



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Facultad de Química

Estudio de factores de patogenicidad en cepas de
Streptococcus sp. con potencial probiótico, aisladas del pozol.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:
NALLELY MAGAÑA MONTIEL

Directora de Tesis:
MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE
Facultad de Química

Ciudad de México. Febrero 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	González Pedrajo Bertha María Josefina
VOCAL	Rodríguez Sanoja Romina María de la Paz
VOCAL	Ruiz Terán Francisco
VOCAL	Reyes Duarte Dolores
SECRETARIO	Puente García José Luis

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. FACULTAD DE QUÍMICA.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. GLORIA DÍAZ RUIZ

COMITÉ TUTORAL:

DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

DR. CARLOS ESLAVA CAMPOS

SUSTENTANTE:

NALLELY MAGAÑA MONTIEL

La pregunta ¿Cómo acercarse a la ciencia? Sólo tiene una respuesta válida:

¡Con ganas!

Para acercarse a la ciencia, y no solo para acercarse sino para meterle mano, se requiere tener ganas de saber y ganas de entender el mundo. Y para entender el mundo hacen falta ganas de trabajar, capacidad de asombro, un poco de inteligencia, mucha curiosidad y mucha fantasía.

Juan Manuel Lozano

Adaptado del libro "Cómo acercarse a la Física"

Agradecimientos:

Este proyecto de tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte y con el apoyo técnico de la Dra. Gloria Díaz Ruiz en el laboratorio 324 del departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. A la Bióloga María Teresa Flores Espinoza por su apoyo técnico. Sin su guía, disposición, inspiración y apoyo esto no sería posible. Mi admiración, cariño y respeto hacia ustedes que siempre son un ejemplo para mí.

Al Dr. Carlos Alberto Eslava Campos, del laboratorio de Patogenicidad bacteriana del Hospital Infantil de México, por su apoyo técnico en la realización de los ensayos de adherencia y la guía proporcionada para la realización de este proyecto como parte del comité tutorial.

Al Dr. Luis Manuel Perea, del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina en el laboratorio de Biología Molecular de la Torre de Investigación de Medicina de la UNAM, y a su equipo de trabajo por el apoyo y guía en la realización de los ensayos de virulencia.

Al Laboratorio de Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México Federico Gómez por el apoyo con los cultivos de líneas celulares para la realización de los ensayos de adherencia.

A la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch por la guía proporcionada para la realización de este proyecto como parte del comité tutorial, por su disposición y consejos.

Al Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas, al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo para asistir al Congreso Internacional Sobre inocuidad, Calidad y Funcionalidad de los Alimentos en la Industria Alimentaria, al CONACYT por la beca de maestría 322771.

A la Dra. Andrea Trejo Márquez que siempre se ha mantenido presente como una amiga, una guía y un ejemplo a seguir.

A los compañeros de laboratorio y de trabajo, a mi familia y amistades que se mantuvieron cerca de mí en momentos difíciles confiando en mi capacidad.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN.....	- 1 -
2. Introducción.....	- 3 -
3. ANTECEDENTES.....	- 6 -
3.1. El pozol. Generalidades.....	- 6 -
3.1.1 Microbiología del pozol.....	- 8 -
3.2. Género: <i>Streptococcus</i>	- 10 -
3.2.1 Taxonomía.....	- 10 -
3.2.2 Características.....	- 12 -
3.2.3. Factores de patogenicidad.....	- 13 -
3.2.3.1 Resistencia a los antibióticos y virulencia.....	- 22 -
3.2.3.2 Base genética y regulación de la virulencia.....	- 23 -
3.3. Seguridad Alimentaria. Los probióticos.....	- 26 -
4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	- 29 -
5. HIPÓTESIS.....	- 30 -
6. OBJETIVOS.....	- 30 -
7. METODOLOGÍA.....	- 31 -
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 32 -
8.1. Material Biológico.....	- 32 -
8.2. Recuperación de las cepas.....	- 32 -
8.3. Actividad hemolítica.....	- 33 -
8.4. Detección de genes asociados a la virulencia.....	- 33 -
8.4.1 Amplificación del Gen <i>emm</i> (proteína M)	- 34 -
8.4.2 Amplificación de Genes <i>speA/speC</i> (exotoxinas pirogénicas A y C).....	- 35 -
8.4.3 Genes <i>sic/sof</i> (proteína inhibidora del complemento y lipoproteinasas).....	- 35 -
8.5. Adherencia a células epiteliales.....	- 36 -

9. RESULTADOS.....	- 38 -
9.1. Actividad hemolítica.....	- 38 -
9.2. Detección de genes asociados a la virulencia.....	- 39 -
9.3. Adherencia a células epiteliales.....	- 40 -
10. DISCUSIÓN.....	- 49 -
10.1. Actividad hemolítica.....	- 49 -
10.2. Detección de genes asociados a la virulencia.....	- 49 -
10.3. Adherencia a células epiteliales.....	- 52 -
CONCLUSIÓN.....	- 57 -
REFERENCIAS.....	- 59 -

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación según polisacárido de pared celular por Lancefield	- 11 -
Tabla 2. Grupos y especies del género <i>Streptococcus</i>	- 12 -
Tabla 3. Identificación de las especies de <i>Streptococcus</i> del grupo <i>viridans</i>	- 13 -
Tabla 4. Principales Factores de virulencia del género <i>Streptococcus</i>	- 14 -
Tabla 5. Cepas de <i>Streptococcus</i> sp. seleccionadas.....	- 32 -
Tabla 6. Mezcla de reacción para la amplificación del gen <i>I6Sr</i>	- 35 -
Tabla 7. Mezcla de reacción para la amplificación del gen <i>emm</i>	- 35 -
Tabla 8. Mezcla de reacción para la amplificación de los genes <i>speA/speC</i>	- 35 -
Tabla 9. Mezcla de reacción para la amplificación de los genes <i>sic/sof</i>	- 36 -
Tabla 10. Adherencia a diferentes líneas celulares de los estreptococos aislados del pozol	- 42 -
Tabla 11. Fenotipo de Adherencia identificado en las distintas líneas celulares	- 45 -
Tabla 12. Resultados generales	- 48 -

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama generalizado de la elaboración del pozol.....	- 7 -
Figura 2. Diferentes presentaciones del pozol.....	- 7 -
Figura 3. Árbol de relaciones taxonómicas de <i>Streptococcus</i>	- 15 -
Figura 4. Integración de adhesinas, receptores, señales, adaptación y nutrición en la formación de biopelículas de <i>Streptococcus</i>	- 15 -
Figura 5. Características de la secuencia completa de la proteína M6.....	- 16 -
Figura 6. Invasión de <i>Streptococcus</i> sp.	- 18 -
Figura 7. La proteína G de <i>Streptococcus pyogenes</i>	- 21 -
Figura 8. Sección del genoma de <i>S. pyogenes</i> tipo M1	- 24 -
Figura 9. Diagrama general de trabajo	- 31 -
Figura 10. Etapas del ensayo de adherencia.....	- 37 -
Figura 11. Tipos de hemólisis observadas.....	- 38 -
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de los genes en estudio.....	- 39 -
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los genes <i>sic</i> y <i>sof</i>	- 40 -
Figura 14. Patrones de adherencia de las cepas control en células HEP-2.....	- 40 -
Figura 15. Observaciones de adherencia.....	- 41 -
Figura 16. Diferentes fenotipos de adherencia observados	- 41 -
Figura 17. Fenotipos observados en el ensayo de adherencia a líneas celulares.....	- 44 -
Figura 18. Adherencia de <i>S. pyogenes</i> en las diferentes líneas celulares	- 46 -
Figura 19. Ensayos de adherencia en las células HEP-2	- 46 -
Figura 20. Ensayos de adherencia en las células HeLa	- 47 -
Figura 21. Ensayos de adherencia en las células HT-29	- 47 -

Resumen

En el pozol, bebida indígena de origen mexicano preparada a partir de masa de maíz nixtamalizada y fermentada, predominan las bacterias del género *Streptococcus* (Díaz y cols., 2003) y la especie *Streptococcus infantarius* subsp *infantarius* (*Sii*). No es común encontrar este género en alimentos fermentados, con excepción de estudios recientes sobre *Sii* en alimentos africanos de origen lácteo y vegetal. A pesar de ser un microorganismo que se adapta bien al sustrato, se ha encontrado que algunas cepas están relacionadas con la incidencia de algunas enfermedades (Jans y cols., 2018). Sin embargo, existe poca información con respecto a la presencia de factores de virulencia en los cultivos de *Sii* aislados del pozol que pudieran utilizarse como iniciadores, y sobre todo de su potencial de patogenicidad, por lo que antes de proponer el uso de estas bacterias como cultivos iniciadores o la introducción comercial de la bebida, deberá asegurarse su inocuidad.

En el presente trabajo se estudiaron características fenotípicas y genotípicas de los factores de patogenicidad considerados más importantes en cepas de *Streptococcus* spp. aisladas del pozol y que se ha determinado cuentan con características por las cuales podrían considerarse patógenas, con la finalidad de determinar si es posible distinguir aquellas potencialmente patógenas de los que no lo son, y a futuro proponer su empleo como cultivos iniciadores.

Se presentan resultados relacionados con el estudio del potencial patógeno de cepas de *Streptococcus* spp. aisladas del pozol. Al respecto se analizó la actividad hemolítica de la bacteria; la presencia de genes que codifican para la proteína M, que es uno de los componentes estructurales de los estreptococos del grupo A relacionados con virulencia; para el factor de opacidad que es otro antígeno de superficie celular asociado a la proteína M, para las exotoxinas A y C responsables entre otras cosas de la erupción cutánea en la escarlatina y para la proteína inhibidora del complemento el cual es importante en la respuesta inmune del hospedero (Inzunza y cols., 2004).

El analizar su capacidad de adherencia a células en cultivo, es un evento de gran relevancia, ya que es fundamental para que una bacteria pueda colonizar los epitelios, en el caso de *S. pyogenes* las interacciones iniciales de la bacteria con el hospedero favorecen la expresión de factores de virulencia, que contribuyen al desarrollo de la enfermedad (Nobbs y cols., 2009) y que en el caso de bacterias probióticas es necesaria para interferir con la

colonización de microorganismos patógenos intestinales, protegiendo al hospedero contra infecciones gastrointestinales.

Se estudió la actividad hemolítica de 33 aislados, de los cuales el 56% presentó α hemólisis y el 44% restante no la presentó. Se realizaron estudios de PCR para determinar la presencia de los genes asociados con la virulencia, los cuales codifican para proteína M (gen *emm*), para las exotoxinas pirogénicas A y C (*speA/speC*), para la proteína estreptocócica inhibidora del complemento (*sic*) y para la lipoproteínasa (*sof*). Los resultados fueron negativos para todos los genes, exceptuando las cepas con clave 1 (*sic+*) y 5031 (*sof+*). También se llevaron a cabo ensayos de adherencia a células epiteliales, utilizando las líneas HEP-2 (carcinoma faríngeo), HeLa (carcinoma de cérvix) y HT-29 (adenocarcinoma de colon humano). Los resultados mostraron que todas las cepas son adherentes a por lo menos una línea celular (HEP-2 97%, HeLa 85%, HT-29 88%) y que la gran mayoría son adherentes a los tres tipos de epitelio (72%). El análisis de los ensayos de adherencia mostró patrones con diversos fenotipos: localizado, agregativo y difuso, tomando como referencia aquellos descritos para *E. coli*.

Se concluye que en un alto porcentaje de las cepas (93.5%) no se presentaron los factores de virulencia buscados; sin embargo, en promedio 90% de las cepas presentaron adherencia a diferentes células epiteliales; y debido a que esta capacidad de adherencia no está relacionada con la presencia de factores de virulencia, podría estar relacionada con su capacidad probiótica.

2. Introducción

El pozol es una bebida tradicional indígena que se consume en el sureste de México y en algunos países de Centroamérica. Tradicionalmente se consume solo (pozol blanco), aunque también es común agregarle ingredientes como cacao, azúcar, coco; entre otros, para mejorar su sabor. Se trata de una bebida refrescante, ácida, no alcohólica, obtenida de la fermentación espontánea de la masa de maíz nixtamalizado (Ulloa y cols., 1987).

La fermentación del pozol es llevada a cabo por microbiota natural como resultado de la inoculación no intencionada del nixtamal durante su preparación. Esta microbiota natural está constituida por una gran variedad de microorganismos, compuesta de mohos, levaduras y bacterias (Wacher y cols., 1999).

En estudios con microbiología tradicional (Wacher y cols.; Ampe y cols., 1999) encontraron que las bacterias lácticas constituían del 90 al 97% de la microbiota activa total de una muestra de pozol después de 5 días de fermentación, dentro de éstas, *Lactobacillus* y *Weissella* representaban probablemente el 50% de las bacterias lácticas activas y otro género con actividad considerable fue *Streptococcus*.

En estudios moleculares se ha determinado que existen más de 40 diferentes especies identificadas en abundancias del orden de 10^{10} UFC/g de pozol (Leyva et al., 2015) y en trabajos de metaproteómica se confirmó el predominio de especies previamente identificadas por métodos moleculares dependientes del cultivo. Se identificaron numerosas proteínas bacterianas y fúngicas; a las 36 h de fermentación predominaron las proteínas de bacterias ácido-lácticas (LAB, por sus siglas en inglés), principalmente del género *Lactobacillus*, mientras que los hongos estuvieron representados principalmente por *Aspergillus*. Las proteínas prevalentes pertenecían al metabolismo de los carbohidratos y a las vías de producción de energía. (Cárdenas et al., 2014).

Suele considerarse que la presencia de estreptococos y enterococos en los alimentos indica contaminación fecal y la posible presencia de patógenos (*Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*); sin embargo, muchas de estas cepas no son patógenas y han sido reportadas por diversos autores siendo parte importante de la microbiota de alimentos fermentados como resultado de su proceso natural de producción (Franz et al., 2003; Hardie et al., 1997; Pérez-Pulido et al., 2006; Cunningham et al., 2000; Efstratiou et al., 2000; Hardie et al., 1997; Mathur et al., 2005; Pérez-Pulido et al., 2006).

Como ejemplo están los quesos artesanales del sur de Europa, en donde estos microorganismos juegan un papel destacado en la producción de aromas durante la maduración (Franz et al., 2003). *Streptococcus* también se ha reportado como un productor de bacteriocinas, y en ocasiones también presenta actividad probiótica (Gálvez et al., 1998; Fischer y Phillips, 2009).

La participación de estas cepas en otras fermentaciones es importante, sin embargo; es sabido que algunas cepas de estos géneros son patógenas oportunistas (Díaz y cols., 2003); así mismo en estudios recientes realizados por Becerril (2011) a bacterias de los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus* provenientes del pozol, el 60% de las cepas resultaron ser resistentes por lo menos a un antibiótico y además una de las cepas mostró actividad beta hemolítica.

Las BAL relacionadas con los alimentos a menudo están filogenéticamente relacionados con comensales que pueden ser patógenos oportunistas o incluso invasivos. El ejemplo más sorprendente de esta situación es probablemente el género *Streptococcus*, en el que solo una especie, *Streptococcus thermophilus*, se considera segura. Desde hace siglos, *S. thermophilus* es un iniciador de productos lácteos que se consumen con frecuencia en todo el mundo. Ahora sabemos que esta especie está relacionada filogenéticamente con patógenos estreptocócicos notorios como los del Grupo A y del Grupo B, así como con *Streptococcus pneumoniae*. Sin embargo, los estudios del genoma de *S. thermophilus* han revelado una extensa descomposición genética, que llevó a la pérdida de determinantes patógenos estreptocócicos durante su adaptación a la leche. Además, se demostró que la especie había adquirido genes de especies como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* con quien a menudo comparte una relación simbiótica en el entorno lácteo. Estos atributos, junto con la larga experiencia empírica de su uso seguro respaldan la naturaleza benigna de *S. thermophilus* (Jans y cols., 2013).

Se ha reportado que algunas bacterias encontradas en los alimentos pueden ser reservorios de genes de resistencia a antibióticos y de otros genes de virulencia (Burne y cols., 2007; Hardie y cols., 1997; Mathur y cols., 1995). La mayor preocupación asociada con la aparición de estas bacterias es que pudieran transferir dichos genes a bacterias patógenas y a la microbiota nativa que entre en contacto con ellas en el tracto gastrointestinal. Esto hace que el incremento en el número de infecciones por enterococos despierte la preocupación sobre su transferencia en varios alimentos, y también sobre el tratamiento de enfermedades

gastrointestinales con probióticos que contienen estos microorganismos. Todo esto podría resultar en infecciones humanas, y convertirse en un probable riesgo para la salud (Franz et al., 2003; Kayser, 2003).

Queda claro que los microorganismos utilizados en la industria alimentaria y como probióticos no deberían contener factores de virulencia ni de resistencia, con lo cual no les sería posible dañar al hospedero y por lo tanto no representarían un problema de salud. La selección de los estreptococos para la producción de alimentos, entonces, debe ser evaluada con mucho cuidado y seguridad (Franz et al., 2003; Kayser, 2003; Martin et al., 2005).

Por lo tanto, en este trabajo se realizaron estudios de rasgos fenotípicos asociados con la virulencia que permiten la colonización y diseminación en el hospedero; así como estudios de diversos genes de virulencia, puesto que se tiene que valorar qué papel juegan en la transferencia de dichos genes hacia otros procariontes; y valorar el potencial uso de cepas de estreptococos aisladas del pozol, en la industria alimentaria e incluso en la médica como tratamientos alternativos.

3. Antecedentes

Desde los tiempos antiguos la fermentación ha sido utilizada para preservar los alimentos, actualmente se mantiene como un método utilizado en los hogares y en las industrias de alimentos a pequeña y gran escala alrededor del mundo (Law et al., 2011). Existe una gran variedad de alimentos fermentados a nuestro alrededor, de origen tradicional o industrializados. La demanda actual de productos en el mercado está relacionada con lo que se puede llamar sensibilización social, la cual conlleva a la exigencia de productos frescos, tradicionales, “naturales” o mínimamente procesados; trayendo como consecuencia un mayor interés en este tipo de productos a nivel mundial.

De acuerdo con Nout y Mortarjemi (1997), los alimentos fermentados son típicamente únicos y varían en cada región debido a cambios en el clima, a los patrones sociales, a las prácticas de consumo y mayoritariamente a causa de la disponibilidad de materias primas.

3.1. El pozol. Generalidades.

El pozol es una bebida fermentada tradicional de origen indígena que se consume en México y algunos lugares de Centroamérica. Su nombre proviene de la palabra *pozolli* que significa espumoso en náhuatl. Se trata de una bebida no alcohólica, ácida y refrescante, preparada a partir de una masa nixtamalizada y fermentada en estado semisólido, es de origen maya y se prepara en México y Guatemala desde épocas prehispánicas. El proceso de fermentación es complejo ya que al ocurrir en forma natural (sin inóculo) como la mayoría de los alimentos de origen antiguo, involucra una microbiota mixta.

Los principales estados productores en nuestro país son Tabasco, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas, Campeche, parte de Veracruz, y Oaxaca. Los chontales, mayas, lacandones, tzeltales, tzotziles, tojolabales, chamullas, zoques y zapotecos de estas regiones han utilizado esta bebida con fines alimentarios, curativos y ceremoniales desde antes de la conquista española (Cortés et al., 1997). Actualmente en algunos grupos étnicos y en varias comunidades rurales de nuestro país es considerado como un alimento que forma parte de la dieta básica, es consumido como desayuno o almuerzo, después de realizar las labores del campo, e incluso como refresco. En palabras de los tzotziles, habitantes de tierras chiapanecas: “El pozol es la fuerza que corre a través de nuestras venas” (Paz et al., 2008; Wacher, 1993).

Se le atribuyen beneficios medicinales como el control de la diarrea, y también la cura de infecciones y heridas superficiales, esto último porque las bolas de pozol han sido utilizadas desde la antigüedad como cataplasmas que se colocan sobre las heridas. También se utiliza para reducir la fiebre cuando éste es adicionado con miel de abeja (Wacher, 1993). Se ha reportado que *in vitro* tiene un efecto antagónico con varias especies de bacterias, levaduras y mohos; muchas de las cuales son patógenas o potencialmente patógenas para el hombre (Velázquez-López y cols., 2018).

El pozol se prepara tanto domésticamente como a pequeña escala de manera comercial. Esto bajo las técnicas tradicionales que han sido transmitidas de generación en generación.

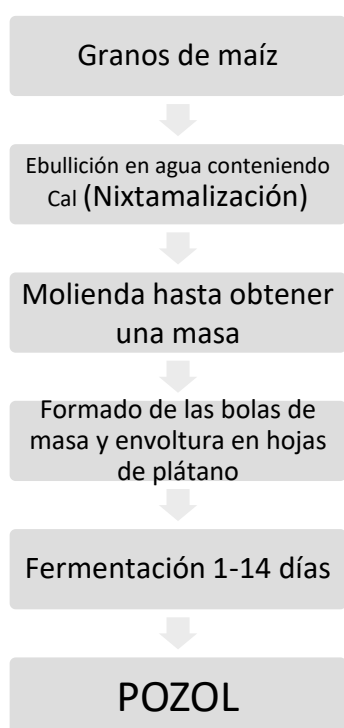


Figura 1. Diagrama generalizado de la elaboración del pozol (FAO, 2011)

La producción del pozol comienza con alrededor de 1 a 1.5 kg de granos obtenidos por el desgrane de las mazorcas de maíz (*Zea mays L.*), los granos son hervidos durante ~1h en una olla de agua con cal, que es hidróxido de calcio 1%. Durante la ebullición, la hinchazón de los granos facilita la remoción del pericarpio. Al enfriarse los granos, se lavan con agua y se drenan, resultando en lo que es conocido como nixtamal. El nixtamal se muele en un molino de metal manual o en molino de piedra para obtener una pasta gruesa que después es moldeada manualmente en forma de bolas, las cuales son envueltas en hojas de la planta del plátano para evitar la desecación y se dejan a temperatura ambiente (30-40°C) durante 1 a 14 días, o más, dependiendo de la preferencia de los consumidores y de las circunstancias. Figuras 1 y 2.



Figura 2. Diferentes presentaciones del pozol. a) Preparación del pozol con cacao y hielo. b) Pozol con cacao en la hoja de la planta del plátano. c) Pozol preparado.

3.1.1 Microbiología del pozol

Desde los años 50 se han realizado varios trabajos dirigidos a este tema, enfocados a entender la microbiota del pozol. Los estudios microbianos fueron iniciados por Salinas en 1958, siendo Ulloa y colaboradores quienes recopilaron las siguientes investigaciones realizadas hasta 1987. Se reportaron algunos microorganismos como *Bacillus cereus*, *Aspergillus flavus*, *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis* y *Phialophora richardsiae* que podían estar presentes y representan un riesgo a la salud (Ulloa et al., 1987).

A partir de estas investigaciones se han destacado trabajos realizados por Wachter et al., Escalante et al., Sainz et al., Rivera, Ampe et al. y Becerril (1993 y 2000, 2001, 2001, 2001, 1999 y 2011 respectivamente); donde también queda confirmado lo compleja que es la microbiota de este alimento tradicional.

Se incluyen hongos, levaduras y bacterias de diferentes tipos, encontrándose principalmente bacterias ácido lácticas (BAL) que son las primeras en actuar durante la fermentación, y por lo tanto son las que determinan la acidez, aroma y sabor característicos del pozol. Dentro de éstas se encontraron los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Weissella* y *Streptococcus*, predominando estos dos últimos.

En su trabajo sobre la dinámica de la comunidad microbiana durante la producción de la masa de maíz fermentado del pozol mexicano, Nabil y Ampe (2000) mostraron que la microbiota aerobia inicial fue reemplazada en los primeros días por bacterias lácticas heterofermentativas, incluyendo a *Lactobacillus fermentum*, siendo reemplazada progresivamente por BAL homofermentativas (*L. plantarum*, *L. casei* y *L. delbrueckii*), que continuaron la acidificación de la masa del maíz. Al mismo tiempo, una comunidad muy diversa de levaduras y hongos se desarrolló en la periferia de la masa. El análisis de los patrones de Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE) obtenidos con los iniciadores para bacterias y eucariotas con los genes 16S y 18S de ADNr, demostraron claramente que hubo un cambio importante en la estructura de la comunidad después de 24 horas, y que ésta alta biodiversidad es mantenida durante todo el proceso. Observaron que un número relativamente elevado de especies, por lo menos seis a ocho ya mencionadas en el párrafo anterior, son necesarios para llevar a cabo la fermentación; siendo las especies de *Streptococcus* spp. quienes dominaron la fermentación y representaron entre el 25 y 75% de la flora total durante todo el proceso. Concluyeron que existe una clara necesidad de desarrollo y validación de pruebas para

describir con más detalle la estructura de las comunidades microbianas, especialmente las comunidades de BAL en alimentos fermentados.

Becerril (2011) identificó varias cepas como *Streptococcus* sp. y *Lactobacillus plantarum*, incluyendo como cepas de referencia a *Streptococcus infantarius*, *S. macedonicus* y *S. pyogenes*, las primeras dos aisladas del pozol por Díaz et al. (2003) y la última de origen clínico. Dentro de otro grupo identificó a *Streptococcus bovis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Leuconostoc citreum*, destacando *Enterococcus italicus*, la cual no se había reportado como especie que formara parte de la microbiota del pozol hasta dicho trabajo. En otros grupos de cepas identificó a *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus pantheris* y *Weissella cibaria*, las cuales tampoco habían sido reportadas como parte de la microbiota del pozol. Es importante resaltar que, de los grupos de bacterias identificados en este estudio, el 70% corresponde al género *Streptococcus*.

Los estreptococos y enterococos en su mayoría son considerados patógenos, sin embargo, la contribución de estas cepas en la fermentación del pozol es destacada, además, la participación de estas cepas en otras fermentaciones es importante (Díaz et al., 2003). Las cepas de *Streptococcus* se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente, especialmente en las superficies mucosas del hombre y de animales, incluyendo el tracto gastrointestinal, pero algunas se encuentran en suelo y agua, también las encontramos en productos lácteos (entre otros alimentos) y en plantas (Hardie y Whiley, 1997). Un ejemplo es *Streptococcus thermophilus*, un microorganismo de los alimentos que junto con *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* forma parte importante en la producción de yogurt, el primero también es bastante utilizado en cultivos iniciadores para algunos quesos como el Ricota, Provolone, Emmental, Mozzarella, Gruyere, y en particular el Parmesano (Bamforth, 2005). *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* están ampliamente identificados como cultivos iniciadores para elaborar quesos, pan y productos vegetales fermentados de manera artesanal (Franz et al., 2000; Steinkraus, 2002; Mahaut et al., 2003; Bamforth, 2005).

Se ha demostrado la presencia de la bacteria patógena *Escherichia coli* que resiste a la acidez característica de este alimento (Sainz et al., 2001), identificándose los serogrupos diarreogénicos de *E. coli* EPEC (Enteropatógena) y ETEC (Enterotoxigénica). Además de diferentes especies bacilares reportadas como *B. lentus*, *B. circulans*, *B. cereus* y *B. mycoides* relacionadas con características amilolíticas en el pozol (Rivera, 2001).

3.2. Género: *Streptococcus*

Los *Streptococcus*, aunque no eran nombrados así, se registraron por primera vez en 1683 por Antonio Van Leeuwenhoek en sus dibujos de las imágenes de microscopio que obtuvo al observar el material tomado de sus dientes. La primera vez que los estreptococos se consideraron importantes en la historia fue en 1879, cuando Louis Pasteur estaba estudiando la fiebre puerperal, la cual estaba causando una alta mortalidad en las salas de maternidad. Dentro de los cuerpos de las mujeres enfermas se encontraron gránulos redondeados (microorganismos) dispuestos en forma de cadenas o collares de cuentas. Él estaba convencido, y se comprobó más tarde, que eran la causa de las infecciones en las mujeres después del parto. Por lo tanto, los estreptococos fueron unos de los primeros microbios que se identificaron como la causa de una enfermedad contagiosa (Nobbs et al., 2009).

El nombre *Streptococcus* proviene del griego *strepto* (torcido) y *coccus* (esférico). Actualmente hay más de 100 especies reconocidas de *Streptococcus* (Nobbs et al., 2009).

3.2.1 Taxonomía

El género *Streptococcus* está formado por bacterias esféricas u ovoides que crecen en pares o cadenas de longitud variable. La mayoría son anaerobios facultativos, existiendo algunas especies de anaerobios obligados. Son Gram positivos, no formadores de esporas, catalasa negativos, inmóviles, con requerimientos nutricionales muy complejos y variables.

Hasta poco antes de la publicación en 1986 del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, el género *Streptococcus* estaba dividido en tres grupos (*Lactococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*). Actualmente la tecnología de hibridación del DNA ha revolucionado la taxonomía, poniendo de manifiesto que los enterococos son tan diferentes del resto de los estreptococos, que constituyen un nuevo género (Facklam, 2002). En las últimas dos décadas han ocurrido cambios en la taxonomía y nomenclatura del género.

Históricamente, la clasificación de los estreptococos está basada en el esquema de Lancefield (Tabla 1), que agrupa las cepas de estreptococos de acuerdo a su composición de antígenos de pared celular. Dichos antígenos, conocidos como antígenos específicos de grupo, o sustancias C, son polisacáridos (grupos A, B, C, y G), o ácidos teicoicos (como en el grupo D).

Este enfoque ha dado buenos resultados para los estreptococos patógenos, pero su aplicación a todas las especies del género es limitada por el hecho de que algunas pueden carecer de pared celular (no poseen un tipo específico de antígeno) o poseer un tipo de antígeno específico y pertenecer a una líneas taxonómicas distintas.

Tabla 1. Clasificación según polisacárido de pared celular por Lancefield.

<i>Grupo</i>	<i>Representante</i>
A	<i>S. pyogenes</i>
B	<i>S. agalactiae</i>
C	<i>S. equi</i>
D	<i>S. bovis</i>
G	<i>S. anginosus</i>

No clasificables: *S. pneumoniae* y *Streptococcus* del grupo viridans

Los estreptococos también se pueden organizar en 6 grupos (Figura 3 y Tabla 3), forma en la cual los grupos y especies del género *Streptococcus* son comúnmente reconocidas. En general, se clasifican según distintas características: hemólisis en agar sangre, reacciones bioquímicas, antígenos de pared celular (Lancefield), características de crecimiento, y análisis genético (Nobbs et al., 2009).

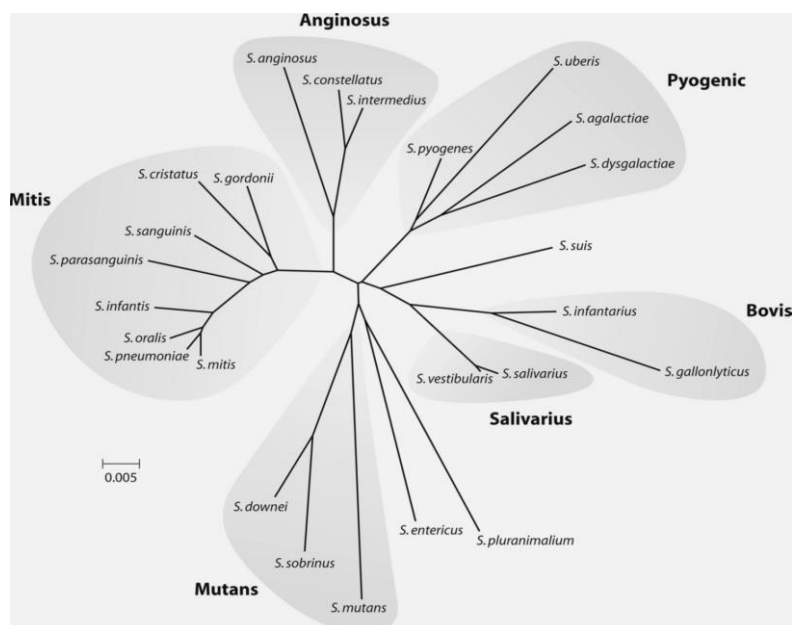


Figura 3. Árbol de relaciones taxonómicas de *Streptococcus* (Nobbs et al., 2009).

Nota: Algunas de las especies no están descritas en la figura y se complementa con la tabla 2.

3.2.2 Características

El grupo piogénico incluye a *Streptococcus pyogenes* (GAS, o grupo A de Lancefield), *S. agalactiae* y *S. uberis* (grupo B), y *S. dysgalactiae* y *S. equi* (grupo C), *S. iniae* también se encuentran en este grupo, pero se no se muestran en la Fig. 3. Estos organismos se ocupan principalmente de la colonización de los seres humanos y otros mamíferos (aunque *S. iniae* coloniza los peces). Están asociados con una variedad de enfermedades incluyendo amigdalitis, faringitis, impétigo, mastitis, y sus secuelas como la fiebre reumática, glomerulonefritis (*S. pyogenes*), y sepsis neonatal (*S. agalactiae*). *S. dysgalactiae* es un organismo importante asociado con la mastitis bovina, mientras que *S. equi* causa paperas a los caballos.

El grupo mitis comprende casi todas las especies que se pueden aislar de los humanos en cavidad oral o la nasofaringe. *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* y *S. pneumoniae* están muy relacionados, y debido a la extensa transferencia horizontal de genes, la delimitación de las cepas en estas especies es a menudo borrosa. *S. pneumoniae* es un patógeno importante asociado con otitis media, bronquitis, sinusitis, meningitis, y neumonía.

Tabla 2. Grupos y especies del género *Streptococcus* (Hardie y Whiley, 1997).

Grupos	Especies	Grupos	Especies	Grupos	Especies
Pyogenic	<i>Strep. pyogenes</i> <i>Strep. agalactiae</i> <i>Strep. canis</i> <i>Strep. dysgalactiae</i> <i>Strep. equi</i> <i>Strep. hyointestinalis</i> <i>Strep. iniae</i> <i>Strep. parauberis</i> <i>Strep. porcinus</i> <i>Strep. uberis</i>	Salivarius	<i>Strep. salivarius</i> <i>Strep. thermophilus</i> <i>Strep. vestibularis</i>	Mutans	<i>Strep. mutans</i> <i>Strep. cricetus</i> <i>Strep. downei</i> <i>Strep. macacae</i> <i>Strep. rattus</i> <i>Strep. sobrinus</i>
Mitis	<i>Strep. gordonii</i> <i>Strep. mitis</i> <i>Strep. oralis</i> <i>Strep. parasanguinis</i> <i>Strep. pneumoniae</i> <i>Strep. sanguinus</i>	Anginosus	<i>Strep. anginosus</i> <i>Strep. constellatus</i> <i>Strep. intermedius</i>	Bovis	<i>Strep. bovis</i> <i>Strep. alactolyticus</i> <i>Strep. equinus</i> <i>Strep. infantarius</i>

Tabla 3. Identificación de las especies de *Streptococcus* del grupo viridans (Facklam, 2002).

Grupo y especies	Origen	Grupo y especies	Origen
Mutans group		Anginosus group	
<i>S. mutans</i>	Humano	<i>S. anginosus</i>	Humano
<i>S. sobrinus</i>	Humano, rata	<i>S. constellatus</i>	Humano
<i>S. cricetus</i>	Rata, humano	<i>S. intermedius</i>	Humano
<i>S. downei</i>	Mono	Sanguinus group	
<i>S. ferus</i>	Rata	<i>S. sanguinus</i>	Humano
<i>S. macaccae</i>	Mono	<i>S. parasanguinis</i>	Humano
<i>S. rattii</i>	Rata, humano	<i>S. gordonii</i>	Humano
<i>S. hyovaginalis</i>	Cerdo	Mitis group	
Salivarius group		<i>S. mitis</i>	Humano
<i>S. salivarius</i>	Humano	<i>S. oralis</i>	Humano
<i>S. vestibularius</i>	Humano	<i>S. cristatus</i>	Humano
<i>S. infantarius</i>	Humano	<i>S. infantis</i>	Humano
<i>S. alactolyticus</i>	Cerdo, aves	<i>S. perois</i>	Humano
<i>S. hyointestinalis</i>	Cerdo	<i>S. orisratti</i>	Rata
<i>S. thermophilus</i>	Productos de consumo diario		

Otros grupos incluyen a *S. anginosus* y *S. salivarius*, que contienen principalmente a los microbios de la cavidad oral humana o animal, y el grupo bovis. Los estreptococos del grupo mutans comprenden la menor cantidad de organismos relacionados; estos incluyen a una variedad de bacterias que colonizan la cavidad oral de los seres humanos (*S. mutans* y *S. sobrinus*), chimpancés (*S. downei*), ratas (*S. rattii*), y el hámster (*S. criceti*) que están asociados con el desarrollo de caries dentales.

Los microbios de la cavidad oral se citan a menudo como estreptococos del grupo viridans, éstos carecen de antígeno de grupo específico (Tabla 3), al formar parte de la microbiota oral pueden contribuir a la patogénesis de la caries dental o producir endocarditis dañando las válvulas del corazón (Nobbs et al., 2009).

3.2.3. Factores de patogenicidad del género *Streptococcus*

Históricamente, el estándar para medir la virulencia de los microorganismos eran “los postulados de Koch” publicados en 1980. Con el descubrimiento de las técnicas en biología molecular, se hizo posible identificar los genes que codifican para los factores responsables de virulencia, siendo utilizados como sondas para encontrar análogos en otros microorganismos (Rocha et al., 2004).

La patogenicidad es la capacidad intrínseca de un microorganismo para producir una enfermedad en un individuo sano, siendo la virulencia el grado cuantitativo de la patogenicidad (Rocha et al., 2004). La virulencia es una propiedad característica de cada cepa bacteriana; dentro de una especie patógena, cada cepa puede tener distintos grados de patogenicidad, incluso ser cepas avirulentas. Estas últimas no producen enfermedad, pero son importantes porque mantienen toda su estructura antigénica, por lo que inducen una respuesta inmune. Así se pueden usar como vacunas (IDAP, 2011). Según las definiciones anteriores, solo los organismos que causan enfermedades en personas sanas son patógenos, mientras que los microorganismos oportunistas o comensales, que solo pueden infectar a los huéspedes con trastornos del sistema inmune, no se consideran patógenos. Casadevall y Pirofski (1999) propusieron una definición de patogenicidad que abarcaba el estado de las defensas inmunológicas de un huésped: la patogenicidad de un microorganismo dado se expresó como el grado de daño causado tanto por el propio microorganismo, como por el sistema inmune, en respuesta al patógeno.

Los factores de virulencia se pueden clasificar en cinco grupos generales (Rocha, et al., 2004), según sirvan para colonizar, invadir, evadir la respuesta inmune o producir daño en el huésped. En la tabla 4 se muestran ejemplos de algunos de los factores de virulencia considerados dentro de los más importantes del género.

Tabla 4. Principales factores de virulencia del género *Streptococcus*.

<i>Tipo</i>	<i>Función</i>	<i>Ejemplos de Factores de virulencia</i>		<i>Ref.</i>
Adhesina	Capacita al organismo para unirse al tejido hospedero	Factor de opacidad Sérico (SOF) Proteína M	<i>S. pyogenes</i> y GAS	Nobbs et al. 2009 Courtney & Pownall 2010
Invasina	Capacita al organismo para invadir una célula, tejido del hospedero	Neumolisina speB	<i>S. pneumoniae</i> <i>S. pyogenes</i> y GAS	Brooks & Mias 2018 Hamada et al. 2015
Evasina	Capacita al organismo para evadir uno o más mecanismos de defensa del hospedero	Cápsula Proteína SIC C5a peptidasa SPE	<i>S. pneumoniae</i> <i>S. pyogenes</i> <i>S. agalactiae</i>	Brooks & Mias 2018 Frick et al. 2018
Agresina	Causa daño directamente al hospedero	Estreptoquinasa Hialuronidasa Hemolisinas	GAS y GBS	Nobbs et al. 2009 Kolar et al. 2016
Modulina	Induce daño en el hospedero de forma indirecta por perturbación de la red de citosinas.	Glucosil transferasas	<i>S. mutans</i>	Argimón et al. 2013

Los estreptococos patógenos se pueden dividir en tres grupos: aquellos que comúnmente causan infecciones en humanos, especies comensales y las epizooticas que causan síntomas de la enfermedad en condiciones específicas. Los microorganismos patógenos se consideran causa de infecciones invasivas en humanos: *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* —grupo A (*Streptococcus* del grupo A, GAS), *S. agalactiae* - grupo B (*Streptococcus* del grupo B, GBS) y *S. mutans*. Numerosos estreptococos se consideran patógenos oportunistas, causando infecciones en el caso de una respuesta inmunológica débil del cuerpo del huésped que ocupan: *S. intermedius*, *S. canis*, *S. equinus*, *S. bovis*, *S. equi*, *S. viridans*, *S. mitis*, *S. uberis* (Krzyściak et al., 2013).

Los factores de colonización o adhesinas son moléculas de la superficie celular bacteriana y son las responsables de las interacciones iniciales de los estreptococos con el hospedero. La colonización por estreptococos depende de la adherencia, la señalización, su adaptación nutricional, y la modulación del hospedero (Figura 4).

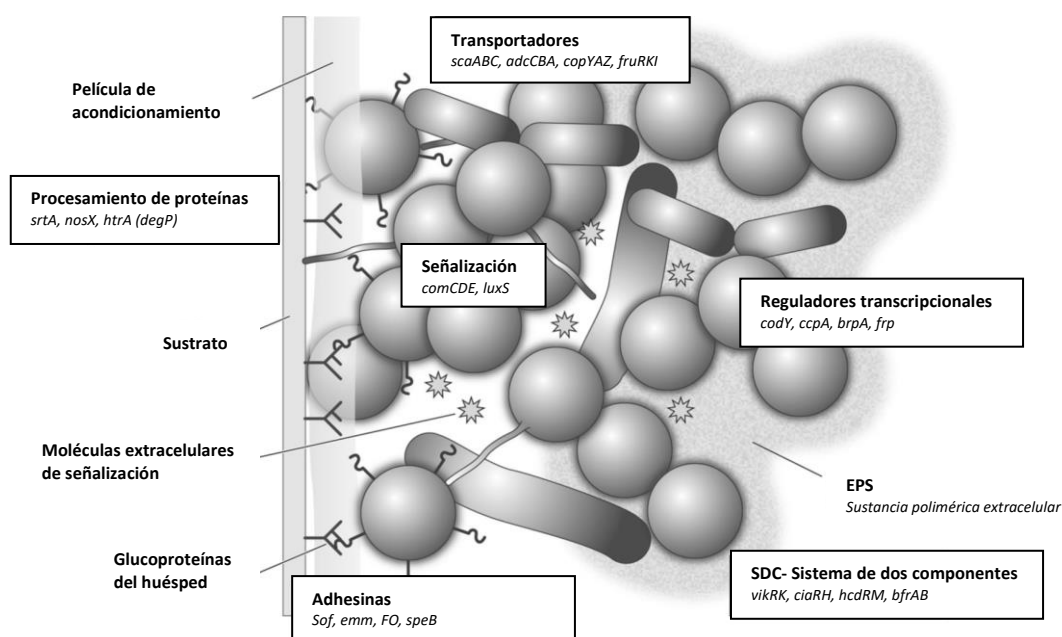


Figura 4. Integración de adhesinas, receptores, señales, adaptación y nutrición en la formación de biopelículas de *Streptococcus* (Nobbs et al., 2009).

El proceso de colonización depende de la expresión de los genes que codifican para las adhesinas, por ejemplo, *sof* y *emm* en la figura 4, de transportadores (*scaABC*), de reguladores de la transcripción (*codY*); del procesamiento postraduccional (*htsA*); de los SDC (sistemas

de dos componentes, p. ej. el de fosfo-transmisión histidina-aspartato: vikRK) y de la comunicación celular (estrellas); siendo sólo unos pocos ejemplos seleccionados (Figura 4).

Las adhesinas incluyen (Figura 4) a los polipéptidos anclados a pared celular, y algunas proteínas de anclaje, que median la unión y posiblemente también la modulación celular del anfitrión. También incluyen a los polipéptidos secretados, que pueden ser de síntesis (GtfBC), o degradadores de las proteínas del huésped (SpeB) que suministran nutrientes adicionales. Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y material capsular contribuyen al desarrollo de la matriz extracelular (Willenborg et al., 2011; Doern et al., 2009).

Nobbs y cols. (2009) mencionan que los péptidos secretados, y posiblemente otras señales moleculares (estrellas en la figura 4) y los estímulos ambientales como el pH, pueden ser detectados por el SDC, con su correspondiente modulación de la transcripción. Los transportadores aseguran la homeostasis nutricional, y tienen una posible participación en la regulación de la adhesión. Es decir, todas las actividades en su conjunto, con las cápsulas y las biopelículas, están involucradas en la adhesión.

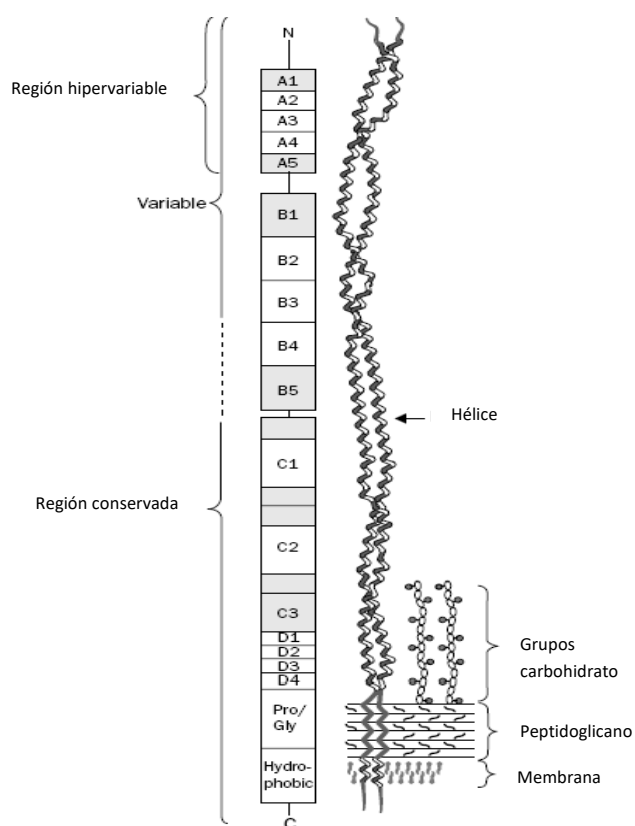


Figura 5. Características de la secuencia completa de la proteína M6 (Bisno et al., 2003).

Proteína M. Es la principal proteína de superficie en *S. pyogenes* y su principal factor de virulencia. Está implicada tanto en la adhesión y colonización de la bacteria como en la permanencia de la bacteria en los tejidos infectados, ya que capacita a la bacteria para resistir a la fagocitosis. Las especies del GAS están clasificadas en 180 tipos M, basados en la hipervariabilidad de la región N-terminal de la proteína M (Figura 5, parte superior).

La proteína M normalmente está compuesta de cuatro regiones repetidas, con dos cadenas de polipéptidos enrollados en forma de α -hélice y anclados en la membrana celular. La proteína M atraviesa la membrana celular apareciendo la región carboxilo terminal en la cara interna de la pared celular (Figura 5, región conservada entre las

bacterias del GAS). En la superficie celular externa se encuentra la región amino terminal en forma de fibrillas que se extienden en el medio ambiente y concluyen en una serie de aproximadamente 20 aminoácidos, secuencia que varía entre los diferentes aislamientos clínicos. Esta última área, junto con el segmento A, constituyen la región hipervariable (Figura 5), lo que hace que ciertas cepas sean altamente patógenas (Nobbs et al., 2009; Jarva et al., 2003; Cunningham, 2000; Bisno et al., 2003).

Para caracterizar factores de virulencia extracelulares para estreptococos se utilizan cepas que representan a serotipos de este tipo de proteína (M1, M2, M3, M4, M6, M12, M18, M22, M28, M49, M75 y M89), que son las que más comúnmente causan faringitis, fiebre reumática, infecciones de la piel y episodios de invasión (Reid et al., 2003).

S. pyogenes utiliza la proteína M para la adherencia e internalización de la bacteria en las células epiteliales del huésped. La proteína M se une directamente a los componentes de la matriz extracelular, como la fibronectina. Además, las proteínas de la matriz extracelular de la bacteria pueden unirse a las integrinas de la superficie celular y establecer de puente entre la bacteria y la célula epitelial humana, promoviendo la internalización mediada por integrinas. Se ha evidenciado que la proteína M6, mediante su región de repetición C, se une a receptores de membrana situados en la superficie de los queratinocitos y la proteína M1 puede unirse a glicosaminoglicanos de la superficie celular, favoreciendo la internalización de la bacteria en las células (Koutouzi et al. 2015; Henningham, 2018).

Factor de opacidad del suero (SOF). Es un antígeno de superficie celular asociado con la proteína M de los estreptococos del grupo A. SOF es una α -lipoproteínasa capaz de opacar los medios que contienen suero de mamífero al alterar la estructura de las lipoproteínas de alta densidad, se une a la fibronectina y está implicada en la adhesión a las células huésped. Los anticuerpos específicos dirigidos contra el factor de opacidad inhiben la reacción de opacidad del tipo M que la produce, por lo que se puede utilizar la opacidad de este factor como una reacción de tipificación suplementaria o complementaria. Actualmente se reconocen alrededor de 27 serotipos que producen el FO (Koneman y Allen, 2008; Courtney et al. 2009).

Son varias las estructuras y mecanismos implicados en la invasión de tejidos por bacterias. *Streptococcus pyogenes* invade al huésped por los espacios intercelulares. Para favorecer la invasión excretan exoenzimas (hialuronidasas, neuraminidasas, lipasas, etc.) capaces de

destruir el ácido hialurónico y otras sustancias de la matriz extracelular que mantienen unidas nuestras células (Lindhal et al., 2005).

La **neumolisina** es un factor de virulencia de los neumococos (Figura 6), que penetra las defensas físicas del huésped. A diferencia de otras proteínas neumocócicas, esta molécula no está expuesta a la superficie, se trata de una enzima citoplasmática que se libera por la acción de una autolisina (Jedrzejewski, 2001).

El ácido hialurónico (HA) es un polímero de glicosaminoglicano lineal que se encuentra en la matriz extracelular de casi todos los tejidos, y se sintetiza por muchos tipos de células, incluyendo fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos. Su función principal es contribuir a la estabilidad y la estructura de la matriz extracelular. En respuesta a una lesión tisular infecciosa o no infecciosa, las especies reactivas de oxígeno y las hialuronidasas del huésped degradan rápidamente el HA en fragmentos de bajo peso molecular que poseen actividad inmunoestimuladora. La **hialuronidasa** es también una enzima secretada por *S. pyogenes*, actúa como un factor de virulencia por su capacidad para ayudar a la propagación de la bacteria a través de los tejidos del huésped y se considera que puede ser importante para abastecer las necesidades nutricionales de la bacteria (Frick et al. 2018).

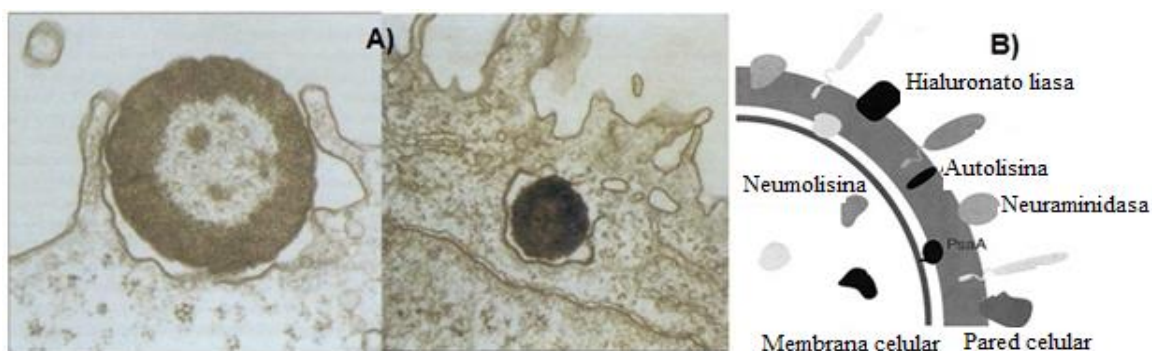


Figura 6. Invasión. A) *Streptococcus pyogenes*. Proceso de invasión (OCW, 2011).
B) *Streptococcus pneumoniae*. Factores de virulencia (Jedrzejewski, 2001).

Hemolisinas. Se trata de toxinas membranolíticas que en un principio fueron identificadas por su característica de lisar glóbulos rojos sensibles de humanos o de otras especies animales, y por la aparición de un halo de hemólisis alrededor de las colonias bacterianas crecidas en agar sangre. Sin embargo, actualmente se sabe con certeza que la mayoría de las hemolisinas bacterianas actúan sobre células distintas a los glóbulos rojos, causando daño tisular o muerte de muchos de los animales de experimentación, justificando así su nombre de “toxina” (Alouf, 2001).

Se conocen variedades de proteínas extracelulares que interactúan con proteínas sanguíneas ó células sanguíneas. Estas incluyen a dos hemolisinas, estreptolisina O (**SLO**) que es lábil al oxígeno y la estreptolisina S (**SLS**) que es estable al oxígeno, las cuales lisan células rojas sanguíneas por medio de la formación de poros en la membrana celular, ocasionando la muerte. Pruebas de hemólisis fueron utilizadas para apoyar las primeras clasificaciones del género *Streptococcus* sp.

Los estreptococos presentan tres fenotipos después de su crecimiento en agar con sangre de oveja: alfa, beta y gamma. La hemólisis alfa se refiere a una lisis parcial de eritrocitos produciendo una coloración verde que se observa alrededor de las colonias (debido a la liberación de un producto de degradación de la hemoglobina llamado bili-verdina); la hemólisis beta se refiere a un halo de hemólisis completamente claro debido a la destrucción total de los eritrocitos y la hemólisis gamma se refiere a la ausencia de hemólisis. Los estreptococos del grupo A son casi siempre beta hemolíticos, mientras que los del grupo B pueden ser alfa, beta o gama hemolíticos, el grupo D son generalmente alfa o gamma. Los *Streptococcus pneumoniae* y *viridans* son alfa-hemolíticos. La mayoría de los estreptococos orales y enterococos no presentan hemólisis (Perea-Mejía 2003). Por lo tanto, la reacción de hemólisis es importante para la clasificación de los estreptococos. Esta reacción, junto con otra de las características fisiológicas es suficiente para una identificación clínica presuntiva (Nobbs et al., 2009).

Exotoxinas pirogénicas. *S. pyogenes* secreta toda una serie de toxinas bajo el nombre común de exotoxinas pirogénicas estreptocócicas (**SPE**), incluyendo SpeA, SpeB, SpeC y SpeD. La exotoxina pirogénica estreptocócica, antes conocida como toxina eritrogénica, es responsable del *rash* (erupción que se manifiesta con cambios en el color o la textura de la piel) de la fiebre escarlatina. Experimentalmente, esta sustancia exhibe una variedad de otras propiedades tóxicas incluyendo pirogenicidad, citotoxicidad, y aumento de la susceptibilidad a los efectos letales. Se conocen 10 toxinas serológicamente diferentes (A-J), cuyos efectos pueden ser neutralizados por anticuerpos. Se trata de exotoxinas que actúan como superantígenos, es decir, productos que estimulan de modo intenso e inespecífico el sistema inmune. **SpeB** es una cisteína proteasa que tiene una amplia especificidad, ya que es capaz de degradar toda una serie de proteínas estreptocócicas y del huésped humano. En el sitio bacteriano, SpeB es capaz de: (i) eliminar proteínas de la superficie, que incluye proteínas M, proteínas de unión a fibronectina y peptidasa C5a, y (ii) hidrolizar proteínas secretadas, como la estreptoquinasa,

y la estreptolisina O (SLO). En el sitio anfitrión, SpeB escinde inmunoglobulinas (son moléculas proteicas que poseen actividad de anticuerpo) del tipo IgG en fragmentos y degrada IgA, IgM, IgD e IgE. La escisión de la IgG da como resultado una alteración de la opsonofagocitosis y una mayor supervivencia de GAS en la sangre humana. Por lo que, SpeB participa directamente en la evasión de la bacteria al sistema inmunitario del huésped y en la propagación de la infección (Shumba et al. 2019).

Dentro de los factores para evadir o superar las defensas del huésped están:

Cápsula. En muchas especies bacterianas las cepas que sintetizan cápsulas son más virulentas que las no capsuladas. *Streptococcus pneumoniae*, gracias a su cápsula de naturaleza polisacárida, es capaz de evadir a los macrófagos alveolares invadiendo el tracto respiratorio bajo para producir neumonía.

Cuando una cepa virulenta de *S. pneumoniae* se cultiva repetidamente en el laboratorio deja de sintetizar cápsula. Estas cepas no capsuladas no son capaces de producir neumonía al ser inyectadas en animales, lo que indica la importancia de esta cápsula como factor de virulencia.

Algunas cepas de *Streptococcus pyogenes* secretan **proteína SIC** (inhibidor estreptocócico del complemento). SIC neutraliza el efecto de una serie de proteínas / péptidos antimicrobianos e interfiere con la función del sistema del complemento del huésped mediante la inactivación de los neutrófilos humanos, las α -defensinas y LL-37, los dos principales péptidos antibacterianos responsables de la eliminación de bacterias. Esta proteína SIC se asocia frecuentemente con los serotipos M1, tiene gran hipervariabilidad y es una de las razones por la que a los estreptococos con serotipo M1 se les considera los más virulentos (Inga y cols., 2002).

C5a peptidasa. El sistema del complemento tiene un papel central en la defensa inmediata contra la infección causada por *S. pyogenes*, siendo uno de los principales sistemas de defensa contra patógenos, que actúa en las primeras fases de infección. El componente C3b es la opsonina (coadyuvante de la fagocitosis) más importante y el C5a es el factor quimiotáctico responsable de estimular la migración de los neutrófilos polimorfonucleares al sitio de la infección para la fagocitosis y eliminación de la bacteria patógena en el huésped. *S. pyogenes* tiene una forma de evadir esta respuesta inmune: produciendo C5a peptidasa. La C5a peptidasa, o también denominada como SCPA (Gen *scpA*), es una enzima proteolítica que se localiza en la superficie celular de todas las cepas de *S. pyogenes* y tiene la función de escindir

de manera específica al factor C5a de su sitio de unión a los neutrófilos polimorfonucleares. De esta manera, se inhibe la función de C5a y se impide el reclutamiento de los neutrófilos al lugar de la infección y con ello se evita la fagocitosis (Lynskey et al. 2017).

Ocultación de antígenos: La proteína G de la pared de *Streptococcus pyogenes* (SPG) es un antígeno de pared celular importante, une el extremo Fc (tallo: fracción constante) de los anticuerpos, de forma que la pared bacteriana queda cubierta de anticuerpos del revés. Esto impide la opsonización de la bacteria por anticuerpos específicos (que deben unir a los antígenos de la pared por los extremos Fab) y por tanto dificulta la fagocitosis (Figura 8).

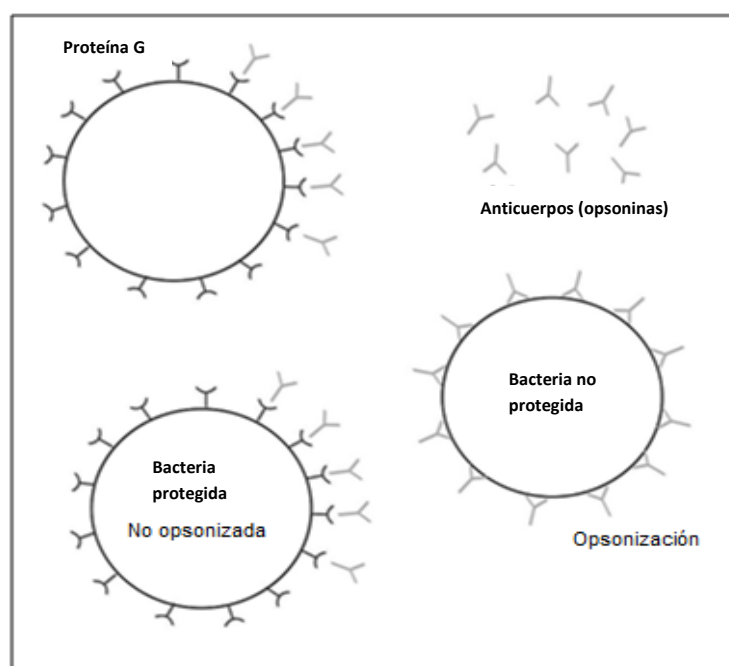


Figura 7. La proteína G de *Streptococcus pyogenes* se une al extremo Fc de los anticuerpos y tapa los antígenos de la pared, pero no los opsoniza (OCW, 2011).

Movimiento y virulencia: Entre las especies bacterianas de vida libre el movimiento es un medio de colonizar nuevos ecosistemas, acercarse a los nutrientes o huir de sustancias tóxicas. Existen varios mecanismos que proporcionan a las bacterias capacidad de moverse por ejemplo los flagelos externos, los endoflagelos, los pilis, mecanismos de deslizamiento, o colas de actina. Estos mecanismos y sus genes correspondientes aparecen en algunas bacterias tanto de vida libre como parásitas, por lo que en general no se consideran factores de virulencia. Pero en casos particulares tienen una relación muy clara con ella. Las cepas patógenas son capaces de diseminarse por el epitelio con sus pili tipo IV; otras logran introducirse entre las microvellosidades intestinales mediante un potente flagelo polar (Köller et al., 2010; Melville & Creig, 2013).

3.2.3.1 Resistencia a los antibióticos y virulencia

Adquirir genes que determinen resistencia a los antibióticos no proporciona a una bacteria más capacidad de hacer daño, pero sí le da la posibilidad de seguir reproduciéndose y por tanto expresando su virulencia en un huésped tratado con antibióticos que destruirían a las bacterias sensibles. En el caso de las patógenas oportunistas, cepas multirresistentes son casi imposibles de tratar, y en ese sentido son “más virulentas” porque ocasionan brotes infecciosos de alta mortalidad.

Las bacterias utilizadas como cultivos iniciadores para la producción de alimentos podrían contener genes de resistencia a antibióticos. En los últimos años, los estudios sobre la selección y difusión de resistencias a antibióticos se han centrado principalmente en la relevancia clínica de especies bacterianas, sin embargo, las bacterias que forman parte de la microbiota nativa de los alimentos pueden actuar como reservorios de genes que traduzcan para resistencia a antibióticos (Hummel et al., 2007; Becerril, 2011).

Existe un incremento dramático en la resistencia a antibióticos de las especies bacterianas en todo el mundo, y pone en evidencia la necesidad de una mayor comprensión de este y otros géneros, incluyendo su ecología, epidemiología y virulencia (Fischer y Phillips, 2009).

En cuanto a las consideraciones relativas a la inocuidad, tema que atañe a este trabajo, la FAO nos dice que cuando se proceda a la selección de cepas probióticas, éstas no deben contener genes transmisibles que codifiquen la resistencia a medicamentos utilizados con fines clínicos, resaltando que no pueden mostrar resistencia a la vancomicina en el momento de su inclusión en un producto. Sin embargo, corresponde al productor demostrar que una determinada cepa no puede adquirir o transferir la resistencia a la vancomicina o ser virulenta e inducir infecciones.

En el caso de las cepas de *Streptococcus* sp. aisladas del pozol, en los estudios realizados por Becerril (2011) por el método de sensidiscos, todas las cepas fueron sensibles a vancomicina. Sin embargo, aún falta complementar los resultados obtenidos con un estudio genético demostrando que estas cepas no pueden adquirir o transferir la resistencia a la vancomicina ni algún otro factor de virulencia.

3.2.3.2 Base genética y regulación de la virulencia

Los genes que codifican factores de virulencia pueden localizarse en cromosoma, plásmidos, transposones o bacteriófagos lisogénicos. Salvo algunas excepciones, las bacterias patógenas son parásitas facultativas y pueden multiplicarse en medios libres de células sin necesidad de expresar sus factores de virulencia. Sin embargo, los genes relacionados con la capacidad de invadir y multiplicarse a costa de huéspedes animales pueden dar nuevas oportunidades de supervivencia a una población bacteriana cuando su entorno es hostil, y por eso se consideran genes de contingencia. Estos genes se han transferido de unas especies a otras por medio de plásmidos, fagos o transposones y la coevolución con el propio huésped humano ha seleccionado a las cepas que los poseen. La posesión de un gen de virulencia no significa necesariamente que se exprese. A menudo varios genes de virulencia son regulados por un mismo operón y se activan o inactivan simultáneamente en las bacterias de una población en función de factores del entorno como la escasez de un nutriente o la temperatura. Es decir, que las bacterias tienen proteínas que recogen información del entorno, se comunican entre sí a través de señales (*Quorum sensing*), regulan la expresión de la virulencia como población y no como individuos (Nobbs et al., 2009; Jarva et al., 2003; Cunningham, 2000; Rocha et al., 2004).

Los genes asociados a la virulencia de *S. pyogenes* se encuentran en islas de patogenicidad. Poseen también elementos genéticos móviles, como transposones e ITS (espaciadores internos transcritos), que les permiten insertarse en ciertos sitios dentro del genoma bacteriano. Tienen un tamaño de entre 10 y 500 kpb (miles de pares de bases). Entre los genes relacionados con virulencia asociados a estas islas de patogenicidad están; adherencia, producción de toxinas, invasividad, resistencia a antibióticos y formación de biopelículas. Para colonizar y persistir con éxito dentro de una variedad de tejidos del huésped, los estreptococos patógenos han desarrollado mecanismos por los cuales pueden responder a diferentes entornos a través de cambios coordinados en sus patrones de expresión génica.

Las bacterias a menudo median tales respuestas mediante sistemas de transducción de señales de dos componentes (SDC), una familia de proteínas fosforiladas conocidas por regular una amplia variedad de procesos celulares. Además de los sistemas de dos componentes de *S. pyogenes* (SPTs por sus siglas en inglés), el GAS posee reguladores globales independientes que controlan grandes conjuntos de genes de virulencia en respuesta a estímulos temporales y ambientales (Buckley et al. 2018). Uno de ellos es *mga*, que codifica para una proteína de

unión a DNA la cual activa la expresión de genes de virulencia importantes para la colonización y evasión inmune tales como la proteína M (Figura 8).

Al analizar la secuencia completa del genoma de tres tipos de *S. pyogenes* (M1, M3 y M18) se han podido asociar con casos de fascitis necrotizante y en específico al M18 con una epidemia de la fiebre reumática aguda ocurrida en Salt Lake en el año 1980. Esta información obtenida del genoma proporcionó datos sobre sutiles diferencias genéticas entre las distintas cepas de estreptococos, que las relacionan con los diferentes síndromes.

Streptococcus pyogenes SF370 chromosome, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_002737.1

[GenBank](#) [FASTA](#)

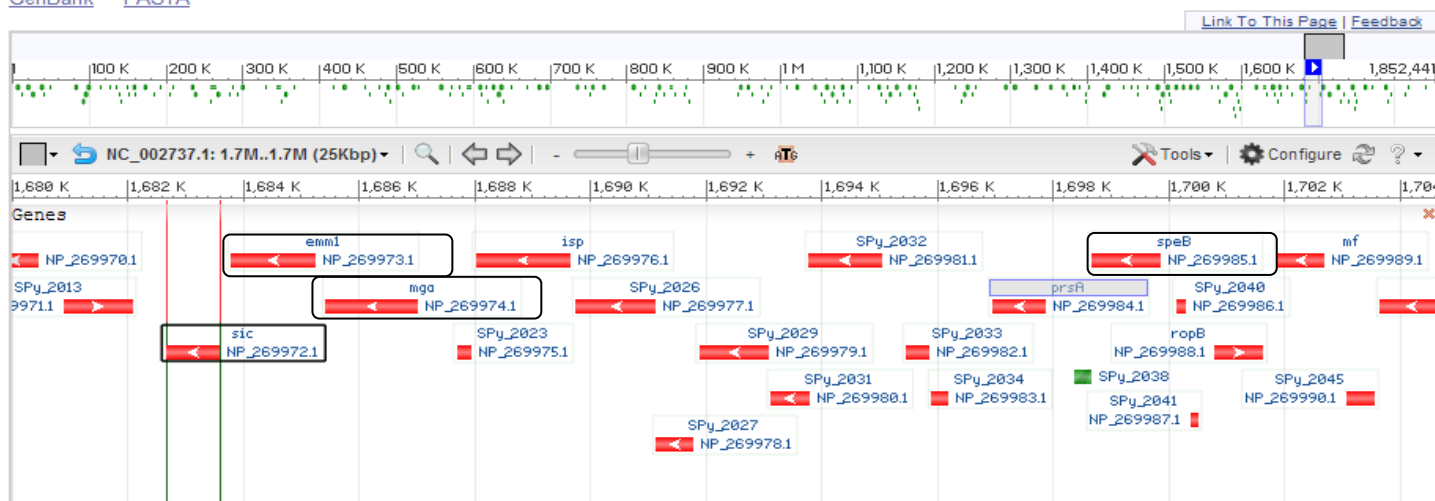


Figura 8. Sección del genoma de *S. pyogenes* tipo M1 que muestra los genes de virulencia *sic*, *emm1* y *speB*, algunos factores transponibles y la región reguladora *mga* (NCBI, 2013).

Los genomas de las tres cepas analizadas contienen genes que codifican para la proteasa cisteína SpeB, el operón que codifica para la cápsula de ácido hialurónico, y la proteína M altamente variable. Las secuencias del genoma confirmaron la observación del papel importante de los fagos en la variación genética, ya que la introducción de genes que codifican toxinas y otros asociados a la virulencia de las proteínas es a menudo a través de transducción (Bisno et al., 2003).

El gen y las variaciones del genoma: Existen indicios que sugieren que los genes que codifican los factores de virulencia (FV) varían en las distintas cepas de *S. pneumoniae*. Asimismo, esta bacteria es capaz de sufrir transformaciones e incorporar el ADN de especies relacionadas.

Por ejemplo, la variación genética que lleva a la resistencia a la penicilina se debe a la adquisición de fragmentos de genes -que codifican las proteínas fijadoras de penicilina- a partir de *S. mitis*. Este cambio reduce la afinidad de estas proteínas por el antibiótico. La comprensión de la diversidad genética es importante para entender la virulencia de las diferentes cepas de esta bacteria.

El genoma de *S. pneumoniae* comprende entre 2.0-2.2 millones de pares de bases y contiene alrededor 2000 genes, según la cepa. La heterogeneidad genética puede abarcar desde polimorfismos simples hasta la presencia o ausencia de grandes islotes genéticos que codifican los factores de virulencia (Wartha, 2008).

Las diferencias en la expresión de los genes pueden modificar el potencial patógeno de la bacteria. Por ejemplo, *S. pneumoniae* también posee 13 sistemas de transducción de señales de 2 componentes que regulan la expresión genética. Las mutaciones en uno de estos sistemas pueden atenuar la cepa TIGR4, alterar la expresión del factor de virulencia PsaA y modificar la resistencia al estrés oxidativo. La PsaA es una adhesina y forma parte de un complejo transportador de manganeso.

Estos ejemplos demuestran que las variaciones genéticas en distintos niveles pueden modificar la capacidad de producir enfermedad. Probablemente, esta capacidad sea el resultado de presiones evolutivas, como los cambios en el entorno de la bacteria en los distintos estadios de la enfermedad. Esta capacidad de adaptación también contribuye con la resistencia a los antibióticos. Un tercio del genoma de los estreptococos está compuesto por genes que codifican proteínas, cuya función se desconoce. Tampoco se conoce el papel que desempeñan estos genes en relación con la virulencia. Por este motivo, es importante continuar con el análisis de la secuencia del genoma de los estreptococos, para establecer y comparar las diferencias que se observan en las distintas cepas, ya que esto es necesario para la comprensión de la virulencia de estas bacterias (Wartha, 2008).

En trabajos recientes, Kaindi¹ *et al* (2018) estudiaron a nivel genético la relación de *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (*Sii*) y la patogenicidad que pudiera estar asociada a esta bacteria como miembro del complejo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* (SBSEC). Mediante la técnica de tipificación multilocus de secuencias (MLST) se identificaron asociaciones de algunos *Sii* con aislados de sangre humana, declarándolos como posibles patógenos humanos. También se identificaron *Sii* provenientes de muestras de

alimentos que tienen perfiles completamente separados de los patógenos, por lo que existe gran interés en seguir estudiándolos.

En una revisión de estudios de metagenómica (Jans y Boleij, 2018) se compararon los principales factores de virulencia responsables de la adhesión y colonización del hospedero para los miembros del SBSEC, en donde se analizaron datos derivados de una búsqueda en la base de datos Blast utilizando las secuencias de proteínas de los nueve genes mayormente asociados a virulencia, comparando diferentes especies de estreptococos provenientes de muestras de heces animales, rumen animal, sangre humana, heces humanas y alimentos (*S. macedonicus* y *Sii*). Para las muestras de alimentos se observó que tanto *S. macedonicus* como *Sii* poseen algunos de estos factores asociados con especies altamente virulentas de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (en específico el locus completo de un gen que codifica para un pili, *pil3*), aun así, no existe información suficiente que las declare como virulentas.

También ha sido investigada la asociación entre *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (aislada de productos lácteos africanos fermentados espontáneamente) y el adenocarcinoma colorrectal (CCR) en Kenia (Kaindi² et al, 2018) en donde se concluye que el consumo de productos tradicionales fermentados no representa un factor de riesgo, no existiendo pruebas suficientes que demuestren la asociación de *Sii* al CCR.

3.3. Seguridad Alimentaria: los probióticos.

Las reglamentaciones respecto a los probióticos difieren entre países, en la actualidad no se ha establecido a nivel internacional la situación de los probióticos como componentes de los alimentos. El nuevo paradigma del análisis de riesgos de acuerdo con los sistemas de seguridad alimentaria (evaluación de severidad contra probabilidad) se está abriendo paso en los sistemas de reglamentación de la inocuidad de los alimentos y se centra en una distinción funcional entre la evaluación de riesgos y la gestión de riesgos, basadas ambas en criterios científicos. En general están basadas en la propuesta que los expertos de la FAO/OMS (2006) han hecho en este sentido. La evaluación debe constar de:

- a) la resistencia a antibióticos, verificando la ausencia de genes de resistencia transferibles;
- b) actividades metabólicas perjudiciales (P. ej., producción de ácido D-láctico que puede producir cambios neurológicos);
- c) determinación de la producción de toxinas y capacidad hemolítica, si la cepa pertenece a una especie potencialmente productora;

- d) ausencia de infectividad en animales inmunodeprimidos, y
- e) estudios de vigilancia sobre los posibles efectos adversos de un consumo continuado.

Actualmente no existen normativas específicas que regularicen los usos probióticos de cultivos activos. En los Estados Unidos, la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA por sus siglas en inglés) ha abordado parcialmente la seguridad de los microorganismos, incluidos los probióticos, utilizados en alimentos y suplementos dietéticos en sus documentos de uso GRAS (Generalmente reconocido como seguro, por sus siglas en inglés) para un microorganismo, en donde la comisión considera aspectos generales de seguridad, por ejemplo, exposición y método de fabricación, taxonomía, patogenicidad, potencial producción de toxinas, resistencia a los antibióticos, potencial, historial de uso seguro en alimentos, informes de eventos adversos, consideraciones metabólicas, presencia ambiental y cualquier otra información considerada relevante para la evaluación de seguridad. Cuando la FDA recibe notificaciones de probióticos, estas son evaluadas caso por caso por peso de la evidencia presentada, enfoque que es particularmente relevante para los microorganismos, ya que pueden faltar sistemas de prueba modelo (estudios de alimentación utilizando los microorganismos, aunque ocasionalmente conducidos, tienden a ser técnicamente difíciles y suelen ser de dudoso valor). La viabilidad es una consideración importante, si el microorganismo es viable en el alimento y si sobrevive al tránsito por el aparato digestivo o es un residente común en el intestino; todos estos datos son componentes de una evaluación de seguridad del uso de un microorganismo probiótico en los alimentos por parte de la FDA (Mattia y Merker, 2008).

La Asociación Internacional de Probióticos (IPA, por sus siglas en inglés) publicó en el 2017 las directrices para calificar a un microorganismo como probiótico. Esta guía es aplicada a escala global, representa las prácticas actuales y los principios científicos adoptados por los fabricantes de probióticos / propietarios de cepas de todo el mundo para calificar un microorganismo que se denominará probiótico. Generalmente se requieren análisis / procedimientos adicionales para cumplir con los requisitos reglamentarios específicos dependiendo de las jurisdicciones particulares y / o el rol de la parte involucrada (por ejemplo, fabricante por contrato, distribuidor, etc.). Resalta la siguiente información a ser considerada: la taxonomía debe determinarse a nivel de género y especie, ser identificables a nivel cepa, caracterizarse, se debe documentar un historial de uso seguro y cumplir con los requisitos específicos regulatorios de cada entidad.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) lanzó la iniciativa de Presunción de Seguridad Calificada (QPS, por sus siglas en inglés), que tiene como objetivo permitir que las especies que históricamente se han utilizado como cultivos alimentarios microbianos vivos, sean seguras para el consumo humano y tener un historial establecido y un estado de seguridad para liberarse de la necesidad de una evaluación de seguridad adicional (aparte de satisfacer cualquier calificación especificada, como la evaluación de la resistencia a los antibióticos) en los procedimientos de autorización de mercado correspondientes a fuentes de alimentos / suplementos alimenticios. El concepto QPS es un enfoque acelerado para especies con un cuerpo suficiente de conocimiento histórico, por lo que se supone que todas las cepas dentro de las especies enumeradas son seguras para el consumo humano una vez que se cumplen las condiciones de calificación. La resistencia a los antibióticos se evalúa y entonces se considera aceptable (IPA, 2017). No ha sido así para nuevas cepas, ya que la EFSA tiene un enfoque estricto para nuevas solicitudes, se reporta que hasta febrero de 2019 se presentaron más de 400 solicitudes sin haber obtenido aprobación, lo que lleva a las empresas a realizar estudios que respalden mejor las declaraciones de microorganismos probióticos (ISSAP, 2019). En general se aplica la metodología de la evaluación de riesgos para el uso de cultivos lácticos “nuevos” en la producción de alimentos seguros, llevando usualmente a ser descartados ya que dicho enfoque invariablemente conduce a una regulación excesiva, e irónicamente se termina excluyendo su uso porque dichas bacterias no han sido sometidas a pruebas de seguridad exhaustivas, que incluso pueden llegar a ser excesivamente costosas para las empresas de alimentos.

4. Justificación del estudio

En México el pozol - bebida indígena preparada a partir de masa de maíz nixtamalizada y fermentada- es la fuente principal de alimentación de muchas comunidades rurales, sobre todo de la zona sureste, siendo también consumido de manera habitual en otras regiones del país como bebida nutritiva y refrescante. Desde sus orígenes se valoran su calidad nutricional, sus propiedades curativas y su importancia religiosa. En estudios previos se ha determinado que en este alimento predominan las bacterias del género *Streptococcus* (Díaz y cols., 2003). En trabajos de metaproteómica se ha confirmado el predominio de especies previamente identificadas por métodos moleculares dependientes del cultivo (Cárdenas *et al*, 2014).

El género *Streptococcus* ha sido relacionado como parte de la microbiota fermentadora de varios alimentos tradicionales, incluido el pozol, y se sabe de su importante participación en estos procesos. Este es el caso de *S. infantarius subsp infantarius* y otros miembros del complejo *Streptococcus bovis / Streptococcus equinus* (SBSEC por sus siglas en inglés), están siendo aislados cada vez con mayor frecuencia de productos tradicionales lácteos y vegetales fermentados en Europa, México y África (Jans y cols., 2011). Es importante señalar que en el género *Streptococcus* también existen microorganismos patógenos de importancia para el humano, entre ellos *Streptococcus pyogenes*, responsable de infecciones como la faringoamigdalitis, así como de procesos de tipo autoinmune como la fiebre reumática y otras cardiopatías (Kenneth y Ray, 2011). Además, estudios previos (Sainz y cols., 2001) mostraron que este alimento también puede presentar bacterias relacionadas con la etiología de la diarrea infecciosa cuando es producido bajo condiciones poco higiénicas.

Ante esto observamos que algunas cepas de estreptococos aisladas de alimentos tradicionales fermentados, no solo en México; si no en diversas partes del mundo, tienen potencial probiótico. Sigue siendo indispensable su estudio exhaustivo y comparar la relación filogenética, funcional y genómica entre aquellas de origen humano y las de origen alimenticio (alimentos tradicionales fermentados) antes de pensar en su aplicación en la producción de alimentos de consumo humano. Es necesario determinar si una cepa es capaz de causar enfermedades, distinguir las cepas patógenas de las no patógenas descartando que presenten factores relacionados con la virulencia, hasta dentro de una misma especie. Todavía es necesario establecer una metodología para poder hacerlo, todos requisitos importantes comenzar a considerar que una bacteria puede ser utilizada como microorganismo probiótico.

5. Hipótesis

Las cepas de *Streptococcus sp.* a evaluar forman parte importante de la microbiota fermentadora del pozol, que ha sido consumido desde tiempos antiguos y hasta la fecha en el sureste del país, por lo que no presentarán factores de patogenicidad.

6. Objetivos

Caracterizar a las bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol estudiando los factores de patogenicidad considerados como los más importantes del género, con la finalidad de distinguir las cepas potencialmente patógenas de las que no lo son.

Para realizar el objetivo principal del estudio, nos propusimos los siguientes objetivos particulares:

1. Establecer la actividad hemolítica, que está relacionada con el daño directo al hospedero (beta hemólisis), mediante la técnica de cultivo en agar sangre.
2. Establecer la presencia del gen *emm* que codifica para la proteína M, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
3. Establecer la presencia de los genes *sic/sof* que codifican para proteína estreptococcica inhibidora del complemento y lipoproteinasas respectivamente, mediante la técnica de PCR dual.
4. Establecer la presencia de los genes *speA/speC* que codifican para las toxinas eritrogénicas A y C respectivamente, mediante la técnica de PCR dual.
5. Evaluar la capacidad de adherencia a células en cultivo, comparándola con controles de cepas de *E. coli* y cepas patógenas de *Streptococcus*.

7. Metodología

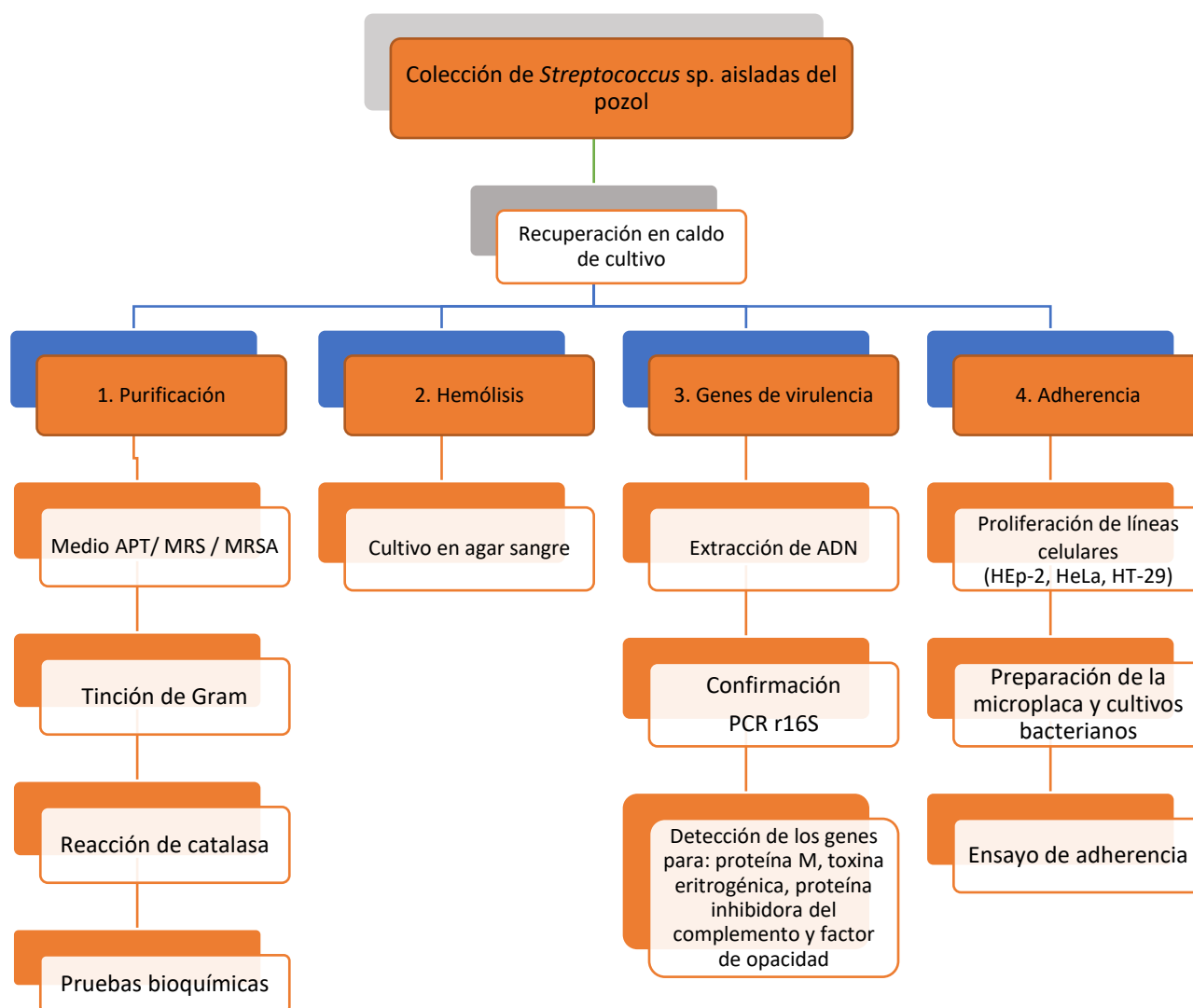


Figura 9. Diagrama general de trabajo.

8. Materiales y Métodos

8.1. Material biológico

Se estudiaron 32 cepas de *Streptococcus* sp. y la cepa de *Streptococcus infantarius* 25124, aisladas del pozol, de la colección de cultivos microbianos de la Dra. Carmen Wachter del Laboratorio 324 de Alimentos y Biotecnología del conjunto E de la Facultad de Química, UNAM. Se utilizaron las cepas de *E. coli* EPEC E2348/69 (adherencia localizada) y *E. coli* EAEC 49766 (adherencia agregativa) como controles para identificar los patrones de adherencia. Las cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC (American Type Culture Collection, por sus siglas en inglés) proporcionadas por el Dr. Carlos Eslava Campos; y *Streptococcus pyogenes* de origen clínico con clave 2774 proporcionada por el Dr. Luis Manuel Perea, ambos del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM, como comparativos de adherencia de estreptococo patógeno.

8.2. Recuperación de las cepas

Se seleccionaron las cepas de *Streptococcus* sp. a estudiar tomando como criterio el dendograma 2 resultante del análisis de ARDRA realizado por Becerril (2011) en trabajos anteriores. Este dendograma consta de cinco grupos, fue a partir de los grupos 1 y 2 de donde se tomaron las cepas de este género. Las bacterias se recuperaron en caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS, Oxoid) suplementado con almidón al 2% p/V (MRSA) incubándolas a 37 °C durante 24-48 h dependiendo del crecimiento observado. A partir las cepas de Becerril (Tabla 5a) se seleccionaron diversos aislados (Tabla 5b) que mostraron características bien definidas del género en las observaciones microscópicas, los cuales se conservaron en medio MRS líquido (Oxoid) con 20% de glicerol (J.T.Baker) a una temperatura de -70°C.

Tabla 5. Cepas de *Streptococcus* sp. seleccionadas.

a) Clave de la colección de cepas aisladas del pozol (Becerril, 2011)	b) Clave asignada a los aislados generados
KF-154	1542, 1544, 1545
KF-130	1301, 13021, 13022
KF-107	1071, 1072, 10721
KF-115	11521, 11522, 1154, 1155
MRS-A50	5011, 5012, 5013, 5020, 5021, 5023, 5031, 5032
MRS-A1	1
KF-92	921
KF-93	931
MRS-A68	6811, 6812, 682, 683
KF-84	841, 8431, 8432,
<i>S. infantarius</i> 25124	<i>S. infantarius</i> 25124

Se realizó la reactivación sembrando las cepas de *Streptococcus* sp. en caldo MRS (de ser requerido en MRSA), el cual se incubó a 30°C durante 24 h. Pasado este tiempo se resembraron en caldo MRS incubando a 37°C durante 16h. Una vez hecho esto se sembraron por estría en caja con agar MRS, se incubaron a 37°C durante 18-24 h, se tomaron varias colonias y se realizó tinción de Gram, reacción de catalasa y el test de pruebas bioquímicas utilizando el equipo Vitek2 (Biomérieux).

8.3. Actividad hemolítica

La producción de hemolisina de las cepas se evaluó sembrándolas en agar base sangre suplementado con sangre de origen bovino al 5% y en agar MRS suplementado con sangre de origen bovino al 5%, luego de una incubación a 37° C durante 24-72 horas en cámaras de anaerobiosis, con el propósito de conocer los siguientes fenotipos:

- a) Alfa hemólisis: se observa lisis parcial de células sanguíneas.
- b) Beta hemólisis: se observa lisis completa de células sanguíneas.
- c) Gamma hemólisis: no existe lisis de células sanguíneas.

La interpretación de los resultados se realizó una vez culminado el tiempo de incubación, se revisaron las placas de agar-sangre al 5%, observándose el contorno de cada colonia con el propósito de identificar tres características (INS, 2001):

- a) Un halo transparente alrededor de las colonias, que corresponde a una actividad beta hemolítica.
- b) Halo de color verde-parduzco, que corresponde a una actividad alfa hemolítica.
- c) Sin cambio alguno en la coloración roja del medio, corresponde a una gamma hemólisis.

8.4. Detección de genes asociados a la virulencia

Una vez reactivadas las cepas se extrajo el ADN de las bacterias mediante el método fenol-cloroformo (Ausbel et al. 2005), confirmando la calidad del ADN aislado mediante electroforesis en gel de agarosa y por medio de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se realizó la amplificación del gen ribosomal 16S con la finalidad de demostrar la integridad del ADN. Se utilizaron los "primers" 27f 5'(GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG)3' y 1495f 5'(CTACGGCTACCTTGTACGA)3' que fueron diseñados tomando como base el genoma de *E. coli* y sintetizados por AccesoLab S. A. de C. V., utilizando el kit Taq polimerasa "Vivantis", la mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 50 µL (Tabla 6).

La detección del producto de PCR se llevó a cabo realizando una electroforesis (90 V, 45 min) en gel de agarosa al 1.5% (Invitrogen) en buffer TBE con bromuro de etidio. Utilizando un marcador de peso molecular (Lowmass/Invitrogen) y un transiluminador de luz UV, con la ayuda del Software Kodak1D.

Tabla 6. Mezcla de reacción para la amplificación del gen 16S RNA.

Reactivo	Cantidad
Agua	33.8 μ L
Buffer 10x para PCR con MgCl ₂ 15 mM (Applied BioSystems)	5.0 μ L
Desoxirribonucleótidos (dNTPs) (Applied BioSystems)	8.0 μ L de una solución 10 mM de cada dNTPs
Primer 27f	1.0 μ L de un stock 2 mM
Primer 1495f	1.0 μ L de un stock 2 mM
DNA de la muestra	1.0 μ L
Taq polimerasa 5 U/ μ L (Applied BioSystems)	0.2 μ L

Una vez hecho esto se procedió a la amplificación de los genes objetivo.

8.4.1 Amplificación del GEN *emm* (Proteína M)

La amplificación del gen *emm* se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems Mod9700 bajo las siguientes condiciones, implementadas en el laboratorio de Biología Molecular de la Torre de Investigación de Medicina de la UNAM (Figueroa 2004). Cada ciclo de la reacción consta de 3 etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión. Antes de comenzar el ciclo de reacción se realizó una etapa inicial a 94°C/5 min. La desnaturalización se llevó a cabo a 94°C/1 min, el alineamiento a 55°C/ 1 min y las condiciones para la etapa de extensión fueron de 72°C/ 1 min. Con el objetivo de obtener la cantidad de producto de PCR necesario para el corte con enzimas de restricción, la reacción se realizó durante 30 ciclos, aplicando una fase final de extensión de 72°C/7 min para terminar disminuyendo la temperatura a 4°C para detener la reacción.

El gen *emm* (proteína M) fue amplificado utilizando los iniciadores descritos por Whatmore (1994), la secuencia de los primers utilizados para ampliar el gen son las siguientes: *emma* 5'(TATT (C/G) GCTTAGAAAATTAA)3' y *emmb* 5'(GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT)3' y el kit Taq polimerasa "Vivantis", se llevó la mezcla de reacción a un volumen final de 50 μ L (Tabla 7). El tamaño del producto de PCR puede ser variable y va desde aproximadamente 700 hasta 1660 pb.

Tabla 7. Mezcla de reacción para la amplificación del gen *emm*.

Reactivo	Cantidad
Agua	33.8 µL
Buffer 10x para PCR con MgCl ₂ 15 mM (Applied BioSystems)	5.0 µL
Desoxirribonucleótidos (dNTPs) (Applied BioSystems)	8.0 µL de una solución 10 mM de cada dNTPs
Primer <i>emmA</i>	1.0 µL de un stock 2 mM
Primer <i>emmB</i>	1.0 µL de un stock 2 mM
DNA de la muestra	1.0 µL
Taq polimerasa 5 U/µL (Applied BioSystems)	0.2 µL

8.4.2 Amplificación de los genes *speA/speC* (exotoxinas pirogénicas A y C)

Se utilizaron los primers *speA* 1 5'(ATGGAAAACAATAAAAAAGTATTG)3' y *speA* 2 5'(TACTTGGTGTAGGTAGCTTC)3', para *speC* 1 5'(ACCTATCATCAAAGTGACTCTAAGA-AAGAC)3' y *speC* 2 5'(CCCTTCATTTGGTGAGTCAAATAAGTCTAT)3' que ya han sido reportados con anterioridad por Pérez-Romano (2003), con un termociclador Applied Biosystems Mod9700, llevando la mezcla de reacción a un volumen final de 15 µL (Tabla 8).

Tabla 8. Mezcla de reacción para la amplificación de los genes *speA/speC*

Reactivo	Cantidad
Agua	7.03 µL
Buffer 10x para PCR con MgCl ₂ 15 mM (Applied BioSystems)	1.5 µL
Desoxirribonucleótidos (dNTPs) (Applied BioSystems)	3.0 µL de una solución 10 mM de cada dNTPs
<i>speA</i> 1	0.4 µL de un stock 2 mM
<i>speA</i> 2	0.4 µL de un stock 2 mM
<i>speC</i> 1	0.4 µL de un stock 2 mM
<i>speC</i> 2	0.4 µL de un stock 2 mM
DNA de la muestra	0.8 µL
Taq polimerasa 5 U/µL (Applied BioSystems)	0.07 µL

8.4.3 Amplificación de los Genes *sic* (proteína estreptococcica inhibidora del complemento) y *sof* (lipoproteinas)

Se utilizó un par de primers. Para *sic* inicio 5'(TAAGGAGAGGTCACAACTA)3' y regreso 5'(TAACGTTGCTGATGGTGTAT)3', para *sof* inicio 5'(GGTATAAACTTAGAAAGTTATCTGTAGG)3' y regreso 5'(GGCCATAACATCGGCACCTTCGTC)3', que ya han sido reportados con anterioridad por Pérez-Romano (2003), con un termociclador Applied Biosystems Mod9700, se llevó la mezcla de reacción a un volumen final de 15 µL (Tabla 9).

Tabla 9. Mezcla de reacción para la amplificación de los genes *speA/speC*

Reactivo	Cantidad
Agua	7.03 μ L
Buffer 10x para PCR con MgCl ₂ 15 mM (Applied BioSystems)	1.5 μ L
Desoxirribonucleótidos (dNTPs) (Applied BioSystems)	3.0 μ L de una solución 10 mM de cada dNTPs
sic 1	0.4 μ L de un stock 2 mM
sic 2	0.4 μ L de un stock 2 mM
sof 1	0.4 μ L de un stock 2 mM
sof 2	0.4 μ L de un stock 2 mM
DNA de la muestra	0.8 μ L
Taq polimerasa 5 U/ μ L (Applied BioSystems)	0.07 μ L

8.5 Adherencia a células epiteliales

Se utilizaron tres líneas celulares HEp-2 (carcinoma faríngeo), HeLa (carcinoma de cérvix) y HT-29 (adenocarcinoma de colon humano), las cuales han sido ampliamente utilizadas para evaluar las propiedades de células probióticas in vitro, utilizando la metodología descrita por Cravioto y cols. (1979) con ligeras modificaciones.

La prueba de adherencia consta de tres etapas:

1. Preparación de las células epiteliales y de la microplaca de células. Se propagan las células epiteliales en botellas de plástico de 72 cm² para crecimiento celular en presencia de medio mínimo esencial (MEM) (GIBCO, New York, USA) con 10% de suero fetal bovino (SFB) y con antibióticos (100 g estreptomicina/ml, ~100g penicilina/ml, 100 g anfotericina B/ml). Las botellas se incuban a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y una humedad del 85% durante 24 h hasta tener una confluencia del 100%. Una vez crecidas las células se elimina el medio y se hacen dos lavados con solución de PBS (NaCl, KCl, NaHCO₃ y EDTA) incubando por 5 min para el desprendimiento de las células. Una vez desprendidas se agregan 25 mL de MEM sin SFB ni antibióticos, pipeteando para homogeneizar.

Se prepara una placa de polipropileno de 24 pozos, colocando una lenteja (Cubreobjetos redondo, plástico o de cristal) estéril en cada uno, y se agregan 2 mL de las células propagadas en el paso anterior, dejando en incubación por 24 h a 37°C.

2. Preparación del inóculo bacteriano. Se preparan cultivos bacterianos de las cepas a probar y de los controles positivos de adherencia de *E. coli* y *S. pyogenes* con D-Manosa al 10%, incubando 18 h a 37°C (Figura 10a). El cultivo obtenido es lavado con 1 mL de PBS, ajustado a una turbidez estándar de 1 en la escala de Mac Farland (aprox. 3×10^8 bacterias/mL).

3. Ensayo de adherencia. Se agrega a los pozos, previamente lavados con PBS estéril, 900 μL de medio MEM sin suero y sin antibióticos (Figura 10b) y 100 μL del inóculo bacteriano incubando la microplaca a 37°C 3h. Posteriormente se lavan los pozos con la finalidad de eliminar las bacterias no adheridas a las células, se fija la preparación con metanol, se tiñe con colorante Giemsa y se fija en un portaobjetos (Figura 10c) para finalmente realizar las observaciones en un microscopio de luz (100x).

El ensayo de adherencia se toma como positivo si más de 10 bacterias se adhieren por célula epitelial, observándose el tipo de patrón de adherencia que presentan (Sainz et al., 2001; Mendoza, 2006).

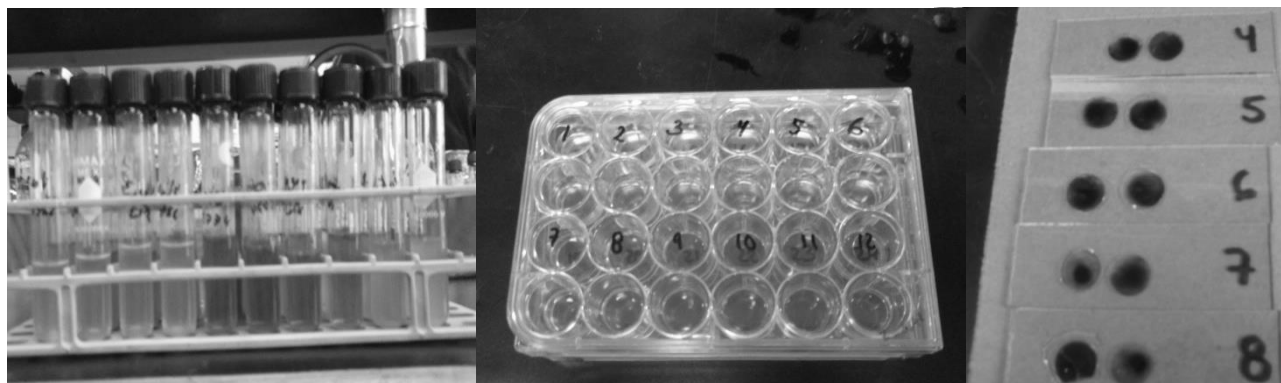


Figura 10. Etapas del ensayo de adherencia. Izquierda: Cultivos bacterianos, Centro: microplaca de células, Derecha: preparaciones celulares.

9. Resultados

9.1 Actividad hemolítica

Se realizó el ensayo de actividad hemolítica para todos los aislados, utilizando a las cepas de *Streptococcus pyogenes* como referencia. En agar sangre, después de 48-72 h de incubación, se observaron colonias muy pequeñas de las cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol apenas perceptibles a simple vista, blancas, de superficie plana y bordes lisos; solo algunas presentaron un ligero halo transparente verduzco alrededor del crecimiento (α , Figura 11a). Las colonias de *S. pyogenes* difirieron mucho de las anteriores: a las 24 h de incubación se observaron colonias de alrededor de 1 mm de diámetro, apareciendo en forma de cúpula, cremosas, color blanco-grisáceo, rodeadas de una zona de hemólisis completa (β , Figura 11b).

En la figura 11d) se presenta el resultado general de los ensayos para evaluar la actividad hemolítica de las cepas en estudio, en donde el 56% de las cepas de estreptococos del pozol son α hemolíticas; el 44% presentó resultado negativo (Figura 11c), incluyendo a *S. infantarius* 25124. Únicamente las dos cepas de *S. pyogenes* utilizadas como control presentaron β -hemólisis (Figura 11b).

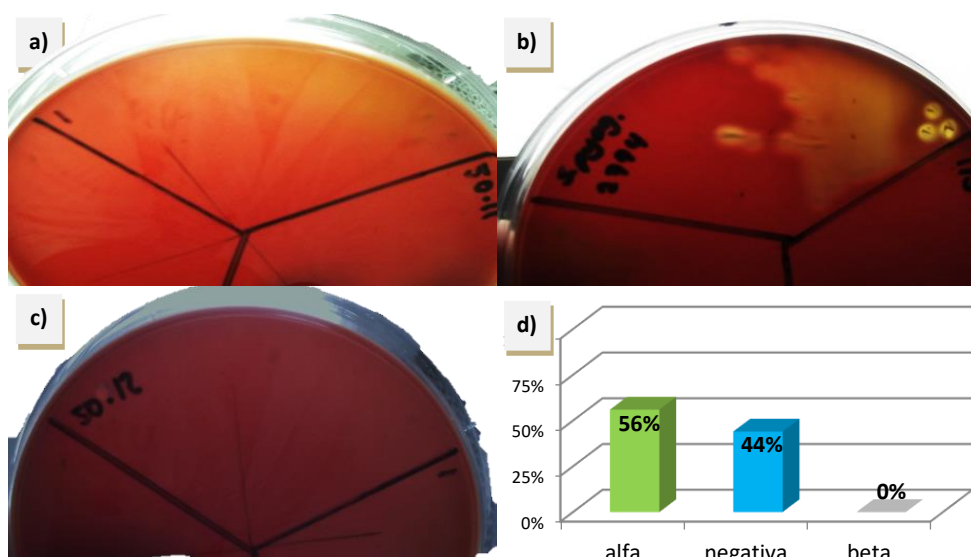


Figura 11. Tipos de hemólisis observados a) alfa, b) beta, c) gamma.
d) % Resultados de la prueba de hemólisis.

9.2 Detección de genes asociados a la virulencia

En este trabajo se evaluó si los estreptococos de interés portan genes relacionados con la virulencia del género, más específicamente de los estreptococos del grupo A (GAS, por sus siglas en inglés). Se analizó en las 33 cepas la presencia de los genes *emm* (Proteína M) *speA* y *speC* (Exotoxinas pirogénicas A y C), *sof* (Lipoproteínasa) y *sic* (Proteína estreptocócica inhibidora del complemento).

En ninguna de las cepas aisladas del pozol se encontraron los amplificadores correspondientes a la proteína M, solamente se obtuvieron los amplicones del tamaño esperado para los controles que corresponden a cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico 2526 y 2527 (~1200 pb), y de los controles *S. pyogenes* 2774 y *S. pyogenes* ATCC (~1400 pb) (Figura 12a).

De la misma manera, en cuanto a los genes de las exotoxinas pirogénicas, solamente se obtuvieron los amplicones del tamaño esperado para los controles que corresponden a cepas de *S. pyogenes* de origen clínico con claves 2527 (*speA*+) y 2528 (*speC*+) (Figura 12b).

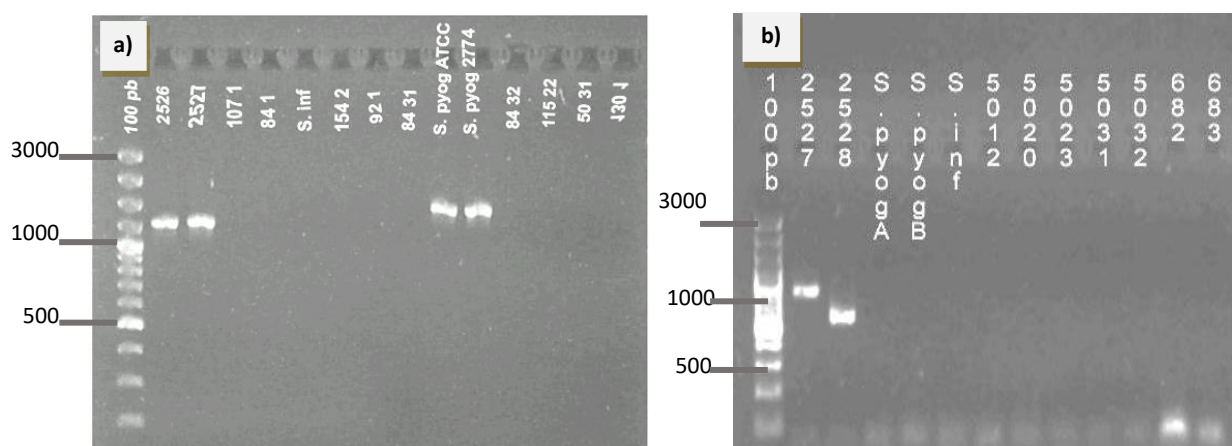


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa (85 V, 30 min) al 1.5% de los productos de PCR de los genes en estudio. a) Gen *emm* (Proteína M); b) Genes *speA* y *speC* (Exotoxinas pirogénicas), en algunas cepas de *Streptococcus* del pozol y controles de *S. pyogenes* de origen clínico.

En el caso de los ensayos para los genes *sic/sof*, una de las cepas de *Streptococcus* sp. aislada del pozol con clave 1 amplificó para el gen *sic*, obteniéndose los mismos resultados en las diferentes repeticiones. En el caso del gen *sof*, la cepa con clave 5031 presentó una banda que se encuentra por debajo de la del control positivo, esto no necesariamente implica que contenga el gen activo; sin embargo, se requieren análisis posteriores como una secuenciación

para asegurar que no se trate de un fragmento del gen de virulencia o alguna variación de este. El resto de las cepas en estudio no presentó ninguno de estos genes de virulencia. En cambio, sí se observaron las bandas correspondientes a los controles de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico 2765 (*sof*+), 2746 (*sic*+) y 2756 (*sof*-/*sic*-) (Figura 13).

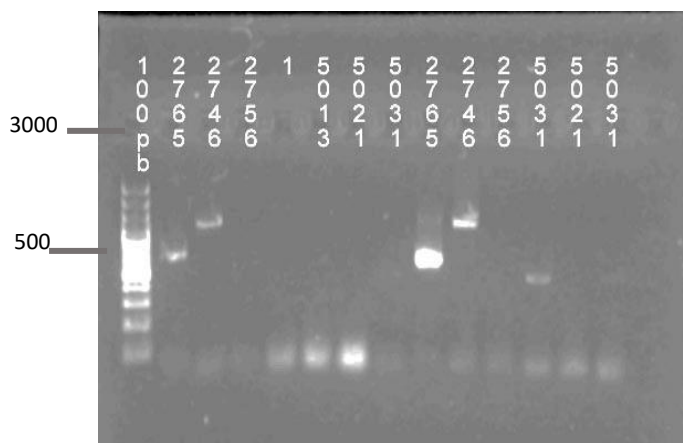


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa (85 V, 30 min) al 1.5% de los productos de PCR de los genes *sic/sof* en algunas cepas de *Streptococcus* del pozol y controles de *S. pyogenes* de origen clínico.

9.3 Adherencia a células epiteliales

Para este ensayo se evaluó la capacidad de adherencia de las cepas de *Streptococcus* sp. a tres líneas celulares: HEp-2 (Carcinoma faríngeo), HeLa (Carcinoma de cérvix) y HT-29 (Adenocarcinoma de colon humano), teniendo como controles de adherencia las cepas de *E. coli* EPEC E2348/69 (Adherencia localizada), *E. coli* EAEC 49766 (Adherencia agregativa), y las cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC y 2774 como controles de adherencia de estreptococo patógeno (Figura 14). Se utilizaron las líneas celulares sin cultivo bacteriano como control negativo (Cravioto y cols. 1979, Sainz et al. 2001; Mendoza 2006).

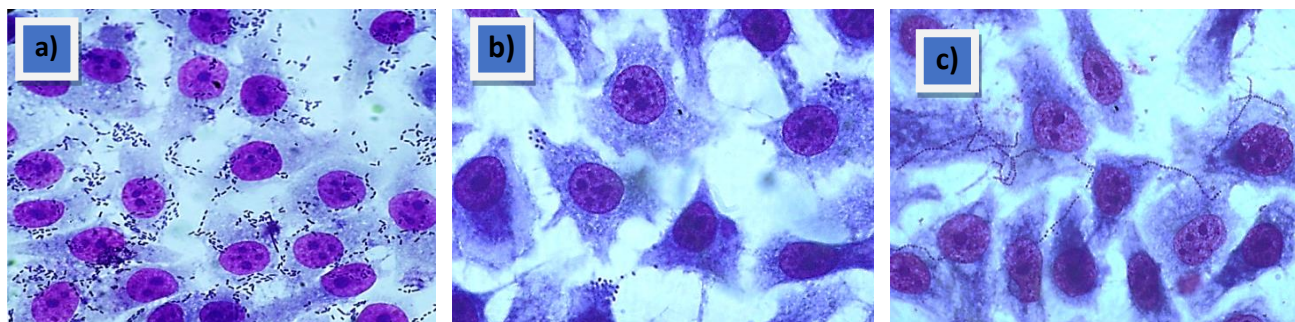


Figura 14. Patrones de adherencia de las cepas control en células hep-2: a) Adherencia agregativa de *E. coli* 49766, b) Adherencia localizada de *E. coli* EPEC, c) Adherencia de *S. pyogenes* de origen clínico.

De las 33 cepas analizadas, 32 (97%) fueron adherentes a células HEp-2, 28 (85%) a células HeLa y 29 (88%) a células HT-29. Todas las cepas (100%) fueron adherentes a por lo menos una línea celular. Un análisis más detallado mostró que 24 (72%) de las cepas de *Streptococcus* sp. resultaron adherentes a las tres líneas celulares, 6 (18%) a dos líneas celulares y 2 (6%) de ellas únicamente fueron adherentes a una línea celular (6811 y 1155); todas en mayor o menor cantidad de bacterias adheridas por célula (Figura 15).

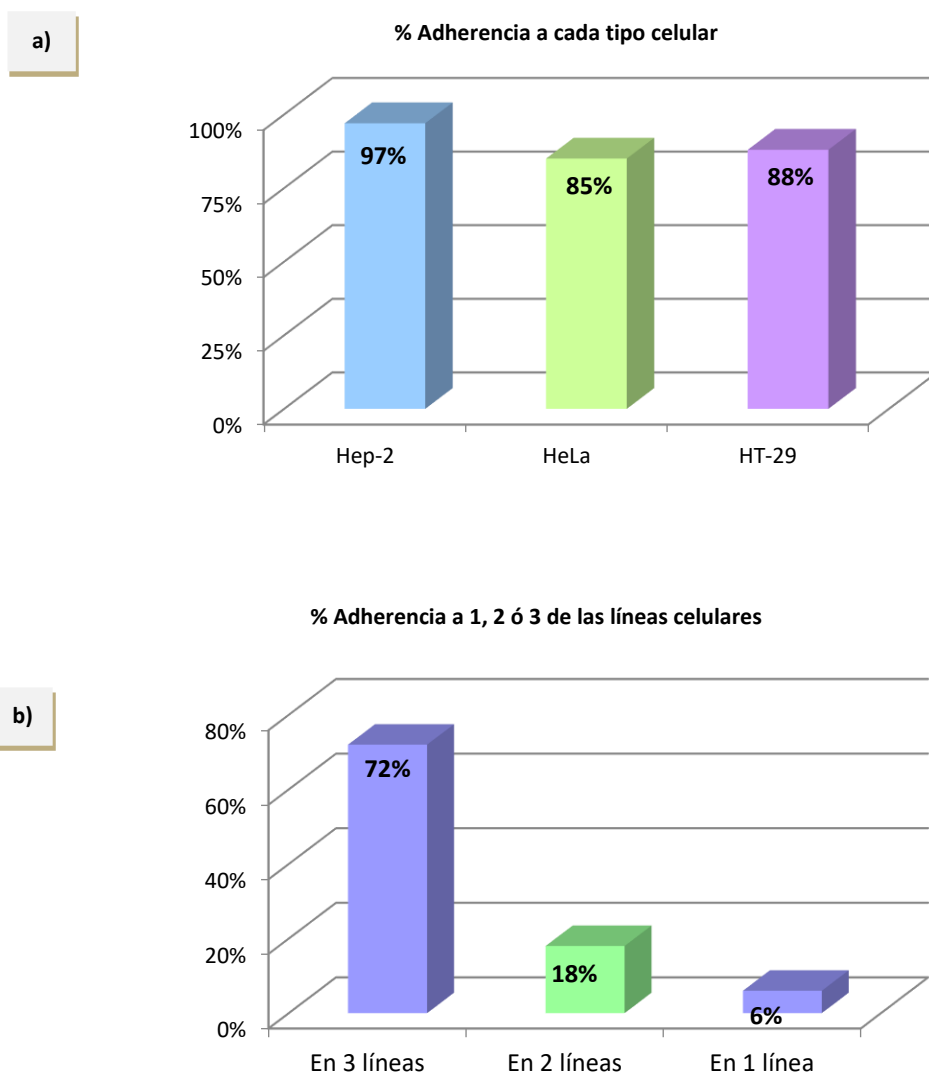


Figura 15. Observaciones de Adherencia. a) Porcentaje de cepas (Dentro de las cepas aisladas del pozol) que presentaron adherencia en cada línea celular Hep-2, HeLa y HT-29. b) Porcentaje de adherentes en 1, 2 ó 3 de las líneas celulares.

En la tabla 10 se muestra con signo (+) a las cepas que presentaron adherencia con 10 bacterias por célula, ~30 bacterias por célula (++) y más de 30 bacterias por célula (+++). Las cepas 5023, 11521 y 13022 mostraron adherencia a las tres líneas celulares. Se observó que los estreptococos del pozol se adhieren en mayores cantidades a las células HEp-2. En las preparaciones con células HT-29 también se visualizaron un gran número de bacterias adheridas en las preparaciones, sin embargo; las bacterias se encontraban adheridas mayoritariamente sobre la superficie de la lenteja, razón por la cual se tomaron en cuenta únicamente las bacterias adheridas a las células.

Tabla 10. Adherencia a diferentes líneas celulares de los estreptococos aislados del pozol.

Clave	Línea celular	HEp-2	HeLa	HT-29
<i>S. infantarius</i> 25124		+++	+	++
1		+	+	+ ^a
50 11		+	++	++ ^a
50 12		+	+	++ ^a
50 13		++	+	++ ^a
50 20		+++	+++	+ ^a
50 21		++	++	+ ^a
50 23		++	++	++ ^a
50 31		+++	++	++ ^a
50 32		+	+	++ ^a
68 11		+++	-	-
68 12		+	++	-
68 2		++	+	++ ^a
68 3		++	NR	NR
84 1		++	-	++ ^a
84 31		++	+	+++ ^a
84 32		+	++	+
92 1		+++	+	++
93 1		+++	++	+
107 1		-	++	+
1072		++	++	+
107 21		++	++	+
115 21		++	++	++
115 22		+++	++	+
115 4		+	+	-
115 5		++	-	-
130 1		+	+	++
130 21		++	++	++
130 22		++	-	++
154 2		+++	+	++
154 4		+++	-	++
154 5		+	+++	++

(-) negativo, (^a) adherencia mayoritariamente a la superficie de la lenteja, (NR) no realizado, ++ cepas positivas adheridas en ~igual cantidad en las 3 líneas celulares

Se identificaron distintos perfiles de adherencia, con y sin formación de cadenas (Figura 16 y tabla 11) los cuales son parecidos a los descritos para *E. coli*:

- *Streptococcus* similar a adherencia difusa (SSDA) que se comparó con el patrón de adherencia difusa de *E. coli* (DAEC)
- *Streptococcus* similar a adherencia agregativa (SSAA) que se comparó con el patrón de adherencia agregativa de *E. coli* (EAEC).
- *Streptococcus* similar a adherencia localizada (SSLA) que se comparó con el patrón de adherencia localizada de *E. coli* (EPEC).

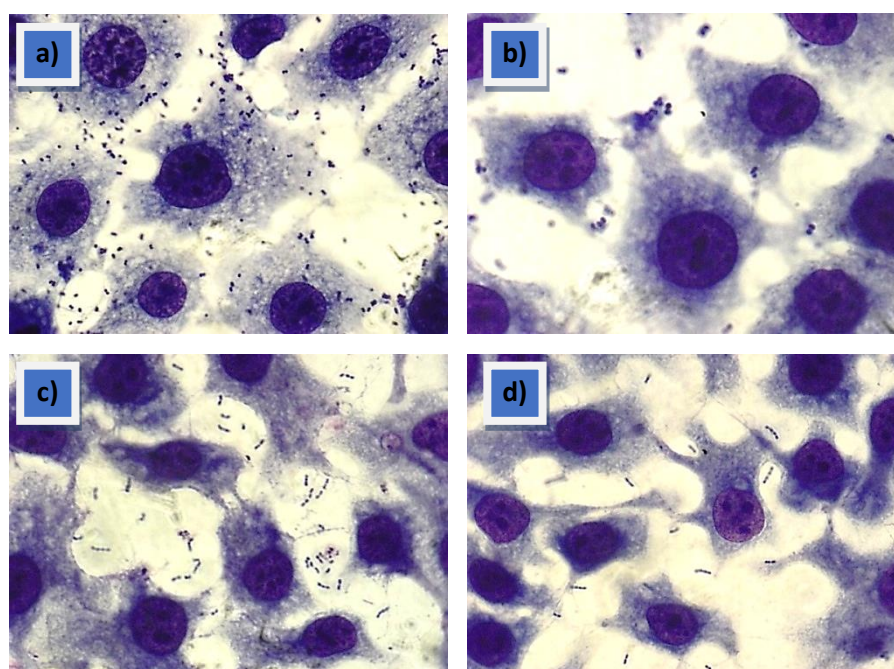


Figura 16. Diferentes fenotipos de adherencia observados en los estreptococos provenientes del pozol.
a) SSDA, b) SSLA, c) SSAA, d) SSDA con formación de cadenas.

Los fenotipos de adherencia difusa corresponden a bacterias adheridas sobre toda la superficie de la célula (Figura 16a, 16d), agregativa en donde las bacterias se encuentran alrededor de la célula y apilándose unas con otras asemejando a ladrillos (Figura 16c) y localizada aquella en donde las bacterias forman grupos de microcolonias en uno o varios puntos de la célula (Figura 16b). Las bacterias podían o no estar formando cadenas. La mayoría de los patrones de adherencia observados (63%) corresponden al fenotipo difuso, de ese 63% el 95% se encontraban formando cadenas (esta última muy variada ya que las bacterias se encontraban formando cadenas cortas a largas) y el 5% restante corresponden a un patrón difuso sin formación de cadenas (*S. infantarius* 25124 adherido a HEp-2, 10721 adherido a HeLa y 11521 adherida a HT-29).

El 15% del total de los fenotipos observados correspondía al patrón agregativo, y en menor cantidad (11%) se observaron patrones de adherencia localizada. Lo descrito anteriormente se muestra en la Figura 17, así como la frecuencia de patrones encontrados con respecto a cada línea celular.

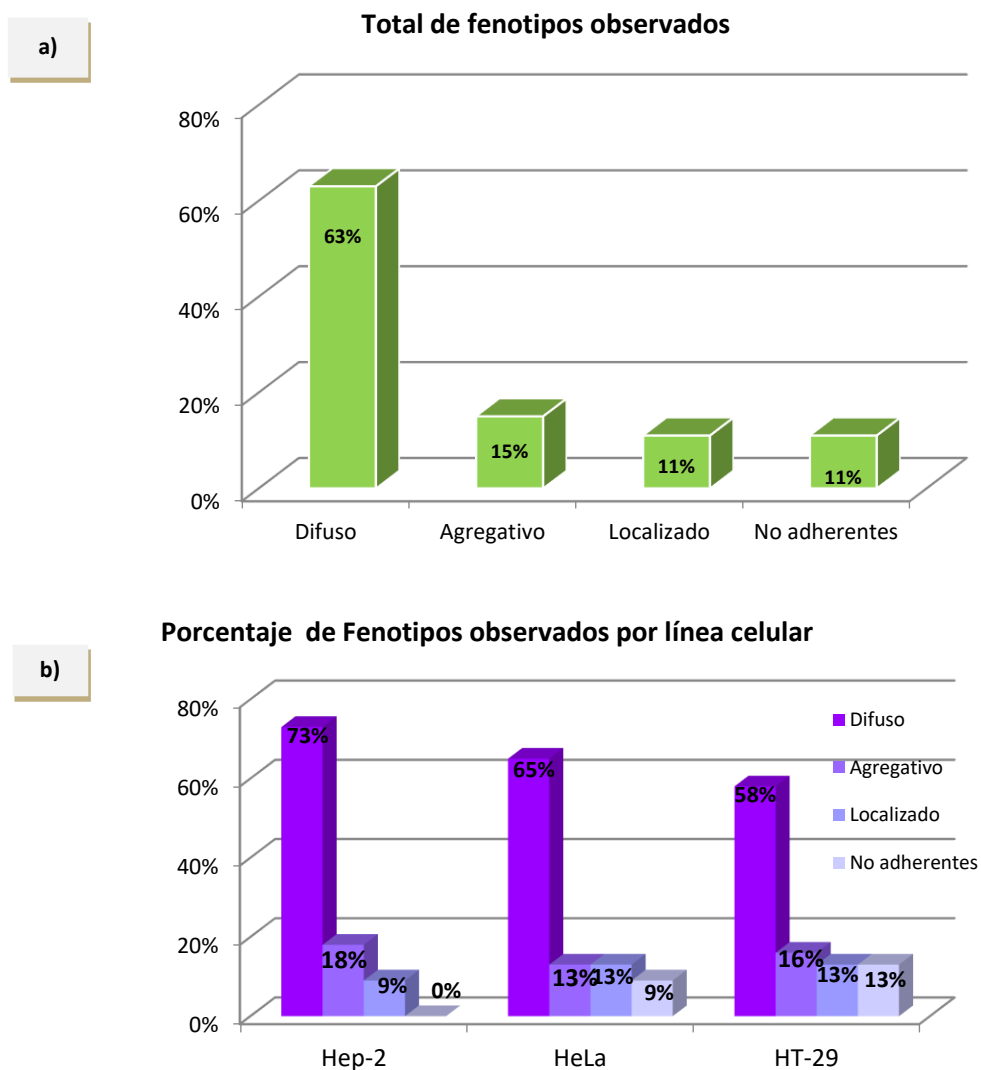


Figura 17. Fenotipos observados en el ensayo de adherencia a líneas celulares. a) % Total de fenotipos observados en todas las líneas de células, b) % Fenotipos observados por cada línea celular.

Al realizar la comparación de las características fenotípicas observadas para *S. pyogenes* en los ensayos de adherencia, contra los *Streptococcus* sp. aislados del pozol, existen diferencias resaltables en cuanto a tamaño de las bacterias (*S. pyogenes* son muy pequeños), en cuanto a la longitud y distribución de las cadenas que *S. pyogenes* forma (Cadenas muy largas y se encuentran super enrolladas alrededor de las células epiteliales) y es notable que las células sufren daño causado por la bacteria patógena *S. pyogenes* (Figura 18).

Tabla 11. Fenotipo de adherencia de los estreptococos aislados del pozol a las distintas líneas celulares.

Clave	Línea celular	HEp-2	HeLa	HT-29
		Patrón de adherencia observado		
<i>S. infantarius</i> 25124		difusa	difusa ^c	difusa ^c
1		difusa ^c	difusa ^c	difusa ^c
50 11		difusa ^c	agregativa	difusa ^c
50 12		difusa ^c	difusa ^c	difusa ^c
50 13		difusa ^c	agregativa	difusa ^c
50 20		agregativa	difusa ^c	difusa ^c
50 21		difusa ^c	difusa ^c	difusa ^c
50 23		difusa ^c	difusa ^c	difusa ^c
50 31		difusa ^c	difusa ^c	difusa ^c
50 32		difusa ^c	difusa ^c	difusa ^c
68 11		difusa ^c	-	-
68 12		difusa ^c	difusa ^c	-
68 2		difusa ^c	difusa ^c	difusa ^c
68 3		difusa ^c	NR	NR
84 1		agregativa	-	difusa ^c
84 31		difusa ^c	difusa ^c	difusa ^c
84 32		agregativa	agregativa	difusa ^c
92 1		difusa ^c	-	difusa ^c
93 1		difusa ^c	difusa ^c	difusa ^c
107 1		-	localizada	difusa ^c
1072		agregativa	difusa ^c	localizada
107 21		agregativa	difusa	localizada
115 21		localizada	localizada	difusa
115 22		difusa	localizada	localizada
115 4		localizada ^c	localizada	-
115 5		localizada ^c	-	-
130 1		difusa ^c	difusa ^c	agregativa
130 21		difusa ^c	difusa ^c	agregativa
130 22		difusa ^c	-	localizada ^c
154 2		difusa ^c	difusa ^c	agregativa
154 4		agregativa	-	agregativa
154 5		difusa ^c	difusa ^c	agregativa

(-) negativo, (c) formando cadenas, (NR) no realizado

(●) patrón similar en las 3 líneas celulares

(●,●) patrón similar en dos líneas celulares

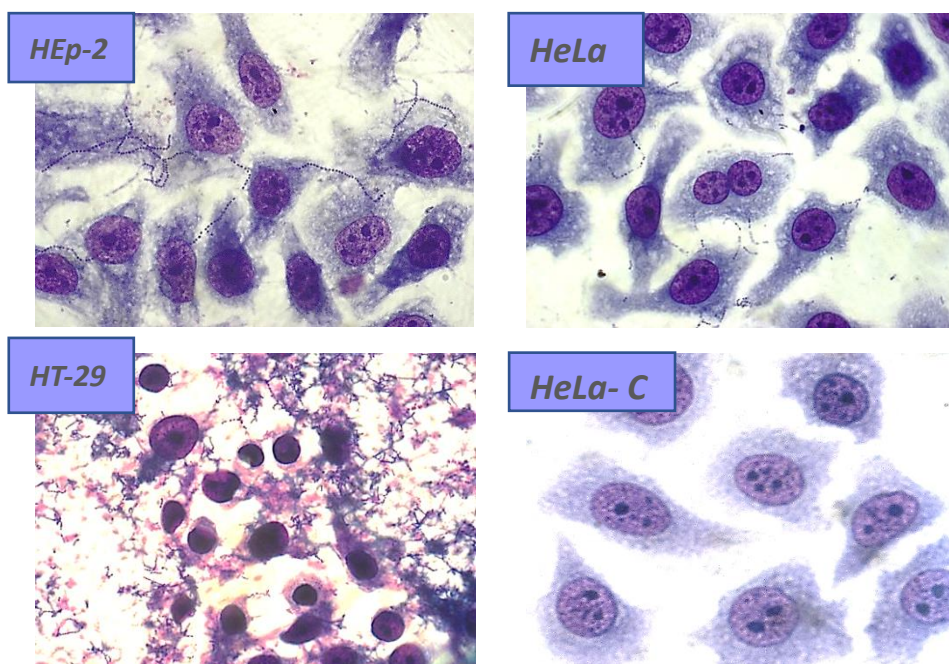


Figura 18. Adherencia de *Streptococcus pyogenes* en las diferentes líneas celulares. Se muestra un control negativo para comparación (HeLa-C). Las preparaciones se observaron con un microscopio de luz a un aumento de 100x.

A continuación, se muestran algunos ejemplos de las características fenotípicas observadas en los patrones de adherencia de *Streptococcus* sp. aislados del pozol, para los ensayos de adherencia a células epiteliales.

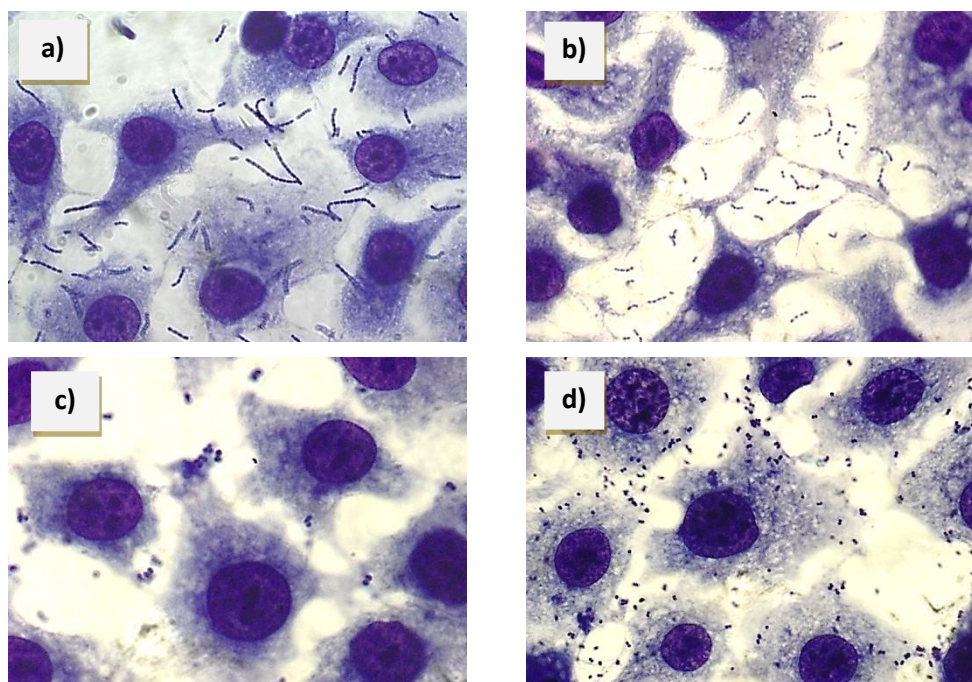


Figura 19. Ensayos de adherencia en células HEp-2. a) Adherencia agregativa de *Streptococcus* sp. (5020). b) Adherencia difusa de *Streptococcus* sp. (10721). c) Adherencia localizada de *Streptococcus* sp. (11521). d) Adherencia difusa de *Streptococcus* sp. (11522). Las preparaciones se observaron con un microscopio de luz a un aumento de 100x.

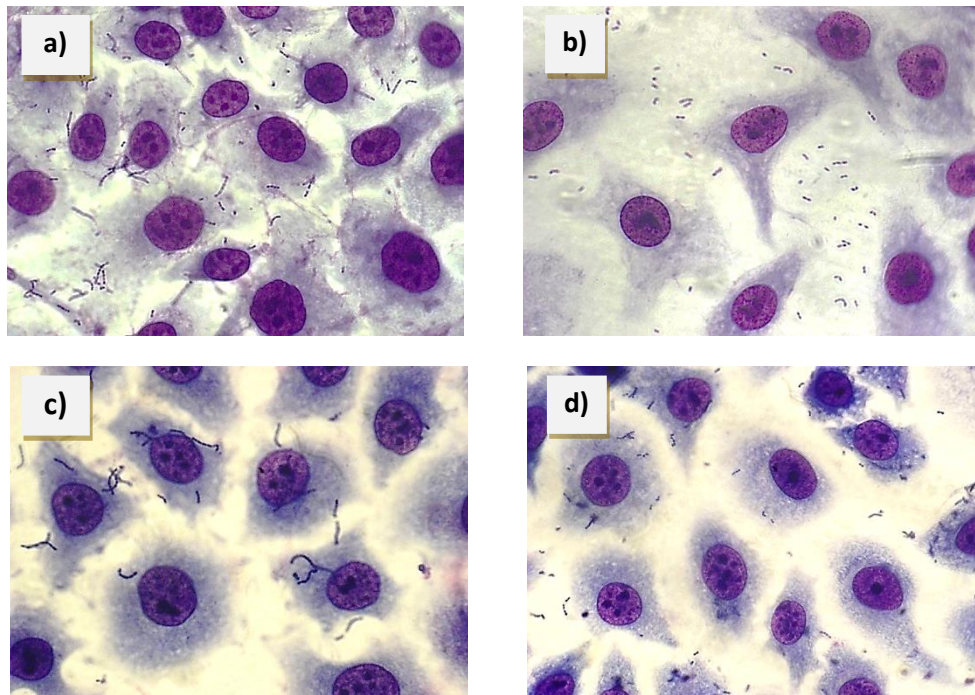


Figura 20. Ensayos de adherencia en células HeLa. a) Adherencia agregativa de *Streptococcus* sp. (8432), b) Adherencia agregativa de *Streptococcus* sp. (6812), c) Adherencia difusa de *Streptococcus* sp. (5031), d) Adherencia difusa de *Streptococcus* sp. (5021). Las preparaciones se observaron con un microscopio de luz a un aumento de 100x.

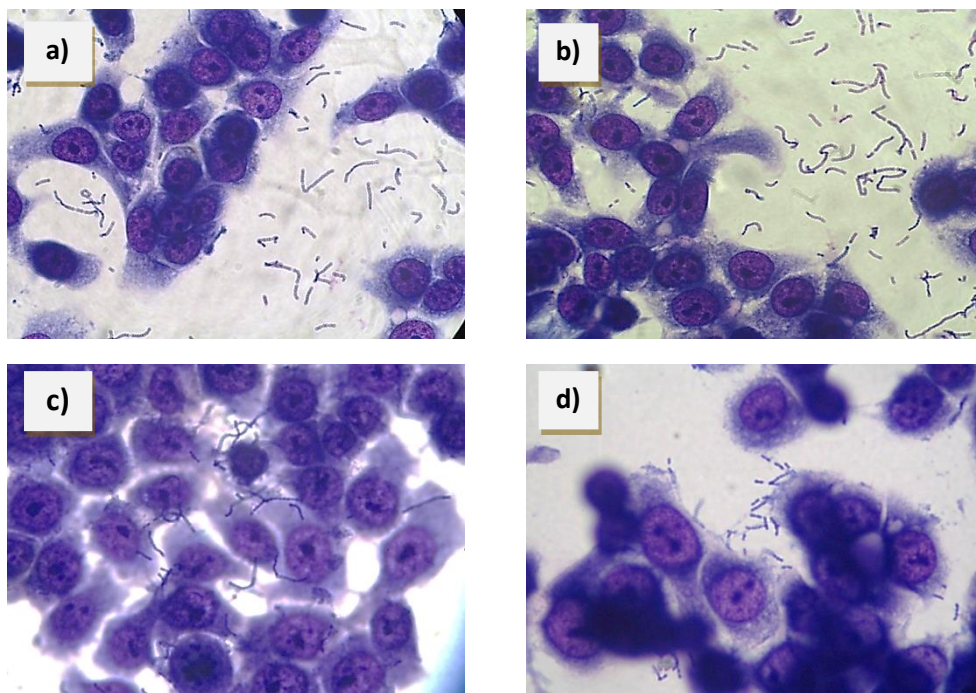


Figura 21. Ensayos de adherencia en células HT-29. a) Adherencia difusa de *Streptococcus* sp. (5013), b) y c) Adherencia difusa de *Streptococcus* sp. (5021), d) Adherencia localizada de *Streptococcus* sp. (13022). Las preparaciones se observaron con un microscopio de luz a un aumento de 100x.

Tabla 12. Resultados generales de la caracterización de cepas de *Streptococcus* sp. aisladas del pozol, con potencial probiótico.

Cepas	Hemólisis	Gen <i>emm</i>	Gen <i>speA</i>	Gen <i>speC</i>	Gen <i>sic</i>	Gen <i>sof</i>	HEp-2	HeLa	HT-29
<i>S. pyogenes</i> control clínico	β	+					difusa ⁺⁺⁺	difusa ⁺⁺	difusa ⁺⁺
<i>S. infantarius</i> 25124	α	-	-	-	-	-	difusa ⁺	difusa ⁺	difusa ^{c++}
1	α	-	-	-	+	-	difusa ⁺	difusa ⁺	difusa ⁺
50 11	α	-	-	-	-	-	difusa ⁺	agregativa ⁺⁺	difusa ⁺⁺
50 12	γ	-	-	-	-	-	difusa ⁺	difusa ⁺	difusa ⁺⁺
50 13	γ	-	-	-	-	-	agregativa ⁺⁺	agregativa ⁺⁺	difusa ⁺⁺
50 20	γ	-	-	-	-	-	difusa ⁺⁺⁺	difusa ⁺⁺⁺	difusa ⁺
50 21	α	-	-	-	-	-	difusa ⁺⁺	difusa ⁺⁺	difusa ⁺
50 23	γ	-	-	-	-	-	difusa ⁺⁺	difusa ⁺⁺	difusa ⁺⁺
50 31	γ	-	-	-	-	+	difusa ⁺⁺⁺	difusa ⁺⁺	difusa ⁺⁺
50 32	α	-	-	-	-	-	difusa ⁺	difusa ⁺	difusa ⁺⁺
68 11	α	-	-	-	-	-	difusa ⁺⁺⁺	-	-
68 12	α	-	-	-	-	-	difusa ⁺	difusa ⁺⁺	-
68 2	α	-	-	-	-	-	difusa ⁺⁺	difusa ⁺	difusa ⁺⁺
68 3	γ	-	-	-	-	-	difusa ⁺⁺	NR	NR
84 1	α	-	-	-	-	-	agregativa ⁺⁺	agregativa ⁺⁺	difusa ⁺⁺
84 31	γ	-	-	-	-	-	difusa ⁺⁺⁺	difusa ^c	difusa ⁺⁺⁺
84 32	γ	-	-	-	-	-	agregativa ⁺⁺	agregativa ⁺⁺	difusa ⁺
92 1	γ	-	-	-	-	-	difusa ⁺	-	difusa ^{c++}
93 1	γ	-	-	-	-	-	difusa ⁺⁺	difusa ^c	difusa ⁺
107 1	α	-	-	-	-	-	-	localizada ⁺⁺	difusa ⁺
10721	α	-	-	-	-	-	agregativa ⁺⁺	difusa ⁺⁺	localizada ⁺
107 2	α	-	-	-	-	-	agregativa ⁺⁺	difusa ⁺⁺	localizada ⁺
115 21	α	-	-	-	-	-	localizada ⁺⁺	localizada ⁺⁺	difusa ⁺⁺
115 22	α	-	-	-	-	-	difusa ⁺⁺	localizada ⁺⁺	localizada ⁺
115 4	γ	-	-	-	-	-	localizada ⁺⁺⁺	localizada ⁺	-
115 5	γ	-	-	-	-	-	localizada ⁺	-	-
130 1	γ	-	-	-	-	-	difusa ⁺	difusa ⁺	agregativa ⁺⁺
130 21	α	-	-	-	-	-	difusa ⁺	difusa ⁺⁺	agregativa ⁺⁺
130 22	α	-	-	-	-	-	difusa ⁺⁺	-	localizada ⁺⁺
154 2	α	-	-	-	-	-	difusa ⁺⁺	difusa ⁺	agregativa ⁺⁺
154 4	γ	-	-	-	-	-	agregativa ⁺⁺⁺	-	agregativa ⁺⁺
1545	γ	-	-	-	-	-	difusa ⁺⁺⁺	difusa ⁺⁺⁺	agregativa ⁺⁺

NR: no realizado, (-) negativo, (+) positivo ~ 10 bacterias por célula, (++) ~30 bacterias por célula, (+++) más de 30 bacterias por célula

10. Discusión

10.1 Actividad hemolítica

Evaluar la actividad de hemolisina es de especial interés en el ámbito clínico y es un ensayo ampliamente utilizado como apoyo diagnóstico. La estreptolisina O, producida por el estreptococo β -hemolítico del grupo A, y por algunas cepas de los grupos C y G, además de su efecto lítico sobre los eritrocitos es tóxica sobre una variedad de células y fracciones celulares, incluyendo leucocitos polimorfonucleares, plaquetas y lisosomas. Tiene características antigénicas, es inactivada por el oxígeno y es de gran relevancia el que los estreptococos aislados del pozol no presenten esta característica, que es muy particular de las bacterias que causan infecciones humanas.

La estreptolisina S no es antigénica. Tiene la capacidad de dañar la membrana de leucocitos, plaquetas y organelos subcelulares. No es inactivada por el oxígeno, pero es termolábil y es sabido que el estreptococo alfa hemolítico protege de la invasión por el estreptococo β -hemolítico del tipo A (Kosky, 2009; Rivera, 1998). Es importante señalar que *S. pneumoniae* y el grupo *viridans* son cocos alfa-hemolíticos.

Ninguna de las cepas de estreptococos del pozol presentó beta hemólisis, sin embargo; poco más de la mitad (56%) son α hemolíticas (Figura 11) por lo que no se debe pasar por alto este dato hasta que pueda compararse con el resto de los factores estudiados; o se lleve a cabo su tipificación para asegurar que no resultan dañinas el hospedero. Lo anterior tomando en cuenta que la mayoría de los estreptococos orales no presentan hemólisis (Perea-Mejía 2003).

10.2 Genes asociados a la virulencia

El género *Streptococcus* sp., además de incluir especies relativamente inocuas y especies icónicas relacionadas con alimentos de alto consumo y con alimentos tradicionales, incluye también a especies con factores de patogenicidad muy diversos, entre estas, dos de los microorganismos patógenos más importantes para el ser humano según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Asokan 2019). Uno de ellos es *S. pyogenes* del grupo A que causa faringoamigdalitis estreptocócica que puede producir fiebre reumática y cardiopatía; *el*

otro *S. pneumoniae* que es la causa principal de la neumonía y meningitis en personas de todas las edades (Kenneth, 2011; Romero, 2007).

Para que un microorganismo produzca una enfermedad, es necesario que posea factores de virulencia que le permitan adherirse a las células del hospedero, para dar paso a la colonización produciendo daño y así poder invadir los tejidos y diseminarse a través de ellos, o evitar la acción defensiva del sistema inmune. En el caso de *S. pyogenes*, existen moléculas secretadas y asociadas a superficie celular que son esenciales en la colonización de los tejidos del hospedero y la subversión de la respuesta inmune: adhesinas e invasinas, tales como la proteína M (*emm*) y el factor de opacidad del suero (*sof*); factores de evasión inmune, tales como proteína M y proteínas de unión a Ig tipo M (*emm*, *mrp*, *arp* y *enn*), peptidasa C5a (*scpA*) y el inhibidor del complemento (*sic*). Otros factores involucrados en la interacción célula-huesped, destrucción local de tejidos, propagación y persistencia intracelular como las proteasas (SpeB) y los superantígenos (SpeA) (Kreikemeyer *et al*, 2003).

En este trabajo se estudió si los estreptococos aislados del pozol poseen factores de virulencia característicos del género, en particular de aquellos descritos para *Streptococcus pyogenes*, microorganismo patógeno de gran importancia para el ser humano ya que los estreptococos del Grupo A (SGA) continúan siendo una de las mayores causas de enfermedad infecciosa relacionada con morbilidad y mortalidad en todo el mundo.

Se determinó si la proteína M, las exotoxinas pirogénicas y algunos otros, como la lipoproteinasa estaban presentes en las cepas estudiadas. Bajo Las condiciones probadas, los resultados obtenidos mostraron la ausencia del gen *emm* en el total de las 32 cepas en estudio. Este es un dato importante debido a que se ha reportado la transferencia horizontal de genes en este género, y existía la posibilidad de que los estreptococos en estudio hubieran recibido genes por esta vía, lo cual para este caso ha quedado descartado.

Sin embargo, se detectó la presencia del gen *sic* (que codifica para la proteína estreptocócica inhibidora del complemento) en una de las 32 cepas (Identificada con la clave 1). El gen *sof*, que codifica para la lipoproteinasa, también fue detectado en una de las cepas (con clave 5031). Esta enzima es característica de los estreptococos del grupo A tipo M aislados en infecciones de la piel. La lipoproteinasa está ampliamente relacionada con la proteína M, es antigénica y es útil para identificar a los estreptococos (Negroni, 2009).

Lo anterior lleva a formular la pregunta ¿Significaría un riesgo para la salud del hospedero que alguna de estas bacterias portadoras del gen *sic/sof* sea consumida en el alimento? En principio, por la simple posibilidad de poseer un gen virulento dicha bacteria ya no puede ser considerada para su uso en alimentos.

Pueden ser muchas las posibilidades respecto a las consecuencias de poseer el gen. Por mencionar que continúe la transferencia horizontal del gen hacia otros microorganismos dentro del hospedero, otra posibilidad es que el gen esté activo, lo cual, aunque no estuviera ligado a una proteína dañina, ya significa un bloqueo directo a la inmunidad innata del hospedero.

Estos resultados tienen gran relevancia ya que los genes detectados generalmente están asociados con las cepas de importancia clínica: Inzunza y cols. (2004) han reportado estudios sobre la prevalencia de los genes *speA*, *speC*, *sof*, *prtF* y *sic* asociados con cepas de *Streptococcus pyogenes* virulentas que poseen la proteína M, siendo de mayor importancia clínica aquellas del serotipo M1 y M12.

La presencia de los genes *speA* y *sic* está asociada con aislamientos clínicos del tipo M1, también se reporta que existe una estrecha relación entre la presencia del gen *sof* con los tipos M1.

El que estas dos cepas (1 y 5031) hayan presentado alguno de estos genes nos dice que no pueden ser propuestas como potenciales probióticos, aún a pesar de no poseer el gen que codifica para la proteína M, además de que aún debe confirmarse por secuenciación.

Las preguntas: ¿Estos genes están siendo expresados? ¿Son funcionales? ¿La transferencia horizontal de genes entre cepas patógenas y la microbiota natural de los alimentos es más frecuente de lo que pensábamos? tendrán que responderse posteriormente.

La detección de genes asociados a virulencia en microorganismos aislados de alimentos para consumo humano no es algo nuevo. En los últimos años, la bibliografía clínica muestra un aumento en el número de casos descritos de infecciones en humanos. Por dar un ejemplo, se ha aislado a *Saccharomyces cerevisiae* de suplementos dietéticos y de probióticos, identificándose que han causado afectaciones principalmente en pacientes inmunodeprimidos, por lo que actualmente *S. cerevisiae* se incluye en el grupo de patógenos oportunistas emergentes. También se han reportado factores de virulencia en cepas típicas de *Enterococcus faecium* y *E. faecalis* aisladas de quesos ovinos (Marguet y cols., 2008).

El que las cepas 1 y 5031 exhiban los genes de virulencia *sic* y *sof*, respectivamente, significa que, en algún momento dado, y bajo determinadas condiciones, podrían evadir el sistema inmune o actuar sobre grupos selectos de proteínas, en cada caso. En consecuencia, las cepas con las claves 1 y 5031 quedarían descartadas como bacterias con potencial probiótico.

Se debe prestar atención a la presencia de estos genes en estas bacterias, ya que su frecuencia en este tipo de especies es muy baja y no se les ha relacionado con casos clínicos reportados en México. A pesar de que no se ha podido demostrar la transferencia de factores de virulencia en las condiciones encontradas en alimentos fermentados o en el intestino, este fenómeno de transferencia genética es hallado frecuentemente en muestras clínicas o en poblaciones que han sido sometidas a una presión selectiva. Está reportado por Morrison y cols. (2013) que cepas de *S. infantarius* y *S. macedonicus* conservan un sistema robusto de transformación natural, e infieren que la transformación es aún más común entre los estreptococos de lo que ha sido reconocido.

Entonces, sabemos que esta bebida tradicional mexicana es altamente consumida por las poblaciones rurales del sureste del país desde generaciones atrás y no se le ha relacionado como la causa directa de enfermedades (Paz y cols., 2008), los resultados obtenidos en este estudio bajo las condiciones probadas dan los pasos iniciales para sugerir que su introducción comercial es posible y requiere el cuidado necesario respecto a las buenas prácticas de higiene, ya que han sido aisladas *E. coli* enteropatógena y enteroagregativa (Sainz et al. 2005).

El resto de las cepas de estreptococos aisladas del pozol, entre ellas *Streptococcus infantarius* 25124 que es de especial interés, no presentó ninguno de los genes asociados con la virulencia típica del género. El caso de *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, es de interés ya que además de encontrarse en el pozol también es un microorganismo prevalente en alimentos de consumo tradicional de origen africano (Jans y cols., 2012).

10.3 Adherencia a células epiteliales

En los microorganismos patógenos se conocen ampliamente los mecanismos que participan en su capacidad de adherencia específica a los epitelios. Por ejemplo, las variedades patógenas de *E. coli* poseen adhesinas (estructuras de superficie celular), que les permiten colonizar diferentes regiones del epitelio intestinal y causar enfermedades. Por lo tanto, esta interacción conduce a la posterior colonización responsable de la infección y al desarrollo de la

enfermedad. En el caso de *S. pyogenes* las adhesinas como la proteína M son las responsables de las interacciones iniciales de estas bacterias con el hospedero, para dar paso a la expresión de factores de virulencia e invasión (Nobbs et al., 2009).

Queda claro que existe un doble papel que representa la capacidad de las bacterias para adherirse a la superficie intestinal, por lo que resultó de importancia realizar este tipo de ensayo para las bacterias aisladas del pozol, teniendo interés en probar su capacidad de adherencia a diferentes líneas celulares vislumbrando que puedan proponerse como apoyo en tratamientos alternativos a diversas afecciones clínicas, se probaron con las líneas celulares HEP-2 (Carcinoma faríngeo), HeLa (Carcinoma de cérvix) y HT-29 (Adenocarcinoma de colon humano).

El ejemplo más sorprendente de esta situación es probablemente el género *Streptococcus*, en el que solo una especie, *Streptococcus thermophilus*, se considera segura. Desde hace siglos, *S. thermophilus* es un iniciador de productos lácteos que consumimos con frecuencia en todo el mundo. Ahora sabemos que esta especie está relacionada filogenéticamente con patógenos del Grupo A y del Grupo B, así como con *Streptococcus pneumoniae*. Sin embargo, los estudios del genoma de *S. thermophilus* han revelado una extensa descomposición genética, lo que lleva a la pérdida de determinantes factores patógenos estreptocócicos durante su adaptación a la leche. Además, se demostró que la especie había adquirido genes de especies como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* con quien a menudo comparte una relación simbiótica en el entorno lácteo. Estos atributos, junto con la larga experiencia empírica de su uso seguro respaldan la naturaleza benigna de *S. thermophilus*. Se sabe que *S. thermophilus* no tiene una alta adherencia a las células del epitelio intestinal, sin embargo, durante sus estancia temporal degrada la lactosa y produce lactato que puede moldear y reforzar las comunidades bacterianas endógenas de la microbiota intestinal en el tracto digestivo funcionando como un prebiótico (Veiga et al., 2014).

En el presente trabajo se observó que todas las cepas fueron adherentes, y aunque no todas las cepas en estudio mostraron capacidad de adherirse a las tres líneas celulares, un porcentaje mayoritario (24 cepas, 72%) sí lo fueron.

Ha resultado de gran interés el probar diferentes epitelios, ya que existe la hipótesis de que un probiótico puede ser mucho más "completo" si éste se adhiere desde el momento en que lo consumimos, ejerciendo una función protectora en la faringe y a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, y que en el caso de las mujeres también ofrezca protección cérvicouterina.

Así, idealmente, un solo microorganismo cumplirá diversas funciones, entre las que pueden estar: protección contra trastornos relacionados con el tracto digestivo, enfermedades relacionadas con el tracto respiratorio, enfermedades inflamatorias y síndromes gastrointestinales, infecciones en las vías urinarias, diversos tipos de vaginosis, protección contra diversos tipos de cáncer, alergias, enfermedades cardiovasculares, entre muchas otras (FAO, 2006).

Un resultado interesante en estos ensayos de adherencia fue que los fenotipos (patrones) de adherencia agregativo (15% del total), localizado (11%) y difuso (63%) observados, pueden interpretarse similares a los reportados para *E. coli*, ya que es utilizada como referencia; pero que pese a ello resultan ser a la vez muy diferentes al compararlos contra *E. coli* y también entre las diferentes cepas de estreptococos del pozol (Figuras 15, 16, 19-21). En estos ensayos también fue posible observar que algunas cepas también tuvieron afinidad (adherencia) a la lenteja de vidrio además de a las células (Figura 21b y 21c), por lo que hay interés en determinar los factores y mecanismos que contribuyen a la adherencia observada. Estudios similares han sido reportados por Chavarín (2010).

Es reconocido que algunas BAL, como por ejemplo los enterococos, pueden poseer características de virulencia. Por esta y otras razones, la última Consulta de la FAO (2006) recomendó que no se hiciera referencia a *Enterococcus* como probiótico para consumo humano, a pesar de que frecuentemente se aísla como microbiota nativa de diversos alimentos fermentados de consumo humano. Este documento no hace referencia alguna al género *Streptococcus*.

En Europa, Estados Unidos y Japón, las bacterias lácticas utilizadas en fermentaciones de alimentos se consideran generalmente seguras (GRAS, generally recognized as safe), pero actualmente para que una nueva cepa obtenga este título se requiere un fuerte respaldo.

Para que la FDA (Food and Drug Administration) reconociera como GRAS a la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20™) se requirió un estudio muy completo. Tan solo la parte de seguridad requirió recabar información sobre el género y la especie, después información histórica y de consumo de *L. rhamnosus* HN001 así como el estudio de los parámetros necesarios: Habilidad de adherirse a células intestinales, habilidad para degradar la mucina, infectividad, actividad metabólica indeseable, presencia de genes de resistencia a antibióticos y elementos transferibles, estudios de esta cepa en animales (ratones, hámsters, ratas, conejos), estudios en vivo, estudios de otras cepas relacionadas a *L. rhamnosus*, estudios

en humanos (adultos, niños, infantes, inmunosuprimidos), incluyendo un extenso número de pruebas indicadas en el Código de Regulaciones Federales de E. U. A. CFR Título 21170.30, entre otras cosas (JHeimbach LLC, 2009).

Aunque la capacidad de adhesión de las bacterias probióticas al huésped no garantiza necesariamente un beneficio para la salud, la unión de los probióticos a la mucosa intestinal tiene un papel protector potencial contra los patógenos a través de la competencia por los sitios de unión a la célula huésped. Además, la capacidad de adhesión de las bacterias probióticas podría aumentar la oportunidad de interactuar con el huésped, lo que da como resultado una colonización temporal, aumentando su tiempo de tránsito en el intestino para ejercer los efectos benéficos previstos. Por ejemplo, Monteagudo-Mera (2019) reporta que la colonización temporal de BAL favorece la acción local de los metabolitos producidos y los efectos inmunomoduladores de las vías de señalización. Entonces, dentro de las perspectivas de este trabajo quedará el estudiar los mecanismos de adherencia de las cepas aisladas del pozol, en donde por recomendaciones de la FAO se debe demostrar que tengan ventaja competitiva por los sitios de unión a la mucosa intestinal contra las bacterias patógenas: por ejemplo que las BAL de interés posean proteínas Mub (proteínas de unión a mucina, que es una serie de proteínas altamente glicosiladas que cubren la superficie mucosa intestinal) y que juegan un papel importante en la interacción con los componentes del moco ya que los dominios Mub se encuentran casi exclusivamente en BAL aisladas del tracto gastrointestinal humano. Otro ejemplo son proteínas de superficie como las proteínas de unión a fibronectina; todo esto para contribuir a la adherencia de las bacterias a la mucosa intestinal (Monteagudo-Mera, 2019).

Derivado de esta investigación también pueden abrirse nuevas líneas relacionadas con el estudio del efecto de las cepas de *Streptococcus* sp. aisladas del pozol sobre las células hospederas, puesto que en las observaciones al microscopio de los ensayos de adherencia a las líneas celulares se observaron "cambios en las células hospederas" que se pueden describir como diferentes conformaciones, alargamientos y/o conexiones entre células (Figura 20b, 20c). Ya existen estudios cuyo objetivo específico es la investigación *in vitro* de efectos que promuevan la salud, en este caso específico la actividad de BAL aisladas de leche de camello contra la proliferación de tres líneas celulares cancerígenas (Ayyash *et al*, 2018).

Los alimentos fermentados en general, y en este caso el pozol, es un reservorio de microorganismos que poseen características metabólicas de interés. A través de la

metagenómica se ha logrado confirmar la predominancia de especies en el pozol, que previamente habían sido identificadas mediante métodos dependientes del cultivo; en donde se detectaron proteínas de microorganismos que no habían sido identificados y se han descrito las actividades metabólicas y celulares más importantes. Por mencionar algunos ejemplos: enzimas que permiten la utilización del sustrato (Cárdenas *et al*, 2014); enzimas que demuestran la actividad amilolítica de *Streptococcus infantarius* 25124 (Rodríguez-Saavedra *et al*, 2017); y la obtención de un biocatalizador con actividad esterasa (Peña y Duarte, 2011).

Conclusión

Los resultados muestran que un alto porcentaje de las cepas (93.7%) de *Streptococcus sp.* aisladas del pozol (con excepción de 1 y 5031) no presentan factores relacionados con la patogenia del género. Las cepas estudiadas se adhieren a cultivos de células de las líneas HEP-2 (carcinoma faríngeo), HeLa (carcinoma de cérvix) y HT-29 (adenocarcinoma de colon humano). El 72% se adhieren a las 3 líneas celulares, por lo que podrían colonizar de manera efectiva el epitelio intestinal, lo que ofrece la posibilidad de que confieran un beneficio significativo a la salud cuando se administren a seres humanos.

En cuanto a la virulencia y a la capacidad de inducir infecciones en este trabajo se ha logrado demostrar que, bajo las condiciones probadas, debido a la ausencia de los principales genes de virulencia en los estreptococos del pozol, tienen un riesgo bajo de inducir enfermedad, o de estar relacionados con ella.

Aunque faltaría evaluar otros factores de riesgo, como la posibilidad de causar enfermedades en humanos, especialmente en niños, los resultados de este trabajo indican que no es común la patogenicidad de las cepas de *Streptococcus* estudiadas provenientes del pozol.

Sabemos que esta bebida tradicional mexicana es altamente consumida por las poblaciones rurales del sureste del país desde generaciones atrás y no se le ha relacionado como la causa directa de enfermedades, entonces los resultados obtenidos en este estudio, bajo las condiciones probadas, demuestran que el pozol es una bebida segura para el consumo humano y dan los pasos iniciales para sugerir que su introducción comercial es posible, manteniendo el cuidado necesario a las buenas prácticas de higiene durante su producción.

Perspectivas

Es importante continuar con el estudio de las interacciones de estas bacterias lácticas con potencial probiótico y su hospedero; así como determinar cuáles son los factores que intervienen en estos fenómenos observados, siendo muy importantes los estudios de competencia y aquellos relacionados con la activación de una respuesta inmune: los probióticos poseen un amplio espectro de efectos inmunomoduladores ya que son capaces de actuar sobre la inmunidad innata y la adquirida o específica, pudiendo proteger al hospedero frente a infecciones y procesos de inflamación intestinal crónica. Las células epiteliales y las células del sistema inmune innato poseen receptores celulares capaces de discriminar entre la microbiota comensal y la patógena, induciendo la síntesis de distintos mediadores de la respuesta inmune innata y de adecuadas respuestas adaptativas destinadas a combatir a los patógenos. En otras situaciones patológicas, los probióticos pueden actuar estimulando una respuesta antígeno-específica en situaciones de sensibilidad (alergias) o bien ejercer efectos claramente inflamatorios (Werner y Haller, 2007).

Deben llevarse a cabo pruebas tales como la tolerancia al ácido y la bilis, la producción de sustancias antimicrobianas, efectuarse ensayos *in vivo* con modelos de animales como la exclusión competitiva de la fijación de patógenos o modulación del sistema inmune, y finalmente deben proyectarse estudios clínicos dirigidos a objetivos específicos (FAO; 2006).

Me es grato concluir este trabajo con el siguiente párrafo adaptado de un texto de Chen et al. (2017) en la revista *Trends in Food Science & Technology*:

“La fermentación de los alimentos es un importante pilar de las tradiciones sociales, pero aún más crucial en términos económicos para numerosos productos regionales en todo el mundo, así como fuentes de riqueza microbiológica esperando por ser exploradas”

REFERENCIAS

- Alouf, J. E. (2001). Pore-forming bacterial protein toxins: An overview. *Current Top Microbiol. Immunol.* 257: 1-14.
- Ampé F. Ben Omar N. Moizan C. Wachter R. Guyot J. 1999. "Polyphasic study of the Spatial Distribution of Microorganisms in Mexican pozol, a fermented Maiz Dough, Demonstrates the Need for Cultivation-Independent Methods to Investigate Traditional fermentations", *Applied and Environmental Microbiology.* 65: 5464-5473.
- Argimón, Silvia; Alexander V. Alekseyenko, Rob DeSalle, y Page W. Caufield. 2013. Phylogenetic Analysis of Glucosyltransferases and Implications for the Coevolution of Mutans Streptococci with Their Mammalian Hosts. *PLoS One.* 2013; 8(2): e56305.
- Asokan, Govindaraj V., Tufoof Ramadhan, Eman Ahmed, and Hala Sanad. 2019. WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of Medline-PubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices. *Oman Med J.* 2019 May; 34(3): 184–193.
- Ausbel F.M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Sith J. A., Struhl K. 2005. *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons Inc.
- Ayyash, Mutamed; Amna K. Al-Nuaimi; Suheir Al-Mahadin; Shao-Quan Liu. 2018. *In vitro* investigation of anticancer and ACE inhibiting activity, α -amylase and α -glucosidase inhibition, and antioxidation activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Journal of Food Chemistry* 239 (2018) 588-597.
- Bamforth, C. W. 2005. *Food, Fermentation and Microorganisms.* Blackwell publishing.
- Becerril, S. L: A. (2011). Tipificación fenotípica y molecular de cepas de Streptococcus y Enterococcus aisladas de pozol del sureste de la República Mexicana. Tesis para obtener el título de maestría en ciencias bioquímicas. Facultad de química, UNAM.
- Bisno, L. A.; Brito, M. O.; Collins, C. M. 2003. Molecular basis of Group A streptococcal virulence. *Lancet Infect Dis.* 3: 191–200.
- Brooks, Lavida R. K. and George I. Mias. 2018. Streptococcus pneumoniae's Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Front Immunol.* 2018; 9: 1366.
- Buckley S. J., Timms P., Davies M. R., McMillan D. 2018. In silico characterisation of the two-component system regulators of Streptococcus pyogenes. *PLoS One.* 2018 Jun 21;13(6):e0199163. doi: 10.1371/journal.pone.0199163. eCollection 2018.
- Burne, A.R., Bessen, E.D., Broadbent, R.J., Claverys, J.P., Feb. 2007. The seventh International Conference on the genetics of streptococci, lactococci, and enterococci. *Journal of Bacteriology.* 1209-1218.
- Cañas, U.A.O., Bárzana, G.E., Owens, J.D., Wachter, C., 1993. La elaboración de pozol en los altos de Chiapas. *Ciencia.* 44, 219-229.
- Cárdenas, C., B. Barkla, C. Wachter, L. Delgado-Olivares, and R. Rodríguez-Sanoja. 2014. Protein extraction method for the proteomic study of a Mexican traditional fermented starchy food. *Journal of Proteomics* 111:139–147. doi:10.1016/j.jprot.2014.06.028.
- Casadevall A, Pirofski LA. Host–pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun.* 1999;67(8):3703–3713.
- Chavarín, 2010. Identificación de factores de colonización relacionados con la adherencia a células de bacterias lácticas aisladas del pozol. Informe de estancia postdoctoral. UNAM.

- Chen, Gu; Congcong Chen; Zhonghua Li. 2017. Meta-omics insights in the microbial community profiling and functional characterization of fermented foods. *Trends in Food Science & Technology* 65 (2017) 23-31.
- Cortés Espinoza, D. V.; Dávila Zamora, A.; González Pérez, A.; Islas Valverde, G. J.; Pérez Navarrete, A.; Serrano Rodríguez, L. 1997. Industrialización de una bebida fermentada a partir de maíz. Universidad Autónoma Metropolitana. Proyecto terminal.
- Courtney, Harry S.; Yi Li, Waleed O. Twal, and W. Scott Argraves. 2009. Serum Opacity Factor Is a Streptococcal Receptor for the Extracellular Matrix Protein Fibulin-1. *J Biol Chem.* 2009 May 8; 284(19): 12966–12971.
- Courtney, Harry S. and Henry J. Pownall. 2010. The Structure and Function of Serum Opacity Factor: A Unique Streptococcal Virulence Determinant That Targets High-Density Lipoproteins. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010: 956071.
- Cravioto A., Gross R. J., Scotlans S. M. & Rowe B. (1979). An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Current Microbiology.* 3:95-99.
- Cunningham, W.H., July. 2000. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. *Clinical Microbiology reviews.* Vol. 13, No. 3, 470-511.
- Dasel W.M. Kaindia, Wambui Kogi-Makau, Godfrey N. Luleb, Bernd Kreikemeyerc, Pierre Renaultd, Bassirou Bonfohe,f,g, Esther Schellingf,g, Jakob Zinsstagf,g, Christophe Lacroixh, Leo Meileh, Christoph Jansh,*, Jan Hattendorffg. 2018. Investigating the association between African spontaneously fermented dairy products, faecal carriage of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* and colorectal adenocarcinoma in Kenya. *Acta Tropica* 178 (2018) 10-18.
- Díaz, Gloria; Ruiz, Francisco; Morlon-Guyot, Juliette y Wachter, Carmen. 1999. Diversidad de bacterias lácticas amilolíticas del pozol. En *Memorias del VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería.* 12-17 Septiembre. (pp. 40). Huatulco, Oaxaca, México.
- Diaz-Ruiz, G. Guyot, J.P., Ruiz-Terán, F. Morlon –Guyot, J., Wachter, C., 2003 Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican maize beverage. *Applied and Environmental Microbiology.* 69: 4367-4374.
- Doern, C.; Roberts, Amity L.; Hong, W.; Nelson, J.; Lukomski, S.; Swords, W. E.; Reid, S. D. 2009. Biofilm formation by group A *Streptococcus*: a role for the streptococcal regulator of virulence (Srv) and streptococcal cysteine protease (SpeB). *Microbiology.* 155, 46-52.
- Efstratiou, F., 2000. Group A *Streptococci* in the 1990s. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 45, Topic T1, 3-12.
- Escalante, A.; Wachter, C.; Farrés, A. 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Journal of Food Microbiology.* 64, 21-26.
- Facklam, Richard. 2002. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. *Clinical Microbiology Reviews,* Oct. 2002, p. 613–630 Vol. 15, No. 4.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2009. Recuperado en Septiembre del 2011. División de Producción y sanidad animal. La leche de camella. Disponible en: <<http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/dairy/camel.html>>.
- FAO. (2006). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. ISSN 10142916.
- FAO. Recuperado en Septiembre del 2011. Agriculture and consumer protection. Cap. 4. Cereal fermentations in latin American countries. Disponible en: <<http://www.fao.org/docrep/x2184e/x2184e10.htm>>.

- FAO y Matthews, C. Recuperado en Agosto del 2011. La última novedad: leche de camella. Disponible en: <<http://www.fao.org>>.
- FAO y Yaguil, R. Recuperado en Septiembre del 2011. Camels and Camel Milk. Disponible en: <<http://www.fao.org/DOCREP/003/X6528E/X6528E00.htm>>.
- Figueroa, Martínez F. J. 2004. Tipificación molecular del gen que codifica para la proteína M (emm) en cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico. Tesis. Facultad de Química. UNAM.
- Fischer, K.; Phillips, C. 2009. The Ecology and Virulence of Enterococcus. *Microbiology*. 155, 1749-1757.
- Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H., 2003. Enterococci in foods- a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 105-122.
- Frick, Inga-Maria; Oonagh Shannon, Ariane Neumann, Christofer Karlsson, Mats Wikström, and Lars Björck. 2018. Streptococcal inhibitor of complement (SIC) modulates fibrinolysis and enhances bacterial survival within fibrin clots. *J Biol Chem*. 2018 Aug 31; 293(35): 13578–13591.
- Gálvez, A., Valdivia, E., Abriouel, H., Camafeita, E., Mendez, E., Martínez-Bueno., Maqueda, M., 1998. Isolation and characterization of enterocin EJ97 a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Arch. Microbiol*. 171, 59-65.
- Hamada, Shigeyuki; Shigetada Kawabata and Ichiro Nakagawa. 2015. Molecular and genomic characterization of pathogenic traits of group A *Streptococcus pyogenes*. *Proceedings of the Japan Academy Series B Physical and Biological Sciences*. 2015 Dec 11; 91(10): 539–559.
- Hardie, J.H and Whiley, R.A., 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 83, 1S-11S.
- Henningham, Anna; Mark R. Davies, Satoshi Uchiyama, Nina M. van Sorge, Sean Lund, Kelsey T. Chen, Mark J. Walker, Jason N. Cole, and Victor Nizet. 2018. Virulence Role of the GlcNAc Side Chain of the Lancefield Cell Wall Carbohydrate Antigen in Non-M1-Serotype Group A *Streptococcus*. *mBio*. 2018 Jan-Feb; 9(1): e02294-17.
- Hummel, A. S.; Hertel, C.; Holzapfel, W. H.; and Franz, M. A. P. 2007. Antibiotic resistances of Starters and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 73, No. 3. P. 730-739.
- IDAP (Instituto para el Desarrollo y Actualización de Profesionales, S. C.). 2011. Expresión de Patogenicidad. Disponible en: <<http://www.idap.com.mx>>.
- Inga F., Per Akesson, Magnus Rasmussen, Artur Schmidtchen, Lars Björck. (2002). SIC, a Secreted Protein of *Streptococcus pyogenes* That Inactivates Antibacterial Peptides. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 278, No. 19, Issue of May 9, pp. 16561–16566, 2003.
- INS (Instituto Nacional de Salud). 2001. Manual de procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias. Ministerio de Salud, Perú.
- Inzunza-Montiel, Alma Edna; Francisco Figueroa-Martínez, Leafar Pérez-Romano, Rocío Dávila-Mendoza, Raúl Garza Velasco, Alejandro Cravioto, Luis Manuel Perea-Mejía, 2004. Prevalencia de los genes (emm, speA, speC, sof, prtF y sic) asociados a la virulencia de cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico. *Bioquímica*, Vol. 29 Suplemento 1.
- IPA. 2017. IPA (International Probiotics Association) guidelines to qualify a microorganism to be termed as ‘probiotic’.
- ISSAP. 2019. Challenges ahead in the probiotic field – insights from Probiota. February 28, 2019/in featured, ISAPP (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) Science Blog. Disponible en: <<https://isappsience.org/probiota2019/>>.
- Jans C.; Annemarie Boleij. 2018. The road to infection: Host-Microbe Interactions Defining the Patogenicity of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* Complex Members. *Frontiers in Microbiology*. Abril 2018, Vol. 9, art. 603.

- Jans, Christoph; Christophe Lacroix & Leo Meile. 2011. A novel multiplex PCR/RFLP assay for the identification of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex members from dairy microbial communities based on the 16S rRNA gene. *FEMS Microbiol Lett* 326 (2012) 144–150.
- Jans, Christoph; Dasel Wambua Mulwa Kaindi; Désirée Böck; Patrick Murigu Kamau Njage; Sylvie Mireille Kouamé-Sina; Bassirou Bonfoh; Christophe Lacroix and Leo Meile. 2013. Prevalence and comparison of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* in raw and fermented dairy products from East and West Africa. *Int J Food Microbiol*. 2013 Oct 15; 167(2): 186–195.
- Jarva, H.; Sakari Jokirante, T.; Würzner, R.; Meri, Seppo. 2003. Complement resistance mechanisms of streptococci. *Molecular Immunology*. 40, 95-107.
- Jedrzejas, M. J. 2001. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 65, No. 2. p. 187-207.
- JHeimbach LLC. (2009). Generally Recognized as Safe (GUS) Determination for the Use of *Lactobacillus rhamnosus* Strain HN001 (DR20TM) in Infant Formula. Center for Food Safety and Applied Nutrition Food and Drug Administration.
- Kaindi¹, Dasel W. M.; Wambui Kogi-Makau¹, Godfrey Nsereko Lule, Bernd Kreikemeyer, Pierre Renault, Bassirou Bonfoh, Nize Otaru, Thomas Schmid, Leo Meile, Jan Hattendorf & Christoph Jans. (2018). Colorectal cancer-associated *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* differ from a major dairy lineage providing evidence for pathogenic, pathobiont and food-grade lineages. *Scientific Reports* | (2018) 8:9181 | DOI:10.1038/s41598-018-27383-4.
- Kaindi², Dasel W.M.; Wambui Kogi-Makau, Godfrey N. Lule, Bernd Kreikemeyer, Pierre Renault, Bassirou Bonfohe, Esther Schelling, Jakob Zinsstag, Christophe Lacroix, Leo Meile, Christoph Jans, Jan Hattendorff. Investigating the association between African spontaneously fermented dairy products, faecal carriage of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* and colorectal adenocarcinoma in Kenya. *Acta Tropica* 178 (2018) 10-18.
- Kayser, F.H., 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 255-262.
- Kenneth J., C. George Ray. 2011. *Sherris. Microbiología Médica*. Mc Graw Hill 5^o edición.
- Kolar, Stacey L.; Pierre Kyme, Ching Wen Tseng, Antoine Soliman, Amber Kaplan, Jiurong Liang, Victor Nizet, Dianhua Jiang, Ramachandran Murali, Moshe Arditi, David M. Underhill, and George Y. Liu. 2016. Group B *Streptococcus* evades host immunity by degrading hyaluronan. *Cell Host Microbe*. Author manuscript; available in PMC 2016 Dec 9.
- Köller, T.; Oreste, A. G. M.; Kreikemeyer, B.; Lembke, C.; Immaculada Margarit; Grandi, G.; Podbielski, A. 2010. Typing of the pilus-protein-encoding FCT region and biofilm formation as novel parameters in epidemiological investigations of *Streptococcus pyogenes* isolates from various infection sites. *Journal of Medical Microbiology*. 59, 442-452.
- Koneman E. y Allen E. (2008). *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Kosky, V. (2009). Evaluación de medios de cultivo para el aislamiento de *S. pyogenes* en pacientes con diagnóstico clínico de faringoamigdalitis. Tesis de grado. Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia.
- Koutouzi, F; A. Tsakris, P. Chatzichristou, E. Koutouzis, G. L. Daikos, E. Kirikou, N. Petropoulou, V. Syriopoulou, and A. Michos. 2015. *Streptococcus pyogenes* emm Types and Clusters during a 7-Year Period (2007 to 2013) in Pharyngeal and Nonpharyngeal Pediatric Isolates. *J Clin Microbiol*. 2015 Jul; 53(7): 2015–2021.

- Kreikemeyer, Bernd; Kevin S. McIver and Andreas Podbielski. 2003. Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen–host interactions. *Trends in Microbiology*, Vol.11, No.5 May 2003.
- Krzyściak, W.; K. K. Pluskwa, A. Jurczak, and D. Kościelniak. 2013. The pathogenicity of the *Streptococcus* genus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013; 32(11): 1361–1376.
- Leyva-Arguelles, Cynthia, Carmen Wachter, Rosario Vera, Romina Rodríguez-Sanoja. 2015. Aproximación proteómica a las etapas iniciales de la fermentación del pozol. XVI Congreso de Biotecnología y Bioingeniería, Guadalajara, Jalisco, México.
- Lindhal, G.; Sta^lthammar-Carlemalm, M.; Areschoug, T. 2005. Surface Proteins of *Streptococcus agalactiae* and Related Proteins in Other Bacterial Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 18, No. 1. P. 102-127.
- López, G. 2006. Estudio de la variabilidad microbiológica del pozol mediante PCR-DGGE con el gen rpoB. Tesis. Facultad de química, UNAM.
- Lynskey, Nicola N.; Mark Reglinsky, Damien Calay, Matthew K. Siggins, Justin C. Mason, Marina Botto, Shiranee Sriskandan. 2017. Multi-functional mechanisms of immune evasion by the streptococcal complement inhibitor C5a peptidase. *PLoS Pathog*. 2017 Aug; 13(8): e1006493.
- Mahaut, M.; Jeantet, R.; Brulé, G. 2003. Introducción a la Tecnología Quesera. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 51-54.
- Marguet, E.; Vallejo M., Olivera N. (2008). Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2008; 42 (4): 543-8.
- Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T., May 2005. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 98, No. 5, 1177-1190.
- Marugan, Gema del Prado. 2008. Adherencia de *Streptococcus pneumoniae* a poliestireno, patogenicidad e interferencia de antibióticos e ibuprofeno. Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral.
- Mathur, S and Singh, R., 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *International Journal of Food Microbiology*. 105, 281-295.
- Mattia, Antonia; Merker, Robert. 2008. Regulation of Probiotic Substances as Ingredients in Foods: Premarket Approval or “Generally Recognized as Safe” Notification. *Regulation of Probiotics as Ingredients*. *Clinical Infectious Diseases* 2008;46 (Suppl 2) 115.
- Melville, Stephen and Lisa Creig. 2013. Type IV Pili in Gram-Positive Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2013, 77(3):323.
- Mendoza-Jönsh, E. 2006. Caracterización química de extractos de *Geranium* sp. Que interfieren en la adherencia localizada de *E. coli* a células Hep-2. Tesis. Facultad de Medicina. UNAM. Morrison, D.; Guédon, E.; Renault, P. (2013). *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.00230-13.
- Monteagudo-Mera, Andrea; Robert A. Rastall, Glenn R. Gibson, Dimitris Charalampopoulos, and Afroditi Chatzifragkou. 2019. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019; 103(16): 6463–6472.
- Morrison, Donald A.; Eric Guédon, and Pierre Renault. 2013. Competence for Natural Genetic Transformation in the *Streptococcus bovis* Group *Streptococci* *S. infantarius* and *S. macedonicus*. *J Bacteriol*. 2013 Jun; 195(11): 2612–2620.
- Nabil Ben Omar and Frédéric Ampe. 2000. Microbial Community Dynamics during Production of the Mexican Fermented Maize Dough Pozol. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66, No. 9, p. 3664- 3673.
- Negróni, Marta. 2009. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. Editorial Médica Panamericana. 2^a edición.

- Nobbs, A. H.; Lamont, R. J.; Jenkinson, H. F. 2009. Streptococcus Adherence and Colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 73. No. 3. P. 407-450.
- Nout, M. R. and Motarjemi, Y. 1997. Assessment of Fermentation as a Household Technology for improving Food Safety: A Joint FAO/WHO Workshop. *Food Control*. 8 (5-6): 221-226.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. (2013). Reference Sequence: NC_002737.1. *Streptococcus pyogenes* SF370 chromosome, complete genome.
- OCW. Recuperado en Septiembre del 2011. Patogenicidad bacteriana. Disponible en: <<https://ocw.ehu.es/>>.
- Olivares, E. G.; Alonso, A.; Miró, M.; Peña, J. 2011. Sistema del complemento. Universidad de Córdoba, España. Disponible en: <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/temas_nuevos_pdf/tema13.pdf>.
- Oguntoyinbo, F. A.; Tourlomousis, P.; Gasson, M. J.; Narbad, A. 2011. Analysis of bacterial communities of traditional fermented Wets African cereal foods using culture independent methods. *Journal of Food Microbiology*. 145: 205-210.
- Paz, L. E.; Arratia, A. M.; Ibarra, P. A.; Magaña, M. N., Salinas, R. A., León, S. M.; Emus, M. A., Márques, P. J., León, F. M., Nieto, M. S. 2008. Evaluación de las condiciones higiénicas y nutricionales de los alimentos consumidos en comunidades rurales de Chiapas, para la detección de necesidades y realización de programas específicos de apoyo. Congreso Internacional del Caribe. Cuba.
- Peña, García Gloria Carlina y Dolores Reyes-Duarte. 2011. Obtención y caracterización de un biocatalizador con actividad esterasa obtenido del metagenoma del pozol. Trabajo presentado en el XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México.
- Perea-Mejía L. M. 2003. *Streptococcus*. Microbiología y parasitología médica. 3ª edición. M. Editores. México, Tay, J., Gutierrez, M., Molina, J., López, R., Manjarrez, M. E.:75-85.
- Pérez-Pulido, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Cañamero, M.M., Gálvez, A., 2006. Safety and potential risk of enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food and Chemical Toxicology*. 44, 2070-2077.
- Reid, Sean D.; Montgomery, Alison G.; Voyich, Jovanka M.; DeLeo Frank R.; Lei, Benfang ; Ireland, Robin M.; Green, Nicole M.; Liu, Mengyao; Lukomski, Slawomir and Musser, James M. 2003. Characterization of an Extracellular Virulence Factor Made by Group A Streptococcus with Homology to the *Listeria monocytogenes* Internalin Family of Proteins. *Infection and Immunity*. Vol. 71, Num. 12. P. 7043-7052.
- Rivera, M. (1998). *Estreptococo beta hemolítico del grupo A*. Honduras pediátrica - vol. Xix - no. 2, abril, mayo, junio - año 1998.
- Rivera – Noriega, A. 2001. Efecto de la acción de microorganismos amilolíticos en la fermentación del pozol. Tesis. Facultad de química, UNAM.
- Rodríguez-Saavedra, Carolina; Romina Rodríguez Sanoja; Carmen Wachter y Gloria Díaz Ruiz. 2017. Liberación y concentración de la actividad amilolítica de *Streptococcus infantarius* 25124 aislada del pozol. *Revista Biotecnología*, Año 2017, Vol 21 No. 2.
- Rocha, G. C.; Lozano, Z. P.; Martínez, L. Y. 2004. Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito-hospedero. Universidad Benemérita de Puebla. Dirección de Fomento Editorial. Puebla, México.
- Romero C. 2007. *Microbiología y Parasitología Humana*. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª edición. Panamericana.
- Sainz, Espuñes T. R. 1998. Estudio de la presencia y sobrevivencia de enterobacterias patógenas en el pozol. Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias bioquímicas. Facultad de química. UNAM.

- Sainz, Espuñes; Wachter, C.; J Espinoza, D Centurión, A Navarro, J Molina, A Inzunza, A Cravioto, C Eslava. (2001). Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 71, Issues 2–3, 30 December 2001, Pages 169–176
- Sainz, Teresita; Julia Pérez, Jorge Villaseca, Ulises Hernández, Carlos Eslava, Guillermo Mendoza, Carmen Wachter. 2005. Survival to different acid challenges and outer membraneprotein profiles of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pozol, a Mexican typical maize fermented food. *International Journal of Food Microbiology* 105 (2005) 357 – 367.
- Salinas, Ch C. *Etnobiología e introducción a la bacteriología del pozol* (Tesis profesional, Facultad de Ciencias, UNAM, México) 63 p.p.
- Shumba, Patience; Srikanth Mairpady Shambat, and Nikolai Siemens. 2019. The Role of Streptococcal and Staphylococcal Exotoxins and Proteases in Human Necrotizing Soft Tissue Infections. *Toxins (Basel)*. 2019 Jun; 11(6): 332.
- Steinkraus, K. H. 2002. Fermentations in World Food Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 1, 23-32.
- Ulloa, M, T Herrera, P Lappe. 1987. Fermentaciones Tradicionales Indígenas de México. Serie de Investigaciones Sociales No. 16, Instituto Indigenista, México. p.p. 13-20.
- Veiga, Patrick; Nicolas Pons, Anurag Agrawal, Raish Oozeer, Denis Guyonnet, Rémi Brazeilles, Jean-Michel Faurie, Johan E. T. van Hylckama Vlieg, Lesley A. Houghton, Peter J. Whorwell, S. Dusko Ehrlich, Sean P. Kennedy. 2014. Changes of the human gut microbiome induced by a fermented milk product. *Sci Rep*. 2014; 4: 6328.
- Velázquez-López, Arturo; David Covatzin-Jirón; María Dolores Toledo-Meza; Gilber Vela-Gutiérrez. 2018. Bebida fermentada elaborada con bacterias ácido lácticas aisladas del pozol tradicional chiapaneco. *CienciaUAT vol.13 no.1 Ciudad Victoria jul./dic. 2018*.
- Wachter, C. 1993. Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9:269-274
- Wachter, C. 1999. El Pozol. *Cuadernos de Nutrición*. 22(3):125-127.
- Wachter, C.; Cañas, A.; Bárzana, E. 2000. Microbiology of Indian and Meztizo pozol fermentations. *Journal of Food Microbiology*. 17, 251-256.
- Wartha, F. 2008. Identification and Characterization of Novel Virulence Factors in *Streptococcus pneumoniae*. Thesis. Department of Microbiology. Sweden.
- Werner, T.; Haller, D. (2007). Intestinal epithelial cell signalling and chronic inflammation: from the proteome to specific molecular mechanisms. *Mutation Research* 1:42-57.
- Whatmore AM, Kapur V, Sullivan J, Musser JM, Kehoe MA. 1994. Non-congruent relationships between variation in emm gene sequences and the population genetic structure of group A streptococci. *Mol Microbiol* 1994; 14:619-631.
- Willenborg, J; Fulde, M.; de Greeff, A.; Rohde, M.; Smith, H. E.; Valentin-Weigand, P.; y R. Goethe. 2011. Role of Glucose and CcpA in capsule expression and virulence of *Streptococcus suis*. *Microbiology*. 157, 1823-1833.