicha temperatura, ambas condiciones se realizaron en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. Pasadas las 24 horas se sacaron todos los cultivos y se les realizó tinción de Gram para descartar contaminación y comprobar crecimiento. Posterior a este proceso, las bacterias se sembraron en condiciones de crecimiento óptimas para éstos géneros bacterianos y de esta forma se confirmó la viabilidad de los mismos.

Las cepas utilizadas se crecieron, en agar MRS por 24h/37°C/CO<sub>2</sub>. Terminando el periodo de incubación, se cosecharon 250ml de caldo MRS 5h/ 37°C en ausencia de CO<sub>2</sub>, para aumentar el estrés del cultivo y así obtener una mayor cantidad de MVs. El cultivo se agregó a tubos cónicos Falcon de 50ml para centrifugar a 10,000 rpm /15 min/4°C, el sobrenadante se depositó en el sistema de filtrado millipore, pasando por un filtro PES Corning™ de 0.45µm de diámetro y posterior a este, por uno de 0.22µm. Terminando la filtración el sobrenadante se ultracentrifugó a 45,000 rpm/3h /4°C. Pasando las 3h, se recuperó el botón de cada tubo en 1ml de PBS 1x estéril y se conservó en criotubos a -70°C hasta su uso. Para la microscopía electrónica de transmisión, así como para la estimulación de los MQ, se usaron MVs frescas, además las MVs utilizadas en cultivo celular, se obtuvieron filtrando el sobrenadante por filtros de .45 µm únicamente, posterior a la obtención de las MVs se filtraron por filtros de .22 µm, previo al enfrentamiento con la línea celular RAW 264.7.

### **VII.1.1. Cuantificación de proteínas Método de Bradford**

Para la cuantificación de proteína, se utilizó Bradford Reagent, Odcznnik Bradford SIGMA desarrollando la curva estándar, según las especificaciones propias del kit. La absorbancia de las muestras se obtuvo agregando 100  $\mu$ l de agente revelador (Assay reagent) y 100 $\mu$ l de la muestra, en una placa de 96 pozos por triplicado, dejando incubar a 37°C /5 min, para posteriormente leer en un lector de placa de ELISA con una longitud de onda de 595 nm.

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

### **VII.1.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida, Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE)**

Para realizar la electroforesis, se usó el Kit de Bio-Rad Mini-Protean,<sup>R</sup> Tetra Cell, 4-Gel System 1658004 . Con geles pre-cast de 12%. Se tomaron 60 $\mu$ l de la muestra problema y se le adicionaron 20  $\mu$ l de Buffer de muestra (450 $\mu$ l de Laemmli y 50  $\mu$ l de  $\beta$ ME), sometiéndose a ebullición a 95°C/ 5 min. Una vez hervida la muestra, se cargó volúmenes homogéneos con concentración de proteína de 2 $\mu$ g en cada carril, dejando siempre en el primer carril, el marcador de peso molecular (Dual color standars, Bio-rad, 1610374TGX) del cual se colocarán 2 $\mu$ l. EL gel de SDS – PAGE, se corrió a 100 volts / 2.5 h.

### **VII 1.3. Tinción de Plata para SDS-PAGE**

Terminando el tiempo de corrimiento, el gel se tiñó con el kit Silver Stain, Pierce<sup>TM</sup> Thermo Scientific. Para la tinción, se inició por lavar el gel en agua ultrapura, dos veces por 5 minutos, al terminar, el gel se fija en una solución al 30% de etanol y 10% de ácido acético, haciendo recambios 2 veces cada 15 minutos, se continúa lavando el gel en una solución de etanol al 10% recambiándola 2 veces cada 5 minutos, posterior a esto el gel se lava con agua ultrapura dos veces por 5 minutos cada una. Las 3 soluciones que son utilizadas para los pasos posteriores se preparan al momento, siguiendo las instrucciones propias del kit. Se mantiene el gel con la primera solución (Sensitizer Working Solution) durante 1 minuto y consecutivamente se lava con agua, 2 veces, por 1 minuto cada una, posteriormente se

emplea la segunda solución (Stain Working Solution), manteniendo el gel durante 30 minutos en ella, al terminar el tiempo, se lava el gel 2 veces por 20 segundos con agua ultrapura e inmediatamente se añade la tercera solución (Developer Working Solution) por 2 o 3 minutos hasta que las bandas aparecen. El proceso de revelado se detiene, agregando una solución al 5 % de ácido acético, por 10 minutos.

#### **VII.1.4. Microscopía Electrónica de Transmisión**

##### Preparación de la muestra

Las muestras de MVs fueron obtenidas, mediante el procedimiento antes descrito, modificando únicamente el medio con el que se mantuvieron resuspendidas, siendo este buffer de cacodilatos.

##### Preparación de rejillas

Las rejillas de níquel se colocan en una membrana de fobar (0.75g y 25ml de cloroformo) con la cara clara en contacto con la membrana, dejando la cara oscura hacia arriba. Las rejillas se recogen con un trozo de papel parafilm. Se observan en el microscopio electrónico de transmisión marca Jeol, modelo JEM-1400, para comprobar que en la membrana no existen poros. Al observar que la membrana está en buen estado, se continúa a sombrear con carbón y se mantienen cubiertas e identificadas hasta su uso.

##### **VII.1.4.1 Observación de las muestras**

Se elaboró la tinción de uranilo al 1% y de ácido fosfotúngstico (PTA) al mismo porcentaje y con un pH de 6, filtrándose ambos al momento de ser utilizados con filtros de PES Corning™ de 0.22µm.

Para la observación de rejillas con la tinción de uranilo, se tomó una gota de la muestra y se colocó en la cara oscura de la rejilla, dejando pasar 3 min. El exceso se secó con papel absorbente y a continuación se agregó una gota de uranilo y se retiró inmediatamente, se continuo agregando otra gota dejándolo actuar sobre la muestra por 30 segundos, para finalizar se retiró el exceso y se agregó nuevamente una gota del colorante manteniéndola por 2 min, el exceso se retiró y se observó la rejilla. Para la tinción de PTA el tratamiento de la muestra es el mismo, únicamente varía el tiempo en el que el colorante

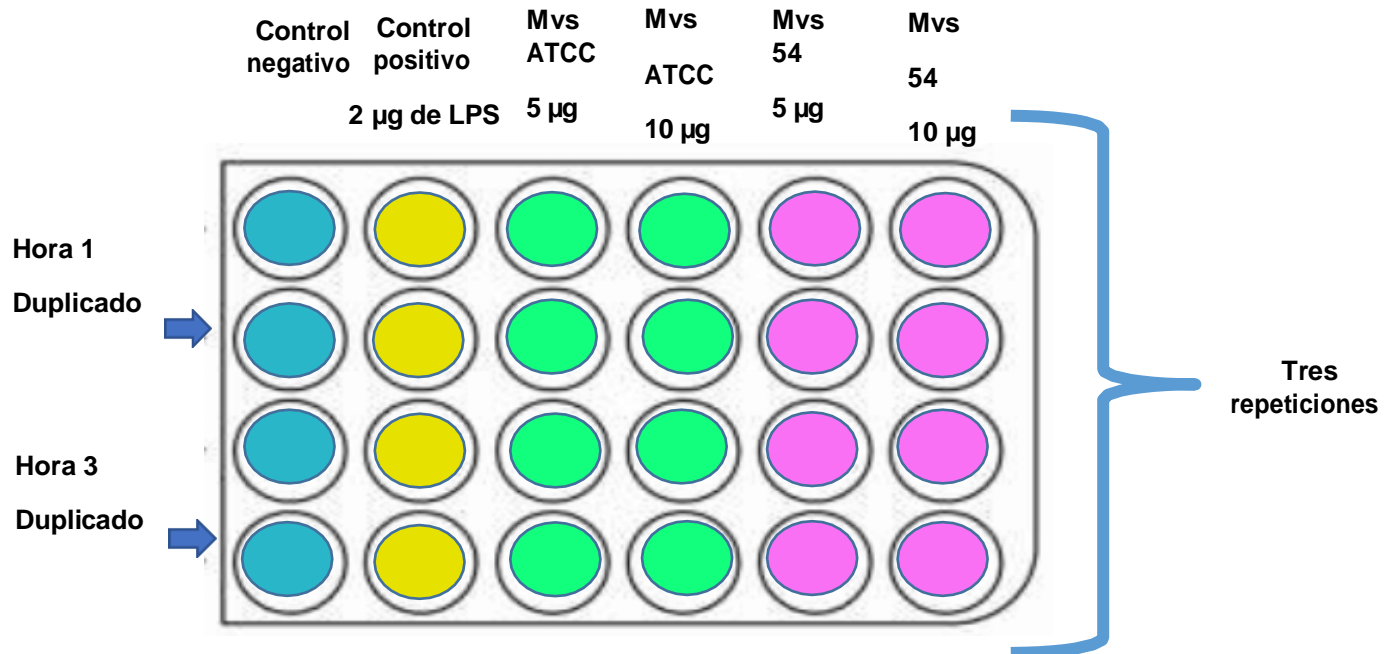
se mantiene en la rejilla, siendo este 1 min únicamente, retirando el exceso y observando la rejilla en el microscopio Jeol, modelo JEM-1400.

## **VII.2 FASE II. Estimulación de macrófagos mediante MVS de BAL**

La línea celular *RAW 264.7* se recibió descongelada en botellas Corning® *BioCoat™ Collagen I 25cm<sup>2</sup>* rectangulares, para posteriormente ser cultivada en placas de 100mm Corning® *BioCoat™ Collagen TC-Treated* en medio RPMI 1640 suplementado con: suero fetal bovino al 10% (SFB, GIBCO), L-glutamina 2 mM (GIBCO) y antibióticos (CAISSON) al 1% (Mo-MQ). Una vez adaptadas, al tener una confluencia del 90% se pasaron a placas de 24 pozos colocando 150,000 células por pozo, incubando a 37°C en condiciones de 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas para propiciar la adhesión celular. Una vez pasado el tiempo se observaron las células para corroborar su morfología y confluencia, después de esto, se realizaron los enfrentamientos de las MVs sobre los mismos.

Se asignó el primer pozo como control negativo, es decir, células sin ningún tratamiento, los siguientes pozos corresponden a los diferentes tratamientos que fueron: 2 µg de LPS (*Escherichia coli*) 0111: B4, Sigma Aldrich) como control positivo, 5 y 10 µg de MVs de la cepa ATCC y por último 5 y 10 µg de MVS de la cepa 54, cada concentración de MVs correspondieron a un pozo por separado. El cultivo se mantuvo en estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, en los tiempos 1h y 3h se recuperó el sobrenadante para futuros experimentos, las células se desprendieron por acción mecánica, agregando 1 ml de *Tryzol<sup>®</sup> LS Reagent ambion, Life technologies*, en cada pozo para ser recolectadas en tubos cónicos de 1.5 ml Eppendorf, las muestras se mantuvieron a -70 ° hasta su uso. Los seis tratamientos se realizaron por duplicado, repitiendo tres veces cada experimento independiente. Como se representa en el **Dibujo 1**.

## Dibujo. 1



**Dibujo 1.** Representación de la distribución de las muestras, durante el enfrentamiento entre MVS y la línea celular RAW 264.7

### VII.3 FASE III. Cuantificación de Interleucinas mediante qRT-PCR

A partir de las muestras obtenidas en los diferentes tiempos, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (qRT-PCR), para medir la producción de mRNA de las diferentes interleucinas. Las citocinas: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL 12. Para ello, primero se procedió a la extracción de RNA, partir de las células suspendidas en 1ml del reactivo de *Trizol* (*Life Technologies*) siguiendo las instrucciones del fabricante. La purificación e integridad de los extractos de RNA fueron evaluados por el equipo NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. Posterior a este procedimiento se realizó la obtención del cDNA, por medio del kit *NIPPON Genetics EUROPE*, con las siguientes constantes: 70°C por 5 min, 4°C por 5min, posteriormente 25°C por 5 min, 42°C por 60 min y 70°C durante 15 min, para dicho proceso se utilizó el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). Al concluir la extracción se cuantifico el cDNA en el mismo equipo utilizado para este fin. Se procedió a realizar el qPCR, con la siguiente mezcla: AMPLIQOON PCR ENZYMES & REAGENTS Mix 2x, 50ng de templado, 5mM de primer Fw y Rv, y se adicionó

cbp de agua libre de nucleasas, para completar la mezcla, de esta manera se corrió 1 ciclo de desnaturalización y posterior a ello, 40 ciclos con las siguientes constantes, 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 60°C y 72°C durante 20 segundos y para la etapa de la extensión final 95°C durante 5 segundos, 60°C por 10 segundos y 95°C durante 10 segundos. Al finalizar la reacción, se obtuvo la Ct, curvas de disociación y de amplificación. El termociclador de tiempo real con el que se trabajó fue Agilent technologies Mx3005P.

El análisis de la expresión relativa se realizó mediante el método  $\Delta\Delta C_t$  utilizando como gen de referencia el que codifica para la enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT1), con la secuencia Fw<sup>5'</sup>-ATTCCCAACAGACAGACAGAA<sup>3'</sup>, Rv<sup>5'</sup>- TTAGGTCGGAAGGCATCAT<sup>3'</sup>, teniendo una temperatura de alineación de 50°C con un tamaño del producto esperado de 229pb. El análisis de las diferencias entre los tratamientos, se realizaron con la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de FISHER para determinar la diferencia entre grupos, usando el paquete estadístico Statgraphics Centurion 18®. En todas las instancias, la significancia estadística se estableció con un valor de ( $p < 0.05$ ).

Las secuencias de primers para las interleucinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , fueron diseñadas por el equipo de trabajo del laboratorio junto con sus pares de bases y temperatura de amplificación, estas son representadas en el **Cuadro 3**.

**Cuadro 3.** Secuencias de *primers* y parámetros de alineación para la IL1 $\beta$  y una TNF $\alpha$

Interleucinas	<i>Primers</i>	Temperatura de alineación	Tamaño del producto esperado
IL1 $\beta$	Fw 5´- GGTGTGTGACGTTCCCATTA3´. Rv 5´-CGTTGCTTGGTTCTCCTTGT3´.	62°C	170pb
TNF $\alpha$	Fw 5´-TATGGCTCAGGGTCCAACCTC 3´. Rv 5´- CTCCCTTTGCAGAACTCAGG 3´.	62°C	174pb



## VIII. RESULTADOS

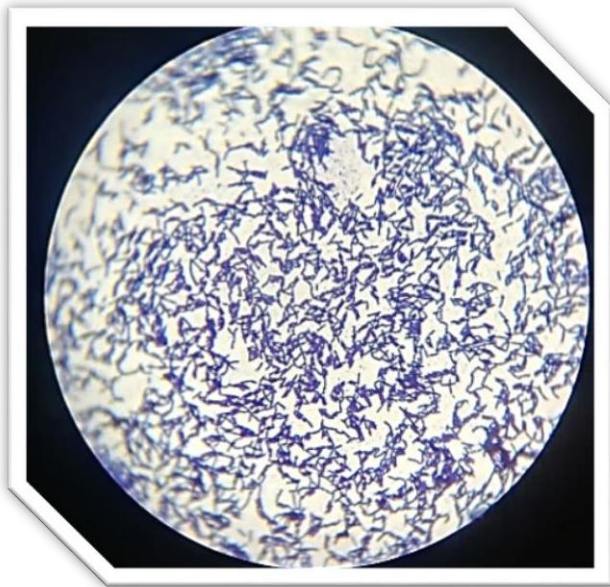
### VIII.1 Caracterización de las cepas

En los resultados de la caracterización bioquímica, se observó un alto porcentaje de identidad por arriba del 94% a *Lactobacillus acidophilus* además de tener una fuerte correlación con su morfología (**Imagen 1 y 2**) bacteriana con tinción de Gram. Las pruebas negativas de catalasa y oxidasa confirman el género y especie de las cepas utilizadas, dado que son características de este género bacteriano. En la **Tabla 5** se observan los resultados.

**Tabla 5.** Resultados de la caracterización bioquímica de las cepas de BAL

N° de cepa	% de identificación API-50CHL	Género y Especie	Morfología	Catalasa Oxidasa	Origen
ATCC	94.6%	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bacilos largos y delgados	(-)	ATCC 314 KWIK STIK.
54	94.2%	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bacilos largos y delgados	(-)	Íleon

## Imagen 1-2. Morfología de la cepa ATCC y cepa 54



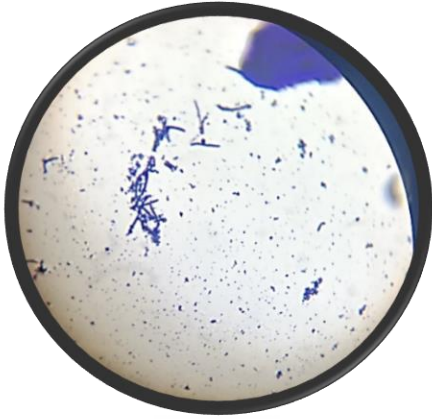
**Imagen 1.** Cepa de referencia,  
ATCC *L. acidophilus*



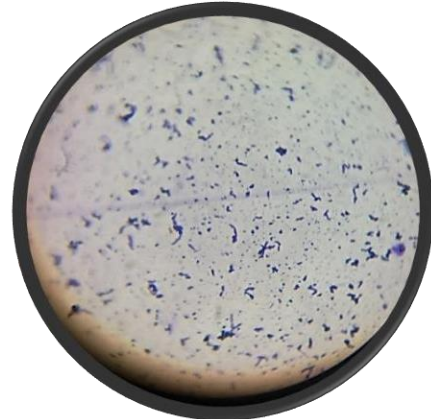
**Imagen 2.** Cepa de campo,  
54 *L. acidophilus*

### VIII.1.1 Pruebas físicas para las cepas probióticas de BAL

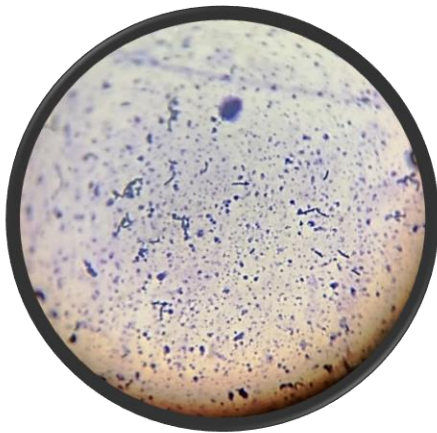
Las pruebas físicas se realizaron para evidenciar la capacidad probiótica de las cepas seleccionadas, entre ellas resistencia al pH ácido y básico, así como crecimiento en diferentes temperaturas. Las siguientes imágenes (**Imágenes 3-10**) muestran el crecimiento de las cepas en medios de cultivo con variantes de pH y temperatura. En las siguientes imágenes se observan dichos resultados.



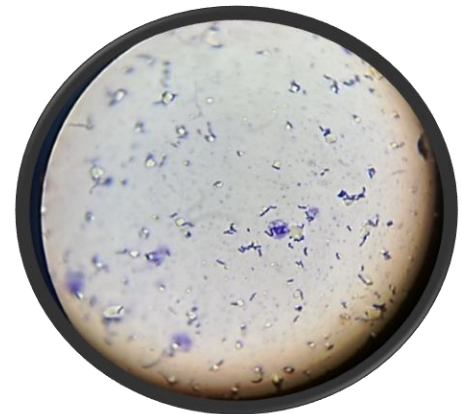
**Imagen 3.** Ceba 54, Gram (+),  
a 24 h de cultivo / 45°C



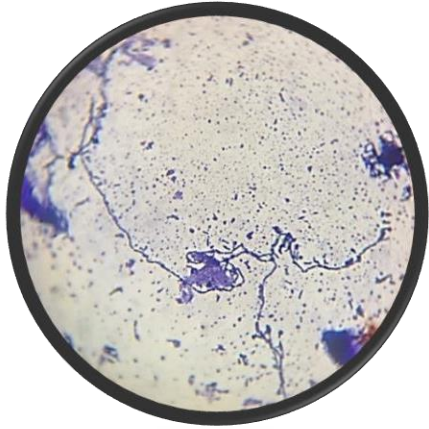
**Imagen 4.** Ceba 54, Gram (+),  
a 24 h de cultivo / 15°C



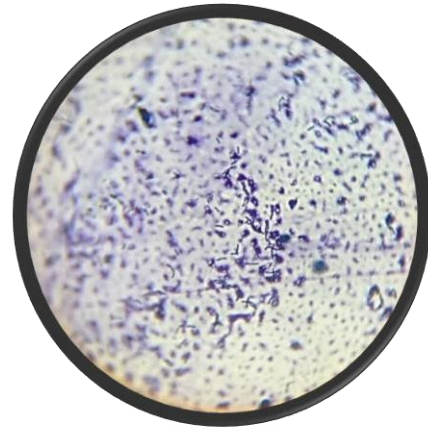
**Imagen 5.** Ceba 54 Gram (+),  
24 h / pH 5



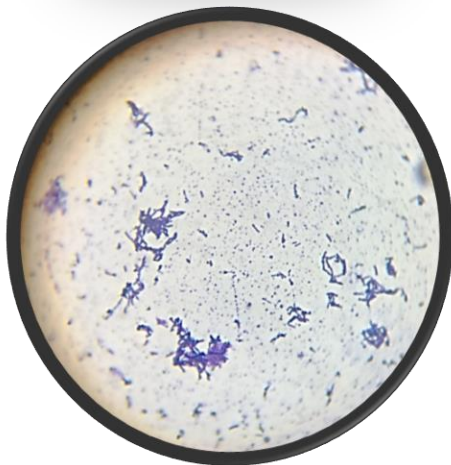
**Imagen 6.** Ceba 54, Gram (+),  
24 h pH 7.4 / NaOH



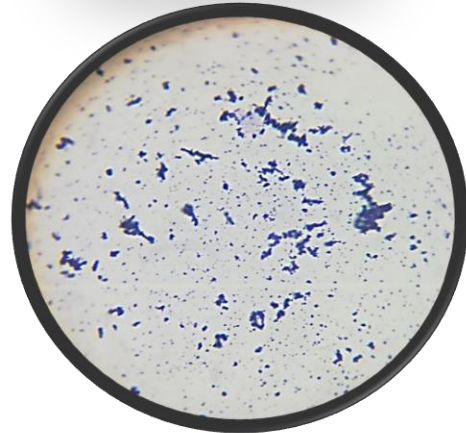
**Imagen 7.** Ceba ATCC Gram (+),  
24 h / pH 7.4 / NaOH



**Imagen 8.** Ceba ATCC Gram (+),  
24 h / pH 5

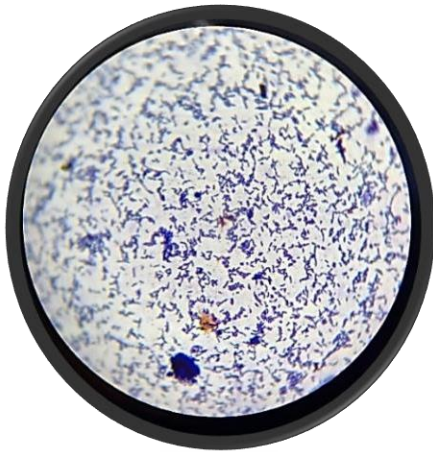


**Imagen 9.** Ceba ATCC Gram (+)  
24 h de cultivo / 15°C



**Imagen 10.** Ceba ATCC Gram (+),  
24 h de cultivo / 45°C

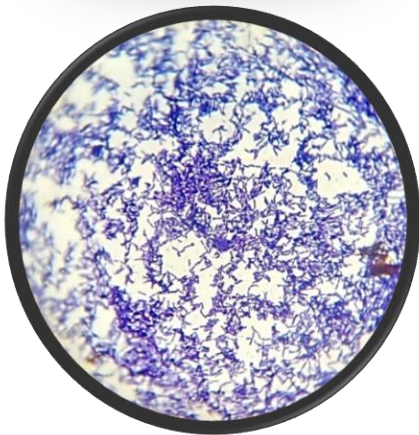
Después de las 24 h de crecimiento, los cultivos se sembraron en caldo MRS mantenidas en condiciones óptimas (**Imágenes 11-18**), para comprobar su viabilidad. En las siguientes imágenes se observan los resultados.



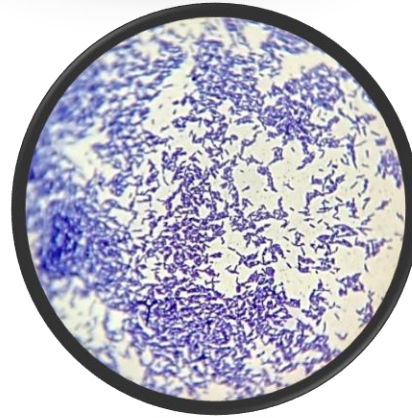
**Imagen 11.** Ceba 54 Gram (+),  
resiembra a partir del cultivo  
de pH 5



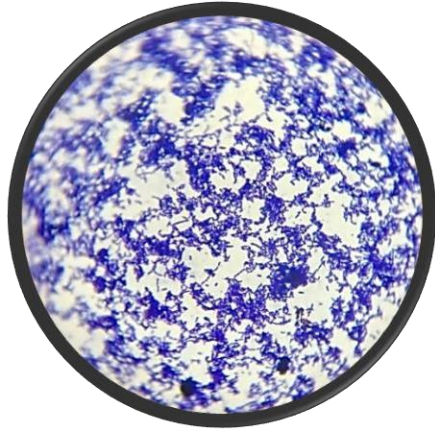
**Imagen 12.** Ceba 54 Gram (+),  
resiembra a partir del cultivo  
de pH 7.4 NaOH



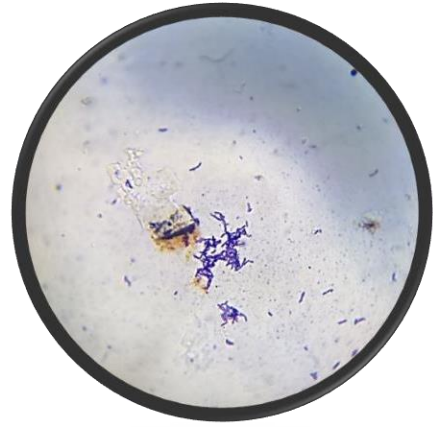
**Imagen 13.** Ceba 54 Gram (+),  
resiembra a partir del cultivo de 45°C



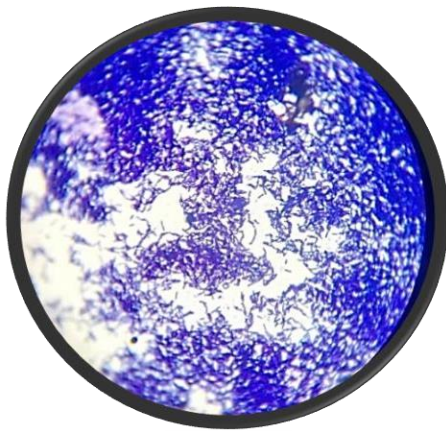
**Imagen 14.** Ceba 54 Gram (+),  
resiembra a partir del cultivo de 15°C



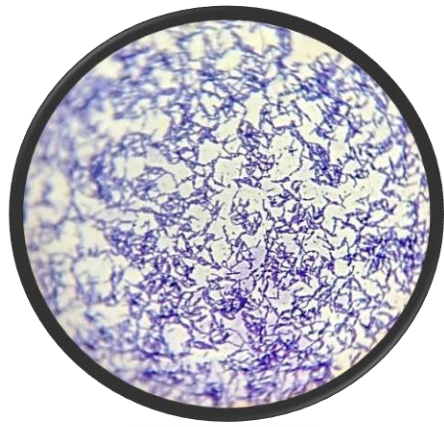
**Imagen 15.** Cepa ATCC Gram (+),  
resiembr a partir del cultivo de pH 5



**Imagen 16.** Cepa ATCC Gram (+),  
resiembr a partir del cultivo de pH 7.4  
NaOH



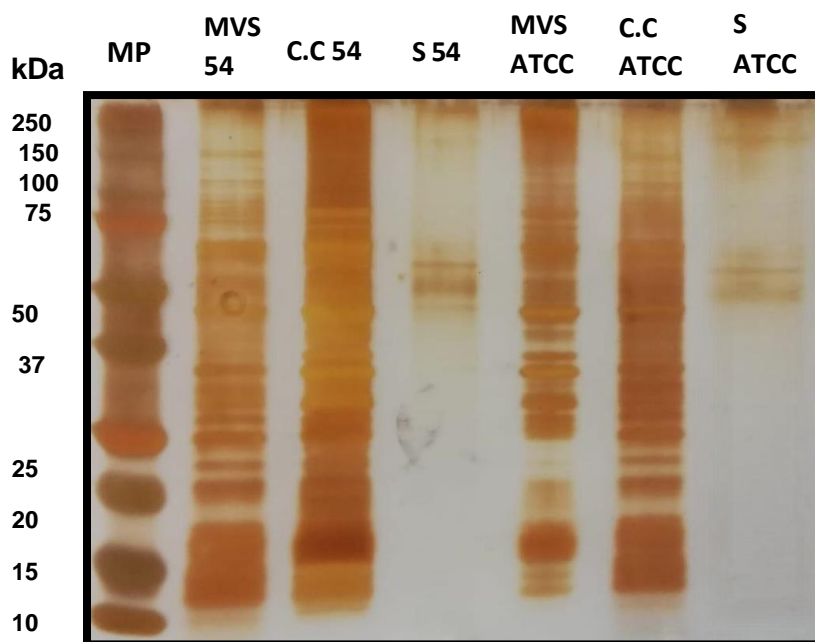
**Imagen 17.** Cepa ATCC Gram (+),  
resiembr a partir del cultivo de 45°C



**Imagen 18.** Cepa ATCC Gram (+),  
resiembr a partir del cultivo de 15°C

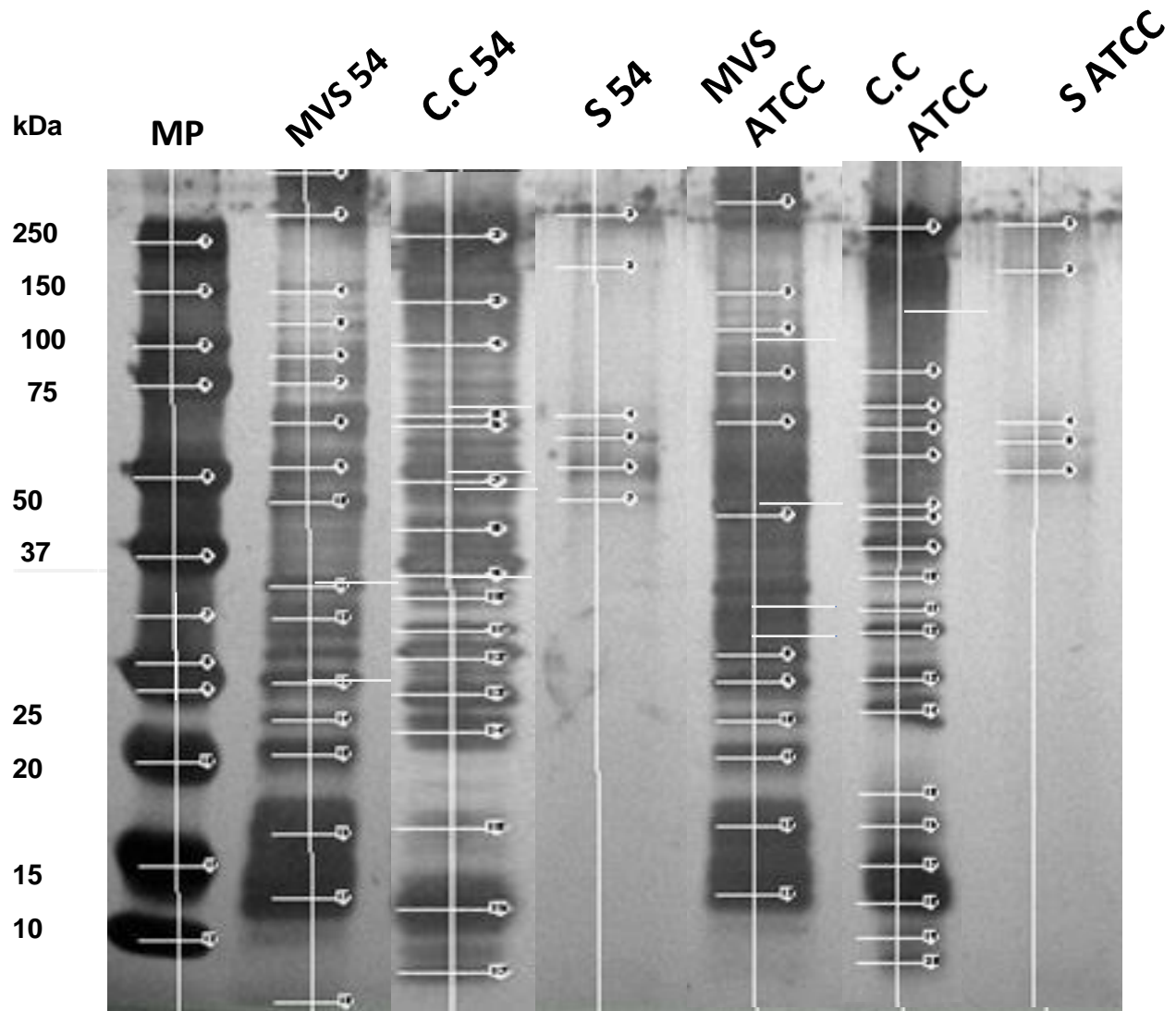
### VIII.2 Perfil electroforético de las proteínas presentes en las MVs, células completas y sobrenadantes.

A partir de la cuantificación de proteínas de las muestras de las diferentes cepas a trabajar, se corrieron geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% /100volt /2.5h, para que una vez teñidos mostraran las proteínas arrastradas en cada muestra **Imagen 19**. Posteriormente usando el software antes mencionado fue posible determinar el perfil electroforético de las proteínas que arrastran y componen las microvesículas (MVs), células completas C.C y sobrenadante S. **Imagen 20**.



**Imagen 19.** Gel al 12% SDS-PAGE, teñido con el kit Silver Stain, Pierce, TM Thermo Scientific. Peso molecular, Microvesículas obtenidas por ultracentrifugación, Células completas y Sobrenadante de la cepa ATCC Y CEPA 54

VIII.2.1 Análisis del gel SDS-PAGE 12% con el software KODAK Gel-Logic 100 system

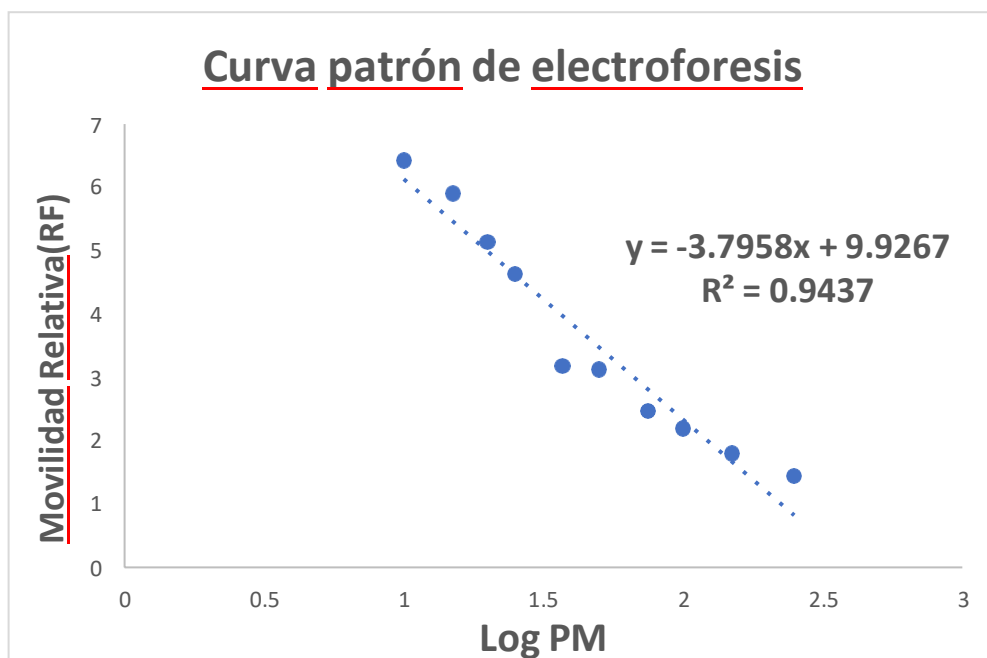


**Imagen 20-** Analisis del gel de poliacridamida al 12% detección de bandas correspondientes a proteínas mediante el software KODAK Gel-Logic 100 system,



### VIII.2.2 Cálculo de la movilidad relativa y obtención de los pesos moleculares del perfil electroforético

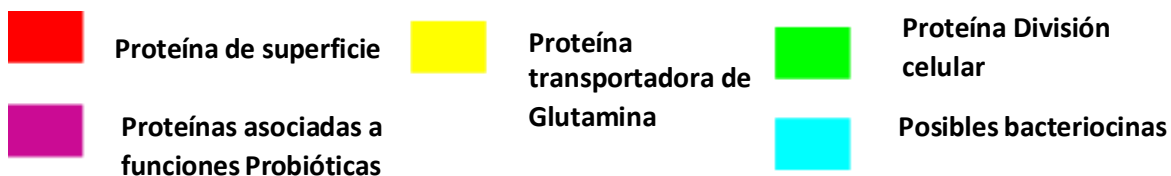
Para el cálculo de los pesos moleculares de las muestras utilizadas, se realizó la movilidad relativa de cada banda de proteína reflejada en el gel SDS-PAGE 12%. En el **Gráfico. 1**, se expresa la curva patrón que se elaboró para dicho cálculo, donde podemos observar que R tiene un resultado confiable por arria del .9. En la **Tabla. 5**, se plasmaron todas las proteínas encontradas en el corrimiento electroforético, categorizadas por peso molecular y muestra de origen, resaltando las proteínas de mayor interés.



**Gráfico 1.** Curva patrón para el cálculo de la movilidad relativa de proteínas, por peso molecular del corrimiento electroforético de las muestras de MVs de las cepas ATCC y 54.

**Tabla 6.** Perfil electroforético de la cepa 54 y ATCC de *L. acidophilus* correspondiente a **MVs** (Microvesículas), **S** (Sobrenadante), **C.C** (Células Completas)

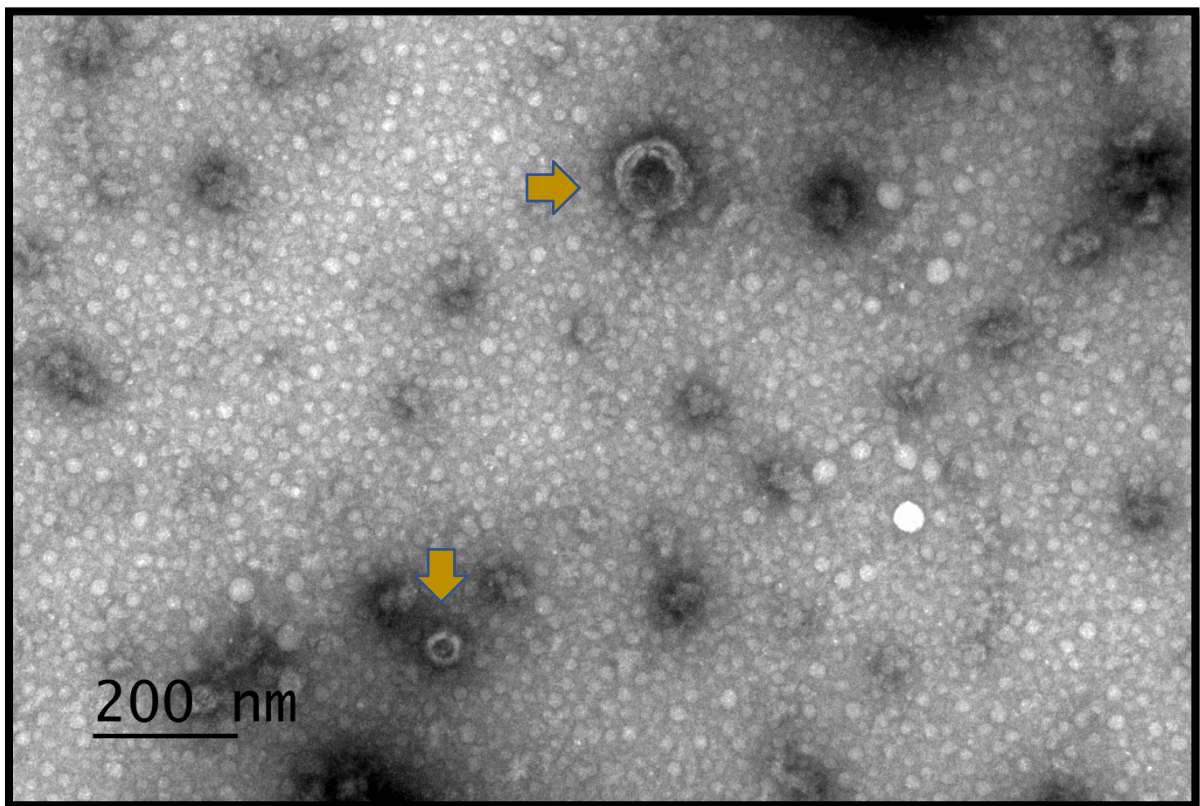
Marcador de PM	54 MVs	54 S	54 C.C	ATCC MVS	ATCC S	ATCC / CC
kDa	378	392	371	358	369	358
250.00	231 193		222	269 211 240	191	219
150.00	154 150	193	169 140	130 141	155	150 141
100.00	139 121 105	154	103 99	120 99 87	80	118 101 92
75.00	93 75	80 73	78 75 70	85 75 60 64	73 64	82 66 62
50.00	64 59 65	64 56	64 55 53	40 47 54	44 50	55 48 42
37.00	37 40 33 32 35		47 41 37 31	37 29 32		38 31
25.00	30 25 21		27 18	28 27 25		27
20.00	18		17	21		19
15.00	13 11		12	18 13 16		16 13
10.00	10 6		9	10		10



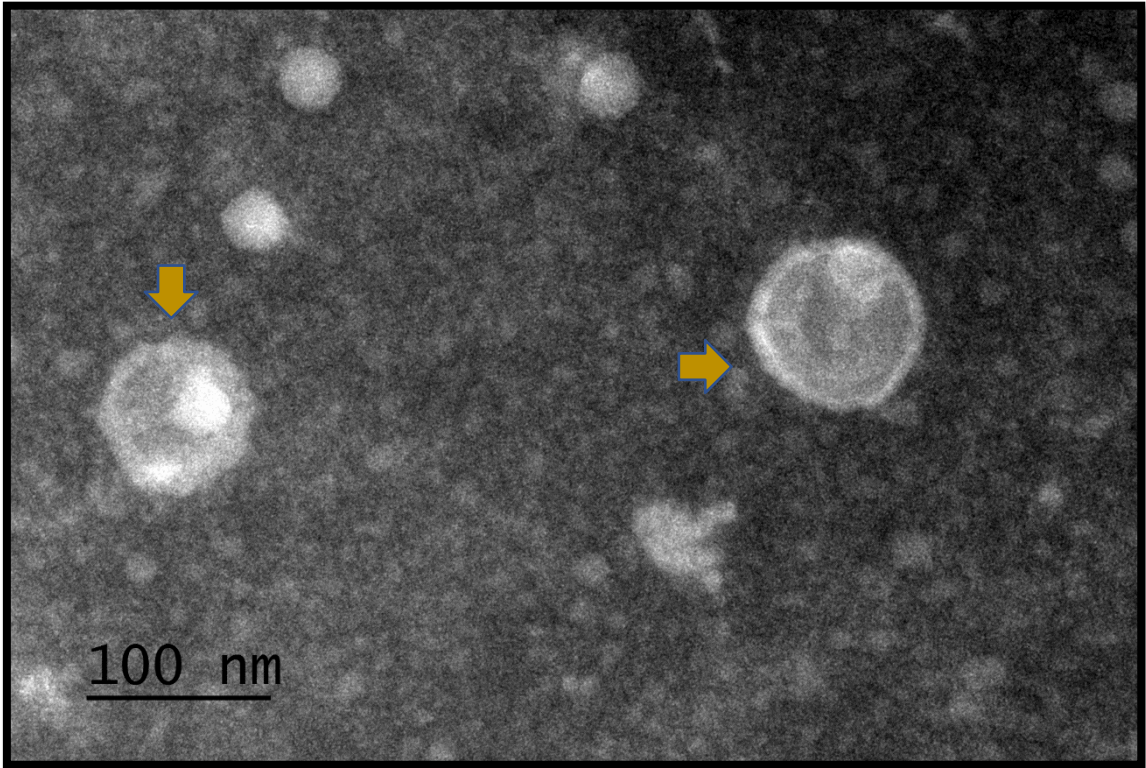
### VIII.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las muestras de MVs evaluadas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), marca Jeol, modelo JEM-1400, correspondientes a las cepas ATCC y 54 ambas a *L. acidophilus*, demostraron la presencia de MVs que evidencian una doble membrana que delimita dichas estructuras. Las microfotografías realizadas (**Imagen 21 -26**), se presentan a continuación.

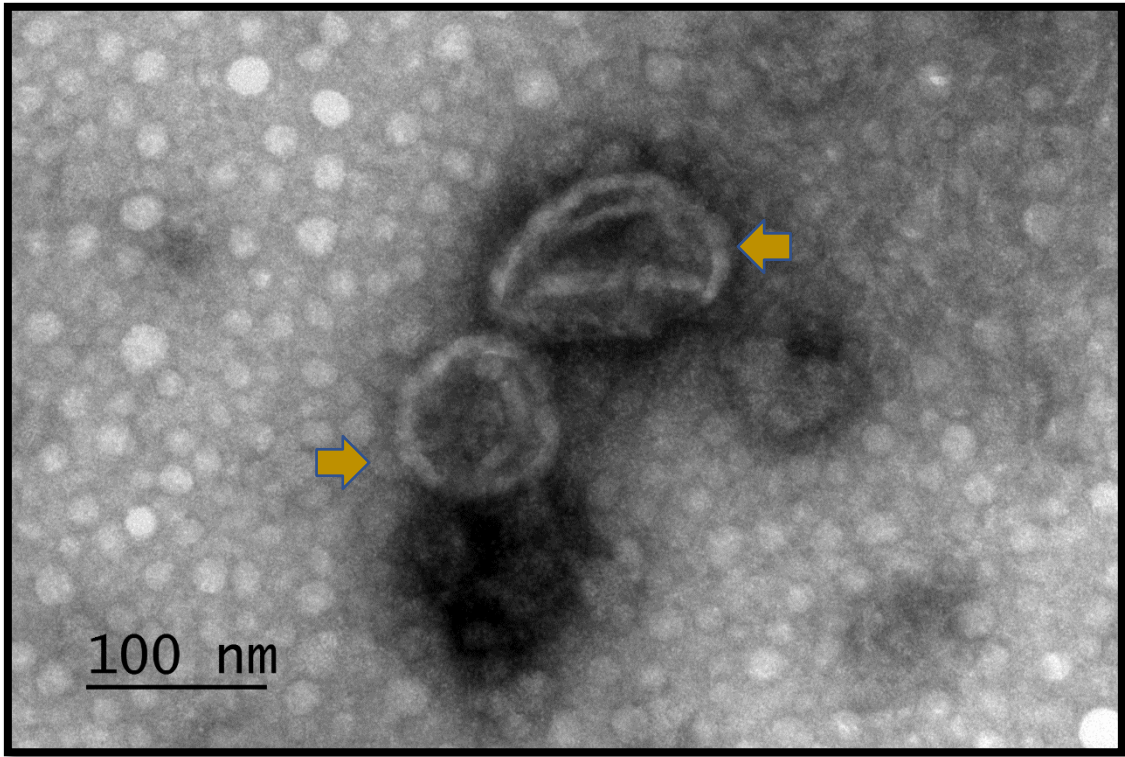
capturadas se presentan a continuación.



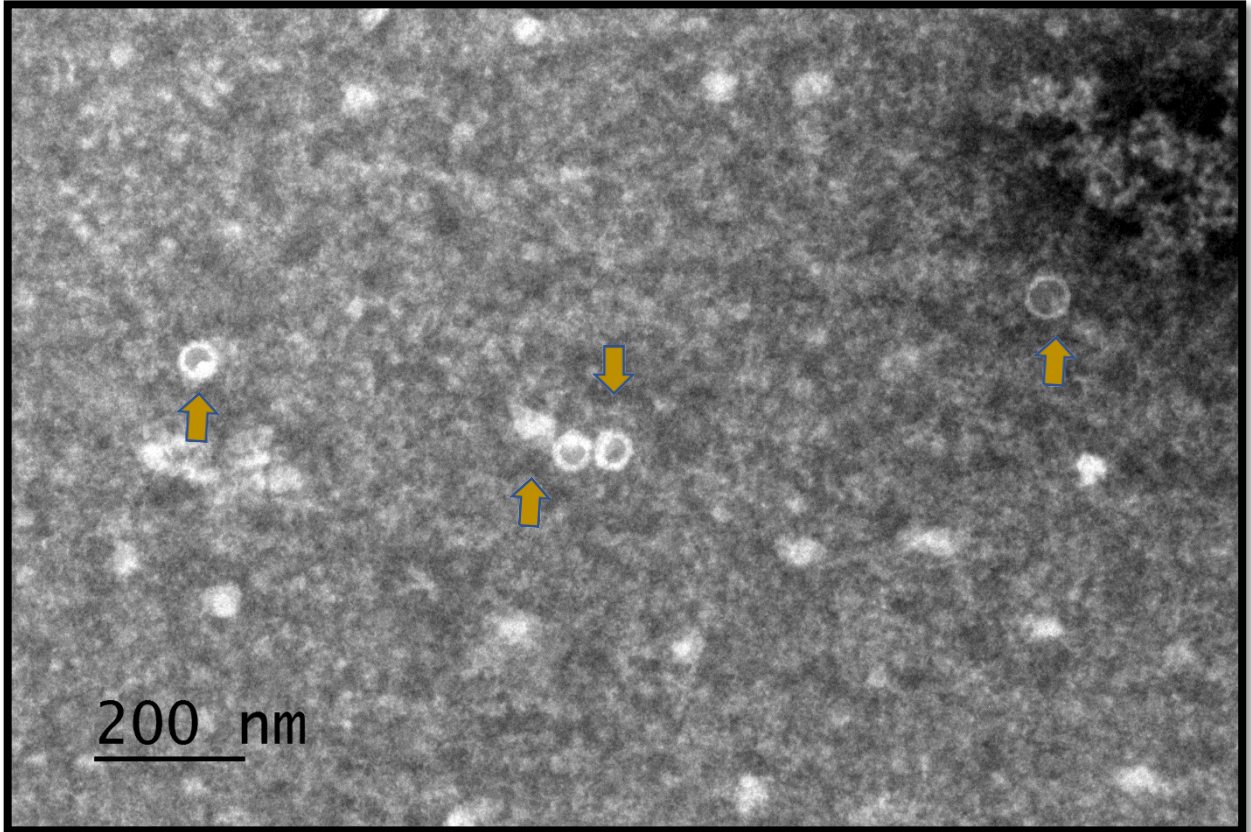
**Imagen 21.** MET. Vista panorámica de Mvs cepa ATCC *L. acidophilus*, Contraste realizado con uranilo.



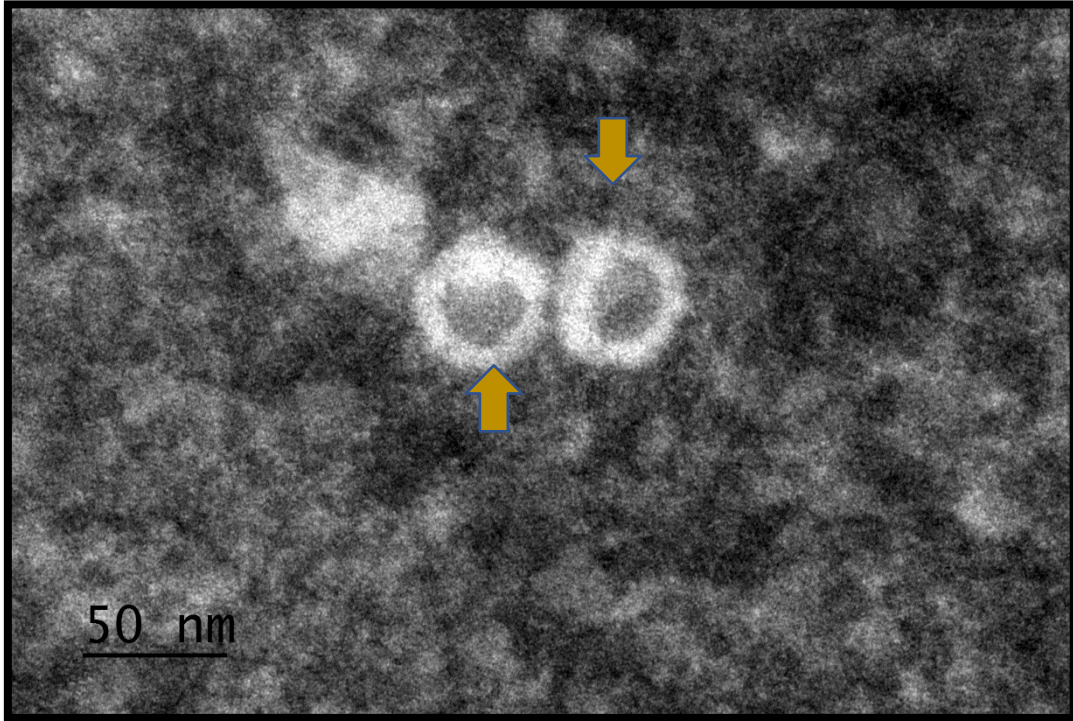
**Imagen 22.** MET. Acercamiento de Mvs cepa ATCC *L. acidophilus*, Contraste realizado con PTA.



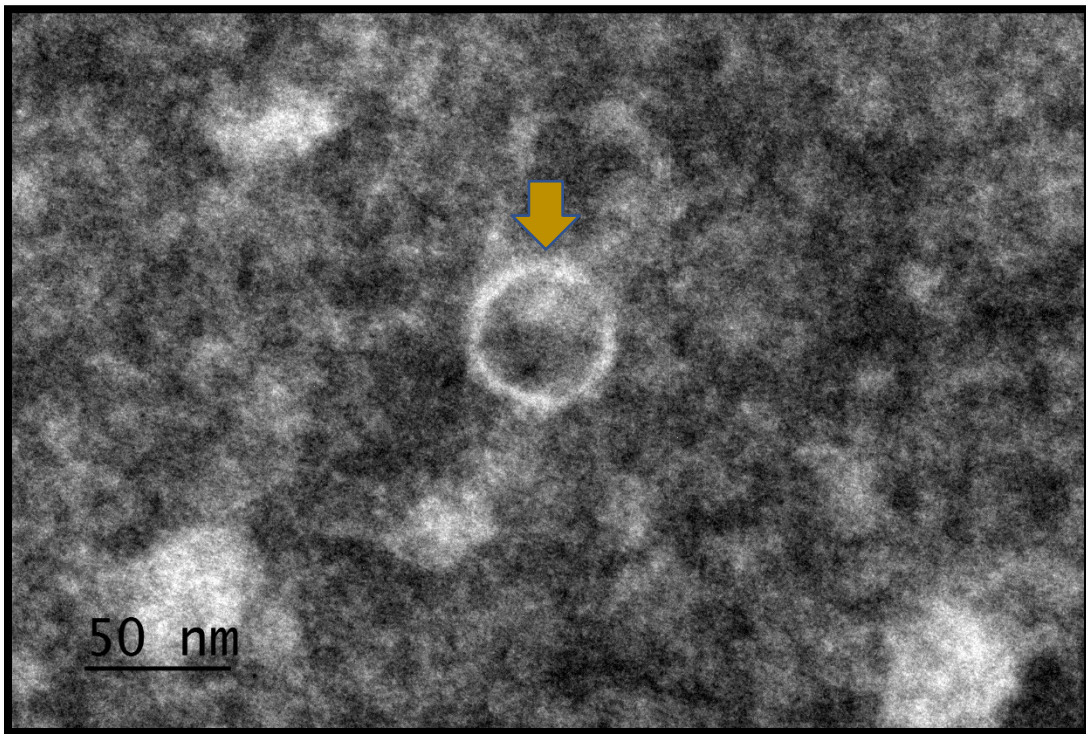
**Imagen 23.** MET. Acercamiento de Mvs cepa ATCC *L. acidophilus*, Contraste realizado con uranilo.



**Imagen 24.** MET. Vista panorámica Mvs cepa 54 *L. acidophilus*, Contraste realizado con PTA.



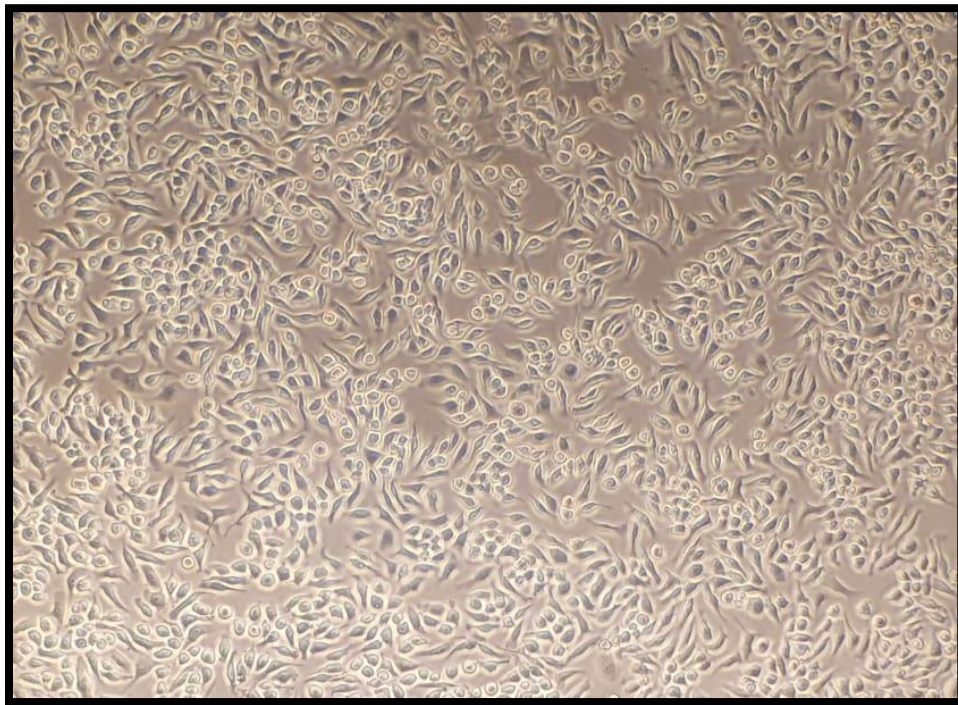
**Imagen 25.** MET. Acercamiento de Mvs cepa 54 *L. acidophilus*, Contraste realizado con PTA.



**Imagen 26.** MET. Acercamiento de Mvs cepa 54 *L. acidophilus*, Contraste realizado con PTA.

**VIII.4.** Estimulación de la línea celular *RAW 264.7* MVs de las cepas ATCC y 54 ambas de *L. acidophilus*

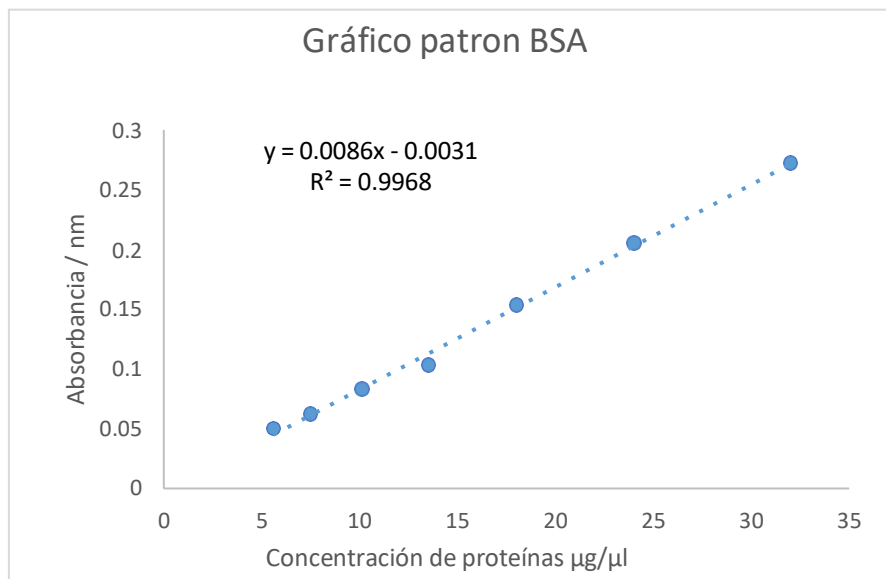
Para la estimulación de la línea celular RAW 264.7, se montó un cultivo hasta observar una confluencia de entre el 90 y 100% (**Imagen. 27**). Para este proceso se estandarizó la cantidad de proteína de cada muestra de MVs, mediante el método de Bradford, descrito previamente (**Gráfico. 2**). A continuación, se muestra la cantidad de MVs agregada en cada pozo de la placa de cultivo, según los tratamientos definidos (**Tabla. 7**) para este experimento.



**Imagen 27.** Línea celular RAW 264.7, bajo condiciones de cultivo celular, en donde se observa la morfología representativa de los macrófagos



**Gráfico 2.** Curva patrón para el cálculo de proteína por el método de Bradford



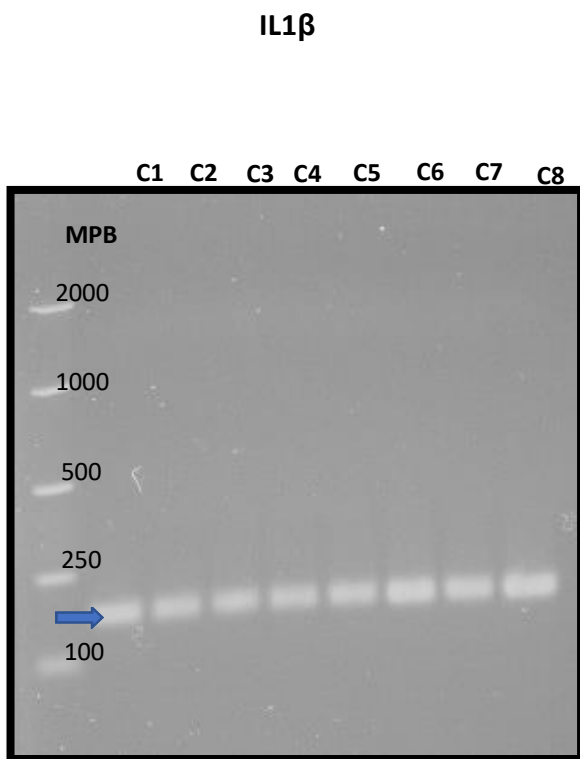
Cepa	5 µg de proteína necesaria	10 µg de proteína necesaria
ATCC	Se utilizaron 2.5 µl	Se utilizaron 5 µl
54	Se utilizaron 2.5 µl	Se utilizaron 5 µl

**Tabla 7.** Cantidad de proteína definida por el método de Bradford. Cálculo basado en 100 µl de muestra.

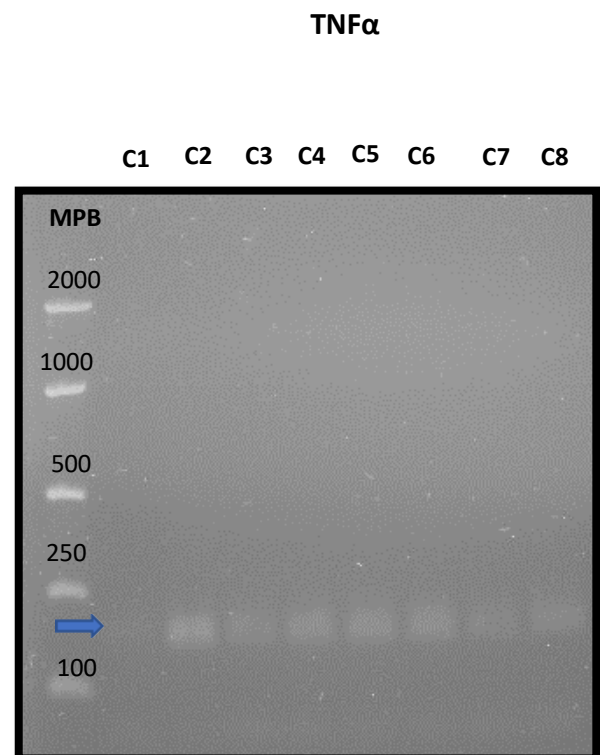
**VIII.5**                    **Cuantificación de RNA mediante qRT-PCR en la línea celular (RAW 264.7) estimuladas con MVs de BAL cepa ATCC y 54.**

VIII.5.1 Estandarización de la amplificación de los primers.

Los primers utilizados para amplificar el RNA de la IL1 $\beta$  y el TNF $\alpha$ , se conformaron de 170 pb y 174pb, utilizando una temperatura de amplificación de 62°C y 60°C respectivamente. Los resultados del PCR punto final se muestran a continuación. **Imágenes 28 y 29.**



**Imagen 28.** Carril C1 a C8 Gel de agarosa 1.5%. Resultado de PCR punto final IL1 $\beta$ . muestras de interés. **Flecha azul** indicando 170 pb para la interleucina IL1 $\beta$ , siendo este concordante con lo esperado, mostrándose amplificado en todas las muestras.

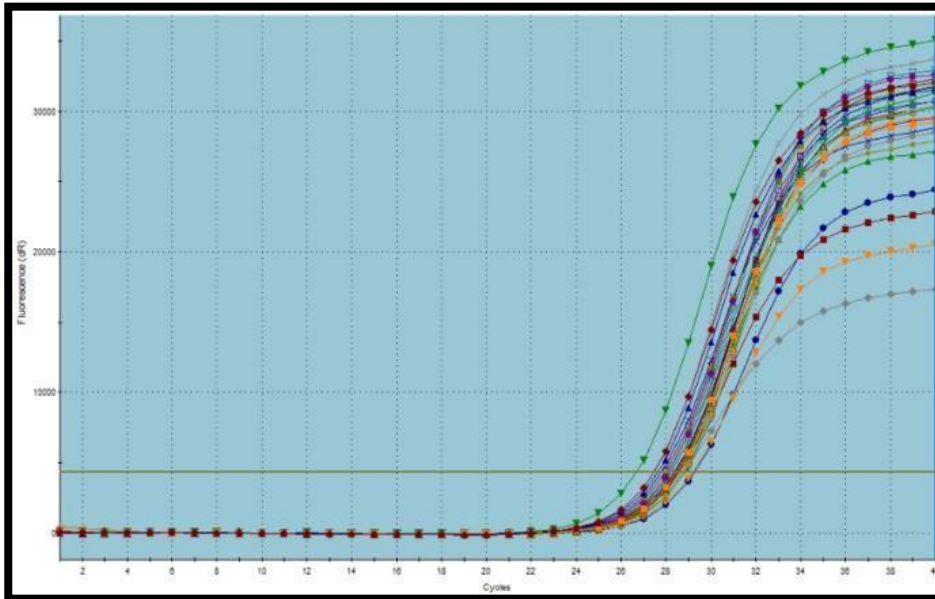


**Imagen 29.** C1 a C8 Gel de agarosa 1.5%. Resultado de PCR punto final TNF $\alpha$ . Líneas muestras de interés. **Flecha azul** indicando 174 pb para la interleucina TNF $\alpha$ , siendo este concordante con lo esperado, mostrándose, amplificando en todas las muestras.

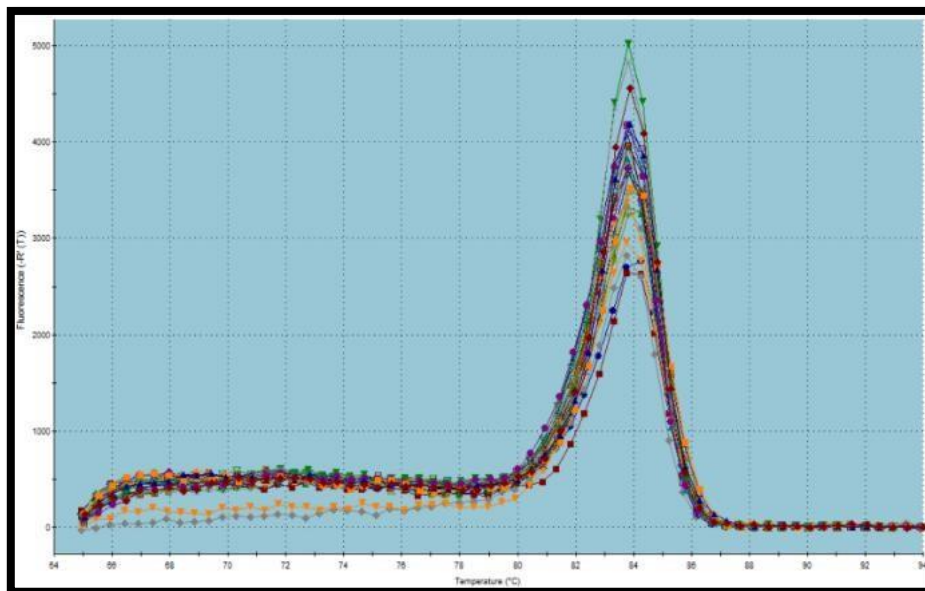
### VIII.5.2 Resultados de laqPCR

Se evaluaron 72 muestras donde el tiempo, la concentración de MVs y las cepas fueron las variantes. El qPCR se corrió por 3 bloques de 26 muestras cada uno obteniendo así la CT (*Cycle threshold*) de cada muestra, así como su curva de disociación y amplificación, donde no se observan productos inespecíficos. **imágenes 30A-30B y 31A- 32B.**

IL1 $\beta$

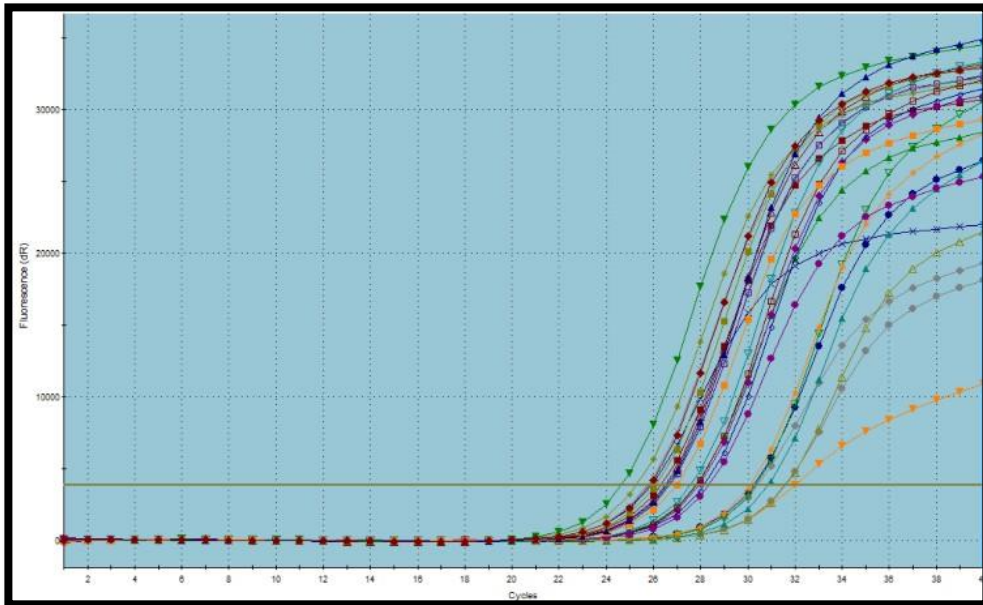


**Imagen 30. A.** Curva de amplificación. Todas las muestras amplificaron a partir del ciclo 24 -25.

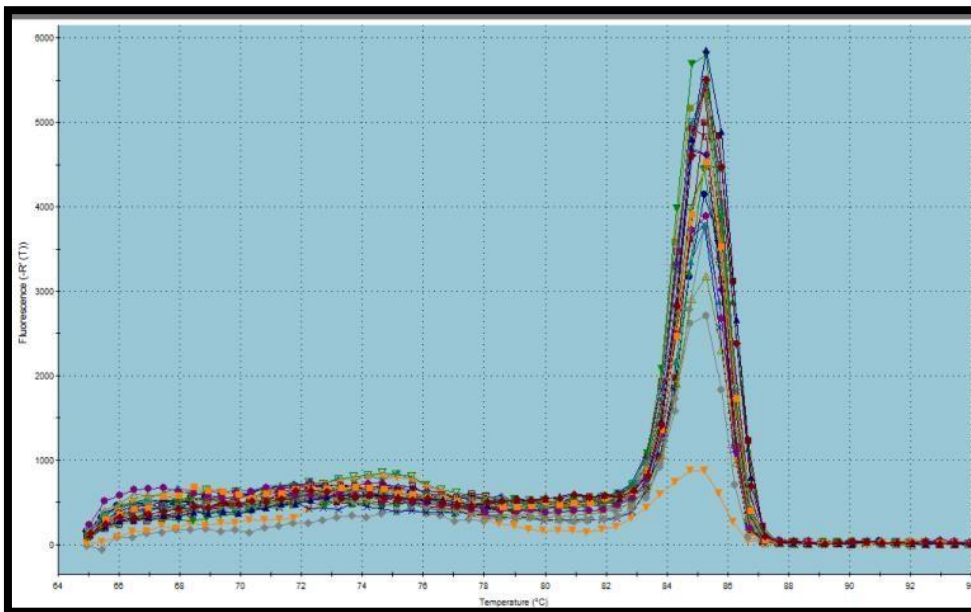


**Imagen 30 B.** Curva de disociación. Como se observa en la imagen, todas las muestras caen en el mismo pico esperado y no existe algún otro producto inespecífico.

## TNF $\alpha$



**Imagen 31. A.** Curva de amplificación. Las muestras amplificaron a partir del ciclo 22 hasta el 28.



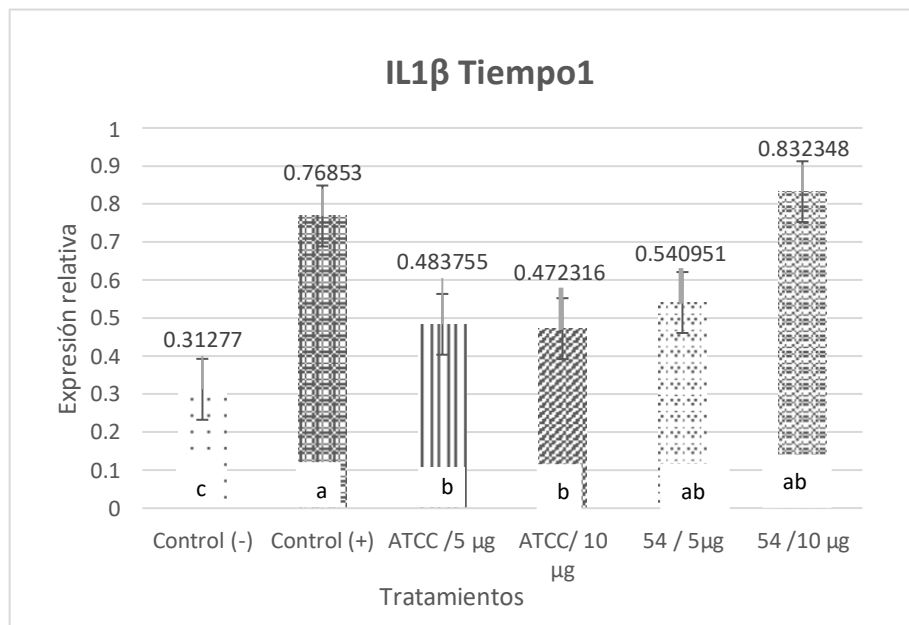
**Imagen 31 B.** Curva de disociación. Como se observa en la imagen, todas las muestras caen en el mismo pico esperado y no existe algún otro producto inespecífico.

### VIII.5.2.1 Las MVs de BAL estimulan a la línea celular (RAW 264.7)

Como se muestra en el **Dibujo 1**; previamente descrito en la sección de metodología, se utilizaron diferentes concentraciones de MVs para demostrar la capacidad estimulante de las mismas. En las siguientes graficas (**Gráfico 3-6**), se muestran los resultados finales de expresión de la IL1  $\beta$  y TNF $\alpha$ , en los tiempos 1h y 3h respectivamente.

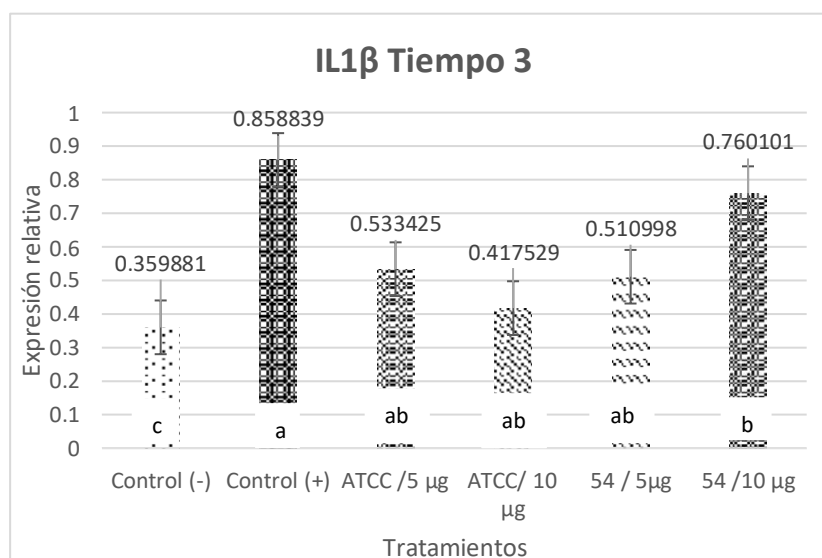
### VIII 5.2.2 Expresión relativa IL1 $\beta$

Como se muestra en el **Gráfico 3**, durante la primera hora de interacción entre el cultivo de macrófagos y MVs, la expresión relativa de la interleucina 1 $\beta$ , mostro que no existe diferencia significativa entre el control (+) 2ug de LPS de *E. coli* (a) comparándolo con el tratamiento (54/10 $\mu$ g) 10 $\mu$  de MVs de la cepa 54 de campo (ab) y el tratamiento (54/5 $\mu$ g) 5 $\mu$  de MVs de la cepa 54 de campo (ab) por lo que este resultado nos muestra que ambos tratamientos estimulan de igual forma a la línea RAW 264.7. En cuanto al resto de los tratamientos se puede apreciar la diferencia significativa entre estos y el control negativo (c), indicándonos que todos nuestros tratamientos son capaces de estimular la producción de RNAm de la IL1 $\beta$



**Gráfico 3. IL1 $\beta$  en el tiempo 1.** Expresión relativa de la interleucina 1 $\beta$ , en la primera hora de interacción entre el cultivo de macrófagos y los diferentes tratamientos de MVs.

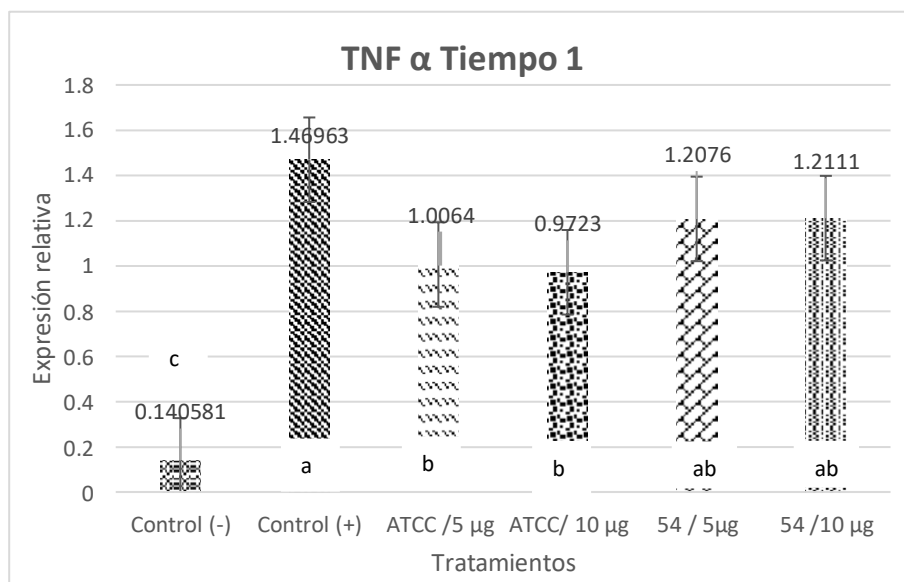
En la tercera hora, se hace evidente la disminución de la expresión relativa de IL1 $\beta$  en todos los tratamientos. Al comparar resultado del Control positivo (a) y el tratamiento de 54 /10 $\mu$ g (b), es existente diferencia significativa en la expresión relativa de la interleucina antes mencionada, lo que nos indica que al paso de 3 horas las Mvs de la cepa 54 disminuyen su capacidad estimulante, sobre la línea celular RAW264.7 **Gráfico 4**. Aunque la expresión relativa disminuyo en todos los tratamientos se mantiene el estímulo sobre los macrófagos ya que la expresión relativa del control negativo (c) y el resto de tratamientos (ab) muestran diferencia estadísticamente significativa.



**Gráfico 4. IL1 $\beta$  en el tiempo 3.** Expresión relativa de la interleucina 1 $\beta$ , en la tercera hora de interacción entre el cultivo de macrófagos y los diferentes tratamientos de MVs.

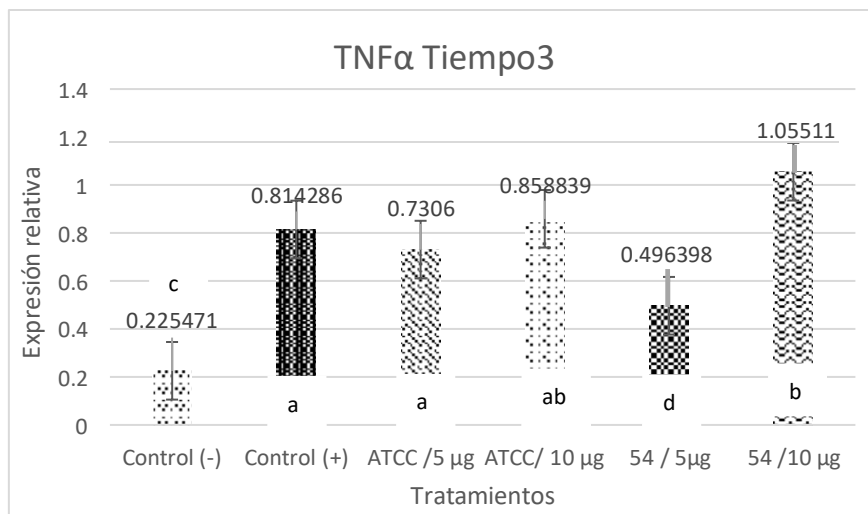
### VII.5.2.3 Expresión relativa de TNF $\alpha$

En cuanto a la expresión relativa de TNF $\alpha$ , durante la primera hora de interacción todos los tratamientos, comparados con el Control negativo (c), mostraron estimulación sobre la línea celular RAW264.7.4. Además, se logró percibir que no existe diferencia significativa entre el Control positivo (a) y ambos tratamientos de la cepa 54 de campo (54/5 $\mu$ g, 54/10 $\mu$ g) (ab), mientras que el resto de los tratamientos de la cepa ATCC (ATCC/5 $\mu$ g, ATCC/10 $\mu$ g) (b) se mantienen por debajo de la expresión relativa de los resultados del control positivo y las MVs de la cepa 54. **Gráfico 5**.



**Gráfico 5. TNFα en tiempo 1** Expresión relativa de la interleucina TNFα, en la primera hora de interacción entre el cultivo de macrófagos y los diferentes tratamientos de MVs.

En la tercera hora de interacción, todos los tratamientos mostraron expresión superior al control negativo (c), observando que dicha expresión aumenta conforme al incremento de la concentración de MVs de ambas cepas, siendo la cepa 54 con 10 μg de MVs 54/10μ (b) la expresión más alta entre los tratamientos con MVs, observándose una diferencia estadísticamente significativa entre ellos, incluyendo el control positivo (a). **Gráfico 6.**



**Gráfico 6. TNFα en el tiempo 3.** Expresión relativa de la interleucina TNFα, en la tercera hora de interacción entre el cultivo de macrófagos y los diferentes tratamientos de MVs.

## VII. DISCUSIÓN

Las BAL juegan un papel muy importante, en el equilibrio de la microbiota intestinal, ya que intervienen en el equilibrio poblacional del microbioma, generando fuentes de energía para el sistema y control de microorganismos patógenos, entre otros. Debido a ello es necesario tener un control estricto en el uso de productos considerados probióticos <sup>39</sup>. Las BAL, en particular el género *Lactobacillus*, se caracterizan por poseer beneficios probióticos, estos efectos deben ser desarrollados por estas bacterias en ambientes acorde a los que se encuentran en el tracto gastrointestinal, así como en los procesos de elaboración de subproductos de origen animal. Estas bacterias deben de tolerar pH menores a 6, también deben poseer resistencia a las sales biliares o pH mayores a 7, además este tipo de bacterias deben proliferar en temperaturas de 15°C y 45°C. Todas estas pruebas se realizan de manera rutinaria para evaluar el potencial probiótico de las cepas de BAL, otorgando así, información y seguridad para el correcto uso de dichas bacterias. Para la evaluación de una cepa con potencial probiótico es necesario superar las pruebas de desafío a pH y temperatura, así como la capacidad para inhibir microorganismos patógenos, ya que es un requerimiento básico si se tiene como fin utilizar las cepas desafiadas para uso en la ingesta alimentaria, humana y animal, ya que solo así podrían ser considerados alimentos generalmente seguros (GRAS) una vez superadas estas pruebas, estos microorganismos están más cerca de ser considerados alimentos GRAS, con funciones probióticas <sup>40,41</sup>. Durante el desarrollo de las pruebas realizadas en este trabajo los resultados indican que tanto la cepa de campo 54 como la cepa de referencia ATCC 314, ambas *L. acidophilus*, poseen capacidad para tolerar, durante su crecimiento, el pH gástrico (5) y el pH 7.4, este último simulando el ambiente del intestino delgado en su primer tercio, el cual es mantenido por las sales biliares. La capacidad de inhibición de patógenos de la cepa 54 y ATCC se comprobó en un trabajo anterior <sup>10</sup>.

Durante los últimos años el estudio de las BAL se ha extendido, ahora no solo se analizan las funciones probióticas de las bacterias completas, sino también su capacidad para la generación de MVs. El interés por estas estructuras, comenzó al ser comparadas con microvesículas de bacterias Gram negativas (OMVS), así como con las vesículas extracelulares (EV), ya que como es conocido, las vesículas antes mencionadas, poseen capacidades propias de la bacteria completa así como de la célula secretora <sup>42,43</sup>. En el presente estudio se realizaron corrimientos electroforéticos, buscando las proteínas que



compartieran las células completas y las MVs, entre ellas destacando las que, por medio de su peso molecular, se asocian a proteínas con capacidades probióticas, reportadas en la bibliografía. Proteínas de muy bajo peso molecular (10 y 6 kDa), están relacionados con bacteriocinas, estos péptidos antimicrobianos son secretados en mayor proporción durante la fase logarítmica de la bacteria, y son conocidos por su capacidad de generar poros en la membrana de microorganismos patógenos. Por el peso molecular de estas proteínas son clasificadas dentro de la clase II de bacteriocinas, los conocidos no Lantibióticos <sup>44</sup>. En el corrimiento electroforético realizado en este trabajo se detectaron proteínas con estos pesos moleculares, en las muestras tanto de MVs y células completas, lo que sugiere la presencia de estos péptidos antimicrobianos, aunque, al no contar con secuenciación de dichas proteínas se mantienen reportados como BLIS (*Bacteriocin likes substances*)<sup>10</sup>. Otras proteínas de relevancia son las que poseen un peso molecular de 32 kDa ya que se ha demostrado su asociación a la división celular <sup>45</sup>. La división celular en bacterias se da por fisión binaria y una proteína muy importante durante este proceso es la FtsZ, esta proteína podría compararse con la tubulina de células eucariotas, su peso molecular es de 64 kDa <sup>46</sup>. En el presente estudio se encontraron proteínas con un peso de 32 kDa y 64 kDa, en las muestras de la Mvs de las dos cepas, lo que podría dar un indicio de la presencia de proteínas con función en la división celular. Otras proteínas de relevancia reportadas en la bibliografía, encontradas en corrimientos electroforéticos de Mvs de BAL, son las que poseen pesos moleculares alrededor de 54 kDa ya que se han reportado como proteínas transportadoras de glutamina<sup>45</sup> La glutamina es el aminoácido más abundante del organismo, participa en diversos eventos metabólicos en hígado, riñón e intestino, entre otros. Particularmente en el sistema intestinal, la glutamina es sumamente importante para el mantenimiento de la funcionalidad del metabolismo, además ayuda a la reparación de estructuras dañadas por toxinas, agentes químicos y sustancias que produzcan irritación de la mucosa. Otra acción destacable de este aminoácido, es su intervención indirecta en el sistema inmune ya que si los niveles de glutamina se alteran, disminuyendo su concentración normal para el organismo, el sistema inmunológico comienza a ser afectado, en cuanto a su funcionamiento a diferentes niveles <sup>46, 47, 48</sup>. De acuerdo con los resultados encontrados en el corrimiento electroforético del presente estudio, nuestras Mvs arrastran proteínas de este peso molecular, sugiriendo la presencia de este transportador. En cuanto a proteínas de peso 40 y 75 kDa, existe una gran cantidad de información sobre su función en la bacteria completa, estas proteínas están asociadas a comunicación celular, adherencia epitelial, efectos antiapoptóticos e incluso capacidad inmunomoduladora. Las

proteínas conocidas como p40 y p75, están ampliamente ligadas a la superficie celular de bacterias ácido lácticas, incluso la p75 está asociada en proporcionar la capacidad de formar largas cadenas durante el crecimiento bacteriano <sup>49,50,51</sup>. Estas proteínas han sido desafiadas en diferentes estudios, para demostrar sus capacidades antiapoptóticas en presencia de citocinas proinflamatorias como lo son IL1, IL6 y TNF alfa así como su capacidad promotora de crecimiento en células epiteliales intestinales. Estas capacidades están asociadas a la activación de la vía Akt y la activación de p38 <sup>52,53</sup>. Estos experimentos fueron evaluados con las proteínas aisladas de las bacterias completas, no se ha puesto a prueba si sus capacidades continúan cuando son arrastradas por MVs, ya que la bibliografía demuestra, que dichas proteínas se encuentran dentro de las MVs de bacterias ácido lácticas <sup>45</sup>. En el presente estudio proteínas de estos pesos moleculares fueron encontradas en los corrimientos electroforéticos, lo que sugiere su presencia en MVs de *Lactobacillus acidophilus* de campo y ATCC. Dentro de todo el repertorio de proteínas mostrado en este trabajo se mencionan y describen aquellas que poseen y brindan capacidades probióticas y que han sido reportadas en la literatura. Las proteínas descritas en este estudio muestran un peso molecular que varía significativamente desde los 9 hasta los 268 kDa, esta última proteína de peso molecular alto se asocia a proteínas de superficie, la cual podría ser parte del sistema de adhesión de dichas bacterias. Las adhesinas son proteínas sumamente importantes dentro de las BAL ya que su función es clave para evitar la invasión de microorganismos patógenos, protegiendo la superficie epitelial por competencia de unión, además de ello proteínas de superficie suelen estar relacionadas con las proteínas p40 y p75 ya que suelen estar ancladas a la superficie celular y como se describió anteriormente las microvesículas son evaginaciones de la pared celular, por lo cual es entendible que arrastren este tipo de proteínas de superficie <sup>50,54</sup>. De esta manera los pesos moleculares de las proteínas ubicadas en las diferentes muestras descritas previamente, nos dan un indicio de las posibilidades en sus funciones, aunque se requiere constatar con secuenciaciones para determinar su identidad.

La producción de microvesículas de bacterias Gram positivas fue reportada desde 2009 en la bacteria *S. aureus*. A partir de este descubrimiento, el interés por las MVs de bacterias Gram positivas aumentó. Hablando en específico de MVs de BAL la información fue desarrollándose recientemente y se ha comprobado mediante diferentes técnicas de microscopía, la producción de dichas estructuras. Diversos estudios han captado imágenes, donde se puede observar, MVs siendo liberadas por bacterias completas, o bien, únicamente MVs; estas fotografías han sido obtenidas por medio de microscopía electrónica

de transmisión (MET), microscopía de fuerza atómica (MFA), entre otras <sup>10,25,45</sup>. Cualquiera que sea la técnica microscópica utilizada, las características morfológicas son las mismas. En este trabajo se obtuvieron fotografías de Mvs de *L. acidophilus* de campo y ATCC a

partir de MET, distinguiéndose su morfología esférica y tamaño característico, estas propiedades concuerdan con las reportadas en la literatura.

La investigación central de este trabajo se concentró en comprobar que las MVs de BAL aisladas del tracto gastrointestinal de *Rattus norvegicus* de vida libre, tienen la capacidad de estimular la expresión de interleucinas en la línea celular RAW 264.7.

La información sobre MVs de bacterias ácido lácticas describiendo sus características morfológicas, contenido y capacidades, ha iniciado una ola de investigación sobre estas estructuras. Entre las áreas de estudio de las MVs se ha investigado características propias de las células bacterianas de origen, siendo una de ellas la regulación de la respuesta inmune<sup>45</sup>. Ya que el interés por estas estructuras es relativamente reciente, los estudios de las MVs se basan en la información obtenida de sus congéneres las OMVS de bacterias Gram negativas, siendo *Pseudomona aeruginosa*, una de las más estudiadas en cuanto su capacidad inmunogénica. Estas OMVS han logrado estimular la producción de IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en diferentes líneas celulares y aislados de monocitos de ovinos en tiempos que van desde los 3 hasta las 24h<sup>55,56</sup>.

En el presente experimento se evaluó la capacidad estimulante inducida por las MVs de BAL de la cepa 54 y ATCC de *L. acidophilus* para expresar IL1  $\beta$  en la línea celular RAW264.7. Todos los tratamientos evaluados, mostraron una diferencia estadísticamente significativa en la expresión relativa de dicha interleucina, comparadas con el control negativo **Gráfico 3**. Dejando en claro que las MVs de BAL, poseen la capacidad antigénica y probiótica para estimular a la línea celular RAW264.7, en presencia de 10 $\mu$ g de MVs de la cepa 54 a la hora 1 de exposición mostrando una expresión relativa de la IL1  $\beta$  estadísticamente igual al del control positivo ( 2 $\mu$ g de LPS de *E. coli* ). La información que brindan estos resultados nos indica que los macrófagos fueron estimulados adecuadamente para transcribir ARNm de dicha interleucina. Por lo que asumimos que la composición estructural de las MVs de BAL tanto de cepa 54 como de la ATCC *L. acidophilus*, inducen un estímulo suficiente para generar dicha acción, ya que las MVs de los *Lactobacilos sp*, son extensiones de la membrana de la célula bacteriana de origen. Lo anterior debido a que poseen una gran cantidad de peptidoglicano a lo largo de su superficie, así como múltiples antígenos acarreados en la interior de la misma<sup>57</sup>. Esta suposición se justifica con lo mencionado en diferentes publicaciones, que describen ampliamente que la IL1  $\beta$  es expresada en macrófagos gracias al estímulo de productos microbianos de manera *in vivo* e *in-vitro*. Tal es el caso del peptidoglicano de bacterias Gram positivas y del LPS por parte

de las bacterias Gram negativas, en este último caso se ha comprobado que la presencia del LPS en las MVS de bacterias Gram negativas, es el factor clave para la estimulación de macrófagos y la producción de IL1 $\beta$  está ligada a la ausencia o presencia de dicho antígeno<sup>56,58</sup>. En el presente trabajo la estimulación observada en la primera hora del experimento, sugiere que fue inducida por la presencia de peptidoglicano en la membrana de las vesículas.

Los resultados obtenidos en el experimento se modifican conforme el tiempo avanza, como se muestra en el **Grafico 4**, a las 3 horas. La expresión relativa de la IL1  $\beta$  disminuye, siendo la cepa 54 y el control positivo diferentes estadísticamente en su expresión relativa en comparación con la primera hora. Este fenómeno se puede asociar a la duración del estímulo antigénico en el cultivo celular, ya que algunos autores mencionan que la estimulación con algún componente microbiano, detona la expresión de ARNm a partir de los 15min de interacción y la misma expresión disminuye al cabo de las 4 horas. Este fenómeno lo asocian a la vida media del ARNm de la IL1 $\beta$ . El tiempo requerido para la síntesis de RNAm varía, dependiendo de la estructura estimulante que se encuentre en interacción con la célula de defensa, ya que se ha demostrado que la producción de ARNm de IL1 $\beta$ , es menos duradera cuando el estímulo proviene de una bacteria, en cambio cuando preexiste IL1 $\beta$  activada en el medio, la producción de ARNm en las células del cultivo puede extenderse hasta 24 horas<sup>58</sup>. En estudios donde se utilizan OMVs de diferentes bacterias Gram negativas para estimular células inmunes, el tiempo de interacción para provocar la síntesis de IL1 $\beta$  es variable. Sin embargo, la producción de dicha interleucina dependerá de una serie de eventos que provocarán su liberación activa, entre ellos encontramos complejos multiproteicos como los inflasomas. Esta liberación activa iniciará con un desencadenante interno a través del factor NF- $\kappa$ B, él cual ayudará a regular la síntesis de pro- IL1 $\beta$ , asociado a un estímulo externo como son los PAMPS <sup>59,60</sup>. En nuestros resultados, se sugiere el mismo camino de estimulación, tomando en cuenta la composición de las MVS. De esta manera, la disminución del estímulo en la hora 3 puede, estar relacionada, a la concentración de antígenos acarreados en la MVs de BAL como los PAMPS los cuales fueron insuficientes para mantener la expresión del RNAm de IL1  $\beta$ . Por otro lado podríamos hipotetizar que lo macrófagos del cultivo en presencia de las MVs de BAL se activaron, fagocitando dichas estructuras, eliminando por completo el estímulo a la hora 3. En cuanto los resultados de expresión relativa de la interleucina TNF $\alpha$  a la hora 1 de interacción observado en el **Grafico 5**, mostró que la expresión de todos los tratamientos se mantuvo superior a la observada en el control negativo. Siendo una vez más la cepa 54

la que mostró una mayor expresión de TNF $\alpha$ . Sin embargo, el control positivo destacó sobre esta última. Este resultado nos indica que las MVs de BAL son capaces de provocar estimulación en la línea celular RAW264.7. Al contrario de la IL1 $\beta$ , la expresión del TNF $\alpha$  aumenta conforme pasa el tiempo, como se observa en el **Gráfico 6**. Donde la expresión relativa del TNF $\alpha$ , en el tratamiento con 10  $\mu$ g de MVS de la cepa 54, supera a todas las muestras incluida la expresión inducida por el LPS de *E.coli*. Estos resultados son consistentes con otros estudios, donde fueron utilizadas OMVS de bacterias Gram negativas, como *Salmonella. P auroginosa* y *Mannhemia haemolytica*. En dichas investigaciones, las OMVS estimularon mononucleares en condiciones de cultivo celular, induciendo la síntesis de diferentes interleucinas proinflamatorias, como lo es el TNF $\alpha$ . La expresión máxima de esta interleucina se reflejó entre las 3 y 4 horas posteriores a la interacción de las OMVS y el cultivo de mononucleares. Dentro de las investigaciones mencionadas anteriormente, el uso de OMVS de *Mannhemia haemolytica* produjo una fuerte activación en monocitos ovinos, en donde este resultado se asoció a la presencia de LPS y TLR4<sup>55,56,61</sup>. En nuestro experimento la expresión de interleucina TNF $\alpha$  así como la IL1 $\beta$  en cultivo de macrófagos RAW264.7 puede ser asociada, como ya se mencionó anteriormente, por los PAMPS anclados a la superficie de la membrana de las MVs, sin embargo no hay que dejar de lado la presencia de receptores tipo Toll (TLR), siendo el de más importancia para nosotros el TLR2, encargado de reconocer el péptidoglicano de bacterias Gram positivas. El TLR es el principal receptor de reconocimiento de ligandos microbianos, la unión del TLR a su ligando provoca eventos de señalización intracelular llevadas a cabo por proteínas MyD88. La inmunoestimulación aguda es provocada principalmente por los receptores de interleucinas, que en el caso del TNF se conoce como TNFR. La interacción entre el TLR y el TNFR, conduce a la activación del NF- $\kappa$ B y MAPK, que termina por inducir la expresión de quimiocinas, citocinas y moléculas microbicidas<sup>62</sup>.

Los resultados de este trabajo en relación con la potencia estimulante de las MVs de la cepa 54 de campo comparándola con el ATCC de la misma especie y género, nos hacen sugerir que la esta cepa aislada del tracto gastrointestinal de ratas de vida libre, están compuestas por factores más estimulantes, además de poseer capacidades microbicidas como se describe en otro trabajo<sup>10</sup>.

## X. Conclusiones

- Las bacterias ácido-lácticas cepa 54 de campo aislada de *Rattus norvegicus* de vida libre y ATCC, ambas *L. acidophilus*, poseen capacidades probióticas.
- Las proteínas que arrastran las MVs de las cepas utilizadas en este estudio, podrían tener capacidades, anti apoptóticas, antimicrobianas, así como capacidades inmunoestimuladoras.
- La expresión relativa de IL1  $\beta$  y TNF $\alpha$  en macrófagos de la línea celular RAW264.7 es dependiente del tiempo y la concentración de MVs de BAL *L. acidophilus*.
- La concentración de 10  $\mu$ g de MVS de la cepa 54 de BAL de *L. acidophilus* mostro ser una potente estimuladora de macrófagos de la línea celular RAW264.7 superando la expresión relativa de IL1 $\beta$  y TNF provocada por LPS de *E. coli*.
- Este estudio abre la puerta para continuar investigando las capacidades y propiedades de las MVs de Bacterias probióticas.

## XI. Literatura consultada

1. Robles-Sánchez, C. (2017). Efecto de *Lactobacillus paracasei* Cncm I-4034, *Lactobacillus rhamnosus* Cncm I-4036 y *Bifidobacterium breve* Cncm I-4035 sobre la expresión génica de la mucosa intestinal de ratas obesas, <http://hdl.handle.net/10481/48945>.
2. Mamani, J. J. V. (2018). Sustancias para inducción de enfermedades en ratas: Revisión De Literatura. Revista Médica Basadrina, 12(2), 47-50.
3. Molina Galicia O. (2017). Aislamiento e identificación mediante el uso de pruebas bioquímicas de bacterias ácido-lácticas del tracto digestivo de ratas (*Rattus norvegicus*), (Tesis pregrado) Universidad Nacional Autónoma de México. FES Cuautitlán.
4. Guenther, S., Bethe, A., Fruth, A., Semmler, T., Ulrich, R. G., Wieler, L. H., & Ewers, C. (2012). Frequent combination of antimicrobial multiresistance and extraintestinal pathogenicity in *Escherichia coli* isolates from urban rats (*Rattus norvegicus*) in Berlin, Germany. Plos One, 7(11), E50331.
5. Sánchez Rodríguez, M. T. (2018). Formas farmacéuticas sólidas destinadas a la bioterapia con microorganismos probióticos. Granada: Universidad De Granada, [[Http://Hdl.Handle.Net/10481/51117](http://hdl.handle.net/10481/51117)]
6. Londoño, N. A., Taborda, M. T., López, C. A., & Acosta, L. V. (2015). Bacteriocinas producidas por Bacterias Ácido-Lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. Alimentos Hoy, 23(36):186-205.
- 7 Ferrer, J. D., Parra, V., Bendaño, T., Montes, P., & Solorzano, P. (2017). Utilidad del suplemento de probióticos (*Lactobacillus acidophilus* y *Bulgaricus*) en el tratamiento del síndrome de intestino irritable. Revista De Gastroenterología Del Perú, 32(4), 387-93.



8. Huertas, R. A. P. (2010). Bacterias Ácido-Lácticas: papel funcional en los alimentos. *Ingresar A La Revista*, 8(1), 93-105.
9. Galina, M. A., Delgado-Pertíñez, M., Ortíz-Rubio, M. A., Pineda, L. J., & Puga, D. C. (2009). Cinética ruminal y crecimiento de cabritos suplementados con un probiótico de bacterias ácido- lácticas. *Pastos y forrajes*, 32(4), 1-1.
10. Gutiérrez Espinosa, Viridiana, sustentante (2020), Identificación de bacteriocinas en microvesículas (Mvs) producidas por bacterias ácido-lácticas (BAL), aisladas del tracto gastrointestinal (TGI) de *Rattus norvegicus* (Tesis Pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México. FES-Cuautitlán.
11. Iniesta, M., Zurbriggen, M., Montero, E., & Herrera, D. (2011). Los probióticos y sus beneficios terapéuticos. *Periodoncia y Osteointegración*, 21(3), 171-179.
12. Guillot, C. D. C. (2017). Microbiota intestinal, probióticos y prebióticos. *Enfermería investiga: investigación, vinculación, docencia y gestión*, 2(4), 156-160.
13. Monroy, M., Castro, T., Fernández, F. J., Mayorga, L. (2009). Revisión Bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contacto S*, 73: 63-72.
- 14 Castro, M., & De Souza Rodríguez, F. (2005). Levaduras: Probióticos y prebióticos que mejoran la producción animal. *Revista Corpoica: Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 6(1), 26-38.
- 15 Rodríguez, H., Sastre, G., (1999), Tratado de nutrición, Editorial Díaz De Santos S.A. Juan Bravo, 3-A, 28006 Madrid. ISBN: 84-7978-387-7. Pág. 131-132.
16. Lara González, Elizabeth Berenice, Sustentante (2018). Producción y caracterización de compuestos similares a bacteriocinas de una cepa de *Streptococcus sp.* aislada de alimentos fermentados tradicionales. (Tesis pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.
- 17 Gorbeña, J. C. R., & Sáenz, T. A. (2017). Bacterias Ácido-Lácticas. *Biotempo*, 8, 54 64.
18. Londoño, N. A., Taborda, M. T., López, C. A., & Acosta, L. V. (2015). Bacteriocinas producidas por Bacterias Ácido-Lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Alimentos Hoy*, 23(36):186-205.

19. S. Orla-Jensen. La Classification des Bactéries Lactiques.. Le Lait, Inra Editions, 1924, 4 (36), Pp.468-474.
20. Ramírez Ramírez, J. C., Rosas Ulloa, Petra., Velázquez Gonzalez, m. y., Ulloa, J. A., & Arce Romero, Francisco (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. CONACYT.
21. Iniesta, M., Zurbriggen, M., Montero, E., & Herrera, D. (2011). Los probióticos y sus beneficios terapéuticos. *Periodoncia y Osteointegración*, 21(3), 171-179.
22. Shkair, L.; Garanina, E.E.; Stott, R.J.; Foster, T.L.; Rizvanov, A.A.; Khaiboullina, S.F. (2021), Membrane Microvesicles as Potential Vaccine Candidates. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1142. <https://doi.org/10.3390/ijms22031142>.
23. Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through The Wall: extracelular vesicles in Gram-Positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 620.
24. Liu, Y., Defourny, K. A., Smid, E. J., & Abee, T. (2018). Gram-Positive Bacterial Extracellular Vesicles and their impact on health and disease. *Frontiers In Microbiology*, 9, 1502.
25. Lee, EY, Choi, DY, Kim, DK, Kim, JW, Park, JO, Kim, S., y Gho, YS (2009). Las bacterias gram positivas producen vesículas de membrana: caracterización basada en proteómica de vesículas de membrana derivadas de *Staphylococcus aureus*. *Proteómica*, 9 (24), 5425-5436.
26. Añón, J. C., Corpas, I., Alique, M., Ramírez-Carracedo, R., & Ramírez, R. (2018, March). Papel de las microvesículas como biomarcadores y futuras dianas farmacológicas de enfermedades cardiovasculares. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 84(1).
27. Portas Torres, I. (2016). Implicación de las vesículas de membrana externa de *Klebsiella pneumoniae* en la resistencia frente a péptidos antimicrobianos. <http://hdl.handle.net/11201/1717>.
28. West CL, Stanisz AM, Mao Y-K, Champagne-Jorgensen K, Bienenstock J, Kunze WA (2020) Microvesicles from *Lactobacillus reuteri* (DSM-17938) completely reproduce

modulation of gut motility by bacteria in mice. PLoS ONE 15(1): e0225481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225481>.

29. Cambroner, M. R., Prado-Cohrs, D., & Sanroma, M. L. (2017). Conceptos inmunológicos básicos aplicados a la vacunología. *Vacunas*, 18(2), 49-58.

30. Martín, E. R., Martín, A. P., Martín, D. D., & Soto, M. Á. M. (2013). Inmunidad innata e inmunidad adaptativa. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(28), 1760-1767.

31. Miguel A. Hernández-Urzúa, Anabell Alvarado-Navarro. (2001) Interleucinas e Inmunidad innata, Centro de Investigación en Inmunología y Dermatología (CIINDE), Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. *Rev Biomed* 12:272-280.

32. Martín, A. P., Escudero, J. B., Girón, S. H., & Sanz, J. M. (2017). Respuesta inmune adaptativa y sus implicaciones fisiopatológicas. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(24), 1398-1407.

33. Ochoa-Carrillo, F. J., & Bravo-Cuellar, A. (2013). Los macrófagos, ángeles o demonios. *Los macrófagos, ángeles o demonios*, 12(1), 1.

34. Atri, C., Guerfali, FZ y Laouini, D. (2018). Papel de la polarización de macrófagos humanos en la inflamación durante enfermedades infecciosas. *Revista internacional de ciencias moleculares*, 19(6), 1801.

35. Curi, R., de Siqueira Mendes, R., de Campos Crispin, LA, Norata, GD, Sampaio, SC y Newsholme, P. (2017). Una descripción pasada y presente del metabolismo de los macrófagos y los resultados funcionales. *Ciencia clínica*, 131(12), 1329-1342.

36. Ramiro-Puig, E., Pérez-Cano, F. J., Castellote, C., Franch, A., & Castell, M. (2008). El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 100(1), 29-34

37. Seminario 09 Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, Argentina. (2019) *INMUNIDAD DE MUCOSAS* [https://www.fmed.uba.ar/sites/default/files/2019-05/Seminario%209%202019%20Inmunidad%20en%20mucosas\\_0.pdf](https://www.fmed.uba.ar/sites/default/files/2019-05/Seminario%209%202019%20Inmunidad%20en%20mucosas_0.pdf).

38. Ruiz-Briseño MR, Sánchez-Reyes K, Alvarez-Zavala M, et al. (2018) Homeostasis intestinal: colaboración del sistema inmune con la microbiota. *Rev Med MD.*;9.10(4):337-340.

39. Mokoena, MP, Mutanda, T. y Olaniran, AO (2016). Perspectivas sobre el potencial probiótico de las bacterias del ácido láctico de los alimentos y bebidas fermentados tradicionales africanos. *Investigación de Alimentos y Nutrición* , 60 (1), 29630.
40. Mokoena MP. (2017) Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*. 26;22(8):1255. doi: 10.3390/molecules22081255. PMID: 28933759; PMCID: PMC6152299.
41. Cueto-Vigil, M. C., Acuña-Monsalve, Y., & Valenzuela-Riaño, J. (2010). Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. *Actualidades biológicas*, 32(93), 129-138.
42. Sedgwick, AE y D'Souza-Schorey, C. (2018). La biología de las microvesículas extracelulares. *Tráfico* , 19 (5), 319-327.
43. Jan (2017). Vesículas de membrana externa (OMV) de bacterias gramnegativas: una actualización de la perspectiva. *Fronteras en microbiología* , 8 , 1053.
44. Beristain-Bauza, S. C., Palou, E., & López-Malo, A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 6(2), 64-78.
45. Dean, SN, Leary, DH, Sullivan, CJ, Oh, E. y Walper, SA (2019). Aislamiento y caracterización de vesículas de membrana derivadas de *Lactobacillus*. *Informes científicos* , 9 (1), 1-11.
46. Ahijado-Guzmán, R. (2012). Análisis biofísico y reconstitución en microesferas funcionalizadas de FtsZ, proteína esencial en la división.
47. González, M., & De Ascencao, M. (2005). Síndrome de intestino irritable. Aspectos psicológicos. *Revista de la facultad de medicina de la Universidad Central de Venezuela*, 28(2), 139-145.
48. Bonet, A., & Grau, T. (2007). La glutamina, un aminoácido casi indispensable en el enfermo crítico. *Medicina intensiva*, 31(7), 402-406.
49. Claes, I. J., Schoofs, G., Regulski, K., Courtin, P., Chapot-Chartier, M. P., Rolain, T., ... & Lebeer, S. (2012). Genetic and biochemical characterization of the cell wall hydrolase activity of the major secreted protein of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *PLoS One*, 7(2), e31588.

- 50 Bäuerl, C., Coll-Marqués, J. M., Tarazona-González, C., & Pérez-Martínez, G. (2020). Lactobacillus casei extracellular vesicles stimulate EGFR pathway likely due to the presence of proteins P40 and P75 bound to their surface. *Scientific reports*, 10(1), 1-12.
- 51 Muñoz Provencio, D. (2011). Caracterización de factores de adhesión a proteínas de la matriz extracelular en *Lactobacillus casei*. Tesis Doctoral, Universitat Politècnica de València
- 52 Yan, F., Cao, H., Cover, T. L., Whitehead, R., Washington, M. K., & Polk, D. B. (2007). Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology*, 132(2), 562-575.
- 53 LÓPEZ, L. S. (2018). Efecto de la administración de leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus fermentum* sobre la respuesta th1-th17 en un modelo murino con inflamación inducida tesis doctoral, centro de investigación en alimentación y desarrollo, a.c. (ciad) .
54. Cervantes Elizarrarás, A. (2019). Bacterias ácido-lácticas aisladas de fuentes vegetales: capacidad probiótica y de inhibición del desarrollo de *Helicobacter pylori* Tesis Doctoral.
55. Ávalos Gómez, Christian, (2015) Identificación del receptor tipo toll-4 en macrófagos de ovino y su activación, al interaccionar con microvesículas (mvs) de *mannheimia haemolytica* a2 en condiciones in vitro. Tesis de grado. CINVESTAV.
56. Ellis, T. N., Leiman, S. A., Kuehn, M. J. (2010). Naturally produced outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* elicit a potent innate immune response via combined sensing of both lipopolysaccharide and protein components. *Infect. Immun.*78, 3822–31
57. Briaud P, Carroll RK. Extracellular Vesicle Biogenesis and Functions in Gram-Positive Bacteria. *Infect Immun.* 2020 Nov 16;88(12):e00433-20. doi: 10.1128/IAI.00433-20. PMID: 32989035; PMCID: PMC7671900.
58. Dinarello, CA (2018). Descripción general de la familia IL-1 en la inflamación innata y la inmunidad adquirida. *Revisiones inmunológicas* , 281 (1), 8-27.
59. Cecil, JD, O'Brien-Simpson, NM, Lenzo, JC, Holden, JA, Singleton, W., Perez-Gonzalez, A.,& Reynolds, EC (2017). Las vesículas de la membrana externa preparan y activan los inflammasomas de los macrófagos y la secreción de citoquinas in vitro e in vivo. *Fronteras en inmunología* , 8 , 1017.

60. Fantappiè, L., de Santis, M., Chiarot, E., Carboni, F., Bensi, G., Jousson, O., & Grandi, G. (2014). Inmunidad mediada por anticuerpos inducida por OMV de *Escherichia coli* modificadas genéticamente que llevan antígenos heterólogos en su luz. *Diario de vesículas extracelulares*, 3 (1), 24015.
61. Alaniz, R. C., Deatherage, B. L., Lara, J. C., Cookson, B. T. Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. *J. Immunol.* 179, 7692–701 (2007).
62. Papadopoulos, G., Weinberg, E. O., Massari, P., Gibson, F. C., Wetzler, L. M., Morgan, E. F., & Genco, C. A. (2013). Macrophage-specific TLR2 signaling mediates pathogen-induced TNF-dependent inflammatory oral bone loss. *The Journal of Immunology*, 190(3), 1148-1157.