

Programa de Estudios de Posgrado

**SELECCIÓN DE CEPAS DE *Lactobacillus*
PROBIÓTICAS Y CARACTERIZACIÓN DE SUS
ADHESINAS DE SUPERFICIE**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos
Naturales
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

María Esther Macías Rodríguez

La Paz, B.C.S. Noviembre del 2008

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 15:00 horas del día 18 del Mes de Agosto del 2008, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

SELECCIÓN DE CEPAS DE *Lactobacillus* PROBIÓTICAS Y CARACTERIZACIÓN DE SUS ADHESINAS DE SUPERFICIE

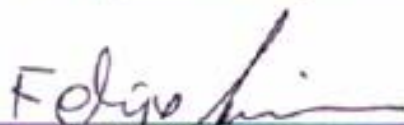
Presentada por el alumno:

María Esther Macías Rodríguez

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



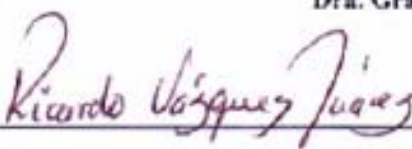
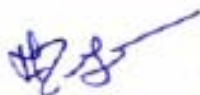
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
DIRECTOR DE TESIS



Dra. Maurilia Rojas Contreras
CO-DIRECTOR

Dra. Monique Zagorec
CO-TUTOR

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
CO-TUTOR



Dr. Ricardo Vázquez Juárez
CO-TUTOR



DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL

El siguiente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Patogénesis Microbiana, del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR); en el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos, de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS) y en la Unité Flore Lactique et Environnement Carné, del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (INRA, France).

El comité tutorial y revisor de tesis estuvo integrado por:

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle (Director)

Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez (Tutor) †

Dr. Ricardo Vázquez Juárez (Tutor)

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro (Tutor)

Departamento de Patología Marina
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR)
La Paz, B.C.S., México

Dra. Maurilia Rojas Contreras (Co-director)

Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos
Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS)
La Paz, B.C.S., México

Dra. Monique Zacogec (Tutor)

Unité Flore Lactique et Environnement Carné (FLEC)
Institut National de la Recherche Agronomique (Jouy en Josas, France)

El comité sinodal estuvo integrado por:

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dra. Maurilia Rojas Contreras

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Suplente:

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Directora de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Lactobacillus es un habitante normal del tracto gastrointestinal de cerdos sanos y su presencia ha estado estrechamente relacionada con la salud de su hospedero. Una de las etapas críticas durante el desarrollo de los cerdos la representa el destete. Un decremento substancial en el número de *Lactobacillus* y un aumento significativo en el número de enterobacterias ha sido reportado durante este período y como consecuencia, las diarreas y otras enfermedades gastrointestinales causadas por patógenos oportunistas son muy comunes. En granjas localizadas en zonas áridas, las condiciones climáticas contribuyen a aumentar el estrés en los lechones. Se ha reportado, que en cerdos expuestos a variaciones de temperatura el estrés causa una disminución en la respuesta inmune y una baja productividad. Por tanto el presente trabajo de tesis se enfocó en dos objetivos principales: 1) Aislar y caracterizar bacterias del género *Lactobacillus* potencialmente probióticas, dirigidas a mantener la salud de cerdos que habitan granjas localizadas en zonas áridas y durante la etapa del destete, 2) Identificar y caracterizar molecularmente proteínas de superficie involucradas en la adhesión a moco y mucina gástrica de cepas de probióticas.

Se aislaron y seleccionaron cepas de *Lactobacillus* abundantes en heces y en mucosas intestinales en cerdos sanos de la región árida-costera de Baja California Sur. Un total de 164 cepas fueron seleccionadas y su habilidad para crecer a 10, 45 y 50°C y en medio MRS conteniendo 430, 680 y 1112 mM de cloruro de sodio (NaCl) fue evaluada. Los resultados mostraron que 75% de las cepas seleccionadas fueron capaces de crecer a 50°C, mientras que 64% presentó habilidad para crecer en medio adicionado con 680 mM de NaCl.

La adhesión a moco y a mucina gástrica fue evaluada en las 164 cepas. Los resultados mostraron que 45% de las cepas aisladas de heces se adhirieron tanto a moco como a mucina mientras que 71% de las cepas aisladas de moco intestinal fue capaz de adherirse. De entre las 164 cepas aisladas, se seleccionó a 27 de estas que presentaron las mejores características de adhesión y de habilidad para crecer a altas temperaturas y en presencia de NaCl. Dichas cepas fueron identificadas a nivel de especie, mediante la secuenciación del gen 16S y de la región intergénica entre los genes 16S-23S del ADNr. Los resultados indicaron que entre las cepas más abundantes en heces se encuentra la especie *L. fermentum*, mientras que en moco la más abundante fue *L. reuteri*.

Mediante un ensayo cualitativo y cuantitativo, se evaluó la habilidad de las cepas para replicarse en moco intestinal de cerdos, observando que 92.6% de estas es capaz de crecer. Finalmente, se evaluó la habilidad de las 27 cepas seleccionadas para crecer en medio conteniendo 0.3, 2.0, 3.5 y 7.5% de sales biliares. Los resultados mostraron que las 27 cepas crecieron en presencia de 3.5% de sales biliares.

Con el fin de identificar proteínas de superficie involucradas en la adhesión de *L. fermentum* BCS87, se llevó a cabo una extracción de las mismas con cloruro de litio 1M (LiCl). Este extracto protéico fue analizado por western blot utilizando moco y mucina marcados con la enzima peroxidasa. Los resultados indicaron la presencia de dos proteínas de peso molecular aparente de 29 y 32 kDa. El extremo amino terminal y péptidos internos de ambas adhesinas fueron secuenciados. El gen que codifica para la proteína de 32 kDa (*32-mmub*) se obtuvo por el método de PCR inversa. La secuencia nucleotídica completa, reveló un marco de lectura abierto (ORF) de 903 nucleótidos que codifica para una proteína primaria de 300 aminoácidos y una proteína madura de 272 aminoácidos. Una búsqueda en Blast mostró que dicha proteína presenta porcentajes de identidad de entre 47 y 99% con componentes de unión a soluto en proteínas transportadoras de glicina/betaína, que han sido reportadas en *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Clostridium*. En la secuencia aminoácida deducida de *32-mmub*, se identificó un dominio conservado OpuAC dentro del cual se agrupan proteínas bacterianas involucradas con el transporte de moléculas y con la osmo-regulación. Un análisis filogenético hecho con la secuencia de *32-Mmubp* y con secuencias miembro de la familia OpuAC, mostró que esta secuencia se encuentra conservada dentro de esta familia.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que animales de granjas localizadas en zonas áridas son una rica fuente de bacterias que poseen potencial probiótico y resistencia a condiciones climáticas adversas. Además la adhesión a moco y mucina que presentó la cepa probiótica de *L. fermentum* BCS87, parece estar mediada por dos adhesinas de superficie de peso molecular aparente de 29 y 32 kDa. La proteína *32-Mmubp*, es un componente de proteínas involucradas en el transporte de solutos que tiene la función adicional de actuar como adhesina en el tracto gastrointestinal de cerdos. Palabras clave: *Lactobacillus*, probióticos, cerdos, zonas-áridas, adhesinas, moco, mucina

ABSTRACT

Lactobacillus inhabits the gastrointestinal tract of healthy pigs and its presence has been related with health issues. Weaning represents a critical period for healthy pigs. This period is characterized by an intestinal decrease in the number of lactobacilli and an increase in the number of enterobacteria. Under these conditions, diarrhea and other gastrointestinal disorders are common. In farms located in arid lands, heat variations contribute to stress the animals, causing susceptibility to gastrointestinal diseases and low efficiencies in the productivity. Therefore, the aim in the present study was 1) To isolate and characterize *Lactobacillus* strains harboring potential probiotic in order to improve the health in pigs that inhabit farms located in arid lands and during the weaning period 2) To identify and characterize adhesive-associated proteins on potential probiotic *Lactobacillus* strains.

A screening of predominant *Lactobacillus* strains from healthy piglets was performed in order to select specific probiotics. The ability of 164 strains to grow at different temperatures and concentrations of NaCl was evaluated. Results showed that all of them grew at 45 °C, 75% at 50 °C and 64% resisted 680mM of salt. Adhesion to mucus and gastric mucin was evaluated showing 45% of strains isolated from faeces were able to adhere whereas 71% of strains from mucus showed mucus binding activity. Among the 164 isolates, 27 adhesive strains were identified using comparisons with 16S rDNA and intergenic 16-23S sequences. Results indicated that *L. fermentum* and *L. reuteri* were the most common species in faeces and mucus respectively.

The ability to grow in gastrointestinal mucus was evaluated in the 27 adhesive strains, showing that 92.6% of adhesive strains were able to replicate. Additionally, bacterial strains growth in MRS containing 3.5% bile salts was evaluated.

On the other hand, protein suspensions obtained by treatment of *L. fermentum* BCS87 with 1M LiCl were analyzed by western blot using HRP-labelled porcine mucus and mucin. Two adhesive-associated proteins of relative molecular weight of 29 and 32 kDa were identified. The N-terminal and internal peptides of the 32 kDa protein (named 32-Mmubp) were sequenced and the corresponding gene (*32-mmub*) was found by inverse PCR. The complete nucleotide sequence of *32-mmub* revealed an ORF of 903 bp encoding a primary protein of 300 amino acids and a mature protein of 272 residues.

A similarity search showed 47 to 99% identity to solute binding components of ABC transporter proteins in *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Clostridium*. An OpuAC conserved domain was identified and a phylogenetic relationship analysis confirmed the 32-MMubp belong to the OpuAC family.

Finally, based on these results we can conclude that animals inhabiting isolated arid coast are a rich source of probiotics, which resist adverse environmental conditions and can colonize the intestinal tract of pigs. Moreover, the adhesion of *L. fermentum* BCS87 appeared to be mediated by two surface-associated proteins of 29 and 32 kDa. The 32-Mmubp is a component of an ABC transporter system that functions also as adhesin.

Key words: *Lactobacillus*, probiotics, pigs, arid land, adhesins, mucus, mucin

DEDICATORIA

A Dios que me ha permitido el milagro maravilloso de la vida

A la memoria de Roberto Carlos

A mis padres con todo mi cariño

AGRADECIMIENTOS

Esta es una de las partes más difíciles de redactar en una tesis (después de las conclusiones claro) porque durante nuestra formación hay muchas personas que de alguna u otra manera contribuyen a que estas etapas tan determinantes en la vida profesional de una persona lleguen a buen fin. Sin lugar a dudas, este trabajo no se habría realizado sin su ayuda, consejos y apoyo. Gracias a todos y perdón si omito a alguien.

Primeramente quiero agradecer a la Dra. Maurilia Rojas quien durante todo este tiempo ha llegado a ser mucho más que mi asesora académica. Gracias por su paciencia, por compartir conmigo sus conocimientos y por haberme aceptado hace muchos años como su estudiante y como su amiga.

Al Dr. Felipe Ascencio por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo. Gracias por el apoyo recibido durante estos años y por sus muy valiosos comentarios y sugerencias.

I wish to express my sincere gratitude to Dr. Monique Zagorec, who with her dynamic ideas, encouragement and warm personality has been an invaluable support through the thesis work. Merci beaucoup Monique.

Al Dr. Ricardo Vázquez Juárez por aceptar ser parte de mi comité tutorial y por aportar siempre y en todo momento muy buenas ideas para que este trabajo mejorara, gracias doc.

Al Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez (†) por tu ayuda, por el interés que siempre mostraste en todo lo relacionado con mi trabajo, gracias por tus consejos, y ya sabes Rober que sigues aquí en nuestros corazones y en nuestra memoria.

A la Dra. Gracia A. Gómez por aceptar ser parte de mi comité tutorial y por tu muy valiosa amistad.

Al CONACyT por la beca otorgada No. 144406 y por brindarme la oportunidad de hacer una estancia en el extranjero al otorgarme una beca mixta. Gracias además al proyecto de colaboración México-France No. M05-A01 por el financiamiento para prolongar mi estancia en Francia.

Gracias a la Dra. Thelma Castellanos, directora del posgrado en el CIBNOR, por su apoyo por sus consejos y por estar en todo momento muy pendiente de mi avance y mis logros.

A todo el grupo de trabajo de posgrado a Osvelia, Letty, la Sra. Lupita, Claudia y Betty por su ayuda gracias.

A toda la patobanda, ustedes son mucho más que mis compañeros de trabajo, gracias por su amistad y por las buenas discusiones científicas y mundanas compartidas durante la hora del café. Gracias a Claus, Perlita, Mau, Kalin, Marthita, Normis, Chula, Rosario, Tania, Jessy, Artemio, Diana, Adriana, Irasema, a Laurita y a los doctores, Angelito y Tony.

To all members at FLEC in INRA for to receive me as a member of your group, for your help during the develop of this thesis, thanks a lot.

A todos mis amigos extranjeros que se convirtieron en mi familia durante el tiempo en el que estuve en Francia. A Luis López, Luis Bermúdez, Borja, Afef, Slim, Fabrizio, Maria, Ewa, Valentina, Jean-Batispte y todos aquellos de los que no recuerdo como se escribe su nombre.

A todos mis amigos cibeños, con quienes he tenido la suerte de llegar a establecer una muy bonita y duradera amistad, a Verito, Laus, Hervey, Estrellita, Lili, Roger, Pedro Cruz, Carmen, José Luis, Delia y Nacho.

A mis amigos universitarios porque siempre han creído en mí y a cada momento me echan porras que me dan fuerza para seguir adelante, gracias a Oscar, Rosalinda, Alfredo, Mony, Ruth y Andrés.

A mis compañeros de generación en especial a Marlene, Cesar y Gastón que en todo momento estuvieron apoyándome con su buena vibra, gracias.

A Manuel y Horacio por ser siempre tan serviciales y eficientes en todo lo relacionado con las broncas de las computadoras, el papel, la impresora, el scanner y toooodooooo lo que nos ocurre a los estudiantes en el centro de cómputo.

A todo el grupo de trabajo de la biblioteca del CIBNOR en especial a la Sra. Ana María y a Tony.

Finalmente, gracias a mi familia y amigos, a mis hermanos Jorge, José Luis, Ramón y Javier, por su enorme cariño y apoyo. A mis cuñadas Luciana, Claudia y Angélica por el apoyo brindado. Y a mis hermosos sobrinos, a Rebeca, Valeria, Ximena y Javito, los amo mis corazones. A mi abuelito Chano (†) y a mi abuelita Evangelina por su enorme amor y cariño. A todos mi tíos, tías, primos y primas, a todos, gracias.

Gracias a todas las personas que contribuyeron a que este trabajo llegara a su término.

PREFACIO

El presente trabajo de tesis doctoral está basado en los siguientes artículos que están referidos con los números romanos I y II, además de los productos de investigación referidos con el número romano III.

A) Publicaciones en revistas internacionales con arbitraje:

I. Macías-Rodríguez, M.E., Zagorec, M., Ascencio, F., Rojas, M. 2008. Potential probiotic *Lactobacillus* strains for piglets in an arid coast. *Annals of Microbiology* (Aceptado).

II. Macías-Rodríguez, M.E., Zagorec, M., Ascencio, F., Vázquez-Juárez, R., Rojas, M. 2008. *Lactobacillus fermentum* BCS87 express on the surface mucus and mucin binding proteins. *Journal of Applied Microbiology* (Manuscrito sometido para su consideración).

B) Secuencias depositadas en el GenBank:

III. Macías-Rodríguez *et al.* 2007 y Macías-Rodríguez *et al.* 2008

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
Acta de liberación de tesis.....	<i>i</i>
Comité tutorial.....	<i>ii</i>
Resumen.....	<i>iii</i>
Abstract.....	<i>v</i>
Dedicatoria.....	<i>vii</i>
Agradecimientos.....	<i>viii</i>
Prefacio.....	<i>x</i>
Índice general.....	<i>xi</i>
Lista de figuras.....	<i>xiii</i>
Lista de tablas.....	<i>xiv</i>
Abreviaturas.....	<i>xv</i>
Capítulo I	
INTRODUCCIÓN	
1.1 <i>Introducción general</i>	1
1.2 <i>El tracto digestivo del cerdo</i>	3
1.2.1. <i>Anatomía y fisiología</i>	3
1.2.2. <i>El moco gastrointestinal: función y composición</i>	7
1.2.3. <i>El establecimiento de la microbiota intestinal</i>	8
1.2.3.1 <i>Los primeros colonizadores</i>	9
1.2.3.2. <i>El destete: adaptación al alimento sólido</i>	11
1.2.3.3 <i>La microbiota intestinal autóctona en cerdos adultos</i>	13
1.2.4. <i>Principales funciones de la microbiota intestinal</i>	14
1.3 <i>Probióticos</i>	
1.3.1. <i>Definición</i>	16
1.3.2. <i>Búsqueda y caracterización de bacterias probióticas</i>	17
1.3.3. <i>Lactobacillus como probiótico</i>	18
1.3.4. <i>Uso de probióticos para producción animal: retos actuales</i>	21
1.4 <i>El género Lactobacillus</i>	
1.4.1. <i>Características fisiológicas y clasificación taxonómica</i>	23
1.4.2. <i>Habitat</i>	24

1.5 Adhesión	
1.5.1. Importancia de la adhesión bacteriana.....	25
1.5.2. Mecanismos de adhesión.....	26
1.5.2.1. Adhesión no-específica.....	26
1.5.2.2. Adhesión específica.....	27
1.5.3. Adhesión de <i>Lactobacillus</i> a células y a componentes epiteliales.....	29
1.5.4. Adhesinas de <i>Lactobacillus</i>	31
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	33
HIPÓTESIS.....	35
OBJETIVOS	
Objetivo general.....	36
Objetivos específicos.....	36
Capítulo II	
Potencial probiótico de cepas de <i>Lactobacillus</i> para cerdos en una costa árida	
2.1 Introducción.....	39
2.2 Materiales y Métodos.....	41
2.3 Resultados.....	42
2.4 Discusión y conclusiones.....	57
Capítulo III	
<i>Lactobacillus fermentum</i> BCS87 expresa en su superficie proteínas que se adhieren a moco y mucina	
3.1 Introducción.....	63
3.2 Materiales y Métodos.....	65
3.3 Resultados.....	66
3.4 Discusión y conclusiones.....	83
DISCUSIÓN GENERAL.....	88
CONCLUSIONES GENERALES.....	91
REFERENCIAS.....	93
Capítulo IV	
ANEXO I.....	112
ANEXO II.....	123
ANEXO III.....	135

LISTA DE FIGURAS

Figura No.		Página
Figura 1.	Representación gráfica del tracto digestivo del cerdo.....	3
Figura 2.	El estómago porcino.....	4
Figura 3.	Esquema que muestra las cuatro capas de la pared del tubo digestivo desde el esófago hasta el intestino grueso.....	6
Figura 4.	El intestino grueso.....	7
Figura 5.	Cambio relativo (en porcentaje) de la flora microbiana de cerdos recién nacidos con respecto al tiempo (h= horas; d= días).....	10
Figura 6.	Desórdenes asociados con el destete temprano en cerdos.....	12
Figura 7.	Principales actividades benéficas y dañinas atribuidas a la microcroflora intestinal.....	17
Figura 8.	Representación esquemática de un modelo teórico de adhesión específica..	28
Figura 9.	Células de <i>Lactobacillus</i> creciendo en moco intestinal de cerdo, teñidas con naranja de acridina.....	48
Figura 10.	Geles de agarosa que muestran los productos de amplificación del gen 16S ADNr y la región intergénica entre los genes 16-23S.....	49
Figura 11.	Árbol filogenético que muestra secuencias del gen 16S ADNr de cepas aisladas de heces y de moco intestinal de cerdos.....	53
Figura 12.	Árbol filogenético que muestra secuencias intergénicas entre los genes 16S-23S del ADNr de cepas aisladas de heces y de moco intestinal de cerdos.....	54
Figura 13.	Patrón de bandeado proteico obtenido por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12%.....	67
Figura 14.	Patrón de bandeado proteico obtenido en un gel de 20x20 cm por electroforesis desnaturizante.....	68
Figura 15.	Producto de amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos degenerados FAAT 8732 y RF10 8732 y oligonucleótidos MEF7 y MER9 diseñados a partir de este primer fragmento.....	72
Figura 16.	Representación esquemática del proceso de PCR inversa.....	73
Figura 17.	Productos de amplificación por PCR inversa obtenidos a partir de ADN digerido con las enzimas <i>Bgl</i> II, <i>Pst</i> I, <i>Sal</i> I y <i>Hind</i> III, respectivamente.....	74
Figura 18.	Productos de amplificación por PCR en colonia de clonas positivas que contienen los insertos <i>Bgl</i> II (M_{11} , M_{12} y M_{13}), <i>Pst</i> I (M_{21} , M_{22} y M_{23}) y <i>Hind</i> III (M_{31} , M_{32} y M_{33}).....	75
Figura 19.	Secuencia nucleotídica del gen <i>32-Mmub</i> de <i>L. fermentum</i> BCS87 y su secuencia de aminoácidos deducida.....	77
Figura 20.	Gráfico de predicción de un sitio de corte y de la presencia de un péptido señal en la proteína <i>32-Mmub</i> obtenido mediante una combinación de varios modelos de redes neuronales artificiales y del modelo de hidden Markov.....	78
Figura 21.	Modelo teórico de predicción de hélices transmembranales en la proteína <i>32-Mmub</i>	79
Figura 22.	Árbol filogenético que muéstrala relación entre secuencias aminoácidas de proteínas miembros de la familia OpuAC.....	82

LISTA DE TABLAS

Tabla No.		Página
Tabla I.	Distribución cuantitativa y cualitativa de microorganismos en el intestino delgado de cerdos jóvenes.....	11
Tabla II.	Principales especies bacterianas cultivables del tracto intestinal de cerdos.....	14
Tabla III.	Características evaluadas en microorganismos probióticos.....	18
Tabla IV.	Diferentes actividades probióticas reportadas para miembros del género <i>Lactobacillus</i>	20
Tabla V.	Microorganismos probióticos utilizados en animales de granja.....	21
Tabla VI.	Factores de adhesión caracterizados en <i>Lactobacillus</i>	32
Tabla VII.	Crecimiento de <i>Lactobacillus</i> a diferentes temperaturas.....	43
Tabla VIII.	Crecimiento de <i>Lactobacillus</i> en medio MRS conteniendo diferentes concentraciones de cloruro de sodio.....	44
Tabla IX.	Adhesión de <i>Lactobacillus</i> a moco y mucina gástrica de cerdo.....	45
Tabla X.	Crecimiento en moco evaluado mediante cuenta viable en medio MRS para cepas seleccionadas.....	47
Tabla XI.	Porcentajes de identidad de las secuencias correspondientes al gen 16S y a la región intergénica entre los genes 16-23S del ADN ribosomal.....	52
Tabla XII.	Resumen de características evaluadas en 27 cepas de <i>Lactobacillus</i> seleccionadas.....	56
Tabla XIII.	Péptidos amino terminal e internos de las proteínas de 29 y 32 kDa de <i>L. fermentum</i> BCS87.....	69
Tabla XIV.	Oligonucleótidos usados para las amplificaciones por PCR durante la búsqueda del gen que codifica para la proteína de 32 kDa.....	71
Tabla XV.	Identidad y similitud entre la proteína 32-Mmub de <i>L. fermentum</i> BCS87 y componentes de proteínas transportadoras de aminoácidos del tipo ABC-transporter.....	80

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNr	Ácido desoxiribonucleico ribosomal
BAL	Bacterias ácido lácticas
°C	Grados Celsius
dNTPs	Mezcla de desoxiribonucleótidos trifosfatados
<i>et al.</i>	y colaboradores (abreviación en latín)
FAO	Food and Agriculture Organization (siglas en inglés)
FDA	Food and Drug Administration (siglas en inglés)
g	Componente centrífugo (gravedades)
GRAS	Generally Recognize as Safe (siglas en inglés)
h	Hora (s)
HRP	Horse Radish Peroxidase (siglas en inglés)
kDa	Kilodaltones
kb	Kilopares de bases
l	Litro
M	Concentración molar
LC-MS/MS	(Cromatografía líquida-Espectrometría de masas) Espectrometría de masas nanoESI
mM	Concentración milimolar
min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)
MP	Máxima Parsimonia (siglas en inglés)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (siglas en inglés)
NJ	Neighbor-joining (siglas en inglés)
OMS	Organización mundial de la salud
ORF	Open Reading Frame (siglas en inglés)
PAUP	Phylogenetic Analysis Using Parsimony (siglas en inglés)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)
pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrógeno
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (siglas en inglés)
s	Segundo (s)
32-Mmubp	Adhesina de 32kDa-Mmubp (Mucus and mucin binding protein; siglas en inglés)
32-mmub	Gen que codifica para la adhesina 32-Mmubp
µg	Microgramo (s)
µl	Microlitro (s)

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción general

La creciente demanda de alimentos a nivel mundial ha propiciado que en años recientes se hayan creado programas que promueven el mejoramiento en los sistemas de producción animal (<http://www.ars.usda.gov/research/programs/>). En dichos programas se han identificado puntos estratégicos importantes entre los que se distinguen primero, un mejoramiento en la eficiencia biológica traducido como mejoramiento genético y segundo, un mejoramiento en la salud y bienestar de los animales en las granjas. Este segundo punto considera que las enfermedades comprometen la salud general de los animales y por tanto la productividad. Una reducción en el número y frecuencia de enfermedades así como la reducción en el uso de productos farmacéuticos (antibióticos) disminuirá los costos de producción y eso se verá reflejado en productos de alta calidad libres de compuestos químicos que puedan causar un problema de salud en los consumidores. En ese sentido, una de las vías propuestas considera la optimización en el uso de microorganismos específicos que habitan el tracto intestinal de animales de granja y que de antemano se sabe le confieren un beneficio a la salud del hospedador (microorganismos probióticos) (Reid & Friendship 2002). En granjas porcícolas, el uso de suplementos probióticos durante los períodos críticos de desarrollo del animal, ha venido en aumento en los últimos años (Figuroa-Velasco *et al.* 2006). Existen en el mercado un gran número de productos enfocados a mejorar la inmunidad de los animales y por consecuencia la resistencia de los mismos a las enfermedades sobre todo de tipo bacteriano (<http://www.porcicultura.com/>). Sin embargo, se ha demostrado que las habilidades probióticas de dichos microorganismos son cepa-dependientes (Lin *et al.*

2007). Se sabe además que animales de granjas localizadas en zonas con climas extremos se ven severamente afectados principalmente por efecto de la temperatura (Shimizu *et al.* 1978). Se ha demostrado que dichas variaciones repercuten severamente en la productividad debido a la pérdida de peso en los animales (Zumbach *et al.* 2008). Así pues, es evidente la necesidad que existe de desarrollar alternativas que vayan dirigidas a aumentar la productividad y a mejorar las condiciones de salud de animales de granja que habitan bajo condiciones climatológicas extremas, en específico aquellas localizadas en zonas áridas (Chiduwa *et al.* 2008).

Por otra parte, a pesar del gran número de trabajos en los que se ha evidenciado el efecto benéfico que ejercen ciertos microorganismos sobre la salud de su hospedero, aún existen muchas preguntas relacionadas con los mecanismos moleculares que dichos microorganismos probióticos utilizan para llevar a cabo estos beneficios (Marco *et al.* 2006). Se sabe que la inhibición de la adhesión y el desplazamiento de patógenos específicos en superficies mucosas es un mecanismo que impide el desarrollo de enfermedades infecciosas (Sgouras *et al.* 2004). Además, la adhesión de microorganismos probióticos se ha relacionado con la estimulación del sistema inmune (Maldonado-Galdeano *et al.* 2007). Son muchos los trabajos que se han enfocado en el estudio de los mecanismos involucrados en la adhesión y colonización de mucosas gastrointestinales en bacterias patógenas (Lidén *et al.* 2004; Torres *et al.* 2006). Sin embargo, en bacterias benéficas como las pertenecientes al género *Lactobacillus* poco se sabe acerca de los mecanismos que estas utilizan para adherirse y colonizar. Aún es necesario conocer quienes son las moléculas involucradas en este proceso y si dicha adhesión es o no específica. Obviamente,

debido a la complejidad del nicho ecológico en el que estos microorganismos habitan, son muchos los factores que deben ser considerados durante el estudio de este fenómeno, sin embargo la descripción de las biomoléculas involucradas directamente en la adhesión nos permitirá continuar con la elucidación de dichos mecanismos.

1.2 Tracto digestivo del cerdo

1.2.1 Anatomía y fisiología

El cerdo es un mamífero que se encuentra clasificado dentro del grupo de los animales monogástricos. Su tracto digestivo esta compuesto por cinco secciones principales identificados como la boca, el esófago, el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso (Rowan *et al.* 1997) como se muestra en la Figura 1:

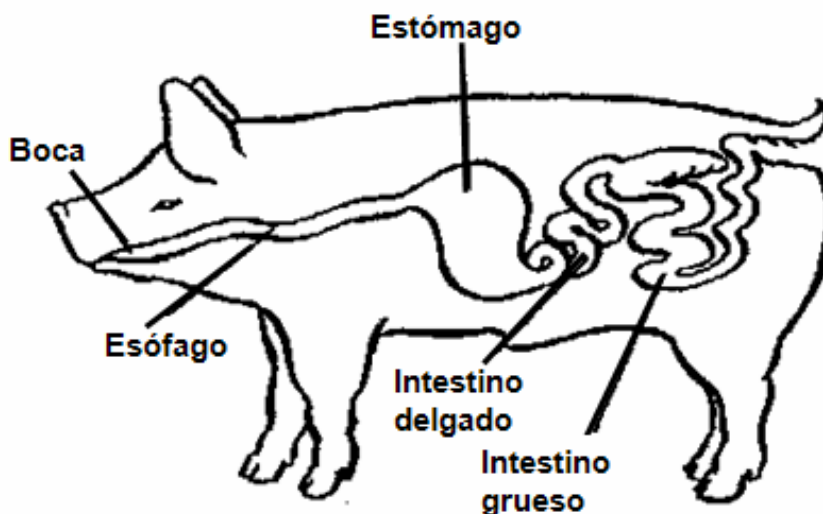


Figura 1. Representación gráfica del tracto digestivo del cerdo (Rowan 1997).

Dentro de cada una de las secciones que comprenden el tracto digestivo del cerdo, se llevan a cabo actividades específicas. Así pues, en la boca se lleva a cabo la ruptura mecánica de los alimentos y es aquí donde el alimento se mezcla con la

saliva. La saliva contiene moco que sirve de lubricante y de protector de las superficies mucosas, además contiene enzimas digestivas como la α -amilasa, lipasas, lactoperoxidasas y lisozima que permiten el rompimiento eficiente de componentes del alimento. El esófago sirve de tubo transportador de esta mezcla de alimento-saliva entre la boca y el estómago. Es en el estómago donde finalmente se recibe el alimento ingerido y donde este se transforma en un producto homogéneo en términos de pH, osmolaridad, consistencia y temperatura (Ouweland 1996). Dentro del estómago porcino, se distinguen 4 regiones mucosales principales referidas como región esofágica, región cardial, región fúndica y la región pilórica (Figura 2).

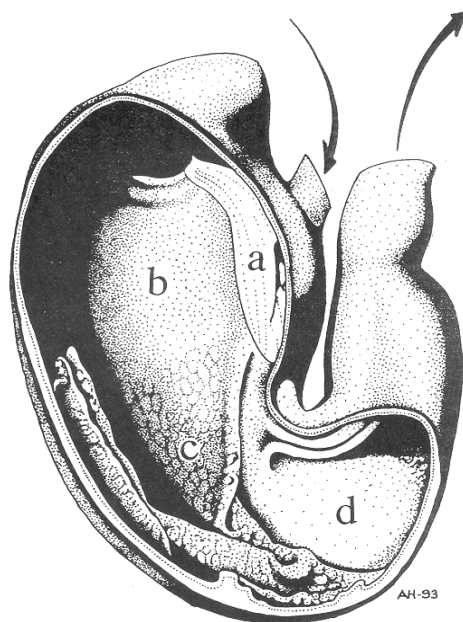


Figura 2. El estómago porcino. Regiones mucosales: esofágica (a), cardial (b), fúndica (c) y pilórica (d) (Henriksson 1993).

La región esofágica, cubre alrededor del 5% del total de la mucosa estomacal. Esta región está cubierta por epitelio estratificado no secretor (no glandular). Por su parte la región cardial cubre alrededor del 30% del área estomacal porcina, mientras que la

región fúndica, que es la más grande, cubre una región aproximada del 44%. Finalmente la región pilórica se encuentra localizada en la región distal al final del estómago, y esta cubre un área de alrededor del 21% del estómago porcino. El intestino delgado por su parte, se encuentra dividido en tres partes identificadas como duodeno (0.7-0.9 m), yeyuno (14-19 m) e íleon (0.7-1m) (Nickel *et al.* 1973). La estructura del epitelio a lo largo del intestino delgado es muy similar y así, la mucosa del intestino delgado se puede dividir en tres capas principales mismas que se encuentran separadas una de otra. La primera y más profunda se conoce como muscular propia (*muscular muscularis*) ésta, se encuentra unida por abajo a las células epiteliales. La siguiente capa la constituye la submucosa, que consiste de tejido conectivo denso no modelado y finalmente se encuentra la mucosa que consiste en un epitelio de revestimiento, un tejido conectivo subyacente denominado lámina propia y la muscular de la mucosa compuesta por una delgada capa de músculo liso. La mucosa del tubo digestivo tiene tres funciones principales de barrera, secretora y absorbiva (Ross *et al.* 1997). La lámina propia forma la base para las vellosidades o villis que son estructuras en forma de dedos con criptas cercanas a la muscular propia y que cuentan con una punta dirigida hacia el lumen y las criptas epiteliales circundantes (ver Figura 3). La lámina propia contiene sangre y vasos linfoides, nervios, músculo liso, tejido conectivo, linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos. Además, está involucrada en reacciones inmunológicas y provee el transporte del material absorbido desde las células epiteliales a sitios distantes. Las células epiteliales se dividen en células secretoras de moco, células goblet y células absorbivas. La vida promedio de estas células es de solo 2 a 4 días (Rowland 1981) y generalmente la estructura de estos villis cambia cuando el hospedero es infectado

y/o colonizado por microorganismos. Todos estos cambios en la morfología de las vellosidades intestinales se ha hecho evidente con base en estudios realizados con animales libres de gérmenes (Shirkey *et al.* 2006).

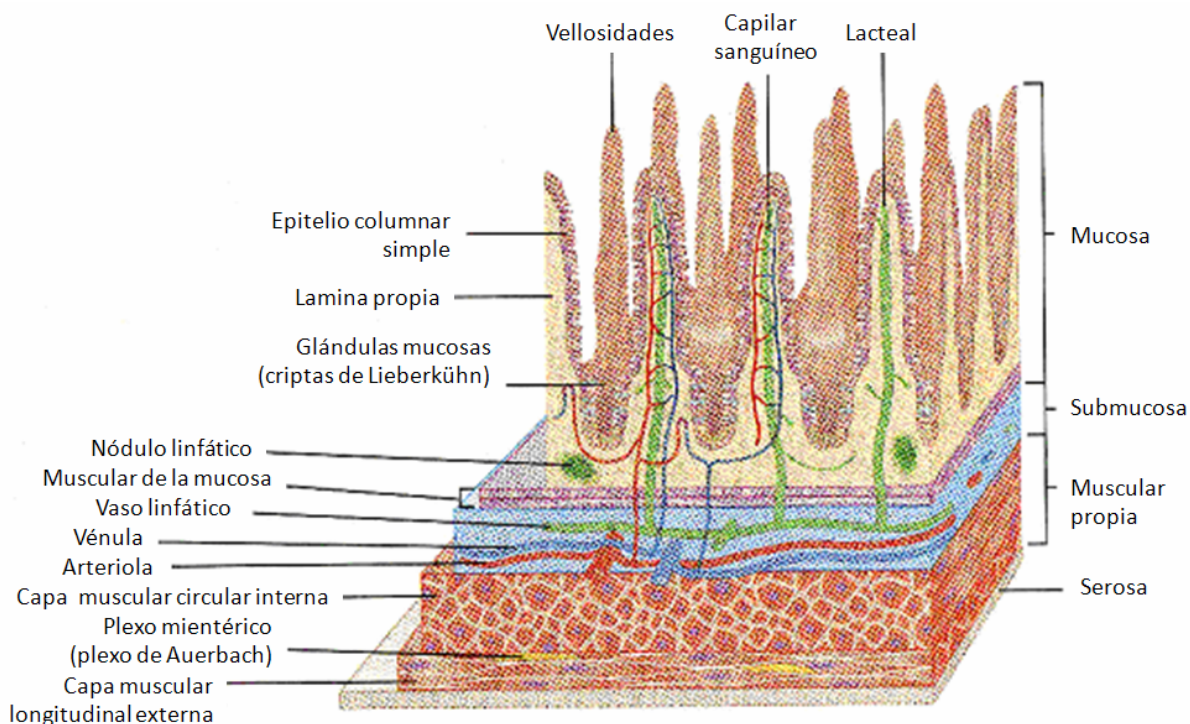


Figura 3. Esquema que muestra las cuatro capas de la pared del tubo digestivo desde el esófago hasta el intestino grueso, la mucosa, la submucosa, la muscular propia (*muscular muscularis*) y la serosa (Ross *et al.* 1997).

La última región descrita en el tracto digestivo del cerdo es el intestino grueso. Una “bolsa oculta” conocida como ciego está localizada a la entrada del intestino grueso (Figura 4). Este es una de las partes más grandes del tracto digestivo, es mucho mas corto que el intestino delgado pero mayor en su diámetro. Su principal función es la absorción de agua, pero sirve a su vez de reservorio de materiales de desecho que componen las heces. Una cantidad considerable de moco se añade al material de desecho y este sirve de lubricante para facilitar el paso de dicho material a través del

intestino. La porción final del intestino grueso es conocido como recto y es aquí donde se encuentra el ano que es una abertura a través de la cual el alimento no digerido es desechado del cuerpo.

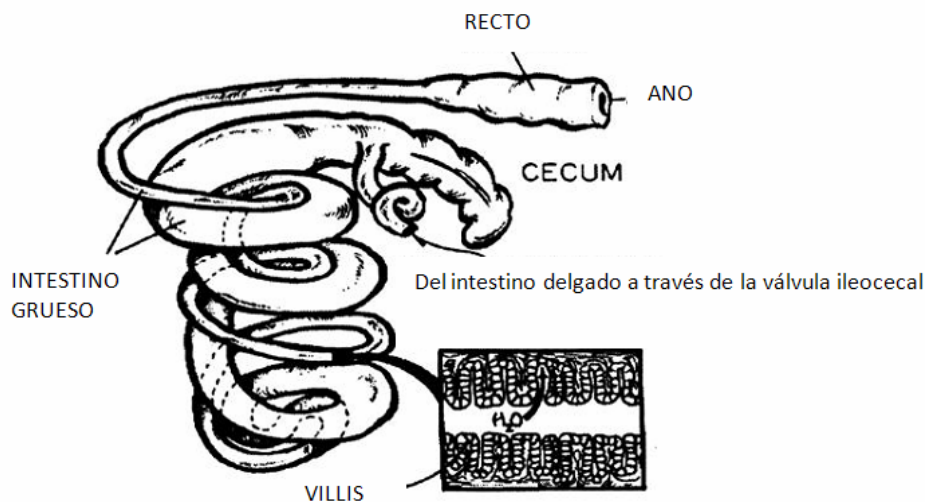


Figura 4. El intestino grueso (Rowan 1997).

1.2.2 El moco gastrointestinal: función y composición

El moco es una estructura tipo gel secretada por células goblet y por las glándulas mucosales que cubren al epitelio gastrointestinal. Los componentes principales del moco son moléculas de alto peso molecular ($> 2 \times 10^6$ Da) llamadas mucinas que son polímeros formados a su vez de monómeros proteicos altamente glicosilados que se mantienen unidos entre sí por enlaces disulfuro (Mantle *et al.* 1984). El epitelio intestinal y en específico la capa de moco que la cubre es el sitio anatómico donde se lleva a cabo el primer contacto entre el hospedador y las bacterias (Deplancke & Gaskins 2001). De hecho, patógenos que comúnmente habitan las superficies gastrointestinales como *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Salmonella*

typhimurium reconocen específicamente a proteínas del moco, lo que les permite adherirse y por consecuencia colonizar este nicho ecológico (Fang *et al.* 2000; Vimal *et al.* 2000). La función protectora del moco es casi siempre considerada desde el punto de vista de sus propiedades químicas y físicas y es visto como un componente estático y constitutivo. El concepto de que el moco funciona como una barrera dinámica de defensa ha sido sugerido con base en estudios hechos *in vivo* que muestran un incremento en la secreción de moco en respuesta a microorganismos intestinales (Mack *et al.* 1999). En este sentido, se considera que tanto la barrera mucosa como la flora microbiana normal que en ella habita, disminuyen el acceso de bacterias potencialmente patógenas a la superficie del tejido intestinal impidiendo que estas penetren e invadan el epitelio (Cover & Aber 1989, Mantle & Husar 1994) pero al mismo tiempo la adhesión bacteriana al moco resulta ser substancial en el proceso de colonización (Fang *et al.* 2000).

1.2.3 El establecimiento de la microbiota intestinal

Al momento de nacer, el aparato digestivo del porcino es prácticamente estéril, pero es colonizado rápidamente por una gran diversidad de microorganismos. El establecimiento de la microbiota intestinal en cerdos es un proceso que involucra una primera fase de colonización donde el intestino de los recién nacidos es rápidamente invadido por un gran número de bacterias. Este a su vez es seguido por diferentes pasos de sucesión bacteriana donde diversos grupos dominantes se vuelven predominantes (Thompson-Chagoyán *et al.* 2007). El proceso continúa de hecho hasta que los cerdos maduran, resultando finalmente en una comunidad microbiana característica y dinámica (Rolfe *et al.* 1996). La complejidad de la microbiota se ve influenciada por varios factores relacionados con su interacción con otras bacterias,

pero además con respuestas fisiológicas propias del hospedador, entre las que se encuentran la secreción de enzimas digestivas, el pH gástrico, la secreción de sales biliares, la composición del moco, el paso luminal y los hábitos de alimentación del mismo (Stewart *et al.* 1993; Hill *et al.* 2005). La microbiota intestinal del cerdo varía de manera cualitativa y cuantitativa a través del tracto gastrointestinal (Berg 1996; Simpson *et al.* 1999), encontrando las cuentas más altas en el ciego y en el colon.

1.2.3.1 Los primeros colonizadores

Durante las primeras horas posteriores al nacimiento, el tracto gastrointestinal porcino es colonizado por microorganismos que se encuentran en la vagina, heces y piel de la madre, además de otros microorganismos que provienen del medio ambiente circundante (Conway 1997). Un estudio llevado a cabo por Katouli y colaboradores (1997), demostró una alta similitud entre la microflora de las jaulas en las que nacen los lechones y donde se desarrollan durante los primeros días de vida, con la observada en el tracto intestinal de los mismos. Este trabajo confirmó que la población microbiana que coloniza durante la primera etapa de vida de los cerdos está asociada principalmente con la madre y con el medio ambiente que rodea a la granja tal como lo sugirió Ewing & Cole (1994) en un trabajo anterior. En esta primera fase, los aerobios y anaerobios facultativos aparecen como los grupos predominantes (Figura 5). Estos comprenden alrededor del 80% del total de la flora intestinal, y se han cuantificado hasta 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de contenido en el colon solo tres horas después del nacimiento (Swords *et al.* 1993). Los primeros colonizadores, modifican el ecosistema gastrointestinal por consumo de oxígeno molecular, haciendo que este sea favorable para que los anaerobios colonicen. Como resultado, las bacterias aerotolerantes son

gradualmente suplantadas por anaerobios estrictos, y 48 h después del nacimiento, los cerdos cuentan ya con hasta 90% de bacterias anaerobias en su tracto intestinal (Figura 5).

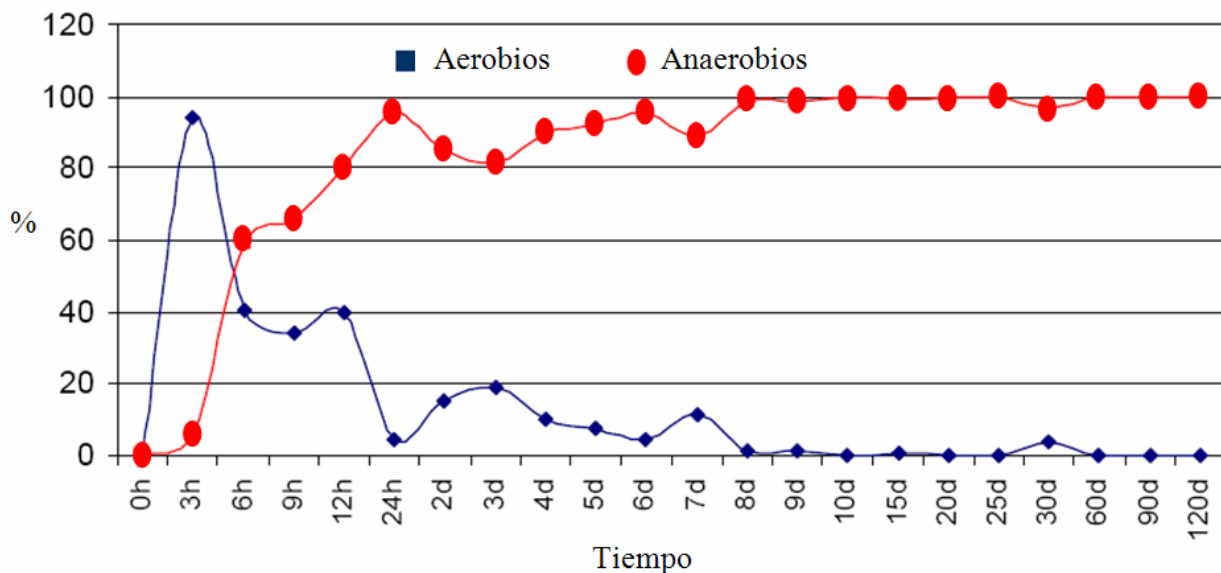


Figura 5. Cambio relativo (en porcentaje) de la flora microbiana de cerdos recién nacidos con respecto al tiempo (h= horas; d= días) (Castillo 2006).

De estos grupos bacterianos, *Lactobacillus* y *Streptococcus* aparecen como dominantes al final de la primera semana de vida y se mantienen hasta antes del destete con cuentas que van de 10^7 - 10^9 UFC/gr de contenido (Swords *et al.* 1993; Ewing & Cole 1994). Esto confirma lo que en un trabajo previo reportaron Kenworthy & Crabb (1963) quienes mostraron que grupos microbianos específicos, entre ellos los lactobacilos, se encuentran colonizando el intestino delgado de lechones sólo un día después del nacimiento (Tabla I).

Tabla I. Distribución cuantitativa y cualitativa de microorganismos en el intestino delgado de cerdos jóvenes (Cuentas microbianas x 10⁶, expresadas por gramo de contenido húmedo).

Edad del cerdo (días)	Sitio intestinal	<i>Escherichia coli</i>	Lactobacilos	Clostridia	Cocos Gram positivos	Levaduras	Total
1	Yeyuno	0.05	0.50	0.40	0.25	0	1.20
	Íleon	5.00	6.30	10.00	40.00	0	61.30
11	Yeyuno	0.85	400.00	0.16	10.00	0	411.01
	Íleon	17.50	200.00	50.00	1585.00	0	1852.50
30	Yeyuno	6000.00	1000.00	0.0	0.30	0.005	7000.30
	Íleon	3000.00	50.00	0.0	1.26	0.002	3051.26

(Adaptada de Kenworthy & Crabb 1963)

1.2.3.2. El destete: adaptación al alimento sólido

La producción porcícola moderna ha adoptado prácticas que involucran el destete temprano de lechones a las 3 o 4 semanas de vida y de manera súbita. En ese momento, el lechón está sujeto a cambios muy complejos que incluyen la separación de la madre, la exposición del animal con otros animales que no pertenecen a su familia y sobre todo a cambios ambientales y nutricionales (Fraser *et al.* 1998). Como resultado, los lechones destetados dejan de comer (Le Dividich & Herpin 1994) y por consecuencia ocurren cambios importantes en la estructura intestinal, los cuales se asocian con una ruptura en la capacidad funcional y que conllevan a su vez a que existan disturbios o cambios negativos en la salud de los animales (Figura 6). De manera particular, la anorexia promueve cambios relacionados con la composición microbiana, todo esto cuando el sustrato usado por microorganismos fermentativos se agota. Como consecuencia, durante la primera semana posterior al destete, la microbiota se vuelve muy inestable y generalmente hay un decremento en la biodiversidad (Wallgren & Melin 2001), la cual se estabilizará después de un período de dos a tres semanas (Jensen *et al.* 1998). En general, se ha observado que

durante este período hay una disminución en el número total de bacterias cultivables (Franklin *et al.* 2002). Además esta fase de inestabilidad se caracteriza por una suplantación de bacterias anaerobias Gram positivas por las del tipo Gram negativo en específico las del género *Bacteroides* (Swords *et al.* 1993).



Figura 6. Desórdenes asociados con el destete temprano en cerdos.

Estos cambios fueron confirmados por Jensen (1998) quien reportó un incremento sustancial de bacterias Gram negativas en el intestino grueso durante los primeros días posteriores al destete. De manera particular, se ha reportado un decremento de hasta 100 veces en la población de *Lactobacillus* de manera paralela al incremento

de hasta 50 veces en el número de enterobacterias (en específico de *Escherichia coli*) durante este período (Castillo *et al.* 2007). Finalmente, como resultado de este desequilibrio en la microbiota intestinal, los lechones se vuelven más susceptibles a enfermedades causadas por patógenos oportunistas tal como se ejemplifica en la Figura 6 (Hopwood & Hampson *et al.* 2003).

1.2.3.3 La microbiota intestinal autóctona en cerdos adultos

Después del período de adaptación posterior al destete, la microflora normal en animales sanos se vuelve estable observando normalmente un incremento en el número de microorganismos conforme nos movemos del estómago hacia el ciego (Ewing & Cole 1994). Las cuentas reportadas tanto en el estómago como en las primeras secciones del intestino delgado van de 10^7 a 10^9 UFC/gr de contenido húmedo (Jensen & Jorgensen 1994) predominando los grupos *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Jensen 2001) junto con otro grupo de enterobacterias entre los que se encuentran, *Clostridium*, *Eubacterium* y *Bifidobacterium* (Melin 2001; Conway 1994). En la sección distal del intestino delgado, las condiciones varían ligeramente en relación a las encontradas en la región cercana al estómago. Entre las bacterias cultivables más importantes de esta región se encuentran los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, Enterobacterias, *Bacillus* y *Bacteroides* spp (Conway 1994; Jensen 2001; Hill *et al.* 2005). Finalmente, el ciego y el colon representan el sitio donde se lleva a cabo la mayor actividad de fermentación microbiana en el intestino del cerdo, y esta sección se caracteriza además por una muy alta diversidad poblacional. Cientos de especies bacterianas anaerobias coexisten en esta región y se han reportado cuentas que van de 10^{11} a 10^{12} UFC/gr de contenido (Ewing & Cole 1994). La mayor parte de las bacterias cultivables descritas en el ciego y en el colon

de cerdos sanos lo representan las bacterias Gram positivas anaerobias (alrededor del 90%), mientras que las bacterias Gram negativas cubren solamente un 10% de las bacterias totales cultivables en esta región (Salanitro *et al.* 1977; Rusell 1979; Moore *et al.* 1987). En la tabla II se describen las principales especies bacterianas cultivables reportadas en el tracto intestinal de cerdos sanos.

Tabla II. Principales especies bacterianas cultivables del tracto intestinal de cerdos.

Bacteria
<i>Bacteroides (Prevotella) ruminicola</i>
<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. uniformis</i> , <i>B. furcosus</i> , <i>B. pyogenes</i> , <i>B. amilophilus</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>B. boum</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. pseudolongum</i>
<i>Butyribibio</i> sp., <i>B. fibrisolvens</i>
<i>Clostridium</i> sp., <i>C. putrificum</i> , <i>C. welchii</i> , <i>C. perfringens</i>
<i>Enterococcus</i> sp., <i>E. avium</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. hirae</i>
<i>Escherichia coli</i> y otros miembros de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Eubacterium</i> sp., <i>E. tenue</i> , <i>E. lentum</i> , <i>E. cylindroids</i> , <i>E. rectal</i>
<i>Fibrobacter succionogenes</i>
<i>Fusobacterium prausnitzii</i> , <i>F. necrophorum</i>
<i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. agilis</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. salivarius</i>
<i>Megasphaera elsdenii</i>
<i>Pediococcus halophilus</i>
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Propionibacterium acnes</i> , <i>P. granulosum</i>
<i>Ruminococcus</i> sp., <i>R. flavefaciens</i>
<i>Streptococcus</i> sp., <i>S. salivarius</i> , <i>S. bovis</i> , <i>S. morbillorum</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. durans</i> , <i>S. equines</i> , <i>S. intestinalis</i>

(Adaptada de Stewart 1999)

1.2.4 Principales funciones de la microbiota intestinal

A principios del siglo pasado Metchnikoff llevó a cabo los primeros trabajos que sugerían que la composición de la microflora gastrointestinal era esencial para mantener la salud de su hospedador, pero además sugería ya que dicha flora podía ser manipulada mediante el consumo de alimentos fermentados, esto con el fin de

augmentar la longevidad (Metchnikoff 1907). En los últimos años ha habido un creciente interés por entender cual es el papel específico que juegan ciertos grupos microbianos en la salud. Se sabe que la microbiota intestinal tiene una influencia directa sobre la estructura, función y maduración del tracto gastrointestinal (Berg *et al.* 1996; Falk *et al.* 1998). Se han observado cambios morfológicos evidentes cuando se comparan animales libres de gérmenes con animales inoculados con bacterias. De manera específica, entre ellos se han descrito diferencias relacionadas con la reducción en la masa intestinal por unidad de longitud además de un alargamiento del ciego con una disminución en el grosor de la mucosa (Wostmann 1996). La ausencia de microorganismos en el tracto gastrointestinal ha sido relacionada además con un menor grosor en las vellosidades intestinales además de una menor profundidad en las criptas (Umesaki *et al.* 1993; Umesaki *et al.* 1995; Wostmann 1996). Sin embargo, García-Lafuente y colaboradores (2001) demostraron que no todas las especies bacterianas ejercen el mismo efecto sobre la morfología intestinal. Mientras que especies de *Lactobacillus* comensales pueden mejorar la tirantez de la barrera intestinal, otros microorganismos comensales no patógenos como *Escherichia coli* pueden deteriorarla e incrementar la permeabilidad del mismo a toxinas lumbinales (García-Lafuente *et al.* 2001). En un estudio reciente se observó que durante el período crítico de destete hay un decremento en la densidad de las criptas y en el número de células goblet, a la vez que se incrementa el índice mitótico (Castillo *et al.* 2007), además se observó una reducción en la respuesta inmunológica manifestada por un incremento en los niveles de linfocitos a nivel intraepitelial y en la densidad de linfocitos en la lamina propia. Todos estos cambios fueron relacionados con un cambio en la estructura microbiana y en

particular, con la reducción en el número de bacterias Gram positivas. Sin embargo, a pesar de estos resultados se sabe que los efectos individuales de especies bacterianas sobre el epitelio intestinal no son representativos en sí del efecto que estas mismas pueden ejercer en un ecosistema microbiano mucho más complejo donde se sabe de hecho, que la función de cada individuo es además modulada por la presencia de otras especies. Sin embargo, los efectos benéficos individuales observados para ciertos grupos bacterianos, nos dan un panorama general de cual es la contribución de cada uno de ellos dentro de este tan complejo nicho ecológico. En este sentido, se ha demostrado que ciertos grupos microbianos que habitan las superficies gastrointestinales llevan a cabo actividades benéficas relacionadas principalmente con 1) el establecimiento de una barrera que impide la colonización del epitelio gastrointestinal por microorganismos exógenos potencialmente patógenos (Kim *et al.* 2008), 2) un efecto nutricional relacionado con su potencial enzimático (Wolf 2006), 3) una producción de metabolitos benéficos (Cheikhyoussef *et al.* 2008) y 4) la estimulación del sistema inmune (Kelly *et al.* 2005; Cerruti & Rescigno 2008). En la Figura 7 se esquematiza de manera general las principales actividades benéficas y dañinas causadas por microorganismos que habitan y/o invaden las superficies epiteliales.

1.3 Probióticos

1.3.1. Definición

Una de las definiciones aún aceptadas entre la comunidad científica describe a los probióticos como “microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al hospedero efectos saludables” (Guarner & Schaafsma 1998). Esta definición ha acotado la utilización del término probiótico a los productos

que contienen microorganismos vivos y por otra parte indica la necesidad de proporcionar una dosis apropiada de bacterias probióticas para obtener los efectos deseados (FAO/WHO 2002). A la fecha, aunque han sido sugeridas un gran número de definiciones más, se considera que esta sigue siendo adecuada para definir a los probióticos.

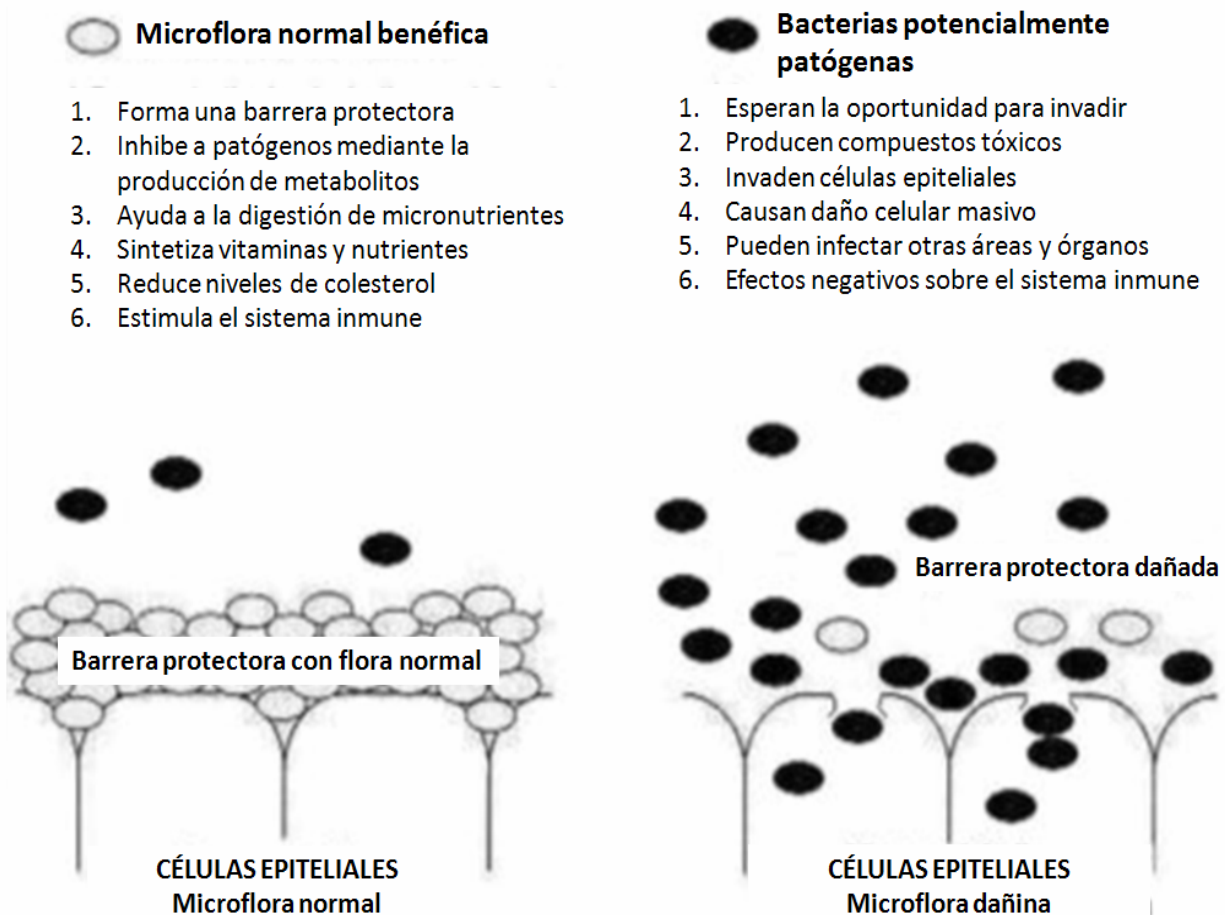


Figura 7. Principales actividades benéficas y dañinas atribuidas a la microcroflora intestinal.

1.3.2. Búsqueda y caracterización de bacterias probióticas

A la fecha, existe un gran número de reportes que describen tanto el aislamiento como la caracterización de bacterias potencialmente probióticas para ser utilizadas

en humanos, animales terrestres y animales marinos de importancia comercial. Entre los géneros comúnmente evaluados se encuentran *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Streptococcus*, *Escherichia coli* y *Bifidobacterium* (Verschuere *et al.* 2000; Sullivan & Nord 2005; Reid *et al.* 2006; Elahi *et al.* 2008). De manera general, las características evaluadas en bacterias potencialmente probióticas se encuentran relacionadas con su habilidad para adherirse y colonizar, inhibir el crecimiento o la adhesión de patógenos y con actividades relacionadas con la estimulación del sistema inmune. Sin embargo, existe una serie de requerimientos más que deben ser considerados al caracterizar a los probióticos, en la tabla III se describe a los más importantes.

Tabla III. Características evaluadas en microorganismos probióticos

Criterios
De preferencia ser del mismo origen del organismo en el que se va a aplicar
No ser patógeno, no invasivo, no carcinogénico
Demostrar resistencia a procesos tecnológicos
Demostrar resistencia a ácidos gástricos y sales biliares
Adherirse a tejido epitelial del intestino y a componentes gastrointestinales
Ser capaz de colonizar el tracto gastrointestinal, al menos por períodos cortos de tiempo
Habilidad para co-agregarse
Excluir o reducir la adhesión de patógenos
Producir sustancias antimicrobianas como ácidos, peróxido de hidrógeno o bacteriocinas
Modular la respuesta inmune
Ejercer influencia sobre actividades metabólicas que mejoren la salud del hospedero (ej. asimilación de colesterol, producción de vitaminas, etc)

(Adaptado de Reid 1999 y Teitelbaum & Walker 2002)

1.3.3. *Lactobacillus* como probiótico

Uno de los géneros mejor caracterizados como probióticos es *Lactobacillus*. Los miembros de este género han sido considerados por la FDA (Food and Drug

Administration) dentro del status GRAS (Generally Recognized as Safe), por tanto su uso cumple con uno de los principales requerimientos mencionados en la tabla 1.3, el de no ser patógenos. Algunas especies miembros de este género han sido plenamente estudiadas y se han descrito los mecanismos específicos mediante los cuales llevan a cabo su acción benéfica en el hospedero, estas se mencionan en la tabla IV.

Tabla IV. Diferentes actividades probióticas reportadas para miembros del género *Lactobacillus*.

Organismo probiótico	Efecto sobre la salud	Posible mecanismo	Referencia
<i>Lactobacillus GG</i>	Mejora la condición de niños que padecen enteritis regional (Crohn's disease)	Estimula la secreción de IgA en el intestino y mejora la permeabilidad intestinal	Malin <i>et al.</i> 1996; Gupta <i>et al.</i> 2000
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Protege contra infecciones causadas por <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	Modula la respuesta inmune como resultado de un contacto íntimo entre el probiótico y el hospedero	Hirano <i>et al.</i> 2003
<i>Lactobacillus casei</i>	Prevención de diarrea causada por <i>E. coli</i>	Inhibe la permeabilidad paracelular inducida por <i>E. coli</i> enteropatógena	Parassol <i>et al.</i> 2005
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Reparación de tejido en modelos afectados por quemaduras	Mejoramiento en la reparación del tejido mediante un incremento en la fagocitosis y un decremento en la apoptosis	Valdéz <i>et al.</i> 2005
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Mejora las condiciones de salud durante episodios diarreicos	Produce linfocitos CD4-positivos en el epitelio del íleon	Valeur <i>et al.</i> 2004
<i>Lactobacillus casei shirota</i>	Inhibición <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>Helicobacter pylori</i>	Inhibición de actividad ureasa y de la viabilidad de <i>H. pylori</i> por efecto directo del ácido láctico	Sgouras <i>et al.</i> 2004
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Protección <i>in vivo</i> contra <i>Salmonella choleraesuis</i> en ratones Balb/c	Producción de compuestos antimicrobianos e inhibición de la adhesión	Olivares <i>et al.</i> 2006
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Previene infecciones provocadas por <i>E. coli</i> O157:H7 enterohemorrágica	Inhibe la transcripción de genes involucrados en la colonización	Medellin-Peña <i>et al.</i> 2007
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Previene daños causados por la ingestión de alimentos contaminados con aflatoxina B1 que es un potente hepatocarcinógeno	Se une a las moléculas de aflatoxina B1 e impide la absorción de las mismas en el intestino	Gratz <i>et al.</i> 2007
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Evita infecciones vaginales e intestinales	Produce reuterina en el tracto intestinal y en la vagina restaura la microflora normal mediante la producción de peróxido de hidrógeno, biosurfactantes, ácido láctico y estimula el sistema inmune	Cadieux <i>et al.</i> 2008
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Protección <i>in vivo</i> contra <i>Salmonella</i> en ratones Balb/c	Producción de compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica e inmunomodulación	Zoumpopoulou <i>et al.</i> 2008

1.3.4. Uso de probióticos para producción animal: retos actuales

A pesar de que se ha demostrado experimentalmente la eficacia de un gran número de microorganismos probióticos para prevenir o controlar enfermedades sobre todo de tipo bacteriano en animales de granja (Tabla V), aún existe escepticismo entre los productores quienes se resisten a abandonar las viejas prácticas de producción.

Tabla V. Microorganismos probióticos utilizados en animales de granja.

Probiótico	Organismo blanco	Beneficio	Referencia
Probiótico comercial "Toyocerin", contiene esporas de <i>Bacillus toyi</i>	Cerdos	Reducción en el número de células bacterianas de <i>E. coli</i> enterotoxigénicas, ganancia de peso significativa y mejora en la conversión alimenticia	Kyriakiss <i>et al.</i> 2003
Mezcla de <i>L. salivarius</i> , <i>L. pentosus</i> y <i>P. pentosaceus</i>	Cerdos	Reducción en el número de bacterias del género <i>Enterobacteriaceae</i> después de 21 días de administración del probiótico	Gardiner <i>et al.</i> 2004
<i>Enterococcus faecium</i>	Cerdos	Reducción en la frecuencia de casos de chlamydia en cerdos en crecimiento	Pollmann <i>et al.</i> 2005
Mezcla de <i>Bifidobacterium bifidum</i> y <i>L. acidophilus</i>	Pollos	Incrementa la respuesta sistémica ante diversos antígenos	Haghighi <i>et al.</i> 2005
Mezcla de <i>L. murinus</i> , <i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> , <i>L. pentosus</i> y <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Cerdos	Reduce la incidencia, la severidad y la duración de diarrea causada por <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	Casey <i>et al.</i> 2007

Las prácticas tradicionales de manejo consideran el uso de antibióticos que generalmente se utilizan de forma indiscriminada, sin que exista un control de dosis o de intervalos de administración. Como consecuencia, en los últimos años se ha observado que un gran número de microorganismos potencialmente patógenos han desarrollado resistencia a los antibióticos. Estudios recientes demostraron que microorganismos del género *Campylobacter*, *Enterococcus* y *Staphylococcus* aislados de alimentos de origen animal son resistentes a altas concentraciones de

antibióticos como eritromicina, oxacilina y gentamicina entre otros (Saenz *et al.* 2000; Aarestrup *et al.* 2001; Aarestrup *et al.* 2002; Lee 2003). Lo más preocupante es que se ha demostrado que estos alimentos de origen animal son los vectores de transmisión de genes de resistencia o de microorganismos ya resistentes hacia los humanos (Zadoks *et al.* 2000). Este grave problema hace necesario y urgente el desarrollo serio y formal de alternativas que permitan a los productores disminuir las dosis y la frecuencia de administración de compuestos antibióticos. Actualmente en el mercado existe un gran número de compuestos etiquetados como “probióticos” que están destinados a mejorar tanto la salud como los parámetros productivos en la industria porcícola, avícola, acuícola y bovina (<http://www.engormix.com>; González 2007). Sin embargo, la aplicación de dichos “probióticos” no siempre resulta en los beneficios que estos prometen (O’Dea *et al.* 2006) y esto se debe principalmente a la baja calidad y a la carencia de un soporte científico que avale la efectividad a varias escalas y en condiciones controladas de dichos productos (Wesse 2002; Lata *et al.* 2006). Los expertos reconocen que la producción a nivel industrial de probióticos ha carecido de ensayos que demuestren su eficacia a gran escala y en todas las fases de control que comúnmente utiliza la industria farmacéutica (Tannock 2003). Es necesario establecer los lineamientos que describan detalladamente cuales son los pasos que se deben seguir con el objetivo de asegurar que un producto probiótico ejercerá el beneficio que promete. Reid (2005) sugirió que para que productos o cepas puedan ser llamados “probióticos” a nivel comercial se deben de seguir los siguientes pasos: 1) implementar ensayos clínicos de tres fases con el fin de probar y comprobar los beneficios a la salud que un producto puede ofrecer, 2) asegurar una buena práctica de manufactura a nivel industrial de forma tal que se asegure la

calidad del producto y 3) identificar los mecanismos de acción *in vivo* de estos productos. Por tanto es claro que mientras que no se establezcan las normas legales que regulen los procesos de selección, procesamiento y validación de probióticos, estaremos muy lejos de resolver los problemas que actualmente precisan de una alternativa al uso de antibióticos.

1.4 El género *Lactobacillus*

1.4.1. Características fisiológicas y clasificación taxonómica

Junto con los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactospaera*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, *Lactobacillus* forma parte del grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL) (Klein *et al.* 1998). Entre el grupo de las BAL se ha clasificado a géneros microbianos que se caracterizan principalmente por su habilidad para producir ácido láctico como único o como el principal producto de la fermentación de la glucosa. Dentro del género *Lactobacillus* se encuentra a bacterias que presentan características particulares como ser Gram-positivas, catalasa negativas, no esporuladas, bacilares o cocobacilares y que contienen porcentajes de Guanina+Citocina (G+C) por abajo del 50% (Axelsson 1998). Los miembros de este género son estrictamente fermentativos, aerotolerantes o anaerobios, acidúricos o acidófilos y sus requerimientos nutricionales son muy complejos, además de utilizar glucosa como fuente de carbono. Adicionalmente, especies pertenecientes al género pueden ser homofermentativas, (metabolizando más del 85% de la glucosa a ácido láctico) o heterofermentativas (produciendo ácido láctico, dióxido de carbono y etanol y/o ácido acético en concentraciones equimolares). Dentro del género *Lactobacillus* se han descrito

ampliamente a 44 especies según el manual de Bergey's (Pether *et al.* 1986), sin embargo, en los últimos años se ha reportado a más de 100 especies diferentes (Julio 2008; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>). Tradicionalmente, las características fisiológicas que se evalúan para clasificar taxonómicamente a miembros de este género se basan en el patrón de fermentación de carbohidratos, la resistencia a varias concentraciones de cloruro de sodio, la configuración del ácido láctico producido, su capacidad para hidrolizar arginina, su habilidad para crecer a diferentes temperaturas y la resistencia a antibióticos (Axelsson 1998). Sin embargo el uso de técnicas moleculares se ha hecho necesario para la reclasificación de dichas especies (Dellaglio & Felis 2005) y entre las más importantes se pueden mencionar el análisis de las secuencias del gen 16S ADNr (Dellaglio & Felis 2005) y la región intergénica entre los genes 16S y 23S (Tannock *et al.* 1999), además de técnicas como electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE), amplificación al azar de regiones polimórficas (RAPD-PCR) e hibridaciones de ADN-ADN (Klein 1998; Holzapfel *et al.* 2001). Actualmente, una de las técnicas moleculares más aceptadas para poder llevar a cabo una identificación taxonómica es la basada en la secuenciación del gen 16S ribosomal (Claesson *et al.* 2007).

1.4.2. Habitat

Lactobacillus forma parte de la microflora normal de la boca, el tracto gastrointestinal y urogenital de animales homotérmicos incluyendo al hombre (Sneath *et al.* 1986), además se puede encontrar en un gran número de alimentos fermentados en productos lácteos, vegetales y cárnicos. De hecho, sus requerimientos nutricionales se ven reflejados en sus hábitats, que se caracterizan por ser ricos en carbohidratos y otros nutrientes como amino ácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos,

vitaminas, sales, y ácidos grasos o esteres de ácidos grasos. *Lactobacillus* ha sido muy importante en la producción de alimentos, entre los productos fermentados más conocidos están el yogurt, quesos, vegetales como las aceitunas y el sauerkraut y en embutidos como el salami (Tannock 2004). Los miembros de este género, crecen a temperaturas que van de 2 a 53 °C aunque las óptimas son generalmente de 30 a 40 °C y su pH óptimo de crecimiento es de entre 5.5 y 6.2 aunque pueden crecer a pH de 5 o incluso más ácidos (Sneath *et al.* 1986).

1.5 Adhesión

1.5.1. Importancia de la adhesión bacteriana

En la naturaleza se ha observado que las bacterias prefieren desarrollarse en comunidades sedentarias adheridas preferentemente a una superficie (Dunne 2002). Desde el punto de vista ecológico, esta tendencia representa una ventaja que permite a los microorganismos el poder iniciar una relación simbiótica con su hospedador. Ejemplos de este tipo abundan en la naturaleza y un ejemplo clásico es el que se observa en la microflora que habita el tracto digestivo de rumiantes, la cual promueve la degradación y el reciclaje de materiales insolubles (Cheng *et al.* 1995). Desde el punto de vista evolutivo, la adhesión bacteriana favorece la localización de una superficie que le provea de nutrientes, que le brinde protección del medio hostil circundante y que al mismo tiempo le sirva de protección para evitar la predación externa (Costerton & Lappin-Scott 1995). En microorganismos que habitan superficies gastrointestinales, la adhesión previene que estos sean excretados del cuerpo debido al continuo paso de fluidos a través de la superficie epitelial. La adhesión bacteriana por tanto puede ser deseable o no y esto dependerá de la bacteria que se adhiera, la superficie a la que se adhiera y el tipo de interacción entre

ambas partes. En el caso de bacterias benéficas este proceso es deseable y por tanto el estudio de los mecanismos involucrados en este proceso de adhesión es de gran interés.

1.5.2. Mecanismos de adhesión

El concepto de que la adhesión entre un microorganismo y un sustrato puede llevarse a cabo por diferentes mecanismos fue sugerido hace más de 20 años por Rutter *et al.* (1984). De manera general se estableció que la adhesión podía ser descrita en términos físico-químicos como la energía involucrada en la formación de una unión adhesiva. Durante el proceso de formación de dicha unión, el microorganismo podía interactuar con la superficie del sustrato mediante interacciones de tipo iónico, dipolar, formación de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas y sin embargo este fenómeno no involucra especificidad. La adhesión de tipo específica por tanto, involucra la formación de una unión donde una restricción estereoquímica permite sólo la interacción entre un grupo específico de la bacteria (llamado adhesina) y un grupo específico en el sustrato (llamado receptor) (Beachey 1980). Ambos mecanismos de adhesión pueden llegar a ser muy importantes durante la formación de la unión adhesiva y de hecho en algunos casos, la adhesión no-específica podría representar el primer evento en la formación de una unión adhesina-receptor (Rosenberg & Doyle 1990).

1.5.2.1. Adhesión no-específica

La adhesión de microorganismos a superficies está determinada por una serie de propiedades de tipo físico-químico, como son la hidrofobicidad de la bacteria y la carga eléctrica de la bacteria y del sustrato. Ambas propiedades son el resultado de la composición química de las superficies, y de manera particular en *Lactobacillus*, la

hidrofobicidad ha sido atribuida a la presencia de proteínas de tipo S-layer en su superficie (van der Mei *et al.* 2003). Sin embargo, la adhesión de *Lactobacillus* no se ha podido explicar completamente cuando sólo se atribuye su adhesividad a sus características hidrofóbicas. Algunos estudios han demostrado que cepas de *Lactobacillus* hidrofóbicas no siempre son las que mejor se adhieren a un sustrato (Millsap *et al.* 1997), pero además, se ha hecho evidente que *Lactobacillus* puede adaptar su hidrofobicidad en respuesta a cambios en su medio circundante como el pH o la fuerza iónica (Vadillo-Rodríguez *et al.* 2004; Vadillo-Rodríguez *et al.* 2005). En un estudio reciente en el que se trató de correlacionar la hidrofobicidad de cepas de *Lactobacillus* con su capacidad para interaccionar con sitios específicos en el intestino de ratones Balb/c y con su habilidad de modular el sistema inmune, se observó que no existe relación entre la hidrofobicidad y la adhesión, aunque si se observó relación entre la adhesión y la estimulación del sistema inmune (Vinderola *et al.* 2004). Por tanto, mucho de las características adhesivas observadas en cepas de *Lactobacillus*, ha sido atribuido a fenómenos relacionados con la adhesión específica, tal como se describe a continuación.

1.5.2.2. Adhesión específica

De manera esquemática, la adhesión específica entre una adhesina bacteriana y un receptor en la superficie mucosa se muestra en la Figura 8. Este esquema es similar al sugerido para las uniones antígeno-anticuerpo o a la de una enzima con su sustrato. Entre los primeros eventos observados durante el desarrollo de una infección bacteriana, se encuentran aquellos en los que ocurre una interacción molecular entre el patógeno y las células de su hospedero. Estas interacciones son indispensables para que el patógeno pueda colonizar e internalizarse y una vez que

ocurre el primer contacto se desencadena una cascada molecular de comunicación entre ambos conocida como cross-talk.

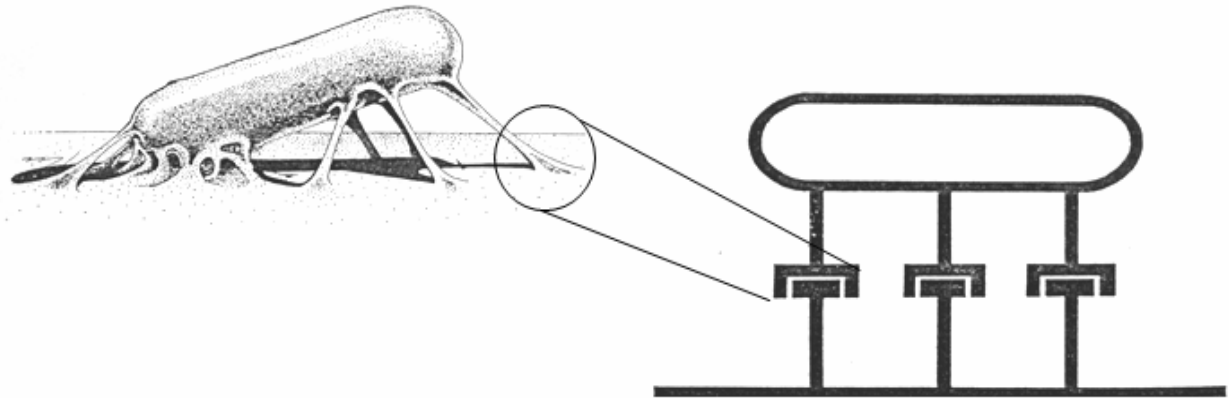


Figura 8. Representación esquemática de un modelo teórico de adhesión específica (Adaptada de Henriksson 1993).

La colonización es casi siempre mediada por adhesinas de superficie de la bacteria, y dichas adhesinas son las responsables del reconocimiento y de la unión entre un receptor específico en las células del hospedero y el patógeno (Soto & Hultgren 1999). Este tipo de interacciones ha sido ampliamente estudiado en un gran número de patógenos que invaden el tracto gastrointestinal o las mucosas del tracto respiratorio en humanos y animales. Entre los mecanismos mejor descritos se encuentra el relacionado con la colonización de *E. coli* K88 enterotóxico (ETEC) que comúnmente enferma a lechones después del destete (Fang *et al.* 2000; Jin & Zhao 2000). Se sabe que *E. coli* K88ac⁺ posee una fimbria especializada que se adhiere de manera específica a dos proteínas de 26 y 41 kDa en el moco intestinal de cerdos (Fang *et al.* 2000). Además en estudios previos, se había reportado ya la presencia de dos glicoproteínas de 210 y 240 kDa en el moco intestinal de cerdos, que son

reconocidas específicamente por múltiples fimbrias de *E. coli* ETEC (K88ab, K88ac y K88ad) (Billey *et al.* 1998; Metcalfe *et al.* 1991). Además de *E. coli*, los mecanismos involucrados en la adhesión y posterior colonización de mucosas para otros patógenos de importancia médica han sido descritos detalladamente, ejemplos de estos son *Salmonella typhimurium* (Vidal *et al.* 2000), *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 (Xicohtencatl-Cortes *et al.* 2007; Rendón *et al.* 2007), miembros del grupo B de *Streptococcus* (Beckmann *et al.* 2002) y *Helicobacter pylori* (Lidén *et al.* 2004) entre otros. Actualmente, la investigación relacionada con la colonización de bacterias patógenas se enfoca en entender como son las interacciones patógeno-hospedero y que tipo de comunicación molecular (cross-talk) ocurre entre ambos. Este nuevo enfoque nos permitirá tener un panorama mucho más fino de cómo es que se dan este tipo de relaciones y en un futuro cercano, poder desarrollar nuevas estrategias que permitan prevenir este tipo de enfermedades.

1.5.3. Adhesión de *Lactobacillus* a células y a componentes epiteliales

Los mecanismos involucrados en la colonización de bacterias benéficas comensales como *Lactobacillus* ha llamado mucho la atención en los últimos años. Como se mencionó anteriormente, *Lactobacillus* está presente en un gran número de hábitats y la relación entre su presencia y la salud tanto en humanos como en animales ha sido ampliamente documentada. Se ha demostrado que cepas de *Lactobacillus* son capaces de adherirse a células epiteliales (Conway & Kjelleberg 1989; Henriksson *et al.* 1991; Yuki *et al.* 2000), a moco intestinal (Rojas & Conway 1996; Kirjavainen *et al.* 1998; Roos *et al.* 2000; Roos & Jonsson 2002; Gusils *et al.* 2003) y a componentes de la matriz extracelular (Styriak *et al.* 2003). Sin embargo, a pesar del enorme

interés que existe por entender cómo es que los miembros de este género colonizan ecosistemas específicos como el gastrointestinal, aún se sabe poco al respecto. Investigaciones *in vitro*, demostraron que moléculas de origen proteico y glicosídico además de ácidos lipoteicoicos de la pared celular de *Lactobacillus* están involucradas con su adhesión (Coconnier *et al.* 1992; Greene & Klaenhammer 1994; Boris *et al.* 1998; Lorca *et al.* 2002; Rojas *et al.* 2002; Granato *et al.* 2004; Baccigalupi *et al.* 2005; Horie *et al.* 2005; Miyoshi *et al.* 2006; Sun *et al.* 2007; Ying *et al.* 2007; Wang *et al.* 2008). Además, se ha observado que el tratamiento de células de *Lactobacillus* con proteinasas reduce de manera significativa su adhesión por lo que se ha sugerido que las principales moléculas responsables de este fenómeno son de origen proteico (Fuller 1975; Henriksson *et al.* 1991; Reid *et al.* 1993; Greene & Klaenhammer 1994). En este sentido, muchas de las investigaciones recientes han dirigido su esfuerzo a la identificación *in vitro* e *in silico* de factores de adhesión de origen proteico en cepas de *Lactobacillus* (Anokhina *et al.* 2006; Boekhorst *et al.* 2006; Wang *et al.* 2008). Una de las principales dificultades observadas es que la presencia de determinados factores de adhesión (o adhesinas) son cepa-dependientes, es decir que aún entre miembros de la misma especie dichas adhesinas pueden estar presentes en algunas cepas y en otras no. Además, el análisis y manipulación de material genético en miembros de este género aún sigue siendo complicado debido a la falta de herramientas moleculares y de protocolos estandarizados que permitan la manipulación de genes entre diferentes especies de *Lactobacillus* (Perea-Vélez *et al.* 2007).

1.5.4. Adhesinas de *Lactobacillus*

A la fecha algunas adhesinas de *Lactobacillus* han sido caracterizadas a detalle (ver tabla VI). El desarrollo de nuevas herramientas de tipo bioinformático, ha permitido además, identificar entre ellas secuencias conservadas que nos permiten sugerir la existencia de dominios conservados relacionados con el reconocimiento a moco (MUB) (Boekhorst *et al.* 2006; Perea-Vélez *et al.* 2007). Sin embargo este dominio MUB es altamente variable en tamaño y en secuencia, haciendo difícil la determinación de límites precisos en el dominio. Por tanto, sigue siendo necesaria la caracterización de nuevas adhesinas en cepas de *Lactobacillus* que nos permitan en un futuro determinar relaciones estructurales conservadas entre ellas, si es que estas existen. Además, esto nos permitirá sugerir mecanismos teóricos involucrados en el reconocimiento de dichas adhesinas por receptores específicos en la superficie gastrointestinal y verificarlos en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Tabla VI. Factores de adhesión caracterizados en *Lactobacillus*.

Cepa	Adhesina/longitud	Blanco de adhesión	No. de acceso	Referencia
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Mub/4326 aa	Líneas celulares de epitelio humano y moco	AAV43217	Buck <i>et al.</i> 2005
	SlpA/1017 aa	Líneas celulares de epitelio humano y moco	AAV43202	Buck <i>et al.</i> 2005
	FbpA/563 aa	Líneas celulares de epitelio humano y fibronectina	AAV42987	Buck <i>et al.</i> 2005
<i>L. brevis</i> ATCC 8287	SlpA/465 aa	Líneas celulares de epitelio humano, laminina, colágeno y fibronectina	CAA78618	Vidgren <i>et al.</i> 1992; Avall-Jaaskelainen <i>et al.</i> 2002; 2003; Hynonen <i>et al.</i> 2002; de Leeuw <i>et al.</i> 2006
<i>L. crispatus</i> JCM 5810	CbsA/440 aa	Colágeno tipo I, IV y laminina	AAB58734	Vidgren <i>et al.</i> 1992; Toba <i>et al.</i> 1995; Sillanpaa <i>et al.</i> 2000; Antikainen <i>et al.</i> 2002
<i>L. helveticus</i> R0052	Slp/437 aa	Líneas celulares de epitelio humano	AAZ99044	Johnson-Henry <i>et al.</i> 2007
<i>L. johnsonii</i> La1 NCC533	EF-Tu/396 aa	Líneas celulares de epitelio humano y moco	AAS08831	Granato <i>et al.</i> 2004
	GroEL/543 aa	Líneas celulares de epitelio humano y moco	AAS08453	Bergonzelli <i>et al.</i> 2006
<i>L. plantarum</i> WCFS1	Msa/1010 aa	Moco vía adhesión mediada por manosa	CAD63738	Kleerebezem <i>et al.</i> 2003; Pretzer <i>et al.</i> 2005
<i>L. reuteri</i> 1063	Mub/3269 aa	Componentes del moco	AAF25576	Roos & jonsson 2002
<i>L. reuteri</i> NCIB11951	CnBP/263 aa	Colágeno	CAA68052	Aleljung <i>et al.</i> 1994; Roos <i>et al.</i> 1996
<i>L. reuteri</i> 104R/ <i>L. fermentum</i> 104R	MapA/263 aa MAPP/263 aa	Células Caco-2 y moco	CAC05301	Miyoshi <i>et al.</i> 2006; Rojas <i>et al.</i> 2002
<i>L. salivarius</i> UCC118	LspA/1209aa	Líneas celulares de epitelio humano	YP_535207	Claesson <i>et al.</i> 2006

Adaptada de Vélez *et al.* 2007

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La búsqueda y caracterización de cepas de *Lactobacillus* con potencial probiótico, aplicable en un futuro cercano a mantener la salud de animales de granja que habitan zonas con ambientes extremos como los que se presentan en zonas áridas, representa una necesidad en la industria dedicada a la producción animal. Se ha demostrado que variaciones en la temperatura ambiente influyen de manera negativa sobre las funciones fisiológicas de los cerdos en particular sobre el sistema inmune (Shimizu *et al.* 1978) y sobre la productividad (Zumbach *et al.* 2008). Por otro lado las enfermedades gastrointestinales que se presentan durante el período de destete en los lechones debido al cambio brusco en el régimen alimenticio (Castillo *et al.* 2007), hacen necesaria la búsqueda de microorganismos benéficos que permitan mantener un equilibrio en la microflora intestinal durante este período crítico. Por tanto el aislamiento y la caracterización de cepas abundantes del género *Lactobacillus* a partir heces y mucosas intestinales de lechones sanos que habitan la zona árida-costera de Baja California Sur, representa una buena estrategia para la selección de probióticos específicos para la industria porcícola.

Por otro lado, es bien sabido que la adhesión de un microorganismo a componentes epiteliales representa un paso importante para la colonización y la comunicación entre dicho microorganismo y su hospedero (Shao *et al.* 2005). Mientras que los mecanismos moleculares involucrados en la adhesión de un gran número de patógenos a componentes gastrointestinales han sido muy bien caracterizados (Niemann *et al.* 2004), poco se sabe acerca de las moléculas de superficie y de los mecanismos que utilizan miembros del género *Lactobacillus* para adherirse y por consecuencia colonizar el tracto intestinal. Por lo tanto la identificación y

caracterización de las moléculas involucradas en adhesión de *Lactobacillus* a componentes intestinales como el moco y la mucina, es indispensable desde el punto de vista de ecología bacteriana básica, pero además contribuirá enormemente a entender como es que se llevan a cabo actividades probióticas relacionadas con la inhibición de la adhesión, la exclusión y el desplazamiento de patógenos en el tracto intestinal.

HIPÓTESIS

Entre las bacterias más abundantes aisladas de heces y mucosas intestinales de lechones sanos que habitan la región árida y costera de Baja California Sur, se encontrará a miembros del género *Lactobacillus*. Un alto porcentaje de las cepas seleccionadas a partir de las últimas diluciones, expresará *in vitro* habilidades probióticas y tecnológicas importantes como la de colonización de mucosas intestinales, resistencia a condiciones propias del intestino y crecimiento en presencia de cloruro de sodio y a altas temperaturas. Además, en al menos una de estas cepas potencialmente probióticas existirán biomoléculas de naturaleza proteica en su superficie celular que estén involucradas con la adhesión de la misma a mucosas gastrointestinales. La caracterización molecular de estas adhesinas nos permitirá conocer su relevancia en el mecanismo de colonización en el tracto gastrointestinal de cerdos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Seleccionar cepas del género *Lactobacillus* a partir de heces y moco intestinal de lechones sanos antes del destete que demuestren *in vitro* habilidad para colonizar mucosas intestinales de cerdos, que resistan condiciones adversas propias del tracto intestinal y condiciones adversas propias de zonas áridas y de procesos tecnológicos. Además, caracterizar en al menos una de las cepas seleccionadas, biomoléculas de origen proteico involucradas en procesos de adhesión a mucosas gastrointestinales de cerdos.

Objetivos Específicos

1. Aislar y caracterizar cepas del género *Lactobacillus* a partir de heces y de moco asociado a intestino delgado y al ciego, utilizando medios de cultivo específicos y analizando características propias de miembros de este género (morfología celular, prueba de tinción de Gram y prueba de catalasa).
2. Llevar a cabo en todas las cepas seleccionadas pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas y concentraciones de cloruro de sodio.
3. Analizar en todas las cepas seleccionadas, su habilidad para adherirse a moco intestinal y mucina gástrica de cerdos mediante ensayos de dot-blot.
4. Llevar a cabo un ensayo de crecimiento en extractos crudos de moco.
5. Evaluar la capacidad para crecer en medio de cultivo MRS conteniendo diferentes concentraciones de sales biliares.
6. Identificar a nivel de especie a las cepas más adhesivas mediante la secuenciación del gen 16S del ADNr y de la región intergénica entre los genes 16S-23S.

7. Identificar biomoléculas de naturaleza proteica que se adhieran a mucina parcialmente purificada y a extractos crudos de moco de cerdos mediante ensayos de Western blot en cepas previamente seleccionadas.
8. Caracterizar por métodos moleculares, a los genes que codifican para dichas proteínas, utilizando estrategias de clonación y secuenciación tradicionales.
9. Analizar por métodos bioinformáticos las secuencias nucleotídicas y aminoácidas traducidas, en proteínas adhesivas y compararlas con otras adhesinas previamente descritas.

CAPÍTULO II

Potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* para cerdos en una costa árida.

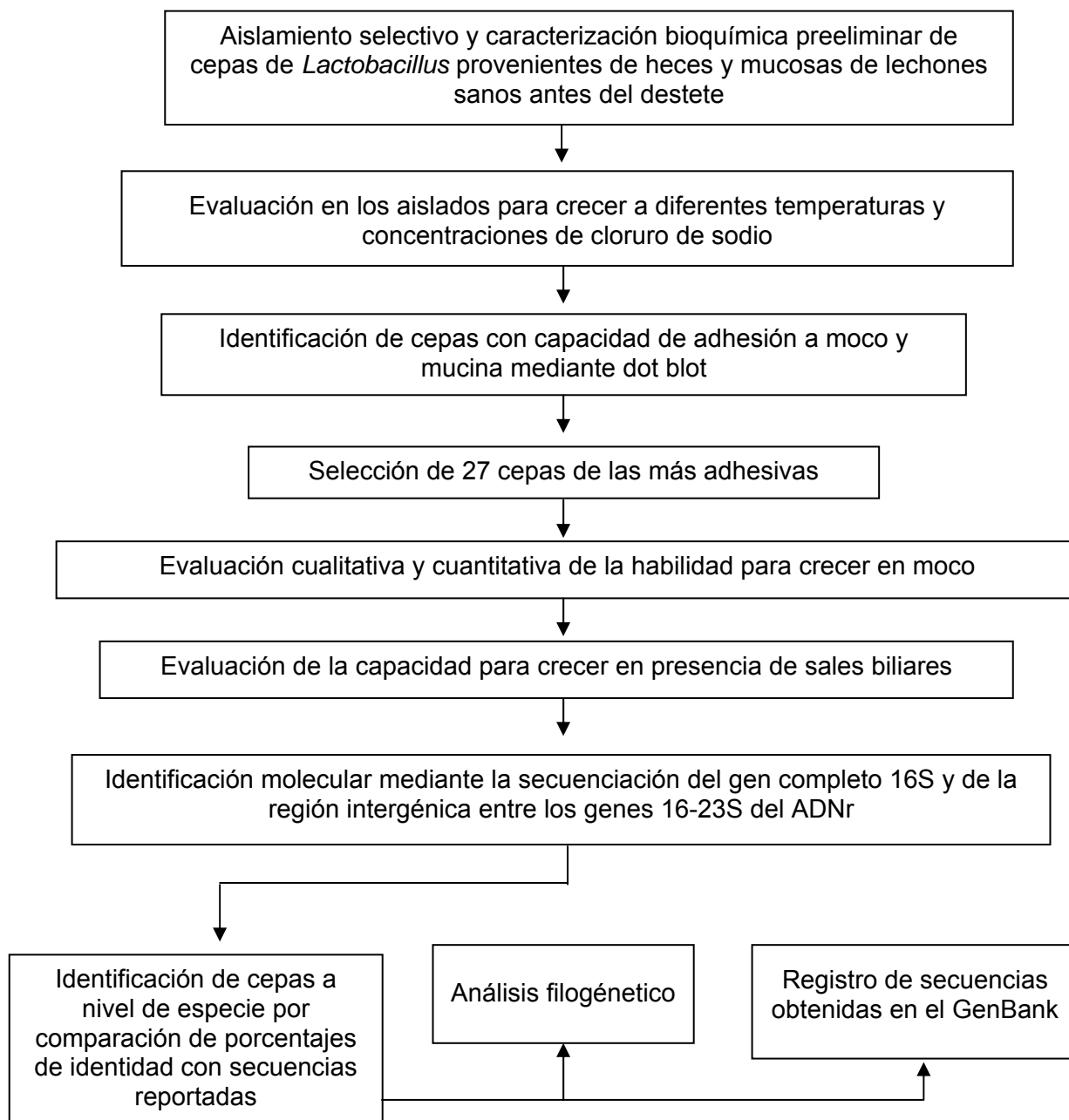
María Esther MACÍAS-RODRÍGUEZ, Monique ZAGOREC, Felipe ASCENCIO, Maurilia ROJAS. 2008. Potential probiotic *Lactobacillus* strains for piglets in an arid coast. *Annals of Microbiology*. (Aceptado).

2.1 Introducción

El uso de cepas de *Lactobacillus* para mantener la salud de cerdos en las primeras etapas de crecimiento ha sido ampliamente documentado (Gardiner *et al.* 2004; Casey *et al.* 2007). Uno de los principales problemas relacionados con la disminución de peso y la susceptibilidad a enfermedades en cerdos en crecimiento lo representa el estrés causado por variaciones en la temperatura ambiente (Shimizu *et al.* 1978; Zumbach *et al.* 2008). Las zonas áridas, se caracterizan por presentar variaciones amplias de temperatura durante las diferentes épocas del año (León de la Luz *et al.* 1996). Bajo estas condiciones, la producción porcina en granjas no tecnificadas o de tipo semi-tecnificado se ve seriamente afectada debido a la baja productividad observada (Chiduwa *et al.* 2008). En México, una buena parte de la industria porcícola se encuentra localizada en la región noroeste del país, principalmente en el estado de Sonora, donde prevalecen estas condiciones ambientales (Hernández & Maya 2002). En esta misma región se encuentra localizado el Estado de Baja California Sur que se caracteriza por ser el estado más árido y por contar con la mayor extensión de costa al estar prácticamente aislado por el Mar del Cortez y por el Océano Pacífico (Trovo-Diéguéz *et al.* 1994). Se ha demostrado que una buena parte de la microbiota que se establece en el tracto gastrointestinal de cerdos proviene del medio que rodea al animal (Conway 1997). Y por otro lado, estudios recientes mostraron que la composición de la microbiota intestinal, se ve afectada por condiciones ambientales como la temperatura y la humedad del ambiente (Tajima *et al.* 2007). Por tanto, el objetivo de este experimento fue aislar cepas de *Lactobacillus* probióticas dirigidas a mejorar las condiciones de salud y los parámetros productivos de cerdos durante el período de destete, en granjas

localizadas en zonas áridas. El proceso se basó en la selección de cepas abundantes en muestras de heces y en moco asociado a intestino delgado en animales sanos antes del destete, en su resistencia a condiciones típicas de zonas áridas-costeras como son las altas temperaturas y concentraciones altas de sal en el medio y en su habilidad para colonizar el tracto gastrointestinal *in vitro*. Finalmente, la identificación molecular a nivel de especie de las cepas que presentan las mejores características, se consideró en este proceso de selección.

2.2 Materiales y métodos



Metodología general revisada a detalle en el **manuscrito I** incluido en esta tesis.

2.3. Resultados

2.3.1. Aislamiento y caracterización bioquímica de cepas de *Lactobacillus*

Con el fin de aislar bacterias del género *Lactobacillus*, abundantes en heces y moco intestinal de lechones sanos antes del destete, se recolectaron muestras justo al momento de defecar de 19 lechones sanos de 23 días de edad, todos ellos de diferentes jaulas de maternidad en la granja porcícola “El Confeti”. Uno de los 19 lechones fue seleccionado al azar, sacrificado por un método humanitario y procesado para el aislamiento de bacterias asociadas a moco de intestino delgado y del ciego.

A partir del análisis microbiológico de heces y moco, un total de 164 colonias que presentaron morfologías diferentes, fueron seleccionadas a partir de las diluciones más altas. De éstas, 109 colonias fueron aisladas de heces, 28 a partir de moco asociado con intestino delgado y 27 de moco asociado al ciego. Las 164 cepas seleccionadas, presentaron morfología celular bacilar, resultaron ser no motiles, no esporuladas, Gram positivas y presentaron reacción de catalasa negativa. Las cuentas promedio observadas en medio específico para *Lactobacillus* (Agar Rogosa SL) fueron de $4.49 \times 10^8 \pm 7.6$ UFC/ gr de heces (n=19), de 3.76×10^6 UFC/cm² de superficie mucosa asociada a intestino delgado y de 3.18×10^6 UFC/cm² de superficie mucosa asociada al ciego.

2.3.2. Crecimiento de las cepas aisladas a diferentes temperaturas.

Al evaluar la capacidad de crecimiento de las 164 cepas aisladas, a las temperaturas de 10, 45 y 50 °C respectivamente, se observó que ninguna de estas fue capaz de crecer a 10 °C. Sin embargo cuando se evaluó su crecimiento a temperaturas altas,

el 100% de las cepas fue capaz de crecer a 45 °C y 75% de las mismas creció a 50 °C. En relación con la fuente de aislamiento, se observó que las cepas que fueron aisladas de heces y de moco del ciego presentaron una mejor habilidad para crecer a 50 °C en comparación con las aisladas de intestino delgado tal y como se muestra en la Tabla VII.

Tabla VII. Crecimiento de *Lactobacillus* a diferentes temperaturas.

Fuente de aislamiento	No. de cepas aisladas	Crecimiento a diferentes temperaturas (% del No. de cepas aisladas)		
		10°C	45°C	50°C
Heces	109	0%	100%	87.2%
Moco de intestino delgado	28	0%	100%	32%
Moco del ciego	27	0%	100%	70%
Total	164	0%	100%	75%

2.3.3. Crecimiento en medio MRS adicionado con NaCl

Al evaluar la capacidad en las 164 cepas aisladas para crecer en medio MRS conteniendo diferentes concentraciones de NaCl se observó que 144 cepas que representan el 87.8% del total fueron capaces de crecer a una concentración de 430 mM de sal. Al aumentar la concentración de NaCl a 680 mM, se observó que solo 105 cepas (64% del total) fueron capaces de crecer. Sin embargo a una concentración mayor (1112 mM) no se observó crecimiento en ninguna de las cepas evaluadas (Tabla VIII). En relación con estos resultados se observó además, que un alto porcentaje de las cepas que fueron aisladas de heces (87.2 %) fueron capaces de crecer en medio conteniendo 680 mM de NaCl, mientras que un menor porcentaje

de aquellas que fueron aisladas de moco intestinal y del ciego, crecieron a esta concentración (17.9%) tal como se muestra en la Tabla VIII.

Tabla VIII Crecimiento de *Lactobacillus* en medio MRS conteniendo diferentes concentraciones de cloruro de sodio.

Fuente de aislamiento	No. de cepas aisladas	Crecimiento en MRS adicionado con NaCl (% del No. de cepas aisladas)		
		430 mM	680 mM	1112 mM
Heces	109	97.3%	87.2%	0%
Moco de intestino delgado	28	71.4%	17.9%	0%
Moco del ciego	27	66.6%	17.9%	0%
Total	164	87.8%	64%	0%

2.3.4. Identificación de cepas con capacidad de adhesión a moco y mucina gástrica de cerdo.

Entre las características comúnmente evaluadas en cepas potencialmente probióticas, se encuentra la de adherirse al tracto gastrointestinal, en particular a componentes específicos como el moco, mucinas y a la matriz extracelular. Así pues, mediante un ensayo de dot-blot en el que se utilizó moco intestinal y mucina gástrica de cerdo marcados con peroxidasa, se evaluó la capacidad de adhesión de las 164 cepas aisladas. Los resultados mostraron que 88 de las cepas que representan un total de 53.7% de las mismas, fue capaz de adherirse tanto a moco intestinal como a mucina gástrica. Además, se observó un mayor porcentaje de cepas adhesivas aisladas de moco de intestino delgado y del ciego (64 y 78% respectivamente), comparado con el observado en las cepas aisladas de heces donde solo un 45% presentó adhesión (Tabla IX).

Tabla IX. Adhesión de *Lactobacillus* a moco y mucina gástrica de cerdo.

Fuente de aislamiento	No. de cepas aisladas	Adhesión (% del No. de cepas aisladas)	
		Fuerte ^a	Débil ^b
Heces	109	45%	55%
Moco de intestino delgado	28	64%	36%
Moco del ciego	27	78%	22%
Total	164	53.7%	46.3%

^a Adhesión similar o más intensa a la mostrada por la cepa de *Lactobacillus fermentum* 104R

^b Adhesión menos intensa a la mostrada por la cepa de *Lactobacillus fermentum* 104R

2.3.5. Crecimiento en moco.

A partir de las 164 cepas aisladas de mucosas y de heces, se seleccionó a 27 de las mismas que presentaron habilidad para crecer a altas temperaturas, en MRS conteniendo NaCl y que presentaron además habilidad para adherirse tanto a moco como a mucina gástrica (cepas mostradas en Tabla XII). En dichas cepas se evaluó adicionalmente su capacidad para crecer en moco intestinal.

Extractos crudos de moco fueron esterilizados por exposición a luz ultravioleta por espacio de 5 min. La esterilidad del moco fue evaluada por el método de dispersión en superficie en medios Agar para métodos estándar (Difco), Agar rojo violeta bilis (Difco), Agar papa y dextrosa (BD Bioxon) y Agar MRS (Difco) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El conteo de UFC/ml de moco no mostró desarrollo microbiano en ninguno de los medios de cultivo utilizados por lo que se consideró que el moco estaba estéril y se continuó con los ensayos de crecimiento en el mismo. El crecimiento bacteriano en el moco se evaluó de manera cuantitativa y cualitativa. La cuantificación del crecimiento se llevó a cabo por las técnicas de cuenta viable en medio MRS y por conteo directo utilizando una cámara de Neubauer. Ambos

métodos resultaron ser útiles para llevar a cabo la cuantificación, sin embargo los resultados obtenidos por el método de conteo directo sobreestiman el número de bacterias ya que no es posible discriminar entre células vivas y muertas. Por esta razón, se consideró sólo los resultados obtenidos por el método de cuenta viable.

De esta manera, los resultados mostraron que 25 de las 27 cepas probadas fueron capaces de crecer en moco y continúan siendo viables después de 24 horas de incubación tal como se muestra en la Tabla X. Para las 25 cepas que mostraron crecimiento, se observaron incrementos en el número de células viables, que van de 1 a 4 ordenes de magnitud (en base log) a las 24 h de crecimiento. Por otra parte, la evaluación cualitativa de crecimiento en moco por microscopía de epifluorescencia, permitió discriminar mediante observación directa a cepas capaces de crecer de aquellas que no crecen, tal como se observa en la Figura 9.

Tabla X. Crecimiento en moco evaluado mediante cuenta viable en medio MRS para cepas seleccionadas.

Cepa	UFC/ ml de moco (T=0 h)	UFC/ ml de moco (T=24 h)	Incremento log
BCS9^a	5.32 X 10 ²	8.6 X 10 ⁶	4
BCS10^a	6.03 X 10 ²	4.6 X 10 ⁵	3
BCS12^a	4 X 10 ²	5.5 X 10 ⁶	4
BCS13^a	1.71 X 10 ²	3.16 X 10 ⁶	4
BCS14^a	4.04 X 10 ²	1.07 X 10 ⁷	5
BCS21^a	9 X 10 ²	3.5 X 10 ⁶	4
BCS24^a	4.66 X 10 ²	6.34 X 10 ⁶	4
BCS25^a	3.6 X 10 ²	1.64 X 10 ⁶	4
BCS27^a	3.38 X 10 ²	1.52 X 10 ⁶	4
BCS30^a	3.24 X 10 ²	1.95 X 10 ⁶	4
BCS36^a	3.61 X 10 ²	1.74 X 10 ⁶	4
BCS41^a	7.6 X 10 ²	1.35 X 10 ³	1
BCS46^a	2.38 X 10 ²	2 X 10 ⁶	4
BCS68^a	1.23 X 10 ³	6.4 X 10 ³	0
BCS75^a	1.82 X 10 ²	1.74 X 10 ⁶	4
BCS80^a	3.17 X 10 ²	1.78 X 10 ⁶	4
BCS81^a	3.7 X 10 ²	2 X 10 ⁶	4
BCS82^a	3.05 X 10 ²	2 X 10 ⁶	4
BCS87^a	1.1 X 10 ³	1 X 10 ⁵	2
BCS113^b	5.5 X 10 ¹	6.01 X 10 ²	1
BCS125^b	1.1 X 10 ³	1 X 10 ⁶	3
BCS127^b	7.84 X 10 ²	1.2 X 10 ⁵	3
BCS134^c	5.74 X 10 ²	5 X 10 ⁵	3
BCS136^c	8.72 X 10 ²	1 X 10 ⁶	4
BCS142^c	6.96 X 10 ²	1 X 10 ⁶	4
BCS154^b	2.43 X 10 ²	1.6 X 10 ²	0
BCS159^c	1.28 X 10 ³	1 X 10 ⁶	3

Fuente de aislamiento: ^a Heces; ^b Moco de intestino delgado de cerdo y ^c Moco del ciego

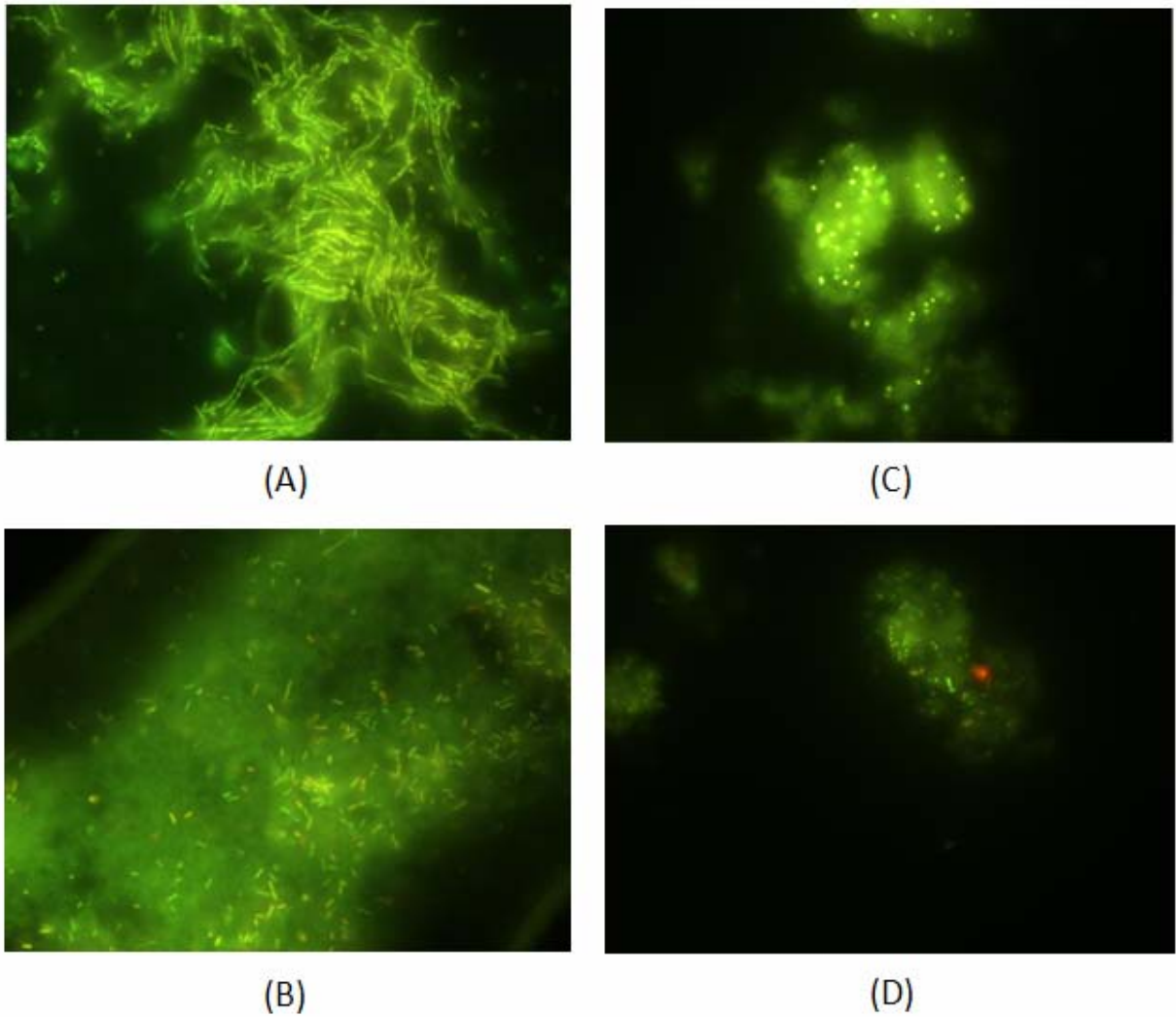


Figura 9. Células de *Lactobacillus* creciendo en moco intestinal de cerdo, teñidas con naranja de acridina. Crecimiento observado por microscopía de epifluorescencia a una magnificación de 100X. (A) y (B) Crecimiento positivo, (C) Crecimiento negativo y (D) Control negativo (moco no inoculado).

2.3.6. Identificación molecular de cepas seleccionadas.

Con la finalidad de identificar a nivel de especie a aquellas cepas que *in vitro* presentaron potencial probiótico, se llevó a cabo la amplificación y secuenciación de las regiones correspondientes al gen 16S del ADN ribosomal (ADNr) y la región intergénica entre los genes 16-23S. Un único producto de alrededor de 1600 pb fue observado al llevar a cabo la reacción de amplificación del gen 16S con los oligonucleotidos pA y pH* utilizando la metodología descrita en el manuscrito I (Figura 10 (A)). Para el caso de la región intergénica entre los genes 16-23S, se observaron 4 bandas, de las cuales la más pequeña se cortó, purificó y re-amplificó tal como se muestra en la Figura 10 (B) y (C). Estos fragmentos fueron purificados y enviados para su secuenciación.

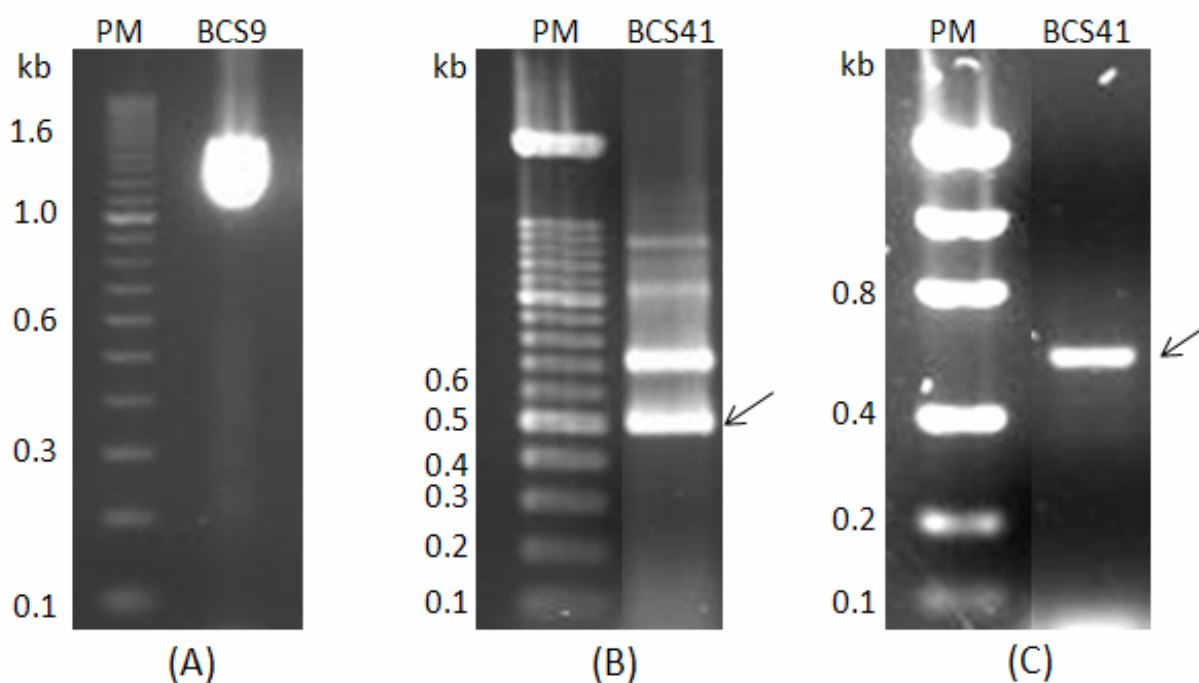


Figura 10. Geles de agarosa que muestran los productos de amplificación del gen 16S ADNr (A) y la región intergénica entre los genes 16-23S (B) y (C). Marcador de peso molecular (PM); cepas de *L. fermentum* BCS9 y *L. johnsonii* BCS41 (BCS9 y BCS41).

Las secuencias obtenidas fueron editadas y posteriormente analizadas. Al comparar las secuencias de los genes 16S ADNr con secuencias dadas de alta en el banco de información del National Center for Biotechnology Information (NCBI), se observaron porcentajes de identidad para 26 de las 27 cepas de 99 y 100% con especies pertenecientes al género *Lactobacillus* (ver Tabla XI). Solo la cepa BCS113 presentó un porcentaje de identidad menor (92%) con un valor de E de $2e-61$. Por otra parte, al analizar los porcentajes de identidad de las secuencias correspondientes a la región intergénica entre los genes 16-23S, se observó para 26 de las 27 cepas un porcentaje de identidad de entre 94 a 99%. La secuencia correspondiente a la región intergénica de la cepa BCS113, presentó un porcentaje de identidad de 87%. A pesar de que los porcentajes de identidad observados para la cepa BCS113 son relativamente bajos, la asignación de la especie se basó en los porcentajes de identidad observados tanto en la secuencia correspondiente al gen 16S ADNr como a su región intergénica (Tabla XI).

Las relaciones filogenéticas entre las secuencias del gen 16S ADNr y de la región intergénica entre los genes 16S-23S ADNr de las cepas seleccionadas, fueron calculadas mediante máxima parsimonia (MP) con el programa PAUP 4.0b. El árbol filogenético construido con el método de Neighbor-joining (NJ; PAUP 4.0d56) presentó la misma topología que el obtenido por MP por lo que se presentan solamente los árboles obtenidos por NJ (Figuras 11 y 12). Al analizar estos árboles (NJ), se observó que 17 de las cepas identificadas y que fueron aisladas de heces de cerdos, se agruparon dentro del cluster I correspondiente a la especie de *L. fermentum*. Adicionalmente, se observó que dentro del cluster II se agruparon las cepas identificadas como *L. reuteri* y *L. vaginalis*. Finalmente en un tercer cluster se

agruparon las cepas identificadas como *L. crispatus*, *L. johnsonii* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Con base en el análisis filogenético, se observó además que entre las 17 cepas identificadas como *L. fermentum* existen diferencias que sugieren que dichas cepas no corresponden a la misma clona. Dichas diferencias (observadas como distancias) pueden observarse en el árbol obtenido con el análisis de las secuencias correspondientes al gen 16S pero se evidencian en el árbol en el que se analizan las relaciones filogenéticas en base a la región intergénica 16-23S (Figuras 11 y 12).

Tabla XI. Porcentajes de identidad de las secuencias correspondientes al gen 16S y a la región intergénica entre los genes 16-23S del ADN ribosomal.

Cepa	% identidad	
	Secuencia 16-23S	Secuencia 16S ADNr
BCS9 ^a	97% <i>Lactobacillus fermentum</i>	99% <i>Lactobacillus fermentum</i>
BCS10 ^a	96% <i>Lactobacillus fermentum</i>	99% <i>Lactobacillus fermentum</i>
BCS12 ^a	97% <i>Lactobacillus fermentum</i>	99% <i>Lactobacillus fermentum</i>
BCS13 ^a	98% <i>Lactobacillus fermentum</i>	99% <i>Lactobacillus fermentum</i>
BCS14 ^a	97% <i>Lactobacillus fermentum</i>	99% <i>Lactobacillus fermentum</i>
BCS21 ^a	98% <i>Lactobacillus fermentum</i>	99% <i>Lactobacillus fermentum</i>
BCS24 ^a	98% <i>Lactobacillus fermentum</i>	99% <i>Lactobacillus fermentum</i>
BCS25 ^a	98% <i>Lactobacillus fermentum</i>	98% <i>Lactobacillus fermentum</i>
BCS27 ^a	98% <i>Lactobacillus fermentum</i>	99% <i>Lactobacillus fermentum</i>
BCS30 ^a	97% <i>Lactobacillus fermentum</i>	99% <i>Lactobacillus fermentum</i>
BCS36 ^a	97% <i>Lactobacillus fermentum</i>	100% <i>Lactobacillus fermentum</i>
BCS41 ^a	99% <i>Lactobacillus johnsonii</i>	100% <i>Lactobacillus johnsonii</i>
BCS46 ^a	97% <i>Lactobacillus fermentum</i>	99% <i>Lactobacillus fermentum</i>
BCS68 ^a	94% <i>Lactobacillus panis</i>	99% <i>Lactobacillus vaginalis</i>
BCS75 ^a	95% <i>Lactobacillus fermentum</i>	99% <i>Lactobacillus fermentum</i>
BCS80 ^a	98% <i>Lactobacillus fermentum</i>	99% <i>Lactobacillus fermentum</i>
BCS81 ^a	97% <i>Lactobacillus fermentum</i>	99% <i>Lactobacillus fermentum</i>
BCS82 ^a	98% <i>Lactobacillus fermentum</i>	99% <i>Lactobacillus fermentum</i>
BCS87 ^a	98% <i>Lactobacillus fermentum</i>	99% <i>Lactobacillus fermentum</i>
BCS113 ^b	87% <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	92 % <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
BCS125 ^b	98% <i>Lactobacillus acidophilus</i>	99% <i>Lactobacillus crispatus</i>
BCS127 ^b	97% <i>Lactobacillus reuteri</i>	99% <i>Lactobacillus reuteri</i>
BCS154 ^b	94% <i>Lactobacillus panis</i>	99% <i>Lactobacillus vaginalis</i>
BCS134 ^c	99% <i>Lactobacillus reuteri</i>	99% <i>Lactobacillus reuteri</i>
BCS136 ^c	99% <i>Lactobacillus reuteri</i>	99% <i>Lactobacillus reuteri</i>
BCS142 ^c	98% <i>Lactobacillus reuteri</i>	99% <i>Lactobacillus reuteri</i>
BCS159 ^c	98% <i>Lactobacillus reuteri</i>	99% <i>Lactobacillus reuteri</i>

Fuente de aislamiento: ^a Heces; ^b Moco de intestino delgado de cerdo y ^c Moco del ciego

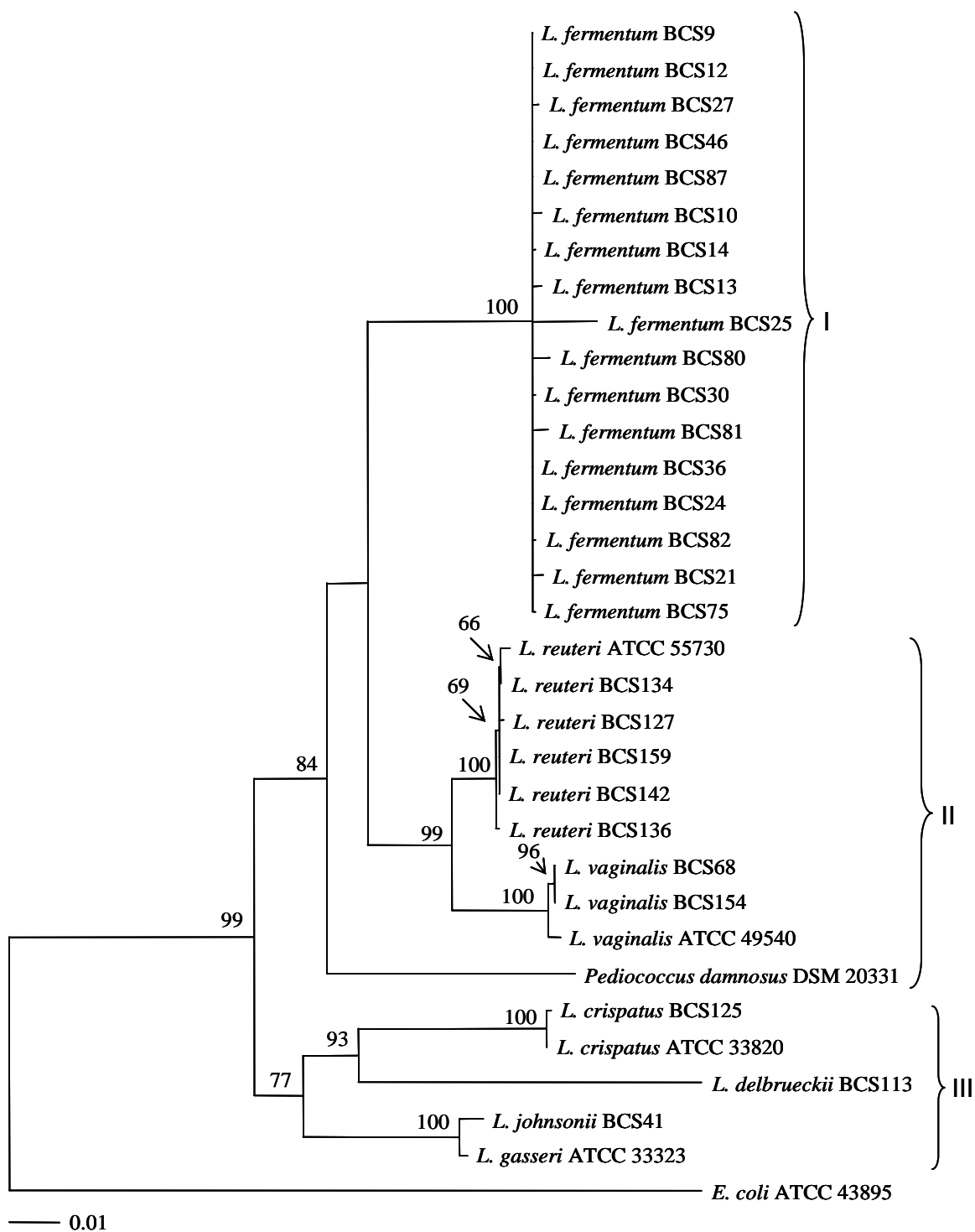


Figura 11. Árbol filogenético que muestra la relación entre secuencias del gen 16S ADN de cepas aisladas de heces y de moco intestinal de cerdos y secuencias dadas de alta en bancos de información. El árbol fue construido por análisis de neighbor-joining a partir de un alineamiento múltiple de secuencias. La longitud de las ramas es proporcional a las diferencias nucleotídicas y el número dado a los nodos representa el porcentaje de frecuencias con el cual una rama dada aparece en un análisis de bootstrap de 1000 réplicas. No se consideró a las frecuencias cuyos valores estuvieron por abajo del 50%. Los números I, II y III representan diferentes clusters identificados en el árbol.



Figura 12. Árbol filogenético que muestra la relación entre secuencias intergénicas 16S-23S del ADNr de cepas aisladas de heces y de moco intestinal de cerdos y secuencias dadas de alta en bancos de información. El árbol fue construido por análisis de neighbor-joining a partir de un alineamiento múltiple de secuencias. La longitud de las ramas es proporcional a las diferencias nucleotídicas y el número dado a los nodos representa el porcentaje de frecuencias con el cual una rama dada aparece en un análisis de bootstrap de 1000 réplicas. No se consideró a las frecuencias cuyos valores estuvieron por abajo del 50%. Los números I, II y III representan diferentes clusters identificados en el árbol.

2.3.7. Crecimiento en presencia de sales biliares

Con el objetivo de evaluar la habilidad para crecer en presencia de sales biliares en las 27 cepas seleccionadas, estas se crecieron en medio MRS conteniendo 0.3, 2.0, 3.5 ó 7.5 % sales biliares. Como resultado de dicha prueba, se observó que las 27 cepas evaluadas fueron capaces de crecer en medio conteniendo hasta 3.5% de sales biliares, mientras que la cepa de *L. reuteri* BCS142 fue capaz de crecer en MRS adicionado con 7.5% de sales biliares.

Tabla XII. Resumen de características evaluadas en 27 cepas de *Lactobacillus* seleccionadas.

Cepa	Crecimiento a diferentes temperaturas			Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl			Crecimiento a diferentes concentraciones de sales biliares				Adhesión a moco y mucina	Crecimiento en moco
	10°C	45°C	50°C	430mM	680mM	1112mM	0.3%	2%	3.5%	7.5%		
BCS9 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS10 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS12 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS13 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS14 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS21 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS24 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS25 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS27 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS30 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS36 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS41 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS46 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS68 ^a	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-
BCS75 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS80 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS81 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS82 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS87 ^a	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS113 ^b	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS125 ^b	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
BCS127 ^b	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS154 ^b	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
BCS134 ^c	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS136 ^c	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
BCS142	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BCS159 ^c	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+

Fuente de aislamiento de cepas de *Lactobacillus*. Heces (^a), Moco de Intestino Delgado (^b), Moco del Ciego (^c).

2.4 Discusión y conclusiones

En cerdos sanos, la asociación de bacterias benéficas como *Lactobacillus* con la superficie epitelial del tracto gastrointestinal y su abundante presencia en heces ha sido previamente documentada (Robinson *et al.* 1981; Rojas & Conway 1996). La habilidad para resistir a las enfermedades y para adaptarse al medio ambiente cambiante, son características deseables en animales de granja como el cerdo (Kanis *et al.* 2005). Un buen número de trabajos ha sugerido que la presencia de *Lactobacillus* en el tracto intestinal, promueve la salud general de los cerdos al estimular el sistema inmune (Roselli *et al.* 2005; Danielsen *et al.* 2007) y al evitar la colonización de patógenos bacterianos (Gardiner *et al.* 2004). En el presente estudio, la asociación de *Lactobacillus* con la mucosa intestinal y su presencia en heces en cerdos sanos que habitan la zona árida-costera de Baja California Sur, fue confirmada. Los niveles de *Lactobacillus* cultivables expresados en UFC/gr ó en UFC/cm² en heces y en moco asociado a intestino respectivamente, corresponden con los previamente reportados para cerdos sanos que habitan climas más fríos como los que se presentan en la región de Finlandia, Italia y Suecia (Rojas & Conway 1996, De Angelis *et al.* 2006; Korhonen *et al.* 2007).

Las regiones árido-costeras como la de Baja California Sur, se caracterizan por presentar variaciones amplias de temperatura durante las diferentes épocas del año (León de la Luz *et al.* 1996). Se ha demostrado que estas variaciones, repercuten severamente en la salud general de los animales pero además en los niveles de producción (Zumbach *et al.* 2008). Adicionalmente durante el período de destete, el cerdo sufre cambios drásticos en su régimen social y alimenticio que desencadenan una serie de cambios morfológicos (a nivel epitelial) y fisiológicos, que lo hacen

susceptible a enfermedades de tipo bacteriano (Castillo *et al.* 2007). Por tanto, la adición de cepas de *Lactobacillus* en el alimento que ayuden a mantener un equilibrio en la microflora intestinal durante este período es una buena alternativa. Sin embargo, se sabe que la microflora se ve influenciada por las condiciones climáticas circundantes. Un estudio reciente, demostró que tanto la temperatura como la humedad del ambiente influyen de manera importante sobre la microflora del rumen en ganado vacuno (Tajima *et al.* 2007). Estudios de este tipo no se han realizado en animales de granja como el cerdo, sin embargo se sabe de antemano que las variaciones en la temperatura ambiente influyen de manera importante sobre la salud de los cerdos. De hecho, cuando estos son expuestos a variaciones amplias de temperatura, se vuelven mucho más sensibles a enfermedades de tipo bacteriano (Shimizu *et al.* 1978) y esto podría estar relacionado con un cambio en la composición microbiana a nivel de tracto gastrointestinal, sin embargo es necesario confirmarlo. En el presente trabajo, para el aislamiento de cepas potencialmente probióticas, se consideró la resistencia de las mismas a condiciones físicas propias de zonas áridas y costeras. Un alto porcentaje de las cepas seleccionadas, creció a temperaturas de 50 °C (Tabla VII) y en medio conteniendo concentraciones elevadas de NaCl (Tabla VIII). En un estudio hecho en Brasil donde las temperaturas ambiente son similares a las encontradas en esta región, se observó que cepas de *L. fermentum* aisladas de pollos fueron capaces de crecer a temperaturas de 45 °C, sin embargo concentraciones altas de NaCl en el medio (680 mM) inhibieron el crecimiento de las mismas (Reque *et al.* 2000). Por tanto, basados en los resultados obtenidos en este trabajo, se puede sugerir que algunas de las condiciones ambientales como la salinidad en los suelos, podría de alguna manera, influenciar la

expresión de genes que le permiten a las bacterias soportar condiciones adversas, cuando dichas bacterias se encuentran fuera del tracto gastrointestinal. Desde el punto de vista biotecnológico, la resistencia de bacterias probióticas a concentraciones altas de NaCl (resistencia al estrés osmótico), representa una de las características más importantes a evaluar (Prasad *et al.* 2003). Esto se debe a que la preservación industrial de cepas de *Lactobacillus* involucra procesos de secado y durante los mismos, las concentraciones finales de sales en los polvos generalmente son altas. En otros casos, el NaCl es adicionado en cierta cantidad a algunos alimentos con el fin de inhibir el crecimiento de algunos microorganismos indeseables, sin embargo se espera que los deseables no sean sensibles a estas condiciones (Abee & Wouters 1999). Así pues, la resistencia de bacterias potencialmente probióticas a NaCl, representa una característica deseable cuando se piensa en un uso industrial a futuro.

Obviamente, durante la evaluación del potencial probiótico en las cepas aisladas, se consideró a aquellas características que le permiten a las bacterias adherirse y por consecuencia colonizar el nicho ecológico al que van dirigidas. En este trabajo, se observó que el 53% de las cepas aisladas, presentó buena habilidad para adherirse a moco intestinal y a mucina gástrica (tabla IX). Por otra parte, un método previamente reportado por Rojas & Conway (1996) fue modificado y utilizado para determinar la habilidad de las cepas para crecer en moco intestinal. Este método, permitió diferenciar cuantitativa y cualitativamente a aquellas cepas que son capaces de crecer en moco de aquellas que no lo son (Figura 9). Trabajos previos, han reportado que bacterias comensales como *E. coli* MG1655 son capaces de utilizar el moco intestinal como fuente de carbono y energía (Chang *et al.* 2004). *E. coli*

MG1655, mostró un alto nivel de expresión de genes relacionados con el catabolismo de amino-azúcares y con el ciclo del ácido tricarboxílico. Así pues, la habilidad de bacterias comensales para crecer en moco es una característica muy importante si consideramos que durante el proceso de colonización, la bacteria en teoría debe ser capaz de multiplicarse en el nicho ecológico en el que va a habitar (Mackie *et al.* 1999). Esto obviamente es mucho más complejo ya que la influencia de factores externos como la administración de antibióticos y el estrés entre otras, pueden modificar la flora intestinal haciendo necesario el consumo periódico de bacterias benéficas (Jernberg *et al.* 2005), esto con el fin de mantener los niveles adecuados. Adicionalmente, la habilidad que presentaron estas cepas para crecer en presencia de sales biliares, sugiere que estas, son buenas candidatas para sobrevivir en el intestino de cerdos.

La identificación molecular de 27 de las cepas más adhesivas y que presentaron buenas habilidades probióticas, mostró que la mayoría (22 de estas) pertenecen a las especies de *L. fermentum* y *L. reuteri* (Figuras 11, 12 y tabla XI). *L. fermentum* fue la especie más abundante en heces mientras que *L. reuteri* lo fue en moco asociado a intestino. Estos resultados confirman la relevancia de estas especies en el tracto intestinal de cerdos tal como se reportó previamente (Tannock *et al.* 1990). Ambas especies han sido utilizadas como probióticos debido a su habilidad para adherirse al epitelio y para resistir condiciones propias del tracto gastrointestinal (De Angelis, *et al.* 2007; Lin *et al.* 2007). Adicionalmente, la presencia de *L. johnsonii*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. vaginalis* y *L. crispatus*, ha sido también reportada en cerdos sanos (Tannock *et al.* 1990).

Durante el presente trabajo se confirmó que los cerdos que habitan la región árido-costera de Baja California Sur, poseen en su tracto gastrointestinal, cantidades altas de *Lactobacillus* que crecen en presencia de hasta 680 mM de NaCl y esto es importante desde el punto de vista biotecnológico. Además estas cepas son capaces de colonizar y sobrevivir *in vitro*, en el tracto intestinal de cerdos. Entre las 27 cepas evaluadas, la que presentó mejores características fue la cepa de *L. reuteri* BCS142. Basados en este trabajo se sugiere que se considere a esta cepa para llevar a cabo estudios *in vivo*.

CAPÍTULO III

Lactobacillus fermentum BCS87 expresa en su superficie proteínas que se adhieren a moco y mucina

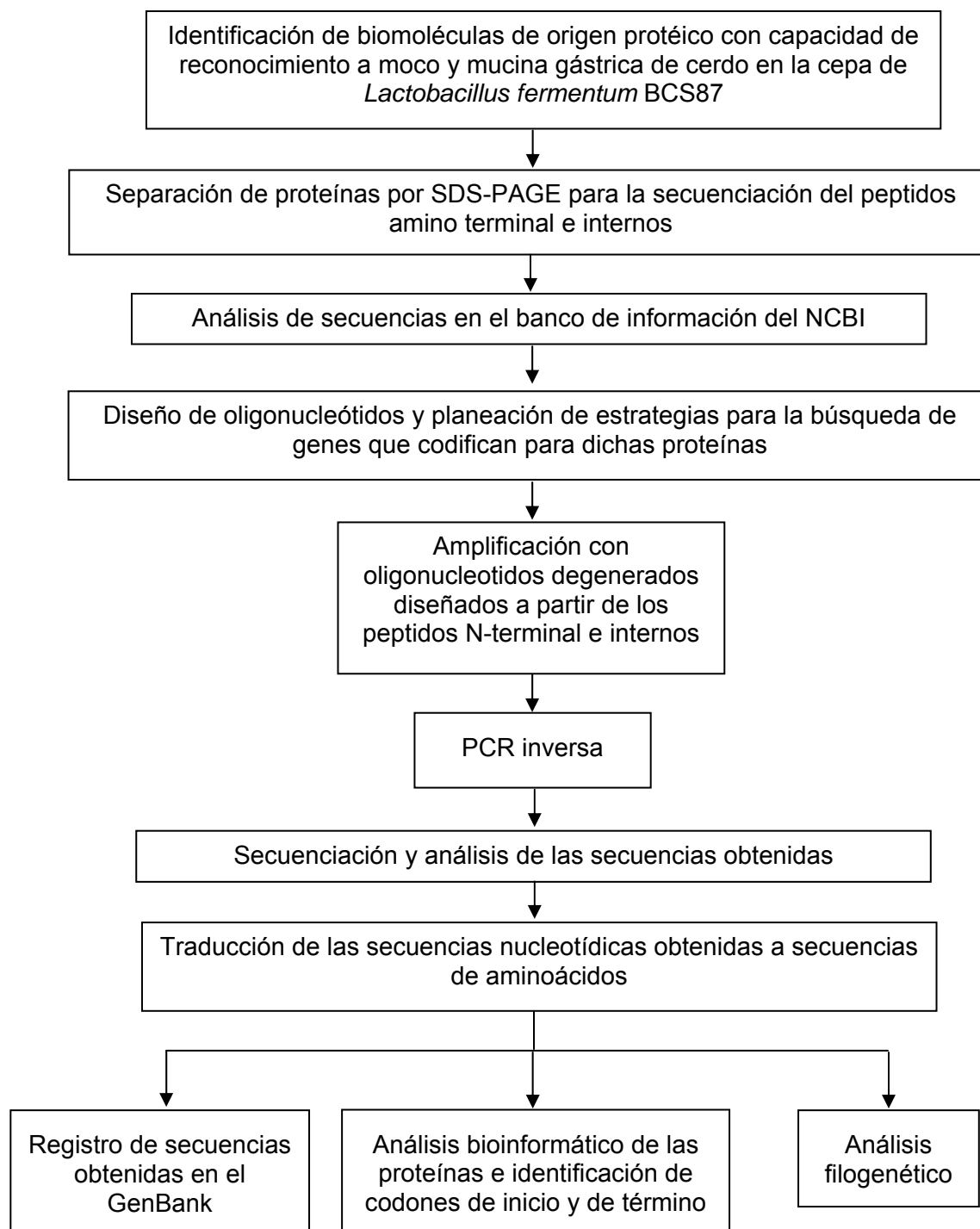
María Esther MACÍAS-RODRÍGUEZ, Monique ZAGOREC, Felipe ASCENCIO, Maurilia ROJAS. *Lactobacillus fermentum* BCS87 express on the surface mucus and mucin binding proteins. Journal of Applied Microbiology (Manuscrito sometido)

3.1 Introducción

Lactobacillus fermentum es un habitante normal del tracto gastrointestinal de cerdos (Tannock *et al.* 1990). En los últimos años, el número de reportes en los que se describen actividades benéficas atribuidas a cepas de *L. fermentum* se ha incrementado enormemente. Entre las más importantes se encuentran aquellas relacionadas con actividades antagónicas contra enteropatógenos así como las de modulación del sistema inmune (Zoumpopoulou *et al.* 2008). La adhesión de *Lactobacillus* al epitelio intestinal y a moco ha sido asociada directamente con la estimulación del sistema inmune y con la inhibición de la adhesión de patógenos (Anokhina *et al.* 2007; Zoumpopoulou *et al.* 2008). Adicionalmente, la adhesión es considerada como un evento crítico y necesario para que un microorganismo colonice (Soto & Hultgren 1999). En este sentido un gran número de trabajos han descrito los mecanismos mediante los cuales bacterias patógenas colonizan el tracto gastrointestinal (Vidal *et al.* 2000; Beckmann *et al.* 2002; Lidén *et al.* 2004; Xicohtencatl-Cortes *et al.* 2007; Rendón *et al.* 2007). Sin embargo, los mecanismos utilizados por bacterias benéficas como los pertenecientes al género *Lactobacillus* no están completamente descritos. Los primeros trabajos sugerían que tanto proteínas como carbohidratos de superficie estaban relacionados con la adhesión a moco y a otros componentes de la matriz extracelular (Gusils *et al.* 2003; Styriak *et al.* 2003). Trabajos posteriores describieron a moléculas de naturaleza proteica que están involucradas directamente en el evento de adhesión (revisado por Perea-Vélez *et al.* 2007). En cepas de *L. fermentum* la adhesión ha sido relacionada con la presencia de proteínas (Rojas *et al.* 2002; Baccigalupi *et al.* 2005). De manera particular, en *L. fermentum* 104R una proteína con peso molecular de 29 kDa (MAPP) fue reportada

por su habilidad para adherirse a moco y mucina de cerdo (Rojas *et al.* 2002). Sin embargo, aún es necesaria la caracterización molecular de biomoléculas en esta especie. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue identificar y caracterizar proteínas de superficie involucradas en la adhesión de *L. fermentum* BCS87 a moco y mucina de cerdo. Esta cepa, aislada de cerdos que habitan la zona árida y costera de Baja California Sur, mostró *in vitro* características probióticas importantes como la habilidad para adherirse y para crecer en extractos crudos de moco intestinal y en presencia de sales biliares. Además esta cepa, es capaz de crecer bajo condiciones estresantes de temperatura y en presencia de NaCl. Este trabajo sin duda contribuirá a la elucidación de los mecanismos que utilizan los miembros de este género para colonizar el tracto gastrointestinal de cerdos, pero al mismo tiempo contribuirá enormemente a entender como es que estas actividades benéficas se llevan a cabo.

3.2 Materiales y métodos



Metodología general utilizada para la elaboración del **manuscrito II** incluido en esta tesis.

3.3. Resultados

3.3.1. Aislamiento de proteínas de superficie

Con el objetivo de aislar proteínas superficiales de la cepa *L. fermentum* BCS87, se llevó a cabo la extracción de las mismas utilizando cloruro de litio 1M (LiCl). La concentración de proteína total recuperada por este método fue cuantificada por el método de Bradford, obteniendo una concentración final promedio de 2.9 µg/ml de proteína en las suspensiones. Para constatar que las células bacterianas de *L. fermentum* BCS87 no eran dañadas durante la extracción, se procedió a hacer una cuenta viable en medio MRS antes y después de este tratamiento. Como resultado se observó que el tratamiento con LiCl 1M por una hora a 4 °C, no dañó la integridad celular del cultivo. En este sentido podemos asegurar que las proteínas obtenidas corresponden a moléculas de superficie y no existe contaminación con proteínas intracelulares.

3.3.2. Identificación de adhesinas de superficie en *L. fermentum* BCS87

Con el fin de constatar que la cepa de *L. fermentum* BCS87 posee en su superficie proteínas que reconocen tanto a moco como a mucina, se llevó a cabo una separación de las proteínas extraídas con LiCl en minigeles de poliacrilamida al 12% por el método de electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE). El perfil de bandeo proteico mostró un total de 24 proteínas visibles en un gel teñido con azul de Coomassie (Figura 13 (A)). Un subsecuente análisis por Western blot utilizando moco y mucina gástrica marcados con la enzima peroxidasa, reveló la presencia de 2 proteínas que reconocieron tanto a moco como a mucina, con pesos moleculares aproximados de 29 y 32 kDa (Figura 13 (A) y (B)). Como control positivo, se utilizó a

proteínas extraídas por el mismo método de la cepa *L. fermentum* 104R (Figura 13 (B)). Esta cepa fue previamente reportada por su capacidad para adherirse a moco y mucina gástrica (Rojas *et al.* 2002). La adhesión de dicha cepa fue atribuida a una proteína de superficie de peso molecular aproximado de 29 kDa llamada MAPP por sus siglas en inglés (Mucus Adhesion Promoting Protein).

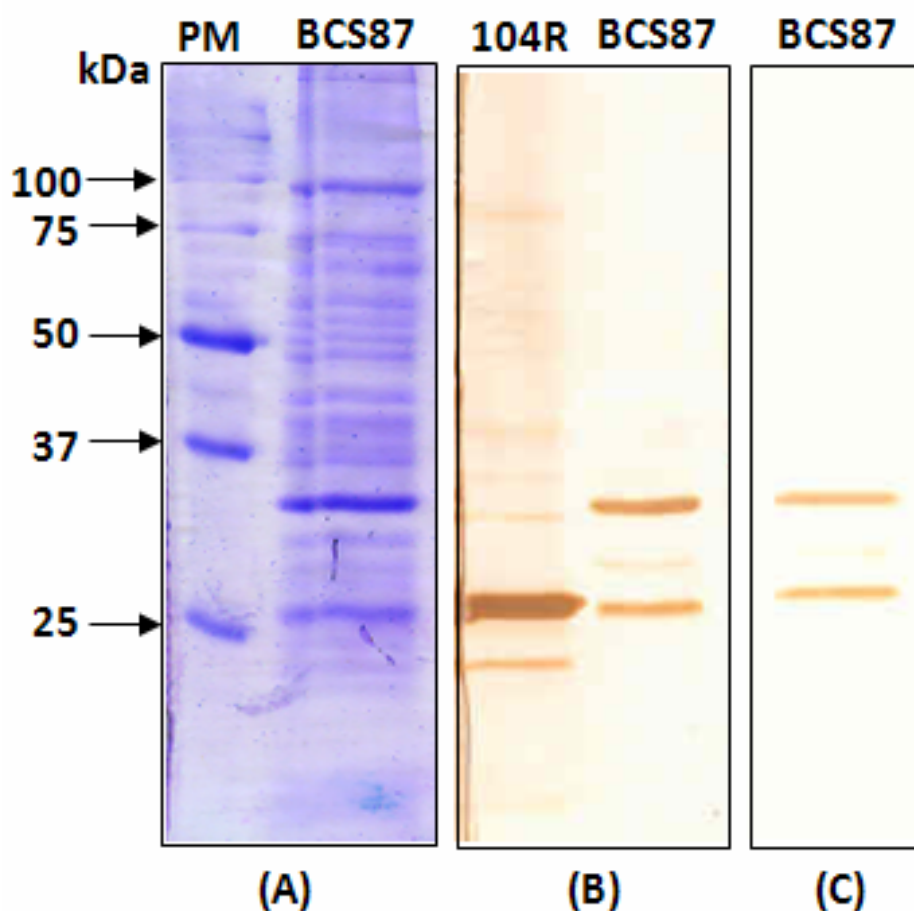


Figura 13. Patrón de bandeo proteico obtenido por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12% **(A)**. Ensayo de adhesión por Western blot utilizando moco **(B)** y mucina gástrica **(C)** marcados con peroxidasa. **PM.** Marcador de peso molecular. **BCS87.** Proteínas de superficie extraídas con LiCl durante la fase logarítmica de la cepa de *L. fermentum* BCS87. **104R.** Proteínas de superficie extraídas con LiCl durante la fase logarítmica de la cepa *L. fermentum* 104R.

3.3.3. Secuenciación de péptidos amino terminal e internos Una vez que se identificó a proteínas adhesivas en la superficie de *L. fermentum* BCS87, se llevó a cabo la separación de las mismas en un gel preparativo, desnaturalizante de poliacrilamida al 12%, de dimensiones de 20x20 cm (Figura 14). A la par, se repitió el ensayo de adhesión por western blot con moco marcado que sirviera de referencia para cortar la banda correspondiente a las proteínas de interés. Este método permitió la separación eficiente de las proteínas de 29 y 32 kDa, mismas que fueron posteriormente enviadas para la secuenciación de sus péptidos amino-terminal e internos. Los péptidos resultantes se muestran en la Tabla XIV.

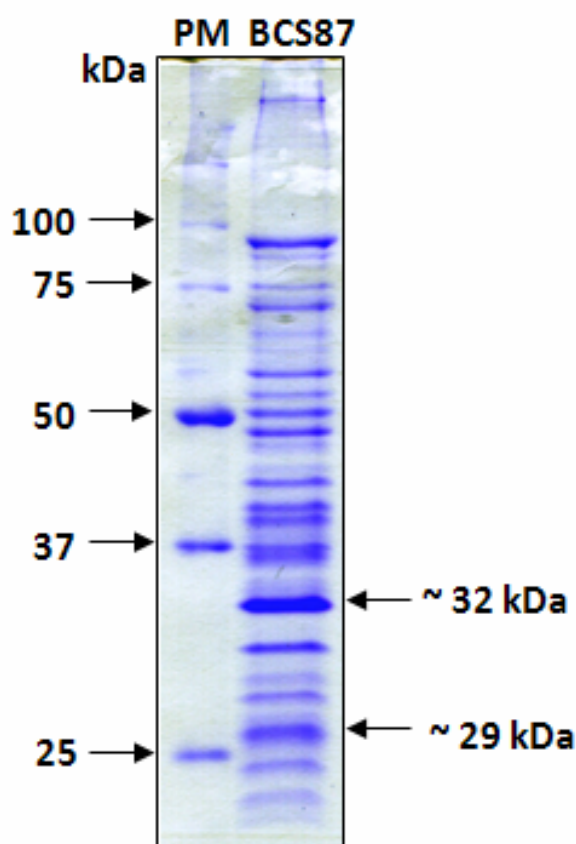


Figura 14. Bando proteico obtenido en un gel de 20x20 cm por electroforesis desnaturalizante. **PM.** Marcador de peso molecular. **BCS87.** Proteínas de superficie extraídas con LiCl durante la fase logarítmica de la cepa de *L. fermentum* BCS87.

Tabla XIV. Péptidos amino terminal e internos de las proteínas de 29 y 32 kDa de *L. fermentum* BCS87.

Proteína	Péptido	Secuencia
29 kDa	N-terminal*	DTVYTVQSGDTLSGISQKF (19 aminoácidos)
29 kDa	Interno 1**	INNAPYAVNR (10 aminoácidos)
29 kDa	Interno 2**	SSTSTGQNYEGLVR (15 aminoácidos)
29 kDa	Interno 3**	LGGDYSAANQER (12 aminoácidos)
29 kDa	Interno 4**	TVNNSLVD (8 aminoácidos)
29 kDa	Interno 5**	YTVQS (5 aminoácidos)
32 kDa	N-terminal*	-NSKTP IIVGSKSFTE (15 aminoácidos)
32 kDa	Interno E7*	KYGLYTISDLQK (12 aminoácidos)
32 kDa	Interno F10*	DDKHLW PAYNLVPLVR (16 aminoácidos)

* Método de secuenciación: Digestión seguida de separación de péptidos por LC y degradación de Edman; ** Digestion seguida de LC-MS/MS

El análisis de similitud de dichos péptidos en el banco de información del NCBI utilizando la herramienta de Blastp, mostró que para la proteína de 29 kDa, el péptido amino terminal es 100% idéntico a una proteína extracelular de *L. fermentum* IFO 3956 (BAG26721), mientras que el péptido interno 3 resultó ser 100% idéntico a esta misma proteína (BAG26721) y 87 % idéntico a proteínas de superficie de *L. reuteri* (EDX41960; AAP94109; AAY86826; ABQ82684; BAG24926) y *L. fermentum* BR11 (BAG26721). Sin embargo, cuando se analizó a los péptidos internos 1 y 2 se observó que estos son entre 100 y 93% idénticos a endonucleasas no específicas (DNA/RNA) reportadas en *L. reuteri* y *L. fermentum*. Finalmente, el péptido interno 4 no mostró identidad significativa con proteínas de *Lactobacillus*. Estos resultados, son confusos y sugieren que la proteína de 29 kDa está contaminada. Los resultados obtenidos originalmente del péptido amino-terminal secuenciado por la técnica de degradación de Edman no mostraron indicio alguno de que dicha proteína estuviese

contaminada, sin embargo los resultados posteriores obtenidos a través de la secuenciación de los péptidos internos por LC-MS/MS mostraron lo contrario. En este sentido, será necesario realizar algunos experimentos más que nos permitan asegurar la pureza de esta proteína y por otro lado, analizar si el fenotipo adhesivo observado mediante el ensayo de Western blot, corresponde a dicha proteína. Por otro lado, cuando se analizó a los péptidos obtenidos para la proteína de 32 kDa, se observó que los 3 resultaron ser 100% idénticos a una proteína transportadora dependiente de ATP (ABC transporter) anotada en el genoma de la cepa de *L. fermentum* IFO 3956. Este genoma fue publicado recientemente (Morita *et al.* 2008) sin embargo al iniciar este trabajo aún no se contaba con esta información por lo que fue necesario utilizar estrategias moleculares que permitieran elucidar la secuencia del gen que codifica para esta proteína tal y como se indica a continuación. Obviamente, aunque esta secuencia anotada en el genoma de *L. fermentum* IFO 3956 es 99% idéntica a la secuencia del gen que codifica para esta adhesina (32-*mmub*), este es el primer reporte donde se sugiere para esta molécula una función biológica como adhesina lo que resulta muy relevante.

3.3.4. Búsqueda del gen que codifica para la adhesina de 32 kDa.

3.3.4.1. Amplificación de un fragmento interno utilizando oligos degenerados.

A partir de las secuencias de péptidos amino-terminal e internos F10 y E7, se diseñaron oligonucleótidos degenerados tal como se muestra en la Tabla XV.

Tabla XV. Oligonucleótidos usados para las amplificaciones por PCR durante la búsqueda del gen que codifica para la proteína de 32 kDa.

Oligonucleótido	Dirección	Secuencia
FAAT 8732	Directo	5'-AAT(A/T)(C/G)TAA(A/G)ACTCCAATTATTGT-3'
RF10 8732	Reverso	5'-CTGGCCA(C/T)AAATG(C/T)TTATCAT-3'
RE7 8732	Reverso	5'-TTTTGTAAATCT(C/G)(A/T)AATAGT(A/G)-3'
MEF7	Directo	5'-ATTTACGCCCTGGCCCTGGAAAAG-3'
MER9	Reverso	5'-AGAGGGTGTATTTGTTGCCATTGG-3'
MEF9	PCR Inversa	5'-GACGGGCAACTGGCCAATGGCAACAAATAC-3'
MER11	PCR Inversa	5'-GACCGCCTTAAAAACGACCGAATTAGAGAT-3'

Cuando se utilizó una combinación entre los oligos FAAT 8732 con RF10 8732, se obtuvo un producto de amplificación de alrededor de 550 pares de bases (pb), tal como se muestra en la Figura 15 (A). Este fragmento fue enviado para su secuenciación y dicha secuencia fue analizada en bancos de información (NCBI). El análisis de la secuencia obtenida, mostró un marco de lectura abierto (ORF) que por medio de un análisis en Blast, confirmó la similitud de esta proteína con proteínas transportadoras de glicina/betaína, dependientes de ATP. En esta secuencia se localizó además al péptido E7 y fragmentos en los extremos del péptido amino-terminal e interno F10. A partir de esta secuencia, se diseñó un par de oligonucleótidos no degenerados, que nos permitiera amplificar un fragmento interno de este gen (MEF7 y MER9). La amplificación por PCR utilizando este par de oligos, resultó en un fragmento de 537 pb (Figura 15 (B)), mismo que fue purificado y enviado para su secuenciación. Este fragmento fue utilizado como sonda para llevar a cabo un análisis por Southern blot además, se utilizó como template para diseñar los oligonucleótidos inversos MEF9 y MER11 que fueron utilizados durante la PCR inversa tal y como se describe a continuación.

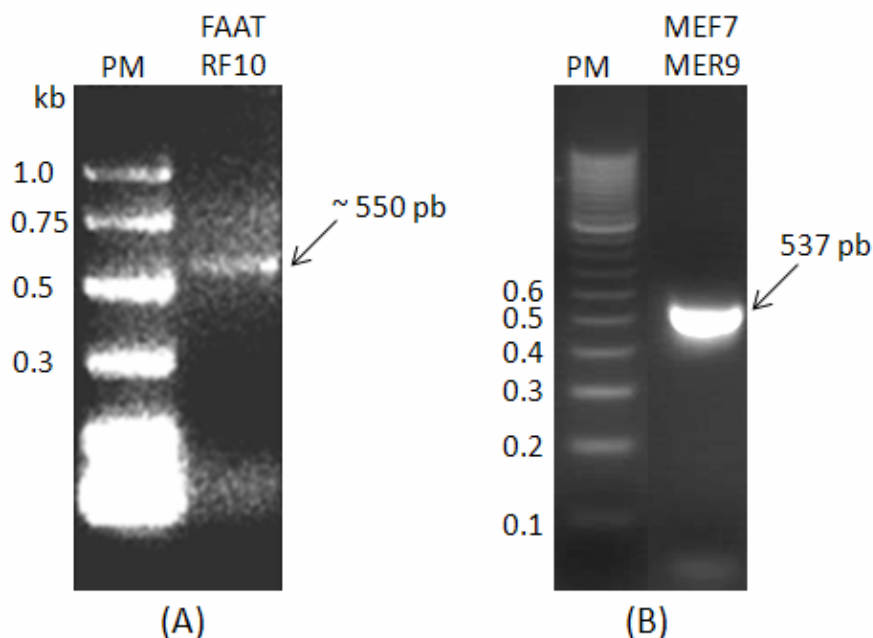


Figura 15. Producto de amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos degenerados FAAT 8732 y RF10 8732 (A) y oligonucleótidos MEF7 y MER9 diseñados a partir de este primer fragmento (B).

3.3.4.2. Southern blot

Para llevar a cabo el análisis de hibridación, se utilizó como sonda el producto de PCR amplificado con los primers MEF7 y MER9 (Figura 15 (B)). La secuencia correspondiente a este producto, fue analizada con la herramienta MapDraw del DNASTAR, esto con el fin de seleccionar enzimas de restricción que no reconozcan una secuencia interna del fragmento ya conocido. El ADN genómico de *L. fermentum* BCS87, fue digerido en su totalidad utilizando las enzimas de restricción *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I y *Sal*I. Los productos de hibridación obtenidos, mostraron tamaños aproximados de 2.5 kb (*Bam*HI), 2 kb (*Bgl*II), (8 kb) *Eco*RI, 2.3 kb (*Hind*III), 8 kb (*Kpn*I), 2.2 kb (*Pst*I), 2 kb (*Sac*I), 1.2 y 0.6 kb (*Sal*I). Con base al tamaño de los productos hibridados, los fragmentos digeridos con las enzimas

*Bam*HI, *Bgl*II, *Hind*III, *Pst*I y *Sac*I fueron utilizados para llevar a cabo la búsqueda del gen completo por PCR inversa.

3.3.4.3. PCR inversa

La PCR inversa, permite encontrar secuencias desconocidas que flanquean a un fragmento interno ya conocido (Ochman *et al.* 1998; Huang *et al.* 2000). El esquema estratégico general se muestra en la Figura 16.

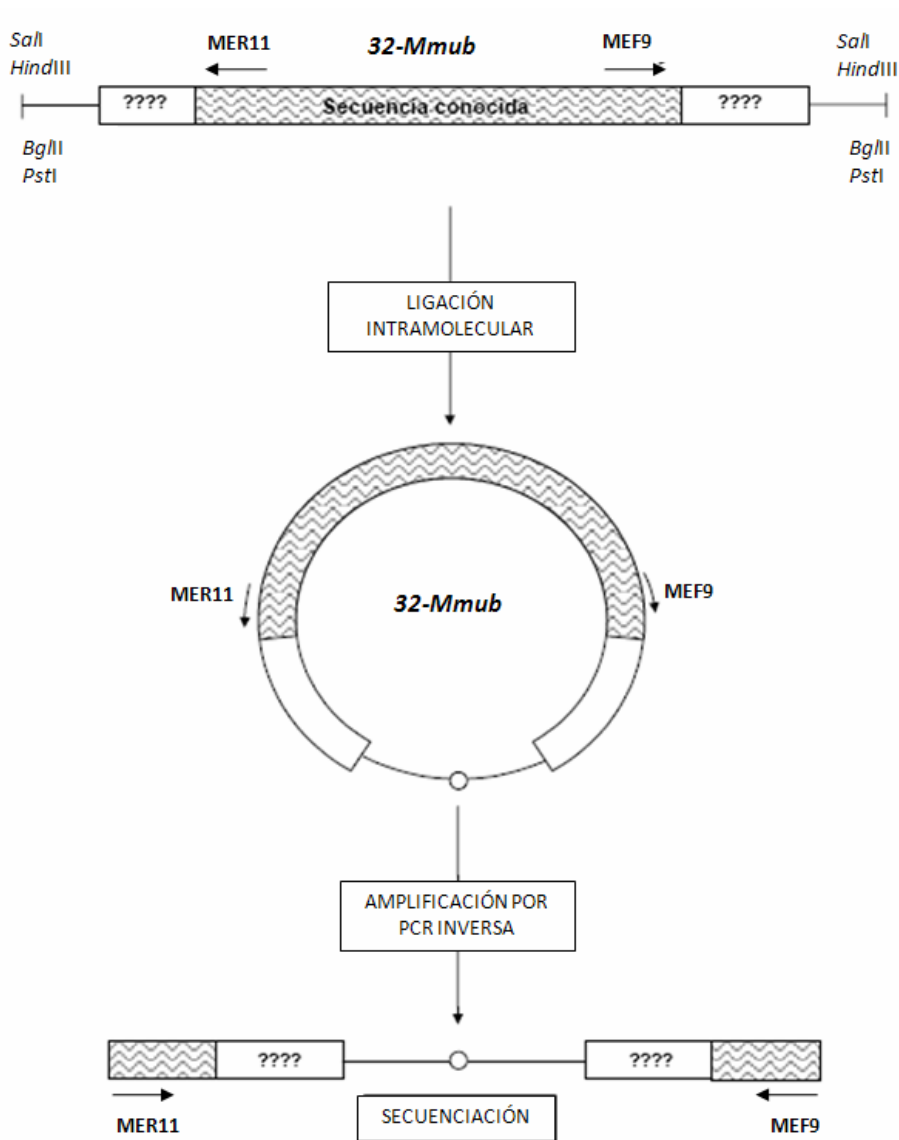


Figura 16. Representación esquemática del proceso de PCR inversa. (Adaptada de Vázquez-Juárez 2003)

Utilizando los oligonucleótidos inversos MER11 y MEF9 (Tabla XV), se obtuvieron productos de amplificación con tamaños aproximados de 1.5 kb (*Bgl*II), 2.0 kb (*Pst*I), 1 kb (*Sal*I) y 1.5 kb (*Hind*III) como se observa en la Figura 17.

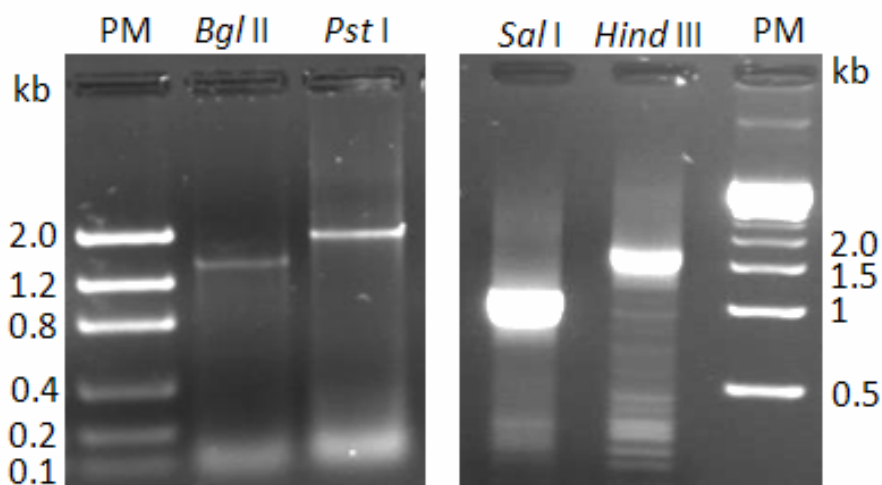


Figura 17. Productos de amplificación por PCR inversa obtenidos a partir de ADN genómico digerido con las enzimas *Bgl*II, *Pst*I, *Sal*I y *Hind*III, respectivamente. PM, marcador de peso molecular.

Estos productos fueron cortados directamente de gel, purificados, re-amplificados y clonados en el plásmido pGEM-T easy. Esta construcción fue utilizada para transformar células de *E. coli* DH5 α , sin embargo solo se obtuvieron clones que contenían los insertos *Bgl*II, *Pst*I, y *Hind*III. El tamaño de los insertos en las mismas se verificó llevando a cabo un análisis por PCR de colonia, utilizando los oligonucleótidos M13F y M13R del mismo plásmido. Sin embargo, los tamaños de los productos obtenidos no correspondieron con los tamaños esperados (con excepción de la clona M₁₃) tal como se muestra en la Figura 18. Tanto las clonas M₁₃ y M₂₃ como los productos de PCR obtenidos de la re-amplificación directa de los productos mostrados en la Figura 16 fueron enviados para su secuenciación. El análisis de los productos secuenciados, permitió obtener una secuencia de 2,803 pb dentro de la

cual se identificó a la secuencia codificante completa del gen *32-mmub* tal como se muestra en la Figura 18.

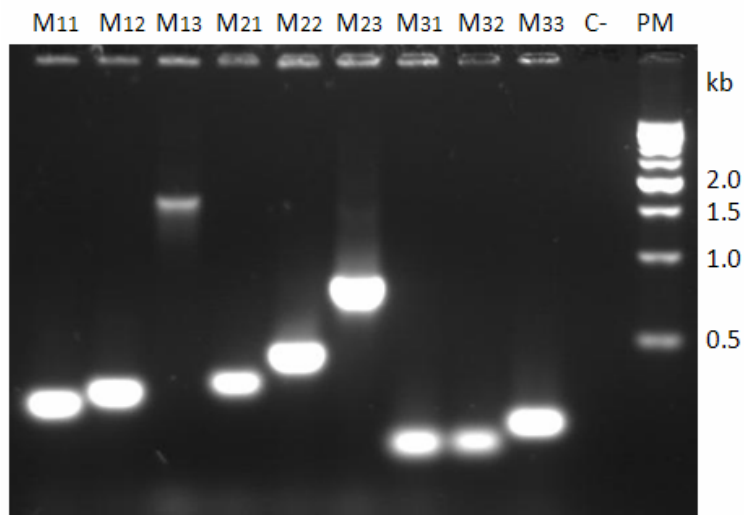


Figura 18. Productos de amplificación por PCR en colonia de clonas positivas que contienen los insertos *Bgl*I (M₁₁, M₁₂ y M₁₃), *Pst*I (M₂₁, M₂₂ y M₂₃) y *Hind*III (M₃₁, M₃₂ y M₃₃). C-, plásmido pGEM-T easy abierto como templete. PM, marcador de peso molecular.

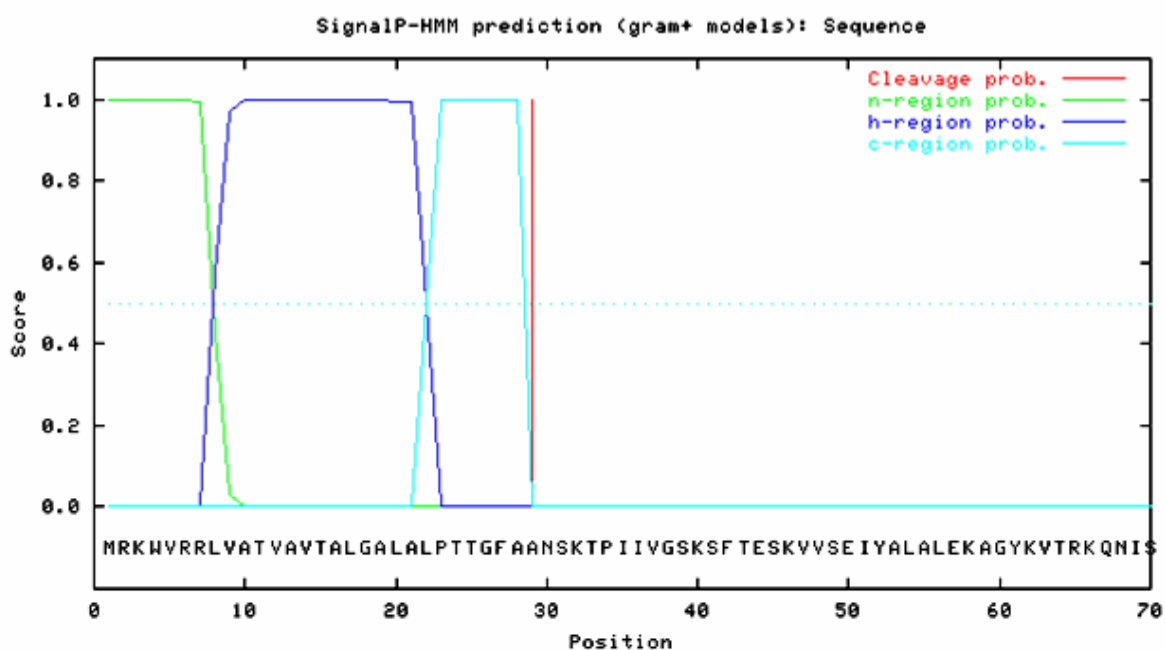
3.3.3.4. Caracterización molecular del gen32-Mmubp.

La secuencia nucleotídica completa del gen *32-mmub* reveló un marco de lectura abierto que consiste de 903 nucleótidos que codifican para una proteína primaria de 300 aminoácidos (No. acceso FJ026800). Tanto la secuencia amino terminal como los péptidos internos E7 y F10 fueron ubicados en la secuencia aminoácida deducida (Tabla XIV y Figura 18). Un péptido señal de 28 aminoácidos fue identificado en la secuencia aminoácida primaria utilizando el software de predicción SignalP 3.0. Las tres regiones características de péptidos señal (n, h y c) fueron ubicadas entre los aminoácidos 1 al 28 de la secuencia aminoácida para la proteína primaria (Figura 20 (A)). Además, el análisis permitió la predicción de un sitio de corte entre los aminoácidos 28 y 29 de esta secuencia (Figura 20). La proteína madura (sin péptido

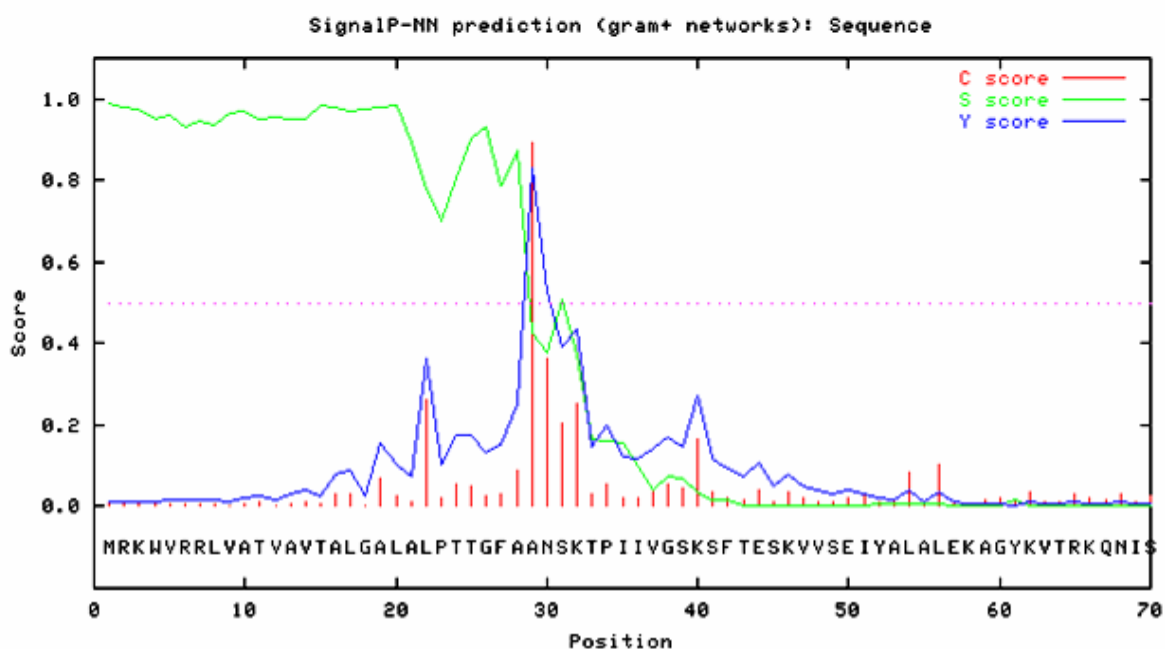
señal), consiste de 272 aminoácidos y una masa molecular de 29,974 Da que es similar al peso molecular aparente observado para esta proteína en un gel de poliacrilamida desnaturizante (Figura 13). La búsqueda de secuencias promotoras en la secuencia completa (2.8 kb) no mostró probabilidades altas de la existencia de un promotor en dicha secuencia. Por otro lado, el análisis del fragmento río arriba del gen *32-mmub* (nucleótido -1357 al -1, Figura 19) mostró la existencia de un fragmento parcial de un gen que codifica por una acetiltransferasa (posición -1357 a -1053). La región que va de la base -1053 a -628 y de -590 a -141 mostró similitud con genes que codifican para una proteína hipotética y un regulador transcripcional respectivamente. Finalmente, la región que se encuentra entre la base 1014 a 1446 mostró similitud con un gen que codifica para un componente permeasa de una proteína transportadora de glicina/betaína dependiente de ATP, todos estos genes en la cepa de *L. fermentum* IFO 3956.

-1357	agottttootggaaggaagcggcccaaacgggataccocgaogcoaagggaattacagag	-1295
-1296	oatotaootgoggggttaatacccaaggtoacococotagggoggoagataatggattttgco	-1235
-1236	atgcaagaagctaaaaaatogggogtccocggggtotgggtaggggtgtggaacataaac	-1175
-1176	tacccggcccaaaaagatctatggggogctacggotttcagoggggttagtoaacataccttc	-1115
-1116	atgggtgggcatgacccogoaagacogattttoattttaatgtaggacatgacggggaagaa	-1055
-1056	taatggcogattacocaaatccococogtthtaogccaggtgggttgocaaagtoataata	-995
-996	acgaoggoaccccaocagtggttactcgaogaaocogttgaccccaagagggaoggatgocag	-935
-936	cacccaaaocccgggttcaatccttatggggggocotoggggggttgocotgtogotgaocgocot	-875
-876	tagacgtgatccggcccaagcaactagacgtcaatcogotttgagotcogagattgaaggga	-815
-816	ocacogattacctaocaggggagocgggctaaaggocottgococogttoacgtgaocggtta	-755
-756	agttagcgaocctcaatgacggataaggogattgacocggotcctagagaogattgataagt	-695
-696	attgocoggttcaocaaatagtttgagogacocgggttgtottttcaatggaggooaaagoga	-635
-636	ttgaatagaaaaaggagcgcctacgggaaacocgtgaaocgocotcttttttagtcttgaactt	-575
-576	ttottgggtgocaaottoaagttgatotgggtococogataatoggotaocggttaogttattgaa	-515
-516	cogaatocogotgocogocotgtgocototgggtatacctocggotaggattgggtgaaatgtg	-455
-456	accacccgacottacactgggggttagtatcgggggttaacgttgaaaggggggtggggacc	-395
-396	atogototcttogaocggocaaaataaacatogtataaggtaatctcttogaaggtoocotago	-335
-336	caacocgtggotgtgocogtccotgggttagttggactaaagococogtgcogtagggttccc	-275
-276	cattaacocogctaacatgacocgggtgaaatccocgatactogataagaggtogocogt	-215
-216	gattcgggocctcctcgtaaaccttcagaaagcacaataatggatagcatcgcgtaaagocg	-155
-156	ggttgaaagocogtatttttctococotogttoaataataatatacagtaaaaaocaaatttga	-95
-96	taacctaatcctatcacacocagcttgaataagotattogattgtgtattgttacttat	-35
-36	gaaatocaaagtaactaaagaaaaggagocgattaaatattgaggaaatgggttcggcgactg	24
	<u>M R K W V R R L</u>	
25	gtggccaccggttgccgctcactgctttggggggccctagcccttccaacaaccgggttcgcc	84
	<u>V A T V A V T A L G A L A L P T T G F A</u>	
85	gctaataagtaagccccgattactcgtcgggtccaagagtttcaccgagagtaggctgctc	144
	<u>A N S K T P I I V G S K S F T E S K V V</u>	
145	agtgaaatttacgccctggccctggaaaaggccgggttacaagggtgaccogtaaacaaaat	204
	<u>S E I Y A L A L E K A G Y K V T R K Q N</u>	
205	atctctaattcgggtcgttttttaaggcgggtccaacccgggcaaatgacggtttaccogag	264
	<u>I S N S V V F K A V Q T G Q I D V Y P E</u>	
265	tatacggggacaattgtggacgcctacttaagcaaaagcaccaccaataagaacgctaag	324
	<u>Y T G T I V D A Y L K Q S T T N K N A K</u>	
325	caaatgcccggcggccgcaagaagggggtcgctaagtataagttaacgaccctgacaccg	384
	<u>Q I A A A A K K G V A K Y K L T T L T P</u>	
385	gcaccgggtaatgattcacaggggatcggcgttaccaccaaggtagccaaaaagtagcggc	444
	<u>A P G N D S Q G I A V T T K V A K K Y G</u>	
445	ctctacacgatcagcgcacctgcaaaagaaggccaacaaaattcgcctcgtctcgcgaaggg	504
	<u>L Y T I S D L Q K K A N K I R F V S Q G</u>	
505	gaatgtgaccaacgggcccgcagccctgcccggggatgggttaaaaagtagcggtaagttcgac	564
	<u>E F D Q R A D A L P G M V K K Y G K F D</u>	
565	ttcaagtcctcaaaggactacgatgacagcttgaaatacaagatcctctccgaaggcaag	624
	<u>F K S S K D Y D D S L K Y K I L S E G K</u>	
625	ggggatgcccggccgggtctcgcactaccgacgggcaactggccaatggcaacaaatacacc	684
	<u>G D A A P V S T T D G Q L A N G N K Y T</u>	
685	ctcttaaaggatgacaagcacctgtggccagcctataacttgggtcccgttagttcgggaat	744
	<u>L L K D D K H L W P A Y N L V P L V R N</u>	
745	tcgaccctcaagtcgcacccgaagatggctaaaggccttaaatcaggtcgacaagaagtta	804
	<u>S T L K S H P K M A K A L N Q V D K K L</u>	
805	acaactaaaaccctgacggaattaaacaaaaaagttgacgtcgacgggcaaaactaccaa	864
	<u>T T K T L T E L N K K V D V D G Q N Y Q</u>	
865	actgtggcctaagaactgggttaataaaaaatattaactaggattgggggtaggggaaaat	924
	<u>T V A K N W F N K N I N -</u>	
925	ocaaatthttocccggccoccttaotatttotatgotgattaggogggaaaaatagocccocato	984
985	acagocaaatgotagotgatotaggtocagttattgococcttctctttattaataacocggag	1044
1045	gtocotgacoggtgottacgocaaatococattactttocaaaocaaocgococogtaocggy	1104
1105	ggotaogtggggocaaococotggtaactgagottttoggotottagtgattgocotgotgato	1164
1165	agocotgocogtagggtaocotcggotcaaaaacocococaaaggtggococaaatgtttoaotg	1224
1225	ttttococaggtotgtoggatocococagotggggototattocototgtatocogotg	1284
1285	attgaaocggagttgtococggocoggaatocococotggtoattcttgcocococococaaat	1344
1345	ttaatocaaacogatoctagggttaatgaaagttgggaogatotococaaagagtagggggtc	1404
1405	gctctcgggaatgaaocgaocgocaaactgctttggcgaagtaaaa	1446

Figura 19. Secuencia nucleotídica del gen *32-mmub* de *L. fermentum* BCS87 y su secuencia de aminoácidos deducida. Las secuencias correspondientes a los péptidos amino terminal e internos E7 y F10, se presentan en negritas. El péptido líder se representa subrayado, mientras que el codón de término está indicado por un guión medio al final de la secuencia aminoácida.



(A)



(B)

Figura 20. Gráfico de predicción de un sitio de corte y de la presencia de un péptido señal en la proteína 32-Mmub obtenido mediante una combinación de varios modelos de redes neuronales artificiales y del modelo de hidden Markov. (A) Valores de probabilidad de la presencia de regiones características n, h y c en la secuencia para la predicción de un péptido señal. (B) Valores de probabilidad de la presencia de un sitio de corte en la secuencia.

La predicción de hélices transmembranales y de la ubicación de la proteína en la célula, utilizando la secuencia primaria de 300 aminoácidos, mostró que la secuencia correspondiente a los aminoácidos 1 al 7 se encuentra dentro de la célula. Por otro lado, el residuo que contiene a los aminoácidos 7 al 29 se encuentra ubicado en transmembrana, mientras que los aminoácidos 30 al 300 se encuentran fuera de la célula tal como se muestra en la Figura 21.

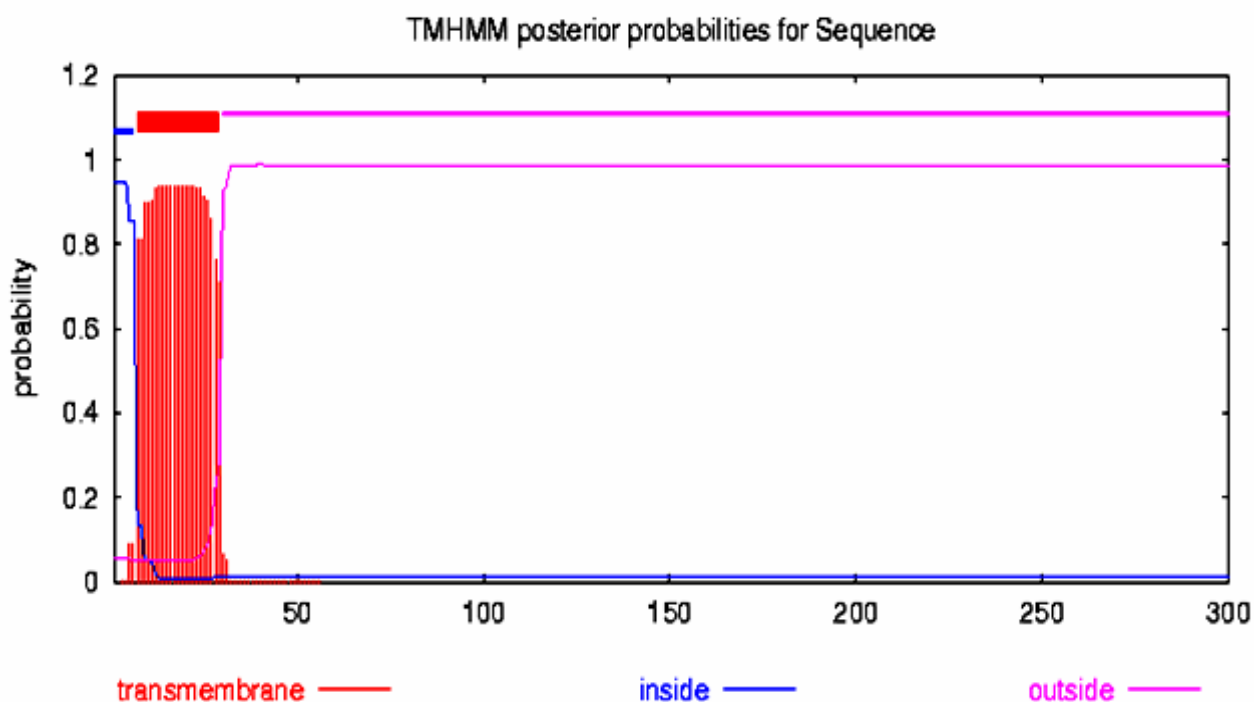


Figura 21. Modelo teórico de predicción de hélices transmembranales en la proteína 32-Mmub. Los valores de probabilidad son mayores a 0.94 para la línea azul que predice una región ubicada en el citoplasma (aminoácidos 1 al 7), la región roja predice una región transmembranal (aminoácidos 7 al 29) y la línea rosa predice una región ubicada en el exterior de la célula (aminoácidos 30 al 300).

Adicionalmente, un punto isoeléctrico de 9.87 y una carga neta de 25.22 fueron deducidas para la proteína madura. El análisis de similitud hecho en bases de información del NCBI por medio de Blast reveló porcentajes de identidad de entre 47 y 99% con componentes de unión a soluto de proteínas transportadoras de

aminoácidos glicina/betaína, dependientes de ATP, (ABC-transporters) tal como se muestra en la tabla 6.3.

Tabla XIV. Identidad y similitud entre la proteína 32-Mmub de *L. fermentum* BCS87 y componentes de proteínas transportadoras de aminoácidos del tipo ABC-transporter.

Organismo	% de identidad	% de similitud	E value	No.de acceso
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO3956	99	99	2e-170	BAG27284
<i>Lactobacillus reuteri</i> 100-23	62	77	3e-98	EDX43505
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730	62	77	6e-98	AAY86791
<i>Lactobacillus reuteri</i> F275	62	77	6e-98	ABQ82454
<i>Lactobacillus reuteri</i> F275	62	77	6e-98	BAG24691
<i>Streptococcus thermophilus</i> LMG 18311	52	70	4e-73	AAV60941
<i>Streptococcus thermophilus</i> CNRZ1066	52	70	4e-73	AAV62852
<i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052	47	67	1e-72	ABR35663

Por otro lado, una búsqueda de dominios conservados en la base de información del NCBI y en Pfam, mostró que 32-Mmubp pertenece a la superfamilia PBPb dentro de la cual se encuentran un gran número de proteínas cuya función es la de transportar una amplia variedad de sustratos como aminoácidos, péptidos, azúcares, vitaminas e iones inorgánicos. En específico, 32-Mmubp presentó relación con el dominio de unión a sustrato de proteínas transportadoras de glicina/betaína del tipo ABC-transporter OpuAC (PF04069).

Un análisis de relación filogenética entre la secuencia primaria de la proteína 32-Mmub y 903 miembros de la familia OpuAC fue hecho durante el presente trabajo por máxima parsimonia (PAUP). Originalmente, el alineamiento múltiple de todas las secuencias miembro de la familia OpuAC que se encuentran en el grupo semilla (seed, 903 secuencias) de esta familia se bajó directamente del sitio Pfam. Con el objetivo de analizar la relación entre estas secuencias miembro y la secuencia

correspondiente a la proteína 32-Mmub, estas junto con la secuencia de 32-Mmubp fueron utilizadas para construir un árbol mediante el método de Neighbor-joining. Secuencias del mismo taxa que presentaron 100% de identidad, fueron manualmente eliminadas del alineamiento múltiple, de manera que no se afectara la topología general del árbol filogenético al reducir el número de secuencias. Al final, un árbol representativo que contiene 37 de las 903 secuencias originalmente utilizadas fue construido a partir del árbol original (Figura 22). Este análisis mostró una estrecha relación entre 32-Mmubp y miembros de OpuAC tal como se muestra en la Figura 22.

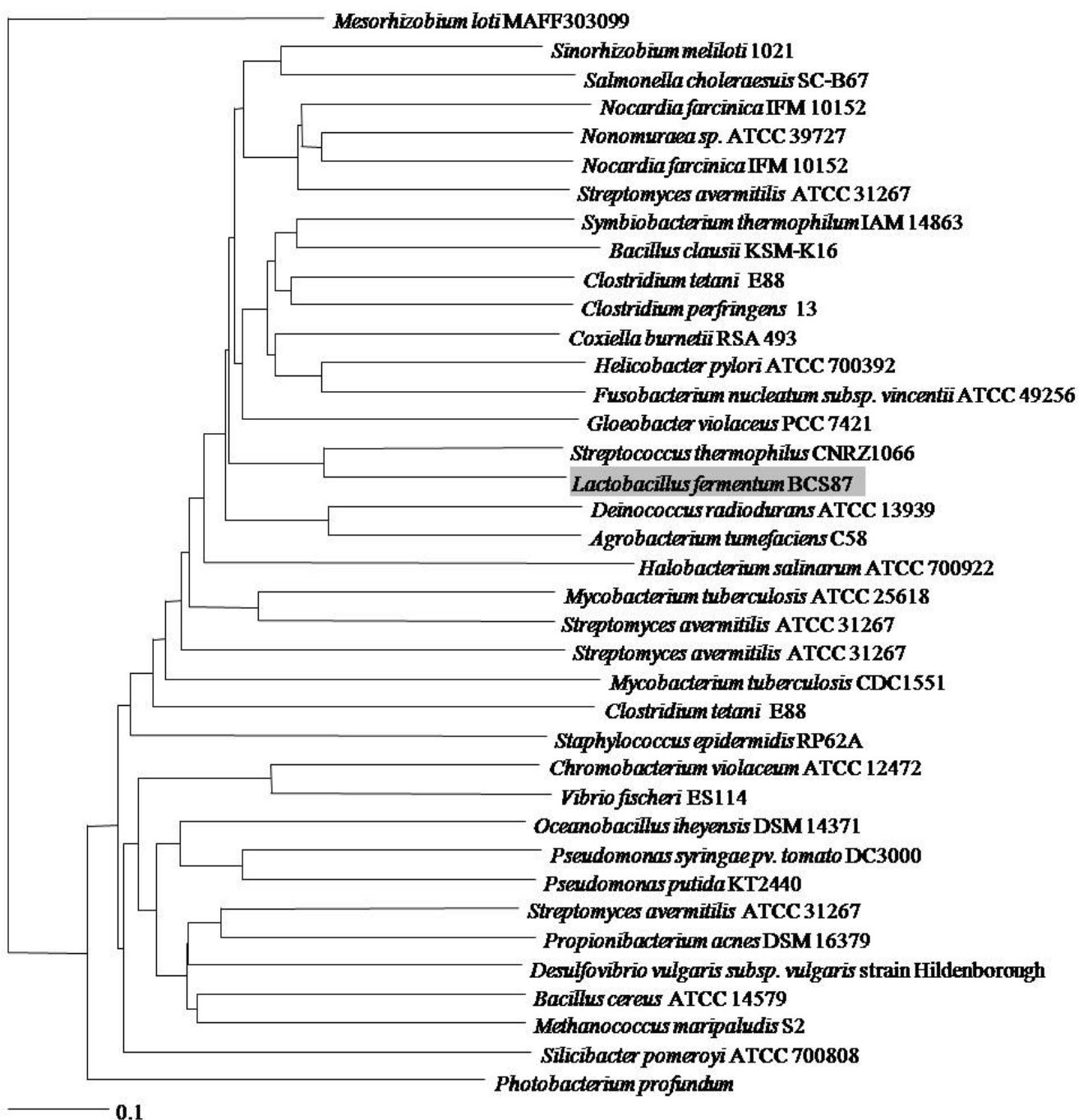


Figura 22. Árbol filogenético que muestra la relación entre secuencias aminoácidas de proteínas miembros de la familia OpuAC. Las secuencias aminoácidas fueron alineadas utilizando las herramientas de Clustal W y el árbol filogenético fue calculado por el método de neighbor-joining. Las secuencias se indican con el nombre del organismo en el que fueron reportadas y los números de acceso de las proteínas que están incluidas en el árbol en orden descendente son las siguientes: Q986J3; Q92YR5; Q57PE5; Q5YV65; Q7WZ46; Q5YUP4; Q82D40; Q67L34; Q5WGH9; Q898R9; Q8XMY0; Q83EY1; O25496; Q7P784; Q7NM78; Q5LZ57; FJ026800; Q9RZ18; Q8UIU3; Q9HP83; O69725; Q82L34; Q825P9; O50459; Q894Y8; Q5HRE7; Q7NXJ7; Q5DYM6; Q8CUV6; Q88B53; Q88R30; Q828F3; Q6A681; Q729Q3; Q81CH2; Q6LYW9; Q5LKZ8 and Q6LGD1.

3.4 Discusión y conclusiones

La colonización del tracto gastrointestinal por microorganismos benéficos constituye la primera barrera de defensa contra la invasión de bacterias patógenas. A pesar de esto, los mecanismos mediante los cuales estos microorganismos benéficos colonizan el tracto gastrointestinal, hasta hoy no han sido completamente descritos. Se sabe que moléculas de superficie, reconocen de manera específica la superficie mucosa en el tracto intestinal y que estas moléculas son vitales durante la colonización (Boekhorst *et al.* 2006). En cepas de *L. fermentum*, la adhesión ha sido correlacionada con su habilidad para ejercer un efecto probiótico en el hospedero (Lin *et al.* 2007;). De manera particular, se ha reportado que la adhesión de *L. fermentum* I5007 está correlacionada directamente con su habilidad para excluir patógenos en el tracto intestinal (Li *et al.* 2008). Durante el presente estudio, se identificó a dos proteínas de superficie involucradas en la adhesión de *L. fermentum* BCS87 a moco y mucina de cerdo. Estas proteínas fueron extraídas con LiCl 1M, por lo que se deduce que están asociadas de manera no covalente con la superficie celular de *L. fermentum* BCS87 tal como fue sugerido anteriormente por Lortal *et al.* (1992). Ambas proteínas mostraron habilidad para adherirse tanto a moco como a mucina de cerdo, esto sugiere que el receptor podría ser un componente de la mucina. Estos resultados concuerdan con lo previamente reportado por Fang *et al.* (2000) y por Vimal *et al.* (2000) quienes observaron que el receptor específico reconocido por adhesinas de *E. coli* K88 ac+ y *Salmonella typhimurium*, son proteínas y glicoproteínas del moco intestinal de cerdos y ratas, respectivamente. Las dos adhesinas identificadas en la superficie de *L. fermentum* BCS87, mostraron un peso molecular relativo de 29 y 32 kDa. En trabajos recientes, proteínas con

pesos moleculares similares a estos han sido reportadas en otras especies de *Lactobacillus* como las responsables de su adhesión a moco, mucinas y células Caco-2 (Rojas *et al.* 2002; Miyoshi *et al.* 2006; Wang *et al.* 2008). De manera particular en cepas de *L. fermentum*, se han reportado factores de adhesión de naturaleza proteica con pesos moleculares de menos de 3 kDa y una proteína de 29 kDa que se adhieren a células Caco-2 y a moco respectivamente (Rojas *et al.* 2002; Baccigalupi *et al.* 2005). Por otro lado, una proteína de 29 kDa que inhibe la adhesión de *Enterococcus faecalis* 1131 a tejido epitelial, fue identificada en la superficie de *L. fermentum* RC-14 (Heinemann *et al.* 2000). Esta proteína resultó ser 100% idéntica a una proteína que promueve la adhesión a colágeno en *L. reuteri* NCIB 11951 (Roos *et al.* 1996). Con base en estas observaciones, podemos sugerir que proteínas de superficie con peso molecular similar al que presentan las 2 proteínas identificadas en *L. fermentum* BCS87, están relacionadas generalmente con la adhesión de cepas de *L. fermentum* y *L. reuteri* a componentes gastrointestinales.

Durante el presente estudio, la cepa de *L. fermentum* 104R fue utilizada como control positivo durante los ensayos de western blot. A pesar de pertenecer a la misma especie, ambas cepas presentaron patrones de adhesión distintos. Estos resultados concuerdan con lo previamente reportado por Jacobsen *et al.* (1999) quien observó patrones de adhesión diferentes en cepas que pertenecen incluso a la misma especie. De hecho, al observar los pesos moleculares relativos de las dos adhesinas identificadas en la superficie de *L. fermentum* BCS87 se sugirió que la proteína de 29 kDa podría estar relacionada con la proteína MAPP de *L. fermentum* 104R. Sin embargo al analizar la secuencia del péptido amino terminal de esta proteína se observó que esta podría pertenecer a las proteínas de tipo APF (Aggregation

Promoting Factor) mismas que promueven la coagregación de cepas de *Lactobacillus* y que se han sugerido además como factores importantes que promueven la colonización de cepas de este género y su habilidad para impedir la colonización de patógenos intestinales (Kmet & Lucchini 1997). A pesar de ser muy atractiva para su estudio, los resultados obtenidos mediante la secuenciación de peptidos internos de 32-Mmubp por LC-MS/MS mostraron que esta no esta completamente pura, por lo que se continuará más adelante con su estudio.

En este trabajo se reporta la secuencia completa del gen que codifica para la proteína de 32 kDa (32-Mmubp). En la secuencia aminoácida deducida se identificó un péptido señal y un sitio de corte, lo que sugiere que esta proteína es dirigida a la superficie bacteriana pero además, que esta proteína puede ser excretada al medio. Sin embargo, 32-Mmubp se encontraba asociada a la superficie bacteriana ya que fue posible recuperarla después de llevar a cabo la extracción con LiCl. Una hipótesis propuesta es que en virtud de que 32-Mmubp presenta un punto isoeléctrico alto (9.87) y una carga neta positiva, esta podría mantener una interacción de tipo electrostático con componentes ácidos en la superficie de *L. fermentum* BCS87, tal como fue propuesto para la proteína BspA de *L. fermentum* BR11 (Turner *et al.* 1997). Por otro lado, un análisis hecho en Blast utilizando la secuencia aminoácida deducida, mostró entre 99 y 47% de identidad entre esta secuencia y la región de unión al sustrato de sistemas de transporte dependientes de ATP (ABC-transporter). Trabajos previos reportaron que eventos de co-agregación y de adhesión a fibronectina en *Streptococcus gordonii* PK488 (Kolenbrander *et al.* 1994) y en miembros del grupo B de *Streptococcus* (Tamura *et al.* 2002) están relacionados directamente con proteínas del tipo ABC transporter. Además, en *L. reuteri* NCIB 11951 fue

caracterizada una proteína de superficie que promueve la adhesión de esta bacteria a colágeno. Dicha proteína mostró una alta identidad con la región de unión al sustrato de proteínas de tipo ABC-transporters (Roos et al. 1996). Estos reportes nos llevan a concluir que proteínas involucradas en el transporte de metabolitos pueden tener más de una función o una función diferente a la que se predice normalmente por medios bioinformáticos tal como fue sugerido por Bâth *et al.* (2005) y por Wall *et al.* (2003).

Por otro lado, un análisis de relación filogenética hecha con la secuencia deducida de 32-Mmubp y con secuencias miembro de la familia OpuAC, mostró que estas se agrupan dentro de un mismo grupo (cluster). Dentro de este cluster, se agruparon secuencias de proteínas de especies bacterianas que comúnmente habitan nichos ecológicos similares a los ocupados por miembros del género *Lactobacillus* como el tracto gastrointestinal y el respiratorio (Figura 22). La relación filogenética observada entre 32-Mmubp y estas proteínas, sugiere una relación estructural entre ellas, pero al mismo tiempo abre la posibilidad de investigar si dichas proteínas exhiben actividades adhesivas de tipo funcional tanto *in vivo* como *in vitro*. En algunas de estas especies bacterianas, se ha reportado la relación entre proteínas del tipo ABC-transporter y su capacidad de adhesión a las células de su hospedero (Matthyse *et al.* 1996). En *Streptococcus pneumoniae* por ejemplo, se demostró que una proteína de tipo ABC-transporter que se encarga del transporte de zinc está involucrada con la adhesión de este patógeno a células epiteliales de pulmones en humanos (Song *et al.* 2008).

Finalmente, a manera de conclusión podemos mencionar que es claro que durante los eventos de adhesión se involucran un gran número de factores. Sin embargo, la

caracterización de las adhesinas de superficie en cepas de *Lactobacillus* y su posterior análisis estructural, podría permitirnos sugerir una relación entre la función y la estructura en dichas adhesinas.

En este trabajo se reporta que 32-Mmubp presenta una nueva función o al menos una función adicional como adhesina, que resulta ser muy importante si consideramos que esta bacteria presenta al menos *in vitro* propiedades probióticas importantes. Es necesario considerar que en este trabajo se encontró que una proteína de peso molecular aparente de 29 kDa presentó también capacidad para adherirse tanto a moco como a mucina. Esta observación hace necesaria la caracterización de la proteína de 29 kDa con el objetivo de evaluar la contribución individual de estas dos proteínas durante la adhesión de *L. fermentum* BCS87 a moco y mucina gastrointestinal de cerdos.

DISCUSIÓN GENERAL

Asegurar la producción de alimentos siendo al mismo tiempo competitivos es una tarea difícil aún para países en desarrollo como el nuestro. En relación con la producción porcícola en nuestro país, en los últimos 10 años ha habido un fuerte apoyo por parte del gobierno federal para incrementar la producción en la región noroeste de nuestro país, en específico en el estado de Sonora. Debido al clima característico de esta región, muchas de las enfermedades comunes que aquejan a los cerdos han sido erradicadas. Por ejemplo, los estados que conforman la región noroeste fueron declarados libres de fiebre porcina clásica por la FAO (<http://www.fao.org/docrep/006/x6704s/x6704s02.htm>). Sin embargo la producción de carne de cerdo en esta región se enfrenta a dos grandes problemas, el primero es que los costos de producción que se manejan en nuestro país superan con mucho a los costos de producción que manejan los productores de nuestro país vecino, Estados Unidos (0.32 dólares/5 kg de carne contra 0.52 dólares/5kg de carne en nuestro país) (2006; <http://www.sagarpa.gob.mx/>). Las condiciones climáticas de la región noroeste, aseguran la baja presencia de patógenos pero por otra parte, hacen necesario el uso de equipo tecnológico que les permita mantener un clima adecuado para las granjas. Los más afectados en este sentido son los pequeños y medianos productores que no cuentan con los recursos necesarios para invertir en este tipo de equipo, y por tanto ven mermada seriamente su producción. Con el fin de poder mantenerse en el mercado internacional, los productores porcícolas de la región han adoptado iniciativas basadas en la premisa de que no invertirán en la expansión pero si apoyarán aquellas estrategias que les permitan añadir valor agregado a sus productos (Hernández & Maya 2002).

Para añadir valor agregado a un producto alimenticio, una de las estrategias más atractivas lo representa el mercado de los productos orgánicos (Wier & Calverley 2002). En las granjas de producción de carne orgánica no se utilizan antibióticos, hormonas de crecimiento y en muchos países se exige que los animales no hayan sido genéticamente modificados. Para evitar el uso de antibióticos y mejorar la productividad en granjas porcíneas, una de las alternativas más viables lo constituye el uso de probióticos (Kyriakiss *et al.* 2003). En el presente trabajo de tesis se describió un panorama general que hace énfasis sobre cual es la situación actual que guarda el uso de probióticos en la producción animal (punto 1.3.4, pag. 18). El principal problema observado es que no existen normas que regulen la selección, validación a varias escalas y producción tecnológica de productos probióticos. No se ha exigido que los probióticos comerciales cuenten con un respaldo científico que aseguren su eficacia a varios niveles. Es claro que durante el aislamiento y selección de bacterias probióticas se deben de considerar un gran número de características. En este trabajo se describió tanto el aislamiento como la selección y caracterización de bacterias potencialmente probióticas basados en cinco premisas principales: 1) las cepas aisladas y seleccionadas habitan de manera normal y en altos números el tracto gastrointestinal de cerdos sanos, 2) estas fueron identificadas a nivel de especie y sabemos que pertenecen al grupo GRAS lo que asegura su inocuidad, 3) el criterio utilizado para su selección se basó en su habilidad para adherirse y crecer en moco intestinal, esto permite discriminar entre bacterias capaces de colonizar el tracto intestinal de aquellas que no lo hacen, al menos *in vitro*, 4) la resistencia de estas cepas a condiciones climáticas propias de las regiones áridas nos permiten asegurar su sobrevivencia antes de que lleguen a su nicho de acción que es el tracto

gastrointestinal y finalmente, 5) las biomoléculas responsables de la adhesión a moco y mucina fueron estudiadas y se tiene ya un avance significativo en lo relacionado al mecanismo mediante el cual estas cepas se adhieren.

Obviamente, este trabajo, nos deja más preguntas que respuestas, aún es necesario contestar cuestiones como ¿las propiedades adhesivas observadas *in vitro* son capaces de reproducirse *in vivo*?, ¿mejoran las condiciones generales de salud y la productividad en cerdos durante el período del destete mediante la suplementación de estas bacterias?, ¿existe relación entre la capacidad de adhesión y la habilidad de estas cepas para estimular el sistema inmune?, ¿qué otro tipo de comunicación celular se manifiesta entre la bacteria comensal probiótica y su hospedero?, ¿a nivel tecnológico, cuales son las condiciones de escalamiento óptimas que nos permitirán poder utilizar a estas bacterias a nivel industrial?, etc.

Para contestar estas preguntas es necesario implementar herramientas que nos permita monitorear *in vivo* cepas específicas (manejo molecular de genes reporteros), investigar que tipo de comunicación celular a nivel transcripcional y post-traducciona se da entre este tipo de bacterias y su hospedero mediante herramientas de expresión diferencial y proteómicas, evaluar la producción de biomasa en biorreactores a diferentes escalas utilizando medios de cultivo baratos y muchos otros más.

CONCLUSIONES GENERALES

De manera general, con base en los resultados obtenidos se puede concluir que la hipótesis originalmente planteada es válida. Los resultados mostraron que cepas de *Lactobacillus* cultivables se encuentran en altos números en heces y en moco intestinal de lechones sanos que habitan la región árido-costera de La Paz, en B.C.S., México. Por otro lado, más de la mitad de las cepas aisladas (53.7% de las cepas) se adhirió fuertemente a moco y mucina gástrica y fue capaz de crecer en moco intestinal.

En relación con la resistencia de las cepas a condiciones adversas propias de zonas áridas, se observó que un alto porcentaje de estas fue capaz de crecer a altas temperaturas (50°C, 75% de las cepas) y en presencia de concentraciones altas de NaCl (680 mM, 64% de las cepas).

La secuenciación y análisis del gen 16S del ADNr y de la región intergénica entre los genes 16-23S nos permitió identificar a nivel de especie a 27 de estas. A partir de este trabajo se concluye además que para llevar a cabo la identificación molecular de cepas del género *Lactobacillus*, la secuenciación del gen 16S es indispensable, sin embargo, para confirmar la identificación en cepas en las que el porcentaje de identidad de este gen con el de cepas de la misma especie previamente reportadas es bajo, el análisis de la región intergénica entre los genes 16S-23S es de gran ayuda.

Tal como se ha observado en trabajos previos hechos en cerdos que habitan climas diferentes, las cepas que mostraron potencial probiótico más abundantes pertenecen a las especies de *L. fermentum* en heces y *L. reuteri* en moco asociado a intestino.

Esto es importante ya que confirma la relevancia de estas especies y su relación con la salud en cerdos de granja antes del destete.

En la bacteria probiótica *L. fermentum* BCS87 seleccionada en el presente trabajo, se identificó a dos proteínas de superficie de 29 y 32 kDa que promueven su adhesión tanto a moco como a mucina. Los resultados sugieren que dichas proteínas podrían estarse adhiriendo específicamente a componentes de las mucinas del moco. La proteína de 32 kDa (32-Mmubp) fue identificada molecularmente y el análisis de su secuencia nucleotídica y aminoácida mostró que esta proteína es excretada al medio, pero en virtud de su carga neta positiva y de su pI, esta podría estar asociada a la pared celular de *L. fermentum* BCS87 mediante interacciones de tipo electrostático. La proteína 32-Mmub forma parte de la familia OpuAC, a la que pertenecen un gran número de proteínas encargadas del transporte de sustratos en bacterias. La relación estructural entre 32-Mmubp con otras proteínas bacterianas presentes en patógenos que comúnmente colonizan mucosas gastrointestinales y del tracto respiratorio sugiere que podría existir una relación entre su función biológica y dicha relación estructural.

REFERENCIAS

- Aarestrup, F.M., Hasman, H., Jensen L.B., Moreno, M., Herrero, I.A., Domínguez, L., Finn, M., Franklin A. 2002. Antimicrobial resistance among Enterococci from pigs in three european countries. *Appl Environ Microbiol* 68:4127-4129.
- Aarestrup, F.M., Seyfarth, A.M., Emborg, H.D., Pedersen, K., Hendriksen, R.S., Bager, F. 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal Enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2054-2059.
- Abee, T., and J. A. Wouters. 1999. Microbial stress response in minimal processing. *Int. J. Food Microbiol.* 50:65-91.
- Anderson, J.W., Gilliland, S.E. 1999. Effect of fermented milk (yoghurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J Am Coll Nutr* 18:43-50.
- Anokhina, I.V., Kravtsor, E.G., Yashina, N.V., Ermolaev, A.V., Chesnokova, V.L., Dalin, M.V. 2006. Characterization of surface adhesins of lactobacilli used in production of probiotic preparations. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 141:716-719.
- Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. 2nd ed. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Salminen, S. and von Wright, A. eds, Marcel Dekker Inc New York, USA pp. 1-72.
- Baccigalupi, L., Di Donato, A., Parlato, M., Luongo, D., Carbone, V., Rossi, M., Ricca, E., De Felice, M. 2005. Small surface-associated factors mediate adhesion of a food isolated strain of *Lactobacillus fermentum* to Caco-2 cells. *Res Microbiol* 156:830-836.
- Báth, K., Roos, S., Wall, T. and Jonsson, H. 2005. The cell surface of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 highlighted by identification of 126 extracellular proteins from the genome sequence. *FEMS Microbiol Lett* 253:75-82.
- Beachey, E.H. 1980. Bacterial adherence. Receptors and recognition. Series B vol.6, pp 1-26.

- Beckmann, C., Waggoner, J.D., Harris, T.O., Tamura, G.S., Rubens, C.E. 2002. Identification of novel adhesins from group B Streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infect Immun* 70:2869-2876.
- Berg, R.D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4:430-435.
- Billey, L.O., Erickson, A.K., Francis, D.H. 1998. Multiple receptors on porcine intestinal epithelial cells for three variants of *Escherichia coli* K88 fimbrial adhesion. *Vet Microbiol* 59:203-212.
- Boekhorst, J., Helmer, Q., Kleerebezem, M., Siezen, R.J. 2006. Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiol* 152:273-280.
- Boris, S., Suárez, J.E., Vázquez, F., Barbes, C. 1998. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect Immun* 66:1985-1989.
- Cadieux, P., Wind, A., Sommer, P., Schaefer, L., Crowley, K., Britton, R.A., Reid, G. 2008. Evaluation of reuterin production in urogenital probiotic *Lactobacillus reuteri* RC-14. *Appl Environ Microbiol* 74:4645-4649.
- Casey, P.G., Gardiner, G.E., Casey, G., Bradshaw, B., Lawlor, P.G, Lynch P.B., Leonard, F.C., Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Hill, C. 2007. A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Appl Envir Microbiol* 73:1858-1863.
- Castillo, M. 2006. Development of gut microbiota in the pig: modulation of bacterial communities by different feeding strategies. Doctoral thesis. Barcelona, Spain. p. 8.
- Castillo, M., Martín-Orué, S.M., Nofrarías, M., Manzanilla, E.G., Gasa, J. 2007. Changes in caecal microbiota and mucosal morphology of weaned pigs. *Vet Microbiol* 124:239-247.
- Cerruti, A., Rescigno, M. 2008. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 28:740-750.

- Chang, D.E., Smalley, D.J., Tucker, D.L., Leatham, M.P., Norris, W.E., Stevenson, S.J., Anderson, A.B., Grissom, J.E., Laux, D.C., Cohen, P.S., Conway, T. 2004. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. Proc Natl Acad Sci USA 101:7427-7432.
- Cheikhoussef, A., Pogori, N., Chen, W., Zhang, H. 2008. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: from production to their application. Int J Food Microbiol 125:215-222.
- Cheng, K.J., McAllister, A., Costerton, J.W. 1995. Biofilms of the ruminant digestive tract. In: Microbial biofilms, H.M. Lappin-Scott and J.W. Costerton eds, 1st ed, Cambridge University Press, New York, N.Y. pp. 221-232.
- Chiduwa, G., Chimonyo, M., Halimani, T.E., Chisambara, S.R., Dzama, K. 2008. Herd dynamics and contribution of indigenous pigs to the livelihoods of rural farmers in a semi-arid area of Zimbabwe. Trop Anim Health Prod 40:125-136.
- Claesson, M.J., van Sinderen, D., O'toole, P.W. 2007. The genus *Lactobacillus*- a genomic basis for understanding its diversity. FEMS Microbiol Lett 269:22-28.
- Coconnier, M.H., Klaenhammer, T.R., Kerneis, S., Bernet, M.F., Servin, A.L. 1992. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. Appl Environ Microbiol 58:2034-2039.
- Conway, P.L. 1994. Function and regulation of the gastrointestinal microbiota of the pig. EAPP publication 2:231-240.
- Conway, P.L. 1997. Development of intestinal microbiota. Gastrointestinal microbes and host interactions. In: R.I. Mackie, B.A. Whyte and R.E. Isaacson, eds. Gastrointestinal Microbil., vol. 2. Chapman and Hall, London.
- Conway, P.L., Kjelleberg, S. 1989. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 to mouse stomach squamous epithelium. J Gen Microbiol 135:1175-1186.
- Costerton, J.W., Lappin-Scott, H.M. 1995. Introduction to microbial biofilms. In: Microbial biofilms, H.M. Lappin-Scott and J.W. Costerton eds, 1st ed, Cambridge University Press, New York, N.Y. pp. 1-11.
- Cover, T.L., Aber, R.C. 1989. *Yersinia enterocolitica*. N Engl J Med 321:16-24.

- Danielsen, M., Hornshøj, H., Siggers, R.H., Jensen, B.B., van Kessel, A.G., Bendixen, E. 2007. Effects of bacterial colonization on the porcine intestinal proteome. *J Proteome Res* 6:2596-2604.
- Davis, C.P. 1996. Normal flora. In: Baron, S. ed. *Medical microbiology*. Galveston, TX. The University of Texas Medical Branch p. 123.131.
- De Angelis, M., Siragusa, S., Berloco, M., Caputo, L., Settanni, L., Alfonsi, G., Amerio, M., Grandi, A., Ragni, A., Gobbetti, M. 2006. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Res Microbiol* 157:792-801.
- De Angelis, M., Siragusa, S., Caputo, L., Ragni, A., Burzigotti, R., Gobbetti, M. 2007. Survival and persistence of *Lactobacillus plantarum* 4.1 and *Lactobacillus reuteri* 3S7 in the gastrointestinal tract of pigs. *Vet Microbiol* 123:133-144.
- Dellaglio, F., Felis, E.G. 2005. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. In *probiotics & prebiotics*, vol. 2, Tannock W.G. ed, pp. 25-49.
- Deplancke, B., Gaskins, H.R. 2001. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr* 73:1131S-1141S.
- Dunne, W.M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 15:155-166.
- Elahi, S., Farnell, P., Thurlow, K.J., Scotti, C., Varnam, A.H. 2008. Referee analysis of probiotic food supplements. *Food Cont* 19:925-929.
- Ewing, W.N., Cole, D.J.A. 1994. The microbiology of the gastrointestinal tract. In: *The living gut. An introduction to microorganisms in nutrition*. W.N. Ewing and D.J.A. Cole eds, Context, Ireland, UK pp 45-65.
- Fagan, R.P., Lambert, M.A., Smith, S.G.J. 2008. The Hek outer membrane protein of *Escherichia coli* strain RS218 binds to proteoglycan and utilizes a single extracellular loop for adherence, invasion and autoaggregation. *Infect Immun* 76:1135-1142.
- Falk, P.G., Hooper, L.V., Midtvedt, T., Gordon, J.I. 1998. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1157-1170.

- Fang, L., Gan, Z., Marquardt, R.R. 2000. Isolation, affinity purification, and identification of piglet small intestine mucosa receptor for enterotoxigenic *Escherichia coli* K88ac+ fimbriae. *Infection and immunity*. 68:564-569.
- FAO/WHO. 2002. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on guidelines for the evaluation of probiotics in foods. World Health organization and Food and Agriculture organization of the United Nations, London Ontario, Canada.
- Figueroa-Velasco, J.L., Chi-Moreno, E.E., Cervantes-Ramírez, M., Domínguez-Vara, I.A. 2006. Functional foods for weanling pigs. *Vet Mex* 37: 117-136.
- Franklin, M.A., Mathew, A.G., Vickers, J.R., Clift, R.A. 2002. Characterization of microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, ileum, and cecum of pigs weaned at 17 vs 24 days of age. *J Anim Sci* 80:2904-2910.
- Fraser, D., Milligan, B.N., Pajor, E.A., Philips, P.A., Taylor, A.A., Weary, D.M. 1998. Behavioral perspectives on weaning in domestic pigs. In: *Progress pig science*, J. Wiseman, M.A. Varley, and P. Chadwick eds, Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 121-138.
- Fuller, R. 1975. Nature of the determinant responsible for the adhesion of lactobacilli to chicken crop epithelial cells. *J Gen Microbiol* 87:245-250.
- García-Lafuente, A., Antolín, M., Guarner, F., Crespo, E., Malagelada, J.R. 2001. Modulation of colonic barrier function by the composition of the comensal flora in the rat. *Gut* 48:503-507.
- Gardiner, G.E., Casey, P.G., Casey G., Lynch, P.B., Lawlor, P.G., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, P. 2004. Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Appl Envir Microbiol* 70:1895-1906.
- González, J.M. 2007. Virbac info. Publicación de laboratorios Virbac México. No. 47.
- Granato, D., Bergonzelli, G.E., Pridmore, R.D., Marvin, L., Rouvet, M., Corthésy-Theulaz, I.E. 2004. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect Immun* 72:2160-2169.

- Gratz, S., Wu, Q.K., El-Nezami, H., Juvonen, R.O., Mykkänen, H., Turner, P.C. 2007. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B₁ transport, metabolism, and toxicity in Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* 73:3958-3964.
- Greene, J.D., Klaenhammer, T.R. 1994. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* 60:4487-4494.
- Guarner F., Schaafsma, G.J. 1998. Probiotics. *Int J Food Microbiol* 39:237-238.
- Gupta, P., Andrew, H., Kirschner, B.S., Guandalini, S. 2000. Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 31:453-457.
- Gusils, C., Oppezzo, O., Pizarro, R., González, S. 2003. Adhesion of probiotic lactobacilli to chick intestinal mucus. *Can J Microbiol* 49:472-478.
- Haghighi, H.R., Gong, J., Gyles, C.L. Hayes, M.A., Sanei, B., Parvizi, P., Gisavi, H., Chambers, J.R., Sharif, S. 2005. Modulation of antibody-mediated immune response by probiotics in chickens. *Clin Diagno Lab Immunol* 12:1387-1392.
- Heinemann, C., van Hylckam-Vlieg, J.E.T., Janssen, D.B., Busscher, H.J., van der Mei, H.C. and Reid, G. 2000. Purification and characterization of a surface-binding protein from *Lactobacillus fermentum* RC-14 that inhibits adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131. *FEMS Microbiol Lett* 190:177-180.
- Henriksson, A. 1993. *Lactobacillus* colonization of the porcine gastrointestinal tract. Doctoral thesis. University of Göteborg, Sweden.
- Henriksson, A., Szewzyk, T., Conway, P.L. 1991. Characteristics of adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. *Appl Environ Microbiol* 57:499-502.
- Hernández, M., Maya, A.C. 2002. Globalization and pork raising in Mexico: The challenges of integration in the world market. *International Journal of Sociology of Agriculture and Food* 10:25-31.
- Hill, J.E., Hemmingsen, S.M., Goldade, B.G., Dumonceaux, T.J., Klassen, J., Zijlstra, R.T., Goh, S.H., Van Kessel, A.G. 2005. Comparison of ileum microflora of pigs fed corn-, wheat-, or barley-based diets by chaperonin-60 sequencing and quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* 71:867-875.

- Hirano, J., Yoshida, T., Sugiyama, T., Loide, N., Mori, I., Yokochii, T. 2003. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells *in vitro*. *Microbiol immunol* 47:405-409.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr* 73:375S-373S.
- Hopwood, D.E., Hampson, D.J. 2003. Interactions between the intestinal microflora diet and diarrhea, and their influences on piglet health in the immediate post-weaning period. In: Weaning the pig. Concepts and consequences. J.R. Pluske, J. Le Dividich and M.W.A. Verstegen, eds, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.
- Horie, M., Marakami, T., Sato, T., Rarusawa, Y., Nakamura, S., Toba T. 2005. Anaerobic induction of adherence to laminin in *Lactobacillus gasseri* strains by contact with solid surface. *Curr Microbiol* 51:275-282.
- Huang, G., Zhang, L., Birch, R.G. 2000. Rapid amplification and cloning of Tn5 flanking fragments by inverse PCR. *Lett Appl Microbiol* 31:149-153.
- Jacobsen, C.N., Rosenfeldt-Nielsen, V., Hayford, A.E., Møller, P.L., Michaelsen, K.F., Paerregaard, A., Sandström, B., Tvede, M. and Jakobsen, M. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus spp.* by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl Environ Microbiol* 65:4949-4956.
- Jensen, B.B. 1998. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *J Anim Feed Sci Technol* 89:175-188.
- Jensen, B.B. 2001. Possible ways of modifying type and amount of products from microbial fermentation in the gut. In: Gut environment of pigs. A. Piva, K.E. Bach Knudsen and J.E. Lindberg eds, Nottingham University Press, United Kingdom.
- Jensen, B.B., Jorgensen, H. 1994. Effect of dietary fibre on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs. *Appl Environ Microbiol* 60:1897-1904.

- Jensen, B.B., Agergaard, N., Hansen, L.L., Mikkelsen, L.L., Jensen, M.T., Laue, A. 1998. Effect of liquid feed on microbial production of skatole in the hind gut, skatole absorption to portal vein blood and skatole deposition in back fat. In: Skatole and Boar taint. W.K. Jesen, ed. Danish Meat Research Institute, Roskilde.
- Jernberg, C., Sullivan, A., Edlund, C., Jansson, J.K. 2005. Monitoring of antibiotic-induced alterations in the human intestinal microflora and detection of probiotic strains by use of terminal restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 71:501-506.
- Jin, L.Z., Zhao, X. 2000. Minireview: intestinal receptors for adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 in swine. *Appl Microbiol Biotechnol* 179:284-286.
- Kanis, E., De Greef, K.H., Hiemstra, A., van Arendonk, J.A.M. 2005. Breeding for societally important traits in pigs. *J Anim Sci* 83:948-957.
- Katouli, M., Lund, A., Wallgren, P., Kühn, I., Snöderlind, O., Möllby, R. 1997. Metabolic fingerprinting and fermentative capacity of the intestinal flora of pigs during pre- and post-weaning periods. *J Appl Microbiol* 83:147-154.
- Kelly, D., Conway, S., Aminov, R. 2005. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends Immunol* 26:326-333.
- Kenworthy, R., Crabbw, E. 1963. The intestinal flora of young pigs with reference to early weaning, *Escherichia coli* and scours. *J Comp Path* 213:215.
- Kim, Y., Kim, S.H., Whang, K.Y., Kim, Y.J., Oh, S. 2008. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 attachment by interactions between lactic acid bacteria and intestinal epithelial cells. *J Microbiol Biotechnol* 18:1278-1285.
- Kirjavainen, P.V., Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Salminen, S.J. 1998. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett* 167:185-189.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 41:103-125.
- Kmet, V., Lucchini, F. 1997. Aggregation-promoting factor in human vaginal *Lactobacillus* strains. *FEMS Immunol Med Microbiol* 19:111-114.

- Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N. and Ganeshkumar, N. 1994. Nucleotide sequence of the *Streptococcus gordonii* PK488 coaggregation adhesin gene, scaA, and ATP-binding cassette. *Infect Immun* 62:4469-4480.
- Korhonen, J.M., Sclivagnotis, Y., von Wright, A. 2007. Characterization of dominant cultivable lactobacilli and their antibiotic resistance profiles from faecal samples of weaning piglets. 2007. *J Appl Microbiol* 103: 2496-2503.
- Kyriakis, S.C., Georgoulakis, I., Spais, A., Alexopoulos, C., Miliotis, C.C., Kritas, S.K. 2003. Evaluation of toyocerin, a probiotic containing *Bacillus toyoi* spores, on health status and productivity of weaned, growing and finishing pigs. *Asian-Australasian J Anim Sci* 16:1326-1331.
- Lata, J., Juránková, J., Doubek, J., Příbramská, P., Frič, P., Dítě, P., Kolář, M., Scheer, P., Kosáková, D. 2006. Labelling and content evaluation of commercial veterinary probiotics. *Acta Vet. BRNO* 75:139-144.
- Le Dividich, J., Herpin, P. 1994. Effects of climatic conditions on the performance, metabolism and health status of weaned piglets: a review. *Livest Prod Sci* 38:79-90.
- Lee, J.H. 2003. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol* 69:6489-6494.
- León de la Luz, J.L., Coria-Benet, R., Cruz-Estrada, M. 1996. Fenología floral de una comunidad árido-tropical de Baja California Sur, México. *Acta Botánica Mexicana* 35:45-64.
- Lidén, S., Mahdavi, J., Hedenbro, J., Borén, T., Carlstedt, I. 2004. Effects of pH on *Helicobacter pylori* binding to human gastric mucins: Identification of binding to non-MUC5AC mucins. *Biochem J* 384:263-270.
- Li, X.J., Yue, L.Y., Guan, X.F., and Qiao, S.Y. 2008. The adhesion of putative probiotic lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus. *J Appl Microbiol* 104:1082-1091.
- Lin, W.H., Yu, B., Jang, S.H., Tsen, H.Y. 2007. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe* 13:107-113.

- Lorca, G., Torino, M.I., Font de Valdez, G., Ljungh, A.A. 2002. Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. *FEMS Microbiol Lett* 206:31-37.
- Lortal, S., Heijenoort, J., Gruber, K. and Sleytr, U.B. 1992. S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: Isolation, chemical characterization and re-formation after extraction with lithium chloride. *J Gen Microbiol* 138:611-618.
- Mack, D.R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., Hollingsworth, M.A. 1999. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* 276:G941-G950.
- Mackie, R.I., Sghir, A., Gaskins, H.R. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 69:1035S-1045S.
- Maldonado-Galdeano, C., de Moreno de LeBlanc, A., Vinderola, G., Bibas-Bonet, M.E., Perdigon, G. 2007. Minireview Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin Vaccine Immunol* 14:485-492.
- Malin, M., Suomalainen, H., Saxelin, M., Isolauri, E. 1996. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus* GG. *Ann Nutrition Metabol* 40:137-145.
- Mantle, M., Forstner, G.G., Forstner, J.F. 1984. Antigenic and structural features of goblet cell mucin of human small intestine. *Biochem J* 217:159-167.
- Mantle, M., Husar, S.D. 1994. Binding of *Yersinia enterocolitica* to purified, native small intestinal mucins from rabbits and humans involves interactions with the mucin carbohydrate moiety. *Infect Immun* 62:1219-1227.
- Marco, M.L., Pavan, S., Kleerebezem, M. 2006. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr Opin Biotechnol* 17:204-210.
- Matthysse, A.G. 1986. Initial interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. *CRC Crit Rev Microbiol* 13:281-307.
- Medellin-Peña, M.J., Wang, H., Johnson, R., Anand, S., Griffiths, M.W. 2007. Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 73:4259-4267.

- Melin, L. 2001. Weaning of pigs with special focus on the intestinal health. Doctoral thesis. Acta 112. Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden.
- Mendez, M., Huang, I.H., Ohtani, K., Grau, R., Shimizu, T., Sarker, M.R. 2008. Carbon catobalite repression of type IV pilus-dependent gliding motility in the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. J Bacteriol 190:48-60.
- Metcalfe, J.E., Krogfelt, K.A., Krivan, H.C., Cohen, P.S., Laux, D.C. 1991. Characterization and identification of a porcine small intestine mucus receptor for the K88ab fimbrial adhesion. Infect Immunol 59:91-96.
- Metchnikoff, E. 1907. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: The prolongation of life: optimistic studies. W. Heinemann, London p. 161-183.
- Millsap, K.W., Reid, G., van der Mei, H.C., Busscher, H.J. 1997. Adhesion of *Lactobacillus* species in urine and phosphate buffer to silicone rubber and glass under flow. Biomaterials 18:87-91.
- Miyoshi, Y., Okada, S., Uchimura, T., Satoh, E. 2006. A mucus adhesion promoting protein, MapA, mediates the adhesion of *Lactobacillus reuteri* to Caco-2 human intestinal epithelial cells. Biosci biotechnol Biochem 70:1622-1628.
- Moore, W.E.C., Moore, L.V.H., Cato, E.P., Wilkins, T.D., Kornegay, E.T. 1987. Effect of high-fiber and high-oil diets on the fecal flora of swine. Appl Environ Microbiol 53:1638-1644.
- Morita, H., Toh, H., Fukuda, S., Horikawa, H., Oshima, K., Suzuki, T., Murakami, M., Hisamatsu, S., Kato, Y., Takizawa, T., Fukuoka, H., Yoshimura, T., Itoh, K., O'Sullivan, D.J., McKay, L.L., Ohno, H., Kikuchi, J., Masaoka, T., Hattori, M. 2008. Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. DNA Res 15:151-161.
- Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. 1973. The viscera of the domestic mammals. Paul Parey. Berlin.
- Niemann, H.H., Schubert, W.D., Heinz, D.W. 2004. Adhesins and invasions of pathogenic bacteria: a structural view. Microbes Infect 6:101-112.
- Ochman, H., Gerber, A.S., Hartl, D.L. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. Genetics 120:621-623.

- O'Dea, E.E., Fasenko, G.M., Allison, G.E., Korver, D.R., Tannock G.W., Guan L.L. 2006. Investigating the effects of commercial probiotics on broiler chick quality and production efficiency. *Poultry Sci* 85:1855-1863.
- Olivares, M., Díaz-Roperó, M.P., Martín, R., Rodríguez, J.M., Xaus, J. 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol* 101:72-79.
- Ouwehand, A.C. 1996. *In vitro* inhibition of adhesion of *Escherichia coli*. Department of general and marine microbiology, Göteborg University. Göteborg Sweden. PhD thesis. p. 3-4.
- Parassol, N., Freitas, M., Thoreux, K., Dalmaso, G., Bourdet-Sicard, R., Rampal, P. 2005. *Lactobacillus casei* CN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Res Microbiol* 156:256-262.
- Perea-Vélez, M., De Keersmaecker, S.C.J., Vanderleyden, J. 2007. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Lett* 276:140-148.
- Pollmann, M., Nordhoff, M., Pospischil, A., Tedin, K., Wieler, L.H. 2005. Effects of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on the rate of natural Chlamydia infection in swine. *Infect Immun* 73:4346-4353.
- Reid, G. 1999. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl Environ Microbiol* 65:3763-3766.
- Reid, G. 2005. The importance of guidelines in the development and application of probiotics. *Curr Pharm Des* 11:11-16.
- Reid G, Friendship R. 2002. Alternatives to antibiotic use: probiotics for the gut. *Anim biotechnol* 13:97-112.
- Reid, G., Kim, S.O., Köhler, G.A. 2006. MINIREVIEW: Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46:149-157.
- Reid, G., Servin, A.L., Bruce, A.W., Busscher, H. 1993. Adhesion of three *Lactobacillus* strains to human urinary and epithelial cells. *Microbios* 75:57-65.

- Rendón, M.A., Saldaña, Z., Erdem, A.L. Monteiro-Neto, V., Vázquez, A., Kaper, J.B., Puente, J.L., Girón, J.A. 2007. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. Proc Natl Acad Sci USA 104:10637-10642.
- Reque, E.de F., Pandey, A. Franco, S.G., Soccoli, C.R. 2000. Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* LPB for use as probiotic in chickens. Brazilian J Microbiol 31:303-307.
- Robinson, I.M., Allison, M.J., Bucklin, J.A. 1981. Characterization of the cecal bacteria of normal pigs. Appl Environ Microbiol 41:950-955.
- Rojas, M., Ascencio, F., Conway, P.L. 2002. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. Appl Environ Microbiol 68:2330-2336.
- Rojas, M., Conway, P.L. 1996. Colonization by lactobacilli of piglet small intestinal mucus. J Appl Bacteriol 81:474-480.
- Rolfe, R.D. 1996. Colonization resistance. Gastrointestinal microbes and host interactions. In: Gastrointestinal Microbiol., vol. 2. R.I. Mackie, B.A. Whyte, and R.E. Isaacson, eds. Chapman and Hall, London. UK.
- Roos, S., Aleljung, P., Robert, N., Lee, B., Wadström, T., Lindberg, M. and Jonsson, H. 1996. A collagen binding protein from *Lactobacillus reuteri* is part of an ABC transporter system? FEMS Microbiol Lett 144:33-38.
- Roos, S., Jonsson, H. 2002. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. Microbiol 148:433-442.
- Roos, S., Karner, F., Axelsson, L., Jonsson, H. 2000. *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with *in vitro* mucus-binding activity isolated from pig intestine. Int J Syst Evol Microbiol 50:251-258.
- Roselli, M., Finamore, A., Britti, M.S., Bosi, P., Oswald, I., Mengheri, E. 2005. Alternatives to in-feed antibiotics in pigs: Evaluation of probiotics, zinc or organic acids as protective agents for the intestinal mucosa. A comparison of *in vitro* and *in vivo* results. Anim Res 54:203-218.

- Rosenberg, M., Doyle, R.J. 1990. Microbial cell surface hydrophobicity: history, measurement, and significance. In: Microbial cell surface hydrophobicity, R.J. Doyle and M. Rosenberg eds, American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 1-37.
- Ross, M.H., Romrell, L.J., Kaye, G.I. 1997. Aparato digestivo II: esófago, estómago e intestino. En: Histología texto y atlas color, 3era. Edición, Editorial médica panamericana. P. 438-486.
- Rowan, J.P., Durrance, K.L., Combs, G.E. and Fisher, L.Z. 1997. The digestive tract of pig (AS23). Department of animal science. Institute of food and agricultural sciences, University of Florida (<http://edis.ifas.ufl.edu/AN012>).
- Russell, E.G. 1979. Types and distribution of anaerobic bacteria in the large intestine of pigs. *Appl Environ Microbiol* 37:187-193.
- Rutter, P.R., Dazzo, F.B., Freter, R., Gingell, D., Jones, G.W., Kjelleberg, S., Marsall, K.C., Mrozek, H., Rades-Rohkol, E., Robb, I.D., Silverman, M., Tylewska, S. 1984. Mechanisms of adhesion. In: Microbial adhesion and aggregation, K.C. Marshall ed, Springer-Verlag, Berlin, pp. 5-19.
- Saenz, Y., Zarazaga, M., Lantero, M., Gastañares, M.J., Baquero, F., Torres, C. 2000. Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* 44:267-271.
- Salanitro, J.P., Blake, I.G., Muirhead, P.A. 1977. Isolation and identification of fecal bacteria from swine. *Appl Environ Microbiol* 33:79-84.
- Shao, L., Kamalu, O., Mayer, L. 2005. Non-classical MNC class I molecules on intestinal epithelial cells: mediators of mucosal crosstalk. *Immunol Rev* 206:160-176.
- Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., Mentis, A. 2004. *In vitro* and *In vivo* inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain shirota. *Appl Environm Microbiol* 70:518-526.
- Shimizu, M., Shimizu, Y., Kodama, Y. 1978. Effects of ambient temperatures on induction of transmissible gastroenteritis in feeder pigs. *Infect Immun* 21:747-752.

- Shirkey, T.W., Siggers, R.H., Goldade, B.G., Marshall, J.K., Drew, M.D., Laarveld, B., Van Kessel, A.G. 2006. Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig. *Exp Biol Med* 231:1333-1345.
- Simpson, J.M., McCracken, V.J., White, B.A., Gaskins, H.R., Mackie, R.I. 1999. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J Microbil methods*. 36:167-179.
- Sneath, P.H.A. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Nicholas S. Mair, M. Elizabeth Sharpe, John G. Holt Eds. Vol 2. John P. Butler Ed. Williams & Wilkins. Baltimore-Hong Kong-London-Sydney.
- Song, X.M., Connor, W., Jalal, S., Hokamp, K. and Potter, A.A. 2008. Microarray analysis of *Streptococcus pneumoniae* gene expression changes to human lung epithelial cells. *Can J Microbiol* 54:189-200.
- Soto, G.E., Hultgren, S.J. 1999. Bacterial adhesions: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol* 181:1059-1071.
- Stewart, C.S. 1999. Microorganisms in hindgut fermentors. In: *Gastrointestinal Microbiol*, R.I. Mackie and B.A. White, eds, 2nd edition, Chapman and Hall Microbiol Series, New York.
- Stewart, C.S., Hillman, K., Maxwell, F., Kelly, D., King, T.P. 1993. Recent advances in probiosis in pig: Observations on the microbiology of the pig gut. In: *Recent advances in animal nutrition*. P.C. Garnsworthy and D.J. Cole, eds. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Stryiak, I., Nemcová, R., Chang, Y.H., Ljungh, Å. 2003. Binding of extracellular matrix molecules by probiotic bacteria. *Lett Appl Microbiol* 37:329-333.
- Sullivan, A., Nord, C.E. 2005. REVIEW: Probiotics and gastrointestinal diseases. *J Intern Med* 257:78-92.
- Sun, J., Le, G.W., Shi, Y.H., Su, G.W. 2007. Factors involved in binding of *Lactobacillus plantarum* Lp6 to rat small intestinal mucus. *Lett Appl Microbiol* 44:79-85.

- Swords, W.E., Wu, C.C., Champlin, F.R., Buddington, R.K. 1993. Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora. *Biol. Neonate* 63:191-200.
- Tajima, K., Nonaka, I., Higuchi, K., Takusari, N., Kurihara, M., Takenaka, A., Mitsumori, M., Kajikawa, H., Aminov, R.I. 2007. Influence of high temperature and humidity on rumen bacterial diversity in Holstein heifers. *Anaerobe* 13:57-64.
- Tamura, G.S., Nittayajarn, A. and Schoentag, D.L. 2002. A glutamine transport gene, *glnQ*, is required for fibronectin adherence and virulence of group B streptococci. *Infect Immun* 70:2877-2885.
- Tannock, G.W. 2003. Probiotics: time for a dose of realism. *Curr Issues Intest Microbiol* 4:33-42.
- Tannock, G.W. 2004. A special fondness for lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 70:3189-3194.
- Tannock, G.W., Fuller, R., Pedersen, K. 1990. *Lactobacillus* succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling. *Appl Environ Microbiol* 56:1310-1316.
- Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Ng, J., Munro, K., Alatossava, T. 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl Environ Microbiol* 65:4264-4267.
- Teitelbaum, J.E., Walker, A. 2002. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu Rev Nutr* 22:107-138.
- Thompson-Chagoyán, O.C., Maldonado, J., Gil, A. 2007. Colonization and impact of disease and other factors on intestinal microbiota. *Dig Dis Sci* 52:2069-2077.
- Torres, A.G., Zhou, X., Kaper, B. 2006. Minireview Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immunol* 73:18-29.
- Troyo-Diéguez, E., Ortega, A., Maya, Y., León, J.L. 1994. Growth and development of the halophyte *Salicornia bigelovii* torr. as affected by environmental conditions in arid Baja California Sur, Mexico. *J Arid Environ* 28:207-213.

- Turner, M.S., Timms, P., Hafner, L.M. and Giffard, P.M. 1997. Identification and characterization of a basic cell surface-located protein from *Lactobacillus fermentum* BR11. *J Bacteriol* 179:3310-3316.
- Umesaki, Y., Okada, Y., Matsumoto, S., Imaoka, A., Setoyama, H. 1995. Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the exgerm-free mouse. *Microbiol Immunol* 39:55-562.
- Umesaki, Y., Setoyama, H., Matsumoto, S., Okada, Y. 1993. Expansion of a β T-cell receptor bearing intestinal intraepithelial lymphocytes alters microbial colonization in germ-free mice and its Independence from thymus. *Immunology* 79:32-37.
- Vadillo-Rodríguez, V., Busscher, H.J., Norde, W., de Vries, J., van der Mei, H.C. 2004. Dynamic cell surface hydrophobicity of *Lactobacillus* strains with and without surface layer proteins. *J Bacteriol* 186:6647-6650.
- Vadillo-Rodríguez, V., Busscher, H.J., van der Mei, H.C., de Vries, J., Norde, W. 2005. Role of *Lactobacillus* cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesión to surfaces at low and high ionic strength. *Colloids Surf B Biointerf* 41:33-41.
- Valdéz, J.C., Peral, M.C., Rachid, m., Santana, M., Perdigon, G. 2005. Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment. *Clin Microbiol Infect* 11:472-479.
- Valeur, N., Engel, P., Carbajal, N., Connolly, E., Ladefoged, K. 2004. Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 70:1176-1181.
- van der Mei, H.C., Belt-Gritter, B., Pouwels, P.H., Martínez, B., Busscheer, J. 2003. Cell surface hydrophobicity is conveyed by S-layer proteins- a study in recombinant lactobacilli. *Colloids Surf B Biointerf* 28:127-134.
- Vázquez-Juárez, R.C. 2003. Clonación molecular y caracterización de proteínas de membrana externa de *Aeromonas veronii*: su implicación en adhesión y su

- potencial como vacunas de ADN para peces. Tesis doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. México.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agent in aquaculture. *Micobiol Mol Biol Rev* 64:655-671.
- Vimal, D.B., Khullar, M., Gupta, S., Kumar, N. 2000. Intestinal mucins: the binding sites for *Salmonella typhimurium*. *Mol Cell Biochem* 204:107-117.
- Vinderola, C.G., Medici, M., Perdigón, G. 2004. Relationship between interactios sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulation capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *J Appl Microbiol* 96:230-243.
- Wall, T., Roos, S., Jacobsson, K., Rosander, A. and Jonsson, H. 2003. Phage display reveals 52 novel extracellular and transmembrane proteins from *Lactobacillus reuteri* DSM 20016(T). *Microbiology* 149:3493-3505.
- Wallgren, P., Melin, L. 2001. Weaning systems in relation to disease. In: The weaner pig. Nutrition and management. M.A. Valey and J. Wiseman, eds, CABI Publishing, UK.
- Wang, B., Wei, H., Yuan, J., Li, Q., Li, Y., Li, N., Li, J. 2008. Identification of a surface protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 that adhere to porcine gastric mucin and human entrocyte-like HT-29 cells. *Curr Microbiol* 57:33-38.
- Weese J.S. 2002. Microbiologic evaluation of commercial probiotics. *J Am Vet Med Assoc* 220:794-797.
- Wier, M., Calverley, C. 2002. Market potential for organic foods in Europe. *British Food Journal* 104:45-62.
- Wolf, G. 2006. Gut microbiota: a factor in energy regulation. *Nutr Rev* 64:47-50.
- Wostman, B.S. 1996. Germfree and gnotobiotic animal models: background and application. Boca Raton, FL: CRC press.
- Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Ledesma, M.A., Jordan, D.M., Francetic, O., Kaper, J.B. Puente, J.L., Girón, J.A. 2007. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Invest* 117:3519-3529.

- Ying, C., Lei, W., Jiazhong, L., Zhantao, S., Ligu, A. 2007. Identification and purification of a novel adhesion-associated protein in a new strain of *Lactobacillus*, L15, from flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Vet Microbiol* 122:116-112.
- Yuki, N., Shimazaki, T., Kushiro, A., Watanabe, K., Uchida, K., Yuyama, T., Morotomi, M. 2000. Colonization of the stratified squamous epithelium of the nonsecreting area of horse stomach by lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 66:5030-5034.
- Zadoks, R., van Leeuwen, W., Barkema, H., Sampimon, O., Verbrugh, H., Schukken, Y.H., van Belkum, A. 2000. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 38:1931-1939.
- Zoumpopoulou, G., Folingne, B., Christodoulou, K., Granette, C., Pot, B., Tsakalidou, E. 2008. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential *in vitro* and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. *Int J Food Microbiol* 121:18-26.
- Zumbach, B., Misztal, I., Tsuruta, S., Sanchez, J.P., Azain, M., Herring, W., Holl, J., Long, T., Culbertson, M. 2008. Genetic component of heat stress in finishing pigs: development of a heat load function. *J Anim Sci* doi: 10.2527/jas.2007-0523