UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS DOCTORAL

CAPACIDAD PROBIÓTICA DE LA CEPA CIDCA 133 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp*lactis*): UN RECORRIDO DESDE MODELOS *in vitro* A *in vivo*

Tesista: Ayelen A. Hugo

Director: Dr. Pablo F. Pérez

Co-**D**irector: Dra. Graciela L. De Antoni

AÑO 2007

Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P

El presente trabajo de **T**esis **D**octoral se realizó en el

Centro de **I**nvestigaciones y **D**esarrollo en **C**riotecnología de **A**limentos (CIDCA),

Departamento de **Q**uímica y en la

Cátedra de **M**icrobiología, **D**epartamento de **C**iencias **B**iológicas de la

Facultad de **C**iencias **E**xactas de la **U**niversidad **N**acional de **L**a **P**lata.

C I D C A
CONICET
U N L P

C I D C A

U N L P

TESIS
Nº 1144

DONACION
A
Fecha 11-02-08
Inv. E. Inv. B. 58455

"La Fe y la Razón son como las dos alas con las cuales
el espíritu humano se eleva hacia la contemplación de la Verdad"

Juan Pablo II

Agradecimientos

En primer lugar a Dios que me sostiene en el ser y que en su Divina Providencia posibilitó que realizara este trabajo de tesis.

A mi director, el Dr. Pablo Pérez, quien siempre confió en mí, alentó mis aciertos y fundamentalmente no condenó mis errores. Gracias por constituir una guía en mi formación científica brindándome orientación; permitiéndome a la vez crecer.

A mi codirectora, la Dra. Graciela De Antoni, quien colaboró en mi formación aportando siempre a mi trabajo una visión creativa y novedosa.

A las Dras. Noemí Zaritzky y María Cristina Añón, por abrirme las puertas del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos permitiéndome realizar este trabajo.

A Emiliano Kakizu, mi colaborador más cercano y amigo con el cual realicé muchos ensayos en conjunto.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Microbiología, los que aún permanecen en el CIDCA y aquellos que no: Analía, Graciela, Jessica, Patricio, Andrea, Rodrigo, Guillermo, Fernando, Pablo, Martín, Juan Martín, Marina, Judith, Fernanda, Marcelo, Alejandra, Silvia, Angélica, Victoria e Ivanna. Uds. hacen que sea gustoso trabajar, brindando incondicionalmente su alegría y ayuda.

A Lucy por ser un poquito la mamá de todos en el laboratorio.

A Mariano, mi esposo por amarme y acompañarme en los momentos de euforia y en los de tristeza.

A mis tres solcitos, Rosario, Nazarena y Juan Cruz que los amo con toda mi alma.

A mis padres, por darme la vida y ayudarme a crecer con valores y metas altas. A mi hermanita, quien a su manera me brinda su apoyo y cariño.

A la "abu" Moni, por su ayuda incondicional. Si bien es cierto que detrás de cada gran hombre hay una gran mujer, también es cierto que detrás de una mamá que trabaja hay una gran "abu".

A todas las personas que de una manera u otra colaboraron en la realización de esta tesis.

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis Doctoral han sido parcialmente publicados en los siguientes artículos:

Hugo, A. A; Minaard, J y Pérez, P. F. 2003. Evaluación de un método colorimétrico para el estudio de la interacción entre microorganismos y células del epitelio intestinal. Revista Argentina de Microbiología. 35: 188-192.

Hugo, A. A.; De Antoni G. L y Pérez, P. F. 2006. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strain CIDCA 133 inhibits nitrate reductase activity of *E. coli*. International Journal of Food Microbiology. 111: 191- 196.

Hugo, A. A; Kakisu, E. J.; De Antoni, G L y Pérez, P. F. 2007. Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli in vitro*. Trabajo enviado al Letters of Applied Microbiology.

ÍNDICE GENERAL

pág

Índice General..... i
Índice de Figuras..... iv
Índice de Tablas..... vii
Abreviaturas..... viii

INTRODUCCIÓN GENERAL

¿Qué es un probiótico?..... 1
¿Dónde residen los probióticos?..... 3
¿Qué hacen los probióticos?..... 5
¿Cómo seleccionar una cepa probiótica?..... 12
¿Quiénes son los lactobacilos?..... 14

OBJETIVOS..... 20

CAPÍTULO I

Propiedades tecnológicas y superficiales de la cepa CIDCA 133

INTRODUCCIÓN..... 21
METODOLOGÍA..... 23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 26
Propiedades de interés tecnológico de la cepa CIDCA 133..... 26
Capacidad de acidificación en leche..... 26
Supervivencia en condiciones de refrigeración..... 28
Resistencia a los ciclos de congelación-descongelación..... 29
Propiedades superficiales de la cepa CIDCA 133..... 32
Determinación de autoagregación bacteriana..... 33
Hidrofobicidad superficial..... 35
Determinación del potencial Z bacteriano..... 35
CONCLUSIONES..... 38

CAPÍTULO II

Características de competitividad de la cepa CIDCA 133 en el tracto gastrointestinal

INTRODUCCIÓN..... 39
METODOLOGÍA..... 43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 47
Evaluación de los aspectos tradicionales relacionados con la competitividad en el medio gastrointestinal de la cepa 133..... 47
Resistencia a la acción de la bilis..... 47
Resistencia a las condiciones ácidas generadas por el ácido clorhídrico..... 48
Evaluación de los aspectos no tradicionales relacionados con la competitividad en el medio intestinal de la cepa 133. Interacción con los CAMPs..... 50
CONCLUSIONES..... 58

CAPÍTULO III

Estudio de la interacción entre la cepa CIDCA 133 y *E.coli*: modelos *in vitro*

INTRODUCCIÓN..... 59
METODOLOGÍA..... 63
RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 69
Inhibición del crecimiento de *E.coli* con sobrenadante de cultivo del lactobacilo..... 69
Asociación de *E.coli* en interacción con la cepa CIDCA 133 73
a) Asociación del lactobacilo cepa CIDCA 133 a Caco-2..... 73
b) Asociación de *E.coli* en interacción con la cepa CIDCA 133..... 77
Ensayos cuantificados por recuento de microorganismos viables..... 77
Ensayos cuantificados mediante la técnica colorimétrica de nitrato reductasa..... 80
Ensayos cuantificados mediante fluorescencia..... 83
CONCLUSIONES..... 86

CAPÍTULO IV

Antagonismo de la actividad nitrato reductasa de *E.coli* por parte de la cepa CIDCA 133

INTRODUCCIÓN 88
METODOLOGÍA..... 95
RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 97
CONCLUSIONES..... 106

CAPÍTULO V

Estudio de la interacción entre la cepa CIDCA 133 y *E.coli* EHEC: modelos *in vitro*

INTRODUCCIÓN..... 107
METODOLOGÍA..... 116
RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 122
Efecto de sobrenadantes de EHEC sobre células Vero..... 122
a) Determinación de viabilidad celular mediante rojo neutro..... 122
b) Determinación del porcentaje de liberación de LDH..... 125
Interacción de *E.coli* EHEC con células Hep-2..... 131
a) Observación del daño celular con tinción de MayGrünwald-Giemsa..... 131
b) Cuantificación de desprendimiento celular por tinción con cristal violeta..... 137
c) Tinción del citoesqueleto con faloidina fluorescente..... 139
d) Observación mediante microscopía electrónica de barrido..... 141
e) Asociación de EHEC a células Hep-2 en cultivo..... 144
CONCLUSIONES..... 148

CAPÍTULO VI

Efecto probiótico de la cepa CIDCA 133 sobre *E.coli* EHEC en un modelo de infección murino

INTRODUCCIÓN..... 149
METODOLOGÍA..... 152
RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 159
Elección del modelo animal..... 159
Aceptabilidad del probiótico..... 160
Supervivencia de los animales..... 161
Colonización de *E.coli* EHEC en intestino de ratón..... 162
Morfología intestinal..... 165
Evaluación de daño renal..... 166
Determinación de traslocación bacteriana en hígado..... 169
Determinación del peso del bazo..... 172
Determinación de Inmunoglobulinas..... 174
CONCLUSIONES..... 178

CONCLUSIONES GENERALES – PERSPECTIVAS..... 179

ANEXO

Evaluación de un método colorimétrico para el estudio de la asociación bacteriana

INTRODUCCIÓN..... 181
METODOLOGÍA..... 183
RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 185
CONCLUSIONES..... 190

APÉNDICE

Medios de cultivo. Reactivos. Formulaciones..... 191

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 195

ÍNDICE DE FIGURAS

pág

INTRODUCCIÓN GENERAL

Figura 1 Efectos benéficos sobre el hospedador producidos por los probióticos..... 5

Figura 2 Árbol de consenso de los mayores grupos de bacterias ácido lácticas..... 15

CAPÍTULO I

Figura 1 Cinética de acidificación en leche de la cepa 133..... 26

Figura 2 Porcentaje de supervivencia a la refrigeración de la cepa 133 en leche fermentada..... 28

Figura 3 Supervivencia de la cepa 133 a ciclos consecutivos de congelación y descongelación... 29

Figura 4 Características macroscópicas del cultivo de la cepa 133 en MRS y en TPY..... 33

Figura 5 Cinética de autoagregación de la cepa 133 crecida en MRS y TPY 34

CAPÍTULO II

Figura 1A Inhibición en medio sólido de distintas cepas bacterianas por fracciones subcelulares de la línea Caco-2..... 50

Figura 1B Inhibición en medio sólido de bacterias probióticas por fracciones subcelulares de la línea Caco-2..... 51

Figura 2 Cinética de crecimiento de *E.coli* CM1 en presencia de la fracción citosólica de Caco2.. 52

Figura 3 Corridas electroforéticas de la fracción citosólica de células Caco-2..... 54

Figura 4 Cinética de crecimiento en medio líquido de lactobacilos en presencia de β defensinas humanas..... 57

CAPÍTULO III

Figura 1 Composición de ácidos orgánicos del sobrenadante de cultivo de la cepa 133..... 69

Figura 2 Cinética de muerte de *E.coli* CM1 por sobrenadantes de cultivo de la cepa 133..... 70

Figura 3 Cinética de crecimiento de *E.coli* CM1 en presencia de sobrenadantes diluídos de la cepa 133..... 72

Figura 4 Asociación del lactobacilo cepa 133 a monocapas de Caco-2..... 73

Figura 5 Asociación de la cepa 133 marcada con BCECF – AM a Caco-2..... 74

Figura 6 Porcentaje de asociación de la cepa 133 a Caco-2 cuantificado por recuento de microorganismos viables..... 74

Figura 7 Porcentaje de asociación de la cepa 133 a Caco-2..... 75

Figura 8 Porcentaje de asociación de la cepa 133 a Caco-2, crecida en MRS o TPY..... 76

Figura 9 Asociación de *E.coli* CM1 a Caco-2 en presencia de la cepa 133..... 77

Figura 10 Coagregación entre *E.coli* CM1, el lactobacilo cepa 133 y células Caco-2..... 78

Figura 11 Asociación bacteriana total a Caco-2..... 79

Figura 12 Porcentaje de actividad nitrato reductasa de *E.coli* en presencia de la cepa 133..... 81

Figura 13 Porcentaje de asociación de *E.coli* CM1 a Caco-2 en interacción con la cepa 133..... 82

Figura 14 Asociación de *E.coli* gfp a Caco-2 en interacción con la cepa 133..... 84

Figura 15 Imágenes de la asociación de *E.coli* gfp a Caco-2 en interacción con la cepa 133..... 85

CAPÍTULO IV

Figura 1	Diagrama de la reducción respiratoria del nitrato por las enzimas Nar	89
Figura 2	Reducción de nitrato en el periplasma por la enzima Nap	90
Figura 3	Modelo de los sensores y reguladores involucrados en la expresión de genes del metabolismo aerobio, anaerobio y del nitrato	91
Figura 4	Diagrama de reacciones para la producción del agente mutagénico N_2O_3 durante el metabolismo de nitrato y nitrito en *E.coli*	92
Figura 5	Determinación del porcentaje de actividad nitrato reductasa de la cepa CM1 en presencia de la cepa CIDCA 133	97
Figura 6	Determinación de la actividad nitrato reductasa de *E.coli* CM1 en presencia de la cepa 133 en MRS o MRS sin glucosa	99
Figura 7	Comparación de la actividad nitrato reductasa específica de *E.coli* CM1 en la presencia de la cepa CIDCA 133 y ácido láctico	102
Figura 8	Efecto de diferentes tratamientos sobre la actividad nitrato reductasa de la cepa CM1	103
Figura 9	Efecto del lactobacilo cepa 133 sobre la producción de nitrito y amonio por *E.coli* CM1	105

CAPÍTULO V

Figura 1	Organización genética de la región LEE	109
Figura 2	Representación esquemática del aparato de secreción tipo III de *E.coli* EPEC/EHEC	110
Figura 3	Porcentaje de células Vero sobrevivientes a la acción del sobrenadante de EHEC tratadas con lactobacilos	123
Figura 4	Porcentaje de células Vero viables a la acción del sobrenadante de EHEC tratadas con la cepa CIDCA 133	124
Figura 5	Determinación del porcentaje de LDH liberado por células Vero luego del tratamiento con distintas concentraciones de sobrenadante de EHEC	126
Figura 6	Determinación del porcentaje de LDH liberado por células Vero luego del tratamiento con distintas concentraciones de sobrenadante de EHEC en presencia de la cepa 133	127
Figura 7	Determinación del porcentaje de LDH liberado de células Vero tratadas con sobrenadante de EHEC en presencia de diferentes bacterias	128
Figura 8	Determinación del porcentaje de LDH liberado de células Vero tratadas con sobrenadante de EHEC en presencia de la cepa CIDCA 133	129
Figura 9	Determinación del porcentaje de LDH liberado de células Vero, luego del tratamiento con sobrenadante de EHEC en presencia de la cepa CIDCA 133 crecida en TPY o MRS	130
Figura 10	Fotografías de las monocapas de células Hep-2 incubadas con EHEC	132
Figura 11	Fotografías de las monocapas de células Hep-2 incubadas con EHEC resuspendida o no en su sobrenadante de cultivo	133
Figura 12	Fotografías de las monocapas de células Hep-2 incubadas con distintas concentraciones de EHEC resuspendida en su sobrenadante de cultivo	134
Figura 13	Fotografías de las monocapas de células Hep-2 coincubadas con la cepa133 y EHEC	135
Figura 14	Fotografías de las monocapas de células Hep-2 coincubadas con la cepa CIDCA 133 o la cepa LBB en conjunto con *E.coli* EHEC	136
Figura 15	Porcentaje de desprendimiento celular en la línea Hep-2 infectada con *E.coli* EHEC	137

Figura 16	Porcentaje de desprendimiento celular en la línea Hep-2 infectada con *E.coli* EHEC y tratadas con la cepa CIDCA 133.....	138
Figura 17	Tinción de F-actina de células Hep-2 infectadas con EHEC.....	139
Figura 18	Tinción de F-actina de células Hep-2 infectadas con EHEC y tratadas con la cepa 133..	140
Figura 19	Fotografías obtenidas por SEM de células Hep-2 tratadas con *E.coli* EHEC.....	141
Figura 20	Imágenes obtenidas por SEM de células Hep-2 incubadas con EHEC y tratadas con la cepa CIDCA 133.....	142
Figura 21	Imágenes obtenidas por SEM de células Hep-2 incubadas con EHEC y tratadas con la cepa CIDCA 133.....	143
Figura 22	Asociación de *E.coli* EHEC a células Hep-2 en interacción con la cepa CIDCA 133.....	144
Figura 23	Porcentaje de asociación de EHEC a células Hep-2 en interacción con la cepa 133 en distintos tiempos de incubación.....	145
Figura 24	Porcentaje de supervivencia de EHEC sobre células Hep-2.....	146

CAPÍTULO VI

Figura 1	Esquema cronológico del ensayo animal.....	154
Figura 2	Porcentaje promedio de consumo de agua por los ratones.....	160
Figura 3	Porcentaje de supervivencia de ratones C57 y BALB/c luego de la infección por EHEC.	161
Figura 4	Evolución del recuento de bacterias viables en materia fecal de la cepa C57BL/6.....	163
Figura 5	Recuento de bacterias viables en la cepa BALB/c a los 21 días post infección.....	164
Figura 6	Morfología de la mucosa intestinal de ratones C57BL/6 infectados con EHEC.....	165
Figura 7	Evolución de la relación vellosidad/cripta de los ratones C57BL/6 infectados con EHEC	166
Figura 8	Morfología histológica renal de ratones C57BL/6.....	167
Figura 9	Determinación de nitrógeno ureico en sangre (BUN) en ratones C57BL/6.....	168
Figura 10	Macromorfología hepática de ratones C57BL/6.....	169
Figura 11	Histología hepática de ratones C57BL/6.....	170
Figura 12	Recuento de bacterias viables en tejido hepático de animales C57BL/6 a los 7 días.....	171
Figura 13	Determinación del peso del bazo en ratones C57BL/6.....	173
Figura 14	Determinación de IgA específica en ratones C57BL/6.....	174
Figura 15	Determinación de IgG específica en ratones C57BL/6.....	176

ANEXO

Figura 1	Sensibilidad de la determinación de nitrito mediante la técnica de Mc Namara.....	185
Figura 2	Relación entre la concentración bacteriana y el color desarrollado en la determinación colorimétrica de la actividad nitrato reductasa.....	186
Figura 3A	Cinética de la reducción de nitrato para diferentes concentraciones bacterianas.....	187
Figura 3B	Velocidades iniciales de reacción para la actividad nitrato reductasa en función de distintas concentraciones bacterianas.....	187
Figura 4	Esquema para el cálculo de las concentraciones bacterianas utilizando el método de nitrato reductasa.....	188

ÍNDICE DE TABLAS

pág

INTRODUCCIÓN

Tabla 1 Criterios de selección para una cepa probiótica..... 13

Tabla 2 Principales especies de lactobacilos agrupadas según sus patrones de fermentación de hexosas..... 17

CAPÍTULO I

Tabla 1 Porcentaje de hidrofobicidad de la cepa CIDCA 133 crecida en TPY y MRS..... 35

Tabla 2 Potencial Z de la cepa CIDCA 133 crecida en TPY y MRS..... 36

CAPÍTULO II

Tabla 1 Resistencia a la bilis de la cepa 133 crecida en MRS, TPY y leche..... 47

Tabla 2 Resistencia al ácido clorhídrico de la cepa 133 crecida en MRS, TPY y leche..... 48

Tabla 3 Inhibición en medio sólido de microorganismos Gram (+) y (-) por la fracción citosólica o el extracto catiónico, provenientes de células Caco-2..... 55

Tabla 4 Inhibición en medio líquido de microorganismos Gram (+) y (-) por β defensinas humanas..... 56

CAPÍTULO III

Tabla 1 Efecto de los sobrenadantes diluídos de la cepa 133 sobre la viabilidad de *E.coli* CM1.. 71

CAPÍTULO IV

Tabla 1 Determinación de actividad nitrato reductasa específica de *E.coli* CM1..... 98

Tabla 2 Determinación de ácidos orgánicos de los sobrenadantes de la cepa 133..... 101

ANEXO

Tabla 1 Porcentajes de asociación de diferentes microorganismos a células Caco-2..... 188

APÉNDICE

Tabla 1 Composición del medio MRS..... 191

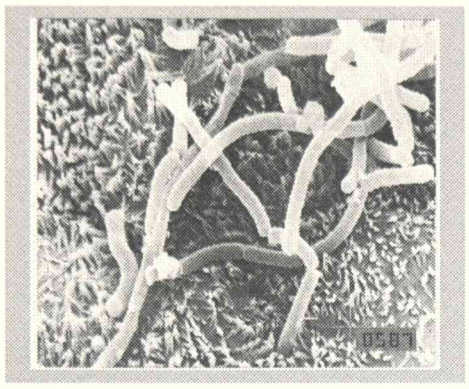
Tabla 2 Composición del medio TPY..... 191

Tabla 3 Composición del medio nutritivo..... 192

Tabla 4 Composición del buffer PBS..... 192

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bacterias ácido lácticas
CAMP`s	Péptidos catiónicos antimicrobianos
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CV	Cristal violeta
DO	Densidad óptica
EHEC	*E. coli* enterohemorrágica
EPEC	*E. coli* enteropatógena
EPS	Exopolisacárido
etc	Etcétera
FPM	Fuerza protón motriz
g	Gramo
Glu	Glucosa
GRAS	Generally Recognized As Safe
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleuquina
kDa	kiloDaltons
MEB	Microscopía electrónica de barrido
min	Minutos
M	Mol
MLP	Procesos semejantes a microvellosidades
Nap	Nitrato reductasa periplásmica
nd	No determinado
NRA	Nitrato reductasa A
NRZ	Nitrato reductasa Z
PAI	Islas de patogenicidad bacteriana
PBS	Buffer fosfato de sodio
rto	Recuento
SCFA	Ácidos grasos de cadena corta
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
sn	Sobrenadante
Stx	Shiga toxina
SUH	Síndrome urémico hemolítico
TTSS	Sistema de secreción tipo III
UAT	Ultra alta temperatura
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta



INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN

¿Qué es un probiótico?

La palabra probiótico deriva del griego y significa para la vida. El término fue usado por primera vez por Lilley y Stillwell en 1965, con una acepción diferente a la actual; refiriéndose a sustancias secretadas por un microorganismo que favorecen el crecimiento de otro, es decir como un antónimo de antibiótico (Naidu et al, 1999). Sin embargo el concepto de probióticos como microorganismos habitantes del tracto gastrointestinal que promueven la salud del hospedador es bastante anterior, desarrollándose alrededor de 1900 con Methchnikoff. Methchnikoff postuló que la longevidad y el buen estado de salud de los campesinos búlgaros se debía al consumo de leches fermentadas. Más tarde concluyó que el yogur contenía los microorganismos necesarios para proteger al intestino de los efectos dañinos de ciertas bacterias (Metchnikoff, 1908). La primera evidencia clínica de los beneficios producidos por los probióticos al hospedador se obtuvo en 1930, mediante un estudio sobre pacientes que sufrían de constipación. Luego de este primer hito, se multiplicaron durante todo el siglo pasado las investigaciones y descubrimientos sobre la acción de los probióticos. Los resultados de estas investigaciones aumentaron el conocimiento sobre su espectro de acción. Se asignaron así múltiples efectos benéficos de estos microorganismos sobre el hospedador tales como: antagonismo frente a enteropatógenos; efectos fisiológicos

(reducción del colesterol sérico, alivio de los síntomas de intolerancia a la lactosa); acción inmunomoduladora; efectos antimutagénicos y anticancerígenos, etc.

Paralelamente a estos avances científicos también el concepto de probiótico fue evolucionando a través de los años. Fuller en 1989, lo redefinió como un suplemento alimentario compuesto por microorganismos vivos que benefician al hospedador, mejorando su balance intestinal. Esta definición, aunque apropiada, resulta actualmente limitada, ya que hoy en día, se sabe que los beneficios ejercidos por los probióticos trascienden el ámbito gastrointestinal. A modo de ejemplo varios autores han descripto que el consumo de probióticos es capaz de incrementar los niveles de IgG séricos frente a determinados microorganismos o inmunoestimular mucosas distantes (Perdigón et al, 1999; Villena et al, 2006, entre otros). Además, en la actualidad los probióticos son consumidos no sólo conformando un alimento; sino que son empleados como productos farmacéuticos. En este último sentido, también se han explorado nuevas vías de ingreso de los microorganismos probióticos al hospedador. Un ejemplo de ello, es la utilización de óvulos vaginales conteniendo lactobacilos para prevenir o tratar ciertas infecciones genitourinarias femeninas, como vaginosis bacteriana, vaginitis o infección urinaria (Bruce y Reid, 1988; Klebanof et al, 1991; Hilton et al, 1995).

Es evidente, por lo tanto, que la acción y el uso de los probióticos desbordan el concepto desarrollado por Fuller. La Organización Mundial de la Salud (WHO) definió recientemente a los probióticos en un sentido más amplio como "microorganismos vivos que administrados en cantidades apropiadas confieren un beneficio en la salud del hospedador" (FAO y WHO, 2001). Más aún, un nuevo término todavía menos restrictivo ha comenzado a utilizarse. Es el de farmabióticos, el cual comprende todas las formas de manipulación microbiana terapéutica, incluyendo probióticos, microorganismos genéticamente modificados, metabolitos o componentes microbianos (Shanahan, 2003).

Hemos de concluir que en la práctica la definición de probióticos está continuamente bajo revisión en función de los nuevos descubrimientos sobre la interacción entre la microbiota residente y el hospedador. Resulta importante señalar que los microorganismos empleados como probióticos también han ido variando a lo largo del tiempo. Las bacterias tradicionalmente y aún más utilizadas son las pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Sin embargo se han ido empleando, cepas de otros géneros bacterianos como *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Escherichia coli*. Inclusive hongos como *Saccharomyces boulardii* han sido utilizados en preparaciones probióticas (Heczko et al, 2006).

Conceptos relacionados con el de probióticos son el de prebióticos y simbióticos. El primero se refiere a un ingrediente alimentario no digerible (frecuentemente un oligosacárido) que beneficia al hospedador estimulando selectivamente el crecimiento o la actividad de un número limitado de microorganismos entéricos (Naidu et al, 1999). Los simbióticos surgen de la combinación racional de pro y prebióticos.

Los probióticos pueden considerarse dentro de una categoría más amplia de alimentos denominados alimentos funcionales. Los alimentos funcionales serían aquellos que mejoran la salud del consumidor más allá de su valor nutricional.

En los últimos 30 años ha crecido muchísimo el interés de la población por la salud y el cuidado personal. El reconocimiento popular de la relación entre salud y dieta nunca ha sido tan fuerte. Como resultado el mercado y la investigación sobre los alimentos funcionales se encuentran en plena expansión (Khan y Ansari, 2007). Los productos fermentados enriquecidos con cultivos probióticos se han convertido en la categoría más exitosa de los alimentos funcionales, constituyendo a su vez un negocio muy rentable. Es de suma importancia por lo tanto que la investigación sobre los probióticos contribuya a esclarecer los beneficios reales de la utilización de estos microorganismos sin sucumbir ante el higienismo y la avidez de consumo de la sociedad actual.

¿Dónde residen los probióticos?

Si bien los lactobacilos forman parte de la microbiota normal vaginal y también se los ha asociado con la generación de efectos benéficos para el hospedador en este ámbito; el presente trabajo de tesis se centra en la actividad de los probióticos a nivel intestinal. Por lo tanto sólo se describirán aspectos del desarrollo y funcionamiento de los probióticos en este hábitat.

Se estima que el tracto gastrointestinal contiene una población de más de 400 especies bacterianas que comprenden aproximadamente 10^{14} células, lo cual representa algo más de diez veces la cantidad de células del cuerpo humano (Kopp-Hooligan, 2001). Estas cifras indican que las bacterias habitantes del tracto gastrointestinal forman parte de un ecosistema enorme y extremadamente complejo. La composición y distribución de la microbiota a lo largo del sistema digestivo está determinada por factores ambientales, interacciones fisiológicas y la dieta. El estómago debido a las condiciones extremadamente ácidas constituye un ambiente con escasa cantidad de microorganismos. Las bacterias predominantes en él, son aerobios Gram positivos con una concentración menor a 10^3 ufc/ml. A nivel intestinal la densidad bacteriana crece abruptamente con aproximadamente 10^{12} ufc/g de heces, especialmente en el intestino grueso.

El establecimiento de la microbiota intestinal, con una composición más o menos semejante en niños y adultos, se produce una vez abandonada la lactancia materna conjuntamente con la incorporación de los distintos alimentos. En general, los microorganismos que están formando parte de esta microbiota en orden decreciente de abundancia son: 1) *Bacteroides*, *Eubacteria*, *Peptostreptococci* y *Bifidobacterium* (10^{10} – 10^{11} ufc/g de heces); 2) Enterobacterias y estreptococos (10^{8} – 10^{9} ufc/g de heces); 3) *Lactobacillus* (10^{5} – 10^{8} ufc/g de heces); 4) *Clostridium* y *Staphylococcus* (constituyentes menores) (Naidu et al, 1999).

Antes del nacimiento el tracto gastrointestinal es un ambiente estéril, su colonización comienza de inmediato luego del alumbramiento. Los primeros microbios que se establecen son organismos aerobios o anaerobios facultativos como *E. coli* y otras enterobacterias, junto con cocos Gram positivos como *Streptococcus* y *Staphylococcus* (Stark y Lee, 1982). En aquellos bebés alimentados con leche materna, las bifidobacterias se convierten en los microorganismos dominantes a los pocos días luego del nacimiento. Esta proliferación de bifidobacterias conlleva el descenso de la colonización por parte de las enterobacterias. En contraste, los bebés alimentados con leches maternizadas, desarrollan una microbiota más compleja que incluye bifidobacterias, *Bacteroides*, *Clostridium* y estreptococos (Mitsuoka, 1972). La introducción del alimento sólido disminuye las diferencias entre la composición de la microbiota entre los bebés alimentados con leche materna y aquellos que consumen fórmulas maternizadas (Stark y Lee, 1982). A los 12 meses la microbiota de los bebés es muy semejante a la del adulto, con una clara predominancia de las bacterias anaerobias y un decrecimiento de los microorganismos anaerobios facultativos.

La microbiota y su hospedador establecen una compleja interacción bidireccional, en la que ambos componentes por lo general se benefician. El consorcio dinámico de microorganismos despliega una amplia actividad metabólica generando numerosas sustancias, algunas de las cuales cumplen importantes funciones en el ámbito intestinal. De particular interés es la recuperación de la energía de los alimentos colónicos debido a la acción enzimática bacteriana. En este caso, la actividad bacteriana termina de degradar ciertos nutrientes generando ácidos grasos de cadena corta, los cuales pueden ser catabolizados por los enterocitos. De esta manera los enterocitos obtienen energía que de otro modo se hubiera perdido.

Otro ejemplo que ilustra la importancia de la interacción microbiota-hospedador lo constituye la influencia de los microorganismos intestinales residentes con el desarrollo del sistema inmune de mucosas. Se sabe que la microbiota cumple un rol esencial en la

instrucción postnatal del sistema inmune asociado al tracto gastrointestinal, determinando en parte la capacidad de una respuesta inmune adecuada a ese nivel (Pérez et al, 2005) (para más detalles ver inmunomodulación).

¿Qué hacen los probióticos?

Existen una amplia variedad de efectos benéficos en el hospedador propuestos como consecuencia de la acción de los probióticos. La figura 1 contiene una síntesis de estos efectos. A continuación se los abordará brevemente, focalizando en los aspectos de particular interés para el presente trabajo de tesis.

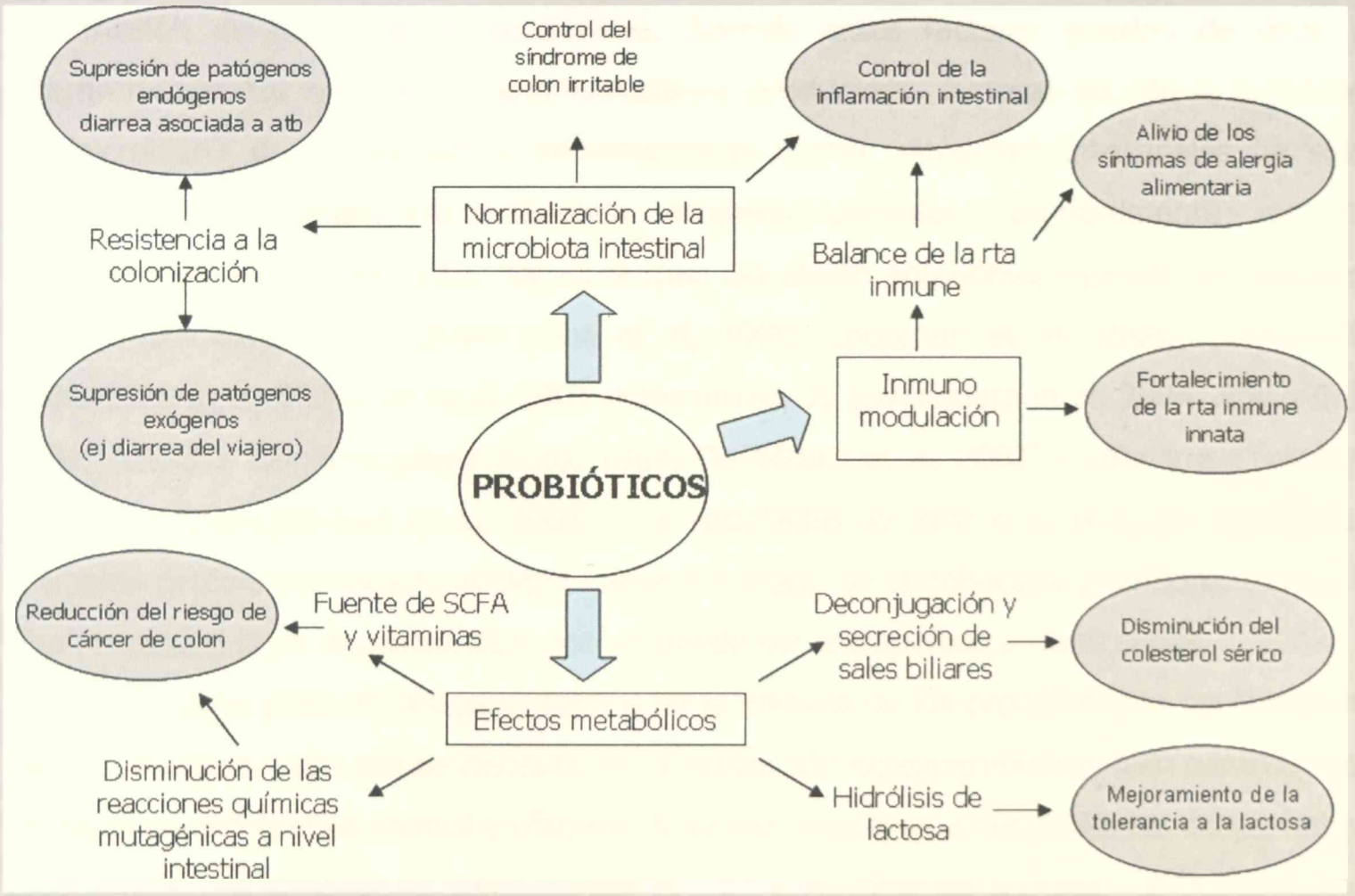


Figura 1. Efectos benéficos sobre el hospedador producidos por los probióticos. (Tomado y modificado de Parvez et al, 2006)

- **Actividad antimicrobiana contra patógenos gastrointestinales.**

La actividad antimicrobiana *in vitro* de lactobacillos y bifidobacterias contra los patógenos gastrointestinales ha sido ampliamente documentada. Se ha demostrado la inhibición de patógenos como *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Listeria*, *Campylobacter* y *Clostridium* entre otros, por parte de las bacterias probióticas (Cocconier et al, 1993; Bernet-Camard et al, 1997; Lee et al, 2003; Trejo et al, 2006).

Los primeros mecanismos propuestos para explicar la acción antagónica de los probióticos se centraron en la capacidad de adhesión de las bacterias a células del hospedador y la producción de sustancias antimicrobianas. Durante la décadas del 80 y 90 las investigaciones se focalizaron en descubrir estas propiedades en distintas cepas probióticas. En función de ello se realizaron numerosas experiencias empleando fundamentalmente modelos *in vitro*. Los estudios *in vitro* utilizan por excelencia como modelo células intestinales humanas en cultivo (por ejemplo T84, HT-29 y Caco-2) que conformando una monocapa imitan la barrera epitelial intestinal. Sin embargo los resultados obtenidos *in vitro* son difíciles de extrapolar a la situación *in vivo* intestinal, donde la microbiota residente, la presencia de mucus y el continuo flujo pueden modificar la adhesión de las bacterias probióticas. Además estos factores pueden de diluir o interfirerir con los compuestos antimicrobianos producidos. A pesar de ello la actividad antimicrobiana de lactobacilos y bifidobacterias contra patógenos intestinales ha sido reiteradamente demostrada utilizando modelos animales, especialmente ratones gnotobióticos y convencionales. Tal es el caso del efecto antagónico ejercido por algunas cepas sobre *Helicobacter pylori* (Aiba et al, 1998; Cocconier et al, 1998), *Salmonella* (Filho-Lima et al, 2000; Gill et al, 2001 entre otros), *E. coli* (Ashara et al, 2004; Shu y Gill, 2001), *Listeria monocytogenes* (Sato, 1984; De Waard et al, 2002) y rotavirus (Yasui et al, 1995; Guerin-Dannan et al, 2001). Los resultados *in vitro* e *in vivo* sobre modelos animales demuestran que la actividad antimicrobiana de lactobacilos y bifidobacterias es una propiedad cepa dependiente y que no puede ser extrapolada a otras cepas.

El último paso en la comprobación de la eficacia de los probióticos lo constituye la evidencia clínica. Para ello se necesita de la realización de experimentos bien controlados, doble ciego con grupos control y placebo. A su vez, las cepas a ser probadas deben haber demostrado previamente su competencia *in vitro* y en modelos animales. Además deben ser de origen humano, taxonómicamente bien identificadas y no mostrar resistencia intrínseca a los antibióticos. Este último requerimiento resulta necesario a fin de que ante una hipotética infección por bacterias probióticas, se disponga de tratamiento antibiótico eficaz. Es de destacar que en general los microorganismos probióticos poseen estatus GRAS (Generally Recognised As Safe). Si bien existen casos de infecciones provocadas por lactobacilos, son extremadamente raras y en pacientes con algún tipo de inmunodeficiencia (Sullivan y Nord, 2006).

Los ensayos clínicos que cumplen todos los requerimientos antes descriptos, no son abundantes. Sin embargo existe evidencia suficiente de la eficacia de algunas cepas para controlar o prevenir desórdenes gastrointestinales humanos. Los resultados más

concluyentes se refieren al tratamiento de niños afectados por diarrea infecciosa aguda (especialmente de origen viral), en combinación con la terapia de rehidratación oral. Las cepas de *L. rhamnosus* 19070-2, (Rosenfeldt et al, 2002) *L. reuteri* DSM 12246 (Shornikova et al, 1997) y *L. casei* GG (Guarino et al, 1997) entre otras han probado su efectividad en este contexto.

En contraste con los reportes pediátricos que muestran la reducción temporal y sintomática de las gastroenteritis virales por el uso de probióticos; los estudios en la prevención de la diarrea del viajero en adulto son más escasos y menos convincentes (Hilton et al, 1997; Oksanen et al, 1990). En forma similar, los resultados obtenidos en el caso de las diarreas producidas por antibióticos suelen ser contradictorios (Pedone et al, 1999, Pedone et al, 2000). Fuera del ámbito intestinal, se han encontrado hallazgos clínicos favorables en el tratamiento de las infecciones provocadas por *H. pylori* (Felley et al, 2001; Cruchet et al, 2003 entre otros).

Los mecanismos propuestos para explicar la actividad antimicrobiana de bifidobacterias y lactobacilos son múltiples. En base a los conocimientos actuales, podemos afirmar que la interferencia bacteriana de los probióticos contra los patógenos se centra en tres pilares: la inhibición de la adhesión a los epitelios del hospedador, la producción de sustancias antimicrobianas y la modelación de la inmunidad de las mucosas. La inhibición de la adhesión de los patógenos puede asignarse a la exclusión competitiva, desplazamiento, coagregación o estimulación de la producción de mucus por parte de las cepas probióticas. En cuanto a la producción de sustancias antimicrobianas por lactobacilos y bifidobacterias las más conocidas son: los ácidos orgánicos (especialmente láctico y acético), el peróxido de hidrógeno (mecanismo no específico propio de lactobacilos en el tracto vaginal), y las bacteriocinas. Además se han descripto otras moléculas inhibitorias de naturaleza proteica.

El tercer pilar del antagonismo de los probióticos frente a los patógenos, la inmunomodulación, es sin duda el más complejo. Actualmente se sabe que existe una comunicación molecular permanente entre el epitelio intestinal y las células inmunes profesionales adyacentes, cuyo fin es conservar la integridad de la mucosa. Esta comunicación es bidireccional y está mediada por distintos ligandos y receptores. Los mensajeros químicos involucrados incluyen citoquinas, hormonas locales, factores de crecimiento y metabolitos del araquidonato. Habitualmente el microambiente de la mucosa se halla en un equilibrio dinámico, su disrupción genera la activación de los mecanismos inmunológicos de defensa y la consecuente inflamación (Servin, 2004). En este sentido los probióticos juegan diferentes roles en la actividad inmunomoduladora de

las mucosas. En primer lugar se ha determinado que distintas cepas de lactobacilos y bifidobacterias pueden activar la secreción de citoquinas pro o antiinflamatorias en células epiteliales o inmunes profesionales (monocitos-macrófagos, NK) (Morita et al, 2002; Wallace et al, 2003; Borruel et al, 2003; entre otros). Se sabe también que algunos lactobacilos pueden activar diferencialmente a las células dendríticas (Foligne et al, 2007). Este hallazgo reviste especial importancia ya que las células dendríticas constituyen un pívot en la inmunoregulación, determinando en parte el perfil de la respuesta específica hacia Th1 o Th2 (ver capítulo 6). Por lo tanto, según el patrón de citoquinas estimulado por las bacterias probióticas sobre las células dendríticas, se verá aumentada la respuesta específica humoral o celular. Por otra parte se ha visto que la ingestión de ciertos lactobacilos y bifidobacterias activan la producción de IgA secretoria intestinal (Yasui et al, 1999; Ibnou-Zekri et al, 2003, Racedo et al, 2006). En vista a los conocimientos actuales podemos concluir que las bacterias probióticas están formando parte de este complejo diálogo entre las células epiteliales y las células inmunes profesionales, determinando en cierta medida el cauce de la respuesta inmune.

- **Síntesis de nutrientes y biodisponibilidad.**

  La acción de los microorganismos durante la preparación de los productos fermentados o en el tracto gastrointestinal, puede mejorar la cantidad, disponibilidad y digestibilidad de algunos nutrientes dietarios (Parvez et al, 2006). La fermentación de la leche con bacterias ácido lácticas (BAL) y bifidobacterias incrementa los niveles de ácido fólico, niacina y riboflavina en los productos finales (Deeth y Tamine, 1981; Alm, 1982). Se sabe además que las BAL liberan varias enzimas y vitaminas en el lumen intestinal. A su vez, la hidrólisis enzimática bacteriana puede mejorar la disponibilidad de grasas y proteínas, incrementando la producción de aminoácidos libres y ácidos grasos de cadena corta (short chain fatty acids, SCFA) (Fernandes et al, 1987). Los SCFA como el ácido láctico, butírico, y propiónico también son producidos por las BAL. Estos ácidos además de disminuir el pH intestinal y contribuir a la inhibición de bacterias patógenas, son absorbidos por las células epiteliales y contribuyen al pool energético del hospedador (Rombeau et al, 1990). Por otra parte se encontró que el ácido butírico puede inhibir la aparición de características neoplásicas de células en cultivo (Leavitt et al, 1978; Leopold y Eileler, 2000). La concentración de SCFA es un factor importante en la determinación del pH luminal colónico que resulta determinante en el funcionamiento de muchas enzimas bacterianas implicadas en el metabolismo de compuestos foráneos y carcinógenos (Mallet et al, 1989).

Como se mencionara anteriormente, la acción de los microorganismos probióticos puede mejorar la digestibilidad de ciertos nutrientes en especial la lactosa. La intolerancia a la lactosa se presenta en el 70% de la población mundial y su causa principal es la deficiencia de lactasa. Ciertas cepas de *Lactobacillus* utilizadas frecuentemente en la elaboración de productos fermentados junto con *Streptococcus thermophilus* y algunas bifidobacterias han demostrado su capacidad de aliviar los síntomas de intolerancia a la lactosa (Kilara y Shahani, 1975; Martini et al, 1991; Jiang et al, 1996).

- **Control del colesterol sérico**

El colesterol es un lípido esencial para numerosas funciones orgánicas. Constituye un precursor de vitaminas y hormonas, forma parte de las membranas plasmáticas y es el componente esencial de los ácidos biliares. Sin embargo niveles elevados de colesterol sanguíneo junto con otros lípidos se consideran factores de riesgo cardiovascular. Los estudios realizados en animales para comprobar la eficacia de los probióticos en el tratamiento de la hipercolesterolemia; muestran que en ciertos casos determinadas cepas de lactobacilos son capaces de reducir los niveles de colesterol sérico (Fukushima y Nakano, 1996; Taranto et al, 1998). En contraste, los estudios clínicos en humanos que afirman lograr la disminución de colesterol sérico o de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) debido al consumo de probióticos, no son concluyentes (Lin et al, 1989 y Lee et al, 1999). Estos resultados contradictorios podrían adjudicarse a la utilización de cepas diferentes entre los trabajos publicados o quizás el efecto documentado sea en realidad muy pequeño y difícil de medir. Los estudios *in vitro* proponen como mecanismos para la remoción del colesterol disuelto el uso metabólico del mismo (Pereira y Gibson, 2002) o la precipitación junto con los ácidos biliares libres debido a la acción hidrolasa de las enzimas bacterianas (Klaver y Van der Meer, 1993; Kociubinski et al, 1999).

- **Inmunomodulación**

La mucosa gastrointestinal es la mayor superficie por la cual el hospedador interactúa con el medio externo. Tan sólo una barrera epitelial simple separa el espacio luminal externo del medio interno. Mecanismos inmunológicos innatos (acidez estomacal, peristalsis, ácidos biliares, uniones estrechas, defensinas y mucus, entre otros) junto con efectores específicos relacionados con el tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (GALT) se encargan de preservar la integridad de esta barrera.

Numerosos mecanismos de control son necesarios para regular la respuesta inmune a las más de 100 toneladas de alimento procesado en promedio durante la vida.

Dado que el tracto gastrointestinal cuenta además con una cantidad de inmensa de bacterias (10^{11}-10^{12}/g en el colon); estos mecanismos deben poder distinguir los microorganismos comensales de los patógenos. Para ello las células del epitelio intestinal, que forman parte del sistema inmune innato, cuentan con receptores capaces de reconocer patrones moleculares conservados en los patógenos (pathogen-associated molecular patterns PAMPs). Estos PAMPs incluyen una familia diversa de biomoléculas como: lipopolisacárido, peptidoglicano, lipoproteínas bacterianas, flagelina y secuencias repetidas en los ácidos nucleicos de bacterias y virus. Los receptores presentes en las células del hospedador que reconocen estos PAMPs, se denominan colectivamente receptores de reconocimiento de patógenos (pathogen-recognition receptors PRRs). Existen básicamente dos sistemas complemetarios de estos receptores: uno extracelular, el de los receptores semejantes a Toll (Toll-like receptors TLRs) y otro intracelular, el de los receptores semejantes a Nod (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors NRLs) (Sansonetti, 2006). Los TLRs son proteínas transmembrana homólogas a los receptores Toll de insectos que funcionan en conjunción con proteínas accesorias. Los NRLs son proteínas citosólicas análogas a las proteínas resistentes de plantas que detectan las moléculas efectoras de los patógenos vegetales. El reconocimiento de los PAMPs por los receptores TLRs y NRLs permite al sistema inmune diferenciar lo que es potencialmente dañino de lo que no, generando así una cascada de mecanismos de defensa como la producción de quimoquinas y citoquinas proinflamatorias que activan la respuesta inmune tanto innata como adaptativa (Saxelin et al, 2005).

La microbiota residente gastrointestinal es un factor importante en el desarrollo y la función del sistema inmune intestinal. Como prueba de ello se ha establecido que el sistema inmune de los animales gnotobióticos está subdesarrollado; presentando a su vez ciertos parámetros funcionales disminuídos (por ejemplo la capacidad fagocítica de los macrófagos y la producción de inmunoglobulinas) (Wostman, 1996). Es posible, por lo tanto, que la interacción entre los microorganismos patógenos y comensales con los sistemas de defensa generen una educación inmune. En este sentido, se ha correlacionado la mayor prevalencia de alergias alimentarias y enfermedades intestinales inflamatorias de origen inmune a las mejores condiciones sanitarias y de higiene presentes en los países desarrollados. Esta elevación de los estándares sanitarios preservaría al sistema inmune de los desafíos de las infecciones entéricas. La falta de inmuno-educación podría llevar al hospedador a reaccionar desmesuradamente frente a las bacterias comensales, generando daño inflamatorio, alergia o autoinmunidad (Dunne et al, 1999).

Los probióticos como parte de la microbiota gastrointestinal también influyen en el desarrollo y actuación a nivel inmune de dicha mucosa. Por ejemplo, se sabe que pueden modular la respuesta inmune innata tanto hacia una dirección proinflamatoria como antiinflamatoria. Veckman y colaboradores encontraron que *L. rhamnosus* redujo la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de las células dendríticas mientras que indujo el aumento de la secreción de citoquinas inflamatorias por parte de los macrófagos (Veckman et al, 2004). Por otra parte, haciendo uso de las propiedades antiinflamatorias de algunos probióticos se los ha utilizado en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el tracto gastrointestinal que tienen un fuerte componente de hiperreacción inmune (alergias alimentarias, dermatitis atópica y enfermedades inflamatorias intestinales) (Niedzielin et al, 2001; Viljanen et al, 2005; Marteau et al, 2005). Los probióticos también pueden mejorar la respuesta inmune adaptativa mediante la estimulación de ciertas citoquinas y aumentar la producción de anticuerpos (Vaarala, 2003). Finalmente, el consumo de probióticos podría suplir el efecto inmuno-educador de las infecciones por enteropatógenos, evitando las respuestas inmunes exageradas a alergenos y bacterias comensales (Dunne et al, 1999).

Aunque la mayoría de los estudios de inmunomodulación por probióticos se focalizan en el tracto gastrointestinal, actualmente se sabe que la administración vía oral de estos microorganismos puede estimular suficientemente el sistema inmune común de las mucosas como para promover la protección en otras mucosas alejadas, entre ellas la mucosa respiratoria y la urogenital (Perdigón et al, 1999.; Álvarez et al, 2001)

- **Efectos antimutagénicos y antitumorales.**

El desarrollo de un tumor maligno constituye un proceso de múltiples etapas que sucede cuando se acumulan mutaciones en ciertos pro-oncogenes o genes supresores de tumor (Wollowski et al, 2001). En general la función de estos genes mutados está relacionada con el crecimiento y la división celular. En muchas ocasiones estas células anormales no llegan a desarrollar un tumor debido a su incompetencia frente a las células normales o por la destrucción que sufren por parte del sistema inmune (Parvez et al, 2006). Mas allá de la predisposición genética individual a desarrollar algún tipo de desorden proliferativo celular, existen procesos o exposiciones que pueden aumentar los riesgos de cáncer.

En lo que se refiere a la carcinogénesis en tracto gastrointestinal la exposición a sustancias químicas mutagénicas ingeridas o generadas por la actividad metabólica de los microorganismos reviste crucial importancia. En especial, el cáncer de colon se encuentra

entre el segundo y tercer tipo de cáncer más frecuente en los países industrializados (Wollowski, 2001). Aproximadamente el 70% de los cánceres de colon se asocian a factores ambientales, particularmente la dieta y la composición de la microbiota (Parvez et al, 2006). Existe un particular interés por lo tanto, en el rol protector de los cultivos probióticos en el desarrollo del cáncer de colon. Numerosos estudios *in vitro* (utilizando líneas celulares) e *in vivo* (en modelos animales de cáncer de colon inducido), confirman la menor incidencia de células tumorales o sus precursoras debido al uso de cultivos probióticos (Pool-Zobel et al, 1993; Goldin et al, 1996; Femia et al, 2002, entre otros). Las investigaciones en humanos, sin embargo, no arribaron a conclusiones contundentes. Los estudios epidemiológicos que buscan asociar el consumo de leches fermentadas con la menor incidencia de cáncer de colon frecuentemente contienen varios factores dietarios entremezclados y no aportan una evidencia fehaciente. Lamentablemente, los estudios realizados en humanos con intervención activa, son escasos y contradictorios (Capurso et al, 2006).

Los mecanismos postulados para explicar la acción de los cultivos probióticos en la disminución de la exposición a los carcinógenos incluyen: - la detoxificación de los carcinógenos ingeridos; - la adsorción de compuestos mutágenos (Morotomi y Mutai, 1986); - la producción de compuestos metabólicos, como el butirato que promueven la apoptosis celular (Hague et al, 1995); - la modificación de la composición de la microbiota intestinal; disminuyendo así las poblaciones de bacterias cuya actividad metabólica puede generar compuestos carcinogénicos (Goldin y Gorbach, 1984) y - la estimulación del sistema inmune generando una mejor defensa contra la proliferación celular (Link-Amster et al, 1994).

¿Cómo seleccionar una cepa probiótica?

Las crecientes investigaciones en el campo de los probióticos han llevado al desarrollo de numerosos criterios y recomendaciones para la selección de cepas probióticas (Tabla 1) (Klaenhamer y Kullen, 1999).

Tabla 1. Criterios de selección para una cepa probiótica (según Klaenhamer y Kullen, 1999).

CATEGORíA	CRITERIOS DE SELECCION
Caracterización	• **Identificación taxonómica precisa.**
	• **Habitante normal de la especie donde se utilizará.**
	• **Sin toxicidad o patogenicidad asociada, estatus GRAS.**
Adaptabilidad tecnológica	• **Pasible de resistir la producción en masa y el almacenamiento (crecimiento adecuado a gran escala, resistencia a la congelación, deshidratación, almacenamiento y distribución).**
	• **Conservación de las características deseadas durante la preparación del producto, almacenamiento y distribución.**
	• **Proveer buenas características organolépticas cuando se incluyen en un alimento.**
	• **Ser genéticamente estable y confiable.**
	• **Conservar alto número de microoganismos viables hasta el consumo (preferencialmente entre 10^6 - 10^8 ufc/g)**
Competitividad	• **Capacidad de sobrevivir, proliferar y desarrollar actividad metabólica en los sitios blancos *in vivo*.**
	• **Resistencia a la bilis y al ácido clorhídrico si debe colonizar el tracto gastrointestinal.**
	• **Capacidad de competir con la microbiota normal, incluso con especies relacionadas. Resistencia a las sustancias antimicrobianas producidas por la microflora residente.**
	• **Adherencia a los epitelios blanco.**
Funcionalidad	• **Capacidad de desarrollar algún beneficio clínicamente documentado (ej. Mejorar la tolerancia a la lactosa).**
	• **Presentar antagonismo hacia los microorganismos patógenos.**
	• **Producción de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno u otros)**
	• **Presentar capacidad de inmunomodulación.**
	• **Presentar actividad antimutagénica o anticarcinogénica.**
	• **Producción de compuestos bioactivos (enzimas, vitaminas, péptidos).**

Evidentemente no existen cepas que puedan cumplir con la totalidad de las propiedades deseadas. Los criterios de competitividad y funcionalidad son los más controvertidos por varias razones. La primera es que no existen medidas estándar reconocidas para cuantificar muchas de estas propiedades, por ejemplo ¿qué porcentaje de asociación a células epiteliales es el apropiado?, ¿cuál es la concentración de bilis que

una cepa debe resistir? y ¿por cuánto tiempo?. Una segunda razón es que frecuentemente se desconocen los mecanismos que subyacen bajo los efectos observados y su correlación genotípica. Este desconocimiento podría implicar la presencia potencial de la característica buscada en una cepa, sin encontrar el medio o los inductores de su expresión. Un tercer aspecto problemático se produce porque la mayoría de estas propiedades deseadas se comprueban *in vitro* sin obtener su correspondiente correlación *in vivo*. En este sentido, la adhesión de las bacterias probióticas a enterocitos humanos en cultivo ha sido un criterio básico ampliamente utilizado para la selección de cepas. Si bien en general las cepas que mejor adhieren suelen disminuir la asociación de los microorganismos patógenos a las monocapas en cultivo, existen excepciones (Bibiloni et al, 1999). Aún más arriesgado es predecir un comportamiento *in vivo* a partir de los indicios *in vitro*. *In vivo* la interacción probiótico-hospedador está influenciada por múltiples factores interrelacionados, imposibles de reproducir experimentalmente. Entre ellos ocupa un lugar destacado la relación entre el sistema inmune y las bacterias probióticas. Es posible que la obtención de un efecto benéfico para el hospedador (ej. la protección frente a un enteropatógeno) requiera de la intervención de varios mecanismos desencadenados por los probióticos como ser la disminución de la adhesión del patógeno junto con inhibición del desarrollo microbiano e inmunomodulación.

¿Quiénes son los lactobacilos?

El concepto de bacterias ácido lácticas (BAL) como un grupo de microorganismos comenzó a principios de 1900. La interacción de estas bacterias con los alimentos captó la atención de los científicos. El descubrimiento de la fermentación ácido láctica por Pasteur (1857) seguido por la obtención del primer cultivo bacteriano puro (*Bacterium lactis*) por Lister en 1873 constituyeron dos hitos fundamentales en el conocimiento de estos microorganismos. Las BAL están involucradas en numerosas fermentaciones espontáneas de alimentos, además de estar estrechamente asociadas al ambiente humano. Las primeras definiciones de las BAL se basaban en su capacidad de fermentar y coagular la leche e incluían a los coliformes. La descripción del género *Lactobacillus* como una bacteria Gram positiva por Beijerinck (1901) separó a los coliformes de este grupo (Stiles y Holzapfel, 1997). Actualmente se considera a las BAL como microorganismos Gram positivos, no esporulados, catalasa negativos que carecen de citocromos, anaerobios facultativos, tolerantes al ácido, fermentadores estrictos cuyo principal producto de fermentación de azúcares es el ácido láctico (Axelsson, 1998). Esta clasificación incluiría a los siguientes géneros de importancia en alimentos fermentados

Carnobacterium, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* más otros géneros como *Aerococcus, Lactosphaera, Melissococcus, Alloiococcus y Dolosigranum* (Vandamme et al, 1996). Filogenéticamente se considera a las BAL como pertenecientes a la rama clostridial de las bacterias Gram positivas (figura 2).

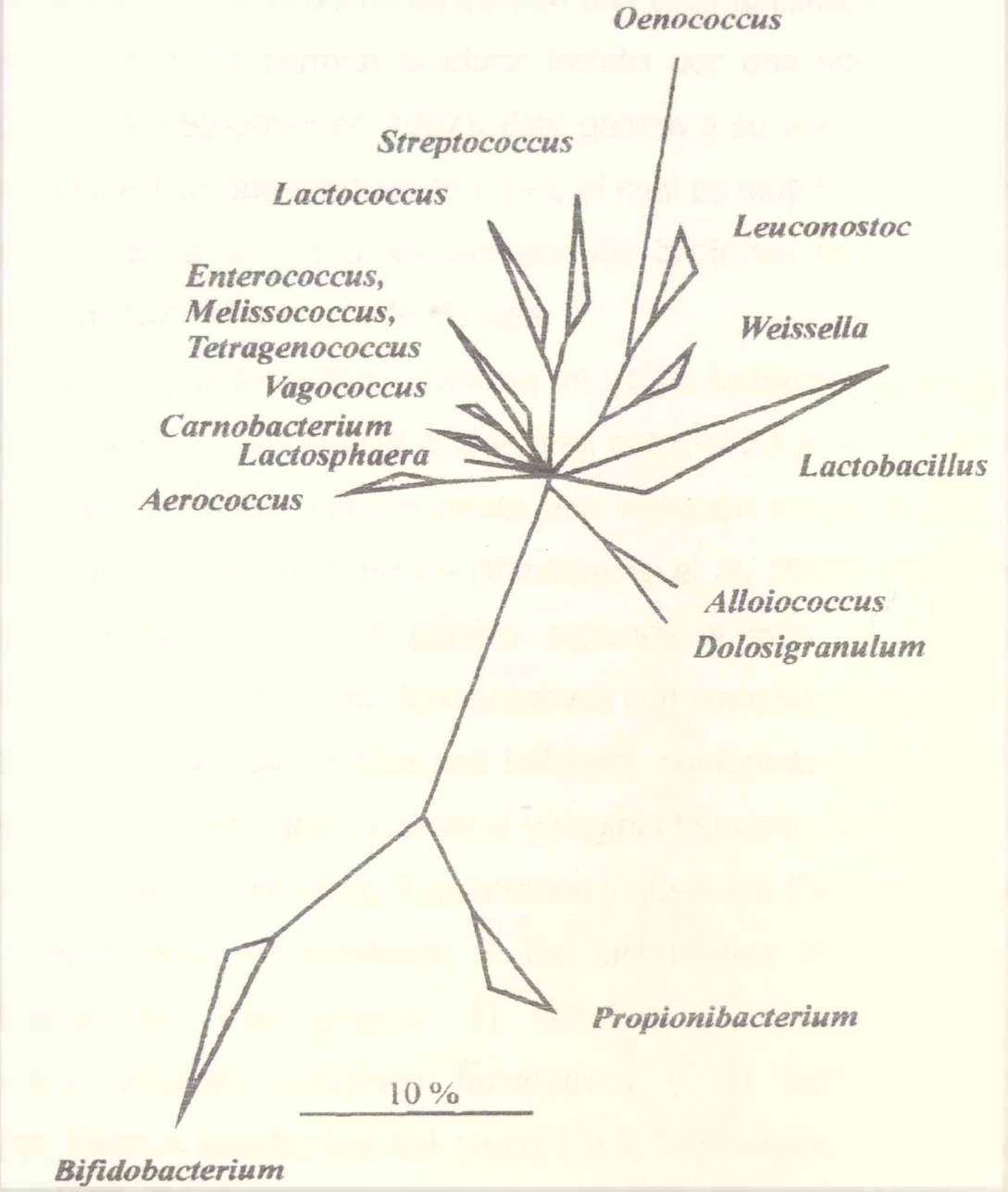


Figura 2. Árbol de consenso de los mayores grupos filogenéticos de bacterias ácido lácticas. El árbol se construyó comparando las secuencias del ARN ribosómico 16S. Se muestran además los géneros *Bifidobacterium* y *Propionibacterium* no relacionados con las verdaderas BAL. (Tomado de Stiles y Holzapfel, 1997)

Las BAL estarían conformadas dentro de este grupo como cocos, cocobacilos y bacilos no esporulados, catalasa negativos con menos de 55% de contenido G+C en su ADN. Esto distanciaría las BAL clásicas de las bifidobacterias que tienen un pocentaje de G+C mayor del 55% y pertenecerían a la rama Actinomyces de las bacterias Gram positivas (Schleifer y Ludwig, 1995) (figura 2).

Las bifidobacterias comparten algunas características fenotípicas con las típicas BAL. Es frecuente la consideración de *Bifidobacterium* dentro de este grupo por motivos prácticos, sin embargo filogenéticamente no se hallan relacionados. Las bifidobacterias

son bacilos Gram positivos, anaerobios, no esporulados, inmóviles, que frecuentemente adoptan disposiciones en V o Y de las que se origina su nombre (Scardovi, 1986). Presentan un metabolismo de los hidratos de carbono diferente del presente en las BAL homo o heterofermentativas. Debido a la carencia de las enzimas aldolasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa los microorganismos pertenecientes al género *Bifidobacterium* no pueden metabolizar la glucosa ni por la vía glicolítica, ni por la vía de las pentosas fosfato. En lugar de esto las bifidobacterias poseen una enzima característica, la fructosa-6-fosfato fosfocetolasa que les permite producir lactato por una vía original denominada shunt bifido (de Vries y Stouthamer, 1967). Este género a su vez es único en el sentido de que todo el ácido láctico que produce es L (+), el cual es muy fácilmente metabolizado por los infantes. La forma D (+) producida por las bacterias lácticas puede causar acidosis metabólica durante el primer año de vida.

El género *Lactobacillus* conforma un grupo heterogéneo de microorganismos con porcentajes de G + C en el ADN que oscilan entre el 33 y 55% (Hammes y Vogel, 1995). Generalmente se sugiere que no exista una variación mayor al 10% en el contenido de G + C dentro de un clado genérico (Vandamme et al, 1996). Actualmente, el número de especies incluidas dentro del género asciende a más de 50. Los lactobacilos son microorganismos estrictamente fermentativos con complejos requerimientos nutricionales. Se encuentran asociados a distintos hábitats; conforman parte de la microbiota de la cavidad bucal, el tracto gastrointestinal y vaginal humano. Además se hallan presentes en plantas, suelo, agua, alimentos fermentados y ensilados (Stiles y Holzapfel, 1997).

Clásicamente se subdivide a los lactobacilos en base a sus características fermentativas en tres grupos: 1) lactobacilos homofermentativos obligados, 2) lactobacilos heterofermentativos facultativos y 3) lactobacilos heterofermentativos obligados. Muchos lactobacilos del grupo 1 y 2, más algunos del grupo 3 se utilizan en la elaboración de alimentos fermentados. Sin embargo, los microorganismos incluidos en el tercer grupo en general se asocian al deterioro de alimentos (Stiles y Holzapfel, 1997). En la tabla 2 se listan las principales especies de lactobacilos encontradas en estos grupos.

Tabla 2. Principales especies de lactobacilos agrupadas según sus patrones de fermentación de hexosas. Las especies resaltadas en negrita forman parte de la microbiota asociada al hombre.

Grupo 1 Homofermentativos obligados	Grupo 2 Heterofermentativos facultativos	Grupo 3 Heterofermentativos obligados
Lb. acidophilus	***Lb. casei***	***Lb. brevis***
Lb. gasseri	*Lb. curvatus*	***Lb. buchneri***
Lb. crispatus	*Lb. paracasei* subsp *paracasei*	***Lb. fermentum***
Lb. johnsonni	*Lb. paracasei* subsp *tolerans*	***Lb. fructivorans***
Lb. salivarius subsp ***salivarius***	*Lb. plantarum*	***Lb. hilgardii***
Lb. salivarius subsp ***salicinus***	*Lb. paraplantarum*	***Lb. kefir***
Lb. delbrueckii subsp *bulgaricus*	***Lb. rhamnosus***	***Lb. parakefir***
Lb. delbrueckii subsp *lactis*	*Lb. sake*	***Lb. reuteri***
Lb. delbrueckii subsp *delbrueckii*		***Lb. sanfrancisco***
Lb. helveticus		***Lb. vaginalis***
Lb. kefiranofaciens		
Lb. kefirgranum		

En el grupo 1 se incluyen los lactobacilos que fermentan la glucosa exclusivamente en ácido láctico. En él se encuentran varias especies importantes asociadas a alimentos como *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* y *Lb. helveticus*. *Lb. delbrueckii* forman un complejo grupo de bacterias que anteriormente poseían el status de especie como *Lb. delbrueckii*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis* y *Lb. leichmanii*. Estas bacterias poseen una homología del 80% en su DNA y por lo tanto, fueron reclasificados como *Lb. delbrueckii* subsp *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp *bulgaricus* y *Lb. delbrueckii* subsp *lactis*. *Lb. leichmanii* fue incorporado dentro de *Lb. delbrueckii* subsp *lactis* (Weiss et al, 1983). Todos estos microorganismos están asociados con alimentos que se fermentan a altas temperaturas (45-50ºC). *Lb. delbrueckii* subsp *bulgaricus* es utilizada como una cepa starter en la fabricación de yogur. *Lb. delbrueckii* subsp *bulgaricus* en asociación con *Lb. delbrueckii* subsp *lactis*, *Lb helveticus* y *S. thermophilus* constituyen cultivos iniciadores para la elaboración de quesos tipo Ementhal, Gruyère, mozarrella y provolone entre otros. *Lb. delbrueckii* subsp *delbrueckii* se asocia a la fermentación del pan ácido (sourdough bread).

Lb. acidophilus constituye un conjunto heterogéneo el cual fue dividido en grupos genotípicos de los cuales algunos alcanzaron el status de especies como *Lb.acidophilus*, *Lb.gasseri* y *Lb. johnsonii*. Para diferenciar estas especies deben utilizarse características adicionales a las fenotípicas. *Lb. acidophilus* se emplea en la elaboración de leche ácida (Stiles y Holzapfel, 1997).

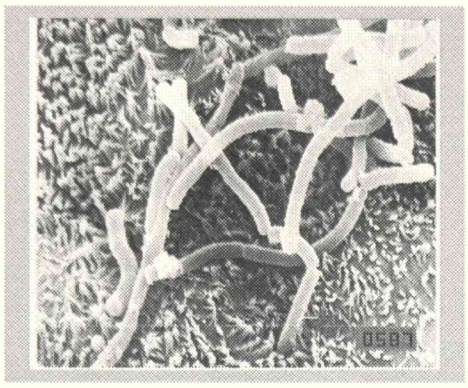
Otros lactobacilos importantes del grupo 1 son *Lb. helveticus* (utilizado en la elaboración de quesos), *Lb. kefiranofaciens* y *Lb. kefirgranum* (presente en los gránulos de kefir) (Stiles y Holzapfel, 1997).

En el grupo 2 se incluyen lactobacilos heterofermentativos facultativos. Estos microoganismos fermentan las hexosas a ácido láctico y pueden producir gas desde el gluconato pero no desde la glucosa. También pueden fermentar pentosas mediante la inducción de una enzima fosfocetolasa y producir ácido acético junto con ácido láctico. Dos especies importantes asociadas a alimentos presentes en este grupo son: *Lb. casei* y *Lb. plantarum* (Stiles y Holzapfel, 1997). *Lb. casei* se encuentra presente en distintos hábitats y está asociado a la fermentación de pan ácido y quesos. También provoca el deterioro de quesos por fermentación del citrato y liberación de dióxido de carbono (Hammmes et al, 1991). *Lb. plantarum* se utiliza como cultivo iniciador de algunas salsas fermentadas y productos derivados de cereales. Constituye parte de la microbiota adventicia de BAL que crece en vegetales fermentados y productos cárnicos. Es en parte responsable del deterioro de jugos de frutas, vino y algunos quesos (Hammmes et al, 1991).

En el grupo 3 se incluyen lactobacilos heterofermentativos obligados que fermentan las hexosas a ácido láctico, acético y/o etanol junto con CO_2. La producción de gas desde la glucosa es una característica típica de estas bacterias. Especies importantes asociadas a la fermentación de alimentos son: *Lb. sanfrancisco* (pan ácido); *Lb. brevis*, *Lb. fermentum* y *Lb.kefir* (kefir). Muchos de los lactobacilos presentes en este grupo provocan el deterioro de alimentos (*Lb. brevis*, *Lb. fructivorans, Lb. buchneri*, etc) (Stiles y Holzapfel, 1997).

En el presente trabajo de tesis se evaluarán aspectos funcionales, de competitividad y adaptabilidad tecnológica de una cepa de lactobacilo potencialmente probiótica: la cepa CIDCA 133 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis*). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que esta cepa podría resultar interesante para su inclusión en productos probióticos, ya que produce una gran cantidad de ácido láctico, es resistente a la bilis y es capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes de alimentos (Kociubinski et al, 1996 y 1999).

Durante el desarrollo de la tesis se utilizarán fundamentalmente modelos *in vitro* para caracterizar diferentes aspectos de la cepa (capítulos 1, 2, 3, 4 y 5). En el capítulo 6 se buscará correlacionar los resultados anteriormente obtenidos, en un modelo de infección murino *in vivo*.



OBJETIVOS

OBJETIVOS

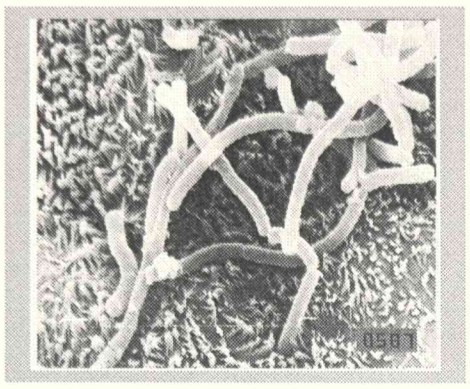
En el presente trabajo de tesis se plantearon los siguientes objetivos generales y específicos:

Objetivo general

- Estudiar las propiedades probióticas de la cepa CIDCA 133 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis*).

Objetivos específicos

- Determinar las principales propiedades superficiales de la cepa CIDCA 133 y correlacionarlas con propiedades biológicas.
- Investigar características de interés tecnológico de la cepa CIDCA 133 en vistas de su posible inclusión en un producto fermentado.
- Estudiar la aptitud de la cepa CIDCA 133 en cuanto a su competitividad en el tracto gastrointestinal; abordando tanto parámetros tradicionales (resistencia al pH ácido, tolerancia a la bilis, adhesión a células epiteliales en cultivo) como no tradicionales (resistencia a moléculas efectoras de la inmunidad innata intestinal).
- Establecer la capacidad de inhibición de *E. coli* mediante la producción de sustancias antimicrobianas por parte de la cepa CIDCA 133.
- Caracterizar mediante modelos *in vitro* la asociación de la cepa CIDCA 133 a enterocitos humanos en cultivo en interacción con *E. coli*.
- Determinar la existencia de un antagonismo por parte de la cepa CIDCA 133 sobre las actividades metabólicas potencialmente perjudiciales de *E. coli*.
- Investigar la capacidad de la cepa CIDCA 133 de contrarrestar la acción biológica de *E. coli* EHEC sobre cultivos celulares.
- Estudiar la capacidad de la cepa CIDCA 133 de contrarrestar la patogenia de *E. coli* EHEC en un modelo de infección murino.



CAPÍTULO I

Propiedades tecnológicas y superficiales de la cepa CIDCA 133

CAPÍTULO I

Numerosos productos alimenticios y farmacéuticos conteniendo cultivos probióticos están actualmente bien establecidos en el mercado. Alimentos conteniendo microorganismos probióticos se ha comercializado en Japón desde 1920. Hoy en día se ha incrementado considerablemente tanto el número de especies probióticas incluídas en los productos alimenticios, como la diversidad de éstos (leches fermentadas, quesos, helados, leche en polvo para bebés, leches pasteurizadas, etc). Sin embargo los productos lácteos fermentados siguen siendo el principal vehículo de administración de probióticos, en especial yogur (Tamime et al, 2005). Existen más de 100 productos lácteos fermentados disponibles en todo el mundo. A fin de posibilitar la producción de un efecto beneficioso en la salud del hospedador, es esencial que los productos comercializados que sostienen un reclamo de salud cumplan el criterio de una concentración mínima de bacterias probióticas viables de 10^6 ufc/g a la fecha de vencimiento, mientras que la dosis mínima terapéutica sugerida por día es de 10^8 - 10^9 ufc/g (Shah, 2000). Diferentes estudios han demostrado que es frecuente encontrar una cantidad menor de bacterias sobrevivientes a las sugeridas en los productos a la venta (Hull, et al 1984, Iwana et al, 1993, entre otros)

La viabilidad de los cultivos probióticos en los productos lácteos fermentados, se ve afectada por numerosos factores entre ellos: la acidez final del producto, la disponibilidad de los nutrientes, la interacción con otras bacterias presentes, la concentración de azúcares, el oxígeno disuelto y la permeabilidad al oxígeno del envase (Tamime, et al 2005).

Desde el punto de vista de la manufactura la selección de una cepa probiótica debe tener en cuenta aspectos tales como: la habilidad del microorganismo para crecer en el medio elegido, la resistencia para soportar los procesos de congelamiento, refrigeración o desecación empleados en la preservación del producto y la capacidad de aportar las características organolépticas adecuadas para el producto final (Tamime, et al 2005).

Desde el punto de vista biológico la selección de una cepa probiótica se basa en demostrar la capacidad de la misma en ejercer algún efecto beneficioso en la salud del hospedador. Un primer paso en la determinación de estos posibles efectos es la caracterización de las propiedades superficiales bacterianas. Estas propiedades han sido clásicamente utilizadas como un criterio de preselección de cepas con potencialidad probiótica (Pérez et al, 1998). En algunas bacterias determinadas características superficiales (ej alta hidrofobicidad) correlacionen positivamente con propiedades biológicas como la adhesión a células epiteliales en cultivo.

En el presente capítulo se exploraron algunas características de la cepa 133 de interés tecnológico; con proyección a un posible uso en un producto lácteo fermentado. Además se evaluaron algunas propiedades superficiales de la cepa, con la finalidad de correlacionar estas características con las propiedades biológicas estudiadas para el lactobacilo, a lo largo del trabajo de tesis.

Metodología

Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.

El lactobacilo utilizado fue la cepa CIDCA 133 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis*) cepa CIDCA 133 perteneciente a la colección del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP). La misma constituye un aislamiento efectuado de leche cruda (De Urraza, 1997). Los cultivos stock del microorganismo se mantuvieron a -80ºC. La cepa fue reactivada dos veces en medio líquido antes de la realización de los experimentos.

L. delbrueckii subsp *lactis* fue crecido en anaerobiosis en caldo MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) o en caldo TPY conteniendo por litro (triptona, 10g; peptona de soja 5g; glucosa 5g; extracto de levadura 2.5g; Tween 80 1g; K_2HPO_4 2g; $MgCl_2.6\ H_2O$ 5g; $ZnSO_4.7H_2O$ 0.25g y $CaCl_2$ 0.15g). A ambos medios se les añadió 0.5 % de cisteína como agente reductor. Las condiciones de incubación fueron 16 h a 37ºC.

Determinación de la actividad acidificante en leche.

En los ensayos se utilizó leche UAT tyndalizada suplementada o no con 0.1% de extracto de levadura. El inóculo de lactobacilo fue del 1 o 3% a partir de un cultivo en MRS de 16 h, cuya concentración osciló entre de 5 10^8 y 6 10^8 ufc/ml. La concentración del lactobacilo al comienzo de la fermentación fue de alrededor de 6 10^6 ufc/ml. La incubación se realizó a 37ºC. El pH se determinó a través de un phchímetro CIDCA TCT-03.

Supervivencia en condiciones de refrigeración.

Cultivos de lactobacilo que produjeron la coagulación de leche UAT tyndalizada fueron conservados durante 15 días a 4ºC. A partir de los mismos, se realizaron recuentos de microorganismos viables a diferentes intervalos de tiempo. Para los recuentos se utilizó solución fisiológica estéril como diluyente y las suspensiones se sembraron en la superficie de placas conteniendo agar MRS. La incubación de las placas se realizó durante 48 h a 37ºC. Se determinó el porcentaje de bacterias sobrevivientes considerando como 100%, la concentración a tiempo cero del lactobacilo en la leche coagulada.

Resistencia a los ciclos de congelación-descongelación.

Cultivos del lactobacilo en fase estacionaria fueron centrifugados a 3000 g por 10 min y lavados con buffer PBS. Seguidamente se los resuspendió en agua destilada o en agua destilada con sacarosa filtrada (3M) utilizada como crioprotector. Alícuotas (1-2ml)

conteniendo 2 10^8 ufc/ml de lactobacilo fueron congeladas a -80ºC. Durante los ciclos de congelación-descongelación las suspensiones fueron descongeladas a 37ºC en baño de agua y conservadas a esa temperatura durante 5 min. Las muestras fueron luego recongeladas a -80ºC, permaneciendo a esa temperatura durante 30 min hasta el desarrollo del siguiente ciclo. El número de bacterias supervivientes se determinó mediante recuento de microorganismos viables según lo especificado anteriormente.

Determinación de autoagregación bacteriana.

La autoagregación bacteriana se determinó registrando los cambios de densidad óptica a 600 nm (Bibiloni et al, 1999). Los cultivos del lactobacilo en fase estacionaria fueron centrifugados a 3000 g durante 10 min. El pellet de bacterias obtenido fue resuspendido un buffer PBS hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600}) próxima a 1. Luego de homogeneizar las suspensiones de lactobacilo, se registraron mediante un espectrofotómetro las modificaciones de la densidad óptica hasta alcanzar un valor constante. Las cepas autoagregantes forman grumos que floculan dejando un sobrenadante límpido. En contraste, las suspensiones de bacterias no agregantes mantienen una turbidez constante por lo menos durante 1h.

Ensayos de hidrofobicidad.

Los cultivos de 16 h del lactobacilo fueron centrifugados y lavados 2 veces con buffer PBS. Posteriormente se llevaron a una densidad óptica de (A_{600}) 0.6. Dos mililitros de las suspensiones bacterianas fueron mezclados con 0.4 ml de hexadecano. Las muestras fueron incubadas tapadas, para evitar la evaporación, a 30ºC durante 30 min. La temperatura constituye un factor importante en el ensayo, ya que el punto de solidificación del hexadecano es cercano a los 20ºC. Luego de la incubación, las muestras fueron agitadas vigorosamente durante 120 segundos a fin de forzar el contacto de la fase acuosa con el hexadecano. Las suspensiones se mantuvieron en reposo durante 30 min, permitiendo así la separación de las fases. La fase acuosa inferior fue cuidadosamente removida y su absorbancia fue leída a 600 nm (A_{600}). El descenso de absorbancia en la fase acuosa se toma como medida de la hidrofobicidad superficial bacteriana. El porcentaje de hidrofobicidad (H%) fue calculado como:

$H\% = [(A_0-A)/A_0]X100$, donde A_0 y A corresponden a la absorbancia de la fase acuosa antes y después de la extracción con hexadecano, respectivamente.

Determinación de movilidad electroforética y potencial zeta.

Cultivos de 16 h del lactobacilo fueron centrifugados y lavados 2 veces con agua bidestilada. Para la determinación experimental las suspensiones fueron diluídas 100 veces en agua destilada. La movilidad electroforética de las bacterias fue determinada en un equipo Z-meter 3.0 (Zeta Meter Inc, Staunton, VA, USA) aplicando un campo eléctrico constante de 75 V. El movimiento de las partículas en el campo eléctrico fue registrado por visualización microscópica en un objetivo reticulado. Los valores de movilidad electroforética (μ) son calculados automáticamente por el equipo. El potencial zeta en voltios (ξ) fue calculado aplicando la ecuación de Smoluchowski:

$\xi = 4\pi (\eta \mu / D)$, donde η es la viscosidad de la suspensión a 20ºC; D es la constante dieléctrica de la solución a 20ºC y μ es la movilidad electroforética de las partículas (micrómetros/volt.cm).

Análisis estadístico.

Las medias fueron comparadas a través de la prueba de dos colas del test de Student's utilizando el software de InfoStat (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Resultados y discusión.

Propiedades de interés tecnológico de la cepa CIDCA 133

a) Capacidad de acidificación en leche

A fin de determinar la posible inclusión de la cepa 133 en un producto lácteo fermentado se decidió investigar su capacidad de acidificación en leche. Para ello se evaluaron cinéticas de acidificación en leche UAT tyndalizada a 37ºC en aerobiosis.

Durante los primeros ensayos se utilizó un inóculo de lactobacilo del 1%, sin el agregado de aditivos a la leche. El pH en estas condiciones solo descendió 0.3 unidades en 5.5 h, no llegando a coagular la leche. El número de microorganismos viables para este tiempo, sin embargo ascendió alrededor de un orden y medio de magnitud desde $6.3\ 10^6 \pm 2.4\ 10^6$ a $1\ 10^8 \pm 1.4\ 10^7$ ufc/ml. Dado que los tiempos deseados de coagulación para un producto industrial son menores a los obtenidos (alrededor de 4 h en un yogur, por ejemplo); se decidió, incrementar el inóculo del lactobacilo al 3% y añadir extracto de levadura al 0.1% como suplemento nutritivo (Figura 1).

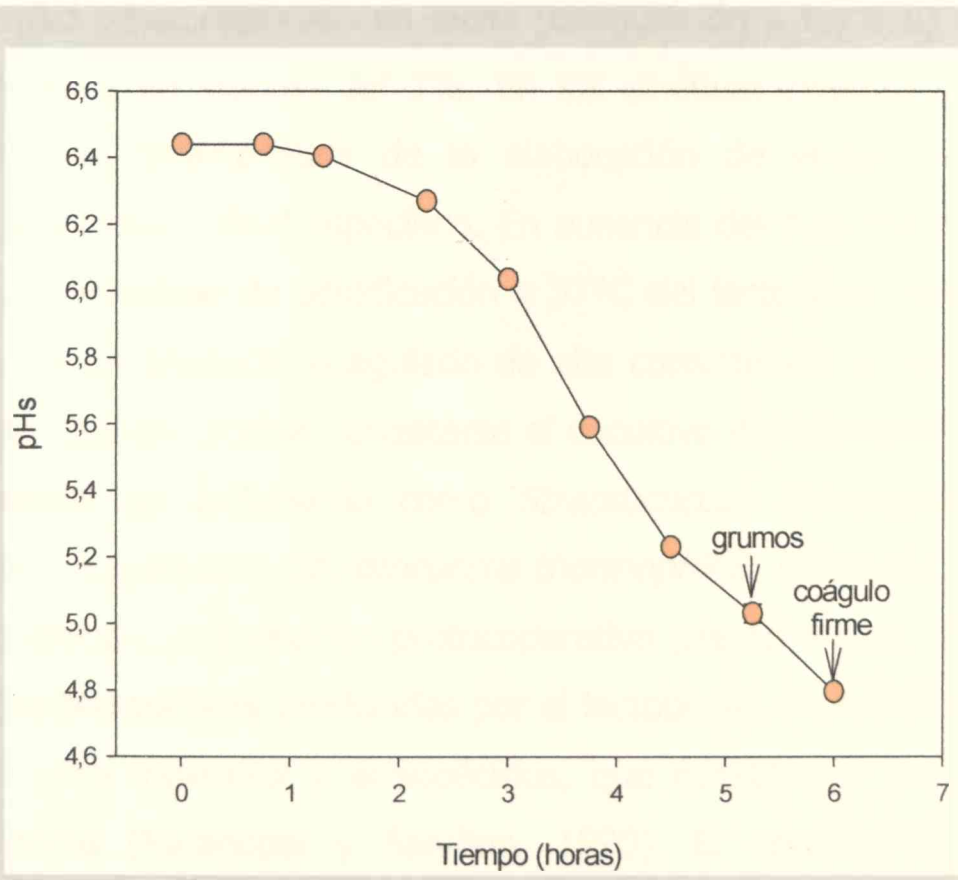


Figura 1. Cinética de acidificación en leche de la cepa 133. El inóculo del lactobacilo fue del 3%. Se utilizó leche UAT tyndalizada suplementada con 0.1% de extracto de levadura. Las barras de la desviación estándar no se observan por ser menores que los símbolos. La concentración inicial del lactobacilo fue de $6.5\ 10^6$ ufc/ml.

Modificando estos parámetros, la leche comenzó a coagular a las 5 h de incubación (figura 1), observándose a este tiempo pequeños flóculos en el seno del líquido. El pH alcanzado en esta instancia fue de 5 unidades aproximadamente. La formación de un coágulo firme se obtuvo a las 6 h post inoculación, con un pH de 4.8. El crecimiento bacteriano logrado en este punto fue de dos órdenes y medio de magnitud desde $6.5\ 10^6 \pm 2.1\ 10^6$ a $1.6\ 10^8 \pm 2.3\ 10^7$ ufc/ml.

Si bien la cepa 133 concentrada (4 10^8 ufc/ml), muestra una excelente capacidad acidificante en los medios ricos en glucosa como el MRS, alcanzando un pH cercano a 5 y produciendo ácido láctico con una concentración de 195 mM en tres horas a 37ºC (ver capítulo 3), esta característica se ve notablemente disminuída cuando el sustrato fermentable es leche. Este comportamiento, sin embargo es habitual en los lactobacilos. En general, las cepas aisladas de productos lácteos fermentados emplean alrededor de 5 o 6 h para acidificar la leche a pHs cercanos a 5 (a 42ºC con un inóculo del 1%) (Chammas et al, 2006). Muchos lactobacilos y bifidobacterias exhiben un crecimiento lento en leche. La razón de este pobre crecimiento se debe a la escasa concentración de pequeños péptidos y aminoácidos libres presentes en la leche. Por eso la adición de hidrolizados proteicos o extracto de levadura incrementa notablemente el crecimiento en leche de estas bacterias (Tamime et al, 2005).

Teniendo en cuenta que se considera como buena, una cepa de bacteria ácido láctica con la habilidad de reducir el pH de la leche desde su valor inicial 6.6 a 5.3, en 6 h a 42ºC con un inóculo del 1% (Cogan et al, 1997); podemos concluir que el lactobacilo, desarrolló una buena velocidad de acidificación en leche (coagulación a las 6 h) con el agregado de extracto de levadura y un inóculo del 3%. En las cinéticas realizadas no se empleó una temperatura tan alta, característica de la elaboración de yogur, ya que no se tenía predeterminado un producto final específico. En ausencia del suplemento nutritivo y con un inóculo estándar, la velocidad de acidificación a 37ºC del lactobacilo resultó muy lenta. Con el objetivo de lograr un producto coagulado de alta consistencia en un tiempo razonable y sin el agregado de aditivos, podría necesitarse el cocultivo del lactobacilo con otra cepa que ayude al crecimiento del lactobacilo como *Streptococcus thermophilus*. Es sabido que *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* utilizados en la elaboración de yogur y quesos presentan una relación protocoperativa (Higasho et al, 1977; Beal y Corrieu, 1994). Las enzimas proteolíticas producidas por el lactobacilo degradan la caseína, liberando péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos, que constituyen factores de crecimiento para *S. thermophilus* (Rajagopal y Sandine, 1990). El crecimiento del lactobacilo es estimulado por el dióxido de carbono y el ácido fórmico producido por el estreptococo. Es factible que esta relación protocoperativa se verificase para la cepa 133 junto con el estreptococo. Otras posibilidades que no requieran de una fermentación rápida de la cepa 133 implicarían el agregado del lactobacilo a un producto ya coagulado o el desarrollo de un producto fermentado líquido, apto para beber.

b) Supervivencia en condiciones de refrigeración

Una condición requerida en un producto probiótico fermentado es la de preservar la viabilidad de sus microorganismos constituyentes en alto título desde la fecha de elaboración hasta su vencimiento. Durante este período, lo habitual es la conservación del producto mediante refrigeración a una temperatura entre 4 y 10ºC. Con el objetivo de evaluar la capacidad de supervivencia de la cepa 133 en condiciones de refrigeración, se determinó el número de bacterias viables en leches fermentadas y conservadas a 4ºC (figura 2). La leche empleada fue UAT tyndalizada sin el agregado de aditivos. El inóculo del lactobacilo fue del 3%. La leche se incubó con el lactobacilo durante 5 h a 37ºC. Al momento de iniciar la conservación por refrigeración, la leche se encontraba en estado fluído y la concentración de lactobacilos era de 2 10^7 ufc/ml.

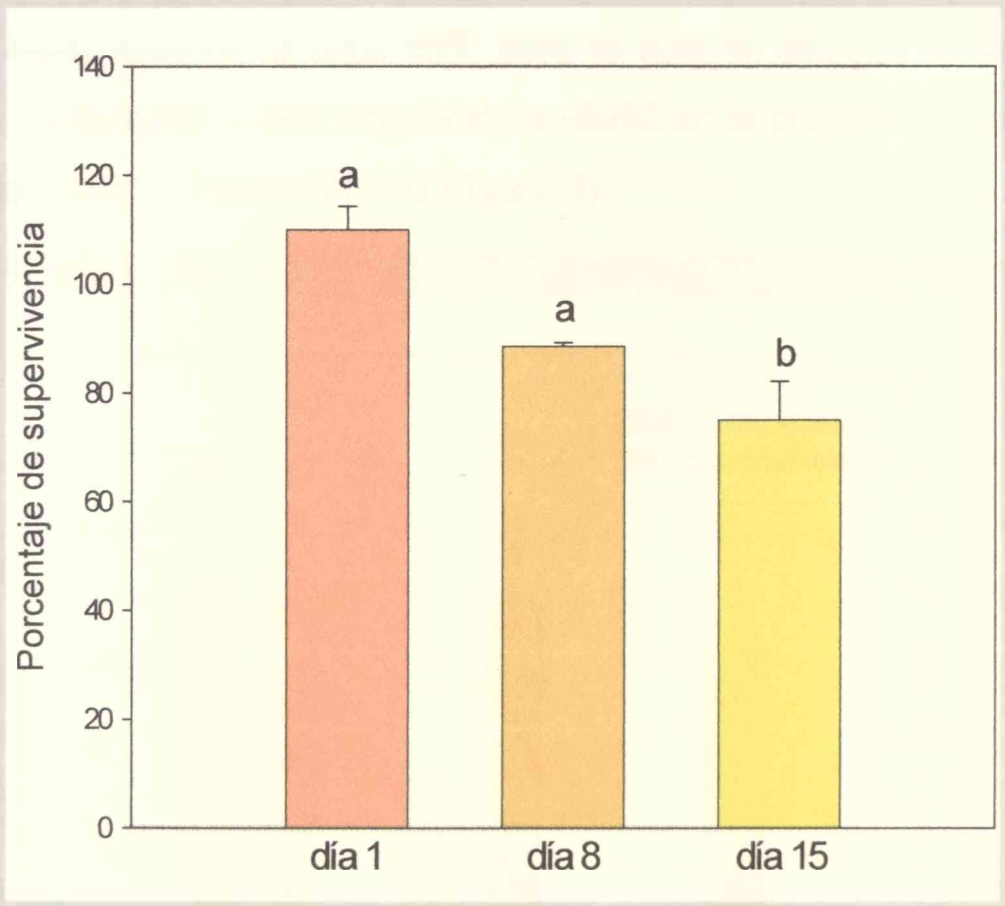


Figura 2. Porcentaje de supervivencia en condiciones de refrigeración de la cepa 133 en leche fermentada. La temperatura utilizada fue de 4ºC. La leche fue fermentada por el lactobacilo durante 5 h. La cuantificación se realizó mediante recuento de bacterias viables. La concentración inicial del lactobacilo fue 2 10^7 ufc/ml.

La preservación de la viabilidad del lactobacilo en la leche fermentada fue muy buena, manteniéndose el porcentaje de bacterias sobrevivientes un 88% a los 8 días y un 75% a los 15 días de almacenamiento. Si bien este último valor fue estadísticamente diferente a los anteriores, representa una elevada concentración bacteriana de alrededor de 1.5 10^7 ufc/ml, considerando el recuento inicial del lactobacilo. Estos resultados demuestran que para el caso de la cepa 133 no sería necesario partir de un inóculo elevado en un producto comercial, para obtener al momento del consumo, la concentración sugerida de microorganismo probiótico viable, la cual es del orden de 10^6 ufc/g (Succi et al, 2005;

Tamime et al, 2005). Estas cifras surgen de un criterio de consenso, ya que salvo en Japón donde la Asociación de Leches y Bebidas Fermentadas estableció un estándar de concentración de 10^7 ufc/ml microorganismos viables en productos lácteos probióticos, no existe una reglamentación oficial en el resto de los países (Tamime et al, 2005).

c) Resistencia a los ciclos de congelación-descongelación.

La congelación es un método de conservación de los cultivos madres bacterianos, de uso frecuente tanto en la industria como en la investigación. Los microorganismos probióticos, además pueden ser incluidos en cremas o postres helados conformando un espectro de productos de enorme potencial. Por ello, la resistencia a la congelación y la capacidad de supervivencia a los ciclos de congelación-descongelación es una característica deseable para una cepa probiótica. Bajo este marco se decidió abordar la investigación de esta propiedad en el caso de la cepa 133, para lo cual se sometió al lactobacilo a ciclos consecutivos de congelación y descongelación a -80ºC en la presencia o no de sacarosa 3M como agente crioprotector (sacarosa 3M) (figura 3).

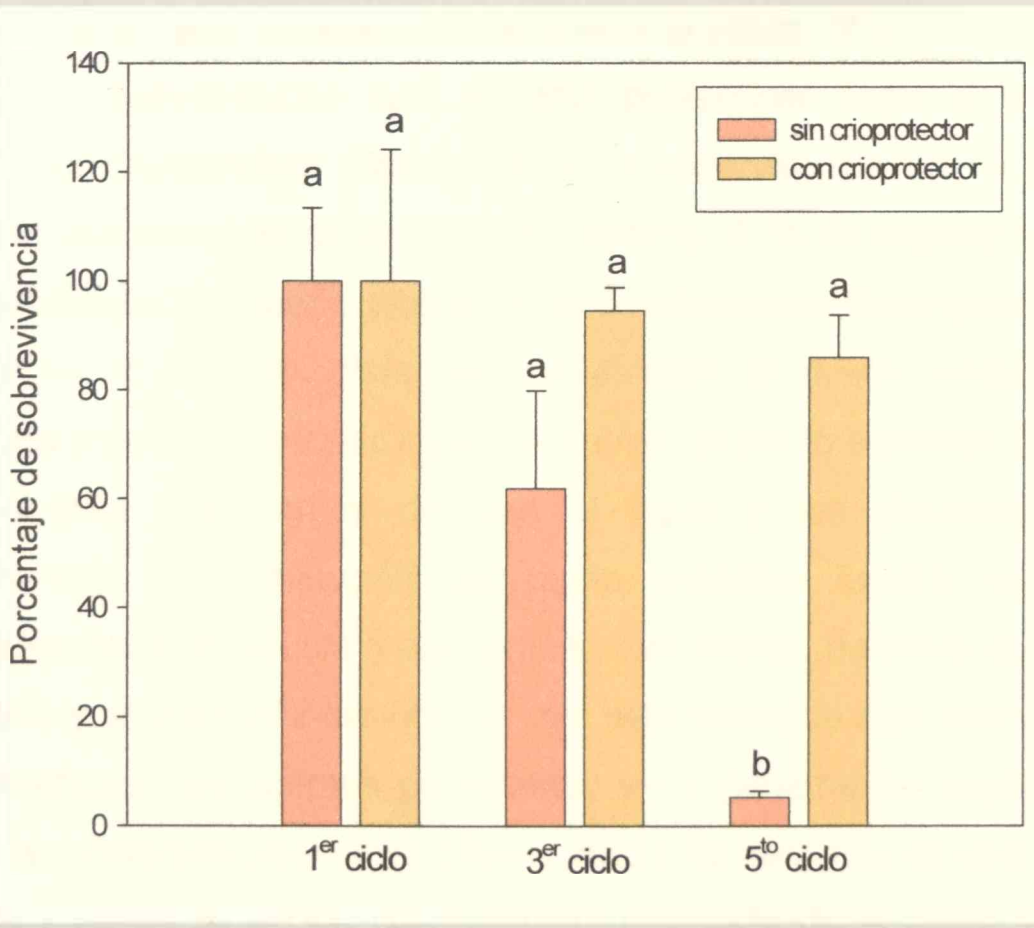


Figura 3. Supervivencia de la cepa 133 a ciclos consecutivos de congelación y descongelación La concentración inicial del lactobacilo fue de 1 10^8 ufc/ml. Las bacterias fueron resuspendidas en PBS con o sin el agregado de sacarosa 3M. La congelación se realizó a -80ºC. Las líneas sobre las barras indican la desviación estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en test t de Student.

La cepa 133 mostró, una muy buena tolerancia a la congelación y a los ciclos de congelación-descongelación especialmente en presencia del crioprotector. Hasta el tercer ciclo no hubo diferencias significativas en el porcentaje de bacterias sobrevivientes respecto a la concentración inicial para ambas condiciones. A partir del quinto ciclo, la viabilidad de la

bacteria cayó abruptamente alcanzando un valor del 5.2% en ausencia del crioprotector. En contraste la supervivencia del lactobacilo, en presencia de sacarosa fue del 86%, para el mismo ciclo.

El lactobacilo mostró un comportamiento óptimo con referencia a su tolerancia a la congelación con una supervivencia del 100% luego del primer ciclo de congelación-descongelación. Estos resultados permitirían especular que la cepa podría incorporarse en un producto alimenticio congelado sin la necesidad de procedimientos especiales de preservación como la microencapsulación. La alta resistencia del lactobacilo a los ciclos de congelación-descongelación demostró que los cultivos madres de la cepa son aptos para conservarse congelados durante períodos prolongados.

Cuando una suspensión celular es enfriada y alcanza temperaturas de -5 a -10ºC se forman núcleos de hielo aleatorios extracelulares. El hielo en el espacio extracelular coexiste con el agua líquida cada vez más concentrada en solutos. Las células deben deshidratarse para mantener el equilibrio osmótico con un medio extracelular más hipertónico. Si la velocidad de descenso de la temperatura es muy elevada, la célula puede no deshidratarse lo suficientemente rápido y al llegar a la temperatura de nucleación, el agua remanente se congela formando hielo intracelular dañino para la célula. Si la velocidad de enfriamiento es muy lenta, la deshidratación será extrema pudiéndose llegar al colapso celular o a la coagulación protoplasmática (Boiso, 2001). La supervivencia celular a la congelación será máxima con una velocidad de enfriamiento óptima. A fin de mejorar la viabilidad celular en la criopreservación se puede alterar el comportamiento físico-químico de las soluciones implicadas en el proceso. Para ello se añaden al medio crioprotectores (sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad) que disminuyen el punto eutéctico (temperatura más baja que se alcanza justo antes de que el agua y los disueltos solutos solidifiquen conjuntamente). La disminución del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de modo que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que está sometida será menor. Los crioprotectores pueden clasificarse en agentes penetrantes y no penetrantes según su permeabilidad a través de la membrana plasmática (Boiso, 2001). La sacarosa es considerada un agente no penetrante y ejerce su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular en el caso de las células eucarióticas.

La pérdida de viabilidad celular por congelación se debe a varios factores entre ellos: - el estrés osmótico sufrido durante la deshidratación a consecuencia de la formación de hielo extracelular.; - la lisis celular dada por la ruptura del plasmalema al momento de la

descongelación en aquellos protoplastos poco "flexibles"; - las lesiones mecánicas producto de la cristalización extracelular o intracelular si la hubiera; y - la alteración funcional de las membranas, especialmente la membrana plasmática (Gazeau y Dereuddre, 1986). Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de congelación, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de lípidos fluídos a sólidos se presenta entre los 10 y 16ºC alterando todas las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad (Boiso, 2001). El grado de resistencia de una cepa bacteriana a la congelación puede relacionarse en parte con la fluidez de su membrana plasmática (a mayor fluidez, mayor resistencia). La fluidez está determinada principalmente por el incremento de la relación entre lípidos insaturados vs saturados presentes en la membrana (Lehninger, 2001). Además se postula que el ácido graso cíclico cyc 19:0 juega un rol importante en el mantenimiento de la fluidez de la membrana (Kodicek, 1963). Gómez Zavaglia y colaboradores (Gómez Zavaglia et al, 2000) relacionaron la composición de ácidos grasos de la cepa 133 y su resistencia a los ciclos de congelación-descongelación en ausencia de crioprotector. Los autores encontraron que los lactobacilos estudiados con mayor tolerancia a la congelación podían dividirse en dos grupos en base a la composición de lípidos de membrana. El primer grupo presentaba una alta proporción de ácidos grasos insaturados (mayor al 60%) con un porcentaje de ácido graso cyc 19:0 menor al 5%. El segundo grupo mostró un bajo nivel de insaturación en sus ácidos grasos de membrana (alrededor del 20%) con un porcentaje de ácido graso cyc 19:0 cercano al 20%. La cepa CIDCA 133 presentó un perfil lipídico correspondiente a los lactobacilos del primer grupo. Esta composición particular de membrana explicaría en parte la tolerancia del lactobacilo a la congelación.

Propiedades superficiales de la cepa CIDCA 133.

La adhesión bacteriana a superficies biológicas es un proceso complejo. Las bacterias se adhieren solamente a un sustrato que exhiba características complementarias. Para lograr la adhesión las bacterias se sirven inicialmente de fuerzas débiles de atracción intermolecular como fuerzas de atracción electrostáticas, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. En algunos casos la adhesión es un proceso altamente estereoespecífico que implica la unión entre una adhesina bacteriana y un determinado receptor celular. Las fuerzas de atracción intermolecular son las que permiten en estos casos la unión entre la adhesina y el receptor celular (Ofek y Doyle, 1994). El proceso de adhesión requiere una estrategia por parte de la bacteria la cual debe posicionar sus adhesinas en cercanía del sustrato. Según la teoría DVLO Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek (Derjaguin y Landau, 1941; Verwey y Overbeek, 1948) se asume que las bacterias y la mayoría de los sustratos biológicos, no se atraen debido a que ambos están cargados negativamente. La repulsión sería el resultado de la presencia de una doble capa cargada formada por las macromoléculas biológicas negativas y los contraiones asociados. Existe un potencial eléctrico a través de esta doble capa, que en las bacterias es función de su movilidad electroforética y la carga neta superficial. Este potencial eléctrico queda definido como potencial Z. El diámetro de la doble capa eléctrica es del orden de 1-5 nm, por lo que las bacterias se ven repelidas de sus sustratos a distancias de 8-12 nm. Una vez superada las fuerzas de repulsión las adhesinas (si existen) pueden interaccionar con su receptor y así crear una ligazón más fuerte (Ofek y Doyle, 1994). Las fuerzas de repulsión entre las bacterias y sus sustratos (otras bacterias o superficies inertes o biológicas) pueden ser de magnitud variable. Si las fuerzas de repulsión inicial son de pequeña magnitud tenderán a favorecer la interacción.

El estudio de las propiedades superficiales bacterianas tiene como objetivo determinar el carácter de estas fuerzas de interacción primaria entre las bacterias y sus sustratos que permitirán la asociación específica (de existir) entre adhesinas y receptores. La determinación de las propiedades superficiales bacterianas se justifica desde la perspectiva de abordar el fenómeno de la adhesión, desde un modelo simplificado hasta llegar a comprobar el comportamiento *in vivo* del microorganismo.

a) Determinación de autoagregación bacteriana.

Observaciones preliminares revelaron diferencias en las características macroscópicas de los cultivos de la cepa 133 crecida en medio TPY o MRS (figura 4).

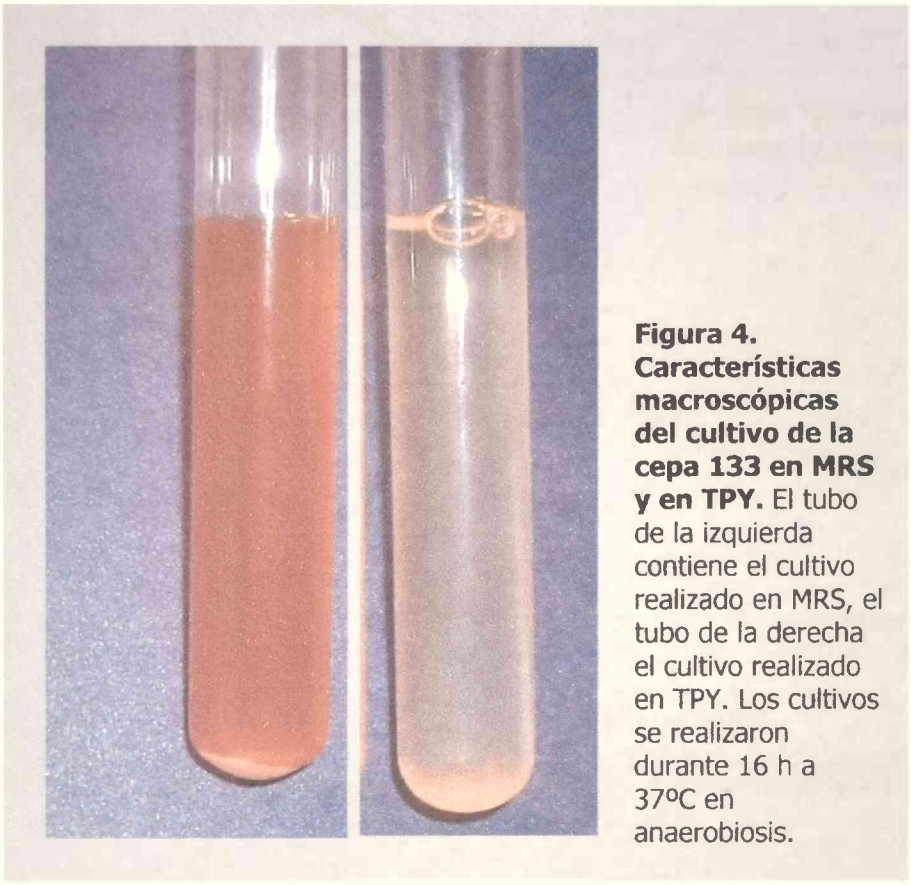


Figura 4. Características macroscópicas del cultivo de la cepa 133 en MRS y en TPY. El tubo de la izquierda contiene el cultivo realizado en MRS, el tubo de la derecha el cultivo realizado en TPY. Los cultivos se realizaron durante 16 h a 37ºC en anaerobiosis.

Los cultivos de 16 h realizados en caldo MRS presentaban un abundante pellet bacteriano, junto con un aspecto opaco. En contraste los cultivos efectuados en caldo TPY presentaron un pellet escaso y un aspecto traslúcido. La diferencia entre el volumen de los pellets bacterianos se atribuyó a los rendimientos disímiles en unidades formadoras de colonias obtenidos en la fase estacionaria para ambos medios ($1\ 10^9$ ufc/ml en MRS frente a $5\ 10^7$ ufc/ml en TPY). Sin embargo las diferencias en la opacidad de los cultivos obedeció a la escasa presencia de bacterias en suspensión presentes en el caldo TPY, respecto al caldo MRS. Cuando se resuspendieron los pellets bacterianos por agitación, las bacterias crecidas en MRS se mantuvieron en suspensión durante un tiempo prolongado, mientras que las bacterias crecidas en TPY precipitaron rápidamente. Esta evidencia cualitativa condujo a la suposición de que podría existir una autoagregación espontánea del lactobacilo crecido en caldo TPY. Para corroborar esta hipótesis se realizó una cinética de agregación bacteriana con cultivos del lactobacilo crecidos en ambos medios (figura 5).

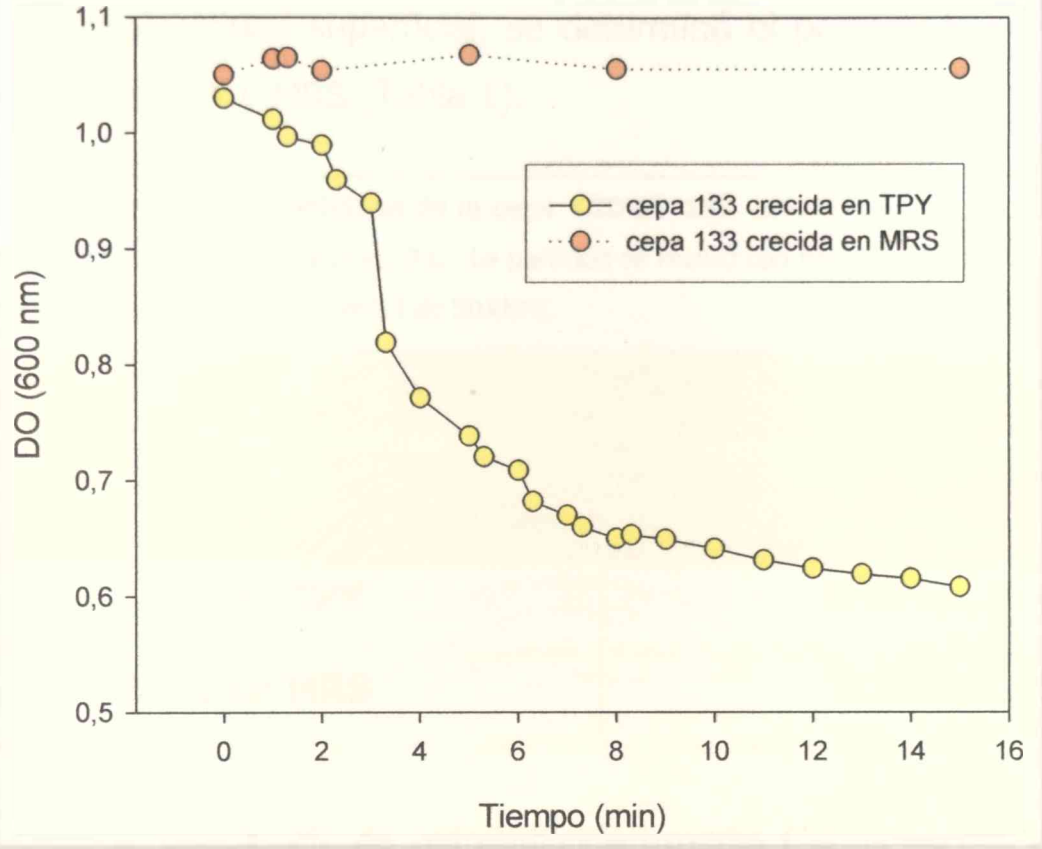


Figura 5. Cinética de autoagregación de la cepa 133 crecida en MRS y TPY. La determinación se realizó por disminución de la absorbancia a 600 nm. Los microorganismos fueron resuspendidos en buffer PBS alcanzando una DO cercana a 1.

Se observó que la cepa 133 crecida en TPY mostró una fuerte tendencia a la autoagregación, reflejada en una disminución de la absorbancia 600 nm, de 0.42 unidades de densidad óptica en 15 min. En contraste, la muestra conteniendo el lactobacilo crecido en MRS mantuvo su absorbancia constante en el mismo período de tiempo.

Es importante destacar que cuando se utilizó el medio TPY en doble concentración la agregación del lactobacilo se vio disminuída (observación visual). Este fenómeno podría explicarse en base a los cambios en el potencial iónico sufrido por el medio de cultivo. El medio TPY contiene numerosas sales (ver materiales y métodos) en baja proporción, la preparación más concentrada del mismo ocasionó muy probablemente un aumento en la fuerza iónica del medio. La presencia de un mayor número de iones cargados en la suspensión podrían generar cambios en la carga superficial de las bacterias y por lo tanto en sus relaciones de atracción y repulsión. Es sabido que las variaciones de pH o de la concentración de sales pueden modificar la capacidad autoaglutinante bacteriana. La disminución del pH por ejemplo puede aumentar la autoagregación bacteriana. En este caso, la concentración creciente de protones ejercería un efecto pantalla sobre las cargas superficiales negativas disminuyendo así, la repulsión entre las bacterias (Pérez et al, 1998).

b) Hidrofobicidad superficial.

Con la finalidad de correlacionar la capacidad autoagregante de la cepa 133 crecida en TPY con la hidrofobicidad superficial, se determinó el porcentaje de hidrofobicidad del lactobacilo crecido en TPY y MRS (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de hidrofobicidad de la cepa CIDCA 133 crecida en TPY y MRS. Los lactobacilos fueron resuspendidos en PBS a una DO_{600} 0.6. La partición se realizó con hexadecano. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en test t de Student.

Lactobacillus delbrueckii subsp *lactis* (CIDCA 133)	Porcentaje de Hidrofobicidad
Cultivo en TPY	**52.54 ± 5.08[a]**
Cultivo en MRS	**2.33 ± 0.75[b]**

Se registró un porcentaje de hidrofobicidad medio (52.54%) del lactobacilo, cuando fue crecido en TPY, mientras que el porcentaje de hidrofobicidad de la cepa 133 disminuyó significativamente (2.33%) cuando se cultivó en MRS. Los resultados obtenidos explicaron en parte el comportamiento autoaglutinante de la cepa 133 en TPY. Se estima que las cepas con mayor hidrofobicidad superficial tienden más hacia la autoagregación, "escapándose" del entorno acuoso. En el caso del lactobacilo en estudio, el crecimiento en TPY genera en la cepa una hidrofobicidad media que resulta suficiente para permitir la agregación bacteriana. En contraste, el cultivo en MRS reduce la hidrofobicidad de la cepa impidiéndole la posibilidad de autoagregación (ver figura 5).

b) Determinación del potencial Z bacteriano.

El potencial Z es una medida que permite estimar la carga superficial bacteriana. Una mayor carga superficial aumenta la repulsión electrostática entre las bacterias. Con el objetivo de relacionar la capacidad autoaglutinante de la cepa 133 crecida en TPY, con la carga superficial, se determinó el potencial Z del lactobacilo crecido en ambos medios (Tabla 2). Dado que el potencial Z puede variar según la fase de crecimiento bacteriano (Gómez Zavaglia, datos no publicados) para la realización de los ensayos se utilizaron cultivos de la cepa 133 de 16 h en fase estacionaria.

Tabla 2. Potencial Z de la cepa CIDCA 133 crecida en TPY y MRS. Los lactobacilos fueron resuspendidos en agua destilada a una DO_{600} 0.03. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Lactobacillus delbrueckii subsp *lactis* (CIDCA 133)	Potencial Z (mV)
Cultivo en TPY	**-21.1 ± 2.7[a]**
Cultivo en MRS	**-7.63 ± 1.49[b]**

El potencial Z del lactobacilo crecido en TPY fue mayor (-21.1) al obtenido en MRS (-7.63). Esta propiedad superficial, no explicaría por lo tanto, la tendencia de la cepa 133 crecida en TPY a autoagregarse. Es lógico pensar que a mayor carga superficial debería existir mayor repulsión entre las bacterias, sin embargo los lactobacilos crecidos en TPY autoagregan y poseen una carga superficial más elevada que aquellos crecidos en MRS, los cuales no autoagregan.

La agregación observada en lactobacilos es un fenómeno multifactorial y cepa dependiente. En ella intervienen tanto la asociación de biomoléculas de superficie específicas como fuerzas de atracción intermoleculares no específicas. En algunos casos la presencia de moléculas específicas de unión está claramente determinada. A veces se trata de factores proteicos como la presencia de capa S (Garrote et al, 2004), el factor promotor de agregación (Kmet y Lucchini, 1997) u otros péptidos no totalmente caracterizados (Ocaña y Nader-Macias, 2002). En otros casos la autoagregación depende de factores de origen glucídico como por ejemplo la producción de exopolisacárido bacteriano (Bergmaier et al, 2005).

Las fuerzas de atracción intermoleculares son esenciales para el desarrollo de la interacción bacteria-sustrato, tanto en las situaciones donde se comprobó la presencia de moléculas específicas de unión como en las que no. La hidrofobicidad superficial es una propiedad que correlaciona con la capacidad de agregación de numerosas bacterias, de nuestro particular interés lactobacilos (Kmet y Lucchini, 1997) y bifidobacterias (Pérez et al, 1998). Sin embargo siempre existen cepas que escapan a este comportamiento. En general se observan altas hidrofobicidades (superiores al 80%) en las cepas de bifidobacterias que autoagregan (Pérez et al, 1998). Para la cepa 133 la hidrofobicidad obtenida en TPY fue de carácter medio (52.54%), permitiendo sin embargo la autoagregación bacteriana. La hidrofobicidad hallada en MRS fue baja (2.33%); lo cual, explicaría el carácter no autoaglutinante de la cepa en este medio; que fue lo realmente observado.

El potencial Z es una medida de la carga superficial bacteriana que permite dimensionar la fuerza de la repulsión o atracción electrostática entre bacteria y sustrato. Se ha registrado en bifidobacterias autoagregantes rangos bastante amplios de carga superficial que oscilan entre -29 a -40 mV, aunque todas estas cepas mostraron alta hidrofobicidad (Pérez et al, 1998). En nuestro estudio, la cepa 133 registró en TPY un potencial Z de -21.1 mV, mientras que el hallado en MRS fue menos negativo (-7.6). Considerando estos valores de carga superficial, se esperaría un comportamiento autoaglutinante de la cepa en ambos medios, sin embargo sólo se registró agregación del lactobacilo en TPY.

Si bien en el presente trabajo se trató de explicar la capacidad de autoagregación del lactobacilo cepa 133 mediante el estudio de dos propiedades superficiales (hidrofobicidad y potencial Z), es sabido que otros factores no estudiados pueden modificar esta característica. Estos factores pueden ser: el pH, la fuerza iónica del medio, la cantidad de biomasa, etc (Juarez Tomas et al, 2005). La hidrofobicidad superficial y el potencial Z del lactobacilo, son distintos en los medio TPY y MRS explicando en parte la capacidad autoaglutinante de la cepa en TPY. Posiblemente estas no sean las únicas fuerzas que determinan la posibilidad de autoagregación del lactobacilo, ya que por ejemplo el valor de hidrofobicidad superficial en TPY no es tan elevado como para predecir este comportamiento. El hecho de que la autoaglutinación se observe en un medio de cultivo y no en otro, permite suponer que componentes diferenciales presentes en ambas formulaciones asociado o no al diferente rendimiento de biomasa final bacteriana, colaboren en el desarrollo de esta propiedad.

El estudio de las propiedades superficiales constituye una aproximación *in vitro* que permite predecir y explicar ciertas características de las cepas bacterianas en especial la capacidad de adhesión a superficies inertes o a células en cultivo. A lo largo del presente trabajo de tesis se buscó relacionar la capacidad autoagregativa de la cepa 133 crecida en TPY con diferentes propiedades biológicas (adhesión a células en cultivo, resistencia a bilis y pH ácido, etc). La correlación entre autoaglutinación y adherencia a enterocitos en cultivo está ampliamente documentada en bifidobacterias (Pérez et al, 1998; Bibiloni et al, 1999). Sin embargo una cepa con capacidad adherente a células epiteliales no garantiza la exclusión de un patógeno intestinal *in vitro* (Bibiloni et al, 1999). Paradójicamente, es frecuente encontrar entre los aislamientos de bacterias probióticas de origen humano, cepas que no adhieren a las monocapas de células intestinales humanas. La existencia de estos fenómenos no invalida los estudios de las propiedades superficiales bacterianas o el uso de

modelos *in vitro* para caracterizar la adhesión u otras propiedades biológicas. Estas aparentes contradicciones indican que no debemos adjudicar a los resultados obtenidos mediante estas técnicas un carácter predictivo absoluto sobre el comportamiento *in vivo* de las cepas probióticas.

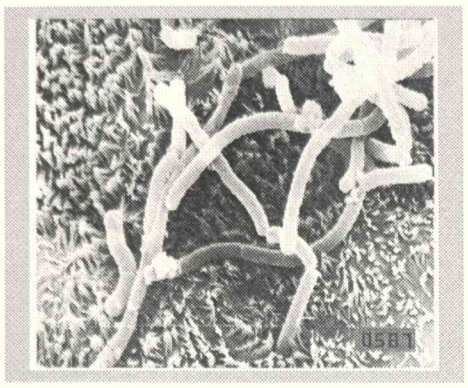
Conclusiones

Propiedades tecnológicas

- La cepa CIDCA 133 mostró una capacidad de acidificación en leche moderada a 37 y con un inóculo estándar.
- El lactobacilo presentó una excelente supervivencia a las condiciones de refrigeración utilizadas para la conservación de productos lácteos.
- La cepa en estudio desarrolló una alta resistencia a los ciclos de congelación-descongelación, especialmente en presencia de crioprotector.
- El lactobacilo presentó propiedades tecnológicas apropiadas para el desarrollo de un producto fermentado lácteo fluído.

Propiedades superficiales

- La cepa CIDCA 133 presentó capacidad autoagregante cuando fue crecida en TPY, mientras que se mostró como no aglutinante cuando fue cultivada en MRS.
- La propiedad autoaglutinante del lactobacilo en TPY puede explicarse parcialmente en función de la hidrofobicidad superficial moderada que desarrolló la cepa en este medio.
- El lactobacilo en estudio mostró cargas superficiales compatibles con la capacidad autoagregante tanto para el medio TPY como en MRS.
- La propiedad autoagregante de la cepa CIDCA 133 en TPY obedece en parte a las propiedades superficiales estudiadas aunque no pueden descartarse la intervención de otros factores.



CAPÍTULO II

Características de competitividad de la cepa CIDCA 133 en el tracto gastrointestinal

CAPÍTULO II

Actualmente son numerosos los criterios considerados para la selección de cepas probióticas (ver introducción general). Una de las condiciones más importantes que deben presentar las cepas es una adecuada competitividad *in vivo*. Se entiende por competitividad de una cepa probiótica, la capacidad de sobrevivir, proliferar y desarrollar su actividad metabólica a nivel intestinal. Las características *in vitro* tradicionalmente evaluadas con el objetivo de intentar extrapolar estas capacidades *in vivo* incluyen las determinaciones de resistencia a la bilis, tolerancia a la acidez estomacal simulada y la asociación bacteriana a células u órganos en cultivo.

El primer ámbito francamente adverso que deben enfrentar los microorganismos al ingresar al tracto gastrointestinal es el estómago. El ácido clorhídrico producido por las células parietales del estómago en respuesta a la ingestión de alimentos, genera un pH fuertemente ácido (alrededor de 2.5) a nivel estomacal (Blaser et al, 1995). La extremada acidez producida es esencialmente bactericida para numerosos gérmenes Gram positivos y negativos, a excepción de aquellos especialmente adaptados (ej. *Helicobacter pylori*).

A nivel intestinal la supervivencia de los microorganismos se ve amenazada por la abundante actividad enzimática y la presencia de bilis. La bilis es un producto de secreción hepática compuesto principalmente por ácidos biliares conjugados (65-70%), fosfatidilcolina (20%), colesterol (3-5%) y bilirrubina (0.5%). Los ácidos biliares cólico y quenodesoxicólico son conjugados con glicina y taurina formando las sales biliares con

función emulsificante sobre los lípidos. Estas sales biliares son liberadas al duodeno desde la vesícula biliar y luego de transitar por el intestino delgado son deconjugadas por acción bacteriana a ácido deoxicólico y litocólico (Blaser et al, 1995). *In vitro* los ácidos biliares deconjugados quenodesoxicólico, cólico y deoxicólico, inhiben a numerosos microorganismos como *Clostridium*, *Bacteroides*, *Enterococcus* y *Lactobacillus*, no afectando a los gérmenes entéricos anaerobios facultativos. Las sales biliares conjugadas no presentan esta propiedad inhibitoria (Blaser et al, 1995).

Si bien la bilis y el ácido clorhídrico constituyen probablemente los agentes más poderosos en cuanto a su acción germicida existen, sin embargo, otros factores capaces de amenazar la supervivencia, permanencia y/o adhesión de los microorganismos (de nuestro particular interés las bacterias probióticas) a nivel gastrointestinal. Estos factores pertenecen a los mecanismos de defensa innata de la barrera gastrointestinal. Entre ellos se incluyen factores mecánicos (motilidad y flujo, descamación de células epiteliales, secreción de mucus), químicos (enzimas digestivas, lisozima, péptidos catiónicos antimicrobianos) y microbiológicos (microbiota intestinal residente) (Otte et al, 2003). La interacción de estos agentes de la inmunidad innata con los microorganismos, en especial con las bacterias probióticas, no ha sido extensamente explorada. Una de las posibles causas obedece a que muchos de estos factores son difíciles de simular *in vitro* (por ejemplo flujo intestinal). Entre los tópicos poco explorados de esta temática se encuentra la relación entre los péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs) y las bacterias lácticas. Los péptidos catiónicos antimicrobianos son proteínas de bajo peso molecular, con fuerte carga positiva a pH neutro y amplio espectro inhibitorio antimicrobiano (Felgentreff et al, 2006). Estas sustancias son producidas a nivel intestinal por las células circulantes y las células epiteliales. Los CAMPs más importantes humanos son las defensinas y las catelicidinas.

Características de los péptidos catiónicos antimicrobianos.

Defensinas: Las defensinas son pequeños péptidos catiónicos (3.5 a 4.5 KDa), ricos en arginina, que contienen de seis a ocho residuos de cisteína, los cuales conforman tres o cuatro puentes disulfuro. Las defensinas se clasifican en tres familias de acuerdo a su origen (defensinas vegetales, defensinas de insectos y defensinas presentes en vertebrados). Basándose en el número y patrón de los puentes disulfuro las defensinas de vertebrados se dividen, a su vez, en tres subfamilias α, β y θ (Yang et al 2000). Las defensinas θ, contienen un sólo miembro identificado, la minidefensina RTD-1, presente en leucocitos de primates (Tang et al, 1999). Son moléculas cíclicas, derivadas de una α

defensina mutada, con seis residuos de cisteína que ligan los carbonos C1-C6; C2-C5 y C3-C7 (Yang et al, 2000). Las α y β defensinas poseen estructuras terciarias similares formadas por tres hojas β plegadas antiparalelas. Las α defensinas poseen 29-35 residuos de aminoácidos, sus puentes disulfuro ligan los átomos de carbono C1-C6; C2-C5 y C3-C7. Las β defensinas poseen 38 a 42 residuos de aminoácidos mientras que los puentes disulfuro ligan los carbonos C1-C5; C2-C4 y C3-C6 (Nisen-Meyer y Nes, 1997). En los mamíferos se han identificado más de 50 defensinas. Las α defensinas se producen y almacenan en los gránulos de los neutrófilos, monocitos-macrófagos o células de Paneth. Las β defensinas son generadas y liberadas por queratinocitos o células epiteliales mucosas de los sistemas respiratorio, digestivo, y genitourinario (Yang et al, 2000). En los humanos se han identificado seis α defensinas las cuales se denominan HNP (péptidos neutrófilos humanos) 1-4 si se encuentran presentes en los en los gránulos de los fagocitos y HD (defensinas humanas) 5-6 si se hallan en los gránulos de las células de Paneth. Por otra parte, existen tres β defensinas humanas producidas por los queratinocitos y distintas células epiteliales mucosas denominadas hβD (β defensinas humanas) 1-3 (Yang et al, 2000). Recientemente Conejo García y colaboradores (Conejo García et al, 2001), describieron el hallazgo de una cuarta β defensina utilizando análisis genómico.

La función más destacada de las defensinas es su actividad antimicrobiana frente a un amplio rango de bacterias Gram positivas y negativas, hongos y algunos virus envueltos (Nisen-Meyer y Nes, 1997). Las defensinas actúan en concentraciones micromolares y generalmente en condiciones de baja concentración salina (excepto la β defensina humana 3) (Harder et al, 2001). Dos modelos explican la actividad antimicrobiana de las defensinas. Uno de ellos postula la formación de poros multiméricos en las membranas, mientras que el otro describe la actividad de las defensinas en términos de interacciones no específicas entre las membranas microbianas cargadas negativamente y las cargas positivas de los péptidos (Hoover et al, 2001). Además de la función antimicrobiana, las defensinas expresan otras numerosas actividades; entre ellas aumentar la capacidad fagocítica de los macrófagos, inducir la expresión de interleuquina 8 (IL-8) y presentar quimiotaxis frente a los linfocitos T (Yang et al, 2000).

De nuestro particular interés son las defensinas que se expresan en el tracto gastrointestinal. Estas incluyen las α defensinas producidas por las células de Paneth (HD-5 y 6) y las β defensinas 1 y 2 (hβD-1y hβD-2). Las β defensinas presentan una expresión bastante extendida lo largo del tracto gastrointestinal en contraste con la alta expresión de las α defensinas concentrada fundamentalmente en el intestino delgado. La hβD-1 se

expresa en forma relativamente constante en todo el tracto gastrointestinal y permanece estable en condiciones de inflamación o ataque microbiano (Otte et al, 2003). La hβD-2, también se encuentra ampliamente distribuída en el tracto gastrointestinal pero su expresión es inducida por el contacto con microbios, LPS o citoquinas proinflamatorias como IL-1 y TNF (Yang et al, 2000).

Catelicidinas Las catelicidinas constituyen otra familia de péptidos antimicrobianos presente en los mamíferos (Otte et al, 2003). Son péptidos lineales sin puentes disulfuro; conteniendo un dominio catelina (inhibidor de L-catepsina) altamente conservado de función desconocida y un dominio C-terminal más variable de función antimicrobiana. Entre las distintas especies de mamíferos se han identificado aproximadamente 30 miembros de la familia de las catelicidinas. Sin embargo, el hombre produce una sola, la catelicidina denominada hCAP18. A fin de cumplir su función, el dominio C-terminal de las catelicidinas es clivado por proteasas específicas. Por ejemplo la hCAP18 es clivada por la elastasa de los neutrófilos para liberar el dominio antimicrobiano denominado LL-37 (la denominación LL-37 surge a partir de la composición del péptido, el cual comienza con dos residuos de leucina y contiene 37 aminoácidos). Las catelicidinas son primariamente almacenadas en los gránulos de los neutrófilos, liberándose luego de la activación de los mismos. Sin embargo hCAP18/LL-37 se expresa también en las células epiteliales, monocitos, células NK, linfocitos B y linfocitos Tγδ. El dominio C-terminal de las catelicidinas es microbicida frente a un amplio espectro de microorganismos incluyendo bacterias y hongos. Al igual que las defensinas, las catelicidinas también cumplen otras múltiples funciones como unirse y neutralizar el LPS bacteriano, ser quimiotácticas para fagocitos y linfocitos T, además de contribuir a la degranulación de los mastocitos (Yang et al, 2000).

En el presente capítulo se analizarán distintos aspectos inherentes a la competitividad de la cepa 133 a nivel intestinal. En primer lugar, se evaluará la tolerancia del lactobacilo a la acidez estomacal simulada y la resistencia a la bilis. Estas propiedades constituyen dos, de las tres capacidades clásicamente estudiadas en una cepa potencialmente probiótica, con el objetivo de inferir su comportamiento *in vivo*. La tercera característica tradicionalmente evaluada en este tipo de análisis es la adhesión a células epiteliales en cultivo. El estudio de la adhesión del lactobacilo a cultivos de enterocitos humanos, se reservará en este trabajo de tesis hasta el capítulo 3. En el presente capítulo se evaluarán además, factores no tradicionales determinantes del perfil de competitividad de una cepa probiótica, como es la interacción con los CAMPs.

Metodología.

Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.

Las bacterias con potencialidad probiótica empleadas fueron: *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* cepa CIDCA 133, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *delbrueckii* cepa LBB, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* cepa LBR, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* (CIDCA 83114), *Bifidobacterium bifidum* (CIDCA 5310) y *Bifidobacterium breve* (CIDCA 5314) pertenecientes a la colección del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP); junto con *Lactobacillus reuteri*, NCC 2458 y *Bifidobacterium sp.*, NCC 585 pertenecientes a la colección de cultivos de Nestlé (Nestlé, Lausanne Suiza). Además se utilizaron distintas cepas de microorganismos Gram positivos y negativos a saber: *E. coli* CM1, *Bacillus cereus* M2, *E. coli* EPEC, *Salmonella* no *typhi*, *Salmonella arizonae* y *Shigella flexneri*. *E. coli* CM1 y *Bacillus cereus* M2 pertenecen a la colección de la cátedra de Microbiología General de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP). *E. coli* EPEC, *Salmonella* no *typhi*, *Salmonella arizonae* y *Shigella flexneri* fueron cedidas gentilmente por el Dr. Horacio Lopardo del Hospital de Pediatría SAMIC. Prof. Dr. Juan P. Garraham.

Los cultivos stock de las cepas se mantuvieron a -80ºC y cada microorganismo fue reactivado dos veces en medio líquido antes de la realización de los experimentos. Las bacterias probióticas fueron crecidas en condiciones anaeróbicas en medio MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) o TPY con 0.5% de cisteína a 37ºC durante 16 h. Las bacterias no BAL fueron crecidas sin agitación en medio nutritivo conteniendo extracto de carne (3 g/l) y peptona de carne (5 g/l). La incubación se realizó durante 16 h a 37ºC.

Determinación de resistencia a la bilis.

Cultivos de 16 h del lactobacilo en caldo TPY o MRS fueron centrifugados a 3000 g durante 10 min. Posteriormente el pellet bacteriano obtenido fue resuspendido en igual volumen de medio. El shock de bilis se realizó añadiendo a la suspensión bacteriana una concentración final de 0.5% de bilis de buey (Merck, Darmstadt, Alemania) esterilizada por filtración. La incubación de las muestras se realizó a 37ºC. A diferentes intervalos de tiempo se determinó el número de bacterias sobrevivientes por recuento de microorganismos viables en agar MRS. Para el caso de los lactobacilos crecidos en leche, se utilizaron cultivos de 16 h de la cepa 133, encontrándose la leche a ese tiempo en estado coagulado. La bilis fue añadida directamente sobre el cultivo previa disgregación del coágulo. El número de bacterias sobrevivientes se cuantificó como se describe anteriormente.

Determinación de resistencia al ácido.

Los cultivos del lactobacilo en medio TPY y MRS fueron procesados de la misma manera que en el ensayo anterior. El shock ácido se realizó añadiendo HCl 10% sobre las suspensiones de microorganismos hasta alcanzar un pH de 2.5. Las muestras se incubaron a 37ºC y a diferentes intervalos de tiempo se determinó el número de bacterias sobrevivientes mediante recuento de microorganismos viables. En el caso de los lactobacilos crecidos en leche se añadió el ácido clorhídrico directamente sobre el cultivo de leche coagulada, previa homogenización del coágulo.

Obtención de la fracción citosólica de células Caco-2.

La línea celular utilizada (Caco-2) está constituída por células epiteliales de intestino humano, provenientes de un adenocarcinoma colónico (Fogh et al, 1977). La línea fue provista por el Centre de Recherche Nestlé (Lausanne, Suiza).

Los stock de células se mantuvieron en N_2 líquido con dimetilsulfóxido al 10% como crioprotector. Las células se sembraron en botellas de 25 cm^3 (Greiner Bio One) en una concentración de 2 10^5 células/ml y luego en botellas de 75 cm^2 con el objetivo de obtener la mayor masa celular posible. Las botellas se incubaron a 37ºC en una estufa (Forma Scientific, Ohio. USA) que provee una atmósfera húmeda enriquecida en 5% de CO_2. Las células se crecieron en medio DMEM (Gibco, Life Technologies, Rockville MD, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser, Argentina), 1% de aminoácidos no esenciales y antibióticos. El medio se recambió cada dos días. Se utilizaron monocapas confluentes y diferenciadas de 15 días de incubación.

La fracción citosólica se obtuvo según la técnica de Pinto y colaboradores (Pinto et al, 1983), utilizada para la purificación parcial de membranas del ribete en cepillo. Las células fueron colectadas y lavadas 3 veces con buffer PBS helado. Luego se las resuspendió en buffer Tris-manitol (2 mM Tris, 50 mM manitol, pH 7.1) para disgregarlas con un sonicador de punta (MSE, Londres, Inglaterra) en baño de hielo-agua. Posteriormente se añadió $CaCl_2$ (10 mM concentración final), incubando la suspensión a 4ºC durante 10 min. El lisado celular fue centrifugado a 4ºC con una fuerza de 950 g por 10 min. El sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 4ºC con una fuerza de 33.500 g durante 30 min. El pellet obtenido contiene las membranas del ribete en cepillo y el sobrenadante constituye la fracción citosólica.

Obtención del extracto catiónico de células Caco-2.

Se realizó una extracción en batch sobre la fracción citosólica de células Caco-2 según el protocolo de Porter y colaboradores (Porter et al, 1993). La fracción citosólica fue mezclada con una resina de intercambio catiónico débil (CM-Macro-Prep, Bio-Rad Laboratorios, California. USA) a razón 1:200. El sistema resina-muestra se equilibró durante toda la noche a 4ºC con agitación. Posteriormente, la matriz se lavó 3 veces durante 5 min con buffer fosfato de sodio (10 mM) a temperatura ambiente. Los cationes adsorbidos se eluyeron en dos lavados con ácido acético. El primero se realizó durante una hora con una concentración de ácido al 10%. El segundo lavado se efectuó durante toda la noche con una concentración de acético del 5%. Ambos lavados se realizaron a 4ºC con agitación. Los extractos fueron conservados a -20ºC hasta su utilización.

Inhibición en medio sólido de bacterias por extractos celulares.

Los ensayos de inhibición en medio sólido se realizaron utilizando como matriz gelificante agarosa al 1%. Este polímero forma un gel termorreversible con una carga negativa menor que el agar, lo cual favorece la difusión de sustancias catiónicas. El medio nutritivo empleado fue caldo nutritivo para las bacterias no ácido lácticas o caldo MRS para las BAL. Los extractos celulares se sembraron sobre el medio solidificado en orificios preformados con sacabocado estéril, a razón de 10 μl por holluelo. Las cepas se sembraron en superficie mediante hisopado, desde un cultivo de 16 h. La incubación se realizó durante 16 h a 37ºC en aero o anaerobiosis según fuese necesario.

Cinética de inhibición en medio líquido por extractos celulares o defensinas.

En los ensayos de inhibición en medio líquido se utilizó como medio de cultivo caldo nutritivo para las bacterias no ácido lácticas o caldo MRS para las BAL. Las bacterias se incubaron a 37ºC en baño termostatizado. El inóculo inicial para todas las cepas fue de 1 10^5 ufc/ml. La evaluación del crecimiento se realizó por recuento de microorganismos viables o mediante el incremento de absorbancia a DO 600 nm medida en espectofotómetro (Beckman,). La cantidad de extracto celular empleada se calculó, para cada microorganismo, en base al diámetro de inhibición obtenido en los ensayos realizados en medio sólido. En el caso de las β defensinas comerciales se empleó una concentración de 2.5 μg/ml.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para estudiar el perfil de proteínas de la fracción citosólica y los extractos catiónicos celulares, se realizaron corridas electroforéticas desnaturalizantes-disociantes en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) según la técnica descripta por Laemli (Laemli, 1970). Se prepararon geles espaciadores de acrilamida-bis-acrilamida (solución 30.8 p/v), al 15% junto con geles apiladores al 4%.Para conocer la composición de las soluciones de electroforesis ver apéndice. Las muestras se diluyeron con buffer de muestra a razón 1:1 y se calentaron a baño de María durante 5 min. Antes de la siembra, las muestras se centrifugaron durante 2 min a 12.000 g con el objeto de eliminar impurezas insolubles. Las corridas se realizaron a temperatura ambiente con una corriente constante de 20 mA por placa hasta que las muestras penetran en el gel espaciador y luego a 30 mA por placa hasta que el colorante azul de bromofenol alcanza el final del gel.

Electroforesis en geles ácidos con urea (AU-PAGE).

Se empleó la técnica descripta por Harwig y colaboradores (Harwig et al, 1993). Se utilizaron geles al 15% de acrilamida-bis-acrilamida (solución 30.8 p/v) sin gel apilador. Los geles contuvieron además urea, en una concentración 5M y ácido acético al 5%. Los catalizadores utilizados fueron TEMED (0.46% v/v) y persulfato de amonio (0.17% p/v). Las muestras se disolvieron en relación 1:1 en buffer de muestra (ácido acético 5%, urea 3M y verde de metilo 0.01%). El buffer de corrida fue ácido acético al 5%. Se realizó una precorrida de 60 min a 150V, manteniéndose las condiciones cuando se colocaron las muestras. Las corridas se efectuaron con polaridad inversa. La tinción se efectuó con Coomasie-R, al igual que en los geles de SDS-PAGE.

Análisis estadístico.

Las medias fueron comparadas a través de la prueba de dos colas del test de Student's utilizando el software de InfoStat (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Resultados y discusión.

Evaluación de los aspectos tradicionales relacionados con la competitividad en el medio intestinal de la cepa 133.

a) Resistencia a la acción de la bilis.

Los resultados demostraron una muy buena tolerancia a la acción de la bilis por parte de la cepa 133 (tabla 1)

Tabla 1. Resistencia a la bilis de la cepa 133 crecida en MRS, TPY y leche. Los resultados se expresan en porcentajes de supervivencia. La determinación se realizó mediante recuento de microorganismos viables. La concentración de bilis empleada fue del 0.5%. La leche fue adicionada con 1% de extracto de levadura, al momento del ensayo estaba coagulada. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en test t de Student.

Tiempo de incubación	Cepa 133 cultivada en MRS	Cepa 133 cultivada en TPY	Cepa 133 cultivada en leche
30 min	94.26 ± 8.11^{b}	61.03 ± 6.24^{a}	100 ± 7.10^{b}
60 min	77.66 ± 7.54^{a}	68.5 ± 1.91^{a}	100 ± 20.00^{a}

La supervivencia del lactobacilo fue superior al 60% en todas las condiciones ensayadas. A los 30 minutos de incubación con la solución de bilis, los lactobacilos crecidos en leche coagulada o MRS mostraron una supervivencia mayor (97.13% en promedio) respecto a aquellos cultivados en TPY (61%). Sin embargo estas diferencias desaparecen a los 60 minutos de incubación donde todas las condiciones obtuvieron un porcentaje de supervivencia semejante (82% en promedio).

La alta tolerancia a la bilis demostrada por la cepa 133 está de acuerdo a los resultados encontrados por Kociubinski y colaboradores (Kociubinski et al, 1999), los cuales asignaron el puntaje máximo a este lactobacilo en cuanto a índice de resistencia a la bilis. Esta resistencia no es atribuíble a la capacidad de deconjugar sales biliares por parte del lactobacilo ya que no forma cristales de precipitación conteniendo colesterol (Kociubinski et al, 1999). De todas maneras la hipótesis que relaciona la tolerancia a la bilis con la expresión de actividad hidrolasa de las sales biliares por bifidobacterias y lactobacilos ha sido varias veces refutada (Tannock et al, 1989; Moser y Savage, 2001). No está claro aún para los lactobacilos el/los mecanismos involucrados en la resistencia a la bilis. En *Vibrio cholerae* se ha encontrado que la acción de bombas de eflujo (Bina et al, 2006) o la formación de biofilms por exopolisacárido bacteriano (Hung et al, 2006) protegen a este microorganismo de las sales biliares. En *Bifidobacterium animalis* se

registró un aumento de la actividad ATP sintetasa en cepas resistentes a la bilis; con el consecuente incremento de la reserva de ATP y la disminución del pH intracelular (Sánchez et al, 2006). Sin embargo no está claro el mecanismo que relaciona ambos fenómenos para este microorganismo. Cabría la posibilidad de la intervención de estos u otros mecanismos para el caso de las bacterias ácido lácticas.

b) Resistencia a las condiciones ácidas generadas por el ácido clorhídrico.

En contraste con la buena tolerancia a la bilis de la cepa 133, la resistencia a la acidez generada por el ácido clorhídrico no fue tan elevada (tabla 2).

Tabla 2. Resistencia al ácido clorhídrico de la cepa 133 crecida en MRS, TPY y leche. Los resultados se expresan en porcentajes de supervivencia. La determinación se realizó mediante recuento de microorganismos viables El pH empleado fue de 2.5. La leche fue adicionada con 1% de extracto de levadura, al momento del ensayo estaba coagulada. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en test t de Student.

Tiempo de incubación	Cepa 133 cultivada en MRS	Cepa 133 cultivada en TPY	Cepa 133 cultivada en leche
15 min	4.00 ± 0.80^{a}	$0.03 \pm 7.07\ 10^{-4b}$	55.55 ± 4.19^{c}
30 min	$\leq 10^{-5d}$	$\leq 10^{-5d}$	38.15 ± 20.00^{e}

Los lactobacilos crecidos en MRS o TPY se mostraron extremadamente sensibles a la acidez. A los 30 minutos de contacto con el ácido la supervivencia en ambos medios cayó por debajo de $1\ 10^{-5}$%. Es de destacar sin embargo que a tiempos cortos los lactobacilos crecidos en MRS resultaron 130 veces más resistentes al ácido que aquellos crecidos en TPY. Como se observa en la tabla 2, a los 15 minutos de incubación los lactobacilos arrojaron una supervivencia del 4% en el medio MRS y 0.03% en TPY. Los lactobacilos crecidos en leche tuvieron una supervivencia del 55.5% a los 15 minutos de contacto con el medio ácido y una supervivencia del 38.1% a los 30 minutos. Evidentemente, el medio que brindó mayor protección a la cepa fue la leche coagulada.

La baja tolerancia a las condiciones ácidas extremas de la cepa 133, es en realidad una característica bastante habitual entre los lactobacilos. De Angelis y colaboradores (De Angelis et al, 2006) solamente encontraron dos cepas de lactobacilos altamente resistentes al ácido, entre 35 aislamientos de materia fecal porcina. Las bacterias sobrevivientes de estas cepas (*L. reuteri* 3S7 y *L. mucosae* 1.1R) sufrieron sólo un descenso logarítmico, luego del tratamiento con HCl (90 min a pH 2); mientras que el resto de las cepas disminuyeron el número de bacterias viables entre 5 y 6 unidades logarítmicas. Resultados semejantes obtuvieron Succi y colaboradores (Succi et al; 2005)

hallando sólo 3 cepas de lactobacilos resistentes al ácido clorhídrico de entre 63 aislamientos de queso.

Considerando que el tiempo de permanencia de los alimentos en el estómago es de 2 a 3 h la escasa resistencia a las condiciones ácidas de la cepa 133 proveniente de medios de cultivo pareciera hacer inviable su uso mediante administración oral. La situación cambia cuando el lactobacilo es crecido en leche, donde la supervivencia los 30 minutos aumenta más de un millón de veces respecto a aquellos microorganismos crecidos en medio de cultivo. Aún así la ácido-tolerancia del lactobacilo en leche dista de ser es óptima, comparada con las cepas altamente resistentes (De Angelis et al, 2006). Sin embargo podemos especular que en el bolo alimenticio existen muchas sustancias que podrían proteger a los lactobacilos. Este hecho sumado a la mayor resistencia del lactobacilo en la leche coagulada, hacen posible pensar la administración de la cepa en un producto fermentado. A fin de suplir la sensibilidad a la acidez gástrica de la cepa, habría que incrementar en el producto fermentado, el número de microorganismos viables. Otras opciones de utilización de la cepa, implicarían su administración en forma recubierta tanto para un producto fermentado (mediante micropartículas) como en un producto farmacéutico.

Evaluación de los aspectos no tradicionales relacionados con la competitividad en el medio intestinal de la cepa 133. Interacción con los péptidos catiónicos.

En una primera aproximación al estudio comparado del comportamiento de la cepa CIDCA 133 frente a los metabolitos intestinales antimicrobianos, se realizaron ensayos de inhibición en placa enfrentando fracciones semipurificadas de membrana y citosólicas de células Caco-2 contra distintos gérmenes Gram positivos y negativos (figura 1). Utilizando la técnica descripta por Pinto y colaboradores (Pinto et al, 1983) se obtuvieron mediante sonicación intensa y ultracentrifugación dos fracciones subcelulares. La primera corresponde a una fracción de membrana enriquecida en las microvellosidades del ribete en cepillo; la segunda es una fracción citosólica que incluye el contenido de la totalidad de las organelas subcelulares. La comparación de los diámetros de los halos de inhibición reveló por un lado la existencia de distintas susceptibilidades entre las cepas ensayadas y por otro lado, una mayor actividad antimicrobiana en la fracción citosólica (figura 1A y B)

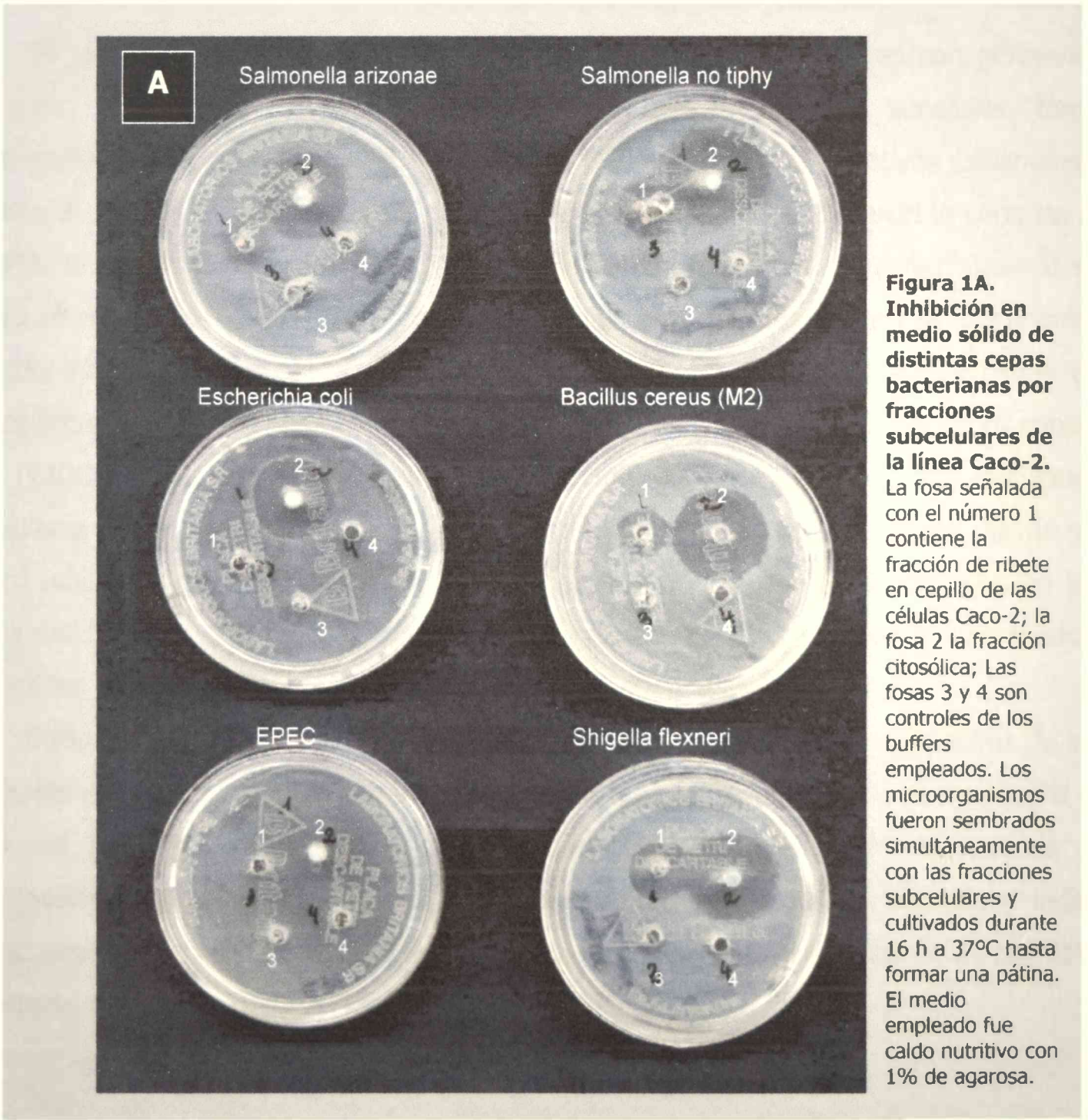


Figura 1A. Inhibición en medio sólido de distintas cepas bacterianas por fracciones subcelulares de la línea Caco-2. La fosa señalada con el número 1 contiene la fracción de ribete en cepillo de las células Caco-2; la fosa 2 la fracción citosólica; Las fosas 3 y 4 son controles de los buffers empleados. Los microorganismos fueron sembrados simultáneamente con las fracciones subcelulares y cultivados durante 16 h a 37°C hasta formar una pátina. El medio empleado fue caldo nutritivo con 1% de agarosa.

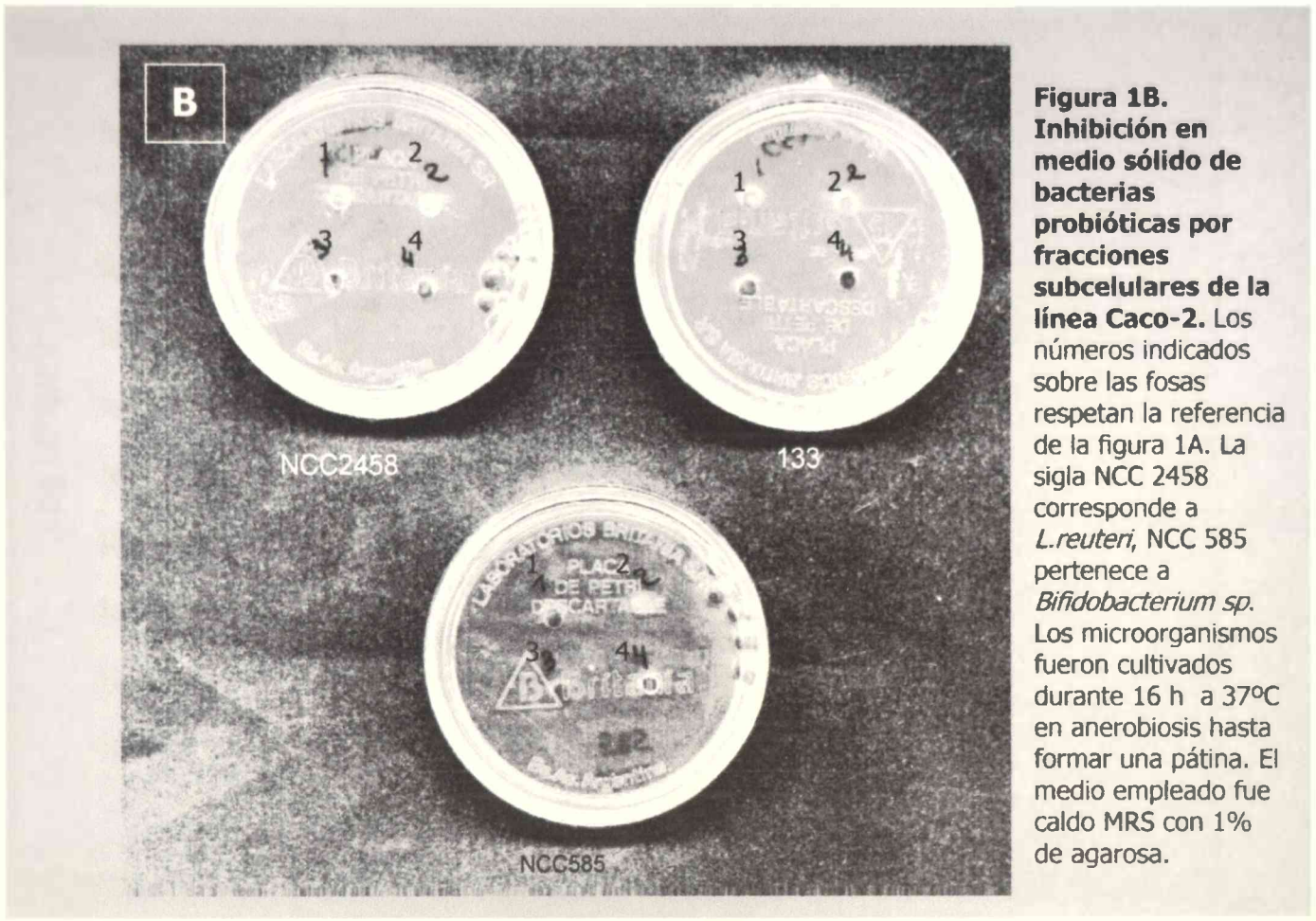


Figura 1B. Inhibición en medio sólido de bacterias probióticas por fracciones subcelulares de la línea Caco-2. Los números indicados sobre las fosas respetan la referencia de la figura 1A. La sigla NCC 2458 corresponde a *L.reuteri*, NCC 585 pertenece a *Bifidobacterium sp.* Los microorganismos fueron cultivados durante 16 h a 37ºC en anerobiosis hasta formar una pátina. El medio empleado fue caldo MRS con 1% de agarosa.

Se observó que cuando se enfrentaron las fracciones subcelulares con gérmenes patógenos o potencialmente patógenos (figura 1A) resultaron sensibles tanto microorganismos Gram positivos (*Bacillus cereus* M2), como Gram negativos (*Salmonella arizonae*, *E. coli* CM1, *Salmonella* no *typhi* y *Shigella flexneri*). Sin embargo la cepa de *E. coli* EPEC ensayada fue resistente a la acción de ambas fracciones celulares. Cuando se efectuó el ensayo en presencia de cepas potencialmente probióticas, no se observaron halos de inhibición de crecimiento alrededor de las fosas. Por lo tanto, las cepas de *Lactobacillus reuteri* (NCC 585), *Bifidobacterium sp* (NCC 2458) y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (CIDCA 133) fueron resistentes a la acción antimicrobiana de las fracciones subcelulares de la línea Caco-2. Es importante destacar que en los casos donde se registró inhibición del crecimiento del microorganismo, los halos fueron mayores en los medios solidificados con agarosa (geles con menor carga negativa) que en los medios solidificados con agar.

Dado que la mayor actividad inhibitoria se encontró en la fracción citosólica de las células, los ensayos subsiguientes se realizaron con esta fracción. A fin de comprobar si el efecto de la fracción citosólica celular correspondía a una acción bactericida o bacteriostática y para evaluar el desarrollo de la interacción entre la bacteria y la/las sustancias presentes en la fracción; se realizó una cinética de crecimiento de *E. coli* CM1 en contacto con dicha fracción (figura 2).

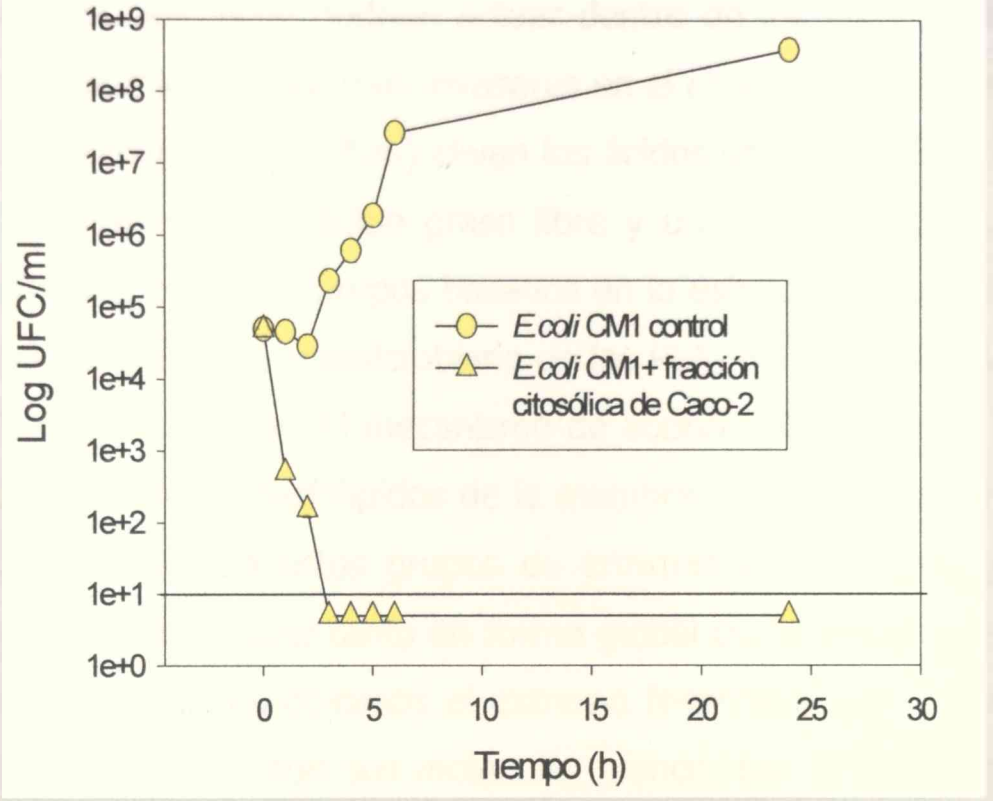


Figura 2. Cinética de crecimiento de *E. coli* CM1 en presencia de la fracción citosólica de células Caco-2. *E. coli* CM1 se creció en caldo nutritivo a 37ºC sin agitación. El inóculo inicial de la enterobacteria fue de 5 10^4 ufc/ml. La cuantificación se realizó mediante recuento de microorganismos viables. La línea horizontal sobre el eje y indica el límite de detección del método (10 ufc/ml).

Se observó que el efecto de la fracción citosólica de Caco-2 sobre *E. coli* CM1 fue fuertemente bactericida. A partir de un inóculo inicial de 4 10^4 ufc/ml la acción inhibitoria de la fracción disminuyó el número de microorganismos viables en tres unidades logarítmicas al cabo de 3 horas.

Algunos datos experimentales preliminares hicieron sospechar que posiblemente la sustancia responsable de la inhibición en la fracción citosólica, fuera de una naturaleza proteica particular. El amplio espectro antimicrobiano, junto con el hecho de que los halos de inhibición tuvieran mayor diámetro en medios solidificados con agarosa, respecto a aquellos conteniendo agar, llevaron a pensar en la posible acción de algún péptido antimicrobiano intestinal de naturaleza catiónica. Los principales péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs) que podrían hallarse presentes en la fracción son las defensinas y catelicidinas. La característica más destacada de estas sustancias es su bajo peso molecular y la fuerte carga positiva que exhiben a pH neutro (Felgentreff et al, 2006). Otras proteínas catiónicas con actividad antimicrobiana que podrían encontrarse en la fracción citosólica de las células epiteliales colónicas serían las histonas y la fosfolipasa II (PLA_2) (Tollin et al, 2003).

Las histonas son proteínas catiónicas (10-20 kDa), cuyo rol primario es contribuir al empaquetamiento del ADN eucariótico. Además de encontrarse en el núcleo celular, estas proteínas, especialmente las histonas H_1, se encuentran presentes en el citoplasma de los enterocitos (Rose et al, 1998). Poseen actividad antimicrobiana contra gérmenes

Gram positivos y negativos. En cuanto a su función, serían liberadas al lumen intestinal a partir de las células epiteliales apoptóticas exfoliadas, cumpliendo así su acción antimicrobiana. Asimismo podrían actuar dentro de los enterocitos una vez producida la penetración de microorganismos invasores en el citoplasma (Rose et al, 1998).

Las fosfolipasas A_2 (PLA_2) clivan los ácidos grasos desde la posición del C-2 de los fosfolípidos, liberando un ácido graso libre y un lisofosfolípido. Las fosfolipasas A_2 han sido clasificadas en varios grupos basados en la estructura molecular de la enzima. Se ha demostrado la actividad antimicrobiana de las PLA_2 del grupo II y V, especialmente contra gérmenes Gram positivos. El mecanismo de acción antibacteriano propuesto se debe a la descomposición de los fosfolípidos de la membrana plasmática (Grönroos et al, 2001). La actividad inhibitoria en estos grupos de enzimas está directamente relacionada con la basicidad de las moléculas tanto en forma global como localmente. En especial una serie de aminoácidos básicos cercanos al extremo N-terminal son esenciales para la unión de las PLA_2 grupo II y V con sus moléculas blanco. Las PLA_2 de los restantes grupos que difieren en la composición y disposición aminoacídica, son prácticamente inactivas contra las bacterias (Weiss et al, 1991). Las PLA_2 de los grupos II y V, constituyen un subtipo de PLA secretorias de bajo peso molecular (14 kDa). Su expresión es abundante en las células del epitelio intestinal y en las lágrimas (Grönroos et al, 2001). Es interesante destacar para el presente trabajo de tesis, donde se emplean células derivadas de un carcinoma colónico humano; que el 50% de los cánceres de colon y las líneas celulares derivados de ellos sobreexpresan las enzimas PLA_2 (Panel et al, 2006).

Algunos de los péptidos mencionados son sensibles a la concentración salina. Las defensinas en general son más activas a bajas concentraciones salinas (excepto $h\beta D_3$), mientras que la catelicidina humana LL-37 es estabilizada por la sal (Tollin et al, 2003). La actividad antimicrobiana de las PLA_2 no se ve afectada por la presencia o ausencia de un medio salino isotónico (Grönroos et al, 2001).

Una evidencia indirecta sobre la posible naturaleza péptido-catiónica de el/los agentes con actividad antimicrobiana en la fracción citosólica se obtuvo al dializar la muestra con una membrana de cutt-off de 1 kDa. Luego del proceso se registró una importante pérdida de actividad de la fracción, lo cual es consistente con la sensibilidad a la concentración salina de alguna de estas sustancias (por ejemplo catelicidina hCAP18/LL-37).

Con el objetivo de poder confirmar la existencia de péptidos de bajo peso molecular en la fracción citosólica celular, se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) o en geles ácidos con urea (AU-

PAGE). Los geles ácidos de poliacrilamida con urea son utilizados por varios autores especialmente para la visualización y purificación de péptidos catiónicos bioactivos (Harwing et al, 1993; Ayabe et al, 2000; Singh et al, 1998; entre otros).

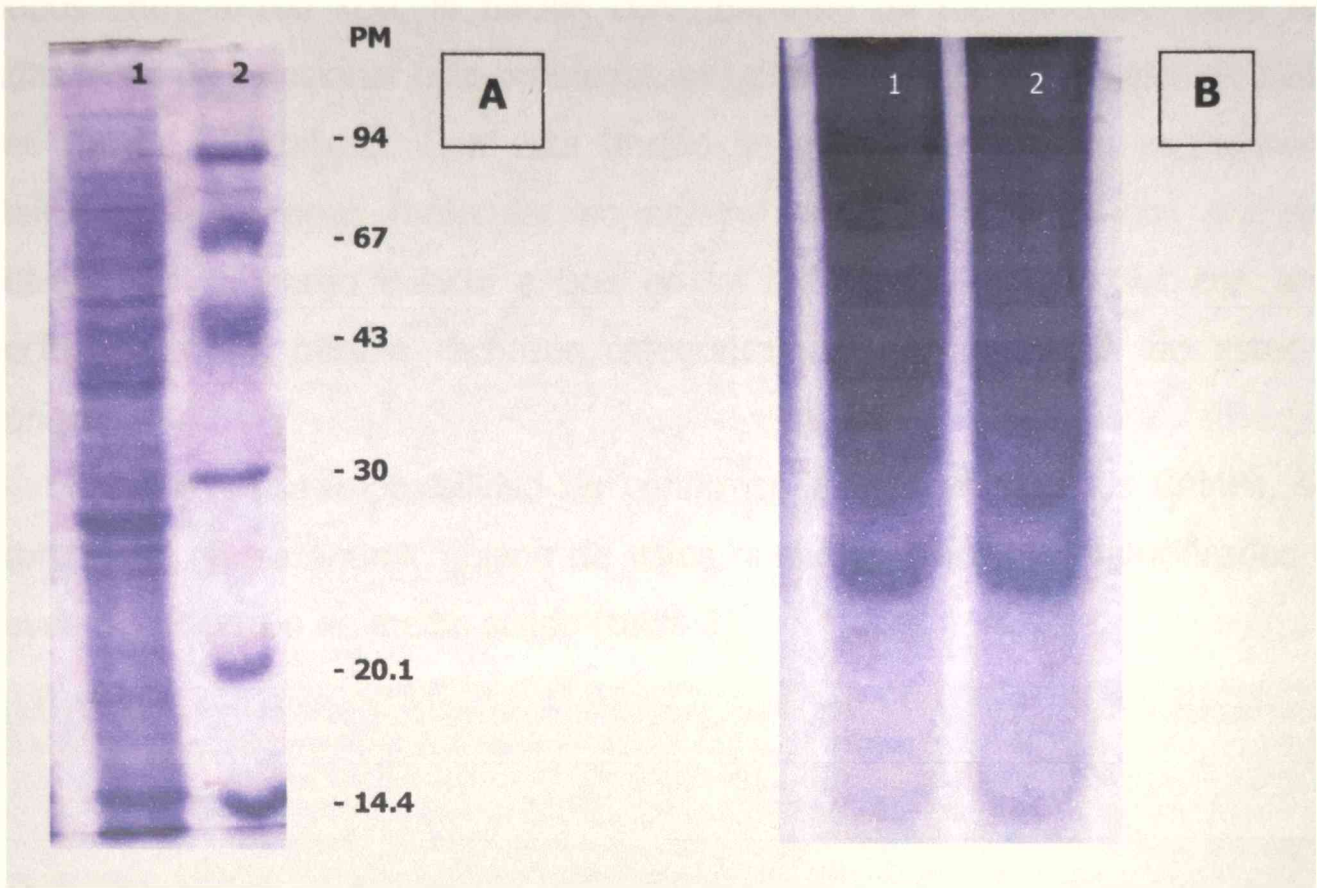


Figura 3. Corridas electroforéticas de la fracción citosólica de células Caco-2. A) Gel de SDS-PAGE. **B)** Gel de AU-PAGE. En la figura 3 A la calle 1 contiene la fracción citosólica celular y la calle 2 el patrón de peso molecular. En la figura 3 B la calle 1 y 2 contienen la fracción citosólica celular. No se colocó patrón de peso molecular en la AU-PAGE, debido a que la separación de las moléculas no es exclusivamente por su peso molecular sino también por su carga.

Las corridas electroforéticas revelaron un complejo patrón de bandas. Los geles efectuados con SDS-PAGE (figura 3A) evidenciaron la existencia de numerosas proteínas en disolución en la fracción citosólica, algunas de alto y otras de bajo peso molecular. Analizando los patrones de bandas puede inferirse la existencia de proteínas de peso molecular menor que 14.4 kDa presentes en el frente de corrida que no llegaron a resolverse. Los geles realizados con AU-PAGE no tuvieron una buena definición de bandas (figura 3B). Dado que en este sistema la separación de las proteínas está relacionada con su carga y su masa, para la identificación final de las moléculas sería necesaria la realización de un western-blot con anticuerpos específicos.

Debido a la complejidad de la muestra y con el objetivo de disminuir el perfil de bandas obtenidos por electroforesis; se decidió realizar una purificación parcial de la fracción. Para ello se realizó una extracción en batch sobre la fracción citosólica, con resinas de intercambio catiónico débil según lo descrito por Porter y colaboradores (Porter et al, 1998). Posteriormente al empleo de las resinas se obtuvieron extractos con una concentración proteica en el rango de 0.16 a 0.37 mg/ml (determinación por Bradford).

Esta concentración estaría en el límite de detección por Coomasie Blue en los geles de SDS-PAGE, si consideramos como mínimo la presencia de 10 ug de proteína por calle. Efectivamente, al realizar geles de tricina/SDS- PAGE especiales para la separación de péptidos entre 1-100 kDa, la tinción con Coomasie no fue suficiente para revelar las bandas. A fin de solucionar este problema, se utilizó una tinción con sales de plata, la cual posee mayor sensibilidad. Con esta tinción se obtuvieron bandas correspondientes a proteínas de alto peso molecular no compatibles con los péptidos antimicrobianos buscados. Sin embargo debido a que no se realizaron western–blot con anticuerpos específicos, no es posible rechazar categóricamente la presencia de estos péptidos catiónicos.

A pesar de la imposibilidad de confirmar la presencia de los CAMPs, se decidió comprobar el efecto antimicrobiano de estos nuevos extractos semipurificados mediante ensayos de inhibición en medio sólido (tabla 3).

Tabla 3. Inhibición en medio sólido de microorganismos Gram (+) y (-) por la fracción citosólica o el extracto catiónico, provenientes de células Caco-2. Los signos indican la intensidad del halo de inhibición, (-) = sin inhibición (0.2 cm diámetro de la fosa), (+) = inhibición leve (0.2 a 0.5 cm), (++) = inhibición moderada (0.6 a 1 cm), (+++) = inhibición fuerte (1.1 a 2 cm), ND no determinado. Los microorganismos fueron sembrados simultáneamente con las fracciones subcelulares y cultivados durante 16 h a 37°C en aerobiosis o anaerobiosis según fuera necesario. El medio empleado fue caldo nutritivo o caldo MRS con 1% de agarosa.

CEPA	Fracción citosólica	Extracto catiónico
E. coli CM1	+++	++
Shigella flexneri	+++	ND
Salmonella arizonae	+++	ND
Bacillus cereus M2	+++	++
Lactobacillus delbrueckii subsp *lactis* (CIDCA 133)	-	-
Lactobacillus delbrueckii subsp *bulgaricus* (cepa LBB)	++	++
Lactobacillus delbrueckii subsp *bulgaricus* (cepa LBR)	-	ND
Lactobacillus acidophilus	-	ND
Lactobacillus plantarum	-	ND
Lactobacillus brevis	-	ND
Bifidobacterium bifidum (CIDCA 5310)	-	ND
Bifidobacterium breve (CIDCA 5314)	-	ND

En las cepas bacterianas donde se ensayó comparativamente el efecto de la fracción citosólica y el extracto catiónico se registró un comportamiento similar, es decir

aquellas cepas que resultaron inhibidas por la fracción citosólica, también lo fueron por el extracto catiónico y viceversa (Tabla 3). Sin embargo, las cepas sensibles a la acción de la fracción citosólica fueron inhibidas con menor intensidad por el extracto catiónico. Esta observación puede significar que el extracto perdió parte de su actividad a consecuencia del procedimiento de extracción en batch, o bien que además de las sustancias catiónicas existen otras, no recuperadas por la resina, con acción inhibitoria. Nuevamente se registró un amplio espectro de actividad antimicrobiana por parte de la fracción citosólica y el extracto catiónico; afectando tanto a microorganismos Gram positivos como Gram negativos. Es importante destacar que durante este ensayo se encontró una cepa de lactobacilo (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, LBB) sensible a la acción inhibitoria de los extractos celulares. Este hallazgo demostró que la resistencia en las BAL observada durante los experimentos anteriores (ver figura 1) no es una propiedad inherente de las mismas.

A fin de profundizar un poco más en el estudio de la inhibición de microorganismos por CAMPs, se decidió comprobar el comportamiento de cepas sensibles o resistentes a los extractos catiónicos celulares frente a dos péptidos antimicrobianos purificados. Para ello se adquirieron las defensinas humanas producidas en el epitelio intestinal $H\beta D_1$ y $H\beta D_2$, las cuales se enfrentaron en un ensayo de inhibición en medio líquido con distintas cepas bacterianas (Tabla 4).

Tabla 4. Inhibición en medio líquido de microorganismos Gram (+) y (-) por β defensinas humanas. Los signos indican la presencia o no de crecimiento luego de 16 h de incubación a 37°C en condiciones aeróbicas o anaeróbicas según fuese necesario. La concentración de las defensinas fue de 5 μg/ml. Los microorganismos fueron inoculados simultáneamente con las defensinas. El medio empleado fue caldo nutritivo o caldo MRS. La concentración inicial bacteriana fue de 1 10^5 ufc/ml.

CEPA	$H\beta D_1$	$H\beta D_2$
E. coli CM1	+	+
Bacillus cereus M2	+	+
Lactobacillus delbrueckii subsp *lactis* (CIDCA 133)	+	+
Lactobacillus delbrueckii subsp *bulgaricus* cepa LBB	-	-

Los resultados obtenidos reflejan diferentes comportamientos de algunas cepas frente a las β defensinas y los extractos celulares. Mientras que *E. coli* CM1 y *Bacillus cereus* M2 resultaron inhibidos por el extracto catiónico y la fracción citosólica de Caco-2, no se vieron afectados por las defensinas. Los lactobacilos ensayados, sin embargo, conservaron la sensibilidad previamente observada, resultando la cepa 133 resistente y la cepa LBB sensible. La cepa LBB fue inhibida hasta una dilución 1/128 de las defensinas

equivalente a 0.04 ug/ml, según la concentración inicial empleada. La ausencia de inhibición por parte de las defensinas sobre *E. coli* CM1 y *Bacillus cereus* M2, puede significar que en los extractos celulares de Caco-2 haya otras sustancias catiónicas responsables de inhibir a estas bacterias por ejemplo catelicidina hCAP18/LL-37, histonas o PLA_2. Otra posible hipótesis implicaría una mayor concentración de defensinas presentes en los extractos celulares con respecto a la empleada en el ensayo; aunque esto es altamente improbable.

Dado el efecto diferencial de las defensinas frente a *L. delbrueckii* subsp *lactis* cepa 133 y *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* cepa LBB, se decidió investigar la interacción de los péptidos y las bacterias en una cinética de crecimiento (figura 4).

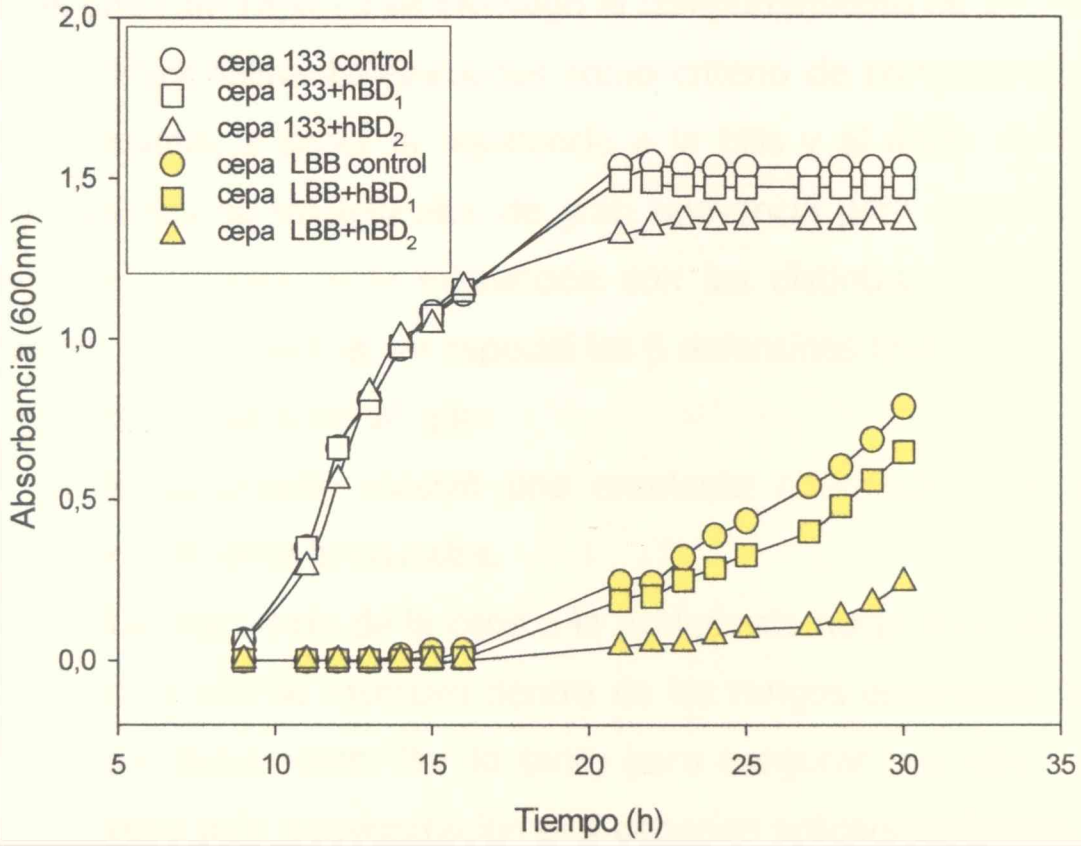


Figura 4. Cinética de crecimiento en medio líquido de lactobacilos en presencia de β defensinas humanas. Las cepas de lactobacilos empleadas fueron la cepa 133 y LBB. El crecimiento se registró por aumento de la densidad óptica a 600 nm. La concentración de las defensinas utilizada fue de 2.5 ug/ml. El inóculo inicial bacteriano fue de 1 10^5 ufc/ml. El medio utilizado fue MRS.

La cinética de crecimiento (figura 4), evidenció un retraso del desarrollo de la cepa CIDCA LBB de alrededor del 20% en presencia de la $H\beta D_1$ y del 70% frente a la $H\beta D_2$. La diferencia se mantuvo aún 30 h post inoculación. En contraste la cepa CIDCA 133 mostró un crecimiento semejante al control en presencia de ambas defensinas.

La cepa CIDCA 133 presentó comparativamente una mejor capacidad de sobrevida y desarrollo que la cepa LBB en presencia de los extractos de células epiteliales colónicas y de las β defensinas humanas. Esta capacidad resultaría importante para lograr la colonización intestinal y la generación posterior de los efectos probióticos deseados. Se sabe que, los péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMPs), ejercen su función inhibitoria

interaccionando con la membrana citoplasmática bacteriana, la cual presenta de ordinario una elevada carga negativa por la presencia de los fosfolípidos (Peschel, 2002). Sin embargo, algunos microorganismos patógenos tanto Gram negativos como positivos han desarrollado mecanismos de resistencia frente a los CAMPs. Los mecanismos más extendidos previenen la unión de los péptidos bioactivos a la membrana plasmática disminuyendo la carga neta negativa de los ácidos teicoicos, del LPS y de la propia membrana (Peschel, 2002). Es posible, por lo tanto especular que el comportamiento disímil de las dos cepas de lactobacilo se deba a diferencias en la composición lipídica de membrana plasmática o de los ácidos teicoicos de la pared.

Conclusiones.

En el presente capítulo se investigó el comportamiento de la cepa 133 frente a las propiedades tradicionalmente evaluadas como criterio de competitividad de una cepa a nivel gastrointestinal, a saber la resistencia a la bilis y al ácido clorhídrico. Además se abordaron aspectos no tradicionales de gran relevancia para definir la supervivencia de una cepa *in vivo*, como es la interacción con las distintas moléculas antimicrobianas producidas por los enterocitos, en especial las β defensinas humanas.

En conclusión se observó que:

- El lactobacilo mostró una excelente tolerancia a la bilis en todas las condiciones ensayadas.
- La resistencia de la cepa a la acidez estomacal simulada no fue destacada, sino que se mantuvo dentro de los rangos esperables para la mayoría de los lactobacilos. Por lo tanto para asegurar una alta supervivencia de la cepa bajo administración oral deberían aplicarse medidas protectivas.
- La viabilidad del lactobacilo no fue afectada por la presencia de los lisados de células epiteliales colónicas, ni por las β defensinas humanas.

Los resultados obtenidos revelaron un buen desempeño de la cepa en los ensayos de competitividad *in vitro*, lo que haría posible especular un comportamiento semejante a nivel gastrointestinal.

CAPÍTULO III

Numerosas investigaciones demostraron que distintas especies de bacterias ácido lácticas (BAL) poseen una acción antagónica contra los patógenos intestinales o de origen alimentario. Las BAL son capaces de prevenir la adhesión, establecimiento, replicación y/o la acción patógena de estos microorganismos (Naidu et al, 1999). Las BAL también poseen un efecto regulador de la microbiota intestinal normal evitando la proliferación excesiva de bacterias putrefactivas. Dentro de los factores causales de estas propiedades antagónicas se destacan la producción de ácidos grasos volátiles de cadena corta (láctico, acético, propiónico) y la capacidad de excluir, competir o desplazar la asociación de los patógenos al epitelio intestinal.

Producción de ácidos orgánicos por las BAL

La fermentación que producen las bacterias ácido lácticas, resulta en la acumulación de ácidos orgánicos, especialmente ácido láctico. El ácido láctico constituye el mayor producto del metabolismo de carbohidratos, generado a partir del piruvato por la enzima lactato deshidrogenasa. La acumulación de ácido láctico y la consecuente reducción de pH del medio provoca una actividad inhibitoria de amplio espectro contra bacterias Gram positivas y negativas (Naidu et al, 1999). La acción antibacteriana de los ácidos orgánicos, como el láctico y el acético, es principalmente asignada a la habilidad de

las formas no disociadas de penetrar en la membrana plasmática, reduciendo el pH intracelular y disrumpiendo la fuerza protón motriz transmembrana (Alakomi et al, 2000).

En el medio intestinal cuyo pH oscila alrededor de 6; el ácido acético presenta una mayor capacidad antimicrobiana que el láctico. El ácido acético posee un pK de 4.76, mientras que el ácido láctico posee un pK de 3.86. A pH intestinal, el 8.4% del ácido acético se encuentra en forma no disociada, mientras que sólo el 1.1% del ácido láctico se halla en esta condición. Las bifidobacterias producen ácido acético y láctico en una relación 3:2, generando en el medio intestinal 11 veces más ácido acético no disociado que láctico (Naidu et al, 1999). Los lactobacilos producen principalmente ácido láctico presentando según las cepas pequeñas cantidades de otros ácidos orgánicos como acético y succínico. Considerando sólo este aspecto, los lactobacilos tendrían un papel secundario en la actividad antimicrobiana intestinal respecto a las bifidobacterias. Sin embargo los lactobacilos son capaces de producir también otros catabolitos con actividad antibacteriana como peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y ácido fenilláctico o hidroxifenilláctico (Makras et al, 2006). Esta variedad de sustancias antimicrobianas producidas, capaces de actuar eficazmente a pH neutro, convierte a los lactobacilos en protagonistas en los que respecta al control bacteriano intestinal.

El ácido láctico (y posiblemente el acético) presenta, además, otro modo acción deletérea frente a los microorganismos Gram negativos ya que actúa como un agente permeabilizante de la membrana externa (Alakomi et al, 2000). Alakomi y colaboradores describieron que el ácido láctico provocaría la desintegración de la membrana externa, evidenciable por la liberación del LPS y la sensibilización de las bacterias a la lisozima y detergentes. La disrupción de la membrana externa posiblemente involucre tanto a las formas disociadas como no disociadas del ácido láctico. La capacidad permeabilizante del ácido láctico determinaría importantes consecuencias, ya que podría potenciar el efecto contra gérmenes Gram negativos de otras sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas (Alakomi et al, 2000).

Adhesión de las BAL a células eucarióticas

El mantenimiento prolongado de las BAL en el tracto gastrointestinal es fundamental para que puedan ejercer sus efectos probióticos. La habilidad de las BAL de adherirse a las superficies mucosas, resulta esencial a fin de garantizar la permanencia de las mismas en el intestino. En caso contrario serían removidas por los fluídos intestinales impulsados por las contracciones peristálticas. El tiempo de residencia de los microorganismos no adherentes es probablemente muy corto para ejercer efectos

positivos en el hospedador, a excepción que se los consuma de manera abundante y continua (Naidu et al, 1999). La capacidad de adhesión a epitelios es una propiedad bacteriana cepa dependiente. Distintos factores de colonización se encuentran involucrados en la adhesión de las BAL a las superficies mucosas. Estos factores van desde atracciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas hasta moléculas específicas (adhesinas). Algunas de estas adhesinas son de naturaleza proteica como la proteína promotora de adhesión a mucus (MapA) de *Lactobacillus reuteri* 104R (Miyoshi et al, 2006), el factor promotor de agregación (APF) de *L. johnsonii* y *L. gasseri* (Ventura et al, 2002) o las proteínas de capa-S de varias especies de lactobacilos (Vaughan et al, 1999). También existen carbohidratos involucrados en la adhesión como en el caso de *L. acidophilus* (Fernández et al, 2003). Asimismo se han descripto otras adhesinas de naturaleza compleja como el ácido lipoteicoico en *Lactobacillus johnsonii* La1 (Granato et al, 1999) o las proteínas semejantes a lectinas de *L. fermentum* (Gusils et al, 2002). Observando esta lista de adhesinas, resulta evidente que en las BAL no existe uniformidad en cuanto a factores y mecanismos responsables de la asociación a las superficies mucosas.

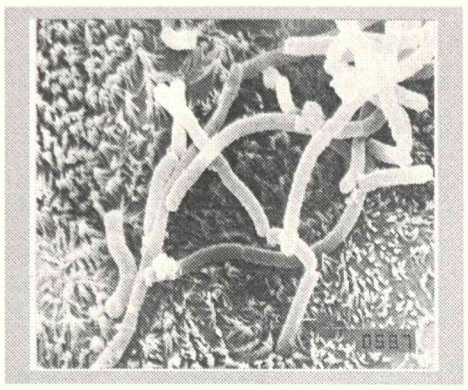
Las propiedades de adherencia de las BAL, confiere a determinadas cepas la capacidad de interferir con la asociación de las bacterias patógenas a las células intestinales. Los estudios clásicos de interacción de las bacterias probióticas y enteropatógenos *in vitro* involucran el uso de líneas celulares en cultivo (por ejemplo T84, HT-29 y Caco-2). Numerosos autores, empleando estos modelos, describieron efectos antagónicos por parte de lactobacilos y bifidobacterias sobre la adhesión de enteropatógenos (Bernet et al, 1993; Coconnier et al, 2000; Hirano et al, 2003 entre otros). Determinadas cepas de BAL empleadas lograron disminuir la adhesión y/o invasión de los patógenos intestinales. Los protocolos que resultron más efectivos generalmente utilizaron la exclusión (preincubación de las monocapas con la cepa probiótica para luego añadir el patógeno) o competencia (incubación simultánea de patógeno y probiótico). Sin embargo se conocen cepas de lactobacilos con capacidad de desplazamiento del patógeno previamente adherido a la monocapa (Lee et al, 2003).

Debido a que las bifidobacterias y los lactobacilos no expresan factores de adhesión específicos equivalentes a los hallados en las bacterias patógenas, se asigna al impedimento estérico el papel de mecanismo principal de inhibición de la adhesión de los patógenos a las células hospedadoras. El impedimento estérico resulta de la adhesión próxima de una cepa probiótica a un receptor celular blanco para una bacteria patógena evitando una interacción óptima entre ambos (Reid et al, 1985 y 1987). Es de destacar,

sin embargo, que se ha descripto la unión competitiva por receptores comunes entre varias especies de BAL y enteropatógenos. Por ejemplo Fujiwara y colaboradores mecionaron que *Bifidobacterium* BL2928 y *E. coli* ETEC con expresión positiva para el factor antigénico de colonización (CFA) II compiten por el receptor gangliotetraosilceramida (GA1) (Fujiwara et al, 1997). Asimismo se encontró que *L. casei* y *L. johnsonii* LA1 expresan uniones específicas para carbohidratos como oligomanósidos y gangliotriosilceramidas que se sabe son expresados en la superficie de los receptores celulares para varias *E. coli* enteropatógenas (Yamamoto et al, 1996; Nesser et al, 2000). Otros mecanismos propuestos para la inhibición de la adhesión de los enteropatógenos por parte de los lactobacilos y bifidobacterias implican el aumento de la producción de las mucinas intestinales (Mack et al, 1999; Mattar et al, 2002) y la coagregación entre bacterias probióticas y patógenas (Spencer et al, 1994).

Si bien la adhesividad a células epiteliales es una propiedad deseable para las cepas de BAL con potencialidad probióticas, esta propiedad no garantiza una efectiva exclusión de los patógenos (Bibiloni et al, 1999). Asimismo tampoco son estrictamente extrapolables los efectos observados sobre cultivos celulares a la situación gastrointestinal *in vivo*. En condiciones naturales la microbiota residente, la presencia de mucus y el flujo peristáltico pueden modificar considerablemente la adhesión de las bacterias probióticas y/o de los enteropatógenos (Servin, 2004). Como es sabido la experimentación *in vivo* proporciona un modelo más aproximado a la realidad del tracto gastrointestinal humano, aunque existen innumerables diferencias entre los animales y el hombre. Estas diferencias conllevan a la presentación de cuadros clínicos no equivalentes e incluso al fracaso de la infección animal en el caso de bacterias y virus humanos altamente específicos.

En el desarrollo del presente capítulo se analiza el comportamiento *in vitro* de la cepa CIDCA 133 *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* en interacción con una cepa de *E. coli* no patógena denominada CM1. La investigación se focalizó en el estudio del efecto de la producción de sustancias extracelulares por parte del lactobacilo sobre *E. coli* y en la capacidad de exclusión-desplazamiento de *E. coli* de las superficies celulares por la cepa CIDCA 133.



CAPÍTULO III

Estudio de la interacción entre la cepa CIDCA 133 y *E.coli* : modelos *in vitro*

Metodología.

Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.

La cepa CM1 de *E. coli* empleada constituye un aislado no patógeno perteneciente a la colección de la Cátedra de Microbiología General de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP). La cepa gfp de *E. coli* fue cedida gentilmente por el Dr. Patricio De Urraza. Constituye una cepa genéticamente modificada, la cual porta en un plásmido multicopia (mini-TN7gfp2) el gen de la proteína verde fluorescente o GFP. El plásmido contiene a su vez genes que confieren a la cepa resistencia a los antibióticos gentamicina y ampicilina. La proteína GFP posee expresión constitutiva y es dependiente de la presencia de oxígeno. El lactobacilo utilizado fue la cepa CIDCA 133 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis*) cepa CIDCA 133 perteneciente a la colección del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP). Los cultivos stock de las cepas se mantuvieron a -80ºC y cada microorganismo fue reactivado dos veces en medio líquido antes de la realización de los experimentos.

E. coli CM1 fue crecida sin agitación en medio nutritivo conteniendo extracto de carne (3 g/l) y peptona de carne (5 g/l). La incubación se realizó durante 16 h a 37ºC. *E. coli* gfp fue crecida con agitación en medio LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, glucosa 1 g/l) suplementado con 50 ug/ml de ampicilina. La incubación se efectuó también durante 16 h a 37ºC. En los ensayos donde se cuantificó la asociación de *E. coli* mediante la técnica colorimétrica de nitrato reductasa se añadió nitrato de sodio 0.1% a la formulación de los medios de cultivo. La presencia del nitrato resulta importante para la correcta inducción de la actividad nitrato reductasa (Shoeb et al, 1991). Dado que la presencia de oxígeno inhibe la actividad nitrato reductasa de *E. coli*, cuando fue necesario cuantificar la asociación de *E. coli* gfp mediante el empleo de la técnica enzimática, la cepa se creció sin agitación. Como la expresión de la proteína GFP necesita condiciones aeróbicas y la cuantificación de la actividad nitrato reductasa condiciones anaeróbicas, cuando se necesitó evaluar ambas variables se efectuó mediante experimentos independientes con las condiciones apropiadas.

L. delbrueckii subsp *lactis* fue crecido en condiciones anaeróbicas en MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) con 0.5 % de cisteína a 37ºC durante 16 h.

Determinación de ácidos orgánicos.

La cuantificación de ácidos orgánicos de los sobrenadantes de cultivo de la cepa CIDCA 133 se realizó mediante HPLC. Los sobrenadantes fueron obtenidos luego de la

incubación durante 16 h a 37ºC del lactobacilo en MRS. A fin de obtener un sobrenadante libre de bacterias las suspensiones fueron centrifugadas a 3000 g durante 10 min y filtradas a través de una membrana de 0.45 μm (Osmonics). La separación de los ácidos orgánicos se efectuó con una columna de intercambio iónico AMINEX HPX-87H (Biorad Laboratories, Richmond, California). La detección se realizó mediante absorción UV a 214 nm (Water 996, Millipore). La identificación de los ácidos orgánicos se basó en la comparación de los tiempos de retención con ácidos estándares. Las muestras fueron preparadas diluyendo 1/4 de los sobrenadantes en H_2SO_4 0.01N. Luego fueron centrifugadas a 14.000 g durante 10 min y filtradas a través de una membrana de 0.45 μm (Osmonics). Se sembraron en el cromatógrafo (Waters 716, Millipore) 10 μl del filtrado. El análisis se realizó con un flujo de 0.7 ml/min a 60ºC usando como fase móvil H_2SO_4 a una concentración de 0.009 N. Los solventes fueron desgasificados en vacío antes de su empleo.

Cinética de inhibición y muerte de *E. coli* por sobrenadantes de la cepa 133.

Los sobrenadantes del lactobacilo fueron obtenidos desde los cultivos en fase estacionaria de 16 h de incubación. Primero se centrifugaron durante 10 min a 900 g. Luego, el pellet bacteriano fue descartado y la fase líquida se sometió a filtración a través de una membrana estéril de 0.45 μm de diámetro de poro. Previo a la filtración se registró el pH de los sobrenadantes. Los sobrenadantes se emplearon con el pH final alcanzado durante el cultivo o con pH ajustado mediante el agregado de NaOH 5N. A su vez se prepararon sobrenadantes artificiales añadiendo al medio MRS ácido láctico, ajustando la acidez según los valores deseados. Los sobrenadantes se utilizaron puros o diluídos, en este caso, el diluyente empleado fue medio MRS.

Las cinéticas de crecimiento de *E. coli* en presencia de sobrenadante se realizaron en forma fraccionada. Se colocaron para cada condición una serie de tubos independientes con 5 ml de sobrenadante natural o artificial y se inocularon con 0.1 ml de un cultivo de *E. coli* de 14 h en caldo nutritivo. Los tubos se incubaron a 37ºC en baño termostatizado; sustrayendo a distintos intervalos de tiempo un tubo de cada condición a fin de determinar el número de bacterias viables mediante recuento. La utilización de una cinética fraccionada permite que cada tubo sea manipulado una sola vez y descartado, impidiendo la pérdida de volumen y la pérdida de temperatura ocasionada por las extracciones sucesivas en una cinética común. Para el recuento de microorganismos viables, se realizaron diluciones seriadas en solución fisiológica y se sembraron en superficie de placas conteniendo agar nutritivo. La diseminación se hizo por agitación con

perlas de vidrio. Las placas se incubaron durante 16 h a 37ºC, en cámara húmeda para evitar la desecación del medio.

Cultivos celulares

La línea celular empleada en esta sección fue Caco-2, la misma corresponde a enterocitos humanos provenientes de un adenocarcinoma colónico. La línea celular fue obtenida del Centre de Recherche Nestlé (Lausanne, Suiza).

Los cultivos stock de las células se mantuvieron en N_2 líquido resuspendidos en medio DMEM completo con el agregado dimetilsulfóxido al 10% como crioprotector. Las células se sembraron en placas de 24 fosas (Greiner Bio One) con una concentración de 1.25 10^5 células por cada una para su utilización en los ensayos. Las placas se incubaron a 37ºC en una estufa que provee una atmósfera húmeda enriquecida en 5% de CO_2 (Forma Scientific, Ohio. USA). Las células se crecieron en medio DMEM (Gibco, Life Technologies, Rockville MD, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser, Argentina), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco, Life Technologies, Rockville MD, USA) y antibióticos. El medio se renovó cada dos días. Se utilizaron monocapas confluentes y diferenciadas de 15 días de incubación. En los ensayos donde se requirió la visualización microscópica de las monocapas, las mismas se desarrollaron sobre láminas de vidrio estériles de 12 mm de diámetro colocadas en las fosas (Assistent, Glaswarenfabrik Kart Hetch K.G., Sondheim. Alemania).

Ensayos de asociación bacteriana a células Caco-2.

Los cultivos de 16 h de *E. coli* y el lactobacilo cepa 133 fueron centrifugados a 850 g durante 10 min y los pellets se resuspendieron con diferentes concentraciones en PBS como diluyente. Las monocapas de Caco-2 fueron lavadas dos veces con buffer PBS, para luego ser incubadas durante 1 h ó 2 h con *E. coli* o el lactobacilo a 37ºC. En el caso de los ensayos de interacción entre la enterobacteria y el lactobacilo, la incubación de las monocapas se realizó durante 1 h con una bacteria para luego añadir el otro microorganismo durante 1 h más. No se realizaron lavados entre el agregado de una y otra bacteria, por lo que la incubación es conjunta. Transcurrido el tiempo de incubación previsto, las monocapas se lavaron tres veces con buffer PBS para eliminar las bacterias no adheridas. La asociación bacteriana se expresó como porcentaje, constituyendo el 100% la cantidad de bacterias agregadas por fosa inicialmente. La cuantificación de las bacterias asociadas se realizó empleando distintos métodos.

a) Recuento de microorganismos viables: En este caso las células lavadas conteniendo las bacterias asociadas se lisaron por incubación con agua destilada estéril durante 1 h a 37ºC. Posteriormente se realizaron las diluciones apropiadas en solución fisiológica estéril y se sembraron en placas conteniendo agar MRS (para la determinación del número de viables del lactobacilo) o agar nutritivo (para la determinación del número de viables de *E. coli*).

b) Recuento microscópico mediante técnica de Breed: Esta metodología permite el recuento de bacterias totales por medio de la observación microscópica. Dado que resulta difícil la distinción visual en bacterias de pequeño tamaño sólo se empleó para la cuantificación del lactobacilo.

Como se mencionara para el recuento de microorganismos viables las células fueron lisadas con agua destilada estéril. Una alícuota de 10 ul de las muestras fue esparcida en una superficie de 1 cm^2 delimitada en un portaobjeto. Luego se permitió la evaporación total del líquido a temperatura ambiente para finalmente fijar las muestras por calor. A fin de obtener una mejor visualización de las bacterias asociadas se las coloreó con cristal violeta (1 g/l en agua destilada) durante 1.5 min. Para la cuantificación se determinó el número de bacterias promedio ($\hat{Y}$) presente por campo microscópico. Con este fin se registraron la totalidad de microorganismos presentes a lo largo de 1 cm^2 y se los dividió por la cantidad de campos. El resultado se extrapoló al número de bacterias por mililitro utilizando la siguiente ecuación:

$$Nº \text{ de bacterias en 1 ml} = (100\ mm^2 * 1/0.155\ mm^2 * \hat{Y}) * 100$$

Donde: 0.155 mm^2 es el área de un campo microscópico; 100 mm^2 es el área sobre el portaobjetos donde fue esparcida la muestra; $\hat{Y}$ es el número de bacterias promedio presente por campo microscópico y 100 es el factor de corrección para extrapolar los resultados a 1 ml.

c) Cuantificación enzimática-colorimétrica de la asociación bacteriana empleando la reacción de nitrato reductasa: La actividad nitrato reductasa fue determinada utilizando la reacción de diazotación para el nitrito que emplea ácido sulfanílico y naftilen diamina (Mc Namara et al, 1971). Las monocapas conteniendo las bacterias asociadas fueron desprendidas mecánicamente y se les añadió una mezcla de 5 partes de nitrato de sodio 1% (p/v) y 3 partes de formiato de sodio (1M), incubándolas durante 2 h a 37ºC. Las suspensiones fueron luego centrifugadas 1 min a 14.000 g. Posteriormente se tomó 0.1 ml del sobrenadante y se mezcló con 0.1 ml de ácido sulfanílico (1% p/v) y 0.1 ml de

N-naftil-etil-dicloro de amonio (0.02% p/v), ambos en HCl (1.5 M). Las mezclas permanecieron durante 10 min a temperatura ambiente para permitir el desarrollo del color producto de la reacción de diazotación. La absorbancia se midió a 540 nm en un lector de placas (ELISA Plate Reader STL Rainbow Reader, Wien, Austria). A fin de determinar el porcentaje de bacterias asociadas se realizó una curva patrón con concentraciones crecientes de *E. coli*. Dada la relación bifásica encontrada para *E. coli* CM1 (ver anexo) entre concentración bacteriana y el color desarrollado, el cálculo de concentraciones se realizó empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de bacterias asociadas} = 100*(C_s / C_r)$$

Donde C_r es la concentración bacteriana (absorbancia a 600 nm) de la suspensión bacteriana de referencia y C_s es la concentración bacteriana (absorbancia a 600 nm) de la muestra.

d) Determinación de fluorescencia promedio de bacterias asociadas mediante análisis de imágenes: Las fotografías que documentaron la asociación de *E. coli* gfp a las monocapas de Caco-2 fueron analizadas utilizando el programa Molecular AnalystTM/PC (versión 1.5) (BIO-RAD). El software permite determinar la intensidad de luz promedio de cada imagen expresándola en unidades arbitrarias. Con el objetivo de determinar el grado de asociación de *E. coli* gfp se cuantificaron seis imágenes diferentes de cada condición, para luego realizar un promedio de intensidad lumínica.

Microscopía electrónica de barrido.

Luego de los ensayos de asociación bacteriana las monocapas crecidas sobre láminas de vidrio fueron lavadas dos veces con buffer PBS y fijadas durante 16 h a 4ºC con glutaraldheído al 2.5 % (v/v) (Riedel de Haen, Séles, Alemania). Las muestras fueron deshidratadas en forma secuencial con soluciones de concentración creciente de etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemania) en agua bidestilada. La deshidratación final se realizó por punto crítico en CO_2 líquido (Baltec CP 30, Japón). Finalmente las muestras se recubrieron con una capa de oro al vacío (Jeol Fine Coat Sputter JFC-1100) y se examinaron utilizando un microscopio electrónico de barrido Jeol Model JSM-T100.

Marcación fluorescente de microorganismos.

Las bacterias fueron coloreadas utilizando el marcador 2' 7' bis (2- carboxietil)– 5(6)-carboxi-fluoresceína acetoximetil éster (BCECF – AM) el cual es capaz de pasar a través de la membrana plasmática. Una vez dentro de la bacteria, el colorante es clivado

por las esterasas intracelulares del microorganismo, confiriéndole fluorescencia verde. La fluorescencia resultante es dependiente de la integridad de las envolturas celulares.

Para la marcación, los microorganismos crecidos en medio líquido fueron lavados con PBS y concentrados en un volumen de 1 ml. Luego se añadieron 10 µl de BCECF-AM (1 mg/ml) a las suspensiones bacterianas; incubándolas durante 30 min a 37ºC al abrigo de la luz. Finalizado el tiempo de incubación, las muestras se lavaron con PBS, para eliminar el exceso de colorante. Las suspensiones marcadas se diluyeron según las concentraciones requeridas en los ensayos.

Análisis estadístico.

Las medias fueron comparadas a través de la prueba de dos colas del test de Student's utilizando el software de InfoStat (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Resultados y discusión.

Inhibición del crecimiento de *E.coli* con sobrenadantes de cultivo de lactobacilo

Los sobrenadantes de cultivo de 16 h en MRS de la cepa 133 alcanzaron un pH final que osciló entre 3.6 y 4.2. Antes de investigar el posible antagonismo de los sobrenadantes sobre *E. coli* CM1 se evaluó, la concentración de ácidos orgánicos de los mismos mediante HPLC (figura 1).

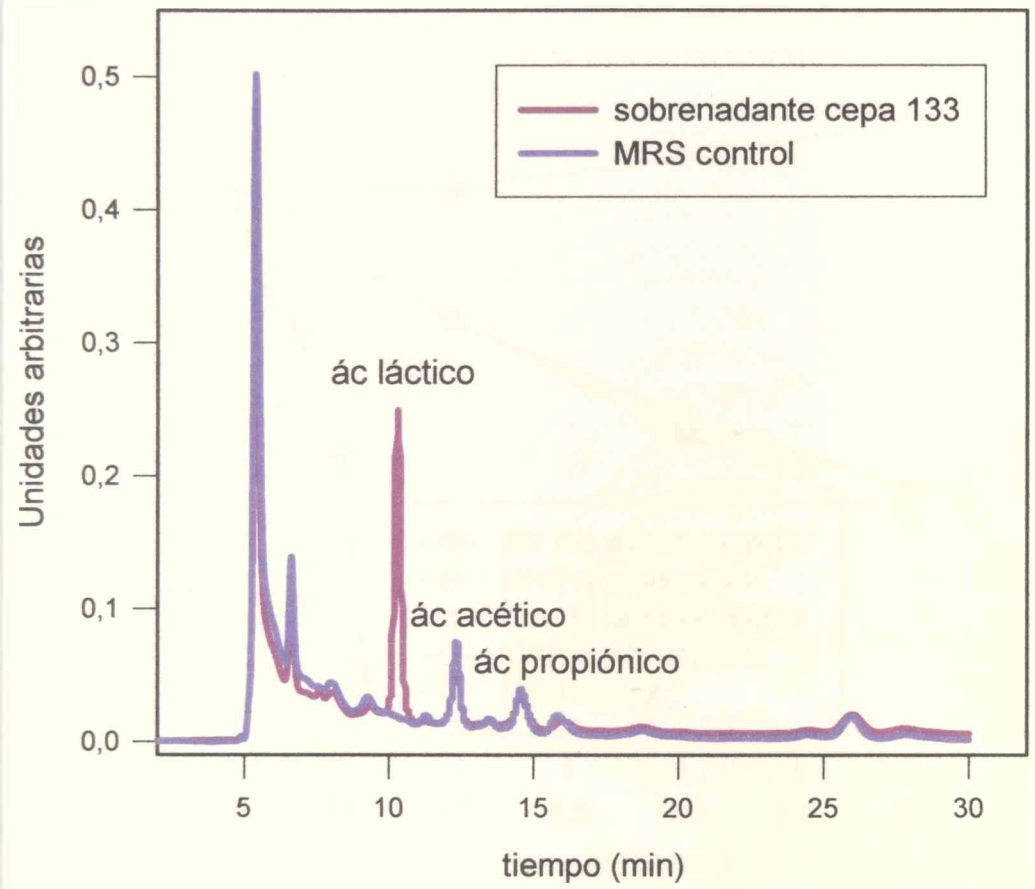


Figura 1. Composición de ácidos orgánicos del sobrenadante de cultivo de la cepa 133. La determinación se realizó por HPLC. En la figura se representan comparativamente los tiempos de retención de los ácidos orgánicos para el sobrenadante y el medio MRS base. Los sobrenadantes se obtuvieron por cultivo de la cepa 133 en medio MRS.

Según se observa en el cromatograma, el único ácido orgánico producido en alta concentración por la cepa 133 es el ácido láctico. Luego del análisis comparativo de las áreas bajo la curva de los ácidos producidos y los respectivos patrones, se determinó la concentración de los ácidos orgánicos. La producción de ácido láctico resultó destacada con una concentración de 111.11 mM, mientras que los ácidos acético y propiónico se encontraron presentes sólo en trazas. Los valores hallados no difirieron de los hallados por otros autores en distintos lactobacilos (Makras et al, 2006).

La acidez de los sobrenadantes naturales del lactobacilo resultó elevada respecto a la encontrada normalmente a nivel intestinal, la cual oscila alrededor de pH 6. Este hecho impulsó el deseo de investigar no sólo el efecto sobre *E. coli* de los sobrenadantes naturales del lactobacilo, sino también el de los sobrenadantes neutralizados a pH 5.

Aunque el pH 5 es todavía un pH bajo en relación al intestinal, se sabe que pueden existir regiones entéricas con microentornos de alta acidez.

En una primera aproximación para evaluar el poder antagónico sobre *E. coli* de los sobrenadantes del lactobacilo se realizaron cinéticas de muerte, empleando sobrenadantes a pH final de cultivo (aproximadamente 4) y a pH 5 (figura 2). A fin de comparar el comportamiento inhibitorio con los sobrenadantes naturales, se utilizaron a su vez sobrenadantes artificiales generados a partir de medio MRS acidificado con ácido láctico (figura 2).

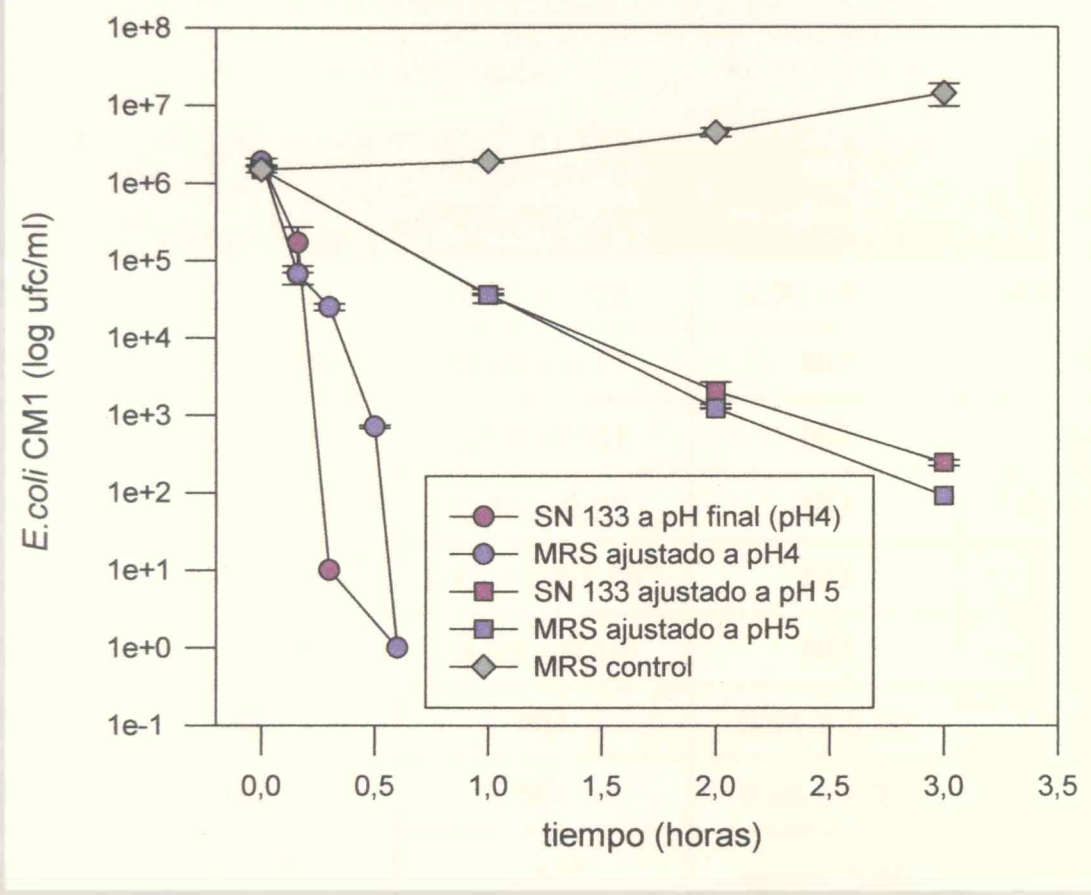


Figura 2. Cinética de muerte de *E. coli* CM1 por sobrenadantes de cultivo de la cepa 133. Se utilizaron como controles de los sobrenadantes medio MRS acidificado artificialmente con ácido láctico. Las barras sobre los símbolos indica la desviación estándar. La cuantificación se realizó mediante recuento de bacterias viables.

Se observó que el sobrenadante del lactobacilo a pH final tuvo un efecto bactericida sobre *E. coli* CM1, reduciendo el número de bacterias viables en 6 log al cabo de 30 minutos de incubación. El sobrenadante de la cepa 133 ajustado a pH 5, presentó también un efecto bactericida. Sin embargo, su efecto fue más lento, empleando 4 h para disminuir en 5 log el inóculo inicial de *E. coli*. No se registraron diferencias significativas entre el comportamiento de los sobrenadantes artificiales y los naturales, lo cual indicaría que el poder inhibitorio se debió principalmente al efecto del ácido láctico. Una evidencia indirecta adicional a favor de esta hipótesis, surgió del hecho de que los sobrenadantes del lactobacilo llevados a pH neutro permitieron un desarrollo de *E. coli* semejante al control de MRS.

Debido al gran volumen de secreciones producidas a nivel gastrointestinal, tanto los alimentos que ingresan como los metabolitos generados por la microbiota residente sufren una importante dilución. Por ello se decidió investigar el efecto antagónico de los sobrenadantes diluídos de la cepa 133 sobre *E. coli* CM1 (Tabla 1). Asimismo, la dilución de los sobrenadantes permitiría evidenciar la presencia de otros factores inhibitorios que pudieran quedar enmascarados por la alta concentración de ácido láctico. En efecto, de existir diferencias entre el comportamiento inhibitorio de los sobrenadantes naturales diluídos y sus respectivos controles artificiales, constituiría un indicio de la presencia de tales sustancias.

Tabla 1. Efecto de los sobrenadantes diluídos de la cepa 133 sobre la viabilidad de *E. coli* CM1. Los resultados se expresan en log (ufc/ml). Los sobrenadantes alcanzaron un pH final de 4 ± 0.3. Los números fraccionarios indican la dilución del sobrenadante (SN) o del MRS acidificado al pH final del sobrenadante. ND significa no determinado.

Tiempo (horas)	SN diluído 1/12	MRS acidificado diluído 1/12	SN diluído 1/20	MRS acidificado diluído 1/20	MRS control
0.0	6.00 ± 0.02	6.00 ± 0.02	6.00 ± 0.02	6.00 ± 0.02	6.00 ± 0.02
0.5	6.16 ± 0.09	6.16 ± 0.11	ND	ND	ND
1.0	6.10 ± 0.07	6.10 ± 0.01	ND	ND	6.03 ± 0.07
1.5	6.01 ± 0.12	5,85 ± 0.21	ND	ND	ND
2.0	$6.01 \pm 5.96\ 10^{-3}$	$5.42 \pm 3.51\ 10^{-3}$	ND	ND	ND
2.7	5.72 ± 0.11	3.83 ± 0.18	ND	ND	6.75 ± 0.01
6.0	ND	ND	5.94 ± 0.02	5.91 ± 0.09	8.08 ± 0.05
10.0	ND	ND	5.94 ± 0.29	5.97 ± 0.05	ND
22.5	$< 10^3$	$< 10^3$	aprox 5.69	5.10 ± 0.09	8.18 ± 0.03

Los sobrenadantes de la cepa 133 diluídos 1/12 y 1/20 alcanzaron un pH de 4.9 y 5.3 ± 0.2 respectivamente. Tanto los sobrenadantes diluídos 1/12 como 1/20 presentaron un comportamiento inhibitorio sobre el crecimiento de *E. coli*. Los sobrenadantes diluídos 1/12 tuvieron un efecto bactericida sobre *E. coli* CM1, disminuyendo el inóculo inicial en más de 3 log al cabo de 22 h 30 min (Tabla 1). Alrededor de las 3 h de incubación el MRS acidificado y diluído 1/12 tuvo un comportamiento más inhibitorio que el sobrenadante natural, sin embargo no existieron diferencias significativas entre las dos condiciones a tiempo final.

Tanto los sobrenadantes como el medio MRS acidificado diluídos 1/20, tuvieron un efecto bacteriostático sobre *E. coli* manteniendo la concentración inicial bacterias durante toda la duración del ensayo (Tabla 1). No se encontraron evidencias que indiquen la

presencia de otras sustancias inhibitorias en los sobrenadantes aparte del ácido láctico; ya que el poder inhibitorio de los sobrenadantes naturales nunca superó el de los controles acidificados artificialmente (Tabla 2).

Dado que los sobrenadantes diluídos del lactobacilo presentaron aún pHs relativamente bajos respecto al intestinal; se decidió investigar el efecto inhibitorio de los sobrenadantes ajustados a pH 5 y posteriormente diluídos. Al cabo de este procedimiento se obtuvieron sobrenadantes con pHs próximos a 6 (figura 3).

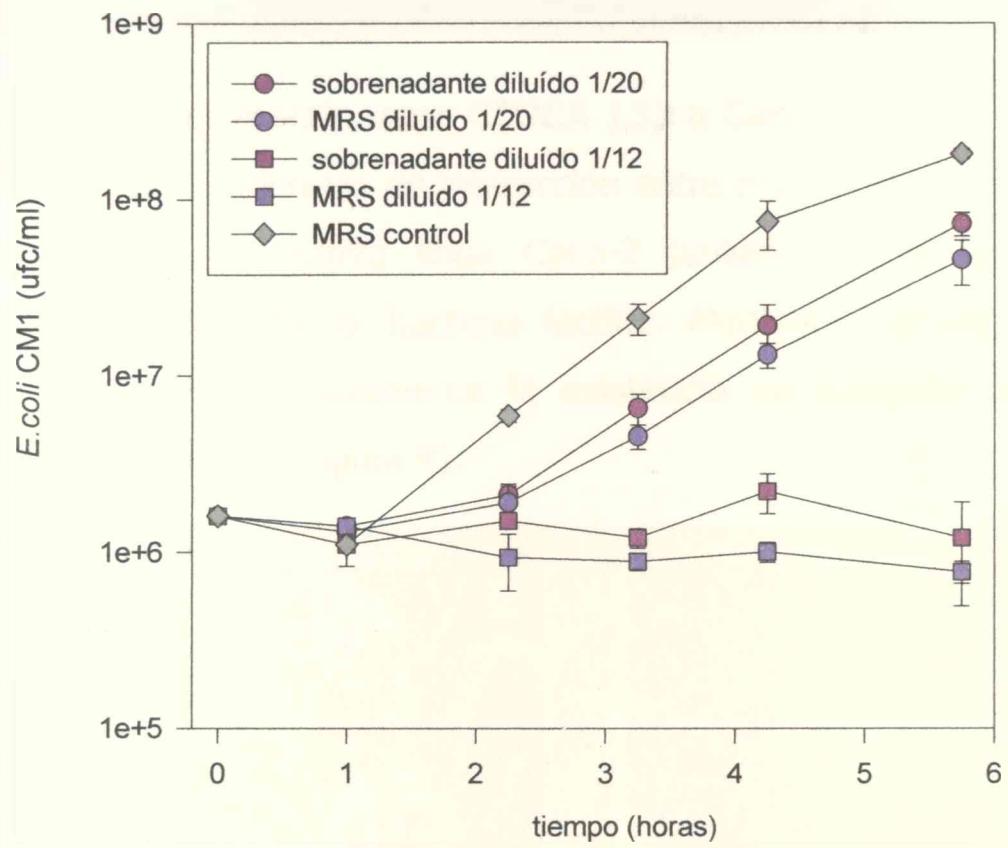


Figura 3. Cinética de crecimiento de *E. coli* CM1 en presencia de sobrenadantes diluídosde la cepa 133. Los sobrenadantes y el medio MRS acidificado con ácido láctico fueron llevados a a pH 5 y posteriormente diluídos. Las barras sobre los símbolos indica la desviación estándar. La cuantificación se realizó mediante recuento de bacterias viables.

Los sobrenadantes del lactobacilo llevados a pH 5 y posteriormente diluídos 1/12 y 1/20 alcanzaron un pH de 5.9 y 6.2 ± 0.2 respectivamente. Los sobrenadantes diluídos 1/12 tuvieron un efecto bacteriostático sobre el desarrollo de *E. coli* CM1 (figura 3). Los sobrenadantes diluídos 1/20 permitieron un crecimiento de la enterobacteria semejante al control (figura 3). No se registraron diferencias en el efecto inhibitorio entre los sobrenadantes de la cepa 133 y los sobrenadantes artificiales obtenidos por acidificación del medio MRS (figura 3).

Analizando el comportamiento de los sobrenadantes diluídos del lactobacilo a pH final y a pH 5, se comprobó que a mayor pH se reduce el poder inhibitorio sobre el crecimiento de *E. coli* CM1. Evidentemente alrededor de los pH 5.7 y 6.4 se encuentra el límite de tolerancia a la acidez de la cepa de *E. coli* estudiada; ya que la pérdida del poder inhibitorio de los sobrenadantes ajustados a pH 5 del lactobacilo se registró entre la

dilución 1/12 y 1/20 los cuales tuvieron pHs de 5.9 y 6.2 ± 0.2 respectivamente. El empleo de los sobrenadantes diluídos aportó evidencia adicional a favor del ácido láctico como único agente inhibitorio de los sobrenadantes.

Es importante destacar que sobrenadantes diluídos del lactobacilo con pHs cercanos a 6, mostraron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de una cepa no patógena de *E. coli* (*E. coli* CM1). Estos resultados indicarían una posible capacidad de regulación, por parte del lactobacilo, de la microbiota intestinal residente *in vivo*.

Asociación de *E. coli* a Caco-2 en interacción con la cepa 133.

a) Asociación del lactobacilo cepa CIDCA 133 a Caco-2.

Las primeras experiencias de interacción entre el lactobacilo cepa CIDCA 133 y los enterocitos humanos en cultivo línea Caco-2 tuvieron como objetivo investigar la capacidad de asociación de la bacteria láctica. Mediante microscopía electrónica de barrido se determinó cualitativamente la existencia de adhesión del lactobacilo a la superficie de los enterocitos (figura 4).

Figura 4. Asociación del lactobacilo cepa 133 a monocapas de Caco-2. Las incubaciones de la bacteria sobre las células fueron de 1 h a 37ºC. La concentración del lactobacilo empleada fue de 1 10^8 ufc/ml. Figura A magnificación 2000X. Figura B magnificación 7500X.

El lactobacilo se adhirió a las monocapas formando grupos o acúmulos sin alterar la integridad de la misma (figura 4 A). Las células conservaron su aspecto normal. La presencia del lactobacilo no modificó la forma celular, ni las microvellosidades superficiales (figura 4 B).

La microscopía óptica de fluorescencia permitió confirmar los resultados anteriores (figura 5). Se observó una importante adhesión de la cepa 133 a los enterocitos humanos (figura 5 A), sin que se perturbara la integridad de las monocapas celulares (figura 5 B).

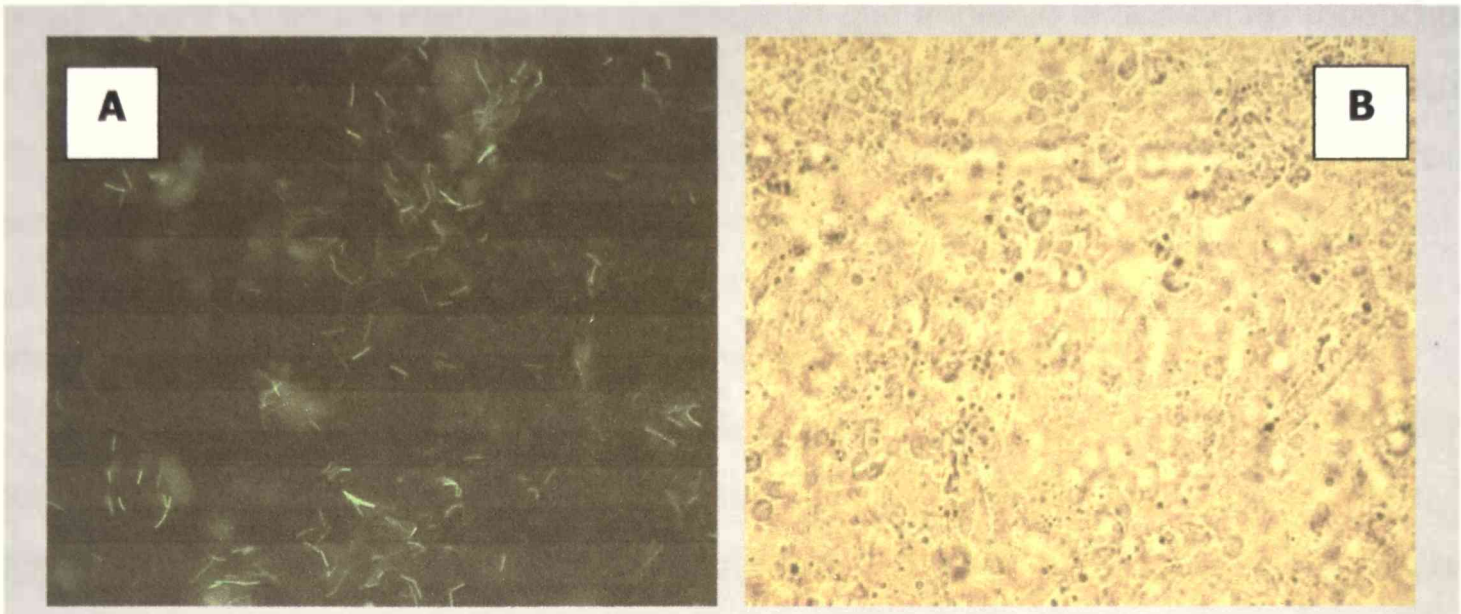


Figura 5. Asociación de la cepa 133 marcada con BCECF – AM a Caco-2. Las incubaciones de la bacteria sobre las células fueron de 1 h a 37ºC. La concentración del lactobacilo empleada fue de 1 10^8 ufc/ml. Figura A microscopía de fluorescencia. Figura B microscopía de campo claro, donde se muestra el mismo campo que en A. La magnificación fue de 40X.

Utilizando la técnica de recuento de microorganismos viables fue posible cuantificar la magnitud de la adhesión del lactobacilo a los enterocitos. Se estableció que la asociación promedio luego de 1 h de incubación fue del 2 al 4% para distintas concentraciones del lactobacilo (figura 6).

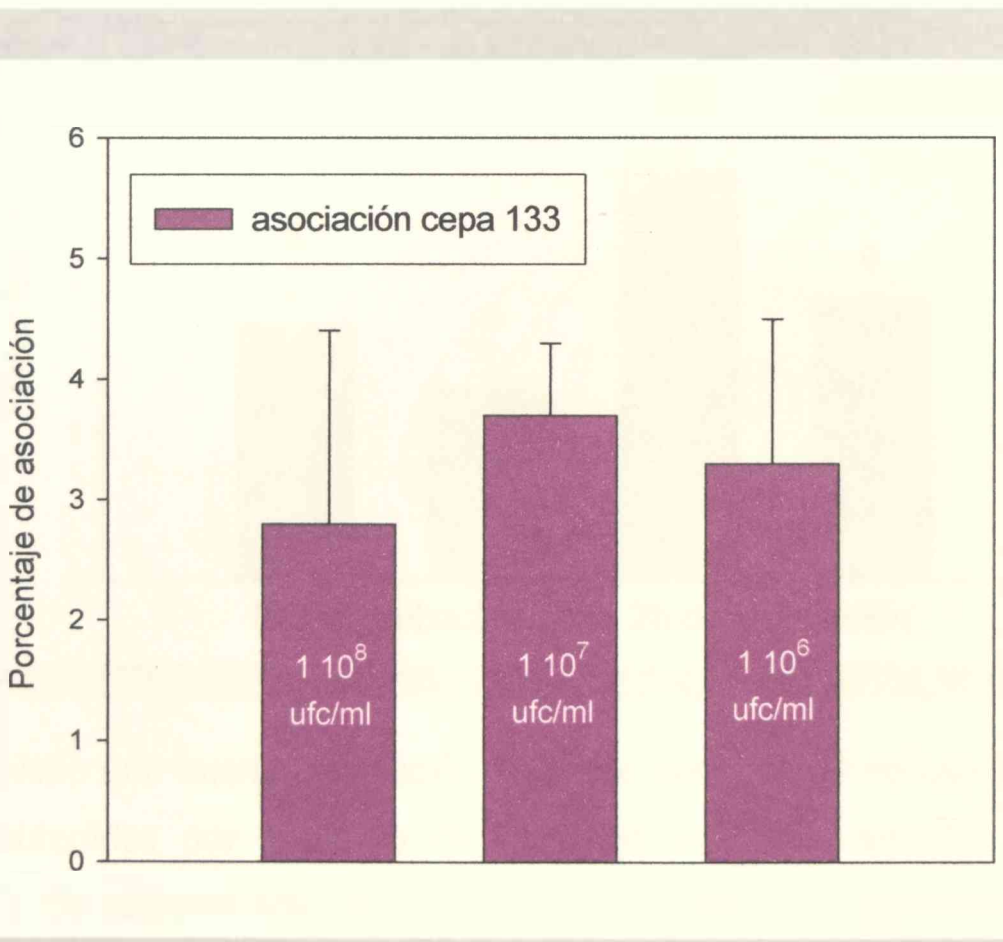


Figura 6. Porcentaje de asociación de la cepa 133 a Caco-2 cuantificado por recuento de viables. La leyenda dentro de las barras indican la concentración de lactobacilo utilizada. Las líneas sobre las barras representan la desviación estándar. No existen diferencias significativas entre las determinaciones para ($p \leq 0.05$) en test t de Student.

Es importante mencionar en este punto que se entiende por asociación bacteriana; término que se utilizará durante todo el desarrollo del presente trabajo de tesis. Asociación bacteriana alude tanto a las bacterias adheridas a la superficie celular como las

internalizadas. Cualquier método de cuantificación que implique la lisis de las monocapas sin que exista un tratamiento previo antibiótico, provoca el contacto de todas las bacterias presentes en las células, tanto las internas como las externas, resultando imposible discriminarlas. Por ello nos referimos a estas bacterias como asociadas, sin especificar si se encontraban en la superficie (adheridas) o internalizadas. Para los microorganismos no invasivos, asociación y adhesión constituyen términos equivalentes.

Dado que la formación de acúmulos durante la adhesión de la cepa 133 a los enterocitos (ver figura 4), podría interferir en la cuantificación por recuento de viables, se decidió emplear una técnica alternativa. El método de Breed, al utilizar el recuento visual microscópico, no ve alterado sus resultados por la presencia de bacterias agrupadas, ya que permite distinguir los microorganismos individualmente. Empleando esta técnica se determinó el porcentaje de asociación del lactobacilo a Caco-2 (figura 7).

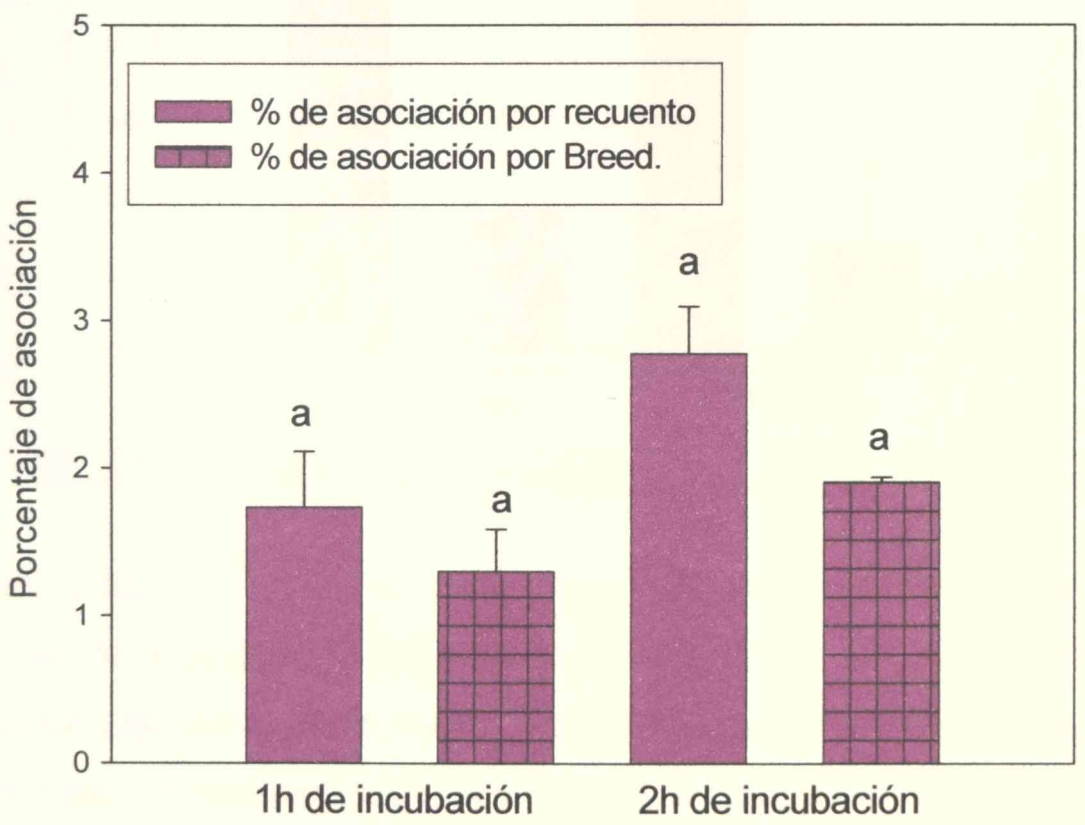


Figura 7. Porcentaje de asociación de la cepa 133 a Caco-2. Las barras lisas indican los porcentajes obtenidos por recuento de bacterias viables. Las barras cuadriculadas indican los porcentajes obtenido por la técnica de Breed. Letras diferentes significan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en test t de Student

Existió una buena correlación entre los porcentajes de asociación del lactobacilo a Caco-2 obtenidos por recuento de bacterias viables y aquellos obtenidos por Breed (figura 7). Se observó además una tendencia a hacia el incremento de la asociación del lactobacilo cuando la incubación se prolongó de 60 a 120 min. La presencia de una buena correlación entre las técnicas de cuantificación, implica que los acúmulos de lactobacilos sobre las células pueden ser disgregados efectivamente durante la preparación de las muestras para el conteo de bacterias viables. Por lo tanto este sería un procedimiento adecuado para la cuantificación de la asociación del lactobacilo a la línea celular Caco-2.

Por otra parte no existieron diferencias en la recuperación de lactobacilos totales incubados con o sin células cuando se cuantificaron utilizando recuento de microorganismos viables, lo cual apoya esta explicación (ver más adelante figura 12).

En busca de una correlación entre las diferentes características superficiales de la cepa 133 crecida en medio MRS o en TPY con propiedades biológicas (ver Capítulo I), se verificó la capacidad de asociación del lactobacilo a Caco-2 crecido en ambos medios de cultivo (figura 8).

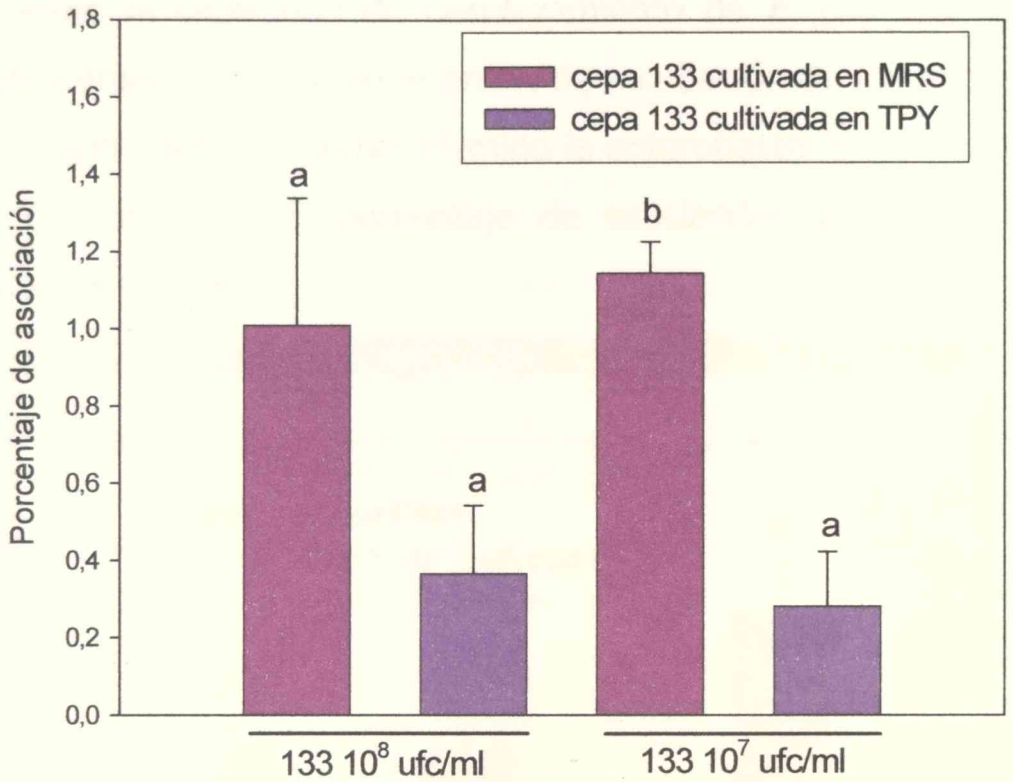


Figura 8. Porcentaje de asociación de la cepa 133 a Caco-2 , crecida en MRS o TPY. La cuantificación se realizó por recuento de bacterias viables .Las líneas sobre las barras representan la desviación estándar. Letras diferentes significan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en test t de Student

Utilizando el recuento de microorganismos viables se determinó que los porcentajes de asociación a las células Caco-2 del lactobacilo crecido en TPY fueron menores que aquellos obtenidos con la cepa 133 cultivada en MRS (figura 8). Es posible que en el caso del lactobacilo crecido en TPY la cuantificación esté subestimada dada la intensa autoagregación que sufre la cepa en estas condiciones (ver Capítulo I). Esta especulación se confirmó cuando se cuantificó la asociación del lactobacilo crecido en TPY mediante la técnica de Breed. Los porcentajes de asociación del lactobcilo crecido en TPY determinados por recuento microscópico se incrementaron a un 1.05% ± 0.04 en promedio; mientras que los porcentajes del lactobacilo crecido en MRS se mantuvieron en el orden de los obtenidos mediante recuento de microorganismos viables. No existieron por lo tanto diferencias significativas entre la asociación del lactobacilo a Caco-2 dependiendo de su crecimiento en TPY o MRS.

b) Asociación de *E. coli* en interacción con la cepa CIDCA 133.

Ensayos cuantificados por recuento de microorganismos viables

Considerando la capacidad de adhesión de la cepa CIDCA 133 a las células intestinales en cultivo, se decidió comprobar la existencia de un antagonismo en la asociación de *E. coli* por la presencia del lactobacilo. Se realizaron dos tipos de experiencias, por un lado se investigó la capacidad del lactobacilo de excluir a *E. coli* de la superficie celular (figura 9 A). En este caso se preincubaron durante 1 h las monocapas con la cepa 133 para luego coincubarlas con *E. coli* durante otros 60 min. Por otra parte se indagó sobre la capacidad de desplazamiento de *E. coli* por parte del lactobacilo. Durante estos ensayos se invirtió el orden de incubación de los microorganismos sobre la monocapa; colocándose en primer término la enterobacteria y al cabo de 1 h se añadió el lactobacilo (figura 9 B). El porcentaje de asociación se determinó por recuento de microorganismos viables.

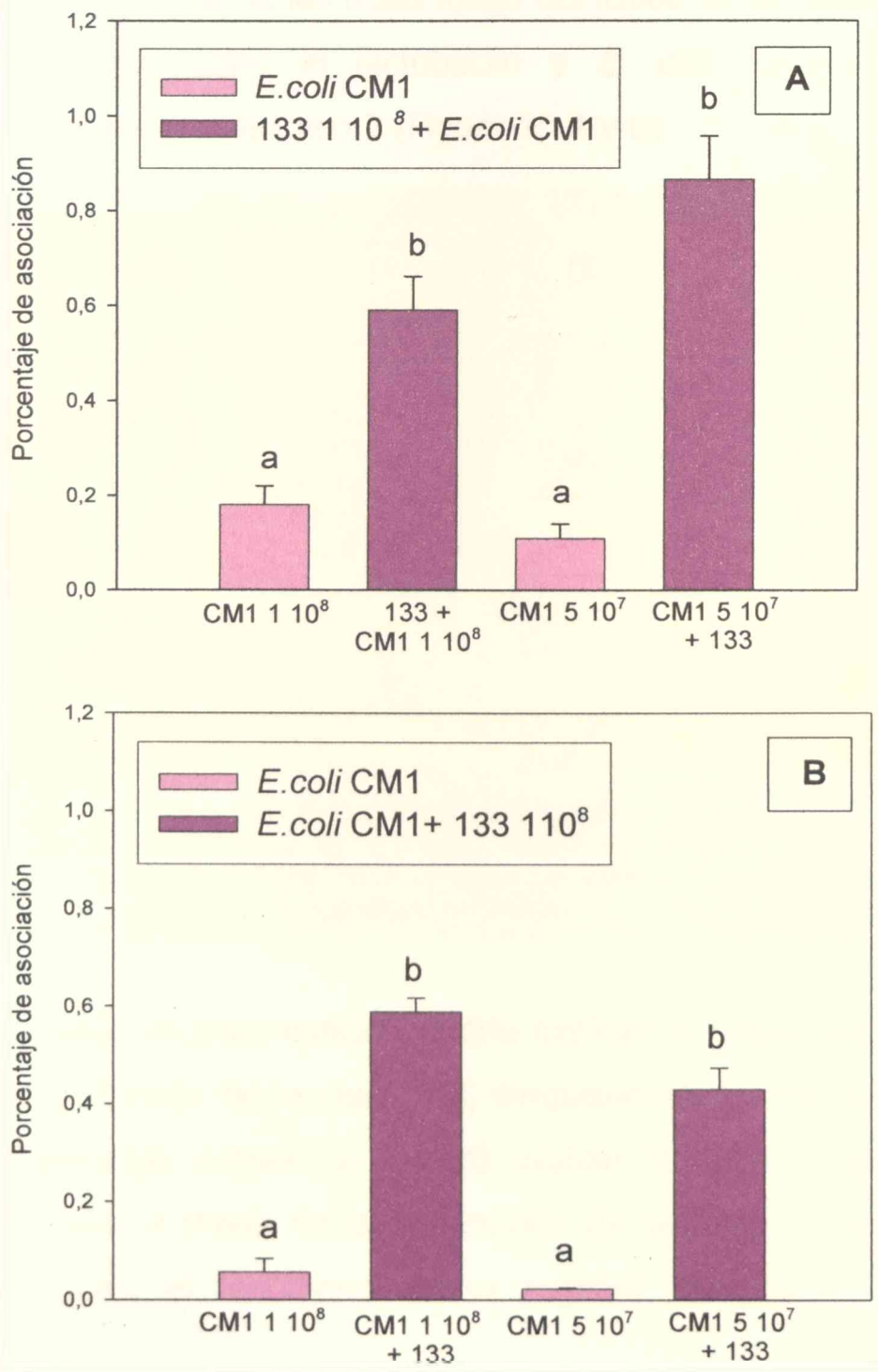


Figura 9. Asociación de *E. coli* CM1 en presencia de la cepa CIDCA 133. En la figura A se describen los porcentajes de asociación de *E. coli* sobre Caco-2 cuando su incubación es antecedida por la del lactobacilo. En la figura B se refleja la asociación de *E. coli* cuando el lactobacilo sigue a su incubación. La determinación de los porcentajes de asociación se realizó mediante recuento de bacterias viables. La concentración final del lactobacilo fue de 1 10^8 ufc/ml. La concentración de la cepa CM1 oscilo entre 1 10^8 y 5 10^7 ufc/ml. Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar. Letras diferentes significan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en test t de Student.

En la figura 9 A se representaron los porcentajes de asociación de *E. coli* CM1 a Caco-2 cuando el lactobacilo antecedió por una hora la incubación de la enterobacteria (ensayo de exclusión). Se observó que la asociación de *E. coli* en presencia del lactobacilo aumentó 5 veces en promedio desde 0.18% a 0.7%. Cuando se incubó en primer lugar a *E. coli* sobre las monocapas celulares y luego la bacteria láctica (ensayo de desplazamiento), se observó nuevamente un incremento en la asociación de la enterobacteria en presencia del lactobacilo. En este caso el aumento fue de 12.5 veces en promedio, desde 0.04% a 0.5%. Los porcentajes de asociación de *E. coli* con o sin lactobacilo en los dos tipos de ensayos (Figura 9 A y B), no difirieron estadísticamente entre sí.

Los resultados evidenciaron que la presencia del lactobacilo, tanto si antecede o es posterior a la incubación con *E. coli*, incrementa la asociación de esta enterobacteria a las células epiteliales en cultivo. Este efecto, aparentemente desfavorable, pudo ser adecuadamente interpretado a la luz de nuevos datos. Observaciones microscópicas de las suspensiones tomadas de las fosas luego del lisado de las monocapas; mostraron una intensa coagregación entre el lactobacilo y *E. coli*, junto con grandes acúmulos bacterianos sobre las células Caco-2 (Figura 10 A y B).

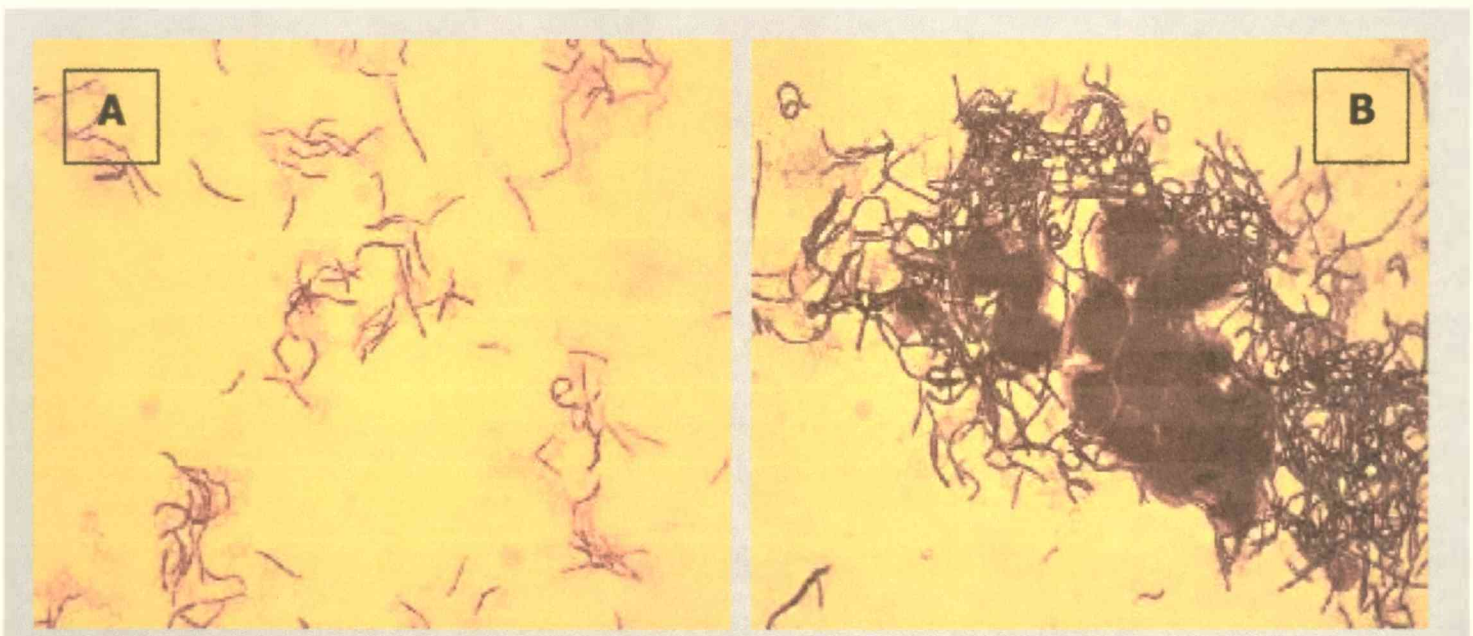


Figura 10. Coagregación entre *E. coli* CM1, el lactobacilo cepa 133 y células Caco-2. A) Imagen mostrando la agregación entre las bacterias. B Imagen que refleja la agregación entre las bacterias y las células. Las células fueron coloreadas mediante tinción de Gram. Las imágenes fueron tomadas luego de lisar la monocapa durante una hora con agua destilada. Magnificación 40X.

El fenómeno de coagregación podría explicar la mayor asociación de *E. coli* a los enterocitos en presencia de la cepa 133, simplemente porque las bacterias se adhieren entre sí. Sin embargo cuando se intentó evaluar la coagregación de suspensiones de *E. coli* y lactobacilo, a través de la disminución de la densidad óptica, en un sistema sin células eucarióticas; el fenómeno no se registró. Es posible, por lo tanto, que la

adherencia de las bacterias entre sí aumente en presencia de las células eucarióticas o sus metabolitos. Aunque no resultó técnicamente posible medir la disminución de la densidad óptica por coagregación bacteriana en presencia de células, se obtuvo una evidencia indirecta del fenómeno realizando una cuantificación de bacterias viables totales asociadas a las fosas. Para ello suspensiones del lactobacilo y *E. coli* se incubaron en las fosas con y sin células, suprimiendo el habitual lavado que antecede a la lisis de las monocapas (figura 11). Es decir que, si las bacterias coagregan en presencia de las células eucarióticas los recuentos de los microorganismos totales sobre las monocapas se verán disminuídos respecto de las fosas si células.

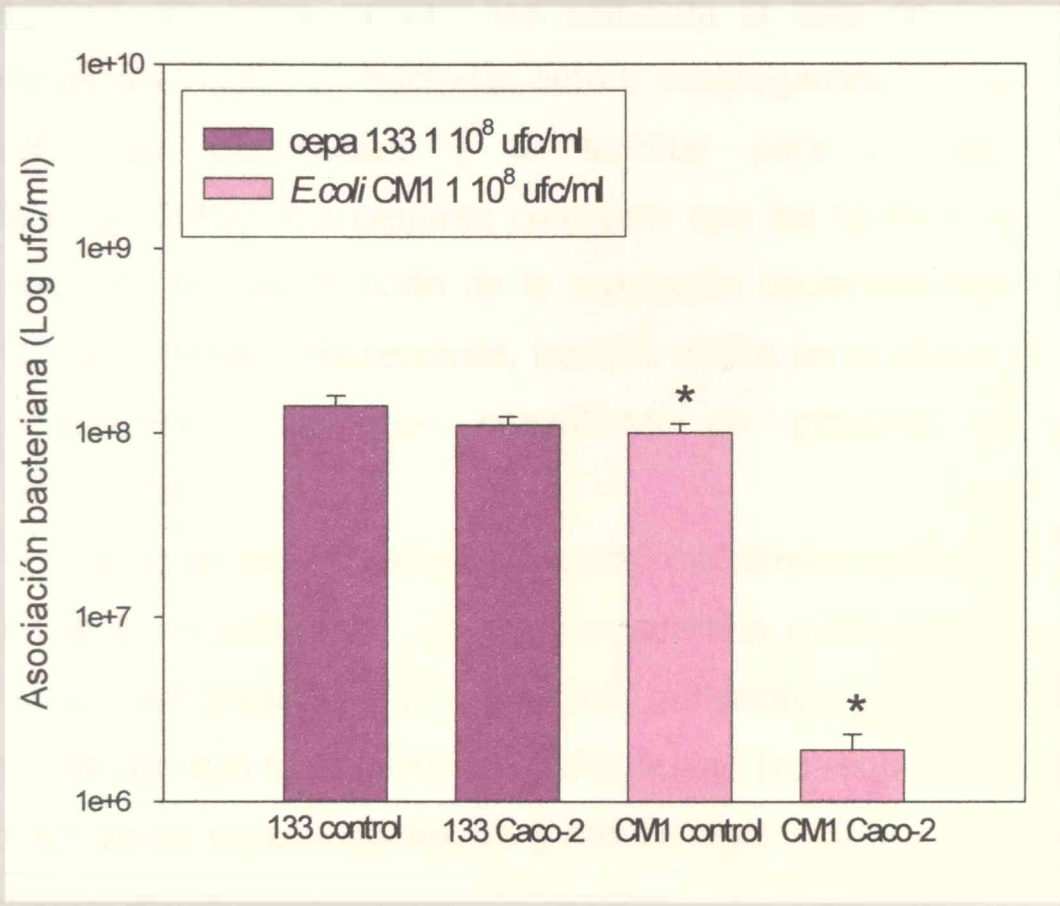


Figura 11. Asociación bacteriana total a Caco-2. Las barras indicadas como bacteria/Caco-2 representan a los microorganismos recuperados sin lavar desde las monocapas. Las barras indicadas como control representan las bacterias recuperadas de fosas sin células. Las incubaciones fueron de 1h. Los asteriscos representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en test t de Student.

Se observó que en los lactobacilos, el recuento de totales no se modificó por la incubación en presencia de las células eucarióticas, mientras que el recuento de *E. coli* disminuyó significativamente, con un valor de alrededor de 2 unidades logarítmicas (figura 11). Los resultados permiten inferir que para *E. coli* existe una importante coagregación entre la bacteria y las células eucarióticas, no observable en el caso del lactobacilo. Resulta evidente que, a igual número de bacterias, los microorganismos agregados darán menor cantidad de unidades formadoras de colonias que los no agregados. Otra posible explicación que justifique la disminución del número de viables de *E. coli* implicaría la muerte bacteriana por parte de metabolitos secretados por las células.

Ensayos cuantificados mediante la técnica colorimétrica de nitrato reductasa.

La existencia de acúmulos formados por bacterias y células generó dudas acerca de la fidelidad del recuento de microorganismos viables como técnica para expresar la asociación bacteriana, especialmente para *E. coli* CM1. Debido al pequeño tamaño del bacilo de *E. coli*, el conteo microscópico por la técnica de Breed resultó difícil de implementar. En la búsqueda de un método que permitiera cuantificar fidedignamente la asociación de *E. coli* CM1 a la línea Caco-2 se puso a punto una técnica enzimática basada en la reacción catalizada por la enzima nitrato reductasa bacteriana (ver Anexo). La utilización de una técnica enzimática colorimétrica permitió determinar la asociación de *E. coli* CM1 con independencia de la formación o no de agregados bacteria-bacteria o bacteria-célula. Ya otros autores han señalado la falta de fidelidad del recuento de microorganismos viables en bacterias auto o coagregantes (Bibiloni et al, 2000), además de objetar su laboriosidad y la lentitud para la obtención de resultados (Candela et al, 2005). Actualmente considera que las técnicas que cuentan con mayor objetividad para la cuantificación de la asociación bacteriana son aquellas que emplean marcación radioactiva o fluorescente, las que miden un producto de acción enzimática y más recientemente las que cuantifican un producto de amplificación PCR (Hierro et al, 2006).

El método de nitrato reductasa aportó numerosas ventajas respecto a las técnicas tradicionales de cuantificación de microorganismos como son el recuento de bacterias viables y la cuantificación por marcación radioactiva de microorganismos. Entre las mencionadas ventajas se encuentran: - simplicidad (no requiere equipamientos especiales a excepción de un espectrofotómetro y reduce significativamente la cantidad de material de laboratorio estéril empleado).

- rapidez (permite obtener en una jornada de trabajo los valores de asociación bacteriana).

- seguridad (constituye un procedimiento con escasos riesgos para el operador y el ambiente, a diferencia del empleo de radioisótopos).

Sin embargo todo método acarrea también algunos inconvenientes. En el caso de la utilización de la técnica de nitrato reductasa las principales desventajas residen en que:

- la cepa a cuantificar debe ser presentar una alta actividad enzimática.

- la sensibilidad del método no permite determinar asociaciones menores de $1\ 10^5$ ufc/ml.

A fin de que la técnica resulte apropiada para la determinación de la asociación bacteriana de *E. coli* en una suspensión conjunta con la cepa 133, es necesario que el

lactobacilo no interfiera en la actividad nitrato reductasa de la enterobacteria. En este sentido se observó que si bien la actividad nitrato reductasa de *E. coli* CM1 es efectivamente disminuída en la presencia del lactobacilo cuando se coincuban ambas bacterias en una mezcla de PBS-MRS (ver Capítulo IV), este fenómeno no se produjo cuando las bacterias se encuentran suspendidas en PBS (figura 12).

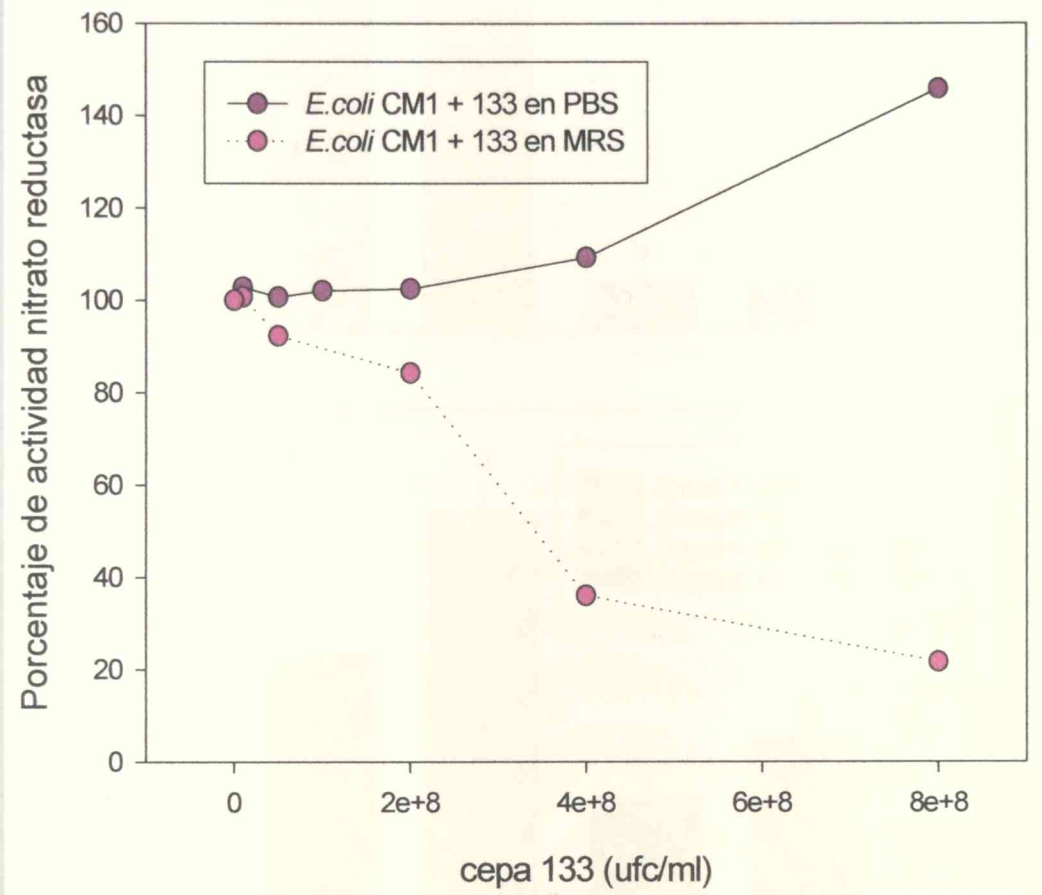


Figura 12. Porcentaje de actividad nitrato reductasa de *E. coli* CM1 en presencia de la cepa 133. *E. coli* se encuentra resuspendida en PBS en una concentración de 5 10^7 ufc/ml. La cepa 133 se halla resuspendida en PBS o MRS con la concentración indicada en abscisas. La incubación fue de 3 h a 37°C.

Mediante el ensayo representado en la figura 12 se determinó que la actividad nitrato reductasa de *E. coli* CM1 en presencia de la cepa 133 suspendida en PBS, se mantuvo en valores próximos al 100% hasta una concentración de 4 10^8 ufc/ml del lactobacilo. A partir de esta densidad bacteriana la actividad enzimática aumentó hasta un 140% respecto al control. Dado que en los ensayos realizados en este capítulo se empleó buffer PBS como medio de resuspensión bacteriana y la concentración de lactobacilo no superó 1 10^8 ufc/ml, la utilización de la técnica de nitrato reductasa como herramienta de cuantificación de la asociación de *E. coli* resultaría válida.

Cuando se evaluó la asociación de *E. coli* CM1 a Caco-2 en interacción con la cepa 133 utilizando como método de cuantificación la técnica colorimétrica de nitrato reductasa se obtuvieron resultados diferentes a los hallados cuando se empleó el recuento de microorganismos viables (figura 13 A y B).

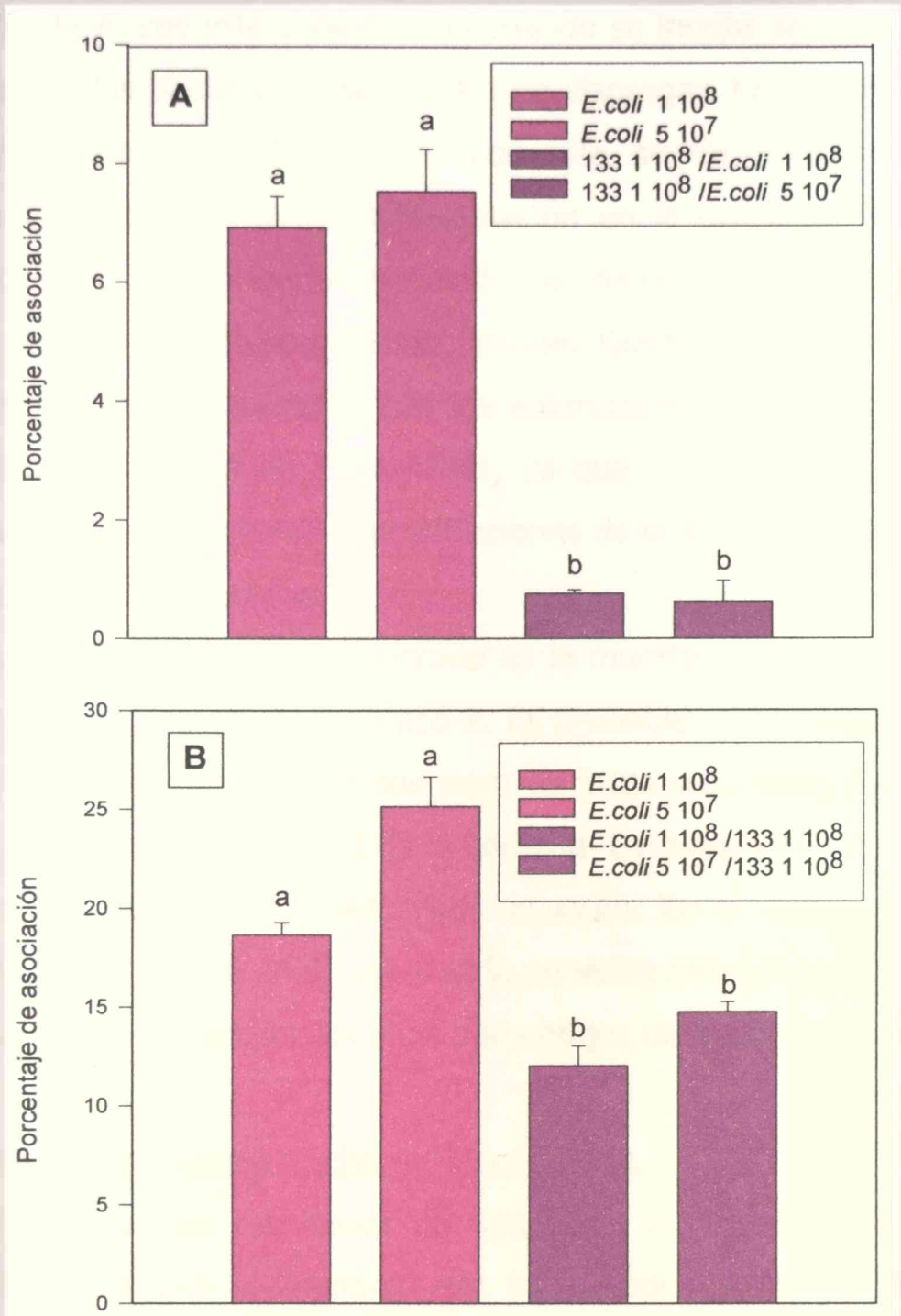


Figura 13. Porcentaje de asociación de *E. coli* CM1 a Caco-2 en interacción con la cepa 133. En la figura A se representan la asociación de *E. coli* cuando es precedida por la incubación del lactobacilo y su respectivo control de 1h. En la figura B se refleja la asociación de *E. coli* cuando la incubación del lactobacilo es posterior a ella y su respectivo control de 2h. Los controles de *E. coli* son de diferente tiempo debido a que si la enterobacteria es añadida en primer lugar permanece 2h totales sobre la monocapa, en cambio si es agregada en segundo lugar permanece sólo 1h. La cuantificación se realizó mediante la técnica de nitrato reductasa.

En primer lugar se observó que los porcentajes de asociación de *E. coli* CM1 aumentaron significativamente su valor con respecto a los hallados mediante la cuantificación por recuento de bacterias viables. A saber, desde 0.1% para el recuento de microorganismos viables hasta 13% para la determinación por nitrato reductasa (valores medios). A su vez, la asociación de *E. coli* se incrementó 3 veces en promedio al prolongarse la incubación de 60 a 120 min. Este fenómeno no se registró empleando la técnica anterior. Por otra parte, la adhesión de la cepa CM1 disminuyó significativamente cuando se incubó con el lactobacilo tanto en los ensayos de exclusión (figura 14 A) como en los de desplazamiento (figura 14 B). Durante los ensayos previos, cuantificados por recuento de microorganismos viables, la asociación a Caco-2 de *E. coli* en interacción con la cepa 133 se incrementaba significativamente respecto al control (ver figura 9). Dado

que se observaron numerosos acúmulos entre las bacterias y las células; es factible que la cuantificación de *E. coli* esté subestimada cuando se incuba sobre las monocapas ya que se forman acúmulos bacteria-célula difíciles de disgregar. En la cuantificación enzimática, los porcentajes de asociación de *E. coli* sola se incrementan en forma notable, probablemente porque no existe subestimación en la cuantificación. El aumento en el valor de adhesión podría poner en evidencia diferencias no detectadas mediante la técnica de recuento de microorganismos viables. Queda descartada la posibilidad de que la presencia de la cepa 133 junto con los enterocitos determine una disminución de la actividad nitrato reductasa de *E. coli* CM1, ya que no se registraron alteraciones en la actividad enzimática de distintas concentraciones de la enterobacteria coincubada con el lactobacilo sobre las monocapas.

Otro posible fenómeno involucrado es la muerte de *E. coli* debida a la acción de factores producidos por las células Caco-2. Es probable que la asociación de *E. coli* a los enterocitos sea efectivamente elevada pero distintas sustancias secretadas por aquellos determinen la pérdida de viabilidad de la bacteria. Esto explicaría los bajos porcentajes de asociación de *E. coli* sola registrados por recuento. En el caso de la cuantificación por nitrato reductasa la muerte de *E. coli*, podría no verse reflejada en su actividad enzimática inmediatamente; lo que explica los altos porcentajes de asociación observados.

Ensayos cuantificados mediante fluorescencia.

Debido a que los resultados de asociación de *E. coli* CM1 obtenidos mediante cuantificación enzimática contrastaron con los hallados utilizando recuento de bacterias viables, se decidió emplear una tercera técnica alternativa: la marcación fluorescente de microorganismos. Durante ensayos preliminares se procedió a marcar con BCECF – AM a la cepa CM1, tal como se había realizado con el lactobacilo (ver figura 5). Sin embargo la cepa de *E. coli* resultó refractaria a la coloración. De todas maneras, a fin de validar la confiabilidad de la cuantificación enzimática se utilizó una cepa fluorescente *E. coli* por expresión endógena de la proteína GFP (green fluorescen protein).

La proteína GFP es un polipéptido de 27kD que convierte la quimiolumiscencia azul de la proteína aequorina (perteneciente al pez *Aequorea victoria*) en luz verde fluorescente (Errampalli et al, 1999). El cromóforo activo es un tripéptido (para–hidroxi-bencil-dien-imidazolidona) de los residuos Ser-Tyr-Gly y depende de la presencia de oxígeno para madurar (Tsien, 1998). La proteína GFP salvaje absorbe luz azul bioluminiscente a 395 nm y emite a 510 nm. Esta proteína constituye un marcador atractivo para monitorear bacterias ya que su detección necesita solamente de la

irradiación de luz azul o del ultravioleta cercano y no requiere sustratos exógenos o medios complejos (Errampalli et al, 1999). En la cepa de *E. coli* empleada el gen de la proteína se encuentra inserto en un plásmido multicopia y su expresión es constitutiva.

En un primer momento, la cuantificación de la fluorescencia se intentó realizar mediante un fluorómetro pero debido a la concentración y el tamaño las células eucarióticas se registró una notable pérdida de la señal luminosa bacteriana. Por lo tanto, se decidió utilizar una técnica de observación microscópica junto con el posterior análisis de imágenes. Con este objetivo se tomaron microfotografías digitales de las monocapas con las bacterias asociadas. Posteriormente la intensidad lumínica de las fotografías fue cuantificada mediante un software analizador de imágenes. Se encontró una buena correlación entre los resultados de asociación de *E. coli* gfp obtenidos por cuantificación fluorescente y aquellos hallados por cuantificación enzimática (figura 14 A y B).

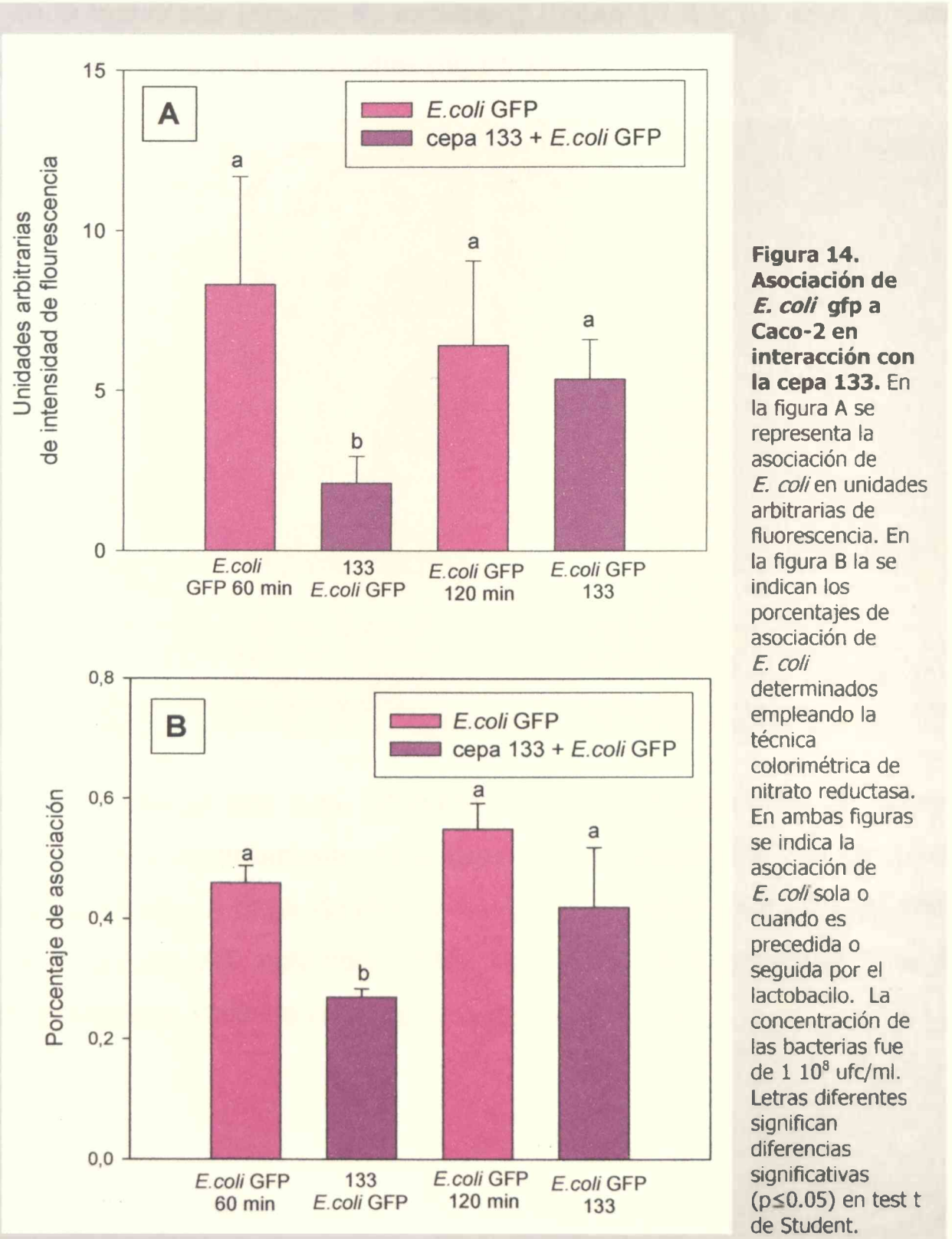


Figura 14. Asociación de *E. coli* gfp a Caco-2 en interacción con la cepa 133. En la figura A se representa la asociación de *E. coli* en unidades arbitrarias de fluorescencia. En la figura B la se indican los porcentajes de asociación de *E. coli* determinados empleando la técnica colorimétrica de nitrato reductasa. En ambas figuras se indica la asociación de *E. coli* sola o cuando es precedida o seguida por el lactobacilo. La concentración de las bacterias fue de 1 10^8 ufc/ml. Letras diferentes significan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en test t de Student.

E. coli gfp mostró porcentajes de asociación a Caco-2 entre 10 y 50 veces menores (figura 14 B), que los hallados para *E. coli* CM1 (figura 13 A y B) cuantificados ambos mediante nitrato reductasa. No se registró una diferencia significativa entre los valores de asociación de *E. coli* gfp encontrados para 60 o 120 minutos de incubación (figura 14 A y B), a diferencia de lo registrado para *E. coli* CM1 (figura 13 A y B). La preincubación de las monocapas con el lactobacilo disminuyó significativamente la asociación de *E. coli* gfp a las células en cultivo (figura 14 A y B). La incubación posterior de la cepa 133 no logró desplazar a *E. coli* gfp de las células Caco-2 (figura 14 A y B).

Evidentemente las diferentes cepas de *E. coli* mostraron comportamientos disímiles en algunos aspectos de la interacción entre células eucarióticas y bacterias. Sin embargo es importante destacar que el lactobacilo fue capaz de disminuir significativamente la asociación de *E. coli* gfp a Caco-2 cuando la precedió en la incubación de la monocapa (ensayo de exclusión) (figura 14 A y B). Este fenómeno se observó claramente en las microfotografías (figura 15 A y B).

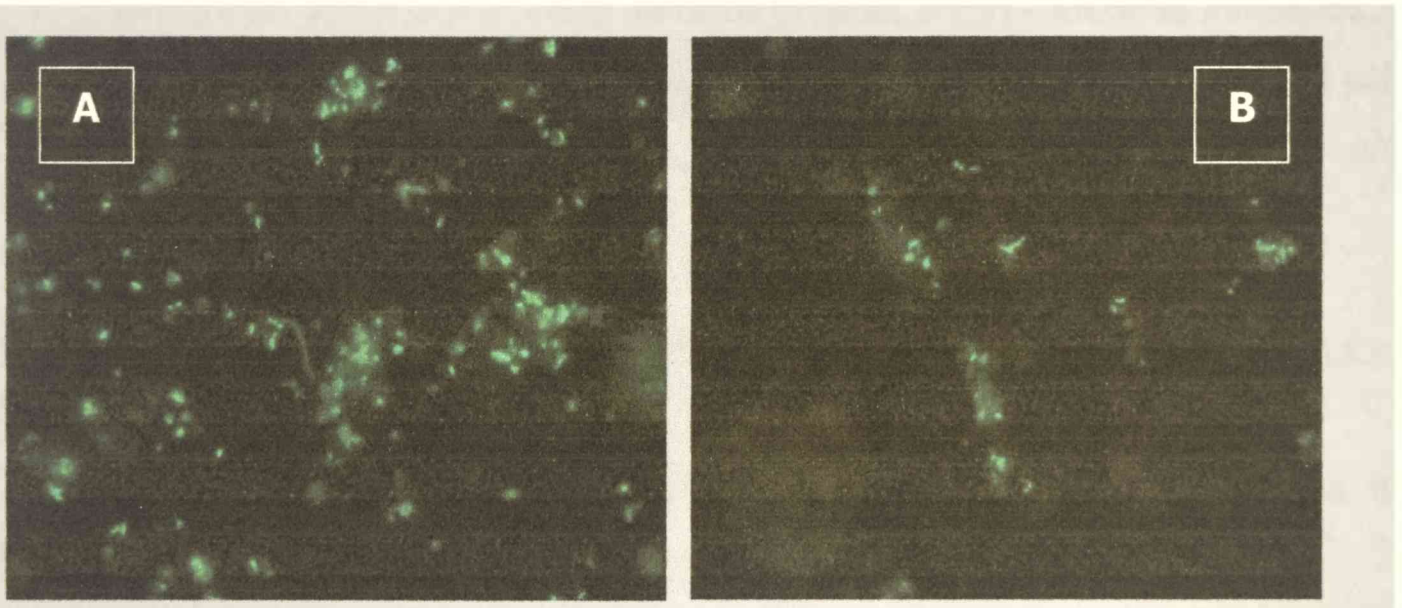


Figura 15. Imágenes de la asociación de *E. coli* gfp a Caco-2 en interacción con la cepa 133. En la imagen A se muestra la asociación de *E. coli* gfp sobre monocapas de Caco-2 luego de 60 min de incubación. En la imagen B se muestra la asociación de *E. coli* gfp cuando las monocapas fueron preincubadas con el lactobacilo cepa 133 durante 60 min. La magnificación de las imágenes fue de 40X.

El hecho de utilizar una cepa diferente de *E. coli* en esta serie de ensayos, no permitió confirmar el comportamiento de la cepa CM1 en interacción con los enterocitos en cultivo y el lactobacilo. A pesar de ello, la excelente correlación entre los resultados de asociación para *E. coli* gfp, obtenidos utilizando la técnica fluorescente y la técnica colorimétrica permitieron validarla como técnica de cuantificación.

Conclusiones.

En el presente capítulo se estudió la influencia de la producción de ácidos orgánicos y la adhesividad a enterocitos humanos en cultivo de la cepa 133 sobre *E. coli* CM1. Aunque existen numerosos estudios que combinan la acción de los sobrenadantes de cultivo con la asociación a células eucarióticas (Coconnier et al 2000, Bernet et al, 1993) debido al posible daño subletal generado sobre las bacterias Gram negativas por contacto con ácidos se decidió evaluar independientemente ambos mecanismos.

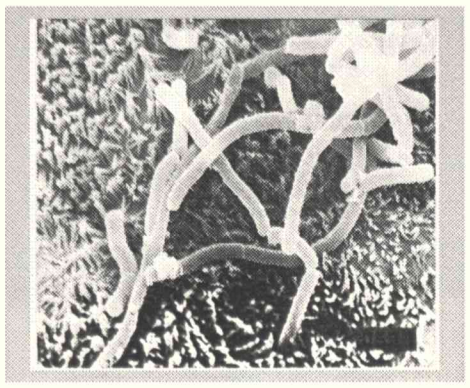
En cuanto a la inhibición del crecimiento de *E. coli* por sobrenadantes de cultivo de la cepa 133 es importante destacar:

- El efecto bactericida y/o bacteriostático de los sobrenadantes sobre la enterobacteria, observado incluso en altas diluciones.
- La accción antimicrobiana ejercida por los sobrenadantes es atribuíble principalmente a la presencia de ácido láctico, ya que no se registraron evidencias sobre la existencia de otros productos con capacidad inhibitoria.
- Los sobrenadantes diluídos alcanzaron pHs muy cercanos a 6 que es el pH intestinal promedio; por lo que posiblemente su acción sea efectiva en condiciones naturales.

Con respecto a las propiedades de adhesión del lactobacilo a enterocitos humanos se determinó que:

- El lactobacilo en estudio posee una buena capacidad de asociación a células eucarióticas (2-4%).
- La cuantificación del lactobacilo fue confiable tanto por recuento de microorganismos viables como por recuento microscópico.
- La interacción de la cepa 133 con *E. coli* CM1 o gfp reveló que el lactobacilo posiblemente impida el contacto efectivo de ambas cepas con la superficie de los enterocitos. Esta exclusión se explica posiblemente por la coagregación entre la enterobacteria y el lactobacilo
- La formación de acúmulos no totalmente disgregables entre el lactobacilo, *E. coli* y los enterocitos obligó al uso de técnicas de cuantificación distintas al recuento de microorganismos viables. Para lo cual se puso a punto la técnica colorimétrica de nitrato reductasa, comparándola con la cuantificación de bacterias fluorescentes.

Los resultados registrados dejan un margen de discusión acerca del efecto de la incubación con 133 sobre la asociación de *E. coli* CM1. El incremento de la asociación de *E. coli* a Caco-2 en presencia del lactobacilo registrado por recuento de microorganismos viables, versus la disminución de la asociación de la enterobacteria observada mediante la técnica de nitrato reductasa; resulta de difícil interpretación. Es posible que diversos mecanismos yuxtapuestos como la coagregación bacteriana y la pérdida de viabilidad de *E. coli* en contacto con las células, den cuenta de estos fenómenos. Sin embargo en la presente sección, donde por primera vez se estudia la interacción de la cepa 133 con *E. coli*, se vislumbran capacidades deseables en una cepa potencialmente probiótica.



CAPÍTULO IV

Antagonismo de la actividad nitrato reductasa de *E.coli* por parte de la cepa CIDCA 133

CAPÍTULO IV

E.coli es un microorganismo anaerobio facultativo; normalmente habita el medio anaeróbico intestinal. La organización de las rutas centrales de su metabolismo reflejan su adaptación a este medio anaeróbico. La bacteria produce energía a través de la fermentación ácido-mixta y mediante la respiración, utilizando diferentes aceptores terminales de electrones incluyendo el oxígeno. *E. coli* contiene una amplia diversidad de vías de respiración aeróbica y aneróbica con 15 deshidrogenasas primarias y 10 reductasas terminales. Estas deshidrogenasas y reductasas incluyen isoenzimas para los diferentes dadores de electrones (H_2, formiato, NADH y glicerol-3-P) y aceptores (O_2 y nitrato) (Unden y Bongaerts, 1997). En condiciones de anaerobiosis, la ruta respiratoria energéticamente más favorable empleada por *E. coli* utiliza el formiato como dador de electrones para la reducción del nitrato. La presencia de nitrato reprime el empleo de vías respiratorias anaeróbicas alternativas que resultan menos eficientes.

En *E. coli* existen tres enzimas nitrato reductasas biológica y genéticamente distintas. Dos de ellas están ancladas en la membrana y se denominan genéricamente nitrato reductasas asociadas a membrana (respiratory membrane–bound nitrate reductases) cuyas siglas en inglés son NAR. Estas isoenzimas de membrana corresponden a la nitrato reductasa A (NRA) y nitrato reductasa Z (NRZ). La tercera enzima tiene ubicación periplasmática, denominándose nitrato reductasa periplásmica (Nap) (Richardson y Watmough, 1999). La enzima NRA se expresa en condiciones anaeróbicas inducida por la presencia de nitrato y representa el 90% de la actividad total. NRZ es una

proteína constitutiva. La expresión de Nap es inducida en condiciones anaeróbicas y por la presencia de nitrato y en menor medida de nitrito (Conrado Moreno et al, 1999).

Las proteínas Nar (pertenecientes a las isoenzimas nitrato reductasas asociadas a membrana) están compuestas por tres subunidades: la subunidad α catalítica (NarG) que contiene un cofactor de molibdeno, la subunidad β (NarH) que posee un centro [3Fe-4S] y tres centros [4Fe-4S] y la subunidad γ (NarI) con un grupo prostético bihem b (figura 1). Las subunidades α y β están ancladas del lado citoplasmático de la membrana interna mediante la subunidad γ. Las enzimas Nar utilizan el pool de quinonas (Q) como los dadores fisiológicos de electrones y generan fuerza protón motriz (FPM) por un mecanismo asociado a reacciones redox de horquilla. NarI oxida a los quinoles en el lado externo de la membrana, interna liberando dos protones al periplasma. Los electrones pasan a NarG a través de los centros Fe-S de NarH, a fin de reducir al nitrato con consumo de dos protones citoplasmáticos (Conrado Moreno et al, 1999).

La estructura y el mecanismo propuesto de reducción de nitrato a nitrito en *E. coli* por las proteínas Nar se esquematizan en la figura 1.

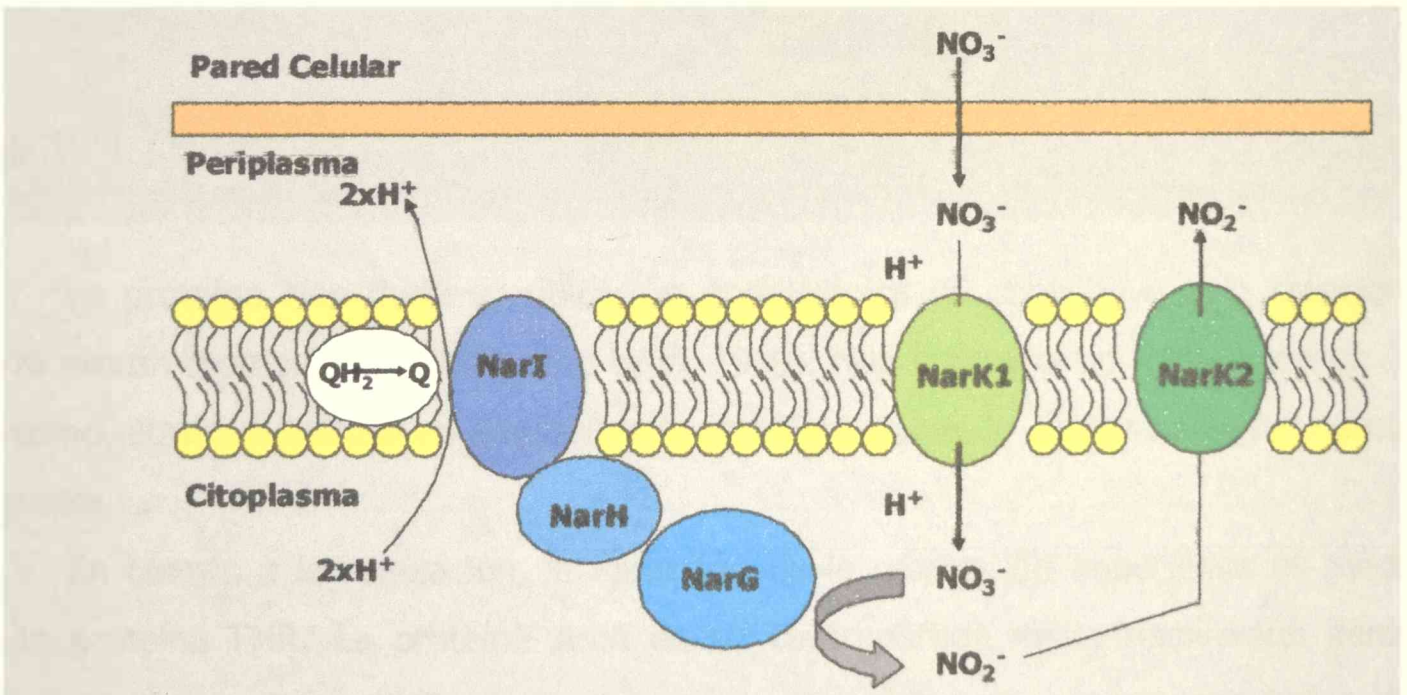


Figura 1. Diagrama de la reducción respiratoria del nitrato por las enzimas Nar. QH_2 y Q indican las quinonas reducidas y oxidadas respectivamente.

A consecuencia de la localización citoplásmica de la subunidad α (catalítica), el nitrato tiene que ser transportado dentro de las células antes de ser reducido. La proteína NarK1 es un transportador conjunto de protones y nitrato (figura 1). Los protones cotransportados se consumen en la reducción del nitrato. Una vez que la reacción de reducción de nitrato avanza se acumulan nitritos; en este punto la función de NarK1 es reemplazada por NarK2 (figura 1). Nark2 es un antiportador nitrato-nitrito, que permite

mantener un estado equilibrado de concentraciones de los metabolitos producidos (González et al, 2006).

La proteína Nap (nitrato reductasa periplasmática) (Figura 2) es un heterodímero que contiene una subunidad catalítica (NapA), con un cofactor molibdeno y un centro [4Fe-4S] además de una subunidad NapB que recibe los electrones de NapC un citrocromo tetrahem c anclado en la membrana, que representa la tercera subunidad.

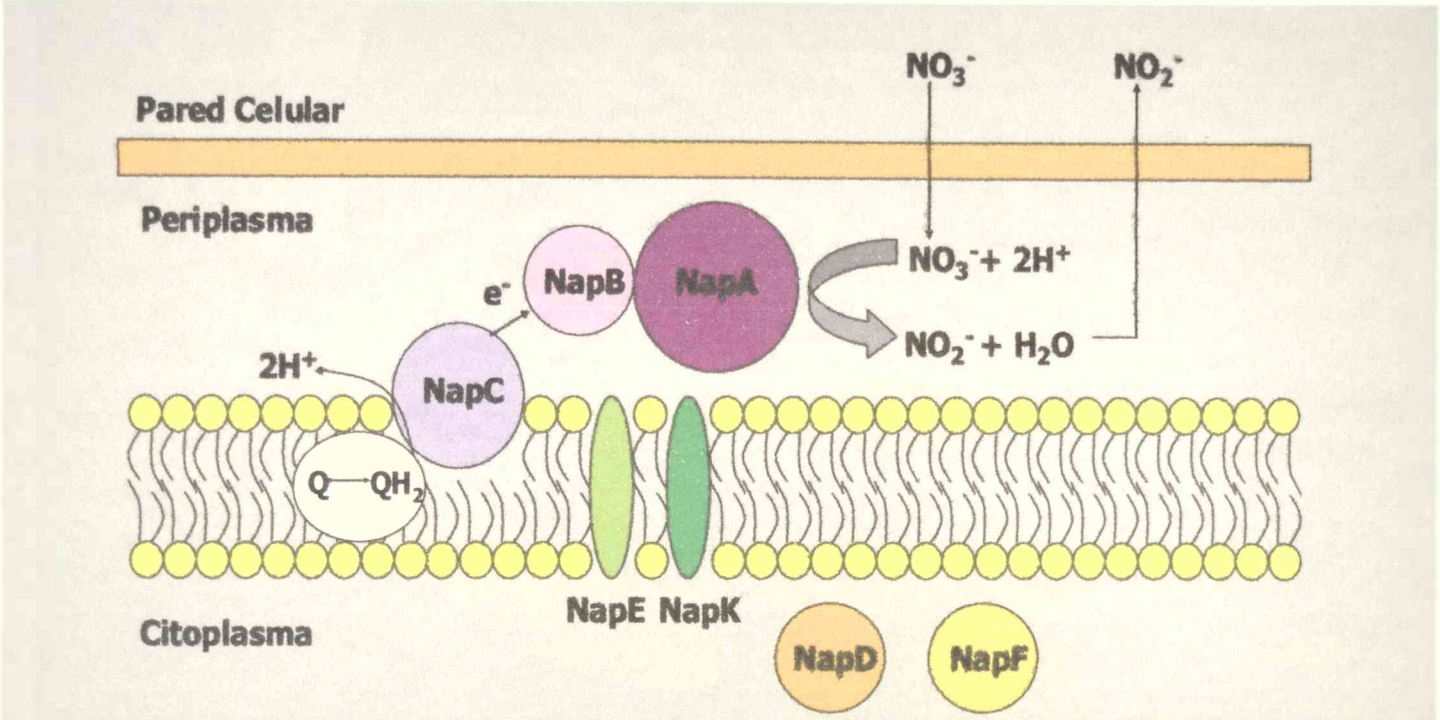


Figura 2. Reducción de nitrato en el periplasma por la enzima Nap. NapE, D, F y K son proteínas codificadas en el mismo operón *nap* que no están involucradas directamente en la reducción del nitrato.

La proteína Nap dada su ubicación periplásmica no contribuye a la creación de fuerza protón motriz (Conrado Moreno et al, 1999). Nap cumpliría un rol importante en *E. coli* como nitrato reductasa en ambientes anaeróbicos donde la concentración del sustrato es escasa.

En cuanto a la regulación, la inducción de la respiración anaeróbica es mediada por la proteína FNR. La proteína ArcA es su contrapartida en la respiración aeróbica (figura 3). La proteína FNR es un sensor de O_2 a la vez que un regulador de la transcripción. Cuando el tenor de O_2 se encuentra reducido, la proteína FNR activa numerosos genes relacionados con la respiración anaeróbica como la enzima fumarato deshidrogenasa, el trasportador de nitrito y la enzima piruvato formiato liasa (Unden y Bongaerts, 1997).

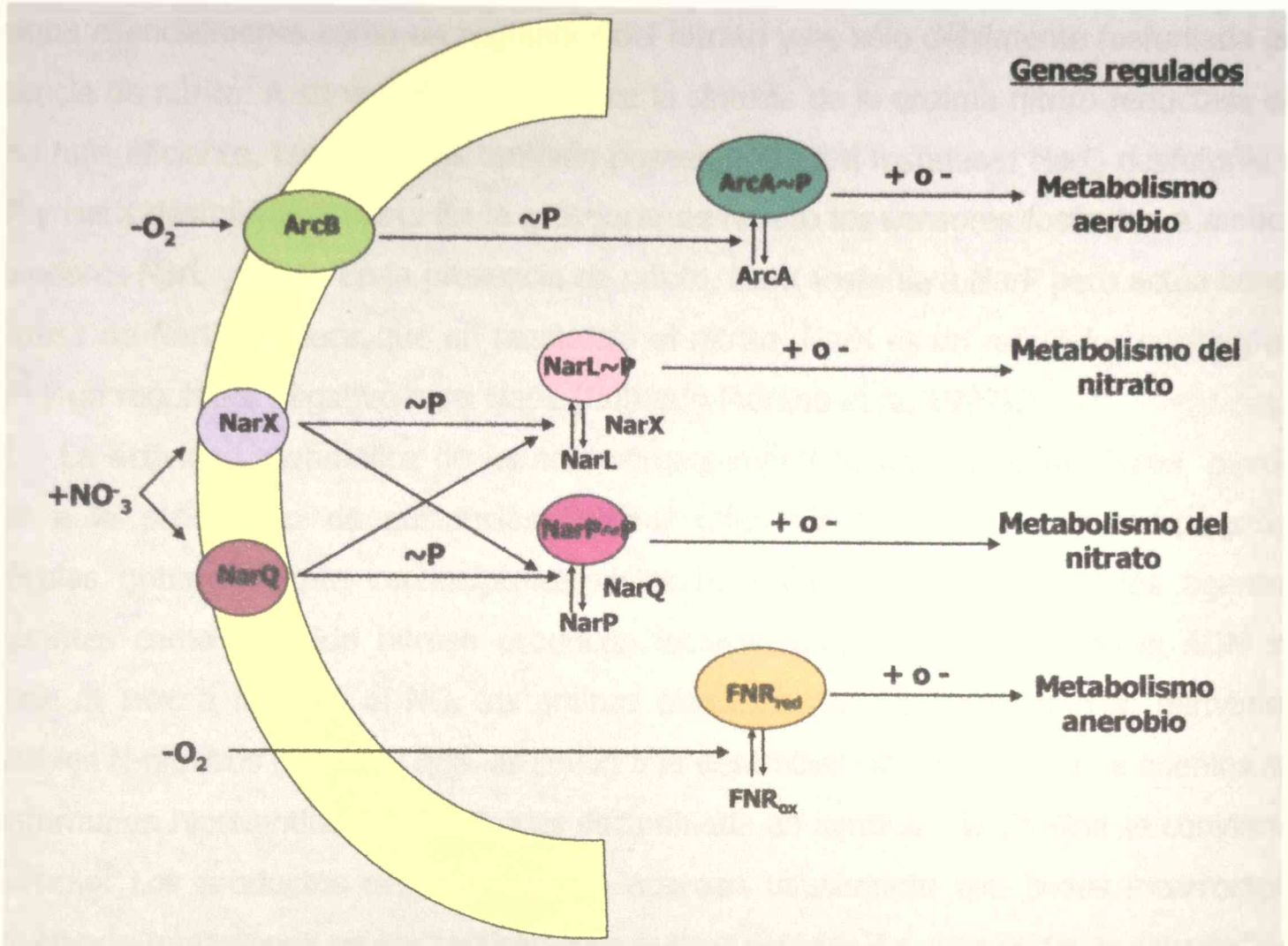


Figura 3. Modelo de los sensores y reguladores involucrados en la expresión de genes del metabolismo aerobio, anaerobio y del nitrato en *E. coli*. Los sensores son ArcB, NarX y NarQ, Los reguladores son ArcA, NarL y NarP. El FNR es un regulador-sensor citoplasmático. Los estados activos fosforilados de los reguladores se señalan como ~P. Tomado y modificado de Unden y Bongaerts, 1997.

Específicamente, la regulación del metabolismo del nitrato está mediada por dos sistemas sensores reguladores (figura 3). El sondaje del nitrato y nitrito se realiza por dos proteínas de membrana homólogas NarX y NarQ, las cuales controlan la actividad de los reguladores NarL y NarP a través de la transferencia de un grupo fosfato. Cada uno de los sensores responde tanto a la presencia de nitrato como de nitrito y pueden fosforilar a ambos reguladores. NarL y NarP activan la expresión de las vías catabólicas del nitrato y nitrito y reprimen otros sistemas de respiración anaeróbica como la vía fumarato reductasa o genes involucrados en la fermentación. NarL regula un mayor espectro de genes comparada con NarP y se considera la proteína reguladora general del metabolismo del nitrato (Unden y Bongaerts, 1997). Algunos operones se controlan solamente por la proteína NarL como la enzima nitrato reductasa A (NRA), fumarato reductasa y el transportador de nitrito. Otros genes se encuentran regulados por ambas proteínas como el responsable de la codificación de la enzima nitrito reductasa o de la enzima nitrato reductasa periplásmica (Nap). En el caso de la proteína Nap, NarP constituye un regulador positivo y NarL es un regulador negativo.

Este complejo sistema regulatorio discrimina entre el nitrato y el nitrito: NarL funciona esencialmente como un regulador del nitrato y es sólo débilmente fosforilada en presencia de nitrito. A su vez el nitrito induce la síntesis de la enzima nitrito reductasa en forma más eficiente. Los sensores también poseen actividad fosfatasa: NarQ desfoforila a NarP y NarX desfoforila a NarL. En la presencia de nitrato los sensores fosforilan a ambos reguladores NarL y NarP. En la presencia de nitrito, NarX fosforila a NarP pero actúa como fosfatasa de NarL. Es decir que en respuesta al nitrito, NarX es un regulador positivo de NapP y un regulador negativo para NapL (Conrado Moreno et al, 1999).

La actividad metabólica de los microorganismos intestinales como *E. coli* puede llevar a la producción de sustancias dañinas tales como los N-nitroso compuestos, moléculas potencialmente carcinogénicas (Goldin, 1986). Es sabido que, los agentes nitrosantes como el óxido nitroso producen lesiones mutagénicas. Cuando el ADN se expone *in vitro* a HNO_2 o al NO, las aminas exocíclicas de las bases forman derivados inestables N-nitrosos (N-N=O) que les llevan a la desaminación. Por lo tanto la adenina se transforma en hipoxantina, la guanina es desaminada en xantina y la citosina se convierte en uracilo. Los productos desaminados se aparean usualmente con bases incorrectas, produciendo mutaciones en las replicaciones subsiguientes. Por otra parte, la nitrosación de aminas secundarias y amidas celulares genera agentes alquilantes que causan lesiones mutagénicas en diferentes partes del ADN (Weiss, 2006).

Estudiando las vías de respiración anaerobia de *E. coli* en relación a la posible formación de metabolitos peligrosos, se comprobó que durante el metabolismo del nitrato y nitrito se genera un subproducto mutagénico, el agente nitrosante N_2O_3 (trióxido de dinitrógeno) (figura 3).

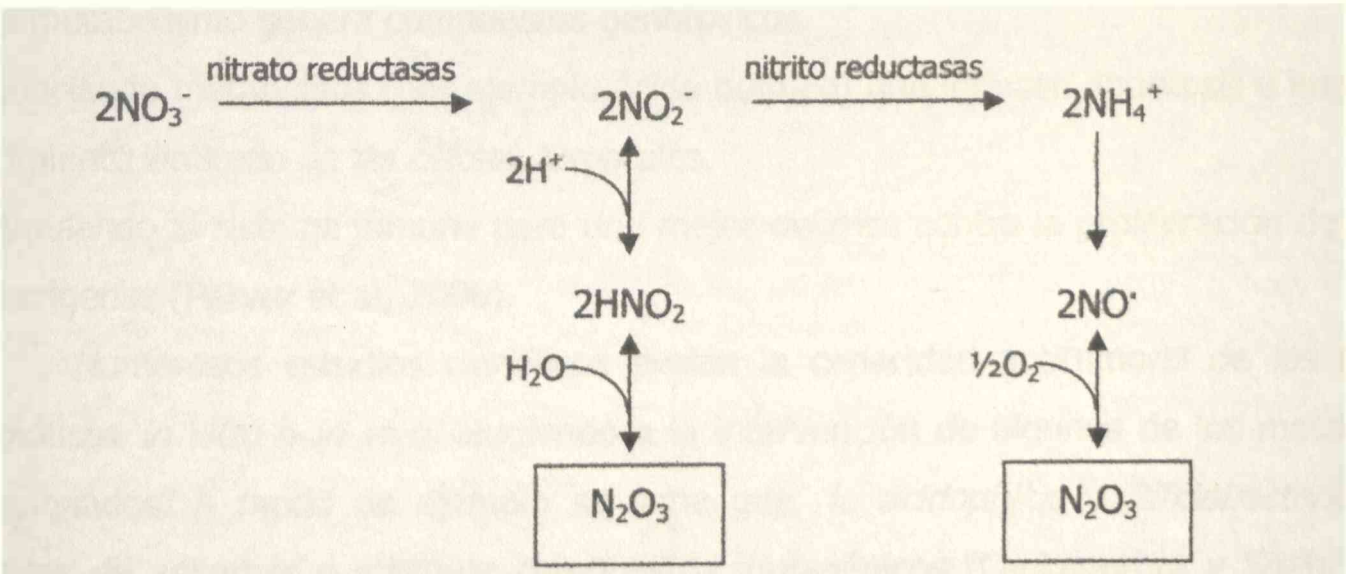


Figura 4. Diagrama de reacciones para la producción del agente mutagénico N_2O_3 durante el metabolismo de nitrato y nitrito en *E. coli*. El NO· es un subroducto menor de la actividad nitrito reductasa. Tomado y modificado de Weiss, 2006.

El N_2O_3 puede obtenerse de la condensación del ácido nitroso (HNO_2) o de la autooxidación del óxido nítrico (NO) (figura 4). A fin de protegerse del nitrito, los microorganismos mantienen su concentración en un bajo nivel. La reducción de los niveles de nitrito se logra mediante la actividad nitrito reductasa, que transforma el nitrito en amonio, o a través de la expulsión del metabolito por bombas de eflujo (Weiss, 2006).

Además de la producción endógena de sustancias nitrogenadas potencialmente dañinas para el hospedador, numerosos compuestos que alcanzan el intestino son susceptibles de sufrir N-nitrosación por las bacterias habitantes del tracto gastrointestinal. Estas reacciones podrían estar relacionadas con la actividad nitrato y nitrito reductasa de estos microorganismos (Calmels et al, 1985,1996).

Los N-nitroso compuestos son potentes agentes inductores de cáncer colon-rectal en animales (Payne, 1990). El carcinoma de colon humano está relacionado en la mitad de los casos con mutaciones del gen *ras*, que en general implican transiciones G-A de la segunda base de un par GG. Este tipo de lesión es característicamente provocado por agentes alquilantes (Bos, 1989). Al respecto, los N-nitroso compuestos pueden generar agentes alquilantes por nitrosación de aminas secundarias y amidas (ver más arriba).

La exposición del hombre a los agentes mutagénicos químicos es un riesgo potencial para el desarrollo de cáncer. En particular, los compuestos cancerígenos que afectan el tracto gastrointestinal pueden provenir de la dieta o del metabolismo bacteriano. Los cultivos probióticos pueden disminuir la exposición o el efecto de estos agentes por diferentes mecanismos: - detoxificando o adsorbiendo los carcinógenos ingeridos.

-modificando el microambiente intestinal y disminuyendo las poblaciones de bacterias cuyo metabolismo genera compuestos genotóxicos.

-produciendo metabolitos (por ejemplo ácido butírico) que inducen apoptosis e impiden el crecimiento ilimitado de las células tumorales.

-estimulando al sistema inmune para una mejor defensa contra la proliferación de células cancerígenas (Parvez et al, 2006).

Numerosos estudios científicos avalan la capacidad antitumoral de los cultivos probióticos *in vitro* o *in vivo,* aludiendo a la intervención de algunos de los mecanismos mencionados. A modo de ejemplo se sabe que, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium* son capaces de adsorber o inactivar compuestos mutagénicos (Lankaputhra y Shah, 1998). Asimismo, *L .acidophilus* incrementa en cultivos celulares la producción de las citoquinas interleuquina (IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), los cuales poseen una potente actividad citotóxica y citostática sobre las células neoplásicas (Rangavajhyala, et

al 1997). Los extractos de *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. helveticus* poseen actividad anticancerígena en el tratamiento de sarcomas de ratón (Friend y Shahani, 1984). Por otra parte, la ingestión de *L. acidophilus* y *Bifidobacterium* reduce la aparición de tumores colónicos inducidos por dimetilhidrazina (DMH) en ratas (Gallaher et al, 1999 y McIntosh et al, 1999). A su vez, el consumo de *L. casei* incrementa el período sin recurrencias de cáncer de vejiga humano (Aso et al, 1995).

En general, los trabajos que aluden a la disminución de las actividades enzimáticas procarcinogénicas en el tracto gastrointestinal (β-glucoronidasa, azoreductasa, nitroreductasa, 7-α-deshidrogenasa y 7-α-deshidroxilasa) por consumo de probióticos, refieren como mecanismo interviniente el desplazamiento de las bacterias que poseen estas enzimas en sus vías metabólicas (Ling et al, 1992 y 1994; Ballongue et al, 1997).

En relación con lo expuesto el presente capítulo contiene el estudio realizado sobre la actividad nitrato reductasa de *E. coli* en interacción con la cepa CIDCA 133. En este contexto se sometió a prueba la hipótesis que adjudica la reducción de la actividad nitrato reductasa de *E. coli* a la inhibición directa de la enzima por parte del lactobacilo.

Metodología.

Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.

Se utilizaron las cepas CM1 de *E. coli* junto con las cepas de lactobacilos CIDCA 133 y LBB descriptas previamente.

E. coli CM1 fue crecida sin agitación en medio nutritivo conteniendo extracto de carne (3 g/l), peptona de carne (5 g/l) y nitrato de sodio 0.1%. La incubación se realizó durante 16 h a 37ºC. La presencia del nitrato resulta importante para la correcta inducción de la actividad nitrato reductasa (Shoeb et al, 1991).

L. delbrueckii subsp *lactis* y *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* fueron crecidos en condiciones anaeróbicas en MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) con 0.5% de cisteína a 37ºC durante 16 h.

Determinación de la actividad nitrato y nitrito reductasa de *E. coli*.

La actividad nitrato reductasa fue determinada utilizando la reacción de diazotación para el nitrito con ácido sulfanílico y naftilen diamina (Mc Namara et al, 1971). El formiato fue añadido como sustrato reductor, ya que la actividad formiato deshidrogenasa está muy relacionada con el sistema nitrato reductasa (Payne, 1973).

Las muestras fueron incubadas en una mezcla de 5 partes de 1% (p/v) de nitrato de sodio y 3 partes de formiato de sodio (1M) por 2 h a 37ºC. Las suspensiones fueron luego centrifugadas 1 min a 14.000 g. Posteriormente se tomó 0.1 ml del sobrenadante y se mezcló con 0.1 ml de ácido sulfanílico (1% p/v) y 0.1 ml de N-naftil-etil-dicloro de amonio (0.02% p/v), ambos en HCl (1.5 M). Las mezclas permanecieron durante 10 min a temperatura ambiente para permitir el desarrollo del color producto de la reacción de diazotación. La absorbancia se midió a 540 nm en un lector de placas (ELISA Plate Reader STL Rainbow Reader, Wien, Austria).

La determinación de la actividad nitrito reductasa, se realizó mediante la cuantificación del amonio producido utilizando una adaptación del método colorimétrico de Nessler (Clescerl et al, 1999).

La actividad nitrato reductasa específica de *E. coli* fue calculada como la razón Absorbancia a 540 nm/log ufc/ml.

Experimentos de coincubación

Se utilizaron cultivos en fase estacionaria tanto para el lactobacilo cepa CIDCA 133 como para *E. coli*. Ambas bacterias fueron colectadas por centrifugación a 3000 g por 10 min. *E. coli* fue resuspendida en buffer PBS a una densidad de 2 10^7 ufc/ml. El lactobacilo

fue resuspendido en MRS con o sin glucosa (20 g/l) a una concentración máxima de 4 10^8 ufc/ml. Se obtuvieron diferentes densidades bacterianas del lactobacilo diluyendo la suspensión de más concentrada de dicha cepa en forma seriada.

Distintas concentraciones del lactobacilo resuspendido en MRS con y sin glucosa fueron mezcladas con un volumen equivalente de la suspensión de *E. coli* CM1 en PBS. Las mezclas fueron incubadas a 37ºC durante 1 h. Posteriormente se añadió la solución de nitrato y formiato, continuando la incubación en las mismas condiciones durante otras dos horas. La concentración de nitrito se determinó en el sobrenadante de las muestras, tal como se indicara anteriormente, luego de centrifugar las suspensiones.

En algunos ensayos se utilizaron lactobacilos no viables o sobrenadantes de cultivo del lactobacilo libre de células. En el primer caso, la cepa 133 se inactivó mediante radiación UV. Para ello se utilizó una cámara con temperatura controlada, compuesta de 4 lámparas (254 nm, U.V Lux 30W/G30 T8, Phillips), de baja presión de mercurio, colocadas en la parte superior de la misma. Las muestras se irradiaron en agitación durante 15 min, empleando una intensidad de luz U.V de 3.3 mW/cm2. Luego del tratamiento las bacterias viables tuvieron un recuento $<10^2$ ufc/ml. Por otra parte, los sobrenadantes del lactobacilo libre de bacterias se obtuvieron por centrifugación y filtración de suspensiones de distintas concentraciones del microorganismo en MRS con o sin glucosa incubadas durante 3 h a 37ºC.

La determinación del número de microorganismos viables se realizó mediante recuento en placa. Para ello diluciones apropiadas de las bacterias en solución fisiológica fueron sembradas en placas conteniendo agar nutritivo, en el caso de *E. coli* CM1, o agar MRS, en el caso de la cepa 133. Las incubaciones se efectuaron en aerobiosis a 37ºC durante 24 h.

Determinación de ácidos orgánicos.

La cuantificación de ácidos orgánicos de los sobrenadantes de cultivo de la cepa CIDCA 133 se realizó mediante HPLC. La técnica se especificó en el Capítulo III.

Análisis estadístico.

Las medias fueron comparadas a través de la prueba de dos colas del test de Student's utilizando el software de InfoStat (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Resultados y discusión.

A fin de comprobar la existencia de alguna modificación en la actividad nitrato reductasa de *E. coli* CM1 por la presencia del lactobacilo cepa CIDCA 133, se coincubaron ambas cepas en una suspensión de MRS/PBS durante 3 h a 37ºC.

La primera observación realizada en el sistema propuesto, reveló que el lactobacilo era capaz de disminuir la actividad nitrato reductasa de *E. coli* (figura 5).

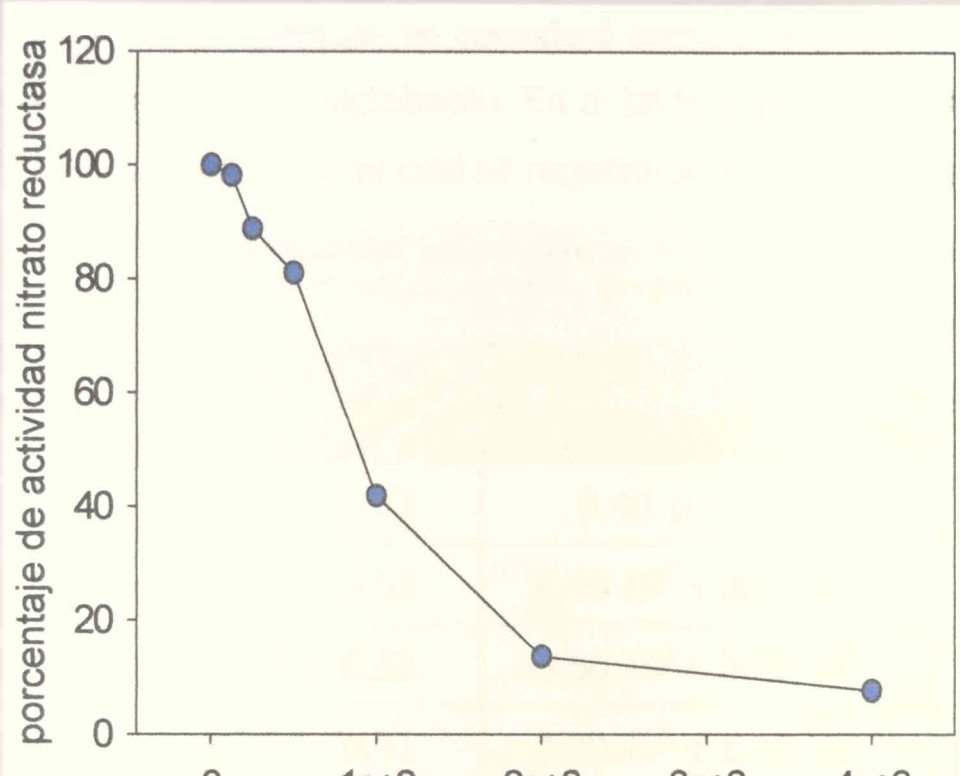


Figura 5. Determinación del porcentaje de actividad nitrato reductasa de la cepa CM1 en presencia de la cepa CIDCA 133. En absisas se indica la concentración final del lactobacilo en ufc/ml. En ordenadas se indica el porcentaje de actividad nitrato reductasa en la suspensión bacteriana.

Se registró una relación dosis respuesta inversa entre la concentración del lactobacilo y el porcentaje de actividad nitrato reductasa de *E. coli* CM1 (figura 5). A mayor concentración de la cepa 133, menor cantidad de nitrito producido. La disminución en la concentración de nitrito se reflejó en la menor absorbacia a 540 nm desarrollada en la reacción colorimétrica por las suspensiones que contenían un mayor número de lactobacilos.

Esta primera observación resultó ser muy positiva, ya que señalaba un posible antagonismo del lactobacilo sobre una actividad enzimática de *E. coli* potencialmente perjudicial. Sin embargo debido a ciertas características del sistema empleado, la disminución de la actividad nitrato reductasa podría haber sido sobrestimada. Dado que el medio MRS contiene una alta cantidad de glucosa, resultaba posible que el lactobacilo acidificara la suspensión durante las 3 h de incubación. Los lactobacilos típicamente utilizan la glucosa por vía fermentativa para formar ácido láctico. La disminución del pH

podría determinar una pérdida de viabilidad de *E. coli*, por lo tanto la menor cantidad de nitrito producido sería un reflejo de un menor número de bacterias viables en vez de una disminución real de la actividad enzimática. Debido a esta posibilidad, en los sucesivos experimentos se procedió a registrar para cada condición el pH, la concentración de *E. coli* viable así como la actividad nitrato reductasa específica expresada en porcentaje. La determinación de la actividad nitrato reductasa específica se realizó dividiendo la absorbancia alcanzada de cada suspensión por el log de la concentración de *E. coli*. En cuanto a la expresión porcentual, se consideró como 100% de actividad a una suspensión de *E. coli* no coincubada con lactobacilo. En al tabla 1 se representan los resultados de un experimento representativo en el cual se registraron las mencionadas variables.

Tabla 1. Determinación de actividad nitrato reductasa específica de *E.coli* CM1. La tabla refleja los resultados de un experimento representativo. Los valores precedidos del ± representan la desviación estándar.

Cepa 133 (ufc/ml)	pH	*E. coli* CM1 (ufc/ml)	Porcentaje de actividad nitrato reductasa específica
$4\ 10^8$	4.85 ± 0.51	$9.40\ 10^5 \pm 0.0$	2.00
$2\ 10^8$	5.08 ± 0.52	$6.40\ 10^6 \pm 3.20\ 10^5$	6.67
$1\ 10^8$	5.44 ± 0.52	$8.50\ 10^6 \pm 2.00\ 10^6$	20.51
$5\ 10^7$	5.95 ± 0.41	$9.70\ 10^6 \pm 1.40\ 10^5$	42.30
$2.5\ 10^7$	6.43 ± 0.18	$1.20\ 10^7 \pm 1.20\ 10^6$	66.67
$1.25\ 10^7$	6.69 ± 0.06	$1.70\ 10^7 \pm 7.10\ 10^4$	87.52
0	6.63 ± 0.02	$2.30\ 10^7 \pm 8.50\ 10^5$	100

Se observó que a mayor concentración del lactobacilo el pH disminuye, llegando a valores cercanos a 5 para $4\ 10^8$ ufc/ml. Este grado de acidez resulta desfavorable para la supervivencia de *E. coli* CM1 dado que la cepa no mostró ninguna resistencia especial a las condiciones ácidas (ver capítulo III). Se registró entonces, que la supervivencia de *E. coli* cayó levemente para las menores concentraciones del lactobacilo, pero mostró una merma del 85% entre los valores de pH de 5.08 y 4.85. La disminución de la supervivencia de *E. coli* podría conducir a una menor actividad nitrato reductasa registrada. Sin embargo cuando se calculó la actividad nitrato reductasa específica, estandarizando así la variable del número de *E. coli* viables, se observó una disminución real de la actividad enzimática (ver columna 4 de la tabla 1). En base a los resultados obtenidos se determinó que la acidez provocada por el metabolismo del lactobacilo sobre la glucosa del medio afectó la viabilidad de *E. coli*. No obstante, la actividad nitrato

reductasa específica de la bacteria se vio disminuída. Por lo tanto, la caída de la actividad enzimática estaría determinada en parte por la reducción del pH. Es sabido que las enzimas poseen una actividad catalítica máxima en un pH óptimo. La desviación de esa condición determina una merma de su actividad. La acidez provocada por el lactobacilo explicaría entonces, la disminución de la actividad nitrato reductasa específica de *E. coli*

Si bien la inhibición por ácidos de la actividad enzimática resultó una explicación factible de los resultados obtenidos, se decidió investigar que sucedería con la actividad nitrato reductasa en un sistema semejante pero sin variación de pH (figura 6).

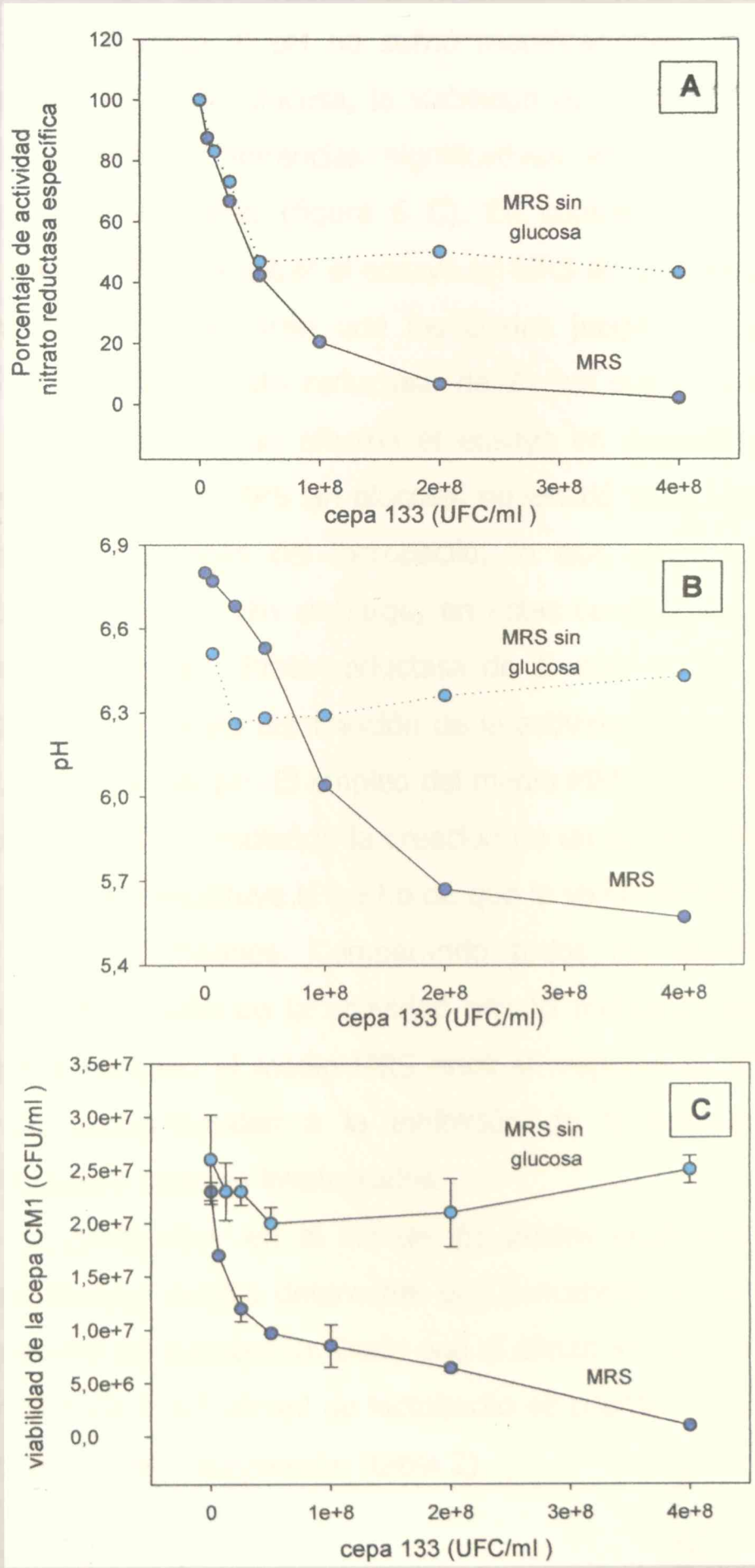


Figura 6. Determinación de la actividad nitrato reductasa de *E.coli* CM1 en presencia de la cepa 133 en MRS o MRS sin glucosa. La figura A representa el porcentaje de actividad nitrato reductasa específica de la cepa CM1 en presencia del lactobacilo en MRS con y sin glucosa. La figura B registra los valores de pH alcanzados por las distintas suspensiones bacterianas con concentraciónes crecientes de lactobacilo, nuevamente se comparan los comportamientos en MRS con y sin glucosa. La figura C representa el número de *E.coli* CM1 viable para cada concentración de lactobacilo en cada formulación de MRS.

Para ello se eliminó la glucosa en la formulación del MRS utilizado para la suspensión de los lactobacilos, evitando así, la producción de ácido láctico y la consecuente acidificación del medio. En la figura 6 se muestran comparativamente los resultados de dos experimentos realizados en MRS y en MRS sin glucosa.

Se observó que el porcentaje de actividad nitrato reductasa específico cae hasta un 2% cuando la incubación se realizó en MRS, mientras que disminuyó al 43% cuando se empleó MRS sin glucosa (figura 6 A). En concordancia con los resultados anteriores, se registró una amplia variación de pH al emplear el medio MRS con glucosa, con un rango de 1.75 unidades de pH de diferencia entre el máximo y el mínimo (figura 6 B). Cuando se utilizó MRS sin glucosa el pH no sufrió modificaciones significativas (figura 6 B). Cuando se empleó MRS con glucosa, la viabilidad de *E. coli* CM1 resultó notablemente disminuída, registrándose diferencias significativas en todas las concentraciones de lactobacilo respecto al control (figura 6 C). En contraste no hubo variaciones en la viabilidad de la cepa CM1 al realizar el ensayo en MRS sin glucosa (figura 6 C).

Los resultados demuestran que los ácidos juegan un papel importante en la inhibición de la actividad nitrato reductasa de *E. coli* cuando se permite al lactobacilo producirlos; es decir cuando se efectúa el ensayo en presencia de MRS con glucosa. Cuando se empleó el medio MRS sin glucosa, no existió variación notable de pH en todo el rango de concentraciones del lactobacilo, lo que presupone una escasa o nula producción de ácido láctico. Sin embargo, en estas condiciones existió una disminución significativa de la actividad nitrato reductasa de *E. coli*, la cual registró un mínimo del 43% respecto al control. Esta disminución de la actividad enzimática, aunque menor, no es atribuíble a la acción del pH. El empleo del medio MRS sin glucosa evitó la acidificación por parte del lactobacilo, impidiendo la creación de un entorno desfavorable para *E. coli*. Una prueba de ello, lo constituye el hecho de que la viabilidad de la cepa CM1 no se viera efectada en estas condiciones. Comparando todos los experimentos realizados, se observó que la disminución de la actividad nitrato reductasa resultó ser mayor en los ensayos donde se empleó el medio MRS original respecto al MRS sin glucosa. Lo cual señala que los ácidos ayudan a la inhibición de la actividad enzimática pero no constituyen los únicos factores involucrados.

A fin de profundizar en el rol de los ácidos orgánicos en la inhibición de la actividad enzimática se decidió determinar qué concentración de los mismos se hallaban en las suspensiones del lactobacilo. Dado que el efecto inhibitorio máximo se alcanzó con una concentración de 4 10^8 ufc/ml de lactobacilo se cuantificó por HPLC el nivel de ácido láctico y acético para esta suspensión (tabla 2).

B: ...dad
F. ...ncias
U.N.L.P
1M 5845

Tabla 2: Determinación de ácidos orgánicos de los sobrenadantes de la cepa 133. La determinación se realizó mediante HPLC. Los sobrenadantes fueron incubados a 37ºC durante 1.5 h o 3 h con la cepa 133 los en una concentración de 1 10^8 ufc/ml. Los valores expresados tienen sustraído las cantidades de ácidos orgánicos presentes en el medio MRS. ND significa no detectado.

Sobrenadante cepa 133	Ácido láctico (mM)	Ácido acético (mM)
Sobrenadante en MRS con glucosa 1.5 h	140.4	ND
Sobrenadante en MRS con glucosa 3 h	194.8	ND
Sobrenadante en MRS sin glucosa 1.5 h	4.2	ND
Sobrenadante en MRS sin glucosa 3 h	4.4	ND

Se registró que la producción de ácido láctico fue significativamente mayor en el medio MRS original respecto al MRS sin glucosa. El MRS con glucosa alcanzó valores de 140.4 mM y 194.8 mM al cabo de 1.5 o 3 h respectivamente; mientras que el MRS sin glucosa registró concentraciones de 4.2 y 4.4 mM en el mismo intervalo de tiempo. El origen más probable para ácido láctico hallado en el MRS sin glucosa es la liberación desde el pool interno del lactobacilo. No se detectó la presencia de ácido acético en ninguno de los medios durante el curso del experimento.

Los resultados anteriores demostraron que el principal ácido orgánico involucrado en el transcurso del ensayo era el ácido láctico. Además permitieron cuantificar el nivel de producción o liberación del mismo por parte del lactobacilo en los medios MRS y MRS sin el agregado de glucosa.

Una vez determinados los niveles de ácido láctico para las suspensiones más concentradas de lactobacilos (4 10^8 ufc/ml), se decidió realizar experimentos a fin de comparar la capacidad de inhibición de la actividad nitrato reductasa de dichas suspensiones frente a sobrenadantes artificiales conteniendo las concentraciones de ácido láctico correspondientes (figura 7). En los ensayos realizados en MRS con glucosa, se observó que la adición de ácido láctico al MRS a una concentración final de 190 mM (pH 5.28 ± 0.02), equivalente al producido por la incubación del lactobacilo durante 3 h; produjo una reducción significativa de la actividad nitrato reductasa de *E. coli* respecto al control (figura 7 A). La presencia del lactobacilo, sin embargo disminuyó aún más la actividad enzimática. Se registraron diferencias significativas entre los valores de actividad nitrato reductasa específica del medio MRS acidificado y el MRS conteniendo la cepa 133 (figura 7 A).

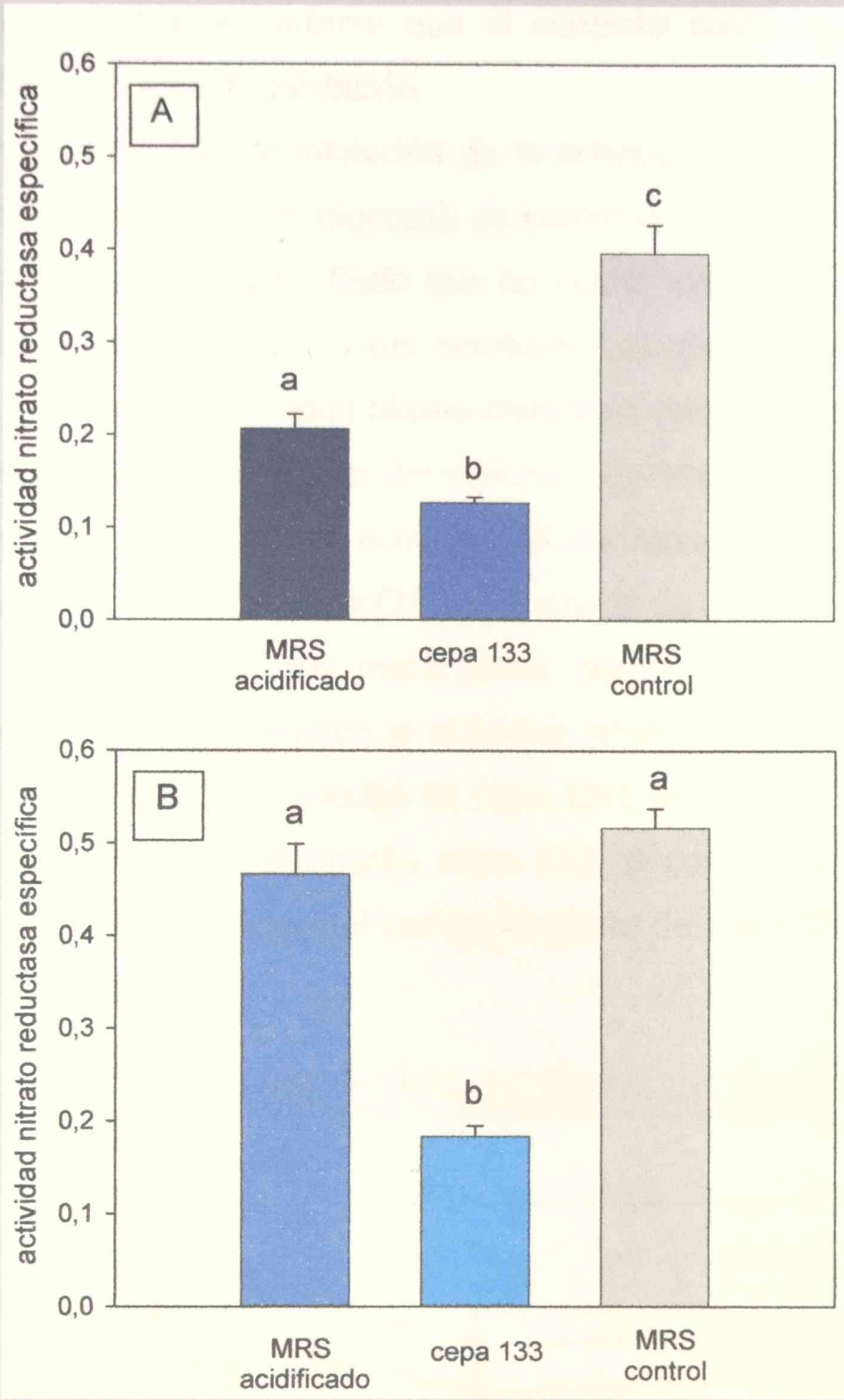


Figura 7. Comparación de la actividad nitrato reductasa específica de *E.coli* CM1 en la presencia de la cepa CIDCA 133 y ácido láctico. A) Ensayo de coincubación realizado en MRS con glucosa. B) Ensayo de coincubación realizado en MRS sin glucosa. La cantidad de ácido láctico agregado al MRS acidificado fue el equivalente al producido por el lactobacilo (4 10^8 ufc/ml) durante 3 h a 37ºC en MRS con glucosa (190 mM) o sin glucosa (4 mM). Las concentraciones se determinaron por HPLC. Letras diferentes significan diferencias significativas en prueba t de Student ($p \leq 0.05$).

Cuando se realizaron los ensayos en MRS sin glucosa se observó que la adición de ácido láctico a una concentración final de 4 mM (pH 6.20 ± 0.02) no modificó la actividad nitrato reductasa. En contraste, la coincubación con el lactobacilo disminuyó significativamente la actividad enzimática (figura 7 B).

Los resultados obtenidos demostraron que el ácido láctico en alta concentración (190 mM) fue suficiente para disminuir la actividad nitrato reductasa específica de *E. coli*. Sin embargo la cepa CIDCA 133 viable incrementó aún más la inhibición de la actividad enzimática en presencia de ácido (figura 7 A). A su vez, el lactobacilo en un medio con escaso ácido láctico como el MRS sin glucosa, fue capaz de reducir significativamente la actividad nitrato reductasa de *E. coli* (figura 7 B). Estas observaciones sugieren la posible existencia de otros metabolitos producidos por el lactobacilo, que sumados al ácido

láctico, se encuentren involucrados en la inhibición de la actividad nitrato reductasa de *E. coli*. Tampoco podría descartarse que el contacto célula-célula entre las bacterias cumpliera algún papel en esta inhibición.

Utilizando el modelo de inhibición de la actividad nitrato reductasa de E. coli sin variación de pH (medio MRS sin glucosa), se continuó investigando los posibles factores involucrados en dicho fenómeno. Dado que no existió modificación en la viabilidad de la cepa CM1 en estas condiciones no fue necesario calcular la actividad nitrato reductasa específica, ya que tanto la actividad nitrato reductasa como la actividad nitrato reductasa específica reflejan el comportamiento del sistema. Los resultados de esta serie de ensayos se expresaron como porcentaje de actividad nitrato reductasa, tomando como 100% de actividad a una suspensión de *E. coli* CM1 en ausencia de lactobacilo.

A fin de ahondar en los mecanismos participantes del efecto inhibitorio se realizaron experimentos comparando la actividad nitrato reductasa de *E. coli* en distintas condiciones. Para lo cual se coincubó la cepa CM1 en presencia de sobrenadante de cultivo libre de células del lactobacilo cepa 133, o con el lactobacilo inactivado por radiación UV. Asimismo se ensayó el comportamiento de *E.coli* CM1 en presencia de otro lactobacilo (Figura 8).

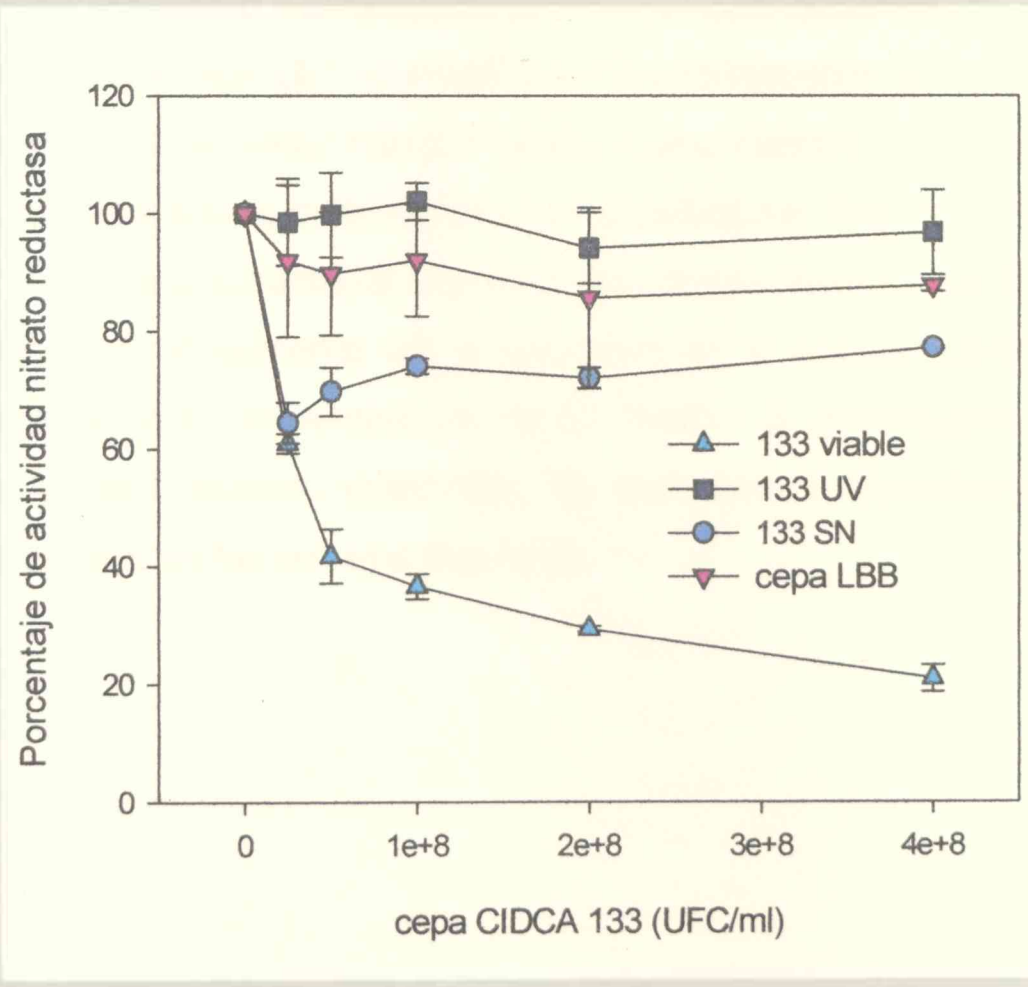


Figura 8. Efecto de diferentes tratamientos sobre la actividad nitrato reductasa de la cepa CM1. *E.coli* CM1 se incubó en presencia de la cepa 133 viable (▲), inactivada por radiación UV (■), o en sobrenadante (SN) libre de células del lactobacilo (●). También se ensayó la respuesta frente al *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* cepa LBB (▼). Los resultados son un promedio de duplicados. En el caso de los sobrenadantes fueron preparados a partir de las suspensiones con la concentración de lactobacilo indicada en abscisa.

Se observó que mientras la actividad nitrato reductasa de *E. coli* disminuyó hasta un 20% en presencia de la máxima concentración de lactobacilos viables (4 10^8 ufc/ml), permaneció inalterada para todo el rango de concentraciones cuando la incubación se realizó con la cepa 133 inactivada por radiación U.V (figura 8).

La incubación de la cepa CM1 con sobrenadantes de lactobacilo también redujo en forma significativa la actividad enzimática ($p \leq 0.05$). En este caso, el grado de inhibición fue menor; disminuyendo la actividad hasta un 70.5% en promedio. Cabe destacar que para lograr un sistema equivalente a la coincubación del lactobacilo con *E. coli*, los sobrenadantes se obtuvieron luego de la incubación de distintas concentraciones de lactobacilo en MRS sin glucosa durante 3 h a 37ºC. No se registraron modificaciones de la actividad enzimática cuando el experimento se efectuó en presencia de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* cepa LBB (figura 8).

Los resultados muestran que la viabilidad del lactobacilo cepa 133 es necesaria para alcanzar un efecto máximo inhibitorio de la enzima nitrato reductasa de *E. coli*. Por otra parte los sobrenadantes de la cepa 133 libres de células ejercieron parcialmente un efecto antagónico. La disminución de la actividad enzimática se debería, por lo tanto a una conjunción del efecto de metabolitos del lactobacilo presentes en el medio y a la interacción célula-célula entre el lactobacilo y la enterobacteria. Asimismo se comprobó que el efecto inhibitorio constituye un fenómeno cepa dependiente ya que, la realización de los ensayos con cepa LBB no modificó el comportamiento de la enzima.

En *E. coli* la actividad nitrato reductasa se encuentra acoplada con la reducción del nitrito a amonio a través de la enzima nitrito reductasa. Dado este hecho, la disminución del nitrito observada durante los experimentos de coincubación de *E. coli* con la cepa 133 podría asignarse al aumento de la actividad de la enzima nitrito reductasa, la cual trasformaría el nitrito en amonio. A fin de evaluar la contribución de la enzima nitrito reductasa en el fenómeno observado, se determinó cuantitativamente los niveles de amonio presentes en los ensayos (figura 9).

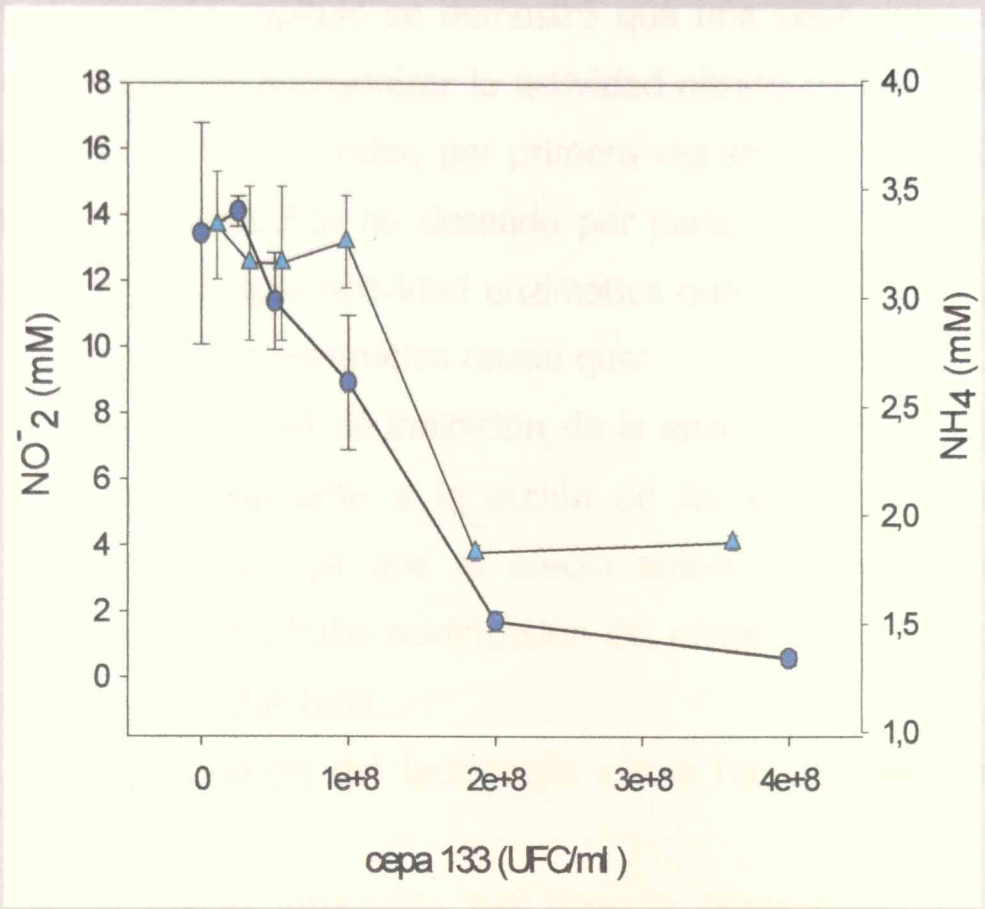


Figura 9. Efecto del lactobacilo cepa 133 sobre la producción de nitrito y amonio por *E. coli* CM1. La producción de nitrito se indica con un punto (●), la de amonio con un triángulo invertido (▼). Los resultados constituyen un promedio de dos experimentos independientes. Las barras indican la desviación estándar.

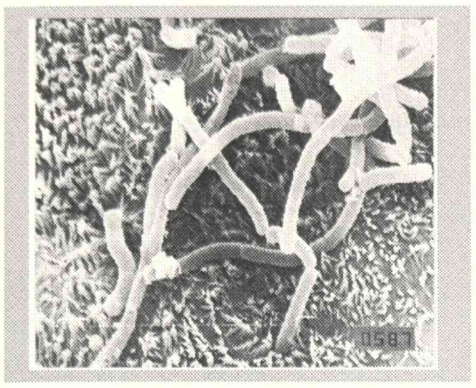
En la figura 9 se comparan para cada concentración del lactobacilo cepa 133 los niveles de producción de nitrito y amonio por parte de *E. coli*. La concentración de nitrito disminuyó en la presencia de la cepa 133 desde 14 mM hasta 0.6 mM. La concentración de amonio se redujo paralelamente desde 3.5 a 2 mM. Por lo tanto la disminución de la concentración de nitrito producido por *E. coli* en presencia del lactobacilo no se debió a una conversión del mismo en amonio. Es importante destacar que la cepa 133 no registró actividad nitrato ni nitrito reductasa. El incremento de la actividad nitrito reductasa de *E. coli* no constituiría un efecto deseado, ya que genera como subproducto menor NO (óxido nítrico). El NO al autooxidarse produce N_2NO_3 (trióxido de dinitrógeno), el cual constituye un agente mutagénico (ver introducción).

Conclusiones.

En el presente capítulo se demostró que una cepa potencialmente probiótica de lactobacilo es capaz de antagonizar la actividad nitrato reductasa de una cepa de *E. coli* no patógena. A nuestro entender, por primera vez se comprobó que la disminución de la concentración del metabolito no deseado por parte de la bacteria probiótica se debe a una inhibición de la propia actividad enzimática que lo produce. La caracterización de la inhibición de la actividad enzimática reveló que:

- La capacidad de inhibición de la enzima nitrato reductasa de *E. coli* no se debe solamente a la acción de los ácidos orgánicos producidos por el lactobacilo, ya que el efecto anti-nitrato reductasa se observó incluso cuando no hubo acidificación del medio, ni disminución de la viabilidad de la enterobacteria.
- La presencia del lactobacilo viable fue necesaria para efecto antagónico máximo.
- El efecto inhibitorio fue especie dependiente ya que el lactobacilo *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* cepa LBB no modificó la actividad enzimática de *E. coli*.
- La disminución del nitrito producido por *E. coli* no se debe al aumento de la actividad nitrito reductasa de la misma.

Un posible mecanismo que explicaría la inhibición de la actividad nitrato reductasa en ausencia de ácido, podría implicar factores extracelulares producidos por la cepa CIDCA 133 que modificaran la composición periplasmática de *E. coli*. Dado que las enzimas de membrana NRA y NRZ están asociadas a la generación de fuerza protón motriz, una alteración de la composición del periplasma podría disminuir su actividad. El hecho de que sea necesaria la presencia del lactobacilo viable para obtener un efecto máximo sugiere la posibilidad de una transferencia directa de algunas sustancias desde la bacteria ácido láctica hacia *E. coli*, lo cual implicaría un contacto estrecho célula-célula.



CAPÍTULO V

Estudio de la interacción entre la cepa CIDCA 133 y *E.coli* EHEC: modelos *in vitro*

CAPÍTULO V

El reconocimiento de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) como una clase distinta de *E. coli* patógenas resultó de dos observaciones epidemiológicas. La primera fue el reporte de Riley en 1983 (Riley et al, 1983) que investigó dos brotes de colitis hemorrágica (CH) en Estados Unidos asociados a la ingestión de hamburguesas mal cocidas. Los aislamientos de materia fecal de los pacientes afectados por la colitis, revelaron un serotipo de *E. coli* poco frecuente O157:H7. La segunda observación correspondió a Karmali y colaboradores (Karmali et al, 1983a) quien investigó la asociación de casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico (SUH) con la presencia de *E. coli* productora de citotoxina en materia fecal (Nataro y Kaper, 1998). La toxina obtenida de estos aislamientos de *E. coli* provocaba un efecto citopático irreversible sobre las células Vero (Karmali et al, 1983a) y además era neutralizada por un antisuero contra la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* 1 (O´Brien et al, 1982). Karmali y colaboradores concluyeron finalmente que la verocitotoxina o la toxina Shiga era el factor de virulencia común entre la colitis hemorrágica y el SUH (Karmali et al, 1983b).

E. coli productoras de verocitotoxina (VTEC) o productoras de toxina semejante a Shiga (STEC) son denominaciones sinónimas empleadas para estas cepas. Existen más de 100 serotipos de *E. coli* capaces de producir la toxina Shiga (Nataro y Kaper, 1998). La denominación de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) implica un subconjunto de estás cepas

que ha demostrado su poder patógeno produciendo CH o SUH en el hombre. El serotipo O157:H7 de *E. coli* es el prototipo de las cepas de EHEC y es el más aislado en los casos de infección en el hombre (Nataro y Kaper, 1998).

E. coli EHEC puede ser considerado un patógeno emergente. Luego del reconocimiento de *E. coli* O157:H7 como causante de la colits hemorrágica (CH) el Centro para la Prevención y Control de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos, revisó entre 3000 serotipos aislados de casos clínicos entre 1973 y 1983 encontrando solamente un aislamiento de O157:H7. Resultados semejantes se produjeron en el Reino Unido y Canadá. Sin embargo la entidad clínica de SUH; caracterizada por fallo renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática; es ampliamente reconocida desde 1955. Posiblemente serotipos no O157:H7 productores de toxina Shiga (Stx) fueran los responsables de estos casos (Nataro y Kaper, 1998). El SUH complica aproximadamente el 10% de los casos de infección por *E. coli* O157, con una tasa de mortalidad entre el 2 al 10%, siendo los niños menores de 5 años especialmente susceptibles (Law, 2000).

La transmisión de EHEC se realiza principalmente través de alimentos y agua contaminada, aunque también de persona a persona. La mayoría de los casos de trasmisión alimentaria corresponden a productos contaminados con materia fecal, particularmente de origen bovino. La ingestión de hamburguesas mal cocinadas es la causa más reconocida tanto en los brotes como en los casos esporádicos de infección por EHEC (Nataro y Kaper, 1998). Estudios realizados en Europa, Asia y Estados Unidos revelan que entre el 10 y el 80% del ganado bovino es portador de *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), con más de 200 serotipos, de los cuales 100 han sido asociados a enfermedad en el hombre (Beutin et al, 1997). Si bien *E. coli* O157 provoca la mayoría de las infecciones humanas; el aislamiento de *E. coli* STEC no O157 es predominante en las heces de animales. Evidentemente *E. coli* O157 es más virulenta o transmisible que el resto de los serotipos de STEC a los que el hombre se halla expuesto (Law, 2000). La dosis necesaria para la infección por EHEC es extremadamente baja, alrededor de 100 a 200 microorganismos, lo que es consistente con la transmisión persona a persona y la diseminación institucional (Nataro y Kaper, 1998).

En Argentina el SUH es endémico con aproximadamente 300 nuevos casos anuales reportados. La incidencia anual de SUH en niños menores de 5 años es del 10.5 por cada 100.000 afectados (CNSAP, 1995). *E. coli* O157:H7 es el serotipo más frecuentemente aislado en los casos de diarrea y diarrea hemorrágica. Fue detectado en el 36,4% de los casos de SUH en niños (Rivas et al, 1998).

Patogenia.

a. Lesión attaching–effacing (A/E).

E. coli EHEC es la responsable de casos esporádicos, brotes de diarrea colitis hemorrágica y SUH. La infección provoca hemorragia y edema en la lámina propia del colon. En cultivos celulares (líneas Hela, Hep-2), así como en cerdos gnotobióticos y conejos lactantes se observa una lesión típica en las células epiteliales denominada attaching/effacing (A/E). La lesión A/E no se ha hallado en muestras clínicas, posiblemente debido a que las biopsias colónicas se colectan en un estadío avanzado de la infección. La lesión A/E implica la adherencia íntima entre la bacteria y la célula epitelial, con pérdida de microvellosidades. Esta interacción ocasiona arreglos en el citoesqueleto acumulándose actina polimerizada debajo de la zona de adhesión de las bacterias. Las bacterias se encuentran, a veces, elevadas sobre un pedestal citoplasmático en la superficie celular (Nataro y Kaper, 1998). La respuesta celular a la lesión A/E implica la transmigración de células inflamatorias, especialmente leucocitos polimorfonucleares y la secreción de interleuquina 8 (IL-8). La capacidad de producir la lesión A/E es compartida por *E. coli* EHEC, EPEC (*E. coli* enteropatógena) y *Citrobacter rodentium* (Deng et al, 2004). Estas bacterias poseen en común la presencia de un locus de patogenicidad de 35 kB denominado LEE (locus of enterocyte effacement). LEE conforma un ejemplo de las denominadas islas de patogenicidad bacteriana (PAI), las cuales constituyen un conjunto de genes próximos que codifican las moléculas efectoras responsables del daño celular junto con los sistemas de secreción que transportan estas moléculas a las células blanco (Deng et al, 2004) (figura 1).

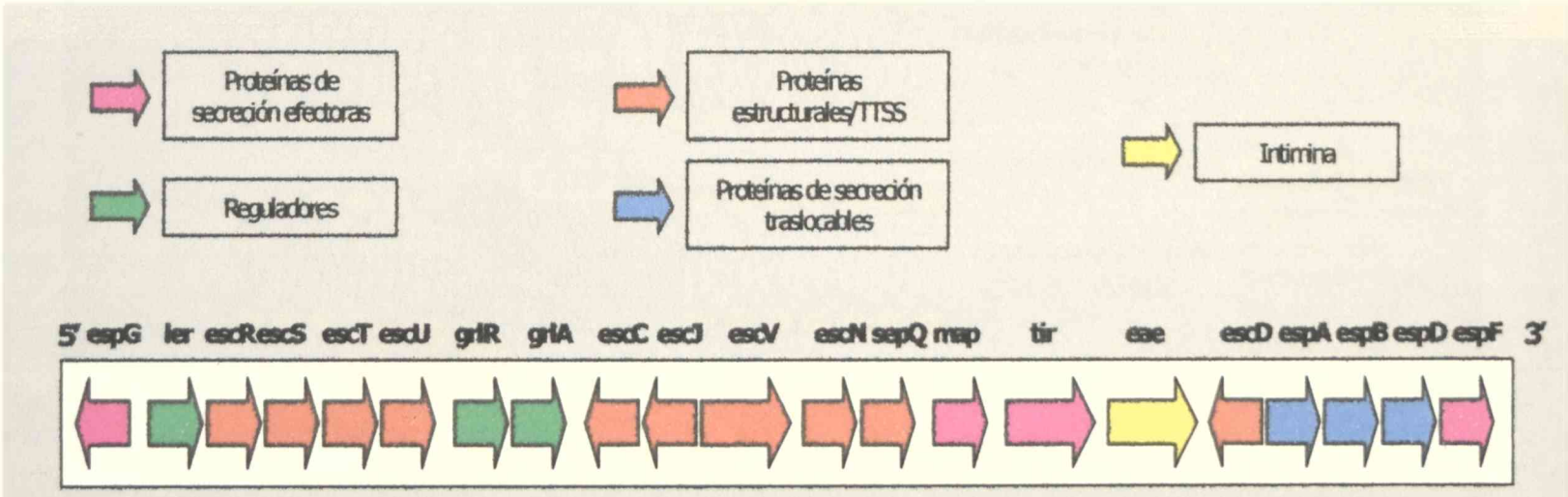


Figura 1. Organización genética de la región LEE. En la figura se muestran los principales genes localizados en esta región. Tomado y modificado de Garmendia y colaboradores (Garmendia et al, 2005).

El extremo 5´de la región LEE codifica para distintas proteínas reguladoras (Ler, GrLA y GrlR) y a continuación contiene los genes de los distintos componentes del sistema

de secreción tipo III (TTSS), comúnmente hallados en las bacterias Gram negativas patógenas (Garmendia et al, 2005) (figura 1). La parte central de LEE codifica la proteína externa de membrana intimina y el receptor traslocable de intimina (Tir). El extremo 3´de LEE codifica para otras proteínas estructurales del TTSS, proteínas traslocables y efectoras (Garmendia et al, 2005).

El TTSS es utilizado por los patógenos para traslocar en un solo paso factores de virulencia desde la bacteria a la célula hospedadora. El TTSS es un sistema multicomponente resultante del producto de aproximadamente 20 genes. La estructura consiste en una sucesión de anillos proteicos insertos en las membranas bacterianas con una extensión similar a una aguja (figura 2).

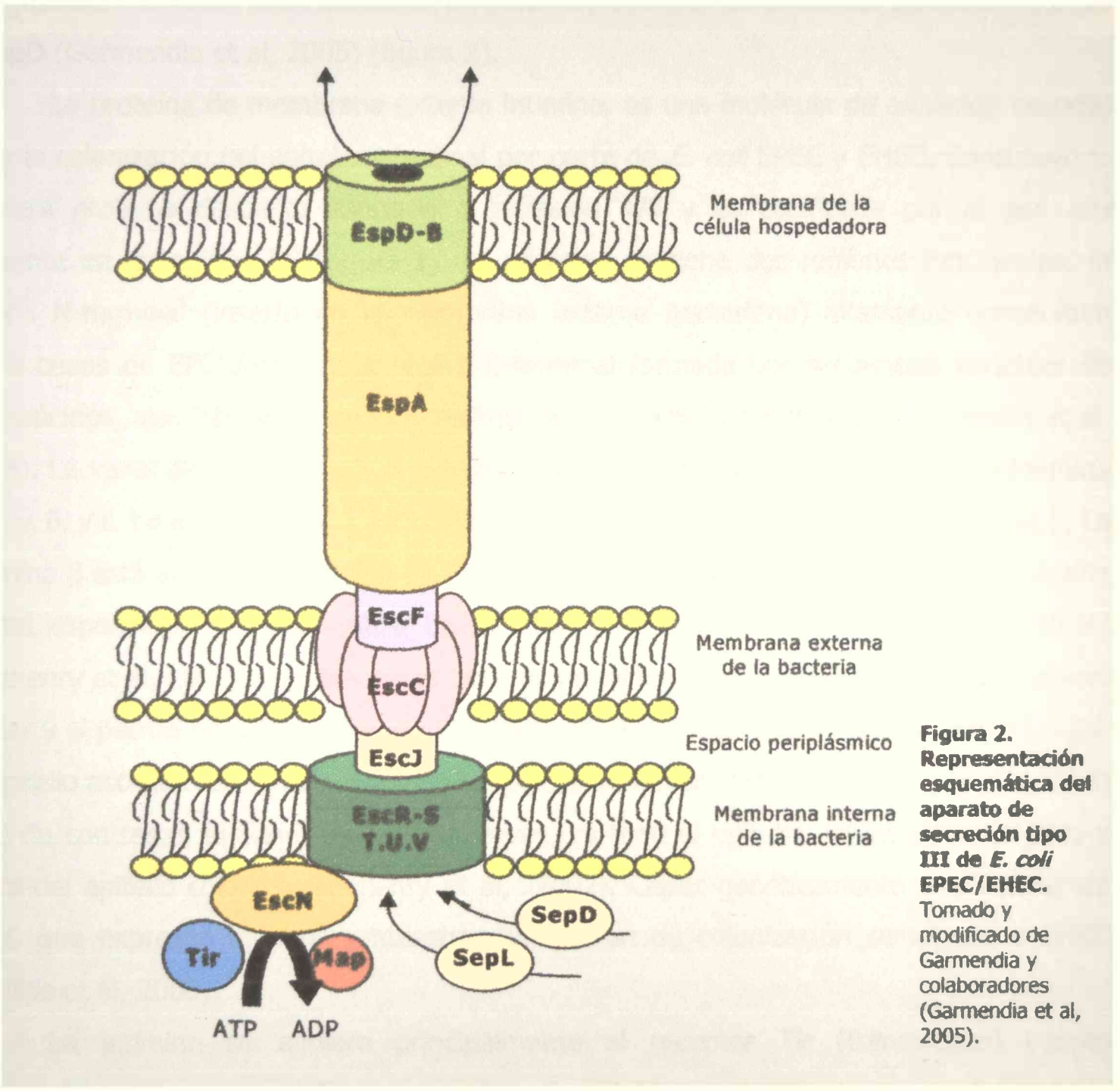


Figura 2. Representación esquemática del aparato de secreción tipo III de *E. coli* EPEC/EHEC. Tomado y modificado de Garmendia y colaboradores (Garmendia et al, 2005).

EscC y EscV son los componentes principales de los anillos de la membrana externa e interna de EPEC/EHEC. EscJ es una proteína periplasmática que sirve de puente entre ambos anillos. La proyección acicular de EPEC/EHEC está formada por la proteína

EscF, la cual permite crear un canal para la secreción de proteínas. Las estructuras antes descriptas son análogas a las encontradas en *Salmonella*, *Yersinia* y *Shigella*. Sin embargo el TTSS de EHEC/EPEC contiene un filamento EspA asociado a la proyección EscF. El filamento es el resultado de la polimerización de la proteína EspA, que conforma un tubo helicoidal semejante estructuralmente a un flagelo. Los filamentos maduros de EspA son importantes factores de adhesión generando una conexión transitoria entre la bacteria y la célula hospedadora, permitiendo la traslocación de proteínas efectoras. Luego de la traslocación el filamento es eliminado de la superficie bacteriana, lo cual es necesario para permitir el contacto estrecho entre la bacteria y la célula eucariótica mediante la interacción Tir-intimina. Las proteínas efectoras alcanzan la célula eucariótica a través del extremo del filamento EspA mediante un poro formado por las proteínas traslocables EspB y EspD (Garmendia et al, 2005) (figura 2).

La proteína de membrana externa intimina, es una molécula de adhesión esencial para la colonización del epitelio intestinal por parte de *E. coli* EPEC y EHEC. Constituyó la primera proteína descripta asociada a la lesión A/E y es codificada por el gen *eae* presente en la región LEE (figura 1). La proteína contiene dos regiones funcionales: la región N-terminal (inserta en la membrana externa bacteriana) altamente conservada entre cepas de EPEC/EHEC y la región C-terminal formada por secuencias variables de aminoácidos, que interactúa con los receptores de la célula eucariótica (Garmendia et al, 2005). La variabilidad de la región C-terminal permite definir 5 tipos de proteína intimina α, β, γ, δ, y ε. La intimina α está asociada a una rama evolutiva de EPEC denominada 1. La intimina β está asociada a un clon de EPEC/EHEC denominado 2, mientras que la intimina γ está específicamente asociada a EHEC O157 y la cepa de EPEC relacionada O55:H7 (Fitzhenry et al, 2002). Los diferentes tipos de intimina están relacionados con el tropismo tisular y el patrón de colonización de EPEC y EHEC. EHEC posee un tropismo distintivo por el epitelio asociado al folículo (FAE) de las placas de Peyer colónicas donde causa la lesión A/E. En contraste, la adhesión de EPEC involucra todo el epitelio del intestino delgado y parte del epitelio colónico (Fitzhenry et al, 2002). Cepas genéticamente modificadas de EPEC que expresan intimina γ muestran un patrón de colonización semejante a EHEC (Phillips et al, 2000).

La intimina se adhiere principalmente al receptor Tir (translocated intimin receptor), codificado en LEE y traslocado a la célula eucariótica por la propia bacteria (figura 1). La intimina interacciona a su vez con otros receptores codificados por la propia célula hospedadora (β_1 integrina y nucleolina) cuya relevancia fisiológica en la patogenia no ha sido determinada. La interacción de la intimina con la célula hospedadora estimula

la producción de proyecciones citoplasmáticas transitorias denominadas procesos semejantes a microvellosidades (MLP) en las primeras horas postinfección (Phillips et al, 2000). Estas proyecciones comienzan a desaparecer a partir de las 3 h de infección dando comienzo a la típica lesión A/E que se observa plenamente a la 6 h postinfección (Phillips et al, 2000).

La región LEE, codifica además de Tir, distintas proteínas efectoras entre ellas: Map, EspF, EspG, EspH, SepZ y EspB. La proteína asociada a la mitocondria o Map interacciona con esta organela alterando su potencial de membrana, aumentando su permeabilidad; provocando así el hinchamiento y daño funcional. También es esencial en la disrupción de la función intestinal y la alteración de las uniones estrechas. La proteína EspF está involucrada en la alteración de la barrera intestinal en forma independiente de Map. EspF parece tener un papel directo en la inducción de apoptosis en cultivos celulares infectados por EPEC provocando la liberación del citocromo c mitocondrial y activando las caspasas 3 y 9 (Crane et al, 2001). EspF juega a su vez, un rol esencial en la remodelación de las microvellosidades. La proteína EspG desestabiliza la tubulina fibrilar. La proteína EspH modula la actividad de la actina de la célula hospedadora, interviniendo en la formación de filopodios y el pedestal de la lesión A/E. La proteína EspB posee un papel importante en la traslocación (ver más arriba) pero también es una proteína efectora interviniendo en la remodelación del citoesqueleto de la célula hospedadora.

El receptor translocable de intimina (Tir) posee dominios extra e intracelulares en la célula eucariótica. El dominio extracelular de Tir se une con la intimina. La interacción de Tir con la intimina genera una red que agrupa los receptores Tir debajo de las bacterias adheridas. Los dominios intracelulares de Tir interaccionan con numerosas proteínas de adhesión focal (α-actinina, talina, vinculina) y del citoesqueleto. Las proteínas de adhesión focal son las que vinculan el citoesqueleto de actina con la membrana. Estas interacciones llevan a la formación de los pedestales ricos en actina debajo de las bacterias. En cuanto al mecanismo de activación de Tir, se sabe que luego de alcanzar la célula hospedadora el receptor es fosforilado en un residuo tirosina y que esta fosforilación es esencial para inducir la polimerización de actina. El receptor Tir fosforilado recluta la proteína adaptadora Nck que activa a su vez a la proteína N-WASP (Neuronal Wiskott-Aldrich protein). N-WASP activa el complejo Arp2/3 induciendo la polimerización de actina y la formación del pedestal. EHEC no fosforila el residuo de Tir y promueve la polimerización de actina por otro mecanismo. EHEC reemplaza la proteína Nck, por la proteína bacteriana efectora TccP/EspFu que se une a N-WASP, a partir de allí la secuencia de acontecimientos es semejante en EPEC y EHEC (Garmendia et al, 2005).

Además de las proteínas efectoras codificadas por LEE, existen otras proteínas portadas por profagos que son traslocadas a la célula hospedadora vía TTSS. Las más estudiadas son Cif, EspI (NleA), EspJ y TccP/EspFu. Tal como lo indica su nombre Cif (factor inhibidor de ciclo celular) impide la división celular mediante la inhibición de la transición G/M_2 del ciclo celular. En cuanto a la proteína NleA o EspI, se sabe que no es necesaria para la lesión A/E y colocaliza con el aparato de Golgi pero su función no ha sido aún determinada. La proteína EspJ tampoco es necesaria para la lesión A/E y jugaría un rol en la permanencia del patógeno en el hospedador. Por último, la proteína TccP/EspFu (Tir-cytoskeleton coupling protein) es la proteína acopladora utilizada por EHEC para activar a la proteína N-WASP y estimular la polimerización de actina (Garmendia et al, 2005).

b. Toxinas Shiga.

Otro de los factores relevantes de la virulencia de EHEC y el cual es definitorio en su patogenia es la producción de Shiga toxinas (Stx). Estas toxinas son exotoxinas de naturaleza proteica, cuyos genes estructurales están codificados en un fago lisogénico integrado en el cromosoma bacteriano (Nataro y Kaper, 1998). Las Stx contienen dos formas principales, antigénicamente diferentes denominadas Stx1 y Stx2. Una cepa de EHEC puede contener una o ambas toxinas. Las toxinas comparten un 60% de la secuencia de aminoácidos. Mientras Stx1 es altamente conservada y virtualmente idéntica a la Shiga toxina de *Shigella dysenteriae* I, Stx2 contiene numerosas variantes (Law, 2000).

Ambas toxinas contienen dos subunidades: la subunidad A (32kD) y la subunidad B que es pentamérica (7.7 kD cada monómero). La subunidad B forma un anillo donde se inserta el extremo C-terminal de la subunidad A. La subunidad B media la unión entre la toxina y el receptor celular globotriaocilceramida (Gb3) (el receptor de una de las variantes de Stx2, Stx2e, es Gb4). Una vez unida la toxina es endocitada por la célula, formándose vesículas que son procesadas por el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático. La subunidad A es clivada por una proteasa generando un fragmento catalíticamente activo A1 de 27 kDa y un fragmeto A2 de 4 kDa. La subunidad A1 liberada contiene una actividad N-glicosidasa que cliva un residuo adenina del RNA ribosómico 28S. Esta ruptura impide la unión de los aminoacil-tRNA a la subunidad 60S ribosómica, inhibiendo la elongación de la cadena polipeptídica, lo que conduce a la detención de la síntesis proteica con la consecuente muerte celular (Law, 2000). Las Shiga toxinas inducen además apoptosis en las líneas celulares Vero Caco-2, Hep-2 y T-84. Este efecto

puede ser producido también por bacterias Stx negativas, tan sólo por medio de la adhesión celular (Foster et al, 2000). Se cree que la proteína EspF (ver lesión A/E) podría estar involucrada en este tipo de mecanismo inductor de apoptosis (Foster et al, 2000).

La mayoría de las cepas de *E. coli* O157 producen solamente Stx2, por contraste las cepas no O157 poseen una expresión de las toxinas más variable. Los aislamientos que producen sólo Stx2 están más relacionados con los casos de infecciones severas. La toxicidad de Stx2 sobre las células endoteliales de la microvasculatora renal humana es alrededor de 1000 veces mayor que la de Stx1 (Law, 2000).

El papel de la Stx en la enfermedad intestinal no está totalmente dilucidado. Los enterocitos humanos carecen del receptor Gb3, sin embargo la toxina provoca daño en cultivos *in vitro* de biopsias colónicas humanas (Schüller et al, 2004).

El rol de las Stx en el desarrollo del SUH es más conocido. La toxina producida en el intestino alcanza el tejido renal vía sanguínea. Posiblemente la absorción intestinal de la toxina es favorecida por la inflamación de la mucosa. El estado inflamatorio de la mucosa intestinal es consecuencia del daño epitelial provocado por las Stx, la lesión A/E, la presencia de citoquinas y del lipopolisacárido bacteriano (LPS). El receptor Gb3, blanco de la toxina Shiga, se encuentra en alta concentración en el tejido renal humano, especialmente en el endotelio de la microvasculatura. Como se explicara anteriormente, la unión de la toxina a las células provoca la detención de la síntesis proteica y la muerte celular. Este daño genera un cuadro histopatológico renal, que en el caso del hombre, muestra el hinchamiento de las células endoteliales del glomérulo junto con el depósito de plaquetas y fibrina. La lesión glomerular conduce a la disminución de la tasa de filtración, la cual es responsable del fallo renal agudo característico del SUH (Nataro y Kaper, 1998). Es posible que las citoquinas proinflamatorias factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) e interleuquina 6 (IL-6) jueguen un rol importante en la patogenia del SUH. Al respecto se sabe que las Stx son capaces de inducir su producción y los niveles de ambas están ampliamente aumentados en los casos severos de SUH (Nataro y Kaper, 1998).

c. Enterohemolisina (Ehx)

La enterohemolisina es una exotoxina de naturaleza proteica perteneciente a la familia de toxinas RTX (repeats in toxin), cuyos miembros se expresan por una amplia variedad de bacterias patógenas. El gen de la enterohemolisina se halla integrado en un plásmido de 60 MDa usualmente presente en las cepas de *E. coli* O157. El gen también se halla ampliamente distribuído en las cepas no O157 que producen Shiga toxina.

La enterohemolisina lisa a los glóbulos rojos *in vitro*. El rol de la toxina *in vivo* es aún sujeto de especulación. La ruptura de los eritrocitos *in vivo* que conduce a la liberación de hemoglobina podría favorecer el crecimiento de *E. coli* (Nataro y Kaper, 1998). La hemoglobina es una importante fuente de hierro, el cual constituye un factor de crecimiento para numerosas bacterias. Se sabe que *E. coli* O157 es capaz de utilizar el hierro desde el grupo hem o la hemoglobina. Esta propiedad, infrecuente en otros serotipos, podría explicar en parte la mayor virulencia de *E. coli* O157:H7 (Law, 2000).

d. Otros factores de virulencia.

Se han descripto otros posibles factores de virulencia involucrados en la patogenia de E. coli EHEC. Entre ellos se encuentran: una serin proteasa extracelular, una enzima catalasa peroxidasa y una toxina termoestable (EAST1).

E. coli O157 produce una **serin proteasa extracelular** denominada EspP, la cual no está codificada en la región LEE. Esta enzima tiene actividad proteolítica contra el factor V de la cascada de coagulación sanguínea. Se cree que el clivaje del factor V llevaría a un retardo en la coagulación con el consecuente sangrado intestinal más prolongado (Law, 2000).

El plásmido pO157 contiene la secuencia del gen *katP* que codifica para una enzima con función **catalasa-peroxidasa**. Las catalasas bacterianas al igual que las superóxido dismutasas podrían detoxificar los compuestos de oxígeno reactivo producidos por los macrófagos y neutrófilos, ayudando a las bacterias a escapar de las defensas del hospedador (Law, 2000).

La mayoría de la cepas de *E. coli* O157 contienen el gen astA que codifica para la **toxina termoestable enteroagregativa (EAST1)**. Esta toxina es característica de las cepas de *E. coli* enteroagregativa (EAggEC). Se sabe que la toxina estimula la secreción de fluídos en el intestino de conejos, sin embargo su rol en la patogenia humana no está definido. En la infección por O157 humana, la toxina podría influir en los estados iniciales de la enfermedad contribuyendo al desarrollo de la diarrea acuosa que precede a la colitis hemorrágica (Law, 2000).

Metodología

Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.

La cepa de *E. coli* EHEC O157: H7 utilizada corresponde a un aislado clínico y fue provista por el Hospital de Niños Sor María Ludovica de La Plata. La identificación numérica asignada fue 69160. Su caracterización genotípica fue *stx* 2(+), *eae* (+) y *hly* (+), la misma se realizó en el A.N.L.I.S Dr Carlos Malbrán. Los lactobacilos empleados pertenecen a la colección del CIDCA. Los mismos corresponden a las especies *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (cepa CIDCA 133) y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (cepas LBB y LBR). Los cultivos stock de todas las cepas se mantuvieron a -80ºC y antes de la realización de los ensayos fueron reactivados dos veces. *E. coli* fue crecida en caldo TSB (Laboratorio LW, Córdoba, Argentina.) a 37ºC durante 16 h en aerobiosis sin agitación. Los lactobacilos fueron crecidos en caldo MRS (Biokar Diagnostics. Beauvais, Francia) con 0.5% de cisteína a 37ºC durante 16 h en anaerobiosis.

Cultivos celulares

Las líneas celulares empleadas en esta sección correspondieron a células Vero (fibroblásticas derivadas de riñon de mono verde africano) (Hoops et al, 1963) y Hep-2 (epiteliales de laringe humana) (Moore et al, 1955). El protocolo de cultivo celular fue semejante al detallado para el caso de la línea Caco-2 (ver capítulo 3). Las células se sembraron en placas de 6 o 24 fosas (Greiner Bio One) en una concentración de 1.25 10^5 células por fosa. Las monocapas se utilizaron en postconfluencia reciente, luego de 48 h de incubación. En los ensayos donde se requirió la visualización microscópica de las monocapas, las mismas se crecieron sobre láminas de vidrio estériles de 12 mm de diámetro (Assistent, Glaswarenfabrik Kart Hetch K.G., Sondheim. Alemania) colocadas en las fosas.

Ensayos de citotoxicidad sobre células Vero.

Las monocapas confluentes de células Vero fueron incubadas por 48 h con distintas diluciones de sobrenadante de cultivo filtrado de la cepa 69160 de *E. coli* EHEC. Para la obtención del sobrenadante, el cultivo de 16 h de EHEC en medio TSB fue centrifugado a 3000 g por 10 min. El pellet fue descartado y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa (Osmonics) de 0.45 μm de diámetro de poro. Para evaluar la protección ejercida por los lactobacilos se coincubaron las células, con el sobrenadante de EHEC y una suspensión de 1 10^7 ufc/ml de los mismos. A fin de

evitar la acidificación del medio durante la incubación tan prolongada, los lactobacilos se inactivaron con gentamicina (100 ug/ml). Otra forma de inactivación empleada en los ensayos fue la radiación UV. Las suspensiones bacterianas dispuestas en una fina película se sometieron durante 15 min a la acción de una lámpara UV germicida (para una descripción más detallada del procedimiento y el equipo ver capítulo IV). Cuando se requirió mantener la viabilidad de los lactobacilos, pero disminuir su capacidad de acidificación, la coincubación con las monocapas se realizó en presencia de cloranfenicol (50 ug/ml). También se evaluó la capacidad de protección de las paredes de la cepa CIDCA 133 coincubándolas junto a las células en presencia del sobrenadante de EHEC (ver obtención de paredes celulares). El daño resultante de la interacción de la Shiga toxina sobre las células se evaluó empleando las técnicas de liberación de lactato deshidrogenasa endógena y rojo neutro. Dichas técnicas se describen más adelante.

Obtención de paredes celulares.

Las paredes celulares del lactobacilo cepa CIDCA 133 fueron obtenidas por centrifugación a partir de bacterias lisadas mecánicamente. El pellet obtenido de un cultivo en MRS de 1000 ml, incubado a 37ºC durante 16 h se lavó dos veces en buffer PBS y se concentró 100 veces. La muestra se colocó en la Prensa X S-17523 (AB Biox, Järfälla, Suecia) y se sumergió en un baño refrigerante a – 30ºC durante 1 h. Se prensó dos veces a una presión de 100 kN cada vez, congelando 1 h entre cada prensada. La muestra prensada se centrifugó a 10.000 g durante 10 min a 4ºC en una centrífuga Sorvall RC-5B (DuPont Co.,Wilmington, DE) para eliminar las células no rotas. Se descartó el pellet y el sobrenadante se procesó por ultracentrifugación a 30.000 g por 15 min a 4ºC, en una centrífuga TL Optima (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA). Esta etapa permitió la concentración de las paredes. El pellet obtenido que consistió en restos de membranas y paredes celulares se lavó numerosas veces con buffer PBS para eliminar las proteínas que no pertenecen a estas estructuras. La eficiencia del lavado se monitoreó realizando medidas espectrofotométricas a 280 nm (rango de absorción de las proteínas) en las aguas de lavado. Los lavados finalizaron cuando la absorbancia correspondiente a la fracción proteica resultó inferior a 0.01 y constante. Las paredes lavadas se resuspendieron en 1 ml de PBS y se conservaron a -20ºC.

Tal como se especificara en el punto anterior, cuando se realizaron los ensayos de protección se utilizó una concentración final de lactobacilos de 1 10^7 ufc/ml. A fin de crear un sistema equivalente en el caso de la coincubación de las monocapas con las paredes del lactobacilo, fue necesario estimar qué cantidad del concentrado de paredes equivalía a

ese número de bacterias. Dado que se partió de 1000 ml de cultivo con una concentración aproximada de 1 10^9 ufc/ml de lactobacilo y se concentró cien veces, la cantidad de paredes presentes en el extracto correspondería a 1 10^{12} ufc/ml. Por lo tanto en los experimentos el concentrado de paredes se diluyó 100.000 veces a fin de aproximar la cantidad de paredes a la correspondiente para 1 10^7 ufc/ml de lactobacilo. Se cuantificó, además la cantidad de azúcares totales de la muestra por el método de antrona (ver punto siguiente), arrojando un valor de 147.3 mg/ml. Es decir que en los ensayos se sembró 1.47 ug/ml de la muestra expresado en concentración de azúcares totales.

Determinación de azúcares por el método de antrona.

La solución de antrona (hidrocarburo tricíclico) en ácido sulfúrico produce un complejo con los hidratos de carbono de un color azul característico (Morris, 1948). La intensidad del color se utiliza para la determinación cuantitativa de azúcares simples y polisacáridos. La sensibilidad del método oscila entre 25 a 350 ug/ml de azúcares. El reactivo de antrona consiste en una solución 0.05% de antrona y 1% de tiourea en ácido sulfúrico 66% (v/v). En este trabajo, la determinación se realizó en simultáneo con una curva de calibración de glucosa. Se colocó 0.2 ml de la solución a ensayar con 2 ml de reactivo de antrona. La mezcla se incubó en un baño de agua a ebullición durante 15 min. Luego se permitió enfriar la muestra a temperatura ambiente en baño de agua y se midió la absorbancia a 620 nm luego de 20 a 30 min.

Determinación de viabilidad celular mediante rojo neutro.

El rojo neutro es un colorante vital que se emplea para determinar daño celular. El colorante se introduce en los lisosomas de las células viables, determinando por lo tanto que a mayor captación del colorante menor es el daño sufrido por las células.

Las monocapas de células Vero tratadas con sobrenadante de EHEC fueron removidas de las fosas por raspado con el extremo de un tip y trasvasadas a tubos Eppendorfs. Las células fueron posteriormente lavadas dos veces con buffer PBS; para lo cual se centrifugaron a 12.000 g durante 2 min y se resuspendieron en igual volumen de buffer. La remoción de las células de las placas, junto con la centrifugación permite evitar la pérdida durante el lavado de las células desprendidas por la acción del sobrenadante de EHEC. Las células ya lavadas fueron posteriormente resuspendidas en medio DMEM sin rojo de fenol con el agregado de rojo neutro (0.2%) diluído 1/50. Las muestras se incubaron luego, durante 2 h a 37ºC. Finalizada la incubación se centrifugaron a 12.000 g

por 2 min, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado nuevamente dos veces con buffer PBS para eliminar el exceso de colorante. A fin de liberar el rojo neutro presente en los lisosomas, las células fueron lisadas con una solución de etanol 50% y ácido acético glacial al 1%. La absorbancia del colorante incorporado por las células eucarióticas fue medida a 550 nm en un lector de placas (ELISA Plate Reader STL, Wien, Austria).

Determinación del porcentaje de enzima lactato deshidrogenasa liberado

Las monocapas de células Vero fueron crecidas en placas de 6 fosas. Se eligió una superficie mayor para cultivar las células a fin de aumentar la concentración de LDH por condición. Luego del tratamiento de las células con sobrenadantes de EHEC, se cuantificó el porcentaje de LDH liberado utilizando un kit comercial LDH-P UV unitest (Wiener Lab, Rosario Argentina). El método se basa en el siguiente esquema de reacción.

$$\text{Piruvato} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-lactato} + NAD^+$$

El sustrato comercial reconstituido provee el piruvato (0.6 mM) y el NADH (0.18 mM), necesarios para la acción de la enzima. En presencia de estos dos sustratos, la enzima lactato deshidrogenasa celular transforma el piruvato en lactato, oxidando a su vez el NADH a NAD^+. El NADH es el sustrato que absorbe la luz UV a una longitud de onda de 340 nm. La conversión de NADH a NAD^+ implica una caída de absorbancia, la cual fue registrada en el ensayo mediante un espectrofotómetro (Beckman DU 650, Palo Alto. USA). La actividad enzimática (en unidades internacionales), se determinó mediante la diferencia promedio de absorbancia por minuto (ΔA/min) de tres lecturas consecutivas multiplicadas por un factor de corrección (9683 para 37ºC). En cada condición se cuantificó la actividad enzimática del medio de cultivo sobrenadante, el cual representa la enzima liberada, y del total (sobrenadante más monocapas lisadas). Las monocapas se lisaron añadiendo Tritón X 100 (Sigma_Chemical,Co., St Louis) al 3% en el medio de cultivo. Los resultados se expresaron como porcentaje de enzima LDH liberada al medio, dividiendo el valor obtenido para el sobrenadante por el valor del total. Cada determinación se realizó por duplicado.

Ensayos de asociación bacteriana a células Hep-2

Los cultivos de 16 h de *E. coli* fueron centrifugados a 850 g durante 10 min y los pellets bacterianos se resuspendieron a diferentes concentraciones en DMEM o en su propio sobrenadante de cultivo filtrado. Los lactobacilos fueron centrifugados en las mismas condiciones y resuspendidos en DMEM a una concentración final de 1 10^8 ufc/ml.

Las monocapas de Hep-2 fueron lavadas dos veces con buffer PBS, para luego ser incubadas durante 1 h ó 3 h con *E. coli* EHEC a 37ºC. En el caso de los ensayos de protección la incubación de las monocapas con *E. coli* fue precedida por la incubación durante 1 h por el lactobacilo. Cabe destacar que no existieron lavados posteriores a la incubación con las BAL, por lo que la incubación con *E. coli* es conjunta.

Coloración de May-Grünwald Giemsa.

Luego de los ensayos de asociación bacteriana, las monocapas de células Hep-2 crecidas sobre láminas de vidrio (Assistent, Glaswarenfabrik Kart Hetch K.G., Sondheim. Alemania) fueron teñidas con la coloración de May-Grünwald Giemsa. La tinción de May-Grünwald Giemsa consta de una mezcla de colorantes ácidos y básicos (entre ellos eosina y azul de metileno). Las estructuras celulares de carácter básico (por ejemplo el citoplasma) fijan preferentemente los colorantes ácidos como la eosina, mientras que las estructuras de carácter ácido (núcleo, ribosomas) fijan los colorantes básicos como el azul de metileno. Para la tinción se colocaron 0.5 ml de solución May-Grünwald (Biopur, Buenos Aires. Argentina) en cada fosa durante 3 min. Luego se añadió el mismo volumen de buffer fosfato 10 mM durante 5 min. Posteriormente se lavaron las placas con buffer PBS y se añadió solución de Giemsa (1/10 del reactivo original disuelto en agua destilada), incubándolas a temperatura ambiente durante 20 min. Finalmente se lavaron las láminas de vidrio con buffer PBS, se escurrieron y montaron sobre glicerol (50%) azida (0.1%), para su observación microscópica.

Determinación del desprendimiento celular por tinción con cristal violeta.

Tsen y colaboradores (Tsen et al, 2000) propusieron una metodología que empleaba el colorante cristal violeta, para determinar cuantitativamente la alteración y el desprendimiento celular de monocapas tratadas con un agente nocivo. El colorante tiñe las células que permanecen adheridas y luego se eluye para su posterior cuantificación.

Luego de los ensayos de asociación bacteriana, las monocapas se lavaron dos veces con buffer PBS. Las células que permanecieron adheridas luego del tratamiento fueron fijadas con formol al 2% durante 1 min y luego teñidas con una solución de cristal violeta (0.13% cristal violeta, etanol 5% y formol 2% en PBS) durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las monocapas se lavaron al menos 5 veces con buffer PBS hasta que cesó la extracción de colorante. El colorante se eluyó con etanol al 50% durante 1 h. La absorbancia se midió a 550 nm en un lector de placas (ELISA Plate Reader STL Rainbow Reader, Wien, Austria).

Marcación de F- actina con faloidina fluorescente.

La red de actina celular fue marcada con faloidina fluorescente (Sigma_Chemical, Co., St Louis). La faloidina es una toxina que se une a las fibrillas de actina e impide su despolimerización. Las monocapas preparadas sobre láminas de vidrio e incubadas durante 3 h con *E. coli* o *E. coli* más lactobacilos fueron lavadas dos veces con buffer PBS y fijadas durante 3 min con p-formaldehído al 3%. Luego, las muestras fueron tratadas con NH_4Cl (50 mM) por 10 min para bloquear las funciones aldehído. Posteriormente, las células se permeabilizaron durante 4 min con una solución 0.2% de Tritón X-100 y se incubaron por 45 min con faloidina fluorescente (1 ug/ml) al abrigo de la luz. Finalmente, las muestras fueron montadas en una suspensión de glicerol (50%) más azida de sodio (0.1%) y analizadas por epifluorescencia con un microscopio DMLB acoplado a una cámara digital DC 100 (Leica Mycroscope Systems Ltd., Heerbrugg, Suiza).

Microscopía electrónica de barrido.

Luego de los ensayos de asociación bacteriana las monocapas crecidas sobre láminas de vidrio fueron lavadas dos veces con buffer PBS y fijadas con glutaraldheído al 2.5 % (v/v) durante 16 h a 4ºC. Las muestras fueron deshidratadas en forma secuencial con soluciones de concentración creciente de etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemania) en agua bidestilada. La deshidratación final se realizó por punto crítico en CO_2 líquido (Baltec CP 30, Japón). Por último las muestras se recubrieron con una lámina de oro durante 4 a 5 min al vacío en un equipo Jeol Fine Coat Sputter JFC-1100 y se examinaron utilizando un microscopio electrónico de barrido Jeol Model JSM-T100.

Determinación de la asociación bacteriana.

El número de bacterias asociadas se determinó mediante recuento de bacterias viables. Luego de la incubación de las células con lactobacilos o *E. coli*, las monocapas se lavaron tres veces con buffer PBS para eliminar las bacterias no adheridas. Las células se lisaron incubándolas durante 1 h a 37ºC con agua destilada estéril. Posteriormente se realizaron para cada condición las diluciones apropiadas en solución fisiológica estéril y se sembraron en placas conteniendo agar MRS o agar nutritivo.

Análisis estadístico.

Las medias fueron comparadas a través de la prueba de dos colas del test de Student's utilizando el software de InfoStat (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Resultados y discusión

Efecto de sobrenadantes de EHEC sobre células Vero.

Las células Vero fibroblásticas originarias de riñón de mono verde africano, constituyen un modelo reconocido para estudiar el efecto biológico de la toxina Shiga *in vitro*. El primer reporte sobre la sensibilidad de la línea celular fue de Konowalchuk y colaboradores (Konowalchuk et al, 1977). Posteriormente se determinó que esta línea compartía junto con las células renales endoteliales, las células epiteliales intestinales y las células HeLa la posesión del glicolípido receptor de la toxina Shiga denominado Gb3 (Nataro y Kaper, 1998). Dada la alta suceptibilidad de la línea celular Vero a la acción de la toxina Shiga fue seleccionada en el presente trabajo como modelo para caracterizar la interacción de la toxina en presencia del lactobacilo cepa CIDCA 133.

a) Determinación de viabilidad celular mediante rojo neutro.

La acumulación de rojo neutro en los lisosomas de las células viables constituye una técnica apropiada para cuantificar en forma relativa la magnitud del daño celular (Finter, 1969). La técnica posee un bajo poder de discriminación ya que sólo refleja diferencias ante condiciones extremas del estado celular. Sin embargo, resulta un método apropiado como primera aproximación para caracterizar el efecto de los sobrenadantes de *E. coli* EHEC sobre células en cultivo.

En esta serie de ensayos se coincubaron durante 48 h células confluentes de la línea Vero con sobrenadantes de cultivo de EHEC filtrados. En determinados tratamientos se añadieron a su vez cepas de lactobacilos, a fin de comprobar la existencia de un efecto protector. Dado el prolongado período de incubación necesario para observar un efecto máximo de la toxina Shiga en las células, los lactobacilos se incubaron en presencia de antibiótico para evitar la acidificación del medio. El antibiótico utilizado fue gentamicina a una concentración de 100 ug/ml. Esta concentración resultó ser bactericida para los lactobacilos (CBM 12.5 ug/ml).

En un primer ensayo se utilizaron tres concentraciones diferentes de sobrenadante de EHEC, para comprobar la existencia de un comportamiento dosis respuesta en la interacción entre la toxina y las células Vero. Se determinó que, a pesar de existir diferencias cualitativas en el estado de las células observables al microscopio óptico invertido, estás no se distinguieron con la técnica de rojo neutro. El porcentaje de células viables incubadas con las diferentes concentraciones de sobrenadante de EHEC fue

semejante (figura 3). Posiblemente se necesiten diluciones mayores del sobrenadante para obtener diferencias entre los tratamientos con esta técnica.

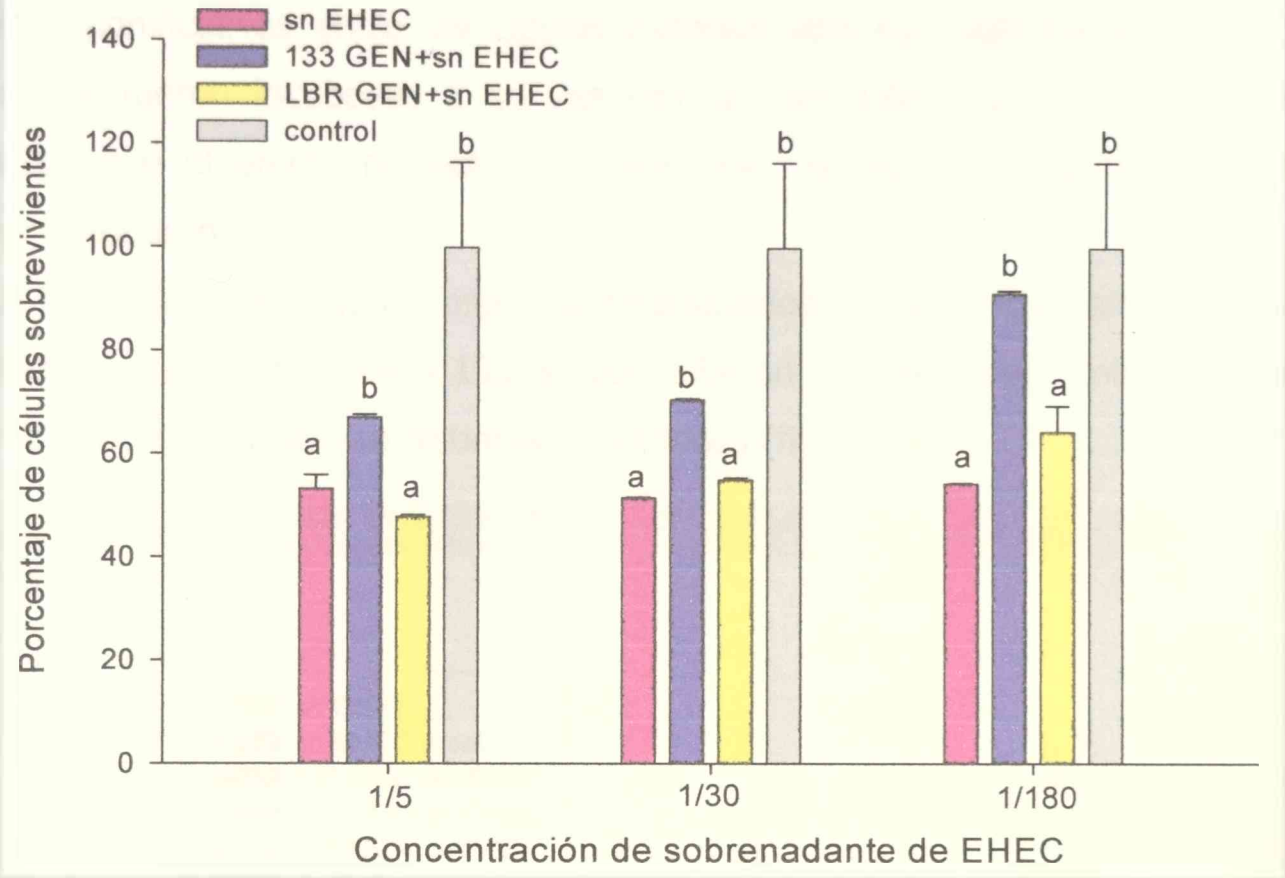


Figura 3: Porcentaje de células Vero sobrevivientes a la acción del sobrenadante de EHEC, tratadas con lactobacilos. La cuantificación se realizó por rojo neutro. Las líneas sobre las barras indican la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas para el test de Student ($p<0.05$)

Los sobrenadantes de EHEC conteniendo la toxina Shiga provocaron sobre las células Vero profundas alteraciones morfológicas. Las monocapas presentaron numerosas discontinuidades debido al desprendimiento celular. Se observaron grandes cantidades de células esféricas en suspensión en el medio de cultivo. Se registró un alto porcentaje de células redondeadas entre aquellas que permanecieron adheridas a la fosa. En contraste, cuando se coincubó el sobrenadante de EHEC sobre las células junto con la cepa CIDCA 133, se observó una evidente protección de la monocapa. La cantidad de células desprendidas fue menor, mientras que aquellas que permanecieron adheridas conservaron en mayor proporción la forma ahusada normal.

La evidencia microscópica de protección por el lactobacilo, correlacionó con un mayor porcentaje de células viables que fueron capaces de incorporar el colorante rojo neutro (figura 3). La presencia del lactobacilo cepa CIDCA 133 aumentó en forma significativa la viabilidad de las células sometidas a la acción de la toxina Shiga en todas la concentraciones ensayadas.

Cuando se coincubaron las monocapas con sobrenadante de EHEC junto con la cepa LBR (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) no se observaron diferencias cualitativas en el estado general de las células al microscópio óptico. En concordancia con esta observación, la cuantificación de la viabilidad por rojo neutro no mostró diferencias significativas entre las células tratadas sólo con sobrenadante de EHEC y aquellas que fueron incubadas a su vez con la cepa LBR (figura 3). Los resultados demuestran que el efecto protector en este caso, no es una propiedad inherente a cualquier lactobacilo.

A fin de indagar algunos aspectos relacionados con los mecanismos involucrados en el efecto protector de la cepa 133, se coincubaron las monocapas con el lactobacilo y los sobrenadantes de EHEC en distintas condiciones (figura 4).

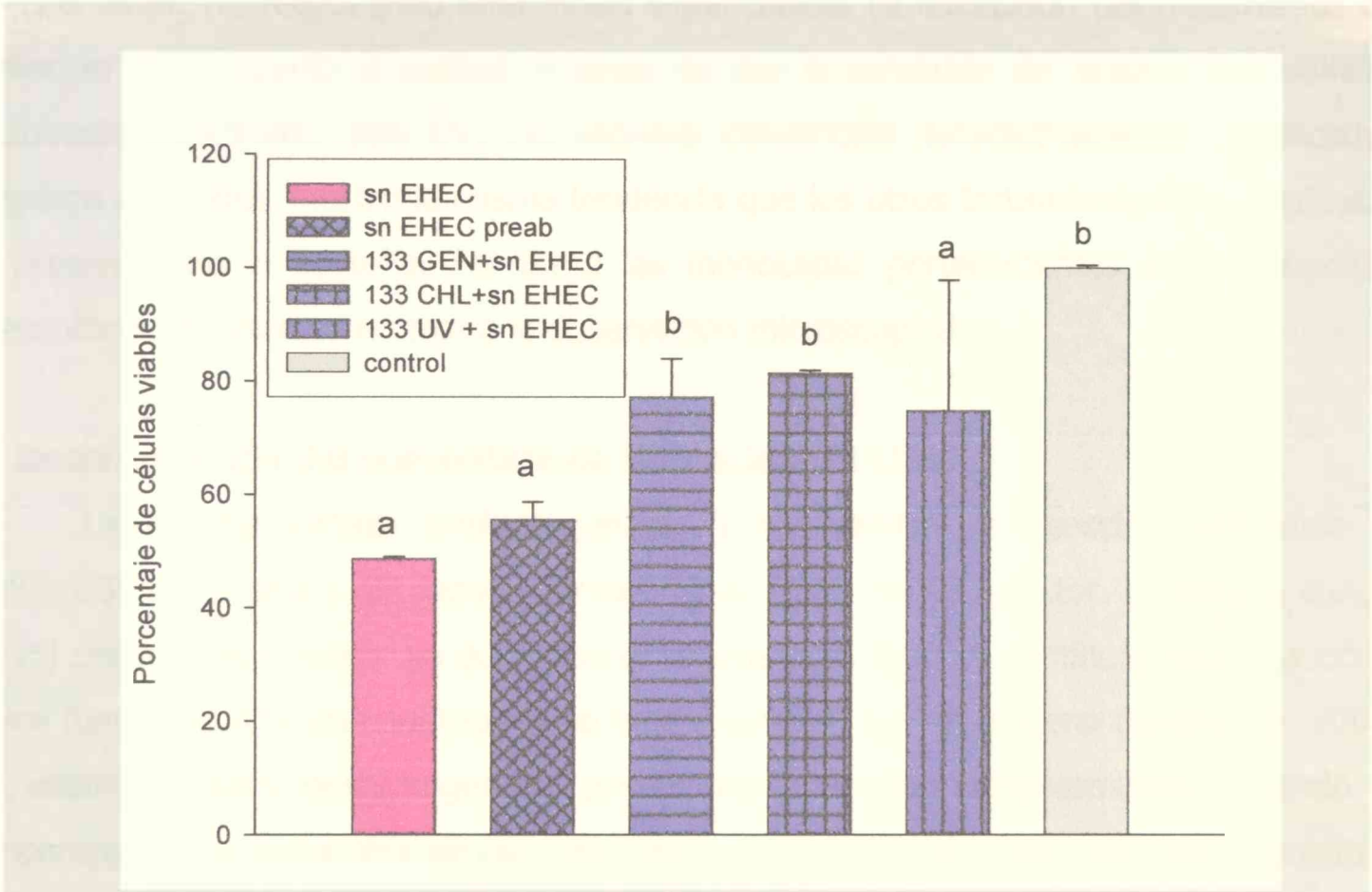


Figura 4: Porcentaje de células Vero viables a la acción del sobrenadante de EHEC tratadas con la cepa CIDCA 133. La cuantificación se efectuó por rojo neutro. El sobrenadante de EHEC (sn) fue utilizado diluído 1/5. Las líneas sobre las barras indican la desviación estándar. Letras diferentes implican diferencias significativas en test t de Student ($p<0.05$). Preab.= sobrenadante pretratado con pellet bacteriano.

En el ensayo se utilizaron tanto lactobacilos viables como no viables. Las bacterias viables se incubaron en presencia del antibiótico cloranfenicol. El cloranfenicol es un antibiótico que se une a la peptidil transferasa del ribosoma bacteriano impidiendo la síntesis proteica, utilizado en la concentración adecuada suele ejercer un efecto bacteriostático. En el ensayo se utilizó a una concentración de 50 ug/ml que efectivamente, resultó ser bacteriostática para el lactobacilo (CIM 100 ug/ml). Como

métodos de inactivación de la célula bacteriana se emplearon: el antibiótico gentamicina (como en el ensayo anterior) y la radiación ultravioleta (UV). Una última condición ensayada fue la utilización de sobrenadante de EHEC preincubado con pellet concentrado de lactobacilo. El pretratamiento del sobrenadante con una suspensión concentrada del lactobacilo se realizó con el objetivo de determinar la existencia de adsorción inespecífica por parte del soma bacteriano de la toxina Shiga.

Se observó que la incubación de las monocapas con sobrenadante de EHEC, redujo el porcentaje de células sobrevivientes al 50% (figura 4). El sobrenadante preabsorbido con pellet de lactobacilo no fue capaz de aumentar este porcentaje significativamente. En contraste, los tratamientos que implicaron la coincubación de la toxina con el lactobacilo viable o no viable incrementaron la viabilidad celular en un 80% en promedio, no registrando diferencias significativas (a excepción del tratamiento con radiación UV) respecto al control. A pesar de que la condición del ensayo que utilizó el lactobacilo inactivado con UV, no registró diferencias estadísticamente significativas respecto al control, mostró la misma tendencia que los otros tratamientos que implicaban la presencia de la bacteria. Asimismo las monocapas pertenecientes a esta condición presentaron un aspecto normal a la observación microscópica.

b) Determinación del porcentaje de liberación de LDH.

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la reacción reversible de conversión de lactato a piruvato en presencia de NAD^+ como cofactor. La enzima cumple un rol esencial en la célula ya que permite regenerar el NAD^+ y continuar con la glucólisis única fuente de ATP en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno (Lenhinger, 2001). La enzima lactato deshidrogenasa posee una ubicación citoplasmática. Cuando su concentración se encuentra elevada en sangre y otros líquidos extracelulares, constituye un marcador de daño celular. Asimismo, en los modelos *in vitro* que emplean cultivos celulares la liberación de LDH al medio es un indicador de injuria celular.

En esta sección se realizaron ensayos para determinar el daño celular provocado por la toxina Shiga sobre células Vero mediante la cuantificación del porcentaje de enzima lactato deshidrogenasa liberado. En un primer experimento se verificó el comportamiento dosis respuesta del sistema, así como la sensibilidad de la técnica (figura 5).

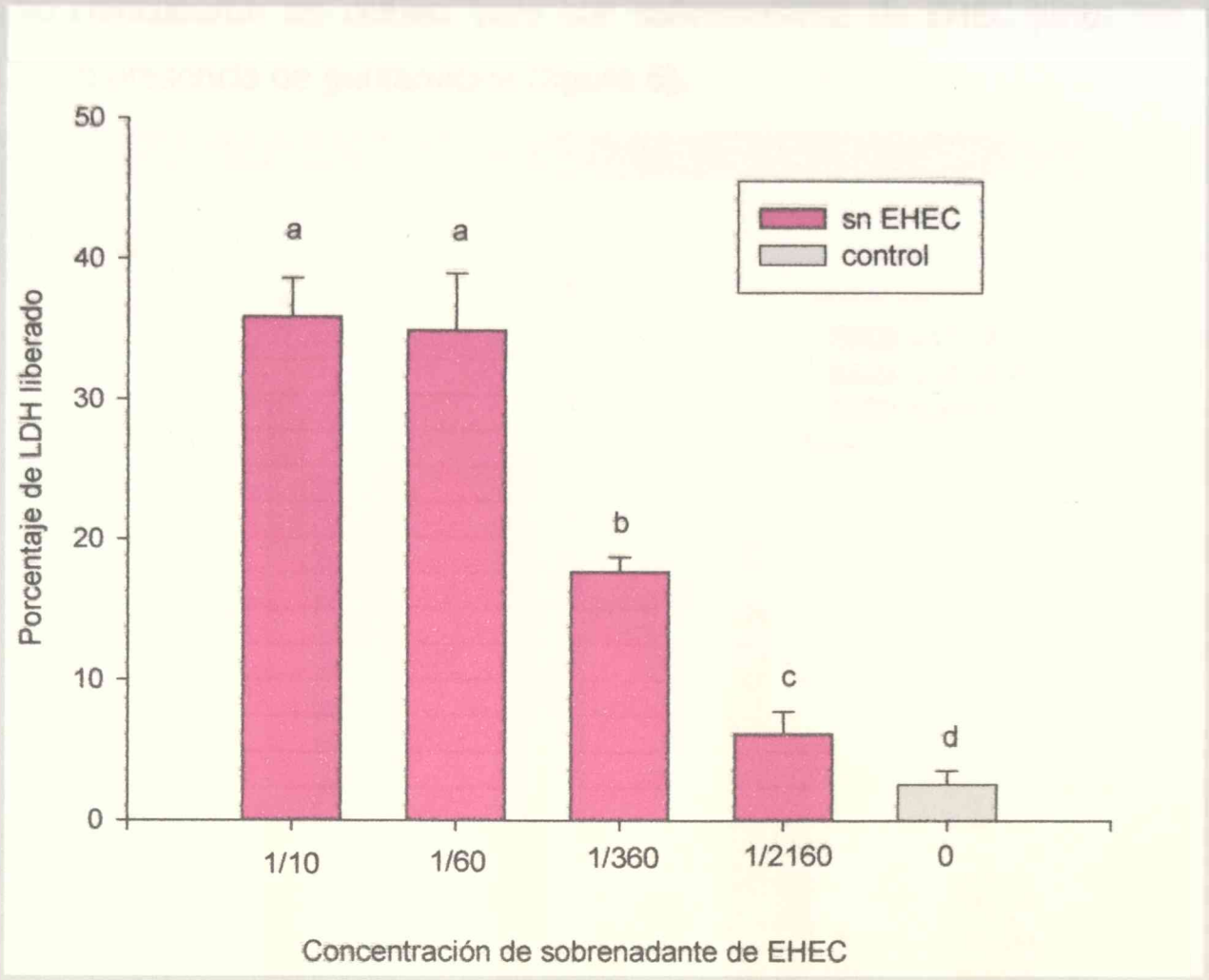


Figura 5: Determinación del porcentaje de LDH liberado por células Vero luego del tratamiento con distintas concentraciones de sobrenadante de EHEC. Las líneas sobre las barras indican la desviación estándar. Letras diferentes implican diferencias significativas en test t de Student ($p<0,05$).

Al microscopio óptico invertido se observó que en las dos primeras diluciones del sobrenadante ensayadas (1/10 y 1/60), las monocapas estaban sumamente deterioradas. Se encontró un alto porcentaje de células en suspensión y numerosas células redondeadas. A partir de la dilución 1/360 del sobrenadante las monocapas presentaron mayor integridad con un aspecto casi normal hacia la dilución 1/2160. El registro visual correlacionó perfectamente con los porcentajes de LDH liberados (figura 5). Las dos diluciones iniciales del sobrenadante mostraron un valor semejante de LDH liberado, alrededor del 35%. En las diluciones siguientes (1/360 y 1/2160) pudo verificarse el comportamiento dosis respuesta del sistema, registrándose valores de LDH liberado de 17.73% y 6.19% respectivamente. Las células del grupo control presentaron un porcentaje de enzima liberado de 2.58%, el cual fue considerado como el porcentaje normal para este sistema.

La sensibilidad de la técnica resultó apropiada, ya que los resultados de la cuantificación de LDH correlacionaron con la observación microscópica.

A fin de verificar la existencia de un efecto protector del lactobacilo en este modelo, se coincubaron las células Vero con sobrenadante de EHEC junto con la cepa CIDCA 133 en presencia de gentamicina (figura 6).

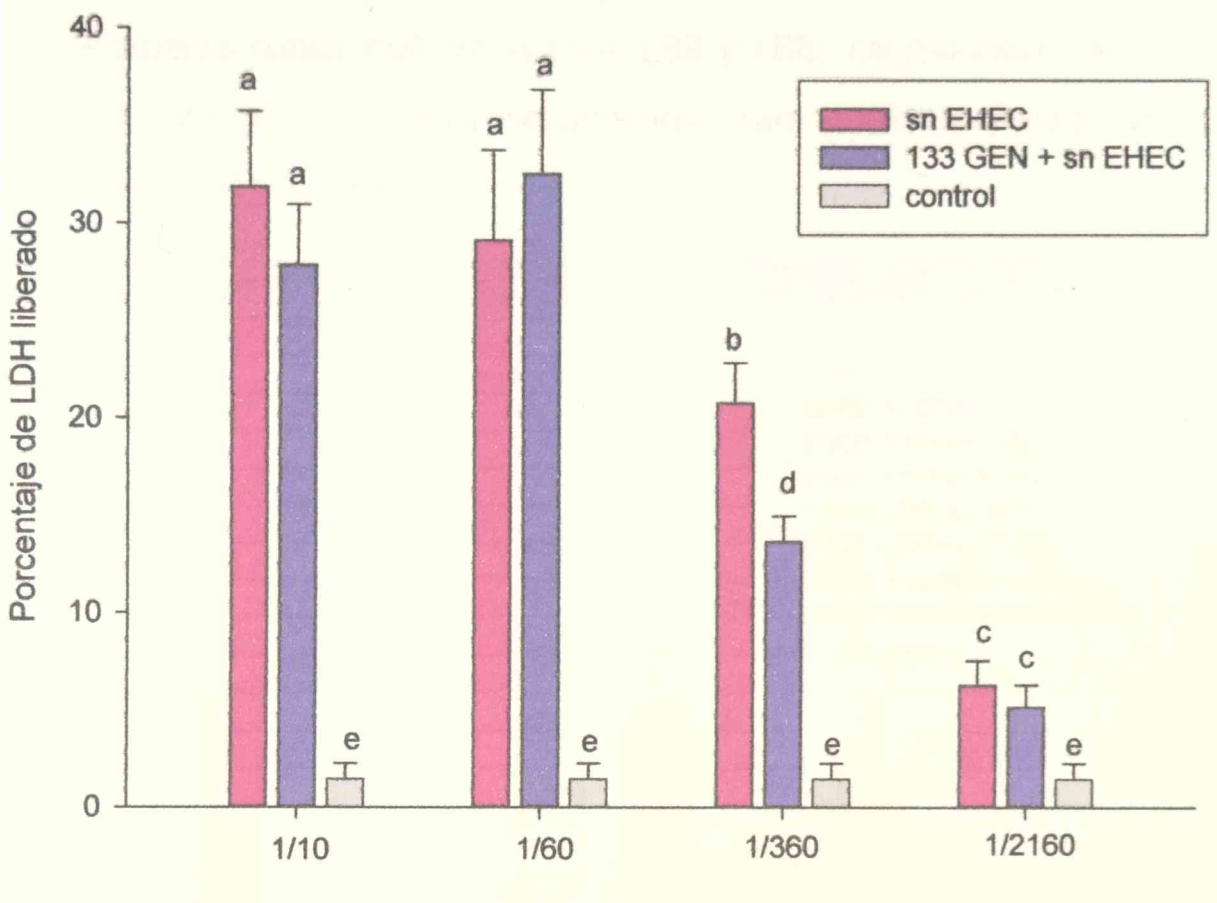


Figura 6. Determinación del porcentaje de LDH liberado por células Vero luego del tratamiento con distintas concentraciones de sobrenadante de EHEC en presencia de la cepa CIDCA 133.
La barra indicada como control carece de sobrenadante. Las líneas sobre las barras indican la desviación estándar. Letras diferentes implican diferencias significativas en test t de Student ($p<0.05$).

Se observó que solamente en la dilución 1/360 del sobrenadante existieron diferencias significativas entre las células tratadas con toxina y aquellas que contenían toxina y lactobacilo. Las primeras tuvieron un porcentaje de LDH liberado de 20,78% mientras que las células que fueron incubadas junto con la cepa CIDCA 133 registraron un valor de 13,33%. A concentraciones altas de la toxina Shiga las monocapas se encontraron profundamente dañadas, tal como se mencionara anteriormente. El lactobacilo no pudo antagonizar el efecto biológico de elevadas concentraciones de toxina sobre las células. En la dilución 1/2160 las células presentaron una apariencia casi normal, aunque el porcentaje de enzima liberado fue significativamente mayor que el control. A dilución 1/2160, la coincubación con la cepa CIDCA 133 disminuyó la cantidad de LDH libre pero esta diferencia no fue significativa. Los resultados demuestran que el efecto protector del lactobacilo se verificó para aquella dilución del sobrenadante donde el daño a las células Vero no fue extremo. Evidentemente existe una relación óptima entre la

concentración de toxina Shiga y el número de ufc/ml de lactobacilo para lograr un efecto antagónico máximo. Es importante destacar que al trabajar con sobrenadantes y no con toxina purificada, la dilución del mismo que ejerce un nivel moderado de daño puede variar entre experimentos independientes (comparar por ejemplo figura 6 y 7).

Utilizando esta metodología, se investigó asimismo el efecto de otros lactobacilos (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* cepa LBR y LBB, *Lactobacillus plantarum* cepa CIDCA 83114), así como de otros microorganismos Gram positivos y negativos (*Bacillus subtilis* y *E. coli* cepa CM1) (figura 7).

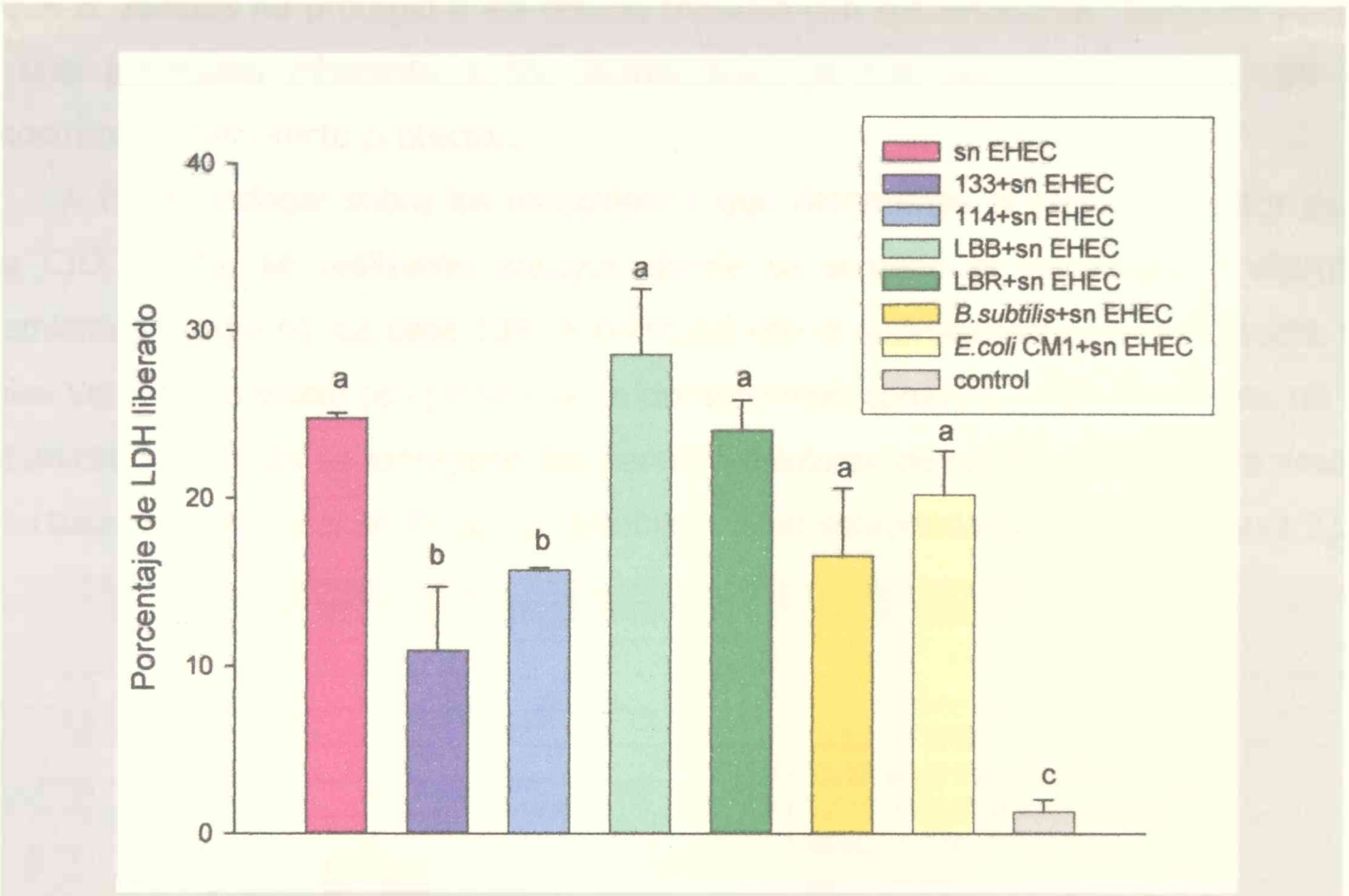


Figura 7. Determinación del porcentaje de LDH liberado de células Vero tratadas con sobrenadante de EHEC en presencia de diferentes bacterias. La dilución del sobrenadante fue de 1/50. Las bacterias fueron coincubadas en presencia de gentamicina (100 ug/ml). Las líneas sobre las barras indican la desviación estándar. Letras diferentes implican diferencias significativas en test t de Student ($p<0.05$).

Los resultados demuestran que tanto la cepa CIDCA 133 como la cepa 83114 disminuyeron significativamente el porcentaje de LDH liberado en las células Vero tratadas con sobrenadante de EHEC. Las monocapas incubadas solamente con sobrenadante tuvieron un 24.8% de enzima lactactato deshidrogenasa libre, mientras que las monocapas que contenían además estas dos cepas tuvieron un 13% de LDH libre en promedio. Los restantes lactobacilos ensayados no fueron capaces de antagonizar el efecto de la toxina Shiga sobre las células en cultivo. La cepa LBR tampoco había logrado proteger las monocapas durante los ensayos previos cuantificados mediante la técnica de rojo neutro (ver punto anterior). Evidentemente estas dos cepas de lactobacilos (LBR y

LBB) aunque muy relacionadas con la cepa CIDCA 133 no ejercieron efecto antagónico sobre la toxina Shiga. Tanto el *B. subtilis* como la cepa CM1 de *E. coli* fueron incapaces de disminuir el daño provocado por la toxina.

Considerando los resultados se puede concluir que el antagonismo hacia el efecto biológico de la toxina Shiga *in vitro* no es una propiedad general de las bacterias, ya que un microorganismo Gram positivo (*B. subtilis*) como un microorganismo Gram negativo (*E. coli*) no fueron capaces de contrarrestarlo. De la misma manera este efecto protector no puede considerarse una característica propia de los microorganismos Gram positivos porque *B. subtillis* no protegió a las células tratadas con sobrenadante. Tampoco resultó ser una propiedad inherente a los lactobacilos, ya que las cepas LBR y LBB no demostraron tener efecto protector.

A fin de indagar sobre los mecanismos que determinan el efecto protector de la cepa CIDCA 133, se realizaron ensayos donde se sometió al lactobacilo a distintos tratamientos (figura 6). La cepa 133 se coincubó con el sobrenadante de EHEC sobre las células Vero, tanto viable (en presencia de cloranfenicol) como no viable (en presencia de gentamicina). Además se extrajeron las paredes celulares de suspensiones concentradas del lactobacilo, las cuales se incubaron también con el sobrenadante de EHEC (figura 8).

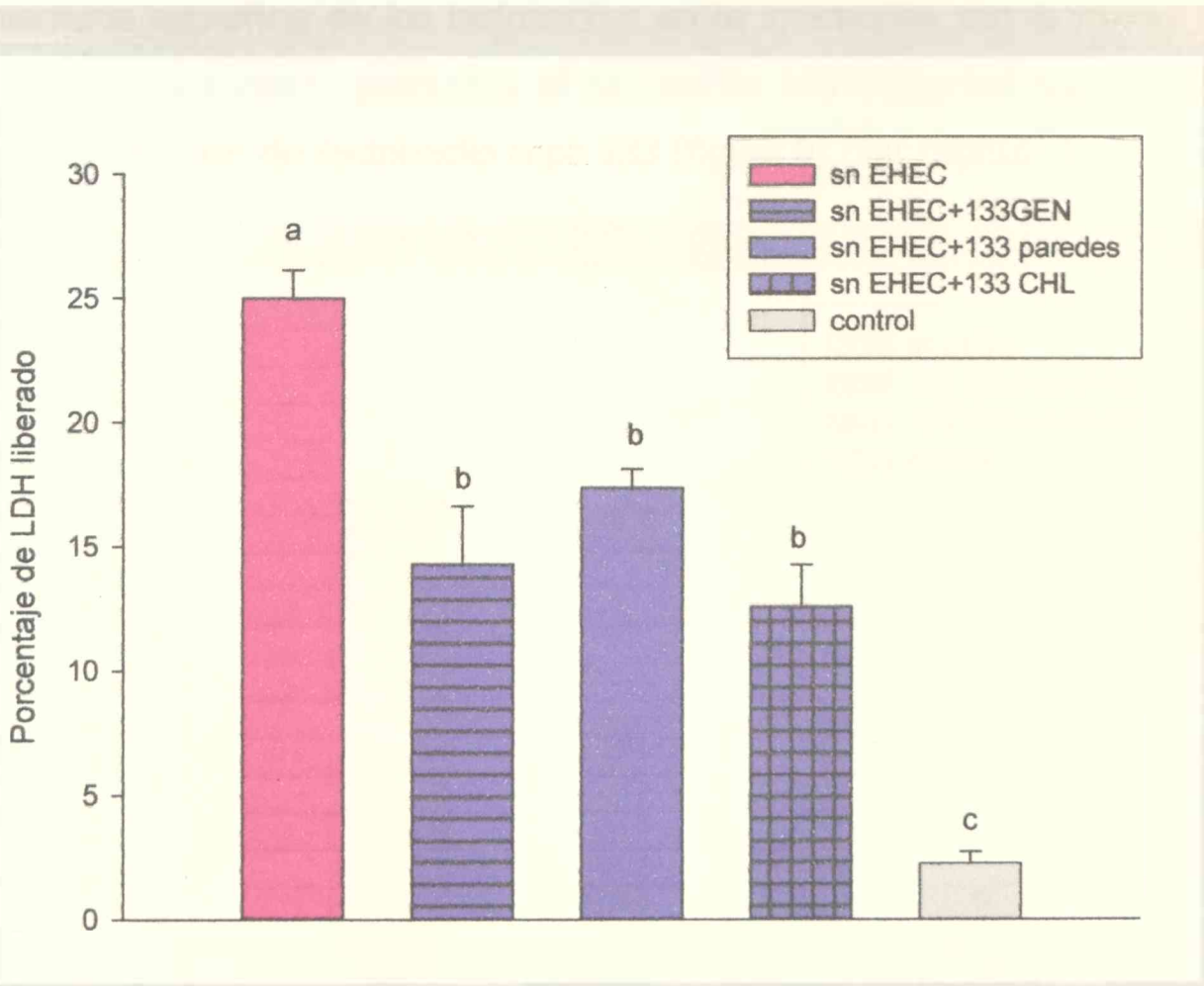


Figura 8. Determinación del porcentaje de LDH liberado por células Vero luego del tratamiento con sobrenadantes de EHEC en presencia de la cepa CIDCA 133. La dilución del sobrenadante fue de 1/50. Las líneas sobre las barras indican la desviación estándar. GEN significa gentamicina, CHL: cloranfenicol. Letras diferentes implican diferencias significativas en test t de Student ($p<0.05$).

Se observó que las tres condiciones resultaron similares, tanto la presencia de las paredes como del lactobacilo viable o no, disminuyeron significativamente el porcentaje de LDH liberado. Las células tratadas solamente con sobrenadante de EHEC registraron un 25% de enzima lactato deshidrogenasa libre, mientras que las que contenían lactobacilo o sus paredes registraron un valor de 14.77% en promedio. Es interesante destacar que si bien las paredes demostraron tener un efecto protector frente a los sobrenadantes de EHEC en todos los experimentos realizados, se observó que la magnitud del antagonismo fue siempre levemente menor con respecto a la presencia de la bacteria entera, por lo que no puede descartarse la influencia de otros factores.

Al indagar sobre el rol antagónico de las paredes se encontró que el tratamiento de los lactobacilos 133 y 83114 con proteasas anula el efecto protector sobre la toxina. Las proteasas utilizadas determinarían la modificación de las proteínas de superficie presentes en las bacterias. Estas proteínas podrían tal vez poseer una actividad catalítica sobre la toxina Shiga que explicaría la disminución de su actividad en presencia del lactobacilo o sus paredes. Esta hipótesis concuerda con el hecho de que la inactivación por calor de la cepa CIDCA 83114 disminuye significativamente su efecto protector.

Dado que los resultados obtenidos destacaron el rol de las paredes o más genéricamente la superficie de los lactobacilos en la interacción con la toxina Shiga; se decidió investigar qué efecto produciría el cambio de hidrofobicidad superficial sobre la capacidad de protección del lactobacilo cepa 133 (figura 9) (ver capítulo 1).

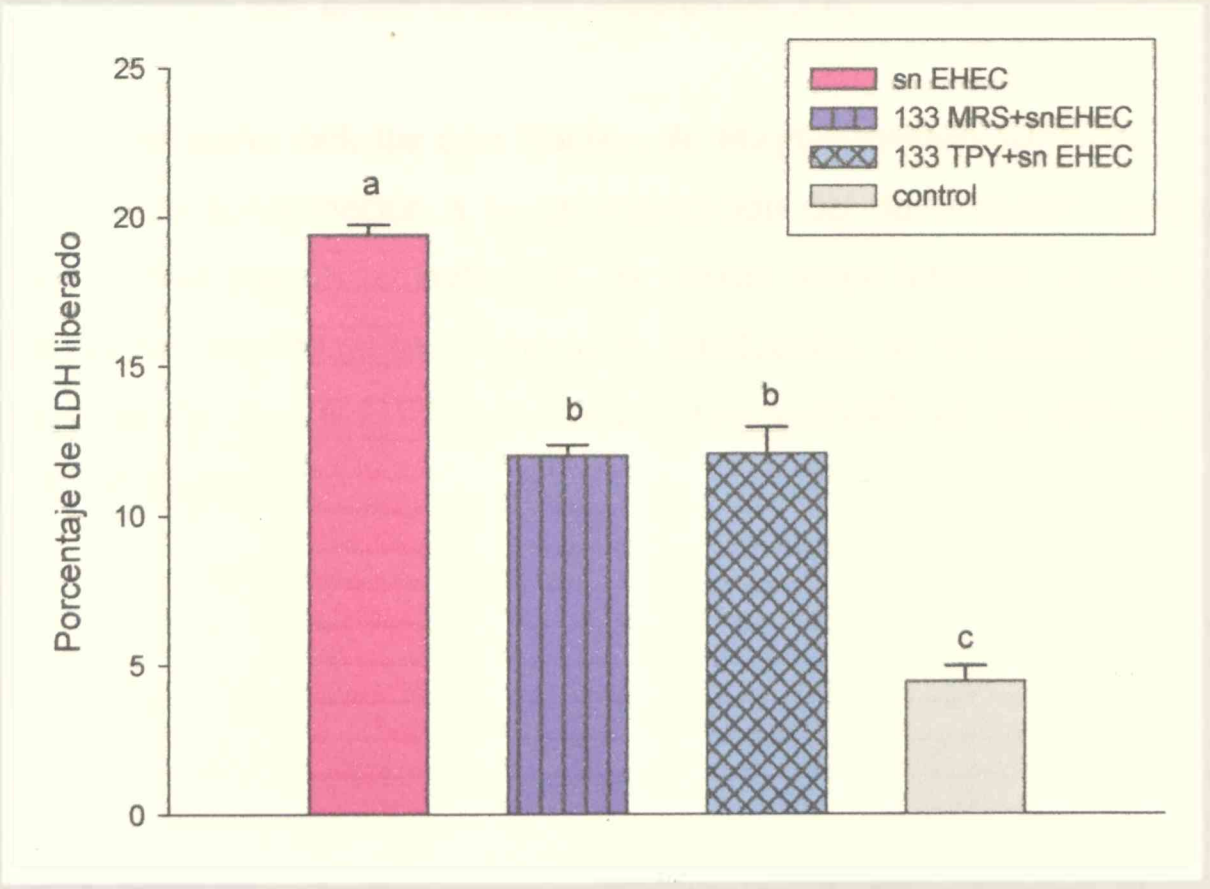


Figura 9. Determinación del porcentaje de LDH liberado de células Vero, luego del tratamiento con sobrenadante de EHEC en presencia de la cepa CIDCA 133 crecida en TPY o MRS. La dilución del sobrenadante fue de 1/50. El lactobacilo se coincubó en presencia de gentamicina (100 ug/ml). Letras diferentes implican diferencias significativas en test t de Student ($p<0.05$).

Con el objetivo de variar la hidrofobicidad superficial del lactobacilo se creció en medio TPY. La cepa CIDCA 133 cambia su hidrofobicidad superficial desde 2.33 ± 0.75% crecida en MRS a 52.54 ± 5.08% cuando se cultiva en TPY (ver capítulo 1). El aumento de la hidrofobicidad del lactobacilo, no afectó sin embargo sus propiedades antagónicas sobre la toxina Shiga. En la figura 9 puede observarse que tanto el lactobacilo crecido en MRS como el cultivado en TPY disminuyeron significativamente la cantidad de enzima lactato deshidrogenasa liberada. Se registró un 13% de enzima libre en promedio cuando las monocapas se incubaron con el sobrenadante de EHEC más el lactobacilo, mientras que se obtuvo un 19.5% de enzima liberada en el caso de las células tratadas sólo con sobrenadante.

Interacción de *E. coli* EHEC con células Hep-2.

Las células Hep-2, epiteliales de laringe humana, constituyen un modelo reconocido para el estudio de la lesión A/E *in vitro.* Otras líneas celulares como Caco-2 o HeLa, también desarrollan la lesión A/E luego de la adhesión de *E. coli* EPEC o EHEC. Dado que la línea celular Hep-2 es una de las más reactivas y ampliamente utilizadas en la investigación de la patogenia de EHEC-EPEC, fue seleccionada en este trabajo para el estudio de la adhesión de EHEC en interacción con el lactobacilo cepa CIDCA 133.

Los ensayos de esta sección, a diferencia de los anteriores donde se estudió la acción de la verocitotoxina, son de corta duración. En este caso, los tiempos de incubación de las células con *E. coli* EHEC no superan las 3 h.

a) Observación del daño celular con tinción de MayGrünwald-Giemsa.

Como primera aproximación a la caracterización del daño celular producido por EHEC sobre las células Hep-2, se cultivaron las células sobre láminas de vidrio para su posterior observación microscópica. Monocapas confluentes se incubaron durante tres horas en presencia de *E. coli* EHEC cepa 69160 resuspendida en su sobrenadante de cultivo o en DMEM (figura 10).

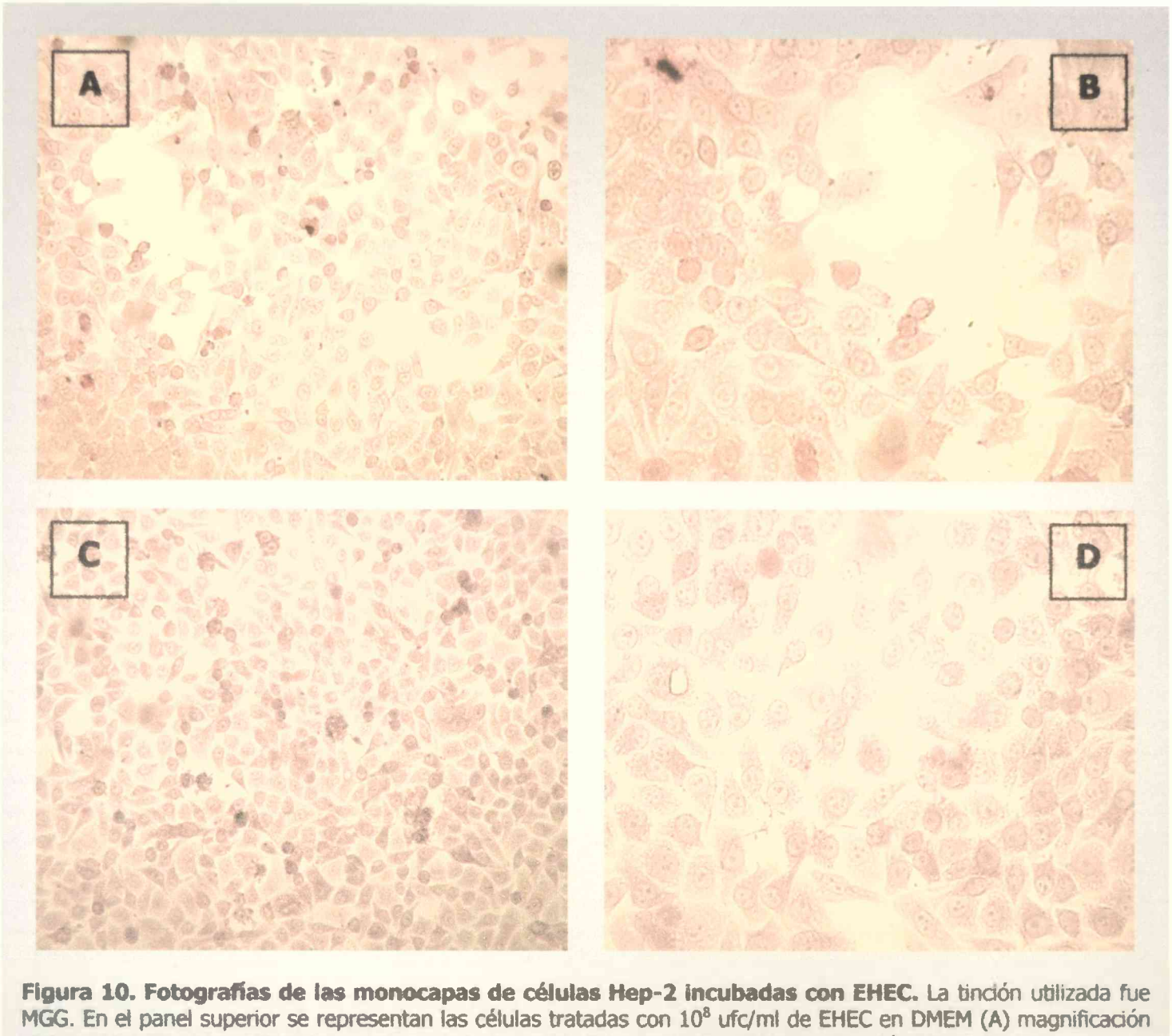


Figura 10. Fotografías de las monocapas de células Hep-2 incubadas con EHEC. La tinción utilizada fue MGG. En el panel superior se representan las células tratadas con 10^8 ufc/ml de EHEC en DMEM (A) magnificación 20X (B) 40X. En el panel inferior se encuentran los respectivos controles (D) magnificación 20X y (E) 40X

Se observó que la presencia de EHEC produjo un marcado daño en las monocapas de células Hep-2 respecto al control. Las monocapas incubadas con EHEC (figura 10 A y B) presentaron una menor densidad de células debido al desprendimiento de las mismas. La morfología celular fue notablemente más ahusada que las células control (figura 10 C y D), posiblemente por la retracción de las células que permanecieron adheridas. No se registraron cambios a nivel nuclear con la coloración empleada.

Si bien la lesión A/E es provocada por la interacción de las proteínas de superficie de EHEC sobre las células (ver introducción), se decidió investigar qué sucedía si en los ensayos de asociación se añadía sobrenadante de cultivo de EHEC (figura 11).

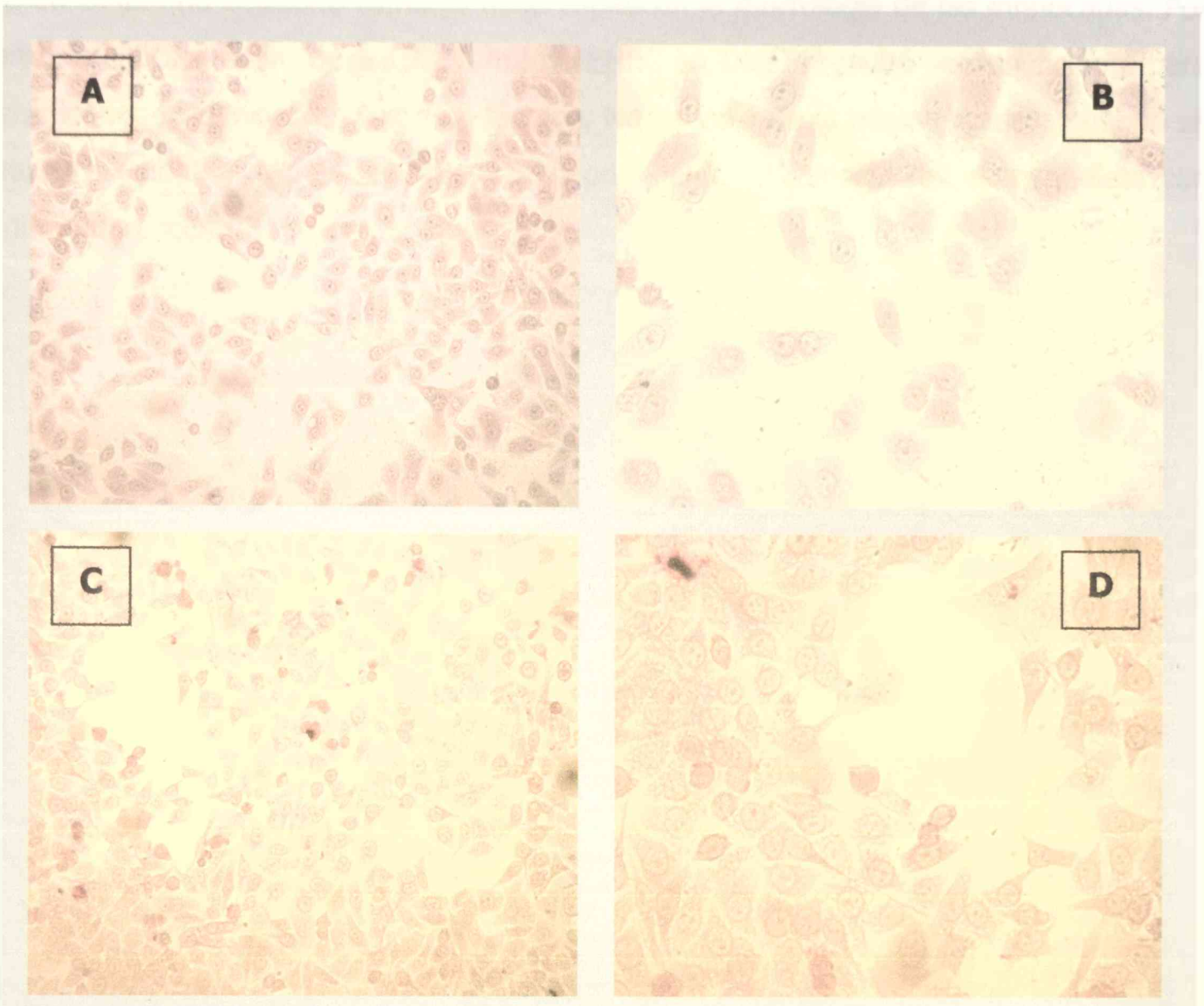


Figura 11. Fotografías de las monocapas de células Hep-2 incubadas con EHEC resuspendida o no en su sobrenadante de cultivo. En el panel superior se representan las células tratadas con 10^8 ufc/ml de EHEC resuspendida en su sobrenadante de cultivo (A) magnificación 20X y (B) 40X. En el panel inferior se encuentran las células tratadas con 10^8 ufc/ml de EHEC resuspendida en DMEM (D) magnificación 20X y (E) 40X La incubación fue de 3 h.

Se registró que las monocapas tratadas con EHEC resuspendida en su sobrenadante de cultivo (figura 11 A y B) sufrieron un mayor deterioro que aquellas donde la bacteria estuvo resuspendida en DMEM (figura 11 C y D). Se incrementó la magnitud del desprendimiento y deformación celular en presencia del sobrenadante de EHEC. Asimismo, durante la realización de otro ensayo pudo observarse la existencia de una relación dosis respuesta entre la concentración de EHEC incubada sobre las células y la magnitud del daño provocado (figura 12). Las monocapas incubadas con 1 10^8 ufc/ml de EHEC presentaron mayores dimensiones de los espacios libres (figura 12 A y B) respecto de las monocapas incubadas con 1 10^6 ufc/ml; lo cual significa un porcentaje de desprendimiento celular mayor. Esta observación se registró tanto en los ensayos donde *E. coli* EHEC se incubó en su propio sobrenadante de cultivo como cuando se lo hizo en DMEM. A diferencia del efecto dañino que produjo sobre las células la incubación de 1 10^6 ufc/ml de EHEC resuspendida en su sobrenadante; una concentración equivalente de

EHEC en DMEM no ocasionó cambios observables en la morfología de las monocapas. Por lo tanto la concentración de 1 10^6 ufc/ml de EHEC en DMEM resultó ser insuficiente para generar daños evidenciables con esta técnica. No sucedió de la misma manera cuando se utilizaron metodologías más sensibles como por ejemplo la tinción del citoesqueleto con faloidina fluorescente (ver más adelante).

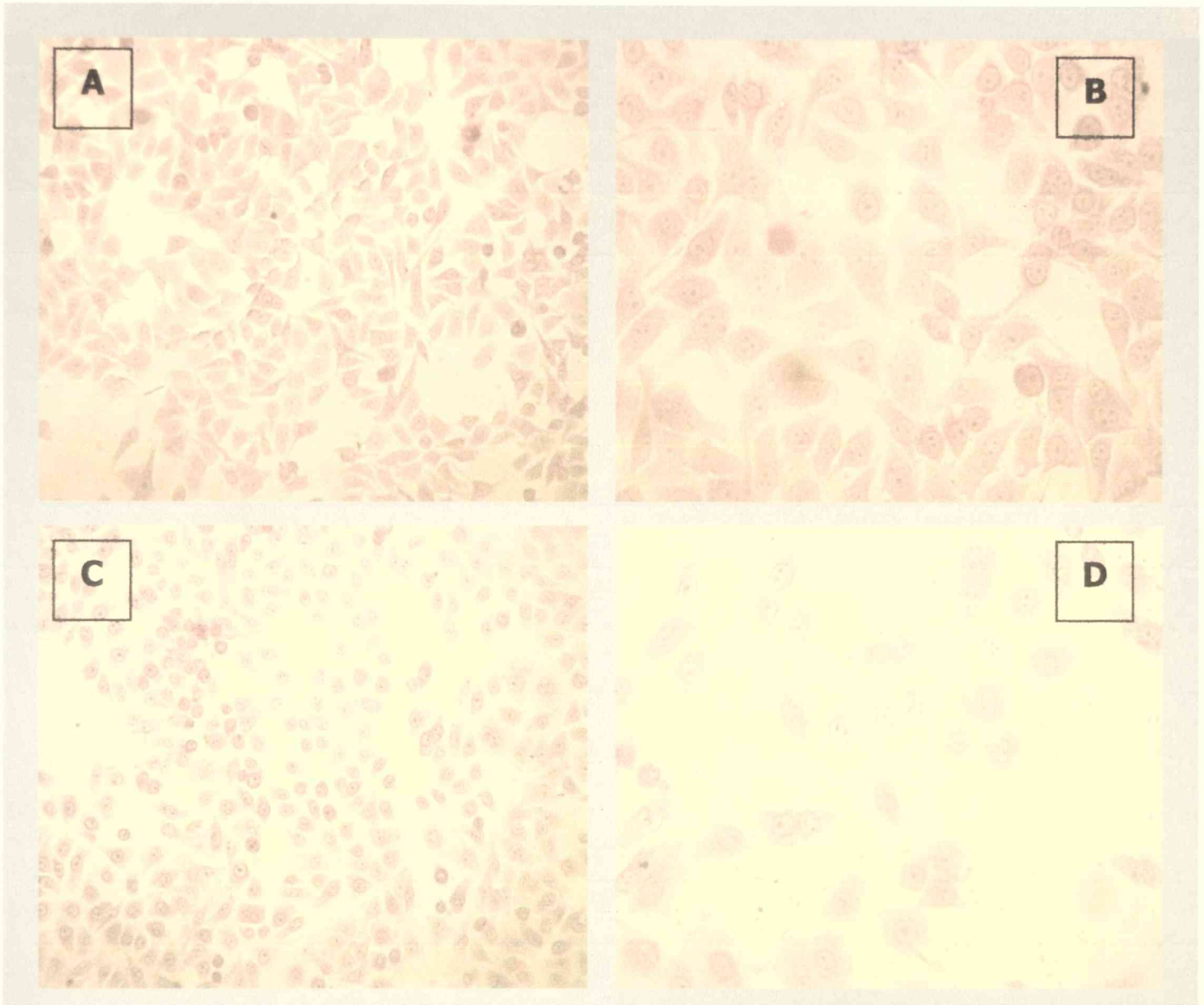


Figura 12. Fotografías de las monocapas de células Hep-2 incubadas con distintas concentraciones de EHEC resuspendida en su sobrenadante de cultivo En el panel superior se representan las células tratadas con 1 10^6 ufc/ml de EHEC resuspendida en su sobrenadante de cultivo (A) magnificación 20X y (B) 40X. En el panel inferior se encuentran las células tratadas con 1 10^8 ufc/ml de EHEC resuspendida en su sobrenadante de cultivo (D) magnificación 20X y (E) 40X La incubación fue de 3 h.

Cuando se preincubaron durante una hora las monocapas de células Hep-2 con la cepa CIDCA 133 en una concentración 1 10^8 ufc/ml y luego se añadió la cepa 69160 de *E. coli* EHEC durante 3 h; se hizo evidente la protección ejercida por la cepa de lactobacilo (figura 13 B, D y F).

Las monocapas incubadas primeramente con el lactobacilo se mostraron íntegras sin poder distinguir diferencias respecto a las células control. No hay evidencias de alteración de la morfología celular ni desprendimiento. El lactobacilo protegió a las células

tanto en la menor concentración de EHEC ensayada (1 10^6 ufc/ml) (figura 13 B) como en la mayor (1 10^8 ufc/ml) (figura 13 D y F).

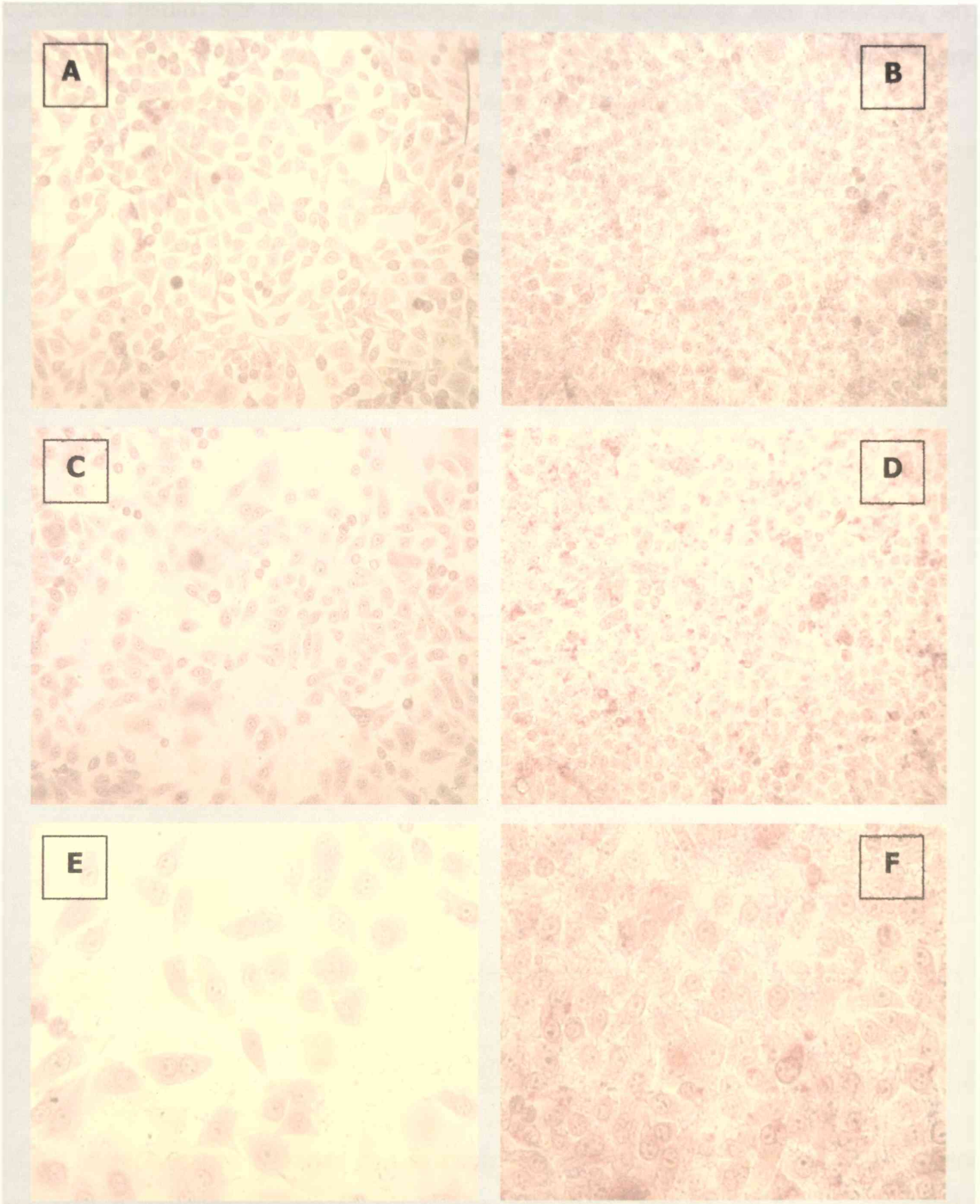


Figura 13. Fotografías de las monocapas de células Hep-2 coincubadas con la cepa CIDCA 133 y *E. coli* EHEC. En el panel izquierdo se representan las células tratadas con EHEC resuspendida en su sobrenadante de cultivo. (A) EHEC 1 10^6 ufc/ml 20X (C) EHEC 1 10^6 ufc/ml 20X y (E) EHEC 1 10^8 ufc/ml Magnificación 40X. En el panel derecho se encuentran las células coincubadas además con la cepa CIDCA 133 en una concentración de 1 10^5 ufc/ml. (B) 133 + EHEC 1 10^6 ufc/ml 20X (D) 133 + EHEC 1 10^8 ufc/ml 20X (F) 133 + EHEC 1 10^8 ufc/ml. Magnificación 40X

Uno de los hallazgos más importantes descriptos anteriormente cuando se analizó la interacción entre los lactobacilos y la toxina Shiga; fue que el efecto protector de los lactobacilos resultó ser cepa dependiente. A fin de corroborar este resultado, en el modelo de células Hep-2, se realizaron los ensayos de coincubación utilizando ahora la cepa LBB (*Lactobacillus delbureckii* subsp *bulgaricus*) (figura 14).

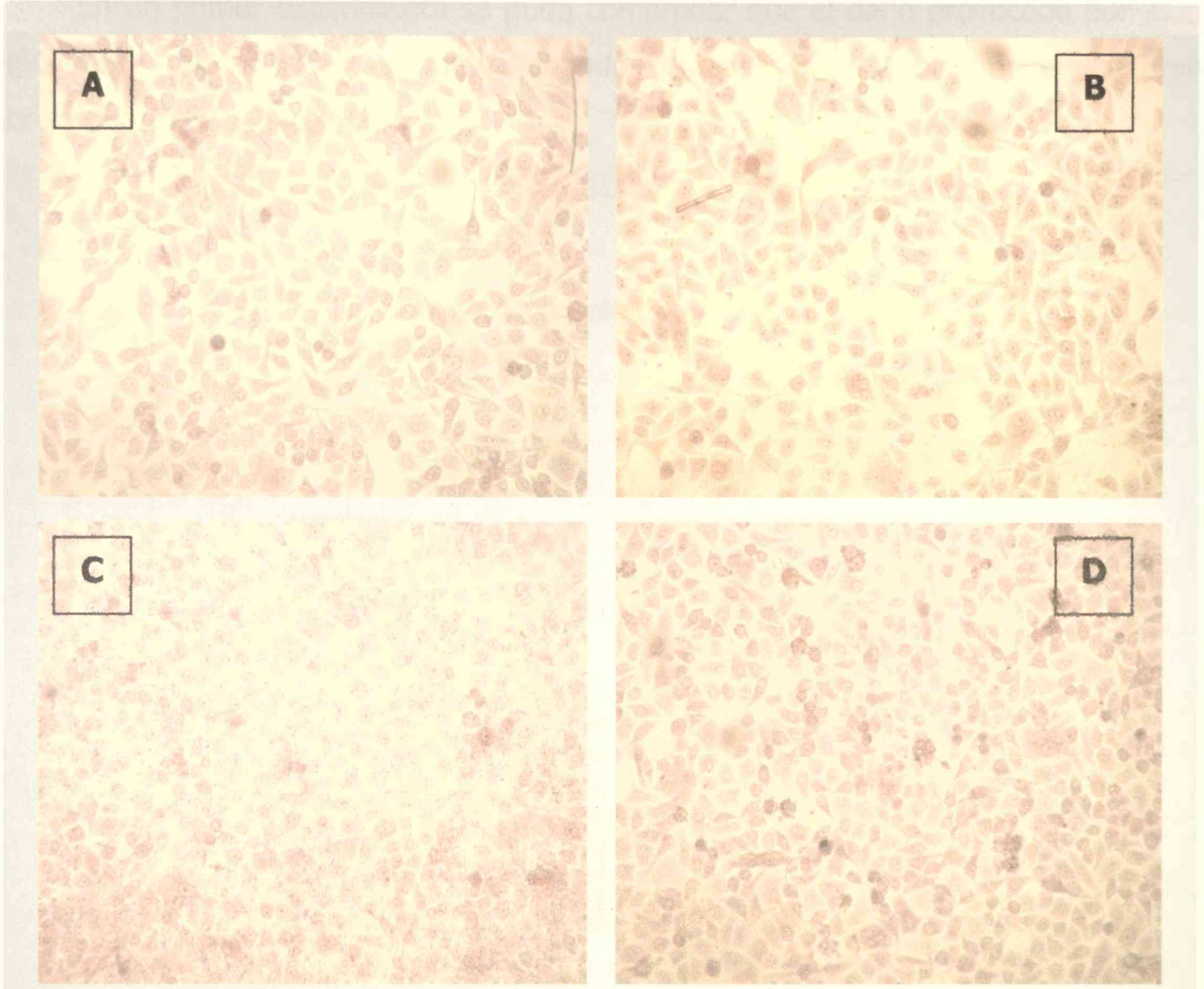


Figura 14. Fotografías de las monocapas de células Hep-2 coincubadas con la cepa CIDCA 133 o la cepa LBB junto con *E. coli* EHEC. En la foto (A) se encuentran células incubadas con 1 10^8 ufc/ml de EHEC en su sobrenadante de cultivo. En la foto (B) se representan las células coincubadas con la cepa LBB + EHEC 1 10^8 ufc/ml. En la figura (C) se encuentran las monocapas coincubadas con la cepa 133 + EHEC en la concentración mencionada. La figura (D) es un control sin bacterias. La magnificación fue en todos los casos 20X.

Las monocapas tratadas con la cepa LBB (figura 12 B) tuvieron una apariencia semejante a aquellas incubadas solamente con EHEC (figura 12 A). La densidad de células adheridas fue notablemente menor que en las monocapas tratadas con la cepa 133 (figura 12 C) o en el control (figura 12 D). La retracción celular fue muy extendida en las monocapas tratadas con EHEC o EHEC junto con la cepa LBB, a diferencia de las monocapas control o aquellas incubadas con la cepa 133.

b) Cuantificación de desprendimiento celular por tinción con cristal violeta.

La técnica de cristal violeta constituye una primera aproximación para cuantificar el daño celular. Se utilizó a fin de poder registrar de un modo numérico las diferencias cualitativas de desprendimiento celular observadas previamente en las fotografías de las monocapas de Hep-2.

En un primer experimento se pudo comprobar que el daño provocado por *E. coli* EHEC sobre células Hep-2 es mayor cuando se resuspende la bacteria en su propio sobrenadante de cultivo (figura 15).

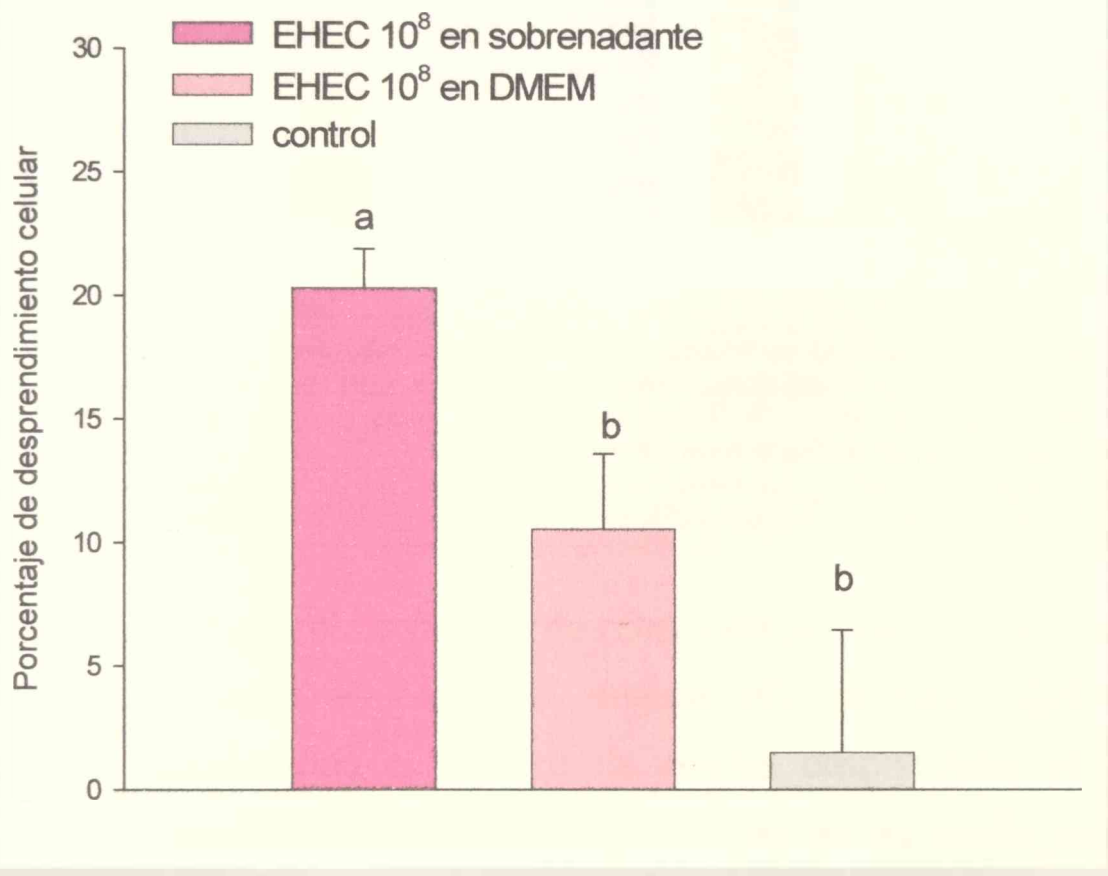


Figura 15. Porcentaje de desprendimiento celular en la línea Hep-2 infectada con *E. coli* EHEC. Las monocapas fueron incubadas con 1 10^8 ufc/ml de EHEC resuspendida en su sobrenadante de cultivo o en medio DMEM por 3 h. Las líneas sobre las barras indican la desviación estándar. Letras diferentes implican diferencias significativas en test t de Student ($p<0.05$).

El desprendimiento celular alcanzó el 20.3% cuando se incubaron las monocapas con *E. coli* EHEC resuspendida en su sobrenadante, mientras que fue sólo del 10.5% cuando la bacteria se resuspendió en DMEM. Estos resultados coincidieron con las observaciones microscópicas analizadas previamente (ver figura 11).

En un segundo ensayo se buscó corroborar los resultados anteriores de protección diferencial entre distintos lactobacilos, por ello se incubaron las monocapas de Hep-2 con *E. coli* EHEC junto con las cepas LBB, LBR y 133. Además se investigó si la viabilidad del lactobacilo cepa 133 constituye un factor determinante del efecto protector, para ello se lo inactivó mediante radiación UV (figura 16).

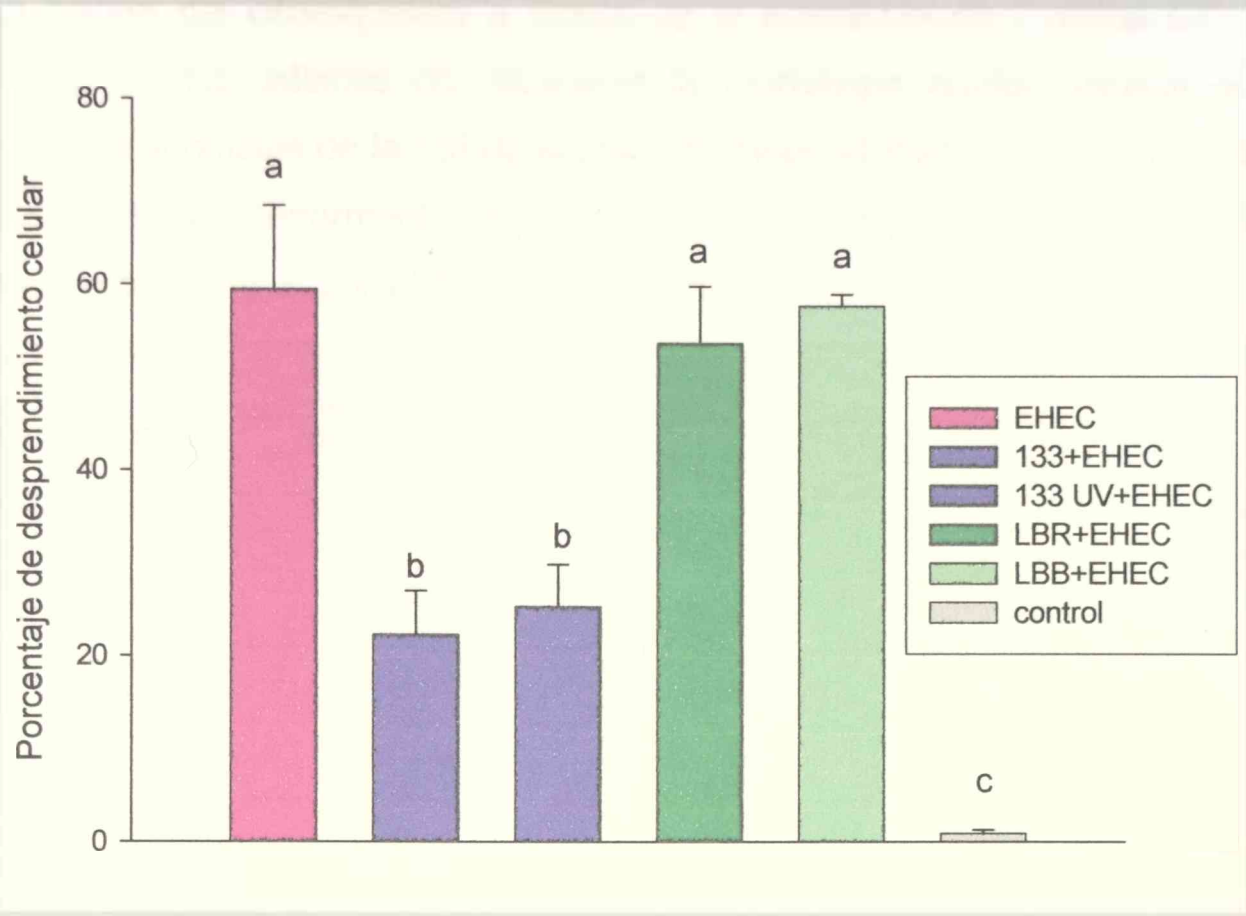


Figura 16. Porcentaje de desprendimiento celular en la línea Hep-2 infectada con *E. coli* EHEC y tratadas con la cepa CIDCA133. Las monocapas fueron incubadas con 1 10^8 ufc/ml de EHEC resuspendida en su sobrenadante de cultivo por 3 h. En el caso de las células tratadas con lactobacilos, se preincubaron durante 1 h con los mismos y luego se añadió la suspensión de EHEC. El control fue incubado en ausencia de bacterias. Las líneas sobre las barras indican la desviación estándar. Letras diferentes implican diferencias significativas en test t de Student ($p<0.05$).

Se observó que el porcentaje de células desprendidas alcanzó un 60 % cuando se incubaron las monocapas con EHEC (figura 16). La cepa CIDCA 133 protegió las monocapas disminuyendo el número de células desprendidas al 22.3 %. No hubo diferencias significativas en los porcentajes de células adheridas entre los tratamientos que contuvieron el lactobacilo viable o inactivado por UV. Las cepas de lactobacilos LBB y LBR no fueron capaces de contrarrestar el efecto provocado por *E. coli* EHEC, obteniendo porcentajes semejantes a las células incubadas solamente con sobrenadante.

Los presentes resultaron confirmaron observaciones previas realizadas sobre el modelo de células Hep-2 y Vero. La protección ejercida por los lactobacilos frente al efecto biológico de EHEC en cultivos celulares es una propiedad relacionada con la especie y cepa bacteriana involucrada. El efecto protector es independiente de la viabilidad bacteriana.

c) Tinción del citoesqueleto con faloidina fluorescente.

La tinción del citoesqueleto a través de la marcación de F-actina con faloidina fluorescente, permite además de reconocer la morfología celular, evaluar si existen conformaciones anómalas de la red de actina. Utilizando el mismo esquema experimental que en los ensayos anteriormente descriptos, se determinó en primer lugar la magnitud del daño provocado por *E. coli* EHEC sobre las células Hep-2 (figura 17).

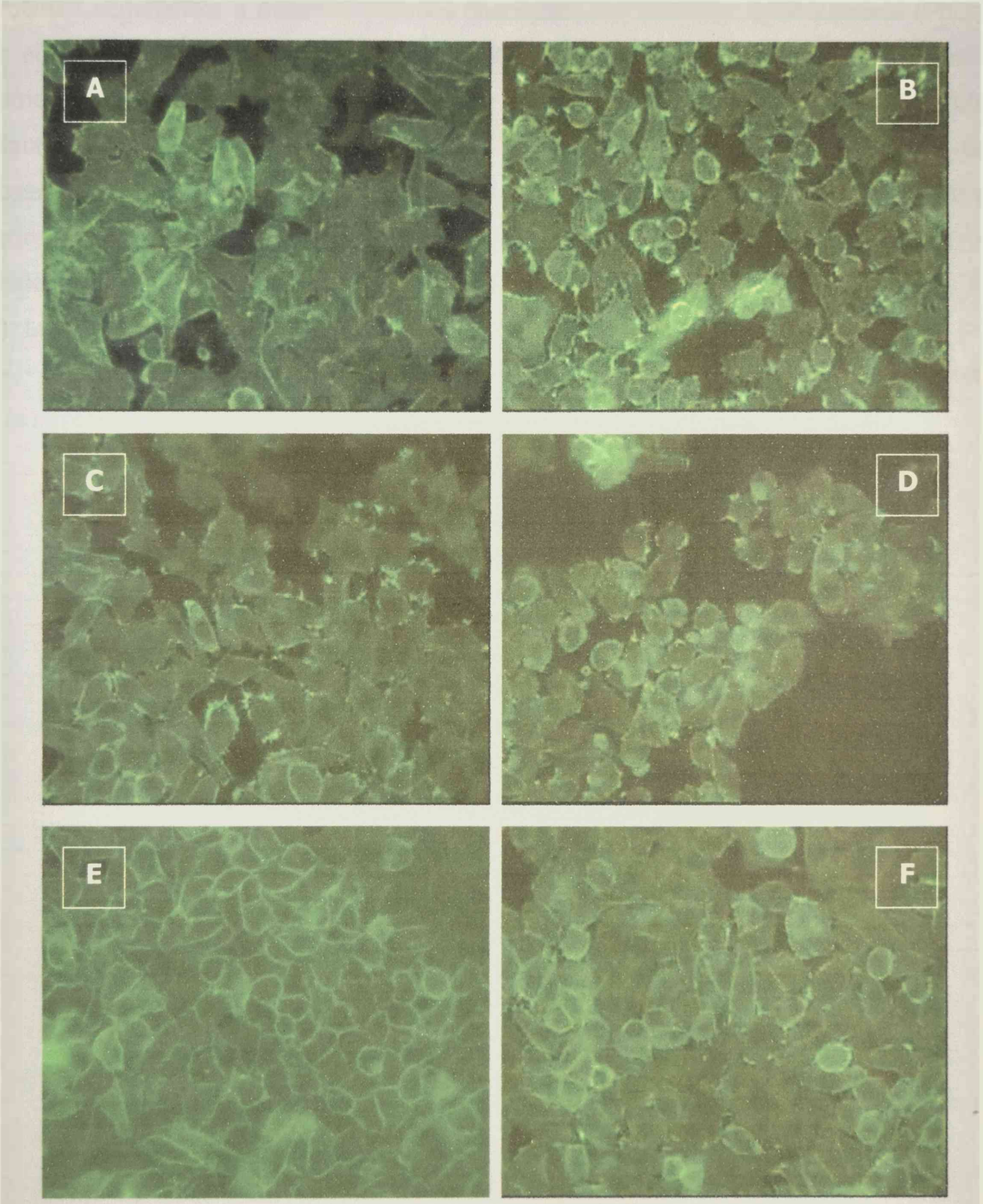


Figura 17. Tinción de F-actina de células Hep-2 infectadas con EHEC. (A) Monocapas incubadas con 1 10^6 ufc/ml de EHEC resuspendida en DMEM. (B) Monocapas incubadas con 1 10^6 ufc/ml de EHEC resuspendida en sobrenadante. (C) Monocapas incubadas con 1 10^8 ufc/ml de EHEC resuspendida en DMEM. (D) Monocapas incubadas con 1 10^8 ufc/ml de EHEC resuspendida en sobrenadante. (E) control (F) control con cepa CIDCA 133. Las incubaciones fueron de 3 h. Magnificación 20X

Las monocapas incubadas durante 3 h con EHEC mostraron signos evidentes de daño (figura 17 A, B, C y D) respecto a las células control (figura 17 E). Las monocapas sufrieron diferentes grados de desprendimiento celular que se corresponden a los espacios vacíos observados en las fotografías. Las células adquirieron una morfología más redondeada, con distintos niveles de retracción. En las monocapas más afectadas se observaron células con prolongaciones perimetrales que podrían corresponder a los procesos semejantes a microvellosidades descriptos por Phillips y colaboradores (Phillips et al, 2000). En concordancia con resultados anteriores se observó además, que el aumento de la concentración de EHEC desde 1 10^6 ufc/ml (figura 17 A y B) a 1 10^8 ufc/ml (figuras C y D) magnifica el daño sobre las monocapas. A su vez, coincidiendo con observaciones previas, la incubación de las células con *E. coli* EHEC resuspendida en su sobrenadante de cultivo (figura 17 B y D) incrementó el daño sufrido por las mismas, respecto de aquellas monocapas incubadas con *E. coli* resuspendida en DMEM (figuras A y C). La cepa CIDCA 133 no produjo daños en las células (figura 17 F).

El siguiente paso fue evaluar con esta técnica el estado de las células Hep-2 frente a la infección con EHEC en presencia del lactobacilo cepa CIDCA 133 (figura 18).

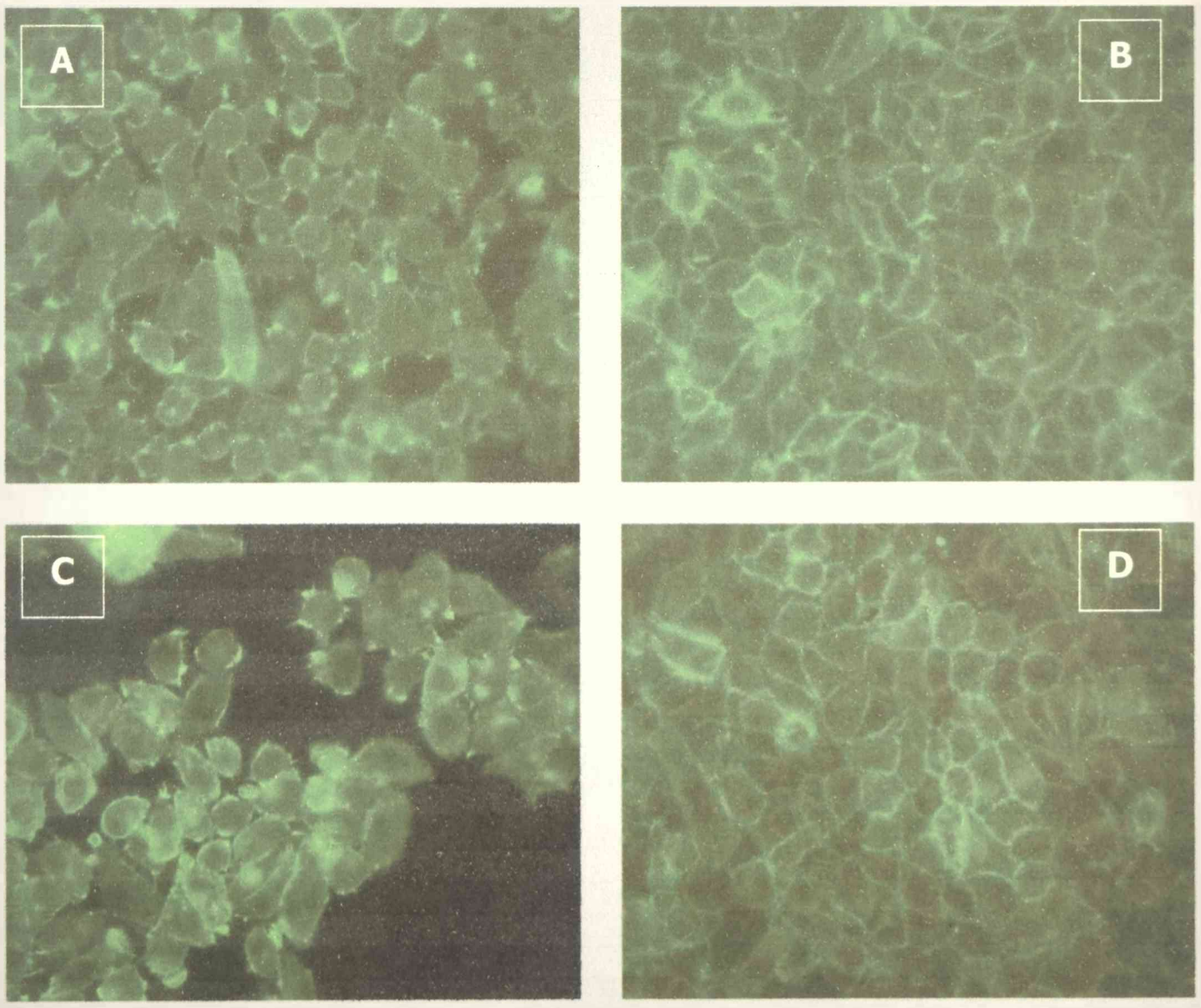


Figura 18. Tinción de F-actina de células Hep-2 infectadas con EHEC y tratadas con la cepa 133. En el panel izquierdo se muestran las células incubadas con EHEC en su sobrenadante de cultivo. (A) 1 10^6 ufc/ml de EHEC (C) 1 10^8 ufc/ml de EHEC. En el panel derecho se muestran las células incubadas con EHEC en su sobrenadante de cultivo junto con la cepa 133 (B) 10^6 ufc/ml de EHEC + 133 1 10^8 ufc/ml (D) 1 10^8 ufc/ml de EHEC + 133 1 10^8 ufc/ml. Magnificación 20X

Las células tratadas con el lactobacilo cepa CIDCA 133 (figura 18 B y D) fueron notablemente protegidas de la acción biológica de EHEC. Las monocapas evitaron el desprendimiento celular en las dos concentraciones de EHEC ensayadas (1 10^6 ufc/ml y 1 10^8 ufc/ml). Las células coincubadas con el lactobacilo no sufrieron deformación conservando su estructura poliédrica. No se visualizaron los procesos semejantes a vellosidades.

d) Observación mediante microscopía electrónica de barrido.

La microscopía electrónica de barrido (SEM) permite obtener una imagen con alto aumento de la superficie celular. La técnica se utilizó como herramienta para la caracterización del daño celular provocado por EHEC sobre las células Hep-2 y el efecto protector de la cepa CIDCA 133. Los ensayos se realizaron con la cepa de EHEC resuspendida en su sobrenadante, condición que demostró ser la más agresiva para las monocapas. Se conservó el esquema experimental de los ensayos anteriores incubando las monocapas durante 3 h con *E. coli* EHEC (figura 19).

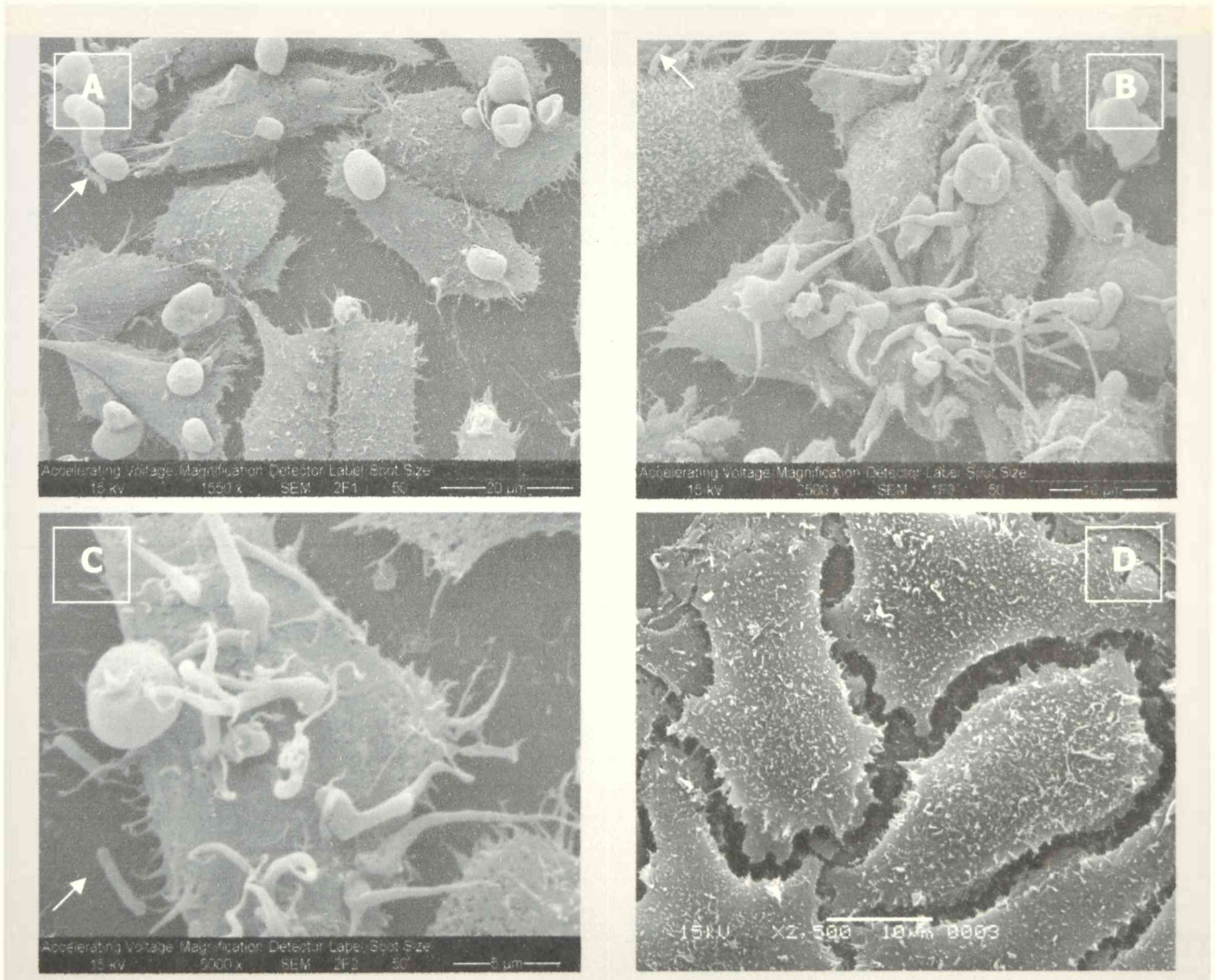
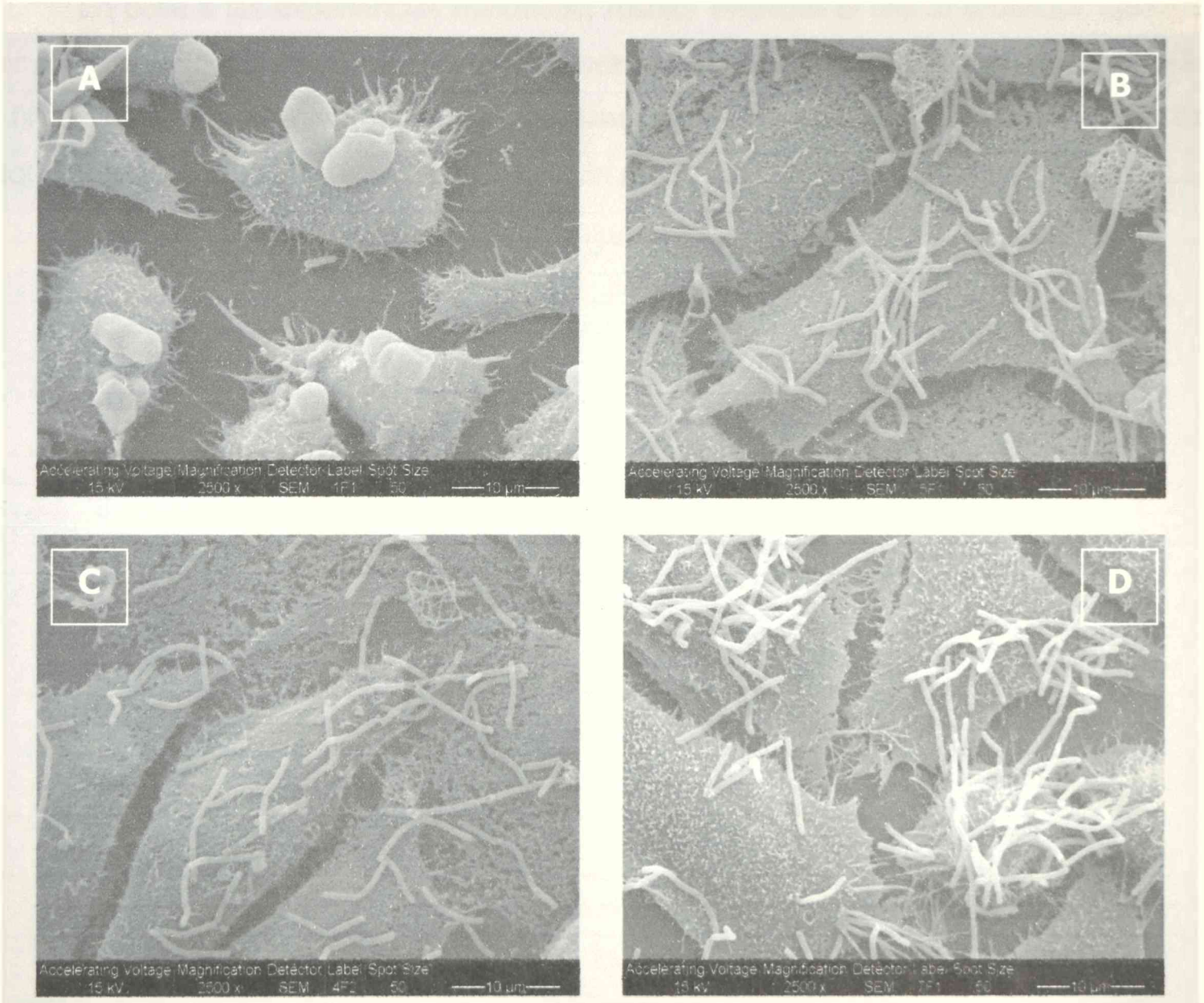


Figura 19. Imágenes obtenidas por SEM de células Hep-2 tratadas con *E. coli* EHEC. (A), (B) y (C) Monocapas incubadas durante 3 h con 1 10^8 ufc/ml de EHEC. Las flechas blancas señalan a *E. coli* EHEC. Magnificación 1550X, 2500X y 5000X respectivamente. (D) Células control, magnificación 2500X.

Las células tratadas con *E. coli* EHEC mostraron notables signos de deterioro (figura 19). Se observó una importante retracción y redondeo de las células tratadas con EHEC (figura 19 A, B y C) respecto al control (figura 19 D). Algunas células infectadas evidenciaron una superficie sumamente irregular con prolongaciones citoplasmáticas digitiformes (equiparables a los MLP) o esferoidales (blebs). Asimismo, se registró una disminución de la densidad superficial de las microvellosidades. En las figuras 19 A, B y C pueden observarse bacterias correspondientes a *E. coli* EHEC sobre las monocapas o en los espacios intercelulares.

La coincubación de la cepa CIDCA 133 junto con *E. coli* EHEC, disminuyó notablemente los signos de daño celular (Figura 20).



Fiogura 20. Imágenes obtenidas por SEM de células Hep-2 incubadas con EHEC y tratadas con la cepa CIDCA 133. (A) Monocapas incubadas con 1 10^8 ufc/ml de EHEC. (B) y (D) Monocapas coincubadas con EHEC + cepa 133 en una concentración de 1 10^8 ufc/ml (D) Monocapa incubada con cepa 133 en igual concentración. Todas las fotos poseen una magnificación de 2500X

A diferencia de las células infectadas solamente con EHEC (figura 20 A), aquellas tratadas con la cepa 133 sufrieron una retracción mucho menor (figura 20 B y C), presentando una apariencia semejante al control de células incubadas con el lactobacilo

(figura 20 D). El nivel de retracción observado en las células control con lactobacilo es una consecuencia normal de la deshidratación por punto crítico (figura 20 D). La presencia del lactobacilo evitó la formación de los procesos semejantes a microvellosidades (MLP) y de los blebs. Si bien la densidad de las microvellosidades fue semejante en las monocapas para ambos tratamientos, cuando se analizó en mayor detalle la superficie celular se evidenciaron diferencias cualitativas su aspecto (figura 21).

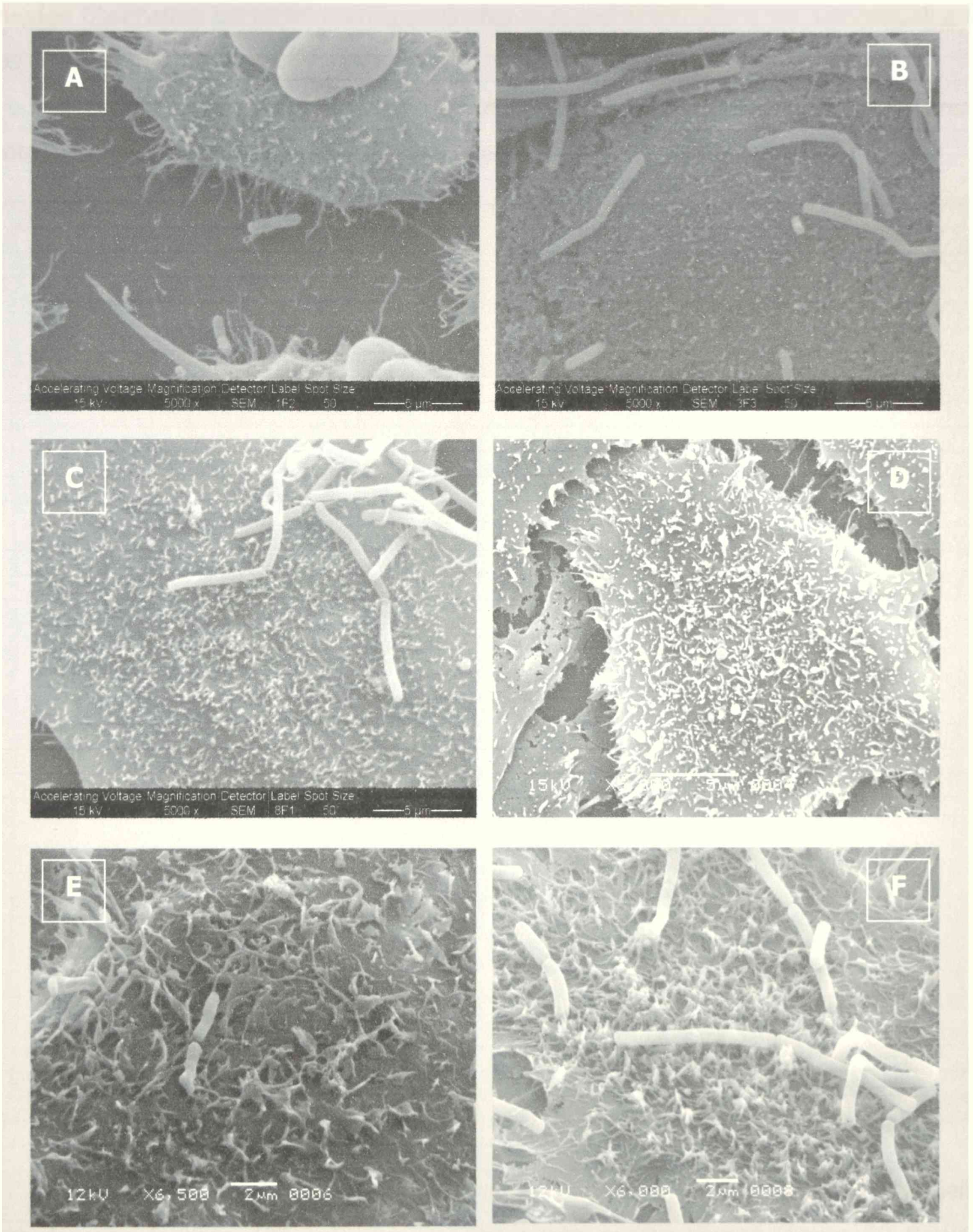


Figura 21. Imágenes obtenidas por SEM de células Hep-2 incubadas con EHEC y tratadas con la cepa CIDCA 133. (A) y (E) Monocapas incubadas con 1 10^8 ufc/ml de EHEC. (B) y (F) Monocapas coincubadas con EHEC + cepa 133 en una concentración de 1 10^8 ufc/ml (C) Monocapa incubada con 1 10^8 ufc/ml de cepa 133. (D) Monocapa control sin bacterias. Magnificación (A), (B), (C) y (D) 5000X; (E) 6.500X y (F) 6000X.

Las imágenes aumentadas 5000 veces de las monocapas infectadas (tratadas o no con lactobacilo) (figura 21 A y B) mostraron una densidad de microvellosidades semejante entre sí, pero menor que los controles (figura 21 C y D). Sin embargo, cuando se incrementó la magnificación a 6000 o 6500 aumentos el aspecto de las microvellosidades resultó diferente en ambos tratamientos. Las células incubadas sólo con EHEC presentaron microvellosidades aplanadas, de apariencia laminar (figura 21 E). Las células que fueron incubadas además con la cepa 133 presentaron microvellosidades digitiformes de conformación normal (figura 19 F).

e) Asociación de EHEC a células Hep-2 en cultivo.

En base a las experiencias realizadas, resulta evidente el efecto protector ejercido por el lactobacilo CIDCA 133 frente al daño ocasionado por *E. coli* EHEC en células Hep-2. A fin de indagar sobre los posibles mecanismos involucrados, se determinó el grado de asociación de EHEC a monocapas de Hep-2 en presencia o no del lactobacilo (figura 22).

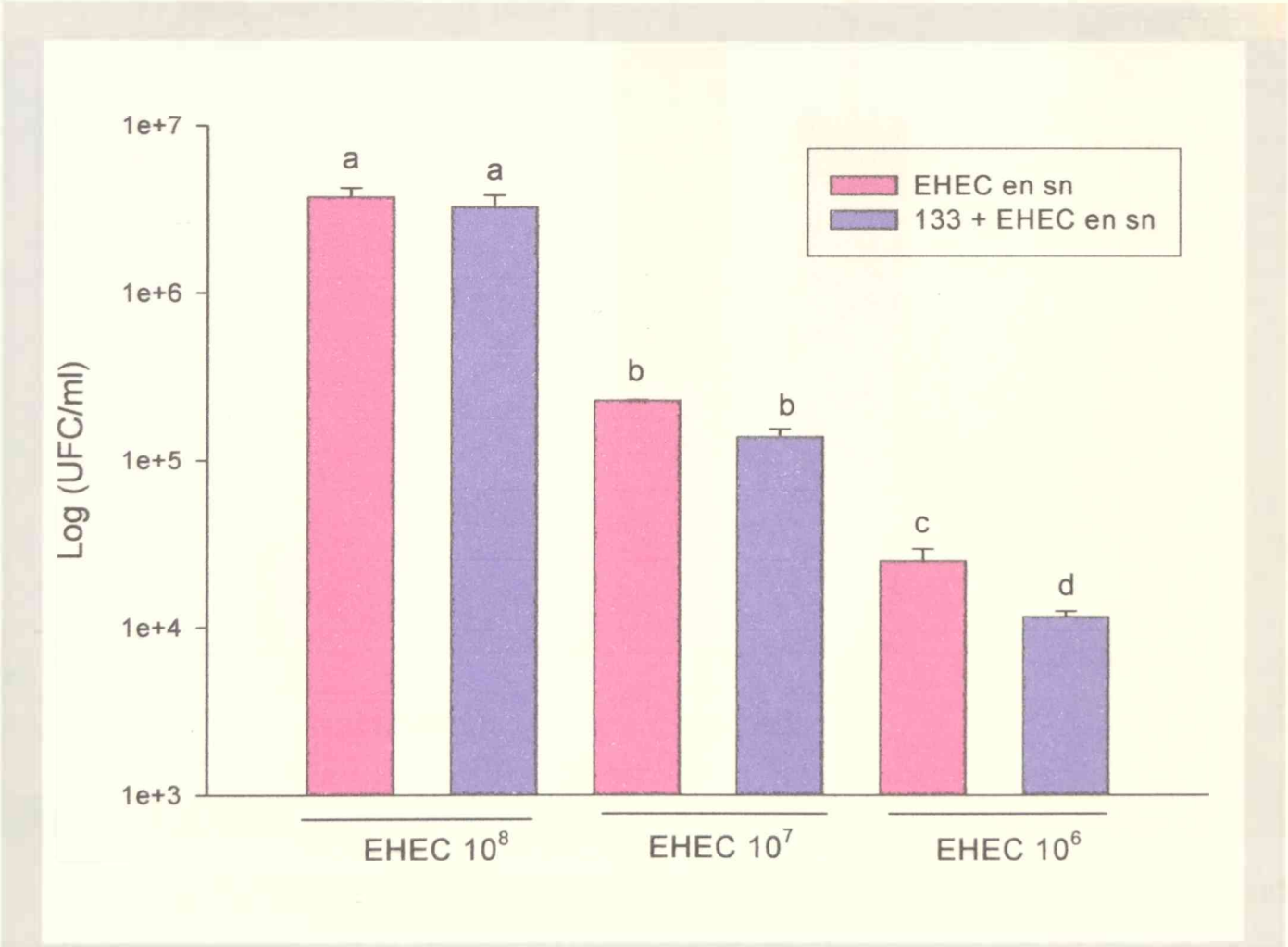


Figura 22. Asociación de *E. coli* EHEC a células Hep-2 en interacción con la cepa CIDCA 133. Las barras rosas indican la asociación de EHEC luego de 1h de incubación. Las barras violetas indican la asociación de EHEC luego de la preincubación durante 1h de la cepa 133 (1 10^8 ufc/ml). Las líneas sobre las barras representan la desviación estándar. Sn significa sobrenadante. Letras diferentes indican diferencias significativas para test de Student ($p \leq 0.05$).

Se observó que sólo a concentraciones bajas de EHEC (1 10^6 ufc/ml) el lactobacilo pudo disminuir significativamente la asociación de EHEC desde 2.5 10^4 a 1. 2 10^4 ufc/ml.

Como se mencionó anteriormente, la protección ejercida por el lactobacilo frente a la infección de EHEC se verificó tanto a concentraciones altas (1 10^8 ufc/ml) como en concentraciones bajas (1 10^6 ufc/ml) de EHEC. Por lo tanto la disminución de la asociación a células Hep-2 de EHEC no sería el mecanismo principal que explicaría el efecto protector. Los ensayos de asociación no son totalmente equivalentes a los realizados para el registro por imágenes, ya que estos se efectuaron con un tiempo de incubación menor de EHEC sobre las monocapas (1 h en vez de 3 h). La reducción de la incubación de *E. coli* obedeció a que a tiempos más prolongados se registraron diferentes grados de desprendimiento celular (ver figura 18 y 19) que podrían afectar el recuento de viables. Esta suposición pudo comprobarse experimentalmente al analizar el porcentaje de asociación de EHEC sobre células Hep-2 con una o tres horas de incubación (figura 23).

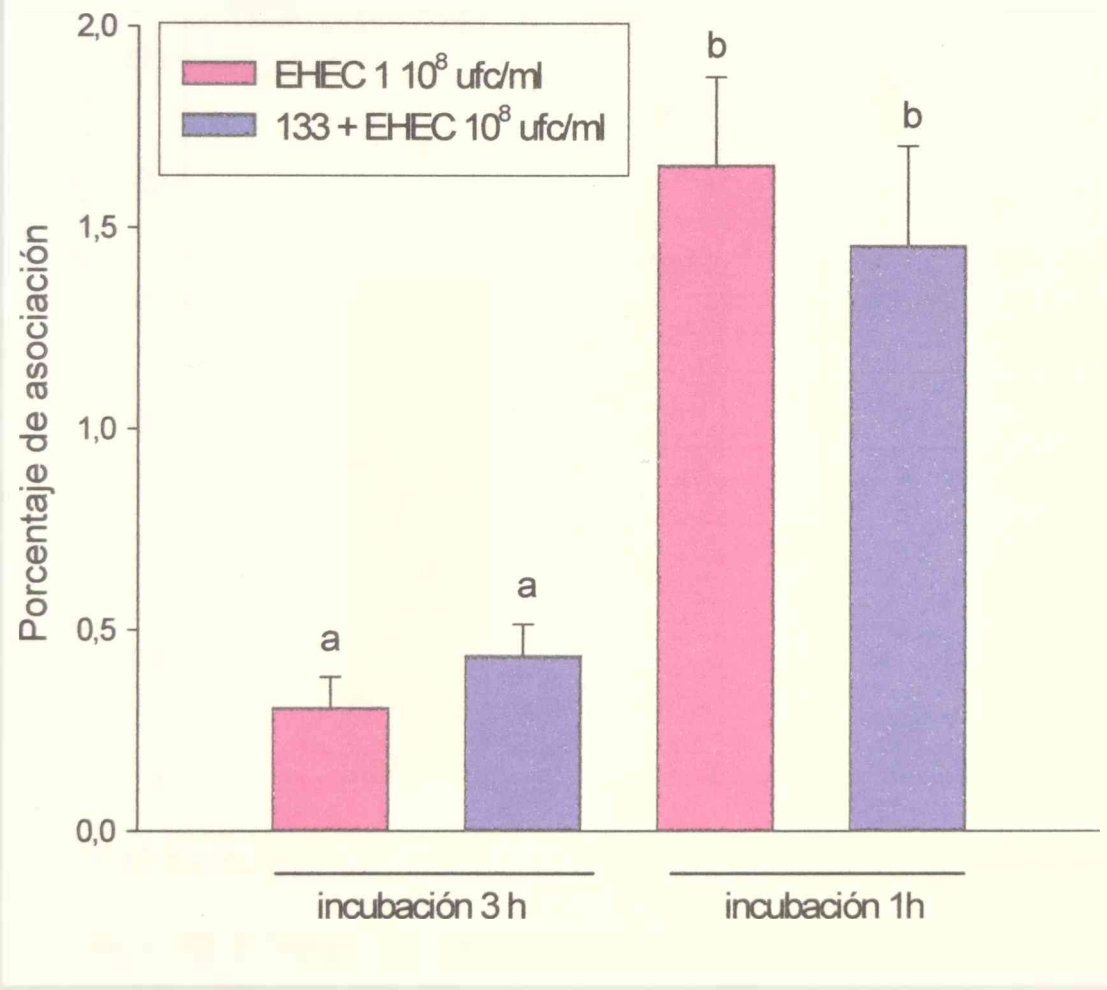


Figura 23. Porcentaje de asociación de EHEC a células Hep-2 en interacción con la cepa CIDCA 133 en distintos tiempos de incubación. La concentración de EHEC y del lactobacilo fue de 1 10^8 ufc/ml. Las dos primeras barras corresponden al recuento de viables luego de 3 h de incubación de EHEC. Las dos últimas barras corresponden al recuento de viables luego de 1 h de incubación de EHEC. Letras diferentes indican diferencias significativas para test de Student ($p \leq 0.05$)

Los recuentos de EHEC obtenidos fueron significativamente menores cuando la incubación se extendió a 3 h (figura 21), lo que puede explicarse por el desprendimiento celular que sufren las monocapas. Sin embargo tanto para los tiempos de incubación cortos o prolongados, la presencia del lactobacilo no modificó la capacidad de adherencia de EHEC. Esta observación corrobora que a altas concentraciones de EHEC el efecto protector del lactobacilo no se debe a un desplazamiento del patógeno de la superficie celular.

Otra posible explicación de la protección del lactobacilo involucraría la pérdida de viabilidad de *E. coli* EHEC. Si bien el lactobacilo no modificó sustancialmente la asociación de EHEC (excepto cuando se lo utilizó en una relación lactobacilo/*E. coli* igual a 100), cabría la posibilidad de que disminuyera el número de bacterias de EHEC viables. Una menor concentración de EHEC sobre las células explicaría, en parte, el mejor estado de las monocapas tratadas con lactobacilo. Sin embargo, se observó que la incubación de EHEC sobre las monocapas de Hep-2 en presencia del lactobacilo, no modificó la viabilidad de la misma (figura 24).

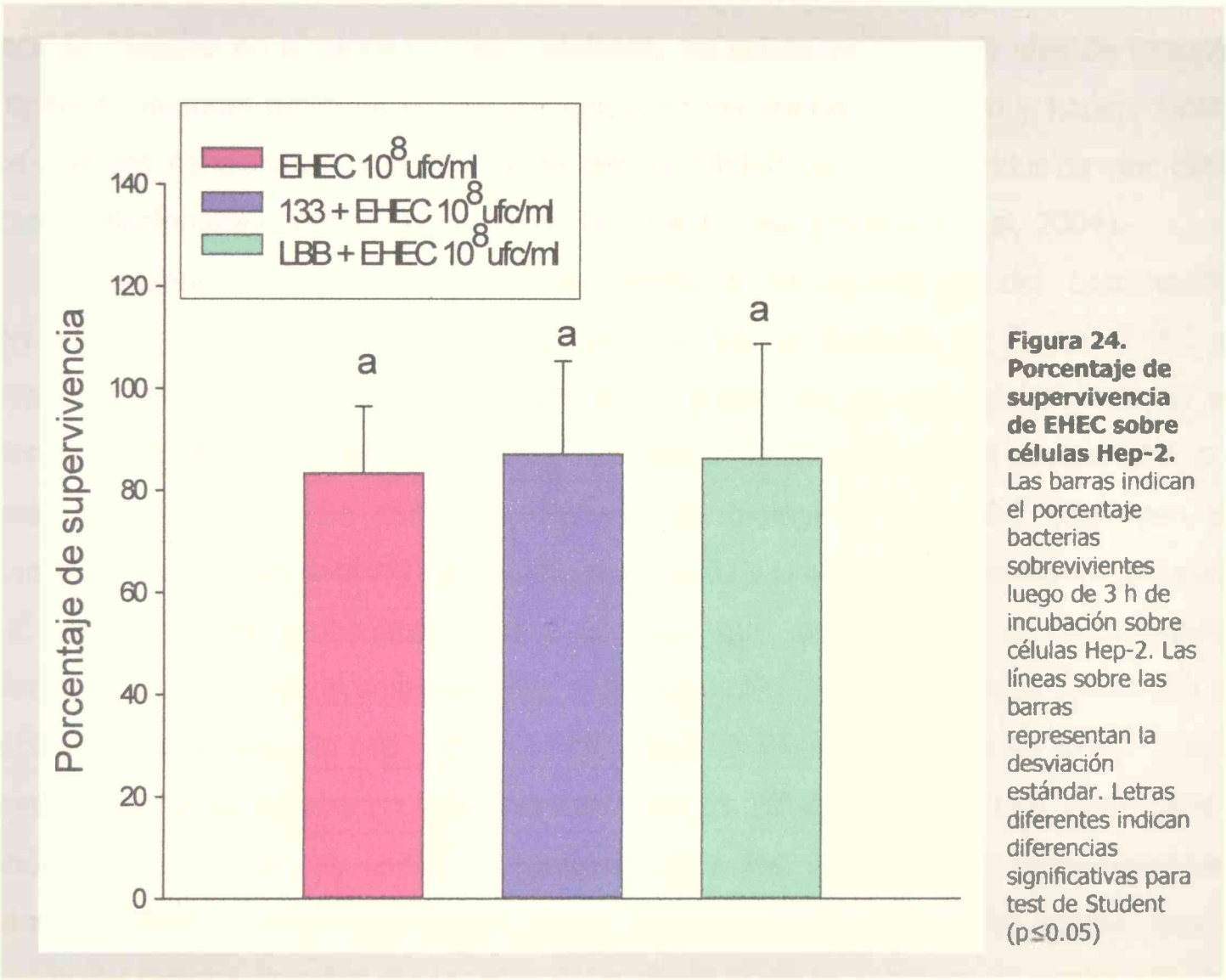


Figura 24. Porcentaje de supervivencia de EHEC sobre células Hep-2. Las barras indican el porcentaje bacterias sobrevivientes luego de 3 h de incubación sobre células Hep-2. Las líneas sobre las barras representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas para test de Student ($p \leq 0.05$)

Luego de 3 horas de incubación de EHEC sobre las monocapas el porcentaje de bacterias sobrevivientes fue semejante tanto en la condición con lactobacilo 133 o sin él. Tampoco hubo diferencias significativas en la supervivencia de EHEC debido a la presencia de la cepa LBB.

La interacción entre cepas probióticas y EHEC en cultivos celulares está poco documentada. Los trabajos más importantes señalan el rol de *Saccharomyces boulardii* en la protección de las células T84 infectadas por EHEC. La levadura es capaz de prevenir la inducción de apoptosis provocada por la infección de EHEC, en parte a través de disminuir la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) (Dalmasso et al, 2006).

Escasas son las publicaciones que se refieren al rol de los lactobacilos en la prevención del daño causado por EHEC en cultivos celulares. Hirano y colaboradores reportaron que *Lactobacillus rhamnosus* disminuye la invasión pero no la asociación de *E. coli* EHEC en células C2BBe1 (Hirano et al, 2003). Si bien EHEC puede presentar cierta capacidad invasiva en algunos cultivos celulares, no existe evidencia *in vivo* de invasión del epitelio intestinal tanto en el hombre como en los animales (Nataro y Kaper, 1998). Otros autores señalan la reducción de la permeabilidad paracelular inducida por EPEC (bacteria relacionada con EHEC) en células T84 por *L. casei* (Parassol et al, 2004).

El presente trabajo demuestra claramente el rol antagónico del *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* (cepa CIDCA 133) sobre la acción biológica de *E. coli* EHEC en cultivos celulares. El lactobacilo contrarrestó el efecto de los principales factores de virulencia de EHEC: la Shiga toxina y las proteínas codificadas por la región LEE que inducen la lesión A/E. Se sabe que los efectos biológicos de EHEC dependen de mecanismos de quorum sensing (Sperandio et al, 2001). Una disminución de la asociación de *E. coli* sobre las monocapas podría prevenir que se alcanzase la concentración poblacional necesaria para desencadenar el proceso. En los experimentos realizados se encontró que el lactobacilo cepa 133 fue capaz de disminuir la adhesión de EHEC cuando la enterobacteria se hallaba en baja concentración (1 10^6 ufc/ml). Por otra parte, Abe y colaboradores (Abe et al, 2002) encontraron que las condiciones microambientales pueden modificar la expresión de los genes de virulencia de EHEC. Es posible que la adhesión del lactobacilo a las células epiteliales altere el microambiente determinando una regulación negativa de los genes involucrados en al patogenia de EHEC. Asimismo se han determinado las distintas vías de señalización activadas luego de la adhesión de EHEC a la superficie celular, como ser proteína quinasa C (PKC), calmodulina (CaM), y la quinasa de la cadena liviana de miosina (MLCK) (Philipott et al, 1998). La asociación del lactobacilo a las monocapas podría antagonizar estas cascadas de señalización comprometidas en el efecto citopático de EHEC. En resumen, si bien los mecanismos específicos de antagonismo de EHEC por la cepa 133 no fueron dilucidados, es probable que impliquen una combinación de efectos como la disminución de la asociación de *E. coli*, interferencia en su expresión génica junto con la alteración de las vías de señalización intracelular.

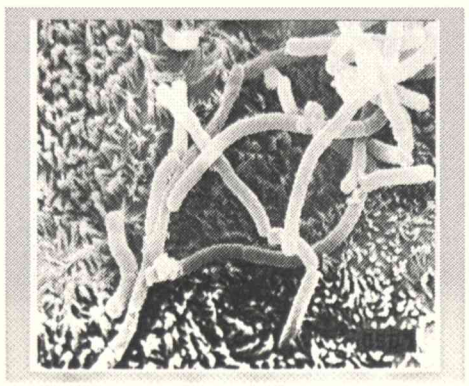
Conclusiones.

La protección ejercida por el lactobacilo del daño provocado por *E. coli* EHEC sobre las células en cultivo se demostró porque:

- La cepa CIDCA 133 fue capaz de aumentar significativamente el porcentaje de células Vero viables luego del tratamiento con sobrenadantes de EHEC conteniendo la toxina Stx2.
- El lactobacilo disminuyó en forma significativa el porcentaje de LDH liberado por las células Vero incubadas con sobrenadante de EHEC.
- La cepa probiótica protegió a las células Hep-2 del daño inducido por la presencia de EHEC, disminuyendo el redondeo y el desprendimiento celular. El lactobacilo evitó la formación de blebs y procesos semejantes a microvellosidades (MLP).

Si bien los mecanismos involucrados en este rol antagónico no fueron totalmente dilucidados, en base a los experimentos realizados se puede afirmar que:

- La adsorción de la toxina a la superficie del lactobacilo no parece tener un efecto importante en la disminución de su acción *in vitro* en los sistemas ensayados.
- La capacidad de ejercer un efecto antagónico sobre la Shiga toxina reside en las paredes del lactobacilo.
- La viabilidad del lactobacilo no es necesaria para ejercer el efecto protector tanto sobre la acción de la Shiga toxina en las células Vero como sobre la acción combinada de EHEC y su sobrenadante sobre las células Hep-2.
- La protección observada en las células Hep-2 infectadas con EHEC no se debe al desplazamiento del patógeno por el lactobacilo, ni a la pérdida de viabilidad de *Escherichia coli.*
- El efecto protector observado en los sistemas ensayados no es una propiedad inherente a todos los lactobacilos sino que es cepa dependiente.



CAPÍTULO VI

Efecto probiótico de la cepa CIDCA 133 sobre *E.coli* EHEC en un modelo de infección murino

CAPÍTULO VI

Los animales de experimentación constituyen un sistema biológico complejo que permite evaluar todas las interacciones de los sistemas orgánicos y sus respuestas. En especial para los modelos de infección gastrointestinal, los estudios *in vivo* permiten determinar la presencia de signos clínicos de desorden intestinal, la localización anatómica del patógeno, el tiempo de residencia y fundamentalmente la respuesta inmune del hospedador tanto adquirida como innata.

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) es un patógeno específico humano. El ganado bovino constituye el principal reservorio de diferentes serotipos de *E. coli* productor de toxina Shiga, pero su portación resulta en general asintomática (Callaway et al, 2004). Si bien es posible lograr en determinadas condiciones infecciones en diferentes especies animales difícilmente se reproducen con fidelidad todas las características de la patogenia en el hombre. *E. coli* EHEC puede provocar en el humano una colitis hemorrágica severa seguida de un cuadro grave denominado síndrome urémico hemolítico (SUH) en el 10% de los casos. El SUH se caracteriza por una tríada de síntomas: anemia, trombocitopenia y fallo renal agudo debido a daño glomerular (Levin et al, 1989). El daño renal es causado fundamentalmente por la unión de la toxina Shiga a su receptor específico globotriasilceramida (Gb3) presente en el endotelio microvascular. La interacción de la toxina con la célula eucariótica determina la interrupción de la síntesis proteica y la muerte celular (Law, 2002). El cuadro clínico de SUH es el más difícil de

reproducir en animales a partir de una infección oral. Los modelos animales que utilizan cerdos gnotobióticos (Gunzer et al, 2002) y conejos lactantes (Ritchie y Waldor, 2005) han resultado ser los más fidedignos para el estudio del SUH. A pesar de constituir modelos apropiados su empleo acarrea numerosas dificultades entre ellas la escasa multiplicidad de reactivos inmunológicos comerciales y la poca disponibilidad de cepas genéticamente modificadas. El mejor modelo murino encontrado para estudiar la patogenia de EHEC administrada por vía oral fue el propuesto por Wadolkowski y colaboradores (Wadolkowski et al, 1990 y Lindgren et al, 1993). Los autores utilizaron ratones CD1 libres de patógenos específicos (SPF) pretratados con antibiótico; los cuales fueron oralmente infectados con cepas altamente virulentas de *E. coli* EHEC. Los animales desarrollaron al cabo de 3 a 5 días una enfermedad aguda seguida de muerte con presencia de necrosis tubular renal. La lesión renal observada no correspondió exactamente al cuadro de SUH, dado que el daño renal fue tubular y no vascular glomerular. Sin embargo el cuadro combinado de colonización intestinal por EHEC sumado al daño tóxico a nivel del riñón conformó un modelo apropiado para la investigación. Es de destacar que las cepas de *E. coli* EHEC empleadas poseían una virulencia altamente exacerbada con una DL_{50} de 10 bacterias. Esta virulencia fue atribuída por los autores a la carencia de la proteína intimina de la cepa. La proteína intimina con sus variantes determina el tropismo celular de EHEC dirigido fundamentalmente hacia el epitelio colónico. La ausencia de la proteína podría determinar un modo no habitual de adhesión al epitelio, quizás a nivel del intestino delgado con la consecuente mayor absorción de la toxina Shiga. Este fenómeno explicaría la alta mortalidad obtenida luego de la infección con la cepa. En conclusión si bien el trabajo de Wadolkowski y colaboradores desarrolló un modelo murino que se aproxima a la infección humana provocada por *E. coli* EHEC, las cepas bacterianas empleadas fueron totalmente atípicas.

Otros modelos murinos de infección oral por EHEC no desarrollaron daño renal. En las investigaciones se emplearon ratones gnotobióticos (Takahashi et al, 2004) o SPF tratados con antibióticos. Las cepas endocriadas utilizadas fueron variadas ICR, (Nagano et al, 2003), C3H/HeN (Hiramatsu et al, 2002) y BALB/c (Nagano et al, 2003) entre otras. La suceptibilidad de los animales dependió de la edad, la virulencia de la cepa de EHEC empleada y la dosis.

Los avances más importantes en el estudio de la patogénesis de EHEC se han desarrollado utilizando dos patógenos veterinarios relacionados: *Citrobacter rodentium* y *E. coli* enteropatogénica de conejo (REPEC) (Vallace et al, 2004). Las bacterias

mencionadas comparten junto con *E. coli* enteropatogénica (EPEC) humana y EHEC la presencia de los genes de virulencia para la producción de la lesión attaching and effacing (A/E) en el epitelio intestinal (ver capítulo V). La lesión A/E implica una adhesión estrecha entre la bacteria y la célula epitelial junto con la desorganización de las microvellosidades y la formación de un pedestal debajo de la bacteria (Knutton et al, 1998). Los genes implicados en la lesión se localizan en el locus LEE PAI (enterocyte effacement pathogenicity island) del genoma bacteriano (Kenny, 2002).

La infección de conejos lactantes con REPEC es la más relevante como modelo de EPEC, ya que provoca diarrea, lesión A/E e inflamación intestinal con alta mortalidad. Sin embargo dada la plasticidad del uso de ratones *C. rodentium* ha adquirido una creciente importancia. La infección por *C. rodentium* es autolimitante, no provoca diarrea, sino que determina la generación de heces blandas, lesión A/E, inflamación e hiperplasia colónica (Vallace et al, 2004). La hiperplasia colónica y la ausencia de diarrea son dos signos diferenciales respecto al cuadro clínico humano generado por EPEC. A pesar de ello, la infección por *C. rodentium* ha resultado muy útil para el estudio del rol de los diferentes genes del locus LEE PAI en la patogenia (Simmons et al, 2003; Maaser et al, 2004; Deng et al, 2004). Cabe destacar que si bien estas bacterias constituyen aproximaciones válidas para el estudio de EHEC carecen de la toxina Shiga, la cual constituye un factor determinante en el curso de la infección humana provocada por este microorganismo.

Los trabajos dedicados al estudio de la interacción entre probióticos y EHEC *in vivo* no son numerosos. Takahashi y colaboradores estudiaron la protección generada por el consumo de *Clostridium butyricum* frente a la infección letal por EHEC de ratones gnotobióticos (Takahashi et al, 2004). Ashara y colaboradores describieron asimismo la supervivencia de ratones BALB/c SPF tratados con *Bifidobacterium breve* cepa Yakult, ante la infección letal por *E. coli* O157:H7. (Ashara et al, 2004). Por último Shu y colaboradores estudiaron el mejoramiento de la respuesta immune de ratones (C57BL/6 y BALB/c) infectados con EHEC que ingirieron *L. rhamnosus* HN001 (Shu et al, 2002).

Evidentemente existe una amplia variedad de modelos para el estudio de EHEC *in vivo*, a la vez que escasos estudios sobre la interacción probiótico-patógeno-hospedador. En el presente capítulo se describirá la respuesta frente a la infección oral por EHEC (cepa 69160) de dos modelos murinos (cepas C57BL/6 y BALB/c). Además se estudiará el posible efecto protector dado por el consumo de la cepa CIDCA 133 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*) durante el tratamiento.

Metodología

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

La cepa de *E. coli* EHEC O157: H7 utilizada corresponde a un aislado clínico y fue provista por el Hospital de Niños Sor María Ludovica de La Plata. Su caracterización genotípica fue descripta en el capítulo anterior. Su identificación numérica es 69160. El lactobacilo utilizado correspondió a la cepa CIDCA 133 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Los cultivos stock de ambos microorganismos se mantuvieron a -80ºC y previamente a la realización de los ensayos fueron reactivados dos veces. *E. coli* fue crecida en caldo TSB (Laboratorio LW, Córdoba. Argentina) a 37ºC durante 16 h en aerobiosis sin agitación. El lactobacilo fue crecido en caldo MRS (Biokar Diagnostics. Beauvais, Francia) con 0.5 % de cisteína en condiciones anaeróbicas.

Animales empleados

Los ratones utilizados fueron hembras de cinco semanas provistas por el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata. Las cepas empleadas fueron C57BL/6J cuyos progenitores proceden del Jackson Laboratory (USA) y BALB/c AnN cuyos progenitores proceden del Nacional Institute of Health (USA). Los ratones fueron criados y producidos en sistema cerrado bajo barreras y pertenecían a la categoría de SPF (libre de patógenos específicos). Los animales fueron trasladados al bioterio de experimentación perteneciente a la cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de La Plata. Se mantuvieron durante el curso del experimento en un sistema controlado con barreras para evitar contaminaciones cruzadas y externas. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a las normas internacionales para el trabajo con animales de experimentación.

Obtención del inóculo para el ensayo animal

A fin de obtener la concentración bacteriana necesaria para realizar el ensayo en ratones fue imprescindible efectuar un salto de escala en la producción de los cultivos. La cepa probiótica se cultivó bajo las condiciones mencionadas pero en varios erlenmeyers conteniendo caldo MRS. Luego de la incubación, los cultivos fueron centrifugados a 10.000 g y lavados dos veces con buffer PBS estéril. El pellet bacteriano se resuspendió en el volumen apropiado de PBS-glicerol 10% para concentrar el cultivo inicial 25 veces. El glicerol se utilizó como agente crioprotector. Las suspensiones bacterianas concentradas fueron fraccionadas por mililitro y conservados a -80ºC. La concentración de las suspensiones conservadas fue de 2 10^{10} ufc/ml, luego de

descongeladas. Durante el curso del experimento, los viales conteniendo el lactobacilo se resuspendieron diariamente en el agua de bebida de los animales; administrándose una concentración final de 2 10^8 ufc/ml. La supervivencia del lactobacilo en estas condiciones al cabo de 24 h, resultó ser del 100%. El recambio diario del agua de bebida junto con la determinación de la viabilidad del lactobacilo aseguraron una concentración constante del probiótico durante todo el ensayo.

La estrategia para la obtención del inóculo de EHEC fue diferente dado el riesgo biológico de manipular grandes volúmenes de cultivo líquido del microorganismo. En este caso se inocularon mediante hisopado placas de agar TSB, las cuales se incubaron durante 16 h a 37ºC hasta obtener una pátina de microorganismos. La pátina fue removida mediante lavados sucesivos con pequeños volúmenes de PBS-glicerol 10% estéril. De esta manera se obtuvo una suspensión de *E. coli* EHEC con una concentración de 1 10^{11} ufc/ml. Los ratones fueron inoculados intragástricamente con 100 ul de la suspensión, ingiriendo por lo tanto 1 10^{10} microorganismos por animal. La suspensión de *E. coli* se obtuvo el mismo día de la infección de los animales, a fin de evitar posibles pérdidas debido a la crioconservación.

Diseño experimental

Al momento de la llegada al bioterio de experimentación los ratones fueron divididos en cuatro lotes. Las hembras pertenecientes a la cepa C57BL/6 se colocaron en dos lotes de 15 individuos, uno correspondiente al grupo placebo y el otro constituyendo el grupo tratamiento. Para el caso de la cepa BALB/c se efectuó el mismo procedimiento. Previamente a la realización del ensayo los animales permanecieron una semana en adaptación a su nuevo macro y microambiente, a fin de disminuir el estrés provocado por el traslado. Los animales recibieron agua y alimento esterilizado *ad libitum*. Los ratones del grupo tratamiento fueron aquellos que ingirieron, durante todo el ensayo, la cepa probiótica en el agua de bebida. Los ratones del grupo placebo fueron aquellos que ingirieron en el agua de bebida el medio soporte (PBS-glicerol 10%) de la cepa probiótica. Ambos grupos fueron infectados con *E. coli* EHEC (cepa 69160). El esquema de infección y muestreo para las cepas murinas C57BL/6 y BALB/c se detalla en la figura 1. Siete días antes de la infección con *E. coli* EHEC, los animales del grupo tratamiento comenzaron a consumir el lactobacilo (cepa CIDCA 133) en el agua de bebida en una concentración constante de 2 10^8 ufc/ml. A su vez, los animales del grupo placebo recibieron el medio soporte del lactobacilo. El recambio del agua de bebida fue diario. La administración del probiótico fue continua en los 21 días del ensayo.

Durante tres días, a partir del día 5 preinfección la totalidad de los animales recibieron tratamiento antibiótico. El objetivo del tratamiento antibiótico fue la disminución de la microbiota nativa intestinal. Esta alteración de las poblaciones bacterianas intestinales genera un desbalance de la microbiota que podría favorecer la infección por EHEC. El antibiótico utilizado fue sulfato de estreptomicina 10 % p/v, el cual se administró bajo toma forzada en forma individual (0.02 ml por animal). La elección de esta modalidad para la administración del antibiótico se fundamentó en dos razones principales. La primera fue que la toma forzada asegura una ingesta precisa del antibiótico. La segunda se constituyó a partir de la necesidad de administrar lactobacilos viables en el agua de bebida, lo cual hizo incompatible el suministro del antibiótico por esta vía. Dado que el suministro del antibiótico solapó parcialmente con el de probiótico, es posible que provocara una disminución del número de lactobacilos intestinales. Sin embargo es poco probable que el antibiótico eliminara a todos los lactobacilos. A fin de evitar el solapamiento entre el probiótico y el antibiótico se podría haber postergado la administración del lactobacilo hasta la culminación del tratamiento antibiótico. Sin embargo esta elección hubiera dejado escaso tiempo a la cepa probiótica para la colonización intestinal antes del tratamiento con EHEC (figura 1).

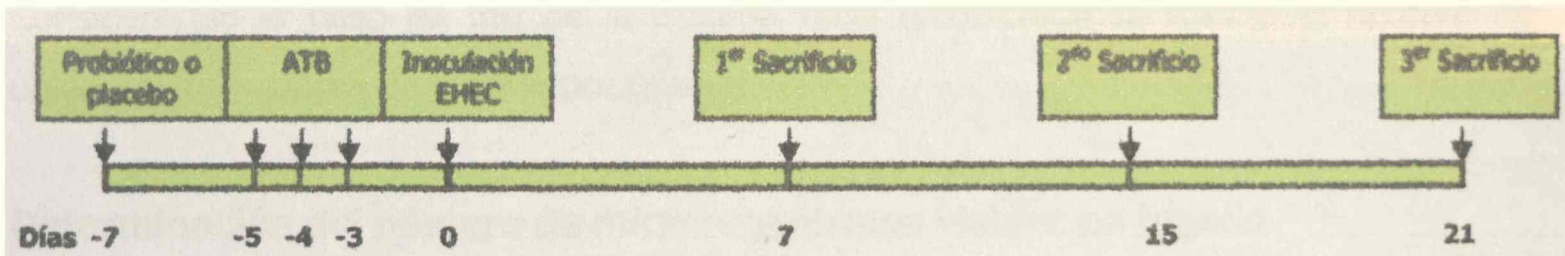


Figura 1. Esquema cronológico del ensayo animal.

Culminado el tratamiento antibiótico, hubo dos días de "descanso", donde se permitió la metabolización y eliminación de la droga a fin de que no interfiriera en el momento de la

infección con el patógeno. El día previo a la ingestión de *E. coli* EHEC, se privó a los animales de agua y alimento. Se sabe que el estado de estrés transitorio provocado por la falta de alimento, es un factor que favorece la infección (Kurioka et al, 1998). Además la quita del alimento evita la dilución del inóculo causado por la presencia del mismo, asegurando así un tránsito rápido hacia el intestino.

La infección con EHEC se realizó por sondaje intragástrico. Se administró por única vez, a cada individuo 10^{10} microorganismos de EHEC en 100 ul de una suspensión conteniendo 1 10^{11} ufc/ml de la bacteria. A partir de ese momento se realizaron sacrificios a los 7, 15 y 21 días post-infección. Los ratones fueron sacrificados por inhalación de CO_2.

Determinación de microorganismos viables en materia fecal.

La cuantificación de microorganismos en materia fecal fue realizada a través de recuento de bacterias viables. Se recolectaron de 1 a 3 pellets por animal de la porción final del intestino grueso. Los mismos se conservaron a –80ºC en sacarosa 20% como crioprotector, hasta el momento de efectuar los recuentos. Se determinó el peso de la materia fecal recolectada utilizando tubos eppendorfs previamente tarados. Las muestras fueron homogeneizadas y diluídas en solución fisiológica estéril. Las diluciones fueron sembradas en la superficie de placas conteniendo agar sorbitol Mac Conkey (SMAC) (Biokar Diagnostics Beauvais, Francia) y agar nutritivo (Biokar Diagnostics Beauvais, Francia). El agar SMAC constituye un medio selectivo para *E. coli* EHEC, ya que inhibe a géneros como *Enterococcus* y *Staphylococcus*, usualmente presentes en materia fecal. Constituye, además un medio diferencial, permitiendo identificar a las colonias presuntivas de EHEC (sorbitol negativas) por permanecer incoloras. Las colonias de *E. coli* no EHEC (sorbitol positivas) adquieren un color rojo intenso. Los recuentos en agar nutritivo permitieron estimar el número de bacterias mesófilas totales en heces. Las placas fueron incubadas a 37ºC en aerobiosis. El recuento de colonias se efectuó a las 24 y 48 h. Se cuantificaron aquellas placas que presentaban entre 30 y 300 colonias. Considerando el peso en mg de la materia fecal recolectada se estimó el número de unidades formadoras de colonia por gramo.

Determinación del número de microorganismos viables en hígado

La muestra seleccionada fue una pequeña porción de un mismo lóbulo hepático de cada animal. La misma se conservó a -80ºC en sacarosa 20% hasta el momento de efectuar los recuentos. Con el propósito de minimizar la posibilidad de contaminación con contenido intestinal, fue la primera muestra tomada luego de diseccionar al animal. Se determinó el peso del tejido recolectándolo en tubos eppedorfs previamente tarados. El tejido fue homogeneizado en pequeños morteros estériles. Se realizaron las diluciones apropiadas en solución fisiológica estéril y se sembraron en placas conteniendo agar sorbitol Mac Conkey y agar nutritivo. Las placas se incubaron en las condiciones antes descriptas.

Determinación del peso del bazo

El peso del bazo se registró ablacionando el órgano y recolectándolo en tubos previamente tarados con 2 ml de buffer PBS estéril. El bazo fue la segunda muestra

recolectada luego del hígado. El peso del órgano se estimó por diferencia entre el peso de los tubos más la muestra y el peso de los tubos vacíos. Se utilizó una balanza analítica.

Determinación de la concentración de proteínas

Se utilizó la técnica de Bradford, la cual fue descripta en el capítulo I.

Análisis histológico

Muestras de intestino delgado, bazo e hígado de ratón fueron procesadas para su posterior análisis histológico. Las porciones seleccionadas de los órganos fueron fijadas en formaldehído al 10% en PBS. Posteriormente fueron deshidratadas utilizando concentraciones crecientes de etanol para ser luego incluídas en parafina. Se realizaron cortes finos (5 µm de espesor) de los tejidos incluídos utilizando un micrótomo. Finalmente las muestras fueron rehidratadas y teñidas con hematoxilina y eosina (H/E). Se efectuó un registro fotográfico de los cortes utilizando un microscopio DMLB acoplado a una cámara digital DC 100 (Leica Mycroscope Systems Ltd.,Heerbrugg, Suiza). Durante el análisis de las muestras se observó tanto la macromorfología tisular como la micromorfología celular. En el caso de los cortes de intestino se determinó la relación vellosidad/cripta. Para esto se registraron las longitudes relativas de ambas estructuras sobre distintas microfotografías de los intestinos. La cuantificación de la relación vellosidad cripta se realizó a fin de obtener un parámetro objetivo de las observaciones.

Cuantificación de la concentración de urea en suero

La concentración de urea en suero de ratón se determinó utilizando un kit comercial de uremia (Wiener Lab. Rosario, Argentina). La cuantificación se basa en la descomposición específica de la urea presente en la muestra, por la acción de la enzima ureasa contenida en el kit. Esta descomposición genera CO_2 y NH_3. El amoníaco reacciona en medio alcalino con fenol e hipoclororito provisto por los reactivos, dando azul de indofenol que se determina colorimétricamente (A = 540 nm). En particular para este trabajo se determinó el parámetro BUN (blood urea nitrogen) para cada muestra por duplicado. El parámetro se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$BUN\ (g/l) = AM_{(540\ nm)} X\ factor$$

Donde el factor es $0.28\ (g/l)/AS_{(540\ nm)}$. Siendo AM: absorbancia de la muestra a 540 nm y AS: absorbancia del estándar a 540 nm. El estándar es provisto por el fabricante y contiene una concentración de urea de 0.60 g/l.

Determinación de inmunoglobulinas.

Se realizó la determinación de inmunoglobulina A (IgA) en materia fecal e inmunoglobulina (IgG) en suero de ratón mediante la técnica de ELISA. La sensibilización de las placas se efectuó con un antígeno no purificado de *E. coli* EHEC cepa 69160. El antígeno se obtuvo a partir de cultivos lavados y concentrados del microorganismo. Para esto se realizó una suspensión bacteriana (DO 10 $_{600nm}$), la cual fue posteriormente inactivada mediante calor húmedo (autoclave 20 min a 121ºC). A continuación, la muestra fue sometida a un tratamiento con ultrasonido (3 pulsos de 1 min) en un sonicador de punta (MSE model 60W, Londres, Inglaterra) con el objetivo de lisar los microorganismos y exponer diferentes epitopes del soma bacteriano. Se determinó, a su vez, la concentración de proteínas del lisado mediante la técnica de Bradford, arrojando un valor de 4 mg/ml. El antígeno de EHEC fue fraccionado y conservado a -80ºC hasta el momento de uso.

En la determinación por ELISA de IgA e IgG se empleó el siguiente protocolo. El antígeno se disolvió en buffer borato (H_3BO_3 0.62%, $Na_2B_4O_7.10H_20$ 0.95%, NaCl 0.44% en agua pH7) a una concentración de 2 ug de proteína por fosa. La sensibilización se realizó durante toda la noche a 4ºC en cámara húmeda. El bloqueo se efectuó con buffer de saturación (leche en polvo descremada 3%, NaN_3 0.5%, Tween 20 0.05%, PBS 10% en agua destilada) en las condiciones antes mencionadas. Las muestras se diluyeron en buffer ELISA (leche en polvo descremada 1%, NaN_3 0.5%, Tween 20 0.05%, PBS 10% en agua destilada) y se incubaron sobre la placa sensibilizada durante 2 h a 37ºC en cámara húmeda. El revelado de la unión antígeno anticuerpo se realizó utilizando Anti-IgA o Anti-IgG de ratón biotinilado (Sigma, St Louis, Mo) más el agregado de Extra Avidina conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma, St Louis, Mo) diluídos en buffer ELISA. El sustrato empleado para el ataque enzimático fue el p- nitrofenil fosfato PNPP (1 mg/ml) diluído en buffer glicina (glicina 0.75%, $MgCl_2$ 1mM y $ZnCl_2$ 1mM pH 10). El mismo al hidrolizarse se transforma en fenil fosfato de color amarillo intenso. La reacción se detuvo con NaOH 3N. La absorbancia a 405 nm se determinó en un lector de placas (ELISA Plate Reader SLT Rainbow Reader, Wien, Austria). Los lavados entre los pasos fundamentales de la reacción de ELISA se efectuaron con buffer PBT (Tween 20 0.05% en PBS), utilizando un equipo de lavado de placas (SLT M8/4R SLT Labinstruments, Wien. Austria).

Determinación de IgA Una vez sacrificado el animal, se recolectaron de 1 a 3 pellets de materia fecal de la porción final del intestino grueso. Se determinó el peso de las heces utilizando tubos eppendorfs previamente tarados. Las muestras se conservaron

a -80ºC hasta el momento de uso. Previamente a la determinación de IgA fue necesario extraer la inmunoglobulina desde la materia fecal. Para esto, las muestras fueron homogeneizadas en buffer de extracción (EDTA 0.03 M pH 7.6, albúmina bovina 1%, inhibidor de tripsina de soja 0.1 mg/ml) en frío. Luego fueron centrifugadas a 13.000 rpm durante 15 min a 4ºC. El sobrenadante de la extracción se conservó a -20ºC. El sobrenadante extraído se empleó diluído 1/4 en el ELISA.

Determinación de IgG Se realizó en suero de ratón. Se tomaron de 0.5 a 1 ml de sangre entera por punción cardíaca de los animales recién sacrificados. Se permitió la coagulación de la sangre a temperatura ambiente y las muestras fueron posteriormente centrifugadas a 3000 g durante 10 min a 4ºC. El suero sanguíneo fue separado y conservado a -20ºC. En la reacción de ELISA, los sueros se utilizaron diluídos 1/20.

Análisis estadístico.

Las medias fueron comparadas a través de la prueba de dos colas del test de Student's o el test de medianas utilizando el software de InfoStat (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Resultados y discusión

Elección del modelo animal.

El modelo de infección murino si bien no reproduce exactamente las características de infección humana, ha sido utilizado por numerosos autores para estudiar la patogenia de EHEC (Takahashi et al, 2004; Nagano et al, 2003 entre otros). Dado que las cepas de ratones empleadas en distintas publicaciones sobre estudios *in vivo* resultan heterogéneas, se decidió realizar el presente trabajo utilizando dos estirpes ampliamente reconocidas: ratones C57BL/6 y BALB/c.

La elección de las cepas de ratones se fundamentó en el perfil de respuesta inmune adquirida de los mismos. Los perfiles básicos de respuesta inmune fueron descriptos por primera vez por T. Mossman y se denominan Th1 y Th2 en función de las subpoblaciones de linfocitos T colaboradores o "helpers" (Th) que se diferencian en respuesta a los antígenos proteicos de los microorganismos (Mossman et al, 1986).

La vía de diferenciación Th1 es la respuesta a microorganismos que infectan o activan a macrófagos y a aquellos que activan a las células NK (natural killer). La diferenciación de células Th2 se produce por ejemplo en respuesta a helmintos y alergenos, que causan una estimulación crónica de las células T, a menudo con una activación escasa de macrófagos. Estas dos subpoblaciones de células, producen distintos tipos de citoquinas, que provocan diferentes funciones efectoras. La subpoblación Th1 produce IFN-γ, IL-2, TNF-α, y linfotoxina participando en la respuesta inmune mediada por células a los patógenos intracelulares. Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, y IL-13 y están involucradas en la respuesta a patógenos extracelulares (Abbas et al, 2002).

Otros estímulos, aparte de las citoquinas, influyen en el patrón de diferenciación de células T colaboradoras. Un determinante importante del patrón de diferenciación de las células T es la constitución genética del huésped. Se sabe que los ratones endogámicos de algunas cepas presentan respuestas Th2 a los mismos microorganismos que estimulan la diferenciación Th1 en la mayoría de las cepas (Abbas et al, 2002). Los ratones C57BL/6 poseen un perfil de activación predominantemente Th1 en respuesta a diferentes clases de antígenos. Este patrón implica que se hallen mejor preparados para resistir una infección por microorganismos de vida intracelular o invasivos (Heinzel et al, 1989). Los ratones BALB/c poseen por el contrario un perfil de activación predominantemente Th2 en respuesta a diferentes antígenos, lo cual los convierte en más susceptibles a la infección por microorganismos intracelulares o invasivos y más resistentes a la infección por bacterias extracelulares (Heinzel et al, 1989). Se eligieron

por lo tanto dos modelos alternativos y complementarios, esperando una mayor susceptibilidad a la infección por EHEC de los ratones C57 y una menor susceptibilidad, pero tal vez una mejor respuesta humoral, por parte de la cepa BALB/c.

Aceptabilidad del probiótico.

La suspensión de la cepa probiótica en el agua de bebida, no afectó el porcentaje de consumo de agua para ambas cepas de ratones (figura 2).

Dada la alta capacidad acidificante de los cultivos de la cepa CIDCA 133, se temió que existiera (a pesar de los lavados) ácido láctico remanente junto con otros productos extracelulares, que pudieran modificar el sabor del agua. Sin embargo la aceptabilidad de la suspensión de lactobacilos fue equiparable con la del lote placebo (figura 2). La utilización de sacarosa al 20% como crioprotector posiblemente favoreció la palatabilidad del agua tanto para la suspensión probiótica como la del control.

El consumo promedio diario de agua de los animales fue de 5 ml. Dado que el lote tratamiento recibió una concentración de lactobacilos de 2 10^8 ufc/ml; cada animal ingirió por lo tanto 1 10^9 lactobacilos diarios.

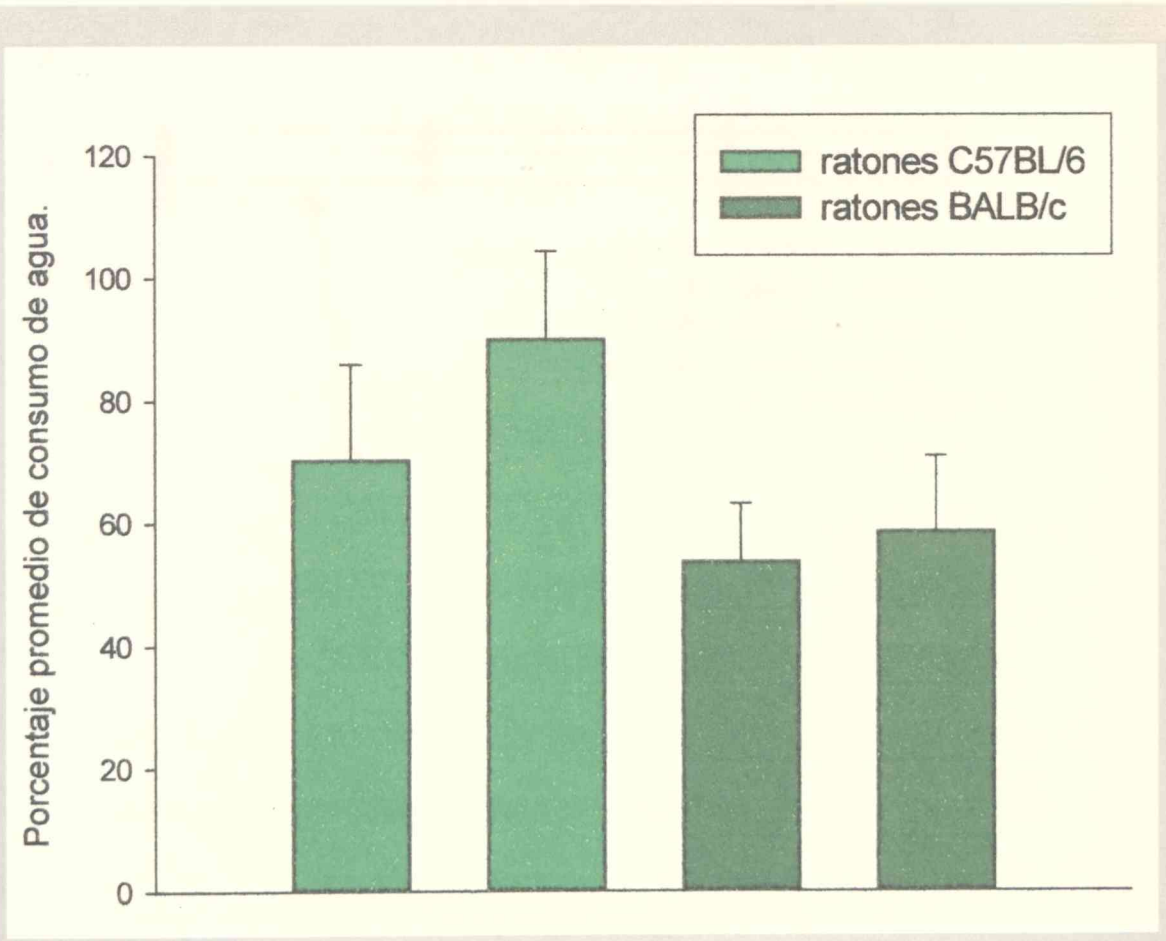


Figura 2: Porcentaje promedio de consumo de agua por los ratones. Se promedió el consumo de agua de los 7 días previos a la infección por EHEC. El 100% corresponde a la totalidad del volumen de agua colocado diariamente en cada lote. No hubo diferencias significativas entre tratamientos para una misma cepa para test t de Student ($p>0.05$). Considérese que los lotes tienen igual cantidad de animales

Supervivencia de los animales.

Las observaciones más generales realizadas durante el transcurso del ensayo se refirieron al estado general de los animales y la tasa de supervivencia. Ambas cepas de ratones y en los dos grupos (placebo y tratamiento), mostraron una actividad normal y un estado general bueno hasta el quinto día post-infección con *E. coli* EHEC. A partir de este momento los ratones C57BL/6 del grupo placebo comenzaron a sufrir un fuerte deterioro de su estado general y a morir en consecuencia (figura 3). Los signos anormales observados fueron un alto grado de letargia, pelo de apariencia hirsuta y alejamiento de los individuos del resto del grupo. El consumo de agua y alimento también resultó significativamente disminuído desde el cuarto día. Entre el quinto y sexto día murieron los 13 animales de ese lote, del cual se llegó a muestrear 7 animales agonizantes. El lote de animales C57BL/6 que recibieron el probiótico en el agua de bebida sobrevivieron los 21 días de duración del experimento y no presentaron alteraciones en su estado general ni en su comportamiento. Los dos grupos de ratones BALB/c sobrevivieron y mostraron signos normales durante todo el ensayo (figura 3).

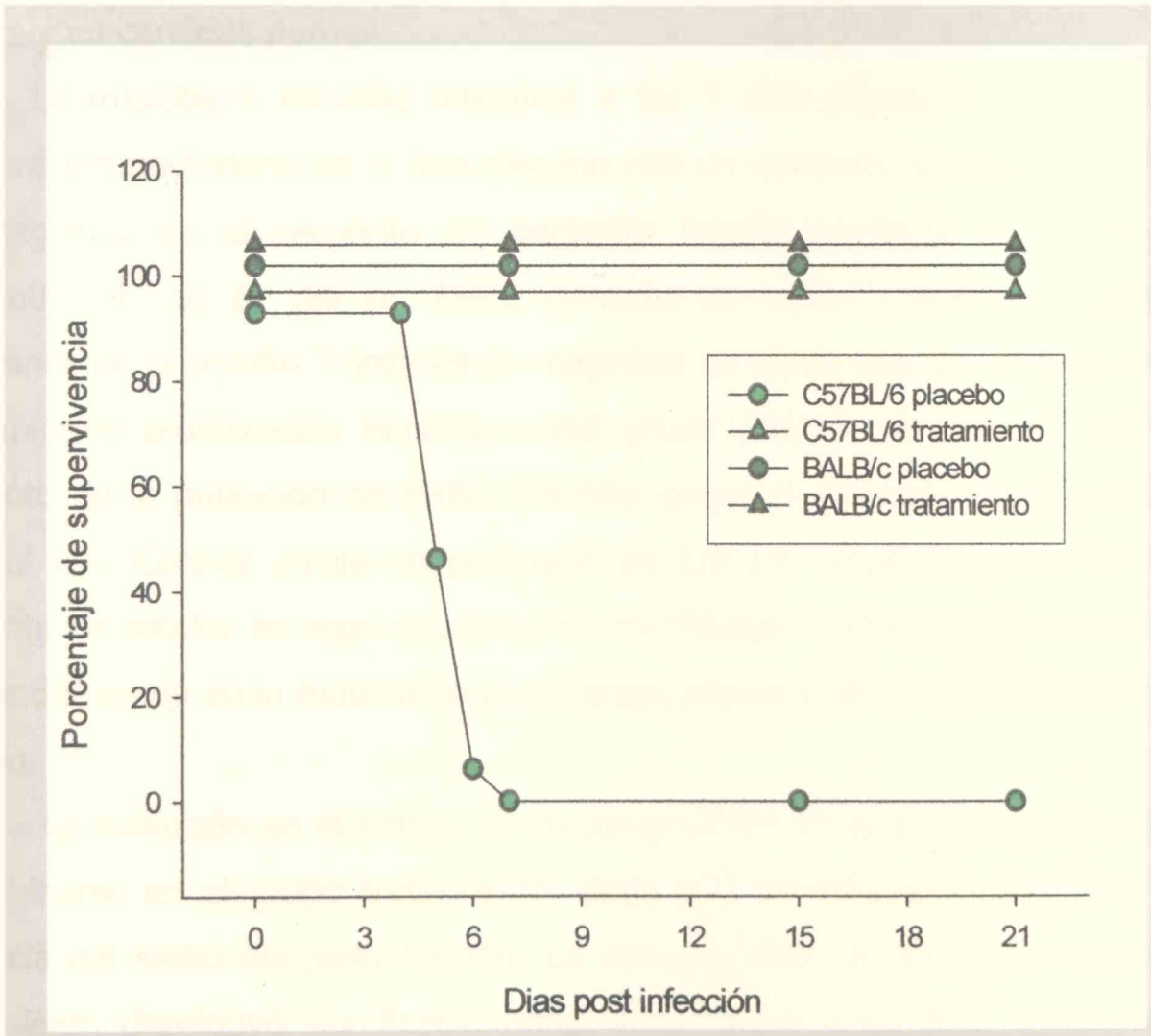


Figura 3. Porcentaje de supervivencia de ratones C57BL/6 y BALB/c luego de la infección por EHEC. Los símbolos alrededor del 100% coinciden pero fueron separados para una mejor visualización.

Los resultados demuestran una alta susceptibilidad del la cepa murina C57BL/6 a la infección por la cepa de EHEC 69160, que le ocasionó una enfermedad aguda seguida de muerte. Por otra parte, el lote de ratones C57BL/6 tratados con el lactobacilo

CIDCA133 sobrevivió a lo largo de todo el ensayo, sin presentar signos de enfermedad. La sensibilidad de la cepa C57BL/6 a *E. coli* EHEC está de acuerdo con su perfil de respuesta inmune Th1. Los ratones BALB/c tuvieron un comportamiento de acuerdo a lo esperado según su perfil de respuesta inmune Th2, con una mayor resistencia a la infección por bacterias extracelulares. Dado que la cepa murina C57BL/6 resultó ser la más susceptible de las dos, los estudios posteriores presentados en este trabajo se focalizaron en caracterizar con más detalle este modelo de infección.

Colonización de *E. coli* EHEC en intestino de ratón.

Se determinó como parámetro de colonización de *E. coli* EHEC al intestino de ratón la presencia de bacterias viables en materia fecal. El límite de detección para el método empleado fue de 100 ufc/g de heces. Los ratones C57BL/6 del grupo placebo, los cuales presentaron un cuadro agudo seguido de muerte, mostraron un escaso contenido de materia fecal en la porción final del intestino grueso con heces no formes. Los ratones C57BL/6 del grupo tratamiento tuvieron durante todo el concurso del experimento heces formes y en cantidad normal.

La microbiota mesófila intestinal a los 7 días (figura 4) evidencia una enorme proliferación bacteriana en el lote placebo con un aumento en promedio de 2.5 órdenes de magnitud en el recuento de bacterias totales respecto al lote tratamiento. La concentración de *E. coli* no EHEC también se hallan significativamente aumentada superando en promedio 3 órdenes de magnitud en el número de ufc al grupo tratamiento. La explosiva proliferación bacteriana del grupo control corresponde en gran parte al aumento de la población de EHEC. En este grupo el recuento de *E. coli* EHEC en agar sorbitol Mac Conkey arroja un promedio de 1.0 10^8 ufc/g frente a 3.3 10^9 ufc/gr del recuento de totales en agar nutritivo. Es interesante destacar que la presencia de EHEC no fue detectada en la materia fecal del grupo tratamiento con probiótico durante todo el ensayo.

La evolución en el tiempo de la composición de la microbiota mesófila sólo pudo determinarse en el grupo tratamiento, dado que los animales control no sobrevivieron más allá del sexto día postinfección. La concentración de bacterias totales en el grupo tratamiento disminuyó significativamente entre los 7 y 15 días; manteniéndose en un promedio de 3 10^6 ufc/g hasta los 21 días. La población de *E. coli* no EHEC se comportó de manera similar disminuyendo significativamente entre los 7 y 15 días desde 3.7 10^5 ufc/g hasta 2.5 10^3 ufc/g en promedio. Los recuentos de *E. coli* no EHEC aumentaron levemente a los 21 días alcanzando 1.4 10^4 ufc/g en promedio (figura 4).

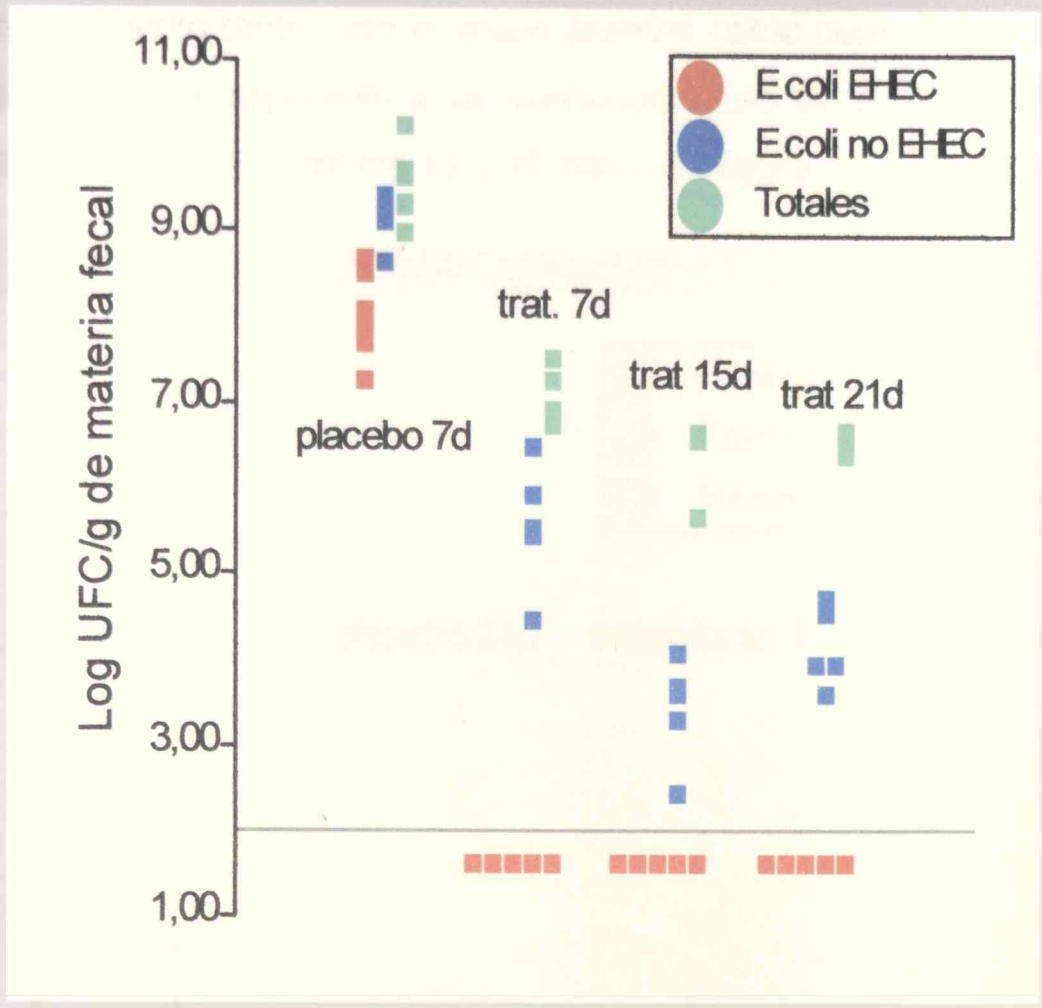


Figura 4. Evolución del recuento de bacterias viables en materia fecal de la cepa C57BL/6. Cada punto en el gráfico indica un valor individual. La sigla trat. indica grupo tratamiento. La línea sobre el eje y señala el límite de detección del método.

Los resultados muestran una clara diferenciación en el patrón de la microbiota mesófila intestinal entre los grupos placebo y tratamiento de los ratones C57BL/6. El grupo placebo sufrió una infección aguda por EHEC acompañada de una proliferación concomitante de *E. coli* no EHEC y otras bacterias intestinales. El grupo que ingirió el probiótico no presentó niveles detectables de EHEC. Sólo existió para este grupo un leve desbalance en la microbiota mesófila a los 7 días post infección, con aumentos significativos del número de bacterias totales y *E. coli* no EHEC respecto a los valores encontrados a los 15 y 21 días. La estabilidad de la microbiota mesófila intestinal observada en el grupo tratamiento, junto con la ausencia de niveles detectables de *E. coli* EHEC en materia fecal podría deberse a la colonización del epitelio intestinal por parte del lactobacilo administrado. Posiblemente, la presencia de la cepa 133 a nivel intestinal determinó una colonización deficiente por parte de *E. coli* EHEC en el grupo tratamiento.

Los ratones BALB/c mostraron un nivel mínimo de colonización por EHEC detectable solamente para algunos animales del grupo placebo, durante los primeros 15 días del ensayo. A los 21 días la concentración de *E. coli* EHEC fue nula o menor que el límite de detección del método (figura 5). El recuento de bacterias totales no se vio modificado a lo largo de todo el experimento con un promedio de $3.4\ 10^6$ ufc/g. Esta concentración bacteriana es semejante a los valores hallados para los 15 y 21 días de la

cepa C57BL/6. La cantidad de *E. coli* no EHEC presente en heces a los 21 días fue de 4.5 10^3 ufc/g en promedio tanto para el grupo placebo como para el grupo tratamiento. Esta cifra también resulta equiparable a las concentraciones de *E. coli* no EHEC encontradas para los ratones C57BL/6 entre los 15 y 21 días (ver figura 4).

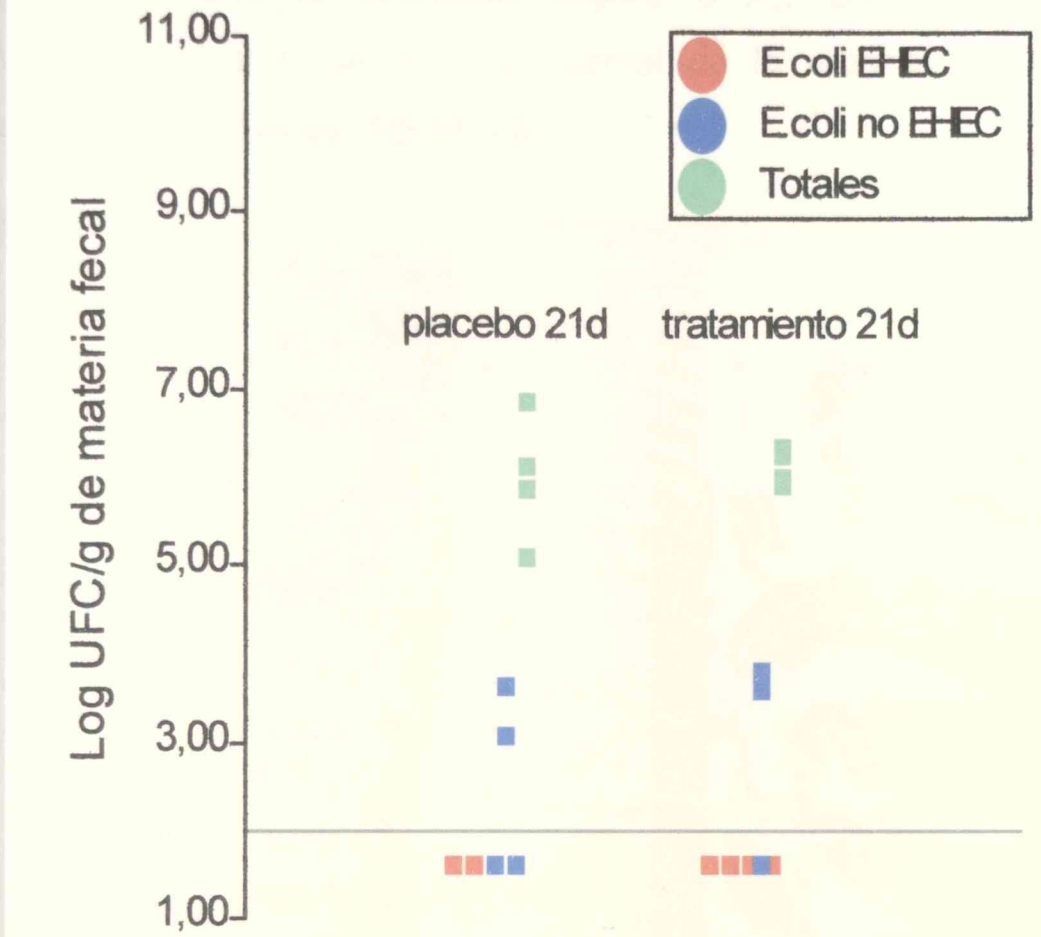


Figura 5. Recuento de bacterias viables en la cepa BALB/c a los 21 d post infección. Cada punto en el gráfico indica un valor individual. La línea sobre el eje y señala el límite de detección del método.

El bajo nivel de recuperación fecal de *E. coli* EHEC en la cepa BALB/c indica que la colonización por parte de la bacteria fue bastante ineficaz. Como consecuencia la composición de la microbiota mesófila intestinal no se observó mayormente perturbada por la administración oral de EHEC. Mecanismos de la respuesta inmune, así como la diferente composición de la microbiota intestinal existente entre ambas cepas de ratones podrían explicar en parte esta diferente susceptibilidad. De hecho la microbiota mesófila, analizada a través de los recuentos totales, mostró diferencias cualitativas entre ambas cepas. Evidentemente los ratones BALB/c resultaron refractarios a la colonización e infección por la cepa 69160 *E. coli* EHEC.

Morfología intestinal.

A fin de determinar el grado de alteración de la mucosa intestinal provocado por la infección de EHEC, se realizaron cortes histológicos del intestino delgado de los animales.

Los ratones C57BL/6 del grupo placebo (aquellos que sobrevivieron hasta el séptimo día), mostraron un deterioro notable de la mucosa intestinal; presentando sus vellosidades sumamente acortadas (figura 6 A). Los ratones C57BL/6 del grupo tratamiento registraron un aspecto normal de la mucosa intestinal con vellosidades alargadas y más ahusadas (figura 6 B).

Figura 6. Morfología de la mucosa intestinal de ratones C57BL/6 infectados con EHEC. A) Animales C57BL/6 del grupo placebo. B) Animales C57BL/6 del grupo tratamiento. Ambas fotografías corresponden a los 7 días postinfección. Las fotografías muestran imágenes representativas de ambos grupos. Las flechas dobles indican un ejemplo de las longitudes tomadas para la vellosidad y la cripta intestinal. Magnificación 40X. Tinción con hematoxilina y eosina.

Con el objetivo de efectuar una descripción más objetiva de la morfología intestinal, se cuantificó para cada animal la relación entre la longitud de la vellosidad y la cripta (señaladas en la figura 6). Una disminución significativa de dicha relación estaría indicando un importante acortamiento de la vellosidad y por ende un considerable daño a nivel de la mucosa intestinal. Las longitudes se determinaron a través del análisis de las imágenes de microscopía (figura 7).

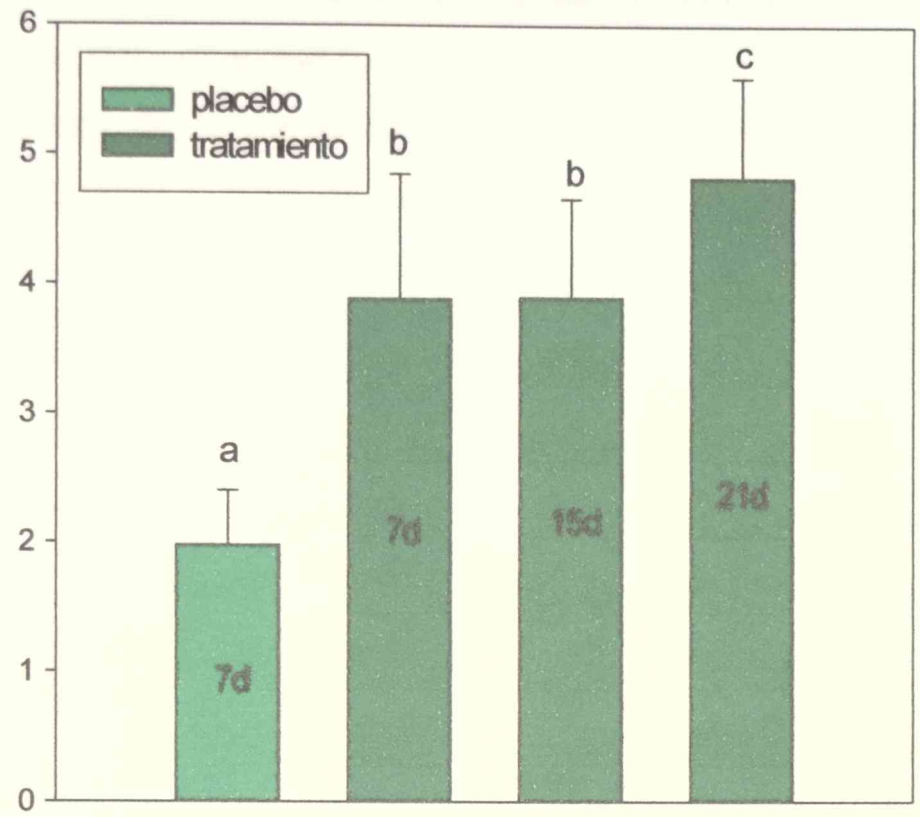


Figura 7. Evolución de la relación vellosidad/cripta de los ratones C57BL/6 infectados con EHEC. Las barras representan el promedio de 10 a 12 medidas de dos animales elegidos al azar. Las longitudes se determinaron sobre micrografías de distintas regiones del intestino. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en test t de Student.

La relación vellosidad cripta de los ratones C57BL/6 del grupo placebo se vio significativamente disminuída respecto al grupo tratamiento a los 7 días postinfección (figura 7). En el grupo tratamiento la relación se mantuvo estable entre los 7 y 15 días, para aumentar levemente a los 21 días postinfección. Resulta evidente que la infección por *E. coli* EHEC provocó un acortamiento de las vellosidades intestinales del grupo placebo, el cual fue menos acusado en el grupo tratamiento.

Los ratones BALB/c no mostraron alteraciones morfológicas a nivel intestinal, tanto en el grupo placebo como control.

Evaluación de daño renal.

En el humano afectado por el SUH, el daño a nivel renal se debe a la acción de la toxina Shiga sobre las células endoteliales de la microvasculatura glomerular. Estas células ricas en el receptor de la toxina Gb3, son altamente susceptibles a la toxina. Las células endoteliales dañadas promueven la adhesión de leucocitos y plaquetas con la consecuente formación de trombos determinando la microangiopatía trombótica característica del SUH (Yamamoto et al, 2005). Los daños glomerulares determinan el fallo de la función renal que se traduce en alteraciones de los parámetros hematológicos de urea y creatinina, así como la manifestación clínica de una intensa oliguria.

En general para los modelos murinos la infección por vía oral con EHEC o la introducción vía sanguínea de la toxina Shiga no provoca daño glomerular sino tubular. Las células tubulares afectadas presentan distintos signos de degeneración como vacuolización del citoplasma, picnosis nuclear, pérdida de microvellosidades y desprendimiento de la pared tubular (Yamamoto et al, 2005). Cuando se analizó la morfología histológica renal de los ratones C57BL/6, se registraron en el grupo placebo alteraciones de los túbulos renales tanto a nivel cortical como medular (figura 8 E y F).

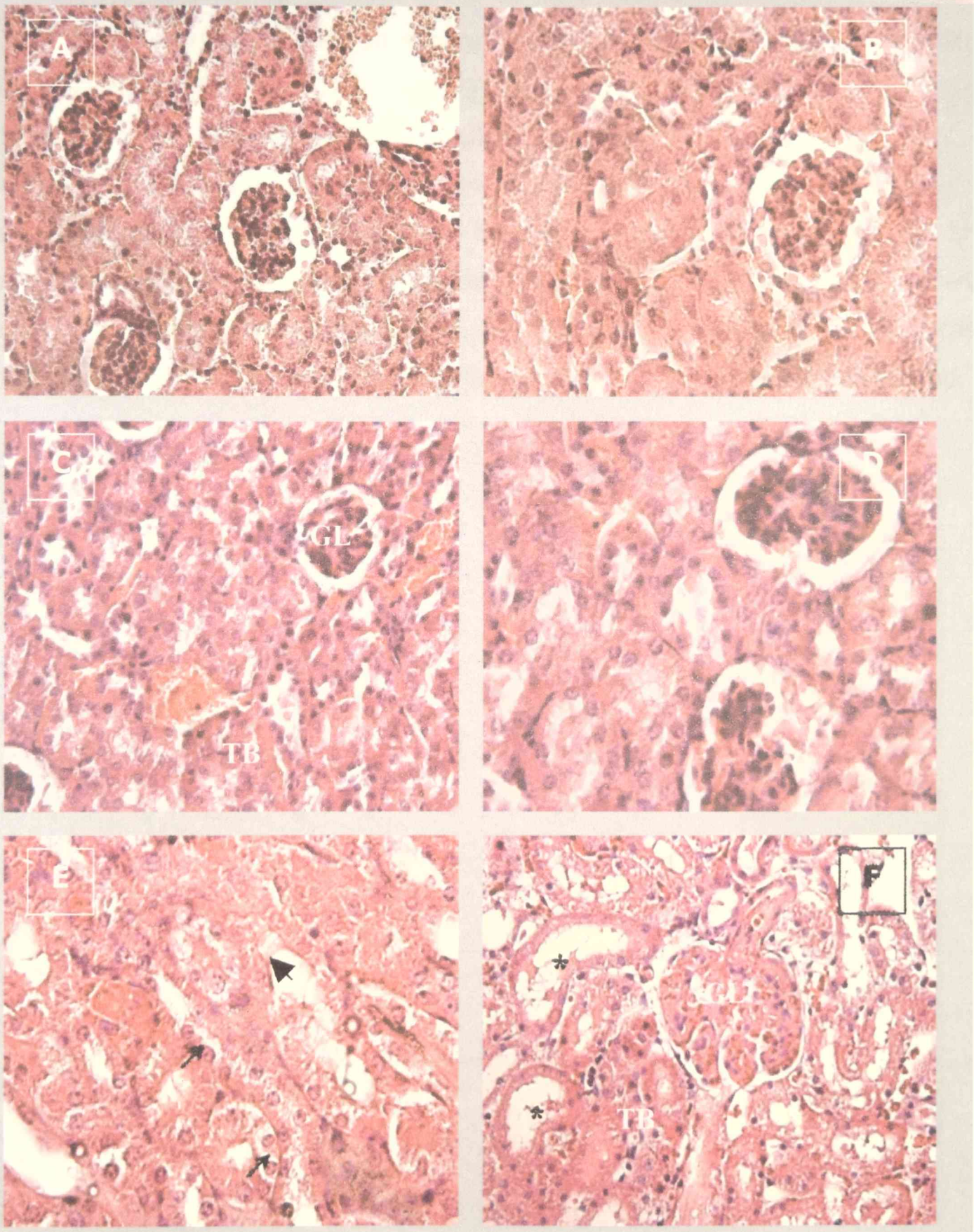


Figura 8. Morfología histológica renal de ratones C57BL/6. A) y B) constituyen controles sin infectar. C) y D) son imágenes pertenecientes a ratones del grupo tratamiento. E) y F) son imágenes pertenecientes a ratones del grupo placebo. Los asteriscos indican ensanchamiento de la luz tubular. Las flechas pequeñas indican vacuolización celular. Las flechas grandes señalan desprendimiento celular desde la pared tubular. Gl. significa glomérulo, TB significa túbulo. Magnificación 40X en la fotografías de la izquierda y 60X en las fotografías de la derecha.

Una gran proporción de los túbulos presentaron ensanchamiento de la luz (figura 8 F). El aumento de la luz tubular puede atribuirse tanto a la pérdida de microvellosidades superficiales como al desprendimiento celular. Se observó asimismo una importante cantidad de células vacuoladas, cuyo citoplasma parece estar ausente (figura 8 E). Los ratones del grupo tratamiento (figura 8 C y D) mostraron túbulos renales de aspecto semejante a los ratones control (figura 8 A y B). Los glomérulos renales tanto del grupo tratamiento como del grupo placebo, no evidenciaron alteraciones morfológicas.

A pesar de encontrarse muestras claras de daño renal en los ratones C57BL/6 del grupo placebo, los valores de urea en sangre se mantuvieron dentro de los estándares normales para ratón (BUN = 0.2 g/l ± 0.03) (Hung et al, 2007) (figura 9). El grupo tratamiento también presentó valores dentro del rango normal durante todo el experimento (figura 9). La no correlación entre el daño morfológico renal y los niveles de urea sanguíneos no constituye un fenómeno anormal. Es sabido que para registrar una alteración en los parámetros hematológicos de urea y creatinina el funcionamiento renal debe estar disminuído en más de un 50% (Kumar et al, 2003). Es posible que en el caso de los ratones C57BL/6 del grupo placebo, el daño global renal no alcance tal magnitud.

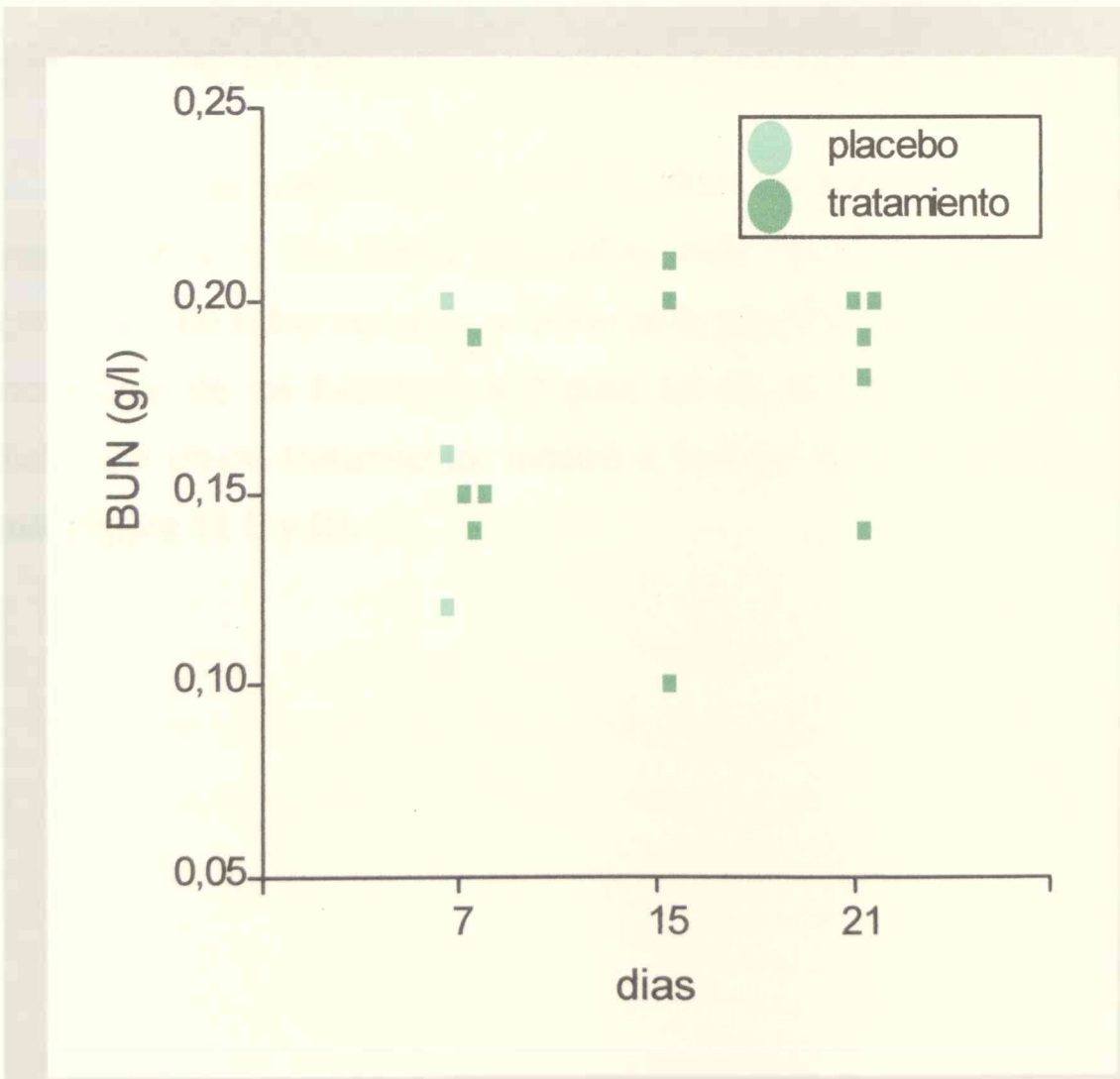


Figura 9. Determinación de nitrógeno ureico en sangre (BUN) en ratones C57BL/6. Cada punto en el gráfico indica un valor individual. Los valores se encontraron dentro del rango normal para ratón (BUN=0.2±0.03)

Determinación de traslocación bacteriana en hígado.

Al diseccionar los ratones C57BL/6 del grupo placebo, se observó que los hígados de los animales muestreados a los 7 días presentaban cambio de color junto con un aumento considerable de volumen (figura 10). En toda la superficie del órgano se encontraron además, zonas blancas correspondientes a áreas necróticas.

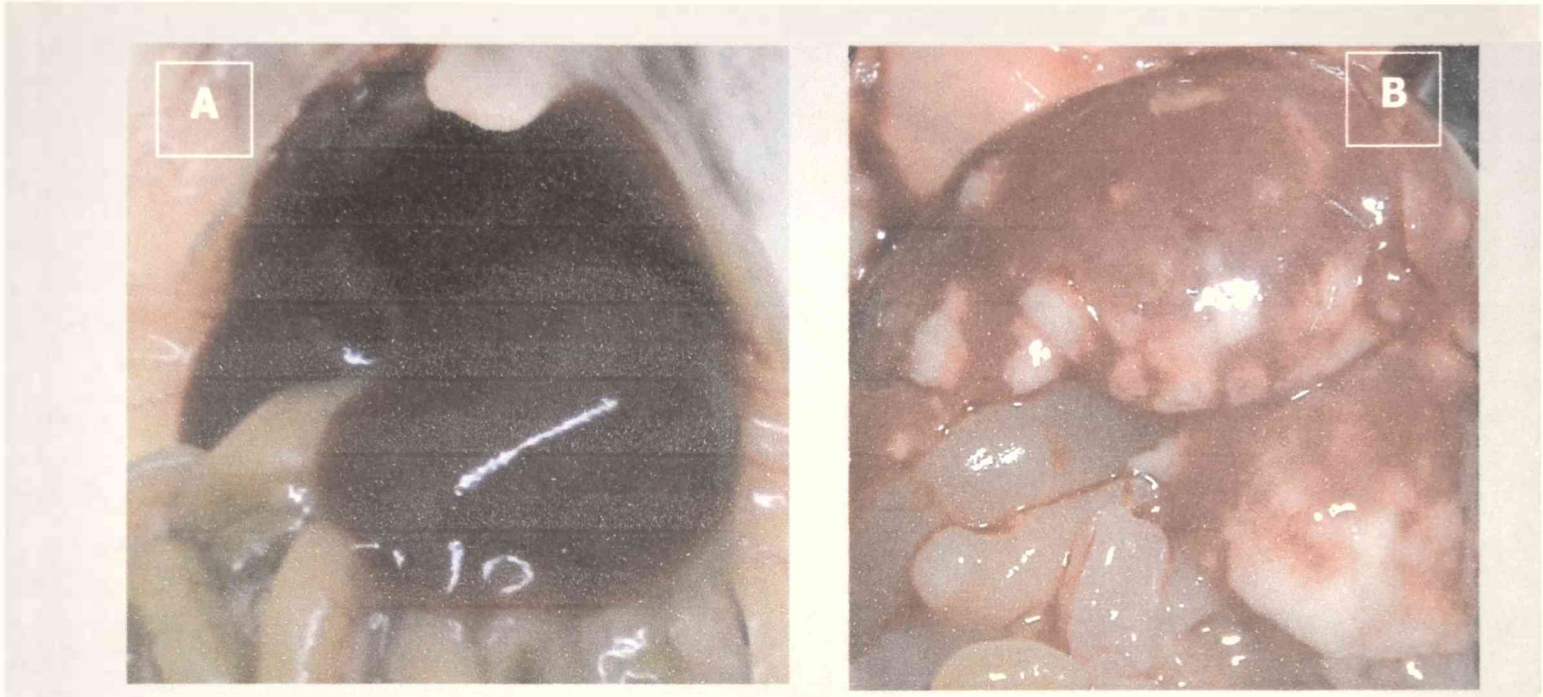


Figura 10. Macromorfología hepática de ratones C57BL/6. La fotografía A muestra el aspecto general de un hígado de un animal control. La fotografía B refleja el aspecto del hígado de un animal del grupo placebo a los 6 días post infección. Nótese el enrojecimiento del tejido y la presencia de áreas blancas correspondientes a zonas necróticas.

Cuando se analizó la histología hepática se determinó que las áreas necróticas se correspondían con las zonas eosinófilas más claras encontradas en los preparados (figura 11 A). En estos sectores se observó la pérdida de la estructura tisular, así como de la morfología de los hepatocitos (figura 11 B). En contraste el tejido hepático de los animales del grupo tratamiento, mostró a lo largo de todo el ensayo una conformación normal (figura 11 C y D).

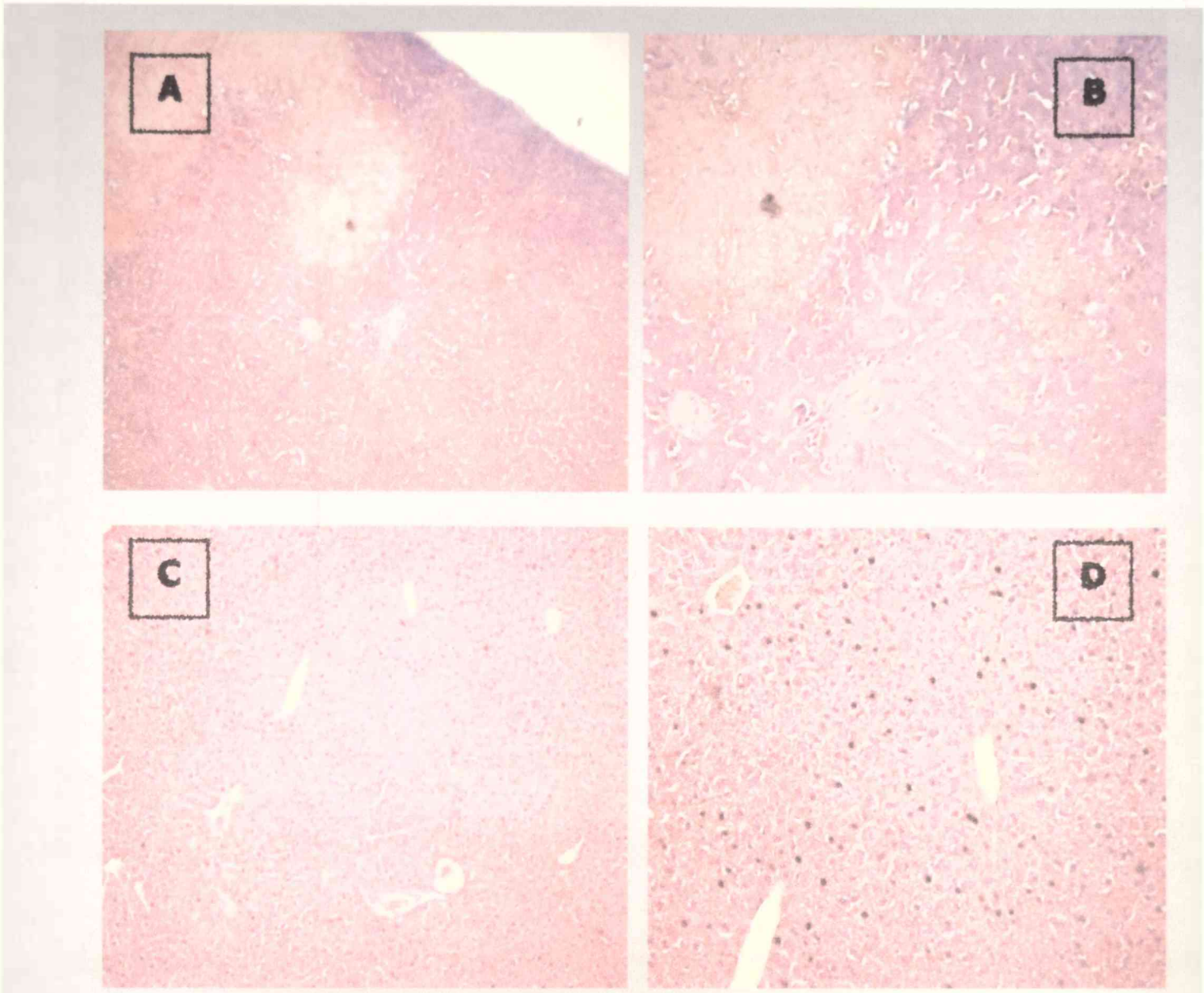


Figura 11. Histología hepática de ratones C57BL/6. Las fotografías A y B, muestran el aspecto histológico del hígado de ratones pertenecientes al grupo placebo a los 6 días postinfección. Magnificación 10X y 20X respectivamente. Las fotografías C y D pertenecen a animales del grupo tratamiento a igual tiempo. Magnificación 10X y 20X respectivamente. Tinción con hematoxilina y eosina.

Posteriormente se determinó la presencia de bacterias en el hígado de los ratones. La cual se efectuó, como en el caso del contenido intestinal, por recuento de microorganismos viables (figura 12).

Los ratones C57BL/6 del grupo placebo presentaron a los 7 días una alta carga bacteriana hepática con un promedio de 1.4 10^8 ufc/g (figura 12). La composición de la flora fue uniforme correspondiendo enteramente a *E. coli* no EHEC. Los recuentos obtenidos en agar sorbitol Mc Conkey y agar nutritivo fueron semejantes tanto cuali como cuantitativamente.

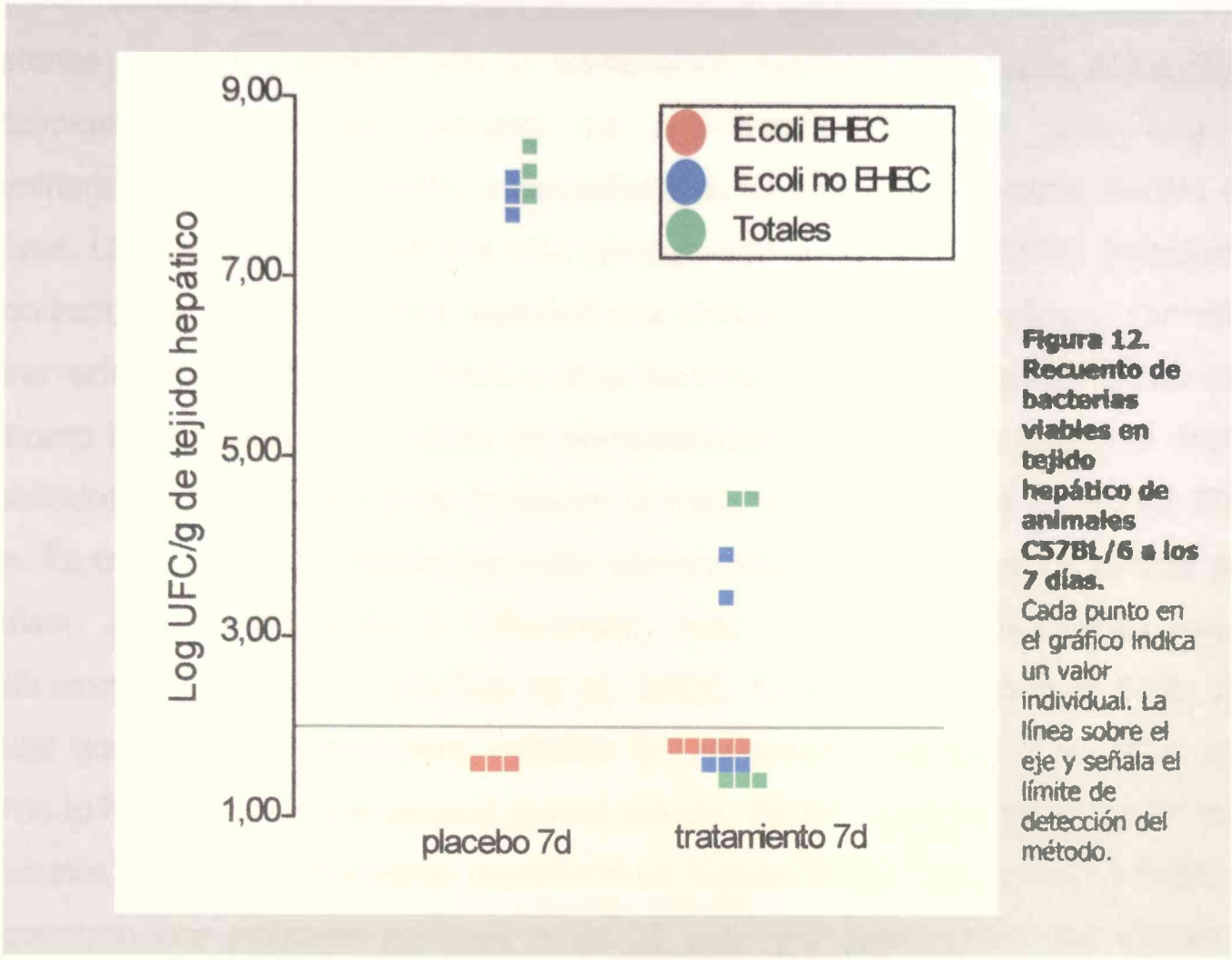


Figura 12. Recuento de bacterias viables en tejido hepático de animales C57BL/6 a los 7 días. Cada punto en el gráfico indica un valor individual. La línea sobre el eje y señala el límite de detección del método.

Los ratones C57BL/6 del grupo tratamiento tuvieron en su totalidad hígados con aspecto normal. Solamente 2 de 5 animales del grupo tratamiento presentaron traslocación bacteriana (figura 12). Las colonias halladas fueron identificadas también como *E. coli* no EHEC. La concentración bacteriana hallada en este grupo fue significativamente menor con un promedio 3.5 10^4 ufc/g en los animales positivos. Los recuentos bacterianos en el grupo tratamiento a los 15 días fueron negativos en los dos medios ensayados (agar nutritivo y SMAC). A los 21 días se obtuvieron dos animales con recuento positivo sólo en agar nutritivo. La flora encontrada fue mixta y con un concentración promedio de 9.3 10^2 ufc/g. Como fuera mencionado anteriormente, los datos recolectados a partir del séptimo día corresponden solamente al grupo tratamiento debido a la muerte de los animales del grupo control.

Los animales BALB/c, que fueron refractarios a la colonización por EHEC, carecieron de recuentos positivos en hígado para esta variante de *E. coli* durante los 21 días. Esporádicamente en el transcurso del experimento apareciron animales con recuento positivo en agar nutritivo tanto en el grupo placebo como en el tratamiento. La flora encontrada fue mixta y estuvo siempre en baja concentración (ligeramente superior al límite de detección del método ~ 10^2 ufc/g).

Los resultados evidenciaron que la proliferación bacteriana intestinal observada en los ratones C57BL/6 coincidió con la traslocación hepática observada a los 7 días; especialmente en el grupo placebo. La proliferación intestinal tenía una neta predominancia de *E. coli* no EHEC acompañada de *E. coli* EHEC y otros bacilos Gram negativos. La traslocación bacteriana sólo correspondió a *E. coli* no EHEC. Posiblemente la colonización intestinal por EHEC provocó una disrupción en la microbiota, permitiendo el sobrecrecimiento de *E. coli* no EHEC y otras bacterias, que concomitantemente iniciaron un proceso inflamatorio. El aumento de permeabilidad de la mucosa intestinal debido a los mediadores inflamatorios pudo favorecer la traslocación masiva de *E. coli* no EHEC a hígado. La traslocación de microorganismos comensales, podría reflejar un evento pasivo secundario a la proliferación e inflamación, más que un acontecimiento asociado específicamente al patógeno (Vallace et al, 2003). Cabe destacar que el 60% de los animales que recibieron probiótico evitaron la traslocación hepática y aquellos que la sufrieron lo hicieron en una magnitud mucho menor. En los días subsiguientes del ensayo los animales del grupo tratamiento mostraron un hígado "limpio" de *E. coli* no EHEC. Sólo se registraron dos animales positivos a los 21 días que presentaron una escasa flora mixta. Se sabe que la aparición esporádica de distintos microorganismos viables en hígado en bajas concentraciones puede corresponder a un proceso fisiológico (Pérez et al, 2007).

Los ratones BALB/c manifestaron un comportamiento normal encontrándose sólo algunos animales positivos para flora mixta a lo largo de todo el experimento en ambos grupos (tratamiento y control).

Determinación del peso del bazo.

La determinación del peso del bazo es una medida indirecta del grado de actividad en que se halla el órgano. Una de las causas más frecuentes del hiperesplenismo es la presencia de infecciones. El bazo es el principal lugar en que se producen las respuestas inmunitarias frente a los antígenos transportados en sangre (Abbas et al, 2002).

Los pesos de los bazos de los ratones C57BL/6 del grupo placebo a los 7 días fueron significativamente mayores que los correspondientes al lote tratamiento (figura 13 A). Los valores registrados fueron los más elevados de todo el ensayo. El grupo tratamiento a los 15 días manifestó una disminución significativa del peso esplénico respecto de los 7 días. A los 21 días el peso diminuyó nuevamente sin llegar a los valores observados en la primera semana. El comportamiento del peso de los bazos podría explicarse sobre la base de que los ratones que sufrieron la enfermedad aguda

acompañada de bacteriemia, posiblemente se enfrentaron a una sobrestimulación de antígenos que determinó en consecuencia, el aumento brusco de la actividad esplénica con proliferación de múltiples clones linfocíticos. Este aumento súbito de la actividad del bazo pudo implicar a su vez, un incremento también rápido del peso del órgano. En el caso de los ratones del grupo tratamiento, al no existir un proceso inflamatorio agudo determinó que los bazos aumentaran gradualmente su masa. El descenso de peso esplénico a los 21 días en el grupo tratamiento podría explicarse por el hecho de que el aumento de *E. coli* no EHEC intestinal fue transitorio. Asimismo la presencia de EHEC (si existió) también fue breve y en baja concentración.

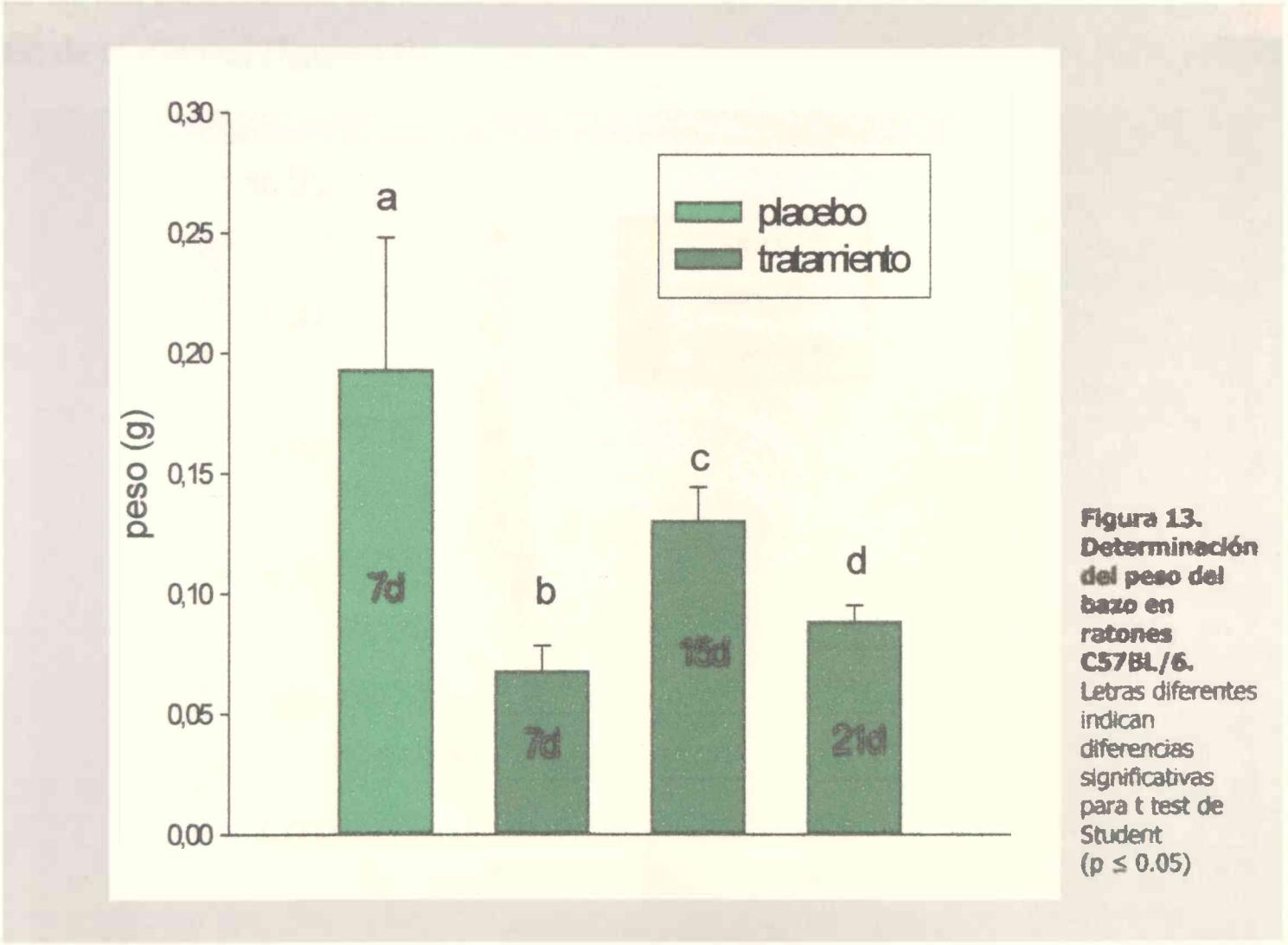


Figura 13. Determinación del peso del bazo en ratones C57BL/6. Letras diferentes indican diferencias significativas para t test de Student ($p \leq 0.05$)

Los ratones BALB/c del grupo placebo y tratamiento tuvieron un comportamiento semejante al registrado para los ratones C57BL/6 del grupo tratamiento con probiótico. El peso de los bazos aumentó significativamente a los 15 días para luego descender a los 21 días a los niveles iniciales tanto para el grupo tratamiento como para el control. No existieron diferencias significativas entre ambos.

Determinación de Inmunoglobulinas.

Uno de los eventos importantes en el desarrollo de una respuesta inmune específica es la producción de inmunoglobulinas. Su presencia *in vivo* demuestra que el antígeno administrado no pasó inadvertido para el sistema inmune. En la presente sección se determinaron los niveles de IgG séricos y de IgA en materia fecal de ratón de los ratones C57BL/6 y BALB/c infectados con la cepa de EHEC 69160

Determinación de Ig A

Los niveles de IgA por mg de materia fecal hallados en los ratones C57BL/6 a los 7 días se ven aumentados significativamente con respecto a los hallados a los 15 y 21 días (test de medianas) (figura 14).

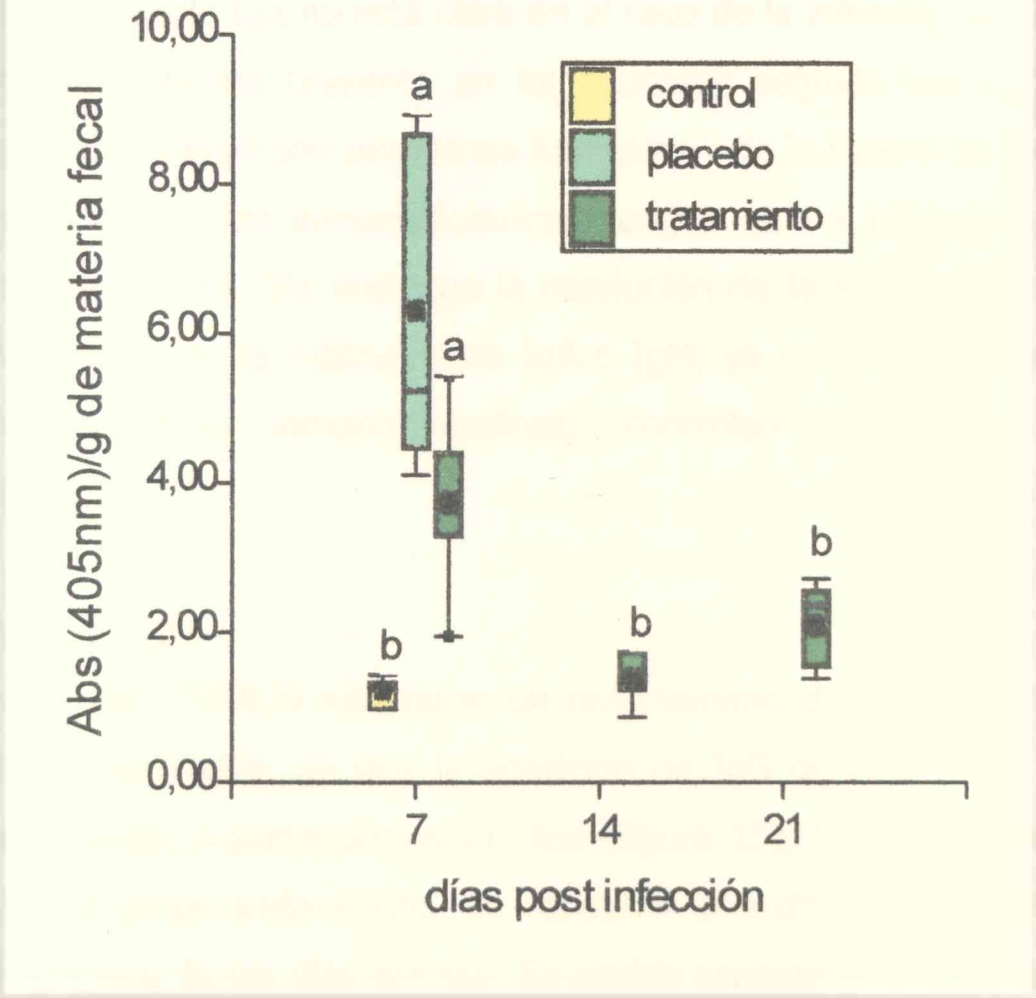


Figura 14. Determinación de IgA específica en ratones C57BL/6. La longitud de las cajas señalan el rango de valores de Absorbancia/g alcanzado en cada condición. El punto en cada caja indica la media. La línea horizontal que divide las cajas representa la mediana. Letras diferentes indican diferencias significativas para test de medianas ($p \leq 0.05$)

A su vez los ratones del grupo placebo muestran a los 7 días valores mayores en promedio a los del grupo tratamiento aunque estás diferencias no son estadísticamente significativas. La presencia de IgA específica tan tempranamente es inesperada. Probablemente la proliferación de *E. coli* EHEC y no EHEC, indujo la activación de linfocitos B memoria de distintas especificidades antigénicas, que elevaron transitoriamente el nivel de IgA intestinal. Estos anticuerpos aunque no específicos de EHEC podrían ser detectados en los ensayos de ELISA, dado que el antígeno empleado

consistió en un lisado bacteriano de la cepa 69160, el cual seguramente contiene numerosos determinantes antigénicos compartidos con otras cepas de *E. coli* y otros microorganismos presentes en el tracto digestivo. Los ratones del lote tratamiento seguramente no desarrollaron una respuesta inmune específica contra EHEC debido a la escasa persistencia de la bacteria en el intestino.

Los niveles de IgA en los ratones BALB/c fueron homogéneos durante las dos primeras semanas post infección y no difirieron del nivel basal indicado por el grupo control. A los 21 días se observó un incremento en los valores promedio, especialmente en el grupo placebo, sin embargo estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas, debido a la gran dispersión de los valores. La evolución de las IgA observada para esta cepa de ratón está en concordancia con los niveles mínimos de colonización intestinal por EHEC.

La función de la IgA no está clara en el caso de la infección por EHEC. La IgA es la principal inmunoglobulina presente en las mucosas seguida por la IgM. Tanto EPEC, EHEC, como *C. rodentium* son patógenos luminales y de la superficie epitelial, por lo tanto es de suponer que estas inmunoglobulinas juegan un rol importante en la respuesta contra estas infecciones. Sin embargo la resolución de la infección por *C. rodentium* en ratones no depende de la existencia de IgA o IgM, ya que ratones con deficiencia en la producción de estas inmunoglobulinas, controlan eficazmente la enfermedad (Maaser et al, 2004).

Determinación de IgG.

Los ratones C57BL/6 mostraron un nivel mínimo de IgG durante los primeros 15 días, lo cual es esperable, ya que la aparición de IgG generalmente ocurre varios días después del desafío. A partir de los 21 días (figura 15), los niveles de IgG aumentaron levemente en el grupo tratamiento, sin constituir una diferencia significativa respecto a las determinaciones de los días previos. Se podría considerar que los animales del grupo tratamiento de la cepa C57BL/6 no desarrollaron una respuesta de IgG contra EHEC.

Los ratones BALB/c como es predecible presentaron también niveles mínimos de IgG durante las dos primeras semanas post infección. A los 21 días tanto el grupo tratamiento como el placebo aumentaron significativamente los valores de IgG, respecto a los 15 y 7 días. Evidentemente, si bien los ratones no enfermaron por la administración de EHEC, su sistema inmune detectó la presencia de la bacteria montando una respuesta específica.

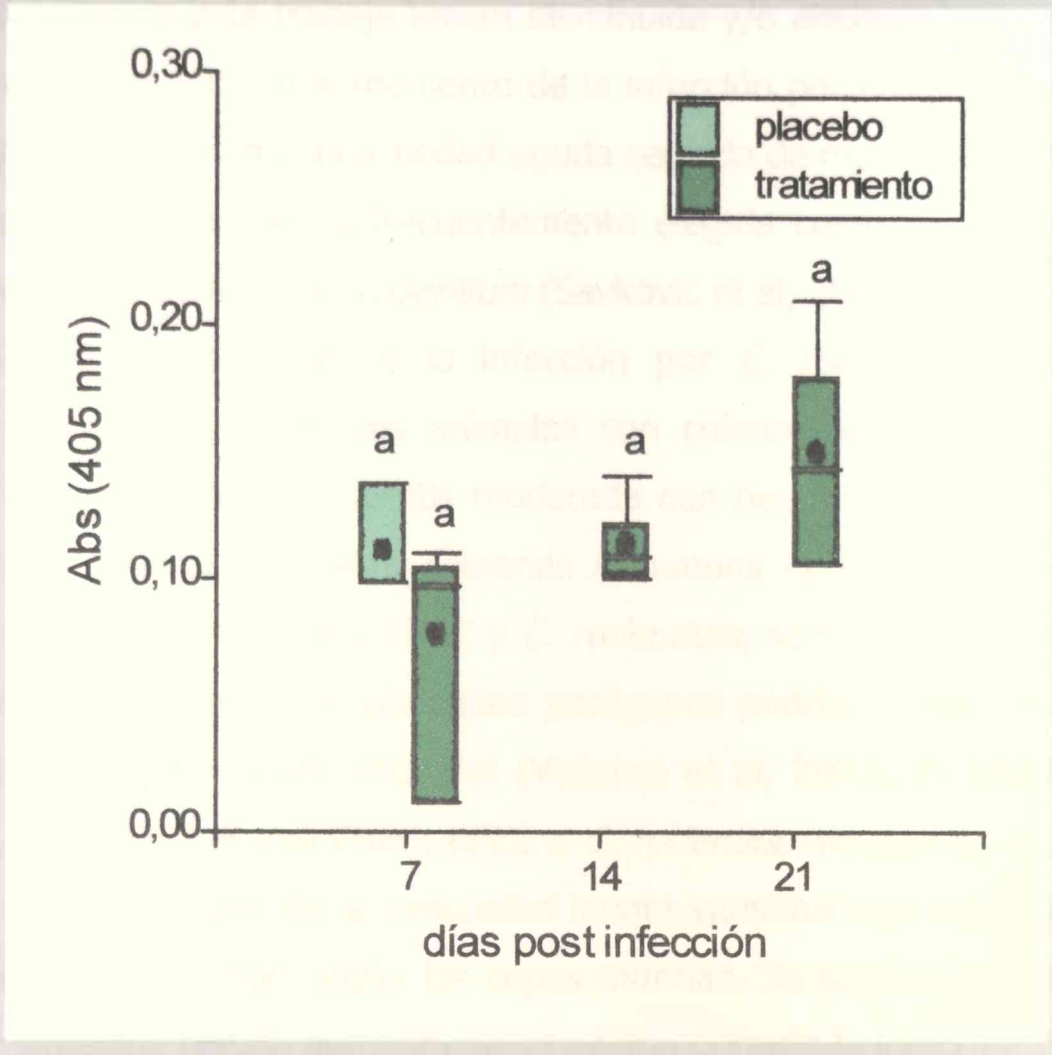


Figura 15. Determinación de IgG específica en ratones C57BL/6. La longitud de las cajas señalan el rango de valores de Absorbancia a 405 nm alcanzado en cada condición. El punto en cada caja indica la media. La línea horizontal que divide las cajas representa la mediana. Letras diferentes indican diferencias significativas para test de medianas ($p \leq 0.05$)

El rol de la IgG en la infección por EHEC no se conoce exactamente. En el caso *C. rodentium*, la producción de IgG parece ser importante en la protección contra la infección oral por este patógeno. Los ratones afectados por *C. rodentium* que eficazmente controlan la infección aumentan tanto sus niveles séricos como fecales de IgG (Maaser et al, 2004). Una explicación posible de la actividad de la IgG reside en el cuadro inflamatorio crónico intestinal que desencadena este patógeno. A consecuencia de la inflamación de la mucosa intestinal es probable que mayores cantidades de IgG alcancen el lumen y sean funcionalmente eficaces (Maaser et al, 2004). En los modelos utilizados para este trabajo la colonización intestinal por EHEC fue muy breve, por lo tanto la IgG no desempeñaría un papel relevante en el control de la infección.

En el presente capítulo se investigó la susceptibilidad a la infección por *E. coli* EHEC en dos cepas murinas C57BL/6 y BALB/c. Los ratones BALB/c se mostraron refractarios a la colonización por EHEC, resultados que concuerdan con los hallados por Nagano y col (Nagano et al, 2003), aunque el autor utilizó animales no pretratados con antibiótico. En contraste, la cepa C57BL/6 mostró una muy alta susceptibilidad a la infección. El cuadro agudo ocasionado por la infección de *E. coli* EHEC en la cepa C57BL/6 hace pensar que su mayor susceptibilidad se debió a diferencias en factores relacionados

con el sistema inmune de mucosas respecto a los ratones BALB/c. Las dos cepas de ratones empleadas en este trabajo tenían disminuída y/o alterada la microbiota intestinal por el tratamiento antibiótico al momento de la infección por EHEC. Sin embargo, sólo la cepa C57BL/6 desarrolló una enfermedad aguda seguida de muerte en el grupo placebo.

La cepa C57BL/6 no es frecuentemente elegida como modelo de infección por EHEC, aunque si por *Citrobacter rodentium* (Savkovic et al, 2005; Vallace et al, 2003). Los ratones C57BL/6 son sensibles a la infección por *C. rodentium*; desarrollando una enfermedad de carácter leve. Los animales son colonizados a nivel intestinal por la bacteria, la cual provoca una enteritis moderada con heces semisólidas. La infección se resuelve por lo general en cuatro semanas (Simmons et al, 2003). Estableciendo un paralelismo entre la infección por EHEC y *C. rodentium*, se sugirió que las cepas murinas más susceptibles a la infección por estos patógenos podrían tener un defecto sen los mecanismos de defensa innata intestinal (Vallance et al, 2003). El estado de avance en los estudios, tanto para *E. coli* EHEC, EPEC o *C. rodentium* no revelan aún cúales son las deficiencias de los efectores de la inmunidad innata intestinal que determinan la diferente susceptibilidad a la infección según las cepas murinas. Se sabe que la enzima inducible oxido nítrico sintetasa (iNOS) aumenta su expresión durante la infección por *C. rodentium* y colabora en la eliminación del patógeno (Vallance et al, 2000). Cabe estudiar aún el rol de los péptidos intestinales en la defensa contra estos microorganismos. Pequeñas diferencias en los comportamientos de estos efectores u otros entre las cepas murinas podrían brindar una explicación a la respuesta tan diferente a la infección por *E. coli* EHEC obtenida en este trabajo.

Poco se conoce de los efectos protectores de las bacterias probióticas contra *E. coli* O157:H7 *in vivo*. Los trabajos que informan la protección por el consumo de probióticos *in vivo* frente a la infección por EHEC son escasos. Los modelos murinos de infección letal por EHEC empleados utilizaron ratones gnotobióticos (Takahashi et al, 2004) o incrementaron la producción de toxina Shiga por la inoculación de mitomicina (Ashara et al, 2004). En ambos casos la administración profiláctica de probióticos (*Cl. butyricum* y *B. breve* respectivamente), determinó una sobrevivencia del 100% de los animales tratados. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo. El tratamiento con *B. breve* no logró disminuir la colonización intestinal de EHEC aunque si su actividad tóxica (Ashara et al, 2004). El tratamiento con *Cl. butyricum* disminuyó tanto la colonización intestinal como la producción de toxina Shiga (Takahashi et al, 2004). Por otra parte Shu y colaboradores describieron un modelo de infección por EHEC semejante al empleado en el presente trabajo, utilizando ratones C57BL/6 y BALB/c (Shu et al,

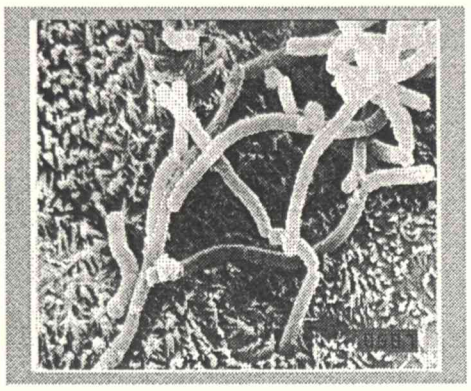
2002). Los animales sólo enfermaron levemente y fueron tratados antes y luego del desafío con EHEC con *Lactobacillus rhamnosus*. El consumo del lactobacilo disminuyó los signos de morbilidad, la colonización intestinal, la translocación extraintestinal y aumentó la producción de IgA. (Shu et al, 2002). Estos resultados también coinciden con los hallados en el presente trabajo.

Diferentes mecanismos han sido propuestos para la acción probiótica *in vivo*. La exclusión competitiva es uno de los más mencionados. Es posible que frente a una flora intestinal disminuída por el empleo de antibióticos, la cepa CIDCA 133 haya colonizado el microambiente luminal e impidiendo el asentamiento de *E. coli* EHEC. Asimismo, la producción de ácidos orgánicos a nivel intestinal prodría estar involucrada, ya que ha sido mencionada como causa de inhibición de la producción de toxina Shiga *in vivo* (Ashara et al, 2004). La disminución del daño tisular puede entenderse sobre la base de la menor concentración de EHEC alcanzada en el intestino de los animales tratados, aunque es posible que el lactobacilo interfiera en la expresión de las citoquinas proinflamatorias. Chien y colaboradores han reportado que la administración de *Lb. acidophilus* en ratones infectados por *C. rodentium* disminuye la expresión de TNFα, IL6 e IL 12 contribuyendo a minimizar los daños en la mucosa (Chien et al, 2005). Otra explicación probable, sugerida en los estudios *in vitro* sobre EHEC (capítulo 5), involucra la modificación de las vías de señalización intracelular debido a la presencia de los lactobacilos. Una respuesta celular diferente o menor a los factores de virulencia de EHEC implicaría una disminución de los daños inducidos por el patógeno.

Conclusiones:

Como hallazgos importantes del presente capítulo se puede destacar que:

- El modelo murino infección letal por *E. coli* EHEC, utilizando ratones C57BL/6 resultó ser adecuado y novedoso.
- La administración vía oral de la cepa CIDCA 133 a los ratones C57BL/6 infectados demostró su protección.
- Los ratones tratados con el lactobacilo tuvieron una sobrevivencia del 100%, mostrando menores niveles de colonización intestinal por EHEC y escasa traslocación bacteriana.
- Los ratones C57BL/6 que consumieron probiótico presentaron menor daño intestinal y renal evidenciado por la morfología tisular.



Conclusiones Generales y Perspectivas

Conclusiones Generales

En el presente trabajo de tesis se abordó en forma integral el estudio de una bacteria potencialmente probiótica el *L. delbrueckii* subsp. *lactis* cepa CIDCA 133.

Dado que en general la mayoría de las propiedades tecnológicas y funcionales de las bacterias probióticas son cepa-dependientes, el estudio exhaustivo de una cepa en particular queda plenamente justificado.

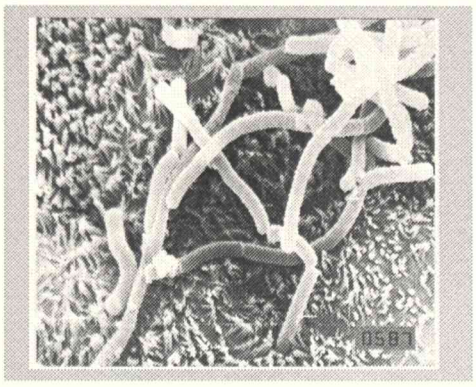
Los resultados más relevantes encontrados durante el estudio de las propiedades probióticas de la cepa CIDCA 133 fueron:

- El lactobacilo presentó una capacidad de acidificación en leche moderada y muy buenas aptitudes para la criopreservación
- El lactobacilo mostró una excelente tolerancia a la bilis en todas las condiciones ensayadas.
- La resistencia de la cepa a la acidez estomacal simulada no fue destacada, sino que se mantuvo dentro de los rangos esperables para la mayoría de los lactobacilos.
- La viabilidad del lactobacilo no fue afectada por la presencia de los lisados de células epiteliales colónicas, ni por las β defensinas humanas por lo que constituye una cepa resistente a la acción inhibitoria de distintos efectores de la inmunidad innata intestinal.
- Los sobrenadantes de cultivo de la cepa 133 tuvieron un efecto bactericida y/o bacteriostático sobre *E. coli* incluso en altas diluciones. Su accción antimicrobiana es atribuíble fundamentalmente a la presencia de ácido láctico.
- La cepa en estudio mostró una buena capacidad de asociación (2-4%) a enterocitos humanos en cultivo (línea Caco-2).
- El lactobacilo fue capaz de excluir a *E. coli* gfp de la superficie de los enterocitos en cultivo.
- El lactobacilo disminuyó la actividad nitrato reductasa de *E. coli*, la cual genera metabolitos potencialmente mutagénicos y/o carcinogénicos.
- El lactobacilo fue capaz de antagonizar el efecto biológico de los distintos factores de virulencia de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) serotipo O157: H7 sobre células Vero y Hep-2.
- El lactobacilo fue capaz de antagonizar en un modelo de infección murino la acción patógena de *E. coli* EHEC.

Perspectivas

El lactobacilo estudiado presentó muy buenas propiedades de adaptabilidad tecnológica, competitividad en el medio gastrointestinal y funcionalidad biológica. En base a los resultados obtenidos es posible considerar al *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* cepa CIDCA 133, un microorganismo de gran relevancia para ser incluido formulaciones probióticas. En vista a los temas e interrogantes planteados en el presente trabajo de tesis se podrían proyectar distintos estudios que complementen los resultados encontrados:

- Evaluar la capacidad del lactobacilo de estimular la expresión de las β defensinas humanas intestinales.
- Determinar si existe disminución en la concentración de metabolitos mutagénicos en materia fecal por el consumo del lactobacilo en modelos *in vivo*.
- Profundizar en la investigación de los mecanismos que determinan la protección ejercida por el lactobacilo frente a la acción biológica de EHEC en cultivos celulares.
- Determinar que clase de mediadores de la inmunidad innata intestinal se modifican por la presencia del lactobacilo colaborando en la resistencia a la infección por EHEC *in vivo*.
- Desarrollar un producto probiótico fermentado que incluya a la cepa CIDCA 133, y evaluar sus propiedades organolépticas y funcionales.



Anexo

Evaluación de un método colorimétrico para el estudio de la asociación entre microorganismos y células

ANEXO

El estudio de la interacción entre los microorganismos y los enterocitos es fundamental para comprender el efecto de la microbiota intestinal sobre el hospedador. Un aspecto relevante en este sentido es la determinación de la capacidad de asociación de los microorganismos a las células epiteliales. Existen numerosos métodos para la determinación de concentraciones bacterianas. Su confiabilidad, costo y duración dependen del microorganismo en estudio así como del sistema experimental utilizado. Las técnicas radiométricas y el recuento de microorganismos viables se encuentran entre los métodos más escogidos para la cuantificación de microorganismos (tanto en suspensión como asociados a células eucarióticas). Otras técnicas utilizadas con menor frecuencia son las mediciones espectrofotométicas, la citometría de flujo, el recuento microscópico de bacterias totales y la PCR cuantitativa (Comas-Riu y Vives-Rego, 2002; Pérez et al, 1998; Shoeb et al, 1991). Muchas de estas técnicas carecen de la objetividad necesaria (recuento microscópico), requieren equipos y/o insumos costosos (citometría de flujo, marcación radioactiva, PCR cuantitativa) o necesitan 24 h o más para arrojar un resultado (recuento de microorganismos viables). Los métodos basados en alguna actividad enzimática microbiana presentan una buena sensibilidad y especificidad, son de rápida ejecución y no requieren equipamiento sofisticado. Además permiten, en ciertos casos, la cuantificación de microorganismos específicos dentro de una muestra compleja (Bibiloni et al, 2000; Bibiloni et al, 2001).

En la búsqueda de un método de cuantificación de la adherencia que no tuviera los inconvenientes del recuento de microorganismos viables, ni las exigencias del empleo de radioisótopos se puso a punto una técnica colorimétrica enzimática, basada en la reacción producida por la enzima nitrato reductasa.

El nitrato sirve como aceptor terminal de electrones en la respiración anaeróbica llevada a cabo por una gran variedad de bacterias, que reducen el nitrato a nitrito. Entre los miembros de este grupo numeroso, que excluye, en lo que concierne a nuestro interés, a las bacterias ácido lácticas; se encuentran: las enterobacterias, *Bacillus, Staphylococcus, Haemophilus, Pseudomonas, Mycobacterium,* etc. Un número limitado de ellas pueden, además, reducir el nitrato a nitrógeno gaseoso, en una serie de procesos anaeróbicos respiratorios denominados desnitrificación.

Con el objetivo de detectar el NO^-_2 producido por los microooorganismos pueden emplearse distintos métodos. En la técnica diseñada por Conn, la reducción de nitrato a nitrito se manifiesta, cuando este último reacciona con el ácido sulfanílico y con la α-naftilamina produciendo un compuesto diazonio de color rosado: el p-sulfobenceno-azo-α-naftilamina (Conn, 1936). Los compuestos coloreados de diazonio se forman por la copulación mediante una ligadura azo de una amina aromática con una sustancia fenólica, generalmente en la posición de un grupo hidroxilo o amino. La modificación del método introducida por Mac Namara emplea como amina a la dicloro-N-naftiletilendiamina, otorgándole así mayor sensibilidad (Mac Namara et al, 1971).

En el presente trabajo se utilizó la técnica descripta por Mac Namara (Mac Namara et al, 1971). A fin de expresar al máximo la actividad nitrato reductasa en los microorganismos, se empleó una solución inductora conteniendo nitrato como sustrato de la enzima de interés, más formiato como sustrato de la enzima formiato deshidrogenasa estrechamente ligada a la anterior. Al realizar el crecimiento de las bacterias en las condiciones de respiración de nitrato, es decir en baja tensión de oxígeno, se afecta a la vez el uso del ciclo de los ácido tricarboxílicos. En consecuencia, los productos generados en la glucólisis: NADH y formiato (o sus precursores lactato y piruvato) ceden directamente sus electrones a la cadena transportadora sin intervención del ciclo de Krebs. Estos electrones reducirán finalmente al nitrato que actúa como último aceptor. La transferencia electrónica directa desde el NADH o el formiato a la cadena transportadora requiere de la activación de las deshidrogeneasas correspondientes (NADH deshidrogenasa y formiato deshidrogenasa); lo cual explica la relación existente entre las enzimas nitrato reductasa y formiato deshidrogenasa (Payne, 1973).

Metodología.

Cepas empleadas y condiciones de cultivo.

Las cepas de *Escherichia coli* CM1, *Bacillus cereus* 2 y *Bacillus cereus* M2 pertenecen a la colección de cultivos de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas (Universidad Nacional de La Plata). Las cepas de *Salmonella* y *Shigella* fueron cedidas gentilmente por el Dr. Horacio Lopardo del Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Buenos Aires. Asimismo se emplearon cepas provenientes del American Type Culture Collection (ATCC), a saber *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Los microorganismos fueron cultivados en caldo nutritivo (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) adicionado con nitrato de sodio (1 g/l). Los cultivos de *Escherichia coli*, *Salmonella arizonae*, *Shigella sonnei* y *Staphylococcus aureus* se realizaron en forma estática a 37°C durante 18 hs. Las cepas de *Bacillus cereus* se crecieron en caldo cerebro corazón (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) a 32°C con agitación durante 18 h. Para su utilización en los ensayos las bacterias fueron colectadas por centrifugación a 800 g durante 10 min y resuspendidas en PBS hasta alcanzar la absorbancia requerida.

Ensayo de nitrato reductasa.

La actividad nitrato reductasa se determinó mediante una reacción de diazotación del nitrito utilizando ácido sulfanílico y N-naftil-etilen-diamonio. Las bacterias fueron incubadas con una solución inductora de 5 partes de nitrato de sodio 1% (p/v) y 3 partes de formiato de sodio 1 M a 37°C durante diferentes intervalos de tiempo. Las muestras fueron posteriormente centrifugadas 1 minuto a 14000 g. Del sobrenadante se extrajo una alícuota (0.1 ml) que fue mezclada con volúmenes iguales de ácido sulfanílico 1 % (p/v) y de cloruro de N-naftil-etilen-diamonio 0.02 %, ambos preparados en HCl 1.5 M. La mezcla se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente para permitir el desarrollo del color y se leyó la absorbancia a 540 nm en un lector de placas (ELISA Plate Reader SLT Rainbow Reader, Wien, Austria).

Estudios cinéticos.

Diluciones seriadas de distintas suspensiones bacterianas se mezclaron con un volumen igual de la solución inductora doble concentración. Las muestras fueron luego incubadas a 37°C durante diferentes intervalos de tiempo. Posteriormente se centrifugaron y se determinó la concentración de nitrito tal como se indica más arriba. El

cálculo de la velocidad inicial de reacción, se efectuó mediante una regresión lineal utilizando los primeros puntos de cada curva.

Cultivo de enterocitos.

Se utilizaron enterocitos humanos (células Caco-2) obtenidos del Nestle Research Center (Lausanne, Suiza). Las células se cultivaron según el protocolo especificado en el capítulo 3. Para los ensayos de asociación bacteriana, las células fueron inoculadas en placas de 24 fosas (Iwaki Glass, Japan), utilizándose monocapas confluentes de 15 días.

Ensayos de asociación.

Las monocapas celulares previamente lavadas con buffer PBS fueron incubadas durante 1 h a 37ºC con las distintas suspensiones bacterianas conteniendo alrededor de 1 10^8 ufc/ml. Transcurrido el tiempo estipulado para la asociación entre las bacterias y los enterocitos, las monocapas fueron enjuagadas tres veces con PBS, para remover los gérmenes no adheridos. Con la finalidad de determinar la asociación bacteriana se añadió luego 0.25 ml de la solución inductora (nitrato-formiato) por fosa y se incubaron las placas durante 2 h a 37°C. Posteriormente se extrajo el volumen total de las muestras desde las fosas y se centrifugó a 14000 g durante 1 min. Una alícuota de 0.1 ml de cada sobrenadante fue transferido a una placa de 96 fosas y se procedió al revelado de la reacción tal como se especificara anteriormente. En el caso de altas concentraciones de nitrito las muestras se diluyeron en PBS antes de realizar la reacción de diazotación. Suspensiones bacterianas de concentración conocida fueron tratadas de la misma manera en presencia de células Caco-2 a fin de establecer las curvas de calibración. Los porcentajes de asociación se calcularon como 100 x Cs/Cr siendo Cs la concentración bacteriana de la muestra y Cr la concentración bacteriana patrón (ver la figura 4).

Por otra parte el porcentaje de asociación se determinó también mediante recuento de microorganismos viables. Para ello, luego de la coincubación entre las bacterias y los enterocitos, las monocapas fueron lisadas con agua destilada a 37°C durante 1 h. Diluciones apropiadas de las suspensiones bacterianas se sembraron en agar nutritivo. Los porcentajes de asociación se determinaron utilizando como 100%, la cantidad total de bacterias agregadas por fosa.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y el test de Tukey para las mínimas diferencias significativas (InfoStat, FCA, Univ. Nac. de Córdoba, Argentina).

Resultados y discusión.

La determinación colorimétrica de nitrito utilizando la técnica de Mc Namara (Mac Namara et al, 1971), presentó una alta sensibilidad ya que pudieron detectarse concentraciones de nitrito tan bajas como 0.58 mM con una elevada intensidad de color (figura 1). El límite de detección real de la técnica resultó aún menor, ya que las muestras debieron ser diluídas para poder determinar su absorbancia sin saturar el equipo. La linealidad entre la concentración de nitrito y la absorbancia se mantiene hasta concentraciones de 300 mM (figura 1).

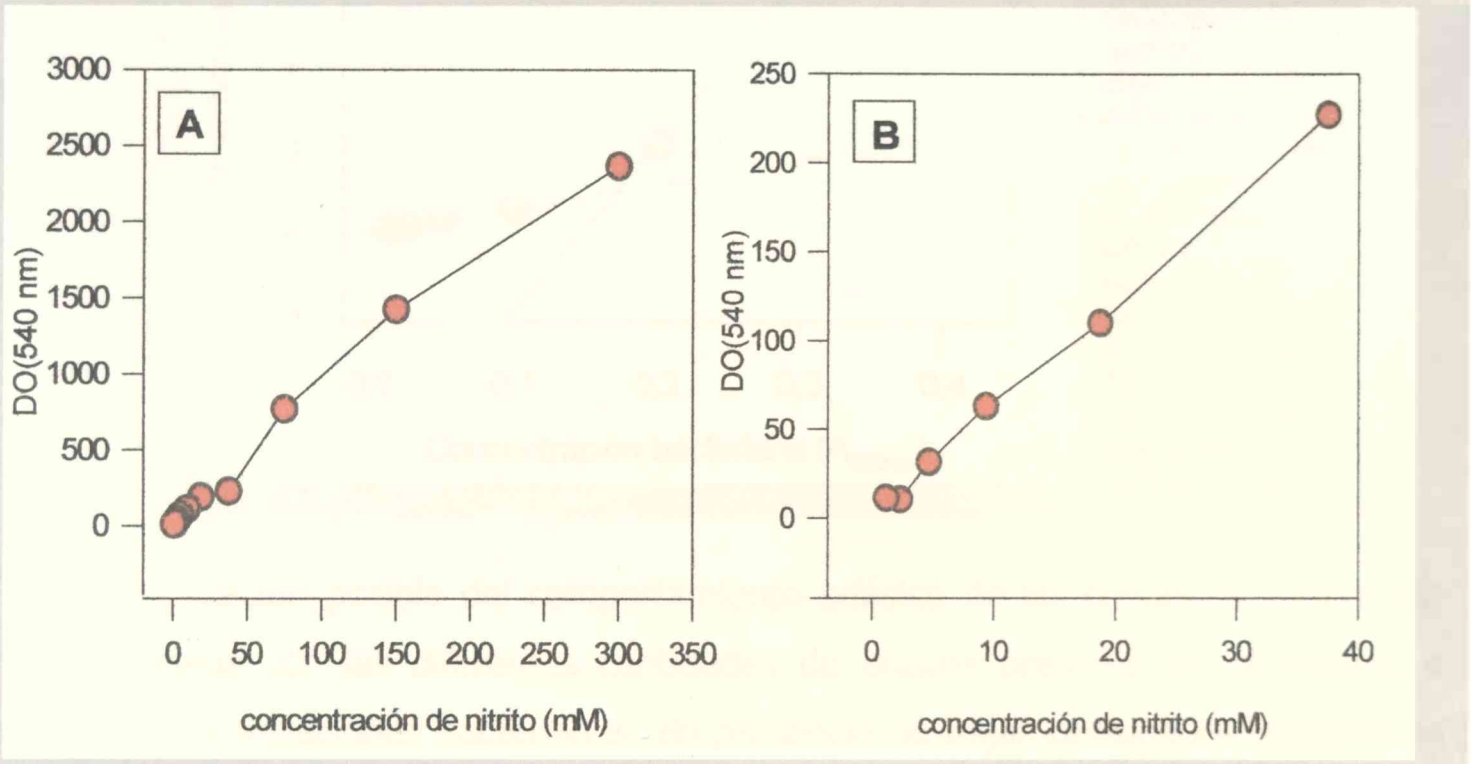


Figura 1. Sensibilidad de la determinación de nitrito mediante la técnica de Mc Namara. En la figura A se representa el rango completo de concentraciones de nitrito ensayadas. En la figura B se representa el rango de concentraciones encontrados en la realización de los ensayos. Debido a los altos valores de absorbancia encontrados, para realizar la lectura espectrofotométrica las muestras fueron diluídas 100 o 1000 veces.

La técnica mostró tener una sensibilidad apropiada para los fines de cuantificación de la asociación bacteriana, ya que en ensayos previos con concentraciones decrecientes de *E. coli* (desde 1 10^8 a 1 10^6 ufc/ml) se obtuvieron absorbancias que entraron en el rango de detección y linealidad del método.

Cuando se determinó colorimétricamente el nitrito producido por suspensiones bacterianas de diferentes concentraciones se registró un comportamiento bifásico (figura 2). Se observó en el caso de *E. coli* CM1 que existió un aumento significativo de la pendiente para suspensiones bacterianas con más de 0.1 unidades de absorbancia (A_{600}). De las distintas cepas ensayadas, solamente *Bacillus cereus* M_2, mostró una respuesta lineal.

Dado el carácter bifásico de la curva entre la concentración de nitrito y la concentración bacteriana en muchas cepas, no sería válido el cálculo de las concentraciones de las muestras asumiendo una relación lineal.

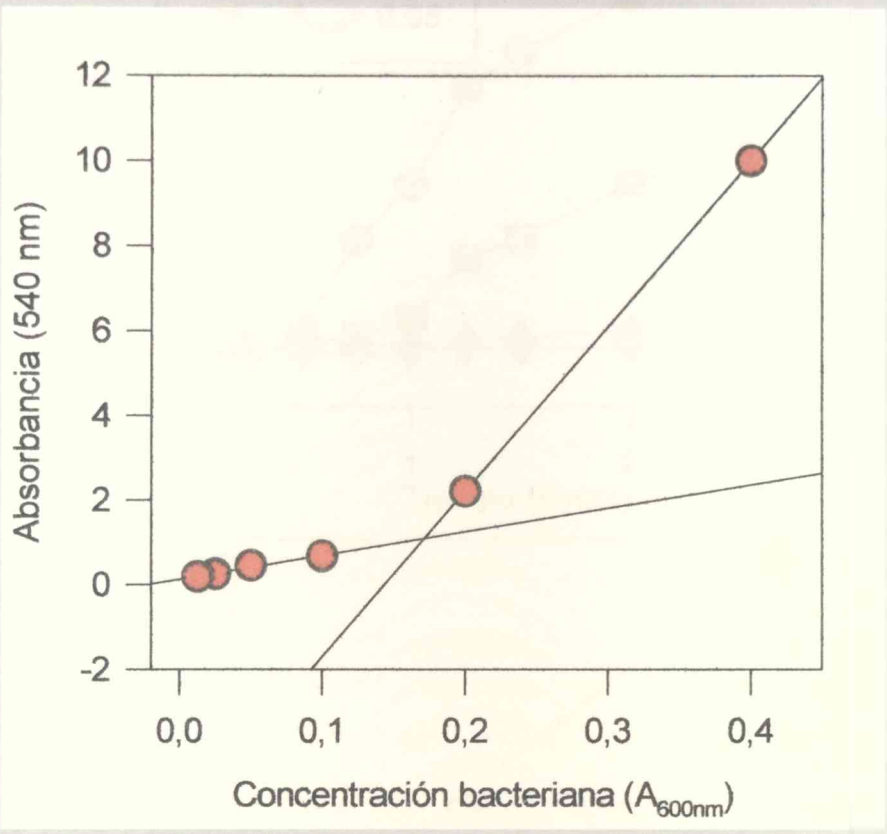


Figura 2. Relación entre la concentración bacteriana y el color desarrollado en la determinación colorimétrica de la actividad nitrato reductasa. La cepa empleada fue *E. coli* CM1. Los datos indicados pertenecen a un experimento representativo.

Una explicación posible del comportamiento bifásico de las curvas de calibración estaría relacionada con las diferentes cantidades de enzima presente en el sistema a bajas y altas concentraciones bacterianas. En presencia de bajas densidades bacterianas la concentración de enzima nitrato reductasa es menor. Es posible que al frenar la reacción en un tiempo determinado, la enzima no haya llegado a la saturación; encontrándose aún en la fase exponencial de la velocidad y no en la velocidad máxima.

Con el objetivo de determinar si la respuesta bifásica estaba relacionada con la cinética de reducción de nitrato, se realizaron determinaciones de nitrito a diferentes tiempos. En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos con *E. coli* ATCC 25922. Puede apreciarse que la absorbancia se incrementó con el tiempo y que existió una relación sigmoidea entre el tiempo y la intensidad de color, especialmente para las suspensiones bacterianas con más de 0.1 unidades de absorbancia (figura 3 A). La relación entre las velocidades iniciales de reacción y las concentraciones bacterianas se mantuvo lineal en un amplio rango de concentraciones (figura 3 B). Resultados similares fueron obtenidos con *E. coli* CM1 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En base a las observaciones realizadas podemos afirmar que es válida la lectura a un tiempo fijo y que las diferentes cantidades de enzima presentes según la concentración bacteriana no constituyen la causa de la respuesta bifásica.

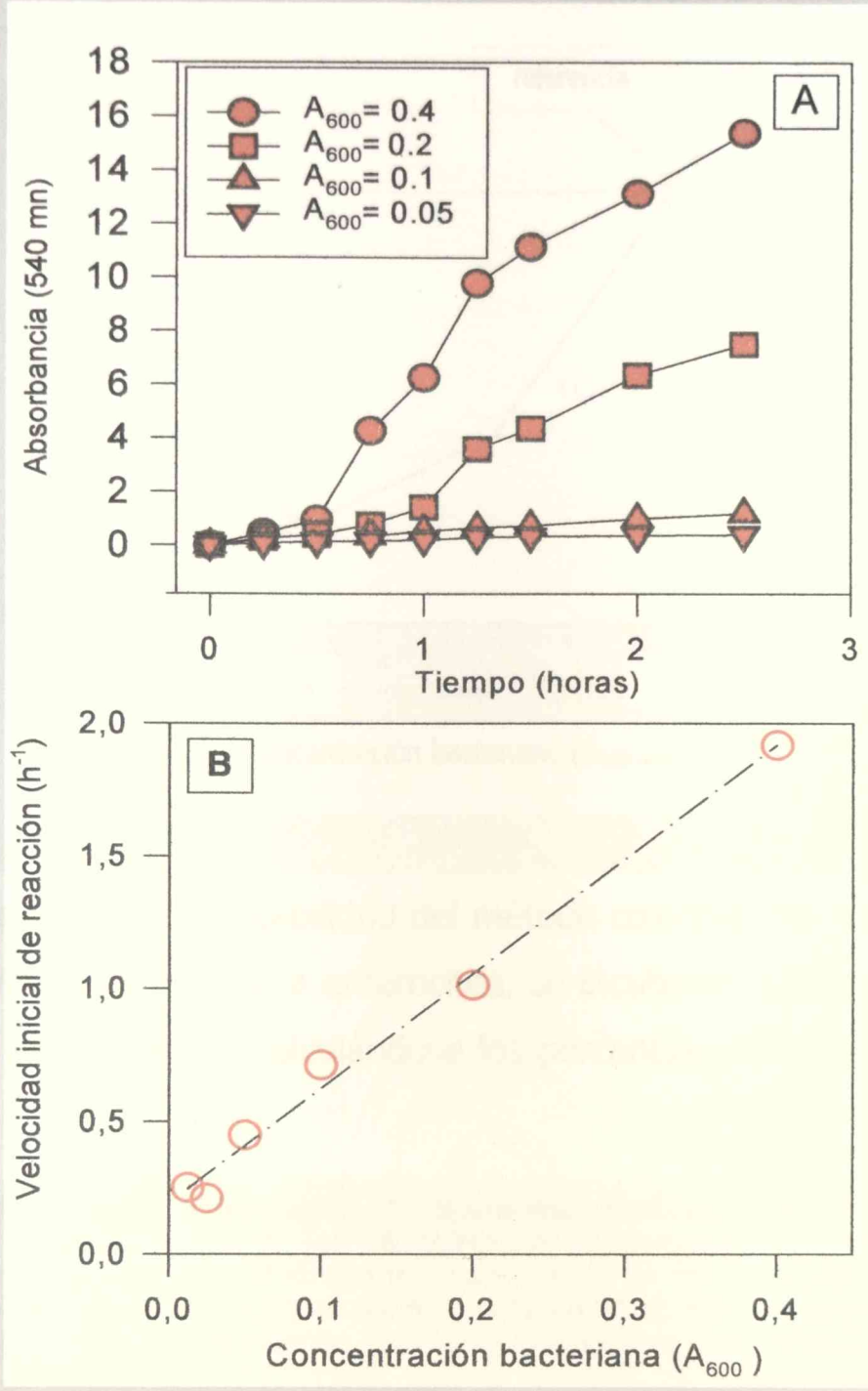


Figura 3. A) Cinética de la reducción de nitrato para diferentes concentraciones bacterianas. B) Velocidades iniciales de reacción para la actividad nitrato reductasa en función de distintas concentraciones bacterianas. La cepa empleada fue *E. coli* ATCC 25922. Las concentraciones bacterianas se expresaron como DO a 600 nm. Los datos indican los resultados de un experimento representativo. Resultados similares se obtuvieron por lo menos en 3 ensayos independientes.

Aunque se encontró una relación lineal entre las velocidades iniciales de reacción y las concentraciones bacterianas, el cálculo de las concentraciones bacterianas utilizando esta metodología constituye un método engorroso y lento. Es aconsejable por lo tanto asumir el carácter bifásico de las curvas de calibración y realizar el cálculo a partir de las relaciones entre las concentraciones bacterianas y la concentración de nitrito producida (figura 4).

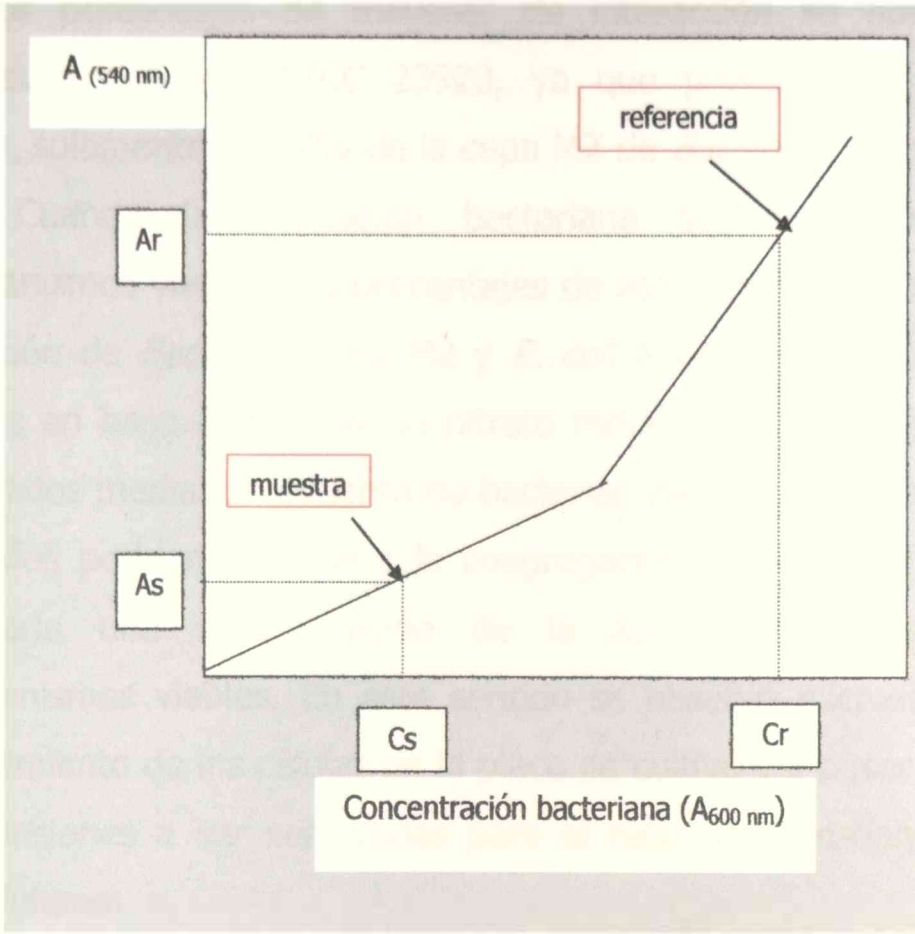


Figura 4. Esquema para el cálculo de las concentraciones bacterianas utilizando el método de nitrato reductasa. Referencias: Ar absorbancia a 540 nm para la suspensión bacteriana de referencia; As absorbancia a 540 nm para la muestra; Cr concentración bacteriana (A 600 nm) de la suspensión de referencia, Cs concentración bacteriana de la muestra.

A fin de evaluar la aplicabilidad del método colorimétrico en la cuantificación de la asociación de microorganismos a enterocitos, se incubaron suspensiones bacterianas con células Caco-2 diferenciadas, calculándose los porcentajes de asociación (Tabla 1) según se indica en la figura 4.

Tabla 1. Porcentajes de asociación de diferentes microorganismos a células Caco-2. Las incubaciones fueron de 1h a 37ºC. Los valores representan promedios ± desviación estándar de 2 a 4 determinaciones. Los asteriscos indican diferencias significativas en test t de Student (* p≤0.05 o **p≤0.01) entre tratamientos (cuantificación por recuento de viables o nitrato reductasa) para la misma cepa. Letras diferentes indican diferencias significativas (p≤0.05) entre cepas para el mismo tratamiento

Cepa	Porcentaje de asociación	
	Nitrato reductasa	Recuento de microorganismos viables
Escherichia coli CM1	4.61 ± 0.28 a	0.31 ± 0.08 a *
Escherichia coli ATCC 25922	1.56 ± 1.00 a	0.05 ± 0.02 a
Bacillus cereus 2	18.9 ± 3.8 b	1.2 ±.0.1 ab **
Bacillus cereus M2	0.7 ± 0.3 a	0.16 ± 0.03 a
Salmonella arizonae	9.6 ± 0.65 c	0.55 ± 0.09 a **
Shigella sonnei	4.96 ± 0.76 a	1.65 ± 0.27 ab
Staphylococcus aureus ATCC 25923	41.7 ± 7.1 d	4.36 ± 1.77 b **

Los porcentajes de mayores de interacción se obtuvieron para la cepa de *Staphylocuccus aureus* ATCC 23923, ya que presentó un 41.7% de asociación. En contraste, solamente el 0.7% de la cepa M2 de *Bacillus cereus* permaneció adherida a las células. Cuando la asociación bacteriana se cuantificó mediante recuento de microorganismos viables, los porcentajes de asociación variaron entre 0.05 y 4.36%. Con la excepción de *Bacillus cereus* M2 y *E. coli* ATCC 25922, los porcentajes de asociación calculados en base a la actividad nitrato reductasa fueron significativamente mayores a los calculados mediante recuento de bacterias viables. Las divergencias encontradas entre los métodos podrían deberse a la coagregación entre bacterias y restos celulares, que determinaría una subestimación de la asociación en el caso del recuento de microorganismos viables. En este sentido se observó microscópicamente que luego del desprendimiento de las células de la placa de cultivo y a pesar de la agitación vigorosa de las suspensiones a ser sembradas para el recuento, existían agregados de bacterias y restos celulares.

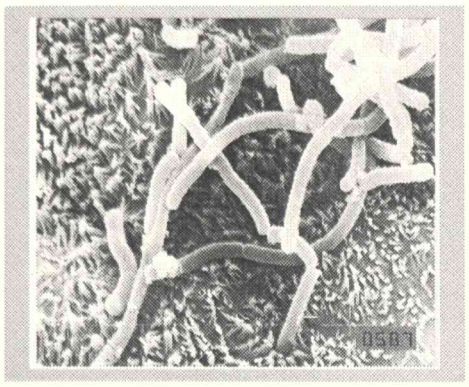
De acuerdo a resultados publicados (Shoeb et al 1991), existe para el ensayo colorimétrico de la actividad nitrato reductasa una relación lineal entre la concentración de nitrito y la concentración bacteriana. Este comportamiento permitiría un cálculo directo de la concentración bacteriana utilizando las relaciones entre las absorbancias de las muestras y las de suspensiones de concentración conocida. Sin embargo en el presente trabajo se demostró que para muchos microorganismos existe una relación bifásica entre la intensidad de color desarrollado en la reacción y la concentración bacteriana (figura 2). Cuando se presenta la mencionada curva bifásica las relaciones Cs/Cr y As/Ar son diferentes entre sí (figura 4). Por lo tanto, las muestras y las suspensiones de referencia se encuentran en zonas diferentes de la curva. Como consecuencia, la determinación del porcentaje de asociación deberá realizarse como 100 X Cs/Cr (figura 4).

El carácter bifásico de las curvas de calibración podría explicarse teniendo en cuenta el curso sigmoideo de la reacción de reducción del nitrato. Como se aprecia en la figura 3 A, a un tiempo fijo, las distancias entre las curvas dependen de la concentración bacteriana. Esta cinética de reacción podría deberse a la existencia de diferentes sistemas bacterianos para la reducción de nitrato (Bonnefoy y Demos, 1994; Conrado Moreno et al, 1999; Payne, 1973). Estos sistemas pueden coexistir en un mismo microorganismo y es posible que presenten diferentes actividades relativas según la concentración bacteriana.

Conclusiones

En conjunto los resultados demostraron que:

- La actividad nitrato reductasa bacteriana puede ser usada para determinar las concentraciones de microorganismos así como la asociación entre microorganismos y enterocitos.
- Algunas bacterias presentan una relación bifásica entre la concentración bacteriana y la intensidad de color que desarrollan en la reacción. Este fenómeno deberá tenerse en cuenta al momento de realizar los cálculos.



Apéndice

Medios de cultivo. Reactivos. Formulaciones

APÉNDICE

MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios fueron esterilizados en autoclave a 120ºC durante 15 minutos y los pH fueron ajustados antes de autoclavar.

Caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe, 1960).
Empleado para el cultivo de bacterias lácticas.

Tabla 1. Composición del medio MRS.

Componente	g/l
peptona universal	10
extracto de carne	5
extracto de levadura	5
D (+) glucosa	20
K_2HPO_4	2
tween 80	1
citrato ácido de amonio	2
acetato de sodio	5
$MgSO_4$	0.1
$MnSO_4$	0.05
pH	6.5 ± 0.2

Agar MRS.

Caldo MRS adicionado con agar en concentración final 12 g/l. pH = 6,5 ± 0.2.

Caldo TPY (triptone-peptone-yeast extract).
Empleado para el cultivo de bacterias lácticas.

Tabla 2. Composición del medio TPY.

Componente	g/l
triptona	10
peptona de soja	5
extracto de levadura	2.5
D (+) glucosa	5
K_2HPO_4	2
$CaCl_2$	0.15
$MgCl_2 .6H_2O$	0.5
$ZnSO_4.7H_2O$	0.25
Tween 80	1
pH	7 ± 0.2

Caldo Nutritivo.
Empleado para el cultivo de bacterias Gram negativas.

Tabla 3. Composición del medio nutritivo.

Componente	g/l
peptona de carne	5
extracto de carne	3
pH	7 ± 0.2

Agar Nutritivo

Caldo nutritivo adicionado con agar en concentración final 15 g/l. pH = 7 ± 0.2.

SOLUCIONES

Diluyente para recuentos

Solución fisiológica (NaCl al 0.85% p/v).

Buffer fosfato salino (PBS)

Utilizado para el lavado y resuspensión de las bacterias y células eucarióticas en cultivo.

Tabla 4. Composición del buffer PBS.

Componente	g/l
KH_2PO_4	0.144
NaCl	9.00
Na_2HPO_4	0.795
pH	7 ± 0.2

COLORANTES

Coloración de Gram.
Componentes:

Cristal violeta: 10 g/l en agua destilada (solución madre); solución de trabajo: 0.1% final.
Safranina: 25 g/l en etanol (solución madre); solución de trabajo: 0.1% final.
Lugol: 10 g I_2 + 20 g KI en 1 litro de agua destilada
Decolorante: etanol – acetona 4:1

Protocolo:

Reactivo	Tiempo de Exposición
Cristal violeta	120 seg
Lugol (2 veces)	30 seg
Lavar con agua	
Decolorante	10 seg
Lavar con agua	
Safranina	120 seg
Lavar con agua	

Los extendidos coloreados se observaron x 1000 aumentos con aceite de inmersión.

Electroforesis de proteínas.

Las composiciones de las soluciones empleadas para realizar las corridas electroforéticas desnaturalizantes fueron las siguientes:

- Solución de acrilamida-bisacrilamida (30.8%).

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0.8 g

- Buffer de corrida (5X).

Glicina	72 g
Tris base	15 g
SDS	5 g

Disolver en agua bidestilada, llevar a pH 8.3 con HCl 1N. El volumen final es de 1 litro. Llevar a 5 l para usar.

- Buffer del gel separador (4X).

Tris base	18.2 g
SDS	0.6 g
TEMED	0.6 ml

Disolver en agua bidestilada, llevar a pH 8.8 con HCl 1N. El volumen final es de 0.1 l.

- Buffer del gel apilador (4X).

Tris base	6 g
SDS	0.2 g
TEMED	0.2 ml

Disolver en agua bidestilada, llevar a pH 6.8 con HCl 1N. El volumen final es de 0.1 l.

- Buffer de muestra (4X).

Buffer stacking	4 ml
Sacarosa	20 %
Azul de bromofenol	0.2 mg
β-mercaptoetanol	5 %

- Persulfato de amonio 12 mg/ml

Conservar congelado a – 20ºC.

- Colorante

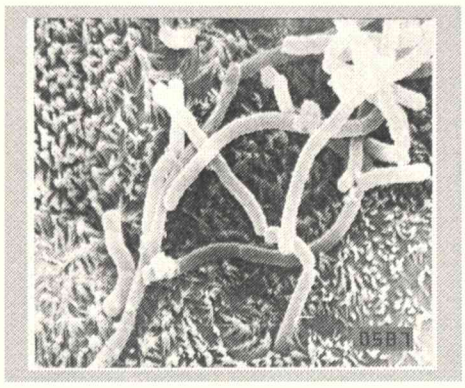
Coomasie R	1.92 g
Metanol	400 ml
Ácido acético	160 ml
Agua bidestilada	400 ml

- Decolorante

Etanol	250 ml
Ácido acético	100 ml
Agua destilada	650 ml

- Marcadores de peso molecular

Se utilizó un kit de calibración de bajo peso molecular (Pharmacia, LKB Biotechnology Inc., Piscotawog, NJ) compuesto por las siguientes proteínas: fosoforilasa b (94 kDa), seroalbúmina bovina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina de soja (20.1 kDa) y α-lactoalbúmina (14.4 kDa).



Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas.

1) Abbas, A.K; Lichtman, A.H y Pober, J.S. 2002. Inmunología celular y molecular. 4ta ed. Mc Graw-Hill. Interamericana. Madrid. España.

2) Abe, H.; Tatsuno, I.; Tobe, T.; Okutani, A. y Sasakawa, C. 2002. Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infec. Immun. 70: 3500-3509.

3) Aiba, Y.; Suzuki, N.; Kabir, A.M.; Takagi, A y Koga, Y. 1998. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of Lactobacillus salivarius as probiotic in a gnotobiotic murine model. Am. J. Gastroenterol.93: 2097-2101.

4) Alakomi, H.L.; Skytta, E.; Saarela, M.; Mattila-Sandholm, T.; Latva-Kala, K y Helander, I.M. 2000. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. Appl.Environ.Microbiol. 66 (5):2001-2005.

5) Alm, L. 1982. Effect of fermentation on lactose, glucose and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose-deficient individuals. J. Dairy Sci. 65: 346-52.

6) Álvarez,S.; Herrero,C.; Bru,E. y Perdigón,G. 2001.Effect of *Lactobacillus casei* and yogurt administration on prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection in young mice. J.Food.Protect. 64:1768-1774.

7) Ashara,T.; Shimizu,K.; Nomoto,K.; Hamabata,T.; Ozawa,A. y Takeda,Y. 2004. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Infect. Immun. 72(4):2240-47.

8) Aso,Y.; Akazan,H.; Kotake,T.; Tsukamoto,T. y Imai,K. 1995. preventive effect of *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial blader cancer in a double-blind trial. Eur.Urol. 27:104-109.

9) Axelsson,L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. Salminen,S. y Von Wright eds. 2nd ed. New York. Marcel Dekker Inc.

10) Ayabe,T.; Satchell,D.P.; Wilson,C.L.; Parks,W.C.; Selsted,M.E y Ouellette, A.J. 2000. Secretion of microbicidal α-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. Nature.1(2):113-118.

11) Ballongue,J.; Schumann C. y Quignon P. 1997. Effect of lactulose and lactitol on colonic microflora and enzymatic activity. Scand.J.Gastroenterol.Suppl.222:41-44.

12) Beal,C y Corrieu,G. 1994. Viability and acidification activity of pure and mixed starter of *S. thermophilus* 404 and *L. bulgaricus* 398 at different steps of their production. Lebensm.Wiss.Technol. 27:86-92.

13) Bergmaier, D.; Champagne, C. P. y Lacroix C. 1995. Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cells chemmostat cultures of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. J.Appl. Microbiol. 98(2).272-284.

14) Bernet,M.F.; Brassart,D.; Neeser,J.R. y Servin,A. 1993. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. Appl.Environ.Microbiol. 59 (12):4121-4128.

15) Bernet-Camard, M.F.; Lievin,V.; Brassart,D.; Neeser,J.R.; Servin,A.L y Hudault,S. 1997. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacterocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. Appl. Environ. Microbiol. 63:2747-53.

16) Beutin, L.; Geier, D.; Zimmermann, S.; Aleskic, S.; Gillespie, H.A. y Whittam, T.S. 1997. Epidemiological reltedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. App.Environ.Microbiol. 63: 2175-2180.

17) Bibiloni, R.; Pérez, P.F. y De Antoni, G.L. 1999. Will a high adhering capacity in a probiotic strain guarantee exclusion of pathogens from intestinal epithelia?. Anaerobe. 5:519-524.

18) Bibiloni, R.; Pérez, P.F. y De Antoni, G.L. 2000. An enzymatic-colorimetric assay for the quantificaton of *Bifidobacterium*. J.Food Prot. 63(3):322-326.

19) Bibiloni, R.; Gómez Zavaglia, A y De Antoni, G.L. 2001. Enzyme-based most probable number method for enumeration of *Bifidobacterium* in dairy products. J.Food Prot.64:2001-2006.

20) Bina, J.E.; Provenzano, D.; Wang, C.; Bina, X.R. y Mekalanos, J.J. 2006. Characterization of the *Vibrio cholerae* vex AB y vex CD efflux systems. Arch. Microbiol. 186(3):171-181.

21) Blaser,M.J.; Smith,P.D.; Ravdin,J.I.; Greenberg,H.B. y Guerrant,R.L (editors). 1995. Infections of the gastrointestinal tract. Raven Press. New York. USA.

22) Boiso, I. 2001. Principios básicos de criobiología. Revista Iberoamericana de Fertilidad. 18(4):20-22.

23) Bonnefoy, V y Demos, J.A. 1994. Nitrate reductases in *Escherichia coli*. Antonie van Leeuwenhoek 66: 47-56.

24) Borruel,N.; Casellas,F.; Antolin,M.; Llopis,M.; Carol,M.; Espiin,E.; Naval,J.; Guarner,F y Malagelada, J.R. 2003. Effects of nonpathogenic bacteria on cytokine secretion by human intestinal mucosa. Am.J.Gastroenterol.98:865-70.

25) Bos,J.L. (1989). Ras oncogenes in human cancer, a review. Cancer Research. 49:4682-4689.

26) Bradford, M. 1976. A rapid and sentitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem. 72: 248.

27) Bruce, A.W. y Reid, G. 1988. Intravaginal instillation of lactobacilli for prevention of recurrent urinary tract infections. Can.J.Microbiol. 34, 339-343.

28) Callaway TR, Elder RO, Keen JE, Anderson RC y Nisbet DJ. 2004. Forage feeding to reduce preharvest *Escherichia coli* populations in cattle, a review. J Dairy Sci. Jun; 87(6):1579.

29) Calmels,S.; Ohshima, H.; Henry, Y. y Bartsch,H. 1996. Characterization of bacterial cytochrome cd(1)-nitrite reductase as one enzyme responsible for catalysis of nitrosation of secondary amines. Carcinogenesis. 17:533-536.

30) Calmels,S.; Ohshima, H.; Vicent,P.;Gounot,A.M. y Bartsch,H. 1985. Screening for microorganisms for nitrosation catalysis at pH 7 and kinetics studies on nitrosamine formation from secondary amines by *E.coli* strains. Carcinogenesis 6: 911-915.

31) Candela,M.; Seibold,G.; Vitali,B.; Lachenmaier,S.; Eikmanns,B.J. y Brigidi,P.2005. Real-time PCR quantificaton of bacterial adhesion to Caco-2 cells: competition between bifidobateria and enteropathogens. Res. Microbiol. 156:887-885.

32) Capurso,G.; Marignani, M y Fave, G.D. 2006. Probiotics and incidence of colorectal cancer: when evidence is not evident. Dig. Liver Dis. 38(2):277-82.

33) Chen,C.C.; Louie,S.; Shi,H.N. y Walker,W.A. 2005. Preinoculation with the probiotic *Lactobacillus acidophilus* early in life inhibits murine *Citrobacter rodentium* colitis. Pediatr. Res. 58 (6):1185-1191.

34) Clescerl,L.S.; Greenberg,A.E.; Eaton,A.D (Eds). 1999. Standard methods for examination of water and wastewate, 20th ed. American Public Health Association, New York, p 1325.

35) CNSAP (Comité de Nefrología de la Sociedad Argentina de Pediatría).1995. Incidencia del síndrome urémico hemolítico (SUH) en la República Argentina. Arch.Arg.Pediatr.93: 409-411.

36) Coconnier,M.H.; Lievin,V.; Hemery,E y Servin, A.L. 1998. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4573-80.

37) Coconnier,M.H.; Liévin,V.; Lorrot,M y Servin,A. 2000. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against intracellular *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* infecting human enterocyte-like Caco-2/TC7 cells. Appl. Environ. Microbiol. 66(3):1152-1157.

38) Cogan,T.M.; Barbosa,M.; Beuvier,E.; Bianchi-Salvadori,B.; Cocconcelli,P.S.; Fernándes,I.; Gómez,J.; Gómez,R.; Kalatzopoulus,G., Ledda,A.; Medina,M.; Rea,M.C. y Rodríguez,E. 1997. Characterization of the lactic bacteria in artisanal dairy products. J. Dairy Res. 64:409-421.

39) Comas-Riu, J y Vives-Rego, J. 2002. Cytometric monitoring of growth, sporogenesis and spore cell sorting in *Paenibacillus polymyxa* (formerly). J. Appl. Bacteriol. 92: 475-481.

40) ConejoGarcía,J.R.;Krause,A.; Schulz,S.;RodríguezJiménez,F.J.;Klüver,E.;Aderman, K.;Forssmann,U.;Frompong-Boateng, A.;Bals,R. y Forssmann,W.G. 2001. Human β-defensin 4: a novel inducible peptide with specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. FASEB J. 15:1819-21.

41) Conrado Moreno,V.;Cabello,P.;Martínez-Luque,M.; Blasco,R. y Castillo,F. (1999). Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and finctional distiction among bacterial nitrate reductases. J. Bacteriol. 181 (21):6573-84.

42) Crane,J.K.; McNamara, B.P. y Donnenberg, M.S. 2001. Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. Cell Microbiol.3:197-211.

43) Cruchet,S.; Obregon,M.C.; Salazar,G.; Diaz,E. y Gotteland,M. 2003. Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* LA1 on *Helicobacter pylori* colonization in children. Nutrition. 19:709-710.

44) Dahan,S.; Dalmasso, G.; Imbert,V.; Peyron,J.F.; Rampal,P. y Czerucka,D. 2003. *Saccharomyces boulardii* interferes with enterohemorrhagic *Escherichia coli* – induced signalling pathways in T84 cells. Infect.Immun.71:766-773.

45) Dalmasso, G.; Loubat, A.; Dahan,S.; Calle,G.; Rampal,P. y Czerucka,D. 2006. *Saccharomyces boulardii* prevents TNF-α-induced apoptosis in EHEC-infected T84 cells. Res. Microbiol. 157:456-465.

46) De Angelis,M.; Siragusa,S.; Berloco,M.; Caputo,L.; Settanni,L.; Alfonso,G.; Amerio,M.; Grandi,A. Ragni,A. y Gobbetti,M. 2006. Selection of potencial probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. Res. Microbiol. 157:792-801.

47) De Urraza, P.J. 1997. Obtención de bacterias lácticas para cultivos starters: aislamiento, caracterización y conservación. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

48) de Vries, W. y Stouthamer, A.H. 1967. Pathway of glucosa fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. J. Bacteriol. 93(2):574-76.

49) De Waard, R.; Garssen,J.; Bokken,G.C y Vos,J.G. 2002. Antagonistic activity of *Lactobacillus casei* strain shirota against *Listeria monocytogenes* infection in rats. Int.J.Food. Microbiol. 73: 93-100.

50) Deeth, H.C. y Tiamine, A.Y. 1981. Yogurt, nutritive and therapeutic aspects. J. Food Prot. 44: 78-86.

51) Deng,W.; Puente,J.L.; Gruenheid,S.; Li,Y.;Vallance,B.;Vázquez,A.;Barba,J.; Ibarra,A.J.; O´Donnell,P.; Metalnikov,P.; Ashman,K.; Lee,S.; Goode,D.; Pawson,T. y Finlay,B.B. 2004. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. PNAS. 101(10): 3597-3602.

52) Derjaguin,B.V y Landau,L. 1941. Theory of the stability of strongly charged lyophobic soils and of the adhesion strongly charged particles in solutions of electrolytes. Acta Physicochim. (URSS). 14: 633-662.

53) Duncan, S.; Louis,P. y Flint,H.J. 2004. Lactate-utilizing bacteria isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. Appl.Environ.Microbiol. 70:5810-5817.

54) Dunne,C.; Murphy,L.; Flynn,S.; Mahony,L.; O'Halloran,S.; Feeney,M.; Morrissey,D.; Thorton, G.; Fitzgerald, G.; Daly, C.; Kiely,B.; Quigley, E.M.M.; O'Sullivan,G.C.; Shanahan, F. y Collins,K. 1999. Probiotics: from myth to reality. Demostration of functionality in animals models of disease and human clinical trials. Antonie van Leeuwenhoek. 76:279-92.

55) FAO/WHO. 2001. Food and Agricultural Organization y World Health Organization Expert Consultation on Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Available from: http://www.fao.org/es/esn/food/foodandfood_probio_en.stm.

56) Felgentreff,K.; Beisswenger,C.; Griese,M.; Gulder,T.; Brigman,G. y Bals,R. 2006. The antimicrobial peptide cathelicidin interacts with airway mucus. Peptides. 27:3100-3106.

57) Felley, C.P.; Corthesy-Theulaz,I.; Rivero,J.L.; Sipponen, P.; Pfeifer,A., Blum,A.L. y Michetti,P. 2001. Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man. Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.13:25-29.

58) Femia, A.P.; Luceri, C.; Dolara,P.; Giannini, A.; Biggeri, A.; Salvadori,M.; Clune, Y.; Collins, K.; Paglierani, M y Caderni,G. 2002. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. Carcinogenesis. 23(11): 1953-60.

59) Fernandes, C.F.; Shahani, K.M. y Amer, M.A. 1987. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented diary products. FEMS Microbiol. Rev. 46: 343-56.

60) Fernández, M.F.; Boris, S y Barbes, C. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. J.Appl.Microbiol. 94:449-455.

61) Filho-Lima, J.; Vieira,E y Nicoli,J. 2000. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus, Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp *typhimurium* in gnotobiotic mice. J. Appl. Microbiol. 88:365-70.

62) Fitzhenry,R.J.; Pickard,D.J; Hartland,E.L.; Reece,S.; Dougan,G.; Phillips,A.D. y Frankel,G. 2002. Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Gut.50.180-185.

63) Fogh, J.; Fogh, J.M. y Orfeo, T. 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cells lines producing tumors in nude mice. J.Natl.Cancer.Inst. 59:221-26.

64) Foligne,B.; Zoumpopoulou,G.; Dewulf,J.; Younes,A.B.; Chareyre,F.; Sirard,J.C.; Pot,B.; Grangette,C. 2007. A key role of dendritic cells in probiotic functionality. PLoS ONE. Mar 21;2:e313.

65) Foster,D.B.; Abul-Milh, M.; Huesca, M. y Lingwood, C.A. 2000. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* induces apoptosis which augments bacterial binding and phosphatidylethanolamine exposure on plasma membrane outer leaflet. Infect.Immun. 68:3108-3115.

66) Friend,B.A. y Shahani,K.M. (1984). Nutritional and therapeutic aspects of lactobacilli. J.Appl.Nutr.36: 125-133.

67) Fujiwara,S; Hashiba, H.; Hirota,T y Forstner,J.F. 1997. Proteinaceous factor(s) in culture supernatants fluids of bifidobacteria which preventes the binding of enterotoxigenic *Escehrichia coli* to gangliotetraosylceramide. Appl. Environ. Microbiol. 63:506-512.

68) Fukushima, M y Nakano, M. 1996. Effects of a mixtures organisms *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats on a fat- and cholesterol-enriched diet. Br.J.Nutr. 76:857-67.

69) Gallaher, D.D. y Khil,J. 1999. The effects of synbiotics on colon carcinogenesis in rats. J.Nutr.129 (7Suppl):1483S-7S.

70) Garmendia,J.; Frankel,G. y Crepin,V.F. 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, traslocation. Infect. Immun. 73(5):2573-2585.

71) Garrote,G.L.; Delfederico,L.; Bibiloni,R.; Abraham,A.G.; Pérez,P.F.; Semorile,L. y De Antoni,G.L. 2004. Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins. J. Dairy Res. 71:222-230.

72) Gazeau, C y Dereuddre, J. 1986. Effets des substances cryoprotectrices au niveau cellulaire. Bull. Soc. Bot. Fr. 3:41-64.

73) Gill,H.S.; Shu,Q.; Lin,H.; Rutherfurd, K.J. y Cross,M.L. 2001. Protection against translocating *Salmonella typhimurium* infection in mice by feeding the immuno-enhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. Med. Microbiol. Immunol. 190: 97-104.

74) Goldin, B. R. (1986). In situ bacterial metabolism and colon mutagens. Ann. Rev. Microbiol. 40, 367-393.

75) Goldin, B.R y Gorbach, S.L. 1984. The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. Am.J.Clin.Nutr. 39:756-61.

76) Goldin, B.R.; Gualtieri,L. y Moore, R.P. 1996. The effect of *Lactobacillus* GG on the initiation and promotion of dimethylhydrazine-induced intestinal tumors in the rat. Nutr. Cancer. 25:197-204.

77) Gómez Zavaglia, A.; Disalvo,E.A. y De Antoni, G.L. 2000. Fatty acid composition and freeze-thaw resistance in lactobacilli. J. Dairy Res.67:241-247.

78) Gómez Zavaglia, A.; Kociubinski,G.; Pérez,P.F. y De Antoni,G.L. 1998. Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. J.Food Prot. 61(7):865-873.

79) González,P.J.; Correia,C.; Moura,I.; Brondino,C.D. y Moura,J.J.G. 2006. Bacterial nitrate reductases: molecular and biological aspects of nitrate reduction. J. Inorganic Biochem. 100: 1015-1023.

80) Granato,D.; Perotti,F.; Masserey,I.; Rouvet,M.; Golliard,M.; Servin,A. y Brassart, D. 1999. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* LA1 to human enterocyte-like cells Caco-2. Appl.Environ.Microbiol.65:1071-1077.

81) Grönroos,J.O.; Laine,V,J.O.; Janssen,M,W.; Egmond,M.R. y Nevalainen,T.J. Bacterial properties of group IIA and group V phospholipases A2. J.Immunol. 166:4029-4034.

82) Guarino,A.; Canani,R.B.; Spagnuolo,M.I.; Albano,F y Di Benedetto,L. 1997. Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and viral excretion in children with mild diarrea. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.25:516-19.

83) Guerin-Danan,C.; Meslin,J.C.; Chambard,A.; Charpilienne, A.; Relano,P.; Bouley,C.; Cohen, J y Andrieux, C. 2001. Food supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* DN-114 001 protects suckling rats from rotavirus associated diarrhea. J.Nutr. 131:111-117.

84) Gunzer,F; Henning-Pauka,I; Waldmann, K.H; Sandhoff, R; Grone, H.J; Kreipe, H.H; Matussek, A. y Mengel M. 2002. Gnotobiotic piglets develop thrombotic microangiopathy after infection with enterohemorrhagic *Escherichia coli* Am.J.Clin.Pathol. 118(3): 364-75.

85) Gusils,C.; Cuozzo,S.; Sesma,F. y González,S. 2002. Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken. Can.J.Microbiol. 48:34-42.

86) Hague,A.; Elder,D.J.E.; Hicks,D.J. y Pareskeva,C. 1995. Apoptosis in colorectal tumour cells: induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate. Int.J.Cancer. 60:400-6.

87) Hammes, W.P. y Vogel, R.F. 1995. The genus *Lactobacillus*. En: The Lactic Acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Vol 2. Wood,B.J.B y Holzapfel, W.H. eds. Blackie Academic. London. Pág: 19-54.

88) Hammes, W.P.; Weiss, N. y Holzapfel, W. 1991. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. En: The Prokaryotes. Vol 2. Balows, H.G.; Trüper, M.; Dworkin, M.; Harder, W. y Schleifer, K.H. eds. Springer-Verlag. New York. Pág. 1535-94.

89) Harder,J.; Bartels,J.; Christophers,E. y Schröder,J.M. 2001. Isolation and characterization of human β-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. J. Biol. Chem. 276(8):5707-5713.

90) Harwig,S.S.L.; Chen,N.P.; Park.A.S.K y Lehrer,R.I. 1993. Purification of cysteine-rich bioactive peptides from leukocytes by continuous acid-urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 208:382-386.

91) Heczko,P.B.; Strus,M y Kochan,P. 2006. Critical evaluation of probiotic activity of lactic acid bacteria and their effects. J. Phys. Pharm. 57(9): 5-12.

92) Heinzel,F.P; Sadick,M.D; Holaday,B.T; Coffman,R.L y Locksley,R.M. 1989. Reciprocal expression of interferon γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. J.Exp.Med.169:59-72.

93) Hierro, N.; Esteve-Zarzoso, B.; González, A.; Mas, A. y Guillamon, J.M. 2006. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription QPCR for detection and enumeration of total yeast in wine. Appl.Environ.Microbiol. 72(11):7148-55.

94) Higashio,K.; Yoshioka,Y. y Kikuchi,T. 1977. Isolation and identification of a growth factor of *S. thermophilus* produced by *L. bulgaricus*. J.Agric.Chem.Soc.Jpn. 51:209-215.

95) Hilton,E.; Kolakwoski,P.; Singer,C.; Smith,M. 1997. Efficacy of *Lactobacillus* GG as a diarrheal retentive in travellers. J.Travel.Med. 4:41-43.

96) Hilton,E.; Rindos,P. e Isenberg,H.D. 1995. *Lactobacillus* GG vaginal suppositories and vaginitis. J.Clin. Microbiol. 33:1433-1436.

97) Hiramatsu, K; Murakami, J; Kishi, K; Hirata, N; Yamasaki, T; Kadota, J; Shibata,T y Nasu, M. 2003. Treatment with rokitamycin suppresses the lethality in a murine model of *Escherichia coli* O157:H7 infection. Int. J. Antimicrob. Agent. 21:471-77.

98) Hirano,J.; Yoshida,T.; Sugiyama,T.; Koide,N.; Mori,I. y Yokochi,T.2003. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. Microbiol.Immunol. 47(6):405-409.

99) Hoops,H.; Bernheim,B.C.; Nisalak,A.; Tjio,J.H y Smadel,J.E. 1963. Biologic characteristics of a continuos cell line derived from the African green monkey. J.Immunol.91: 416-24.

100) Hoover,D.M.; Chertov,O. y Lubkowski,J. 2001. The structure of human β-defensin-1. J.Biol. Chem. 276(42):39021-39026.

101) Hull, R.R.; Roberts, A.V. y Mayes, J.J. 1984. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt. Aust. J. Dairy Technol. 39:164-66.

102) Hung Y.C.; Huang, G.S.; Lin, L.W.; Hong, M.Y. y Se, P.S. 2007. Thea sinensis melanin prevents cisplatin-induced neprhotoxicity in mice. Food Chem. Toxicol. (in press).

103) Hung, D.T.; Zhu, J.; Sturtevant, D. y Mekalanos, J.J. 2006. Bile acids stimulates biofilm formation in *Vibrio cholerae*. Mol.Microbiol. 59(1):193-201.

104) Ibnou-Zekri,N.; Blum,S.; Schiffrin,E.J y Von Der Weid,T. 2003. Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that displays similar properties *in vitro*. Infect.Immun.71: 428-36.

105) Iwana, H.; Masuda, H.; Fujisawa, T.; Suzuki,H y Mitsuoka, T. 1993. Isolation and identification of *Bifidobacterium* spp. in comercial yogurt sold in Europe. Bifidobacteria Microflora. 12:39-45.

106) Jiang, T.; Mustapham, A y Savaiano, D.A. 1996. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium* longum. J.Diary.Sci. 79:750-57.

107) Juarez Tomas, M.S.; Wiese, B. y Nader-Macias, M.E. 2005. Effect of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294. J.Appl. Microbiol.99(6):1383-91.

108) Karmali, M.A; Petric, M.; Lim, C.; Fleming, P.C. y Steele, B.T.; 1983 b. *Escherichia coli* cytotoxin, haemolityc uremic syndrome and haemorrhagic colitis. Lancet ii.1299-1300.

109) Karmali, M.A; Steele, B.T.; Petric, M y Lim, C. 1983 a. Sporadic cases of haemolityc uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin producing *Escherichia coli* in stools. Lancet i:619-20.

110) Kenny,B. 2002. Mechanism of action of EPEC type III effector molecules. Int.J.Med.Microbiol. 291 (6-7),469-77.

111) Khan, S.H. y Ansari, F.A. 2007. Probiotics: the friendly bacteria with market potencial in global market. Pak.J.Pharm.Sci. 20(1): 76-82.

112) Kilara, A y Shahani, K.M. 1975. Lactasa activity of cultured and acidified dairy products. J. Diary. Sci. 59:2031-35.

113) Klaenhammer, T.R y Kullen, M.J. 1999. Selection and design of probiotics. Int.J.Food Microbiol. 50:45-57.

114) Klaver, F.A.M. y Van der Meer, R. 1993. The assumed assimilation of colesterol by Lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-decojugating activity. Appl.Environ.Microbiol. 59: 1120-24.

115) Klebanoff,S.J.; Hillier,S.L.; Eschenbach,D.A. y Waltersdorph,A.M. 1991. Control of the microbial flora of the vagina by H_2O_2- generating lactobacilli. J.Infect.Dis. 164:94-100.

116) Kmet,V y Lucchini,F. 1997. Aggregation-promoting factor in human vaginal *Lactobacillus* strains. FEMS Immunol.Med.Microbiol. 19(2):111-114.

117) Knutton, S; Baldwin, T; Williams, P.H. y McNeish, A.S. 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemoorrhagic *Escherichia coli*. Infect.Immun. 57:1290-1298.

118) Kociubinski,G.; Pérez,P.F.; Añón,M.C. y De Antoni,G.L. 1996. A method of screening of higly inhibitory lactic acid bacteria. J. Food Prot. 59:739-45.

119) Kociubinski,G.; Pérez,P.F. y De Antoni,G.L. 1999. Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. J.Food Prot. 62(8): 905-912.

120) Kodicek, E. 1963. Aspects of the constitution of bacterial membranes. Rec.Prog. Microbiol. 8:23-37.

121) Konowalchuk,J.; Speirs, J.L.; y Stavric,S. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 18:775-779.

122) Koop-Hooligan,L. 2001. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. J.Am.Diet.Assoc. 101: 229-238.

123) Kumar, V.; Cotran, R.S. y Robbins, S. 2003. Patología humana. 7ª edición. Elsevier. Madrid. España.

124) Kurioka, T; Yunou, Y. y Kita, E. 1998. Enhacement of suceptibility to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by protein calorie malnutrition in mice. Infect. Immun.66:1726-34.

125) Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.Nature. 277:680-685.

126) Lankaputhra,W.E.V. y Shah, N.P. 1997. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. Mut.Res. 397:169-182.

127) Law, D. 2000. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E.coli*. J. Appl. Microbiol. 88, 729-745.

128) Leavitt, J.; Barret,J.C.; Crawford, B.D y Tso, P.O.P. 1978. Butyric acid suppression on the in vitro neoplastic state of Syrian hamster cells. Nature. 271:262.

129) Lee, Y.K.; Nomoto, K.; Salminen, S. y Gorbach, S.L. 1999. Handbook of Probiotics. New York, NY: John Wiley & Sons.

130) Lee, Y.K.; Yu,W.K. y Heo, T.R. 2003. Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species isolated from healthy infant faeces. Int.J. Antimicrob. Agents. 21:340-46.

131) Lee,Y.K.; Puong,K.Y.; Ouwehand,A.C y Salminen,S. 2003. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. J. Med. Microbiol. 52:925-930.

132) Lehninger,A.L; Nelson,D.L. y Cox, M.M. 2001. Principios de Bioquímica. 3ª ed. Omega. Madrid. España.

133) Lehrer, R. y Ganz, T. 2002. Defensins of vertebrate animals. Curr. Opin. Immunol.14:96-102.

134) Leopold, C.S. y Eileler, D. 2000. Basic coating polymer for the colon specific drug delivery in inflammatory bowel disease. Drug Dev.Ind.Pharm. 26:1239-46.

135) Levin, M; Walters, M.D.S y Barrat, T.M. 1989. Hemolytic uremic syndrome. Adv. Pediatr. Infect. Dis. 4:51-82.

136) Lin, S.Y.; Ayres, J.W.; Winkler, W. y Sandine, W.E. 1989. *Lactobacillus* effects on cholesterol: *in vitro* and *in vivo* results. J.Dairy.Res. 72: 2885-89.

137) Lindgren, S.W.; Melton, A.R. y O´Brien, A. 1993. Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. Infect. Immun. Sept; 61(9): 3832-42.

138) Ling,W.H.; Hänninen,O.; Mykkänen,H., Hiekura,M.; Salminen,S. y Von Wright,A. 1992. Colonization and fecal enzymes activities after oral *Lactobacillus* GG. administration in elderly nursing home residents. Ann.Nutr.Metab. 36:162-166.

139) Ling,W.H; Korpela,R.; Mykkänen,H., Salminen,S. y Hänninen,O. 1994. *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. J.Nutr. 124:18-23.

140) Link-Amster,H.; Rochat,F.; Saudan,K.Y.; Mignot,O. y Aeschlimann, J.M. 1994. Modulation of specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. FEMS Immunol.Med.Microbiol.10:55-63.

141) Maaser,C; Housley,M.P.; Iimura,M; Smith,J.R; Vallace,B.A.; Finlay,B.B; Schreiber,J.R.; Varki,N.M.; Kagnoff, M.F y Eckmann, L. Clearence of *Citrobacter rodentium* requires B cells but not secretory immunoglobulin A (IgA) or IgM antibodies. Infect.Immun. 72(6):3315-3324.

142) Mack, D.R.; Michail, S.; Wei, S.; Mcdougall, L. y Hollingsworth, M.A. 1999. Probiotic inhibits enteropathogenic *E.coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. Am.J.Physiol. 276: G941-950.

143) Makras, L.;Triantafyllou, V.;Fayol-Messaoudi, D.;Adriany, T.;Zoumpopoulou, G.; Tsakalidou, E.; Servin, A y De Vuyst, L. 2006. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. Res. Microbiol. 157: 241-247.

144) Mallet,A.K.; Bearne,C.A. y Rowland,I.R. 1989. The influence of incubation pH on the activity of rat and human gut flora enzymes. J. Appl. Bacteriol. 66: 433-37.

145) Marteau, P.; Lemann,M.; Seksik,P.; Laharie,D.; Colombel,J.F.; Bouhnik, Y.; Cadjot,G.; Soule,J.C., Boureille,A.; Metman,E.; Lerebours,E.; Carbonnel,F.; Dupas, J.L.; Veyrac, M.; Coffin, B.; Moreau,J.; Abitbol,V.; Blum-Sperisen,S y Mary, J.Y. 2005. Ineffectiveness of *Lactobacillus johnsonii* LA1 for prophylaxis of postoperative recurrence in Crohn's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled GETAID trial. Gut. 55(6):842-7.

146) Martini, M.C.; Kukielka,D y Salvano, D.A. 1991. Lactose digestion from yogurt: influence of a meal and additional lactose. Am.J.Clin.Nutr. 53:1253-58.

147) Mattar, A.F.; Teitelbaum,D.H.; Drongowski,R.A. Yongyi,F.; Harmon, C.M y Coran, A.G. 2002. Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. Pediatr.Surg.Int. 18:586-590.

148) McIntosch, g.H.; Royle,P.J. y Playne, M.J. 1999. A probiotic strain of *L.acidophilus* reduces DMH-induced large intestinal tumors in male Sprague-Dawley rats. Nutr. Cancer. 35 (2):153-9.

149) McNamara, A. L.; Meeker, G. B., Shaw, P. D. and Hageman, R. H. 1971. Use of dissimilatory nitrate reductase from *Escherichia coli* and formate as a reductive system for nitrate assays. J. Agr. Food Chem. 19, 229-231.

150) Metchnikoff, E.I. 1908. The prolongation of life: optimistic studies. New York. Putream.

151) Mishra,V; Prasad,D.N. 2005. Aplication of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics.Int.J.Food Microbiol.103:109-15.

152) Mitsuoka, T. 1972. Intestinal flora and their growth in man and animals. Nippon.Ishikai.Zasshi. 67:132-148.

153) Miyoshi,Y.; Okada,S.; Uchimura,T. y Satoh,E. 2006. A mucus adhesión promoting protein, MapA, mediates the adhesión of *Lactobacillus reuteri* to Caco-2 human intestinal epithelial cells. Biosci.Biotech.Biochem. 70(7):1622-1628.

154) Moore, A.E.; Sabachewsky,L y Toolan,H.W. 1955. Can.Res.15:598.

155) Morita,H.; He,F.; Fuse,T.;Ouwehand,A.C.;Hashimoto,H.;Hosoda,M.; Mizumachi,K. y Kurisaki,J. 2002. Cytokine production by the murine macrophage cell line J774.1 after exposure to lactobacilli. Biosci.Biotechnol.Biochem.66:1963-66.

156) Morotomi, M y Mutai, M. 1986. *In vitro* binding of potent mutagenic pyrolysates. J.Natl.CancerInst. 77:195-201.

157) Morris, D.L. 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's antrhone reagent. Science 107:254-5.

158) Moser, S.A. y Savage, D.C. 2001. Bile salt hydrolase activity and resistence to toxicity of conjugated bile salt are unrelated properties in lactobacilli. Appl.Environ.Microbiol. 67(8): 3476-3480.

159) Nagano,K; Kazuki,T; Takumi, H; Shin-ichiro,Y; Kawada, K y Mori,H. 2003. Adhesion and colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cecum of mice. Microbiol.Immunol. 47(2): 125-132.

160) Nagano,K; Sugisaki,T; Kazuki,T; Takumi, H; Naiki, M y Mori, H. 2003.A murine model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection to assess immunopotentiating activity of drugs on mucosal immunity: effect of drugs. J.Pharmacol.Sci.91:219-228.

161) Naidu, A.S.; Bidlack,W.R. y Clemens, R.A. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Crit.Rev. in Food Sci.Nutr. 38(1):13-126.

162) Nataro, J.P y Kaper,J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol.Rev. 11(1): 142-201.

163) Nesser,J.R.; Granato,D.; Rouvet,M., Servin, A.; Teneberg,S. y Karlsson, K.A. 2000. *Lactobacillus johnsonii* LA1 shares a carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. Glycobiology.10:1193-1199.

164) Niedzielin, K.; Kordecki, H. y Birkenfeld, B. 2001. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. Eur.J.Gastroenterol. Hepatol. 13: 1143-47.

165) Ninfa, A.J y Ballou, D.P. 1998. Fundamental laboratory approaches for biochemestry and biotechnology. Fitzgerald Science Press. Bethesda. Maryland.

166) Niolssn,M.F.; Sandstedt,B.; Sorensen,O.; Weber,G.; Borregaad,N y Stahle-Backdahl,M. 1999. The human cationic protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. Infect.Immun.67:2561-2566

167) Nissen-Meyer,J. y Nes,I.F. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis and mechanism of action. Arch.Microbiol.167:67-77.

168) O´Brien, A.D.; La Veck, G.D.; Thompson, M.R. y Formal, S.B. 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. J.Infect.Dis. 146:763-769.

169) Ocaña, V.S y Nader-Macias, M.E. 2002. Vaginal lactobacilli: self- and co-aggregating ability. Br.J.Biomed.Sci. 59(4):183-90.

170) Ofek, I. y Doyle, R. 1994. Bacterial adhesion of cells and tissues. Chapman & Hall. New York. United States.

171) Oksanen, P.J.;Salminen, S.; Saxelin, M.; Hamalainen, P., Ihantola-Vormisto, A.; Muurasniemi-Isoviita, L.; Nikkari, S.; Oksanen, T.; Porsti, I y Salminen, E.1990. Prevention of travellers' diarrhoea by *Lactobacillus* GG. Ann.Med. 22:53-56.

172) Otte, J.M.; Kiehne, K. y Herzig, K.H. 2003. Antimicrobial peptides in innate immunity of the human intestine. J. Gastroenterol. 38:717-726.

173) Panel, V.; Boelle, P.Y.; Ayala-Sanmartin, J.; Jouniaux, A.M.; Hamelin, R.; Masliah, J.; Trugnan, G.; Flejou, J.F. y Wendum, D. 2000. Role of cytoplasmic and secretory phospholipase A2 in intestinal epithelial cell prostaglandin E2 formation. Int.J.Surg.Investg. 1(6):467-76.

174) Parassol, N.; Freitas, M.; Thoreux, K.; Dalmasso, G.; Bourdet-Sicard, R. y Rampal,P. 2005. *Lactobacillus casei* DN-114001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. Res. Microbiol. 156:256-262.

175) Parvez,S.; Malik,K.A.; Ah Kang,S. y Kim, H.Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficla for health. J.Appl.Microbiol. 100:1171-85.

176) Payne, J.E. 1990. Colonorectal carcinogenesis. Aust.N.Z.J.Surg. 60(1): 11-18.

177) Payne, W.J. 1973. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. Microbiol. Rev. 37, 409-452.

178) Pedone, C.A.; Arnaud, C.C, Postaire, E.R.; Bouley, C.F y Rinert, P. 2000. Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. Int.J.Clin.Pract. 54:568-71.

179) Pedone, C.A.; Bernabeu, A.O.; Postaire, E.R.; Bouley, C.F. y Reinert, P. 1999. The effect of supplementation with milk fermented with *Lactobacillus casei* (strain DN-114 001) on acute diarrhoea in children attending day care centers. Int.J.Clin.Pract.53:179-84.

180) Pereira, D.I y Gibson, G.R. 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. Appl. Environ. Microbiol. 68(9): 4689-93.

181) Perdigón,G.; Álvarez,S.; Medina,M.; Vintiñi,E. y Roux,E. 1999. Influence of the oral administration of lactic acid bacteria on IgA producing cells associated to bronchus. Int.J.Immunopathol.Pharmacol. 12:97-102.

182) Pérez, P.F; Minnaard, J; Disalvo, E.A.; De Antoni, G.L. 1998. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. Appl. Environ. Microbiol. 64: 21-26.

183) Pérez, P.F.; Schiffrin, E. y Brassart, D. 2005. Probiotics: experimental and clinical evidences for health benefits in Microorganism as health supporters number 4, Probiotics biotherapeutics and health. Schiavi, C (editorial coordinator) Mofinalce-Novara. Italy.

184) Peschel, A. 2002. How do bacteria resist human antimicrobial peptide?. 2002. Trends in Microbiol. 10(4): 179-186.

185) Philpott, D. J.; McKay, D. M.; Mak, W.; Perdue, M. H. and Sherman, P. M. 1998. Signal transuction pathways involved in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced alterations in T84 epithelial permeability. Inf. Immun. 66: 1680-1687.

186) Phillips, A.D.; Giròn, J.; Hicks,S.; Dougan,G. y Frankel, G. 2000. Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* mediates remodelling of eukaryotic cell surface. Microbiology. 146: 1333-1344.

187) Phillips, A.D. y Frankel, G. 2000. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. J.Infect.Dis. 181:1496-500.

188) Pinto, M.; Robine-Leon, S.; Appay, M., Kedinger, M.; Triadou, N.; Dussaulx, E.; Lacroix, B.; Simmon-Assmann, P.; Haffen, K.; Fogh, J. y Aweibaum, A. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. Biol.Cell. 47:323-330.

189) Pool-Zobel, B.L; Bertram, B., Knoll, M.; Lambertz, R.; Neudecker, C.; Schillinger; Schmezer,P. y Holzapfel, W.H. 1993. Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria *in vivo* in the gastrointestinal tract of rats. Nutr.Cancer. 20:271-81.

190) Porter, E.M.; Poles,M.A.; Lee,J.S.; Naitoh,J.; Bevins,C.L. y Ganz,T. 1998. Isolation of human intestinal defensins from ileal neoblader urine.FEBSLetters.434:272-76.

191) Potter, L.C.; Milligton,P.; Griffiths,L.; Thomas,G.H. y Cole,J.A. 1999. Competition between *Escherichia coli* strains expressing either a periplasmic or a membrane-bound nitrate reductase: does nap confer a selective advantage during nitrate-limited growth?. Biochemical Journal.344.(Pt1):77-84.

192) Racedo,S.; Villena,J.; Medina,M.; Agüero,G, Rodríguez,V. y Álvarez.S. 2006. *Lactobacillus casei* administration reduces lung injuries in a *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. Microbes Infect. 8: 2359-2366.

193) Rajagopal,S.N. y Sandine,W.E. 1990. Associative growth and proteolysis of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* in skim milk. J.Dairy.Sci. 73:894-899.

194) Rangavajhyla, N.; Shahani K.M.; Sridevi G. y Srikumaran S. 1997. Nonlipopoly of sacharide componenet(s) of *Lactobacillus acidophilus* stimulate(s) the production of interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha by murine macrophages. Nutr.Cancer. 28(2):130-4.

195) Reid,G.; Chan,R.C.; Bruce,A.W. y Costerton,J.W. 1985. Prevention of urinary tract infection in rats with an indigenous *Lactobacillus casei* strain. Infect. Immun.49:320-324.

196) Reid, G.; Cook, R.L. y Bruce, A.W. 1987. Examination of strains of lactobacilli for properties that may influence bacterial interference in the urinary tract. J.Urol. 138:330-335.

197) Richardson, D. J. and Watmough, N. J. 1999. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. Curr. Opin. Chem. Biol. 3, 207-219.

198) Ritchie JM, Waldor MK. 2005. The locus of enterocyte effacement-encoded effector proteins all promote enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity in infant rabbits. Infect Immun. 73(3):1466-74.

199) Rivas,M.; Balbi,I.; Miliwebsky,E.; García,B.; Tous,M.; Leardini,N.; Prieto,M.; Chillemi,G. y De Principi,M. 1998. Síndrome urémico hemolítico en niños de Mendoza, Argentina: su asociación con la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga.Medicina.58:1-7.

200) Rombeau,J.L.; kripke,S.A. y Settle, R.G. 1990. Short-chain fatty acid. Production, absorption, metabolism and intestinal affects. En Dietary Fiber: Chemistry, Phisiology and Health Effects. ed. Kritchevsky, D. New York. Plenum Press.

201) Rose,F.R.A.J.; Bailey,K.; Keyte,J.W.; Chan,W.C.; Greenwood,D. y Mahida,Y.R. 1998. Potential role of epithelial cell-derived histone H1 proteins in innate antimicrobial defense in the human gastrointestinal tract. Infect. Immun. 66(7):3255-3263.

202) Rosenfeldt,V.; Michaelsen,K.F.; Jakobsen, M.; Larsen, C.N.; Moller, P.L.; Tvede, M.; Weyrether,H.; Valerius,N.H y Paerregaard,A. 2002. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains on acute diarrhea in a cohort of non-hospitalized children attending day-care centers. Pediatr.Infect.Dis.J. 21, 411-416.

203) Sánchez, B.; de los Reyes-Gavilán, C.G. y Margolles, A. 2006. The F1 F0-ATPasa in *Bifidobacterium animalis* is envolved in bile tolerance. Environ. Microbiol. 8(10):1825-1833.

204) Sansonetti,P.J. 2006. The innate signalling of dangers and the dangers of innate signalling. Nat. Immunol. 7(12):1237-1242.

205) Sato,K. 1984. Enhancement of host resistance against *Listeria* infection by *Lactobacillus casei*: role of macrophages. Infect.Immun. 44:445-51.

206) Saxelin, M.; Tynkkynen, S.; Mattila-Sandholm,T y de Vos, W.M. 2005. Probiotics and other functional microbes: from markets to mechanisms. Curr. Opin. Biotech. 16:204-11.

207) Scardovi, V. 1986. Genus *Bifidobacterium*. Pág. 1418-34. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2. Sneath, P.H.A.; Mair, M.; Sharpe, E y Holt, J.G. eds. Williams and Wilkins. Baltimore.

208) Schleifer, K.H y Ludwig, W. 1995. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. System. Appl. Microbiol. 10:1-19.

209) Schüller, S.; Frankel, G. y Phillips, A.D. 2004. Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. Cell. Microbiol. 6(3):289-301.

210) Servin, A.L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiol. Rev. 28:405-440.

211) Shanahan, F. 2003. Probiotics: a perspective on problems and pitfalls. Scand. J. Gastroenterol.Supl. 237:34-6.

212) Shoeb, H.A, Tawfik,A.F. y Shibi, A.M. 1991.A nitrate reductase-based colorimetric assay for the study of bacterial adherence. J.Appl.Bacteriol.71, 270-76.

213) Shornikova, A.V.;Casas, I.A.;Mykkanen, H.;Salo, E. y Vesikari, T. 1997. Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in a rotavirus gastroenteritis. Pediatr.Infect.Dis.J. 16:1103-07.

214) Shu, Q y Gill, H.S. 2001. A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157: H7 infection in mice. Med. Microbiol.Immunol. 189: 147-152.

215) Shu, Q y Gill, H.S. 2002. Immune proteccion mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN 001 (DR20TM) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. FEMS Immunol.Med.Microbiol. 34(59) 59-64.

216) Simmons, C.P; Simon, C.; Ghaem-Maghami, M; Uren, T.K; Rankin, J; Huett, A; Goldin, R; Lewis,D.J.; MacDoland,T.T; Strugnell, R.A.; Frankel,G. y Doungan,G. 2003. Infect. Immun. 71(9): 5077-5086.

217) Singh,P.K.; Jia,H.P.; Wiles,K.; Hesselberth,J.; Liu,L.; Conway,B.A.D.; Greenberg,E.P.; Valore,E.V.; Welsh,M.J.; Ganz,T.; Tack,B.F. y Mc Gray,P.B Jr. 1998. Production of β-defensins by human airway epithelia. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 95:14961-14966.

218) Spencer,R.J y Chesson,A. 1994. The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escehrichia coli* to isolate porcine enterocytes. J.Appl.Bacteriol. 77:215-220.

219) Stark,P.L y Lee, A. 1982. The bacterial colonization of the large bowel of pre-term low birth weight neonatos. J.Hyg. (Lond). 89:59-67.

220) Stiles, M y Holzapfel, W.A. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. 36:1-29.

221) Succi,M.; Tremonte,P.; Reale,A.; Sorrentino,E.; Grazia,L.; Pacifico,S. y Coppola,R. 2005. Bile salt and acid tolerante of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. FEMS Microbiol. Lett. 244:129-137.

222) Sullivan, A y Nord, C.E. 2006. Probiotic lactobacilli and bacteraemia in Stockholm. Scand.J.Infect.Dis. 38(5):327-31.

223) Takahashi, M; Taguchi, H; Yamaguchi, H; Osaki, T; Komatsu, A y Kamiya, S. 2004. The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 41:219-226.

224) Tamime, A.Y.; Saarela, M.; Korslund,A.; Mistry, V.V. y Shah, N.P. 2005. Production and maintenance of viability of probiotic micro-organism in dairy products. En: Probiotic Dairy Products. Tamime, A.Y, ed. Blackwell Publishing. Oxford. U.K. Pág. 39-72.

225) Tang,Y.Q.; Yuan,J.; Osapay,K.; Tran,D.; Miller,C.J.; Ouellette,A.J y Selsted,M.E. 1999. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α-defensins. Science.288:498-502.

226) Tannock,G.W.; Dashkevicz,M.P y Feighner,S.D. 1989. Lactobacilli and bile salt hydrolase in the murine intestinal tract. Appl.Environ.Microbiol. 55:1848-1851.

227) Taranto, M.P.; Medici, M.; Perdigon, G.; Ruiz Holgado, A.P. y Valdez, G.F. 1998. Evidence of hipocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. J.Diary.Sci. 81:2336-40.

228) Tollin,M.; Bergman,P.; Svenberg,T.; Jörnvall,H.; Gudmundsson.G.H. y Agerberth, B. 2003. Antimicrobial peptides in the first line defence of human colon mucosa. Peptides. 24:523-530.

229) Trejo, F.M.; Minaard, J.; Pérez, P.F. y De Antoni, G.L. 2006. Inhibition of *Clostridium difficile* growth and adhesión to enterocytes by *Bifidobacteium* supernatants. Anaerobe.12:186-93

230) Tsen, H.Y; Chen, M.L.; Hsieh, Y.M. Sheu, S.J.; Chen, Y.L. 2000. *Bacillus cereus* group strains, threir hemolysin BL gene–targeted multiplex polymerase chain reaction system. J. Food Prot. 63(11):1496-502.

231) Tsien, R.Y. 1998. The green fluorescent protein. Annu.Rev.Biochem.67:509-44.

232) Unden, G y Bongaerts, J. 1997. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. Biochim.Biophys. Acta. 1320:217-234.

233) Vaarala, O. 2003. Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli. Clin.Exp.Allergy. 33:1634-40.

234) Vallace, B.A.; Deng, W.; De Grado, C.C.; Jacobson,K y Finlay, B.B. 2002. Modulation of inducible nitric oxide synthase expresión by the atacching and effacing bacterial pathogen *Citrobacter rodentium* in infected mice. Infect. Immun. 70:6424-6435.

235) Vallace, B.A.; Deng, W.; Jacobson,K y Finlay, B.B.2003. Host susceptibility to the attaching and effacing bacterial pathogen *Citrobacter rodentium.* Infect. Immun. 71(6):3443-3453.

236) Vallace, B.A.; Khan, M.A.; Deng, W.; Gruenheid, S. y Finlay, B.B. 2004. Modelling enteropathogenic and enterohemoorrhagic *E. coli* infectios and disease. Drug Dis. Today. 1(1):73-79.

237) Vandamme, P.; Pot, B.; Gillis, M.; de Vos, P.; Kersters, K y Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. 60:407-38.

238) Vaughan, E.; Mollet, B. y de Vos, W. M. 1999. Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunel. Curr. Opin. Biotechnol. 10(5):505-10.

239) Veckman, V.; Miettinen, M.; Pirhonen,J.; Siren,J., Matikainen,S. y Julkunen,I. 2004. *Streptococcus pyogens* and *Lactobacillus rhamnosus* differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. J.Leukoc.Biol. 75:464-71.

240) Veckman,V.; Miettinen,M.; Matikainen, S.; Lande, R.; Giacomini, E.; Coccia, E. M. y Julkunen, I. 2003. Lactobacilli and streptococci induce inflamatory chemokine production in human macrophages that stimulates Th1 cell chemotaxis. J.Leukoc.Biol. 74:395-402.

241) Ventura,M.;Jankovic,I.; Walker,D.C.; Pridmore,R.D. y Zink,R. 2002. Identification and characterization of novel surface proteins in *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus gasseri*. Appl. Environ. Microbiol. 68:6172-6181.

242) Verwey,E.J.W. y Overbeek, J.T.G. 1948. Theory of the stability of liophobic colloids. Elsevier. Amsterdam.

243) Viljanen, M.; Savilahti, E.; Haahtela, T.; Juntunen-Backman, K.; Korpela, R.; Poussa,T.; Tuure,T y Kuitunen, M. 2005. Probiotics in the treatment of atopic aczema/dermatitis síndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. Allergy. 60:247-50.

244) Villena, J.; Racedo, S.; Aguero, C y Álvarez, S. 2006. Yoghurt accelerates the recovery of defence mechanisms against *Streptococcus pneumoniae* in protein-malnourished mice. Br. J. Nutr. 95(3): 591-602.

245) Wadolkowski, E.A; Sung, L.M.; Burris, J.A; Samuel, J.E y O´Brien, A.D. 1990. Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II. Infect. Immun. Dec; 58(12): 3959-65.

246) Wallace,T.D.; Bradley,S.; Buckley,N.D. y Green-Johnson, J.M. 2003. Interactions of lactic acid bacteria with human epithelial cells: effects on cytokine production. J.Food.Protect. 66:466-72.

247) Weiss, J.; Wright, G.; Bekkers, A.C.; Van den Bergh,C.J. y Verheij, H.M. 1991. Conversion of pig pancreas phospholipase A2 by protein engineering into enzyme active against *Escherichia coli* treated with the bactericidal/permeability-increasing protein. J.Biol.Chem. 266(7):4162-7.

248) Weiss, N.; Schillinger, U. y Kandler, O. 1983. *Lactobacillus lactis, Lactobacillus leichmanii* y *Lactobacillus bulgaricus*, subjective synonyms of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* comb. nov. and *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* comb. nov. Syst. Appl. Microbiol. 4: 552-557.

249) Weiss,B. 2006. Evidence for mutagenesis by nitric oxide during nitrate metabolism in *Escherichia coli*. J. Bacteriol.188 (3):829-833.

250) Wollowski, I.; Rechkemmer, G y Pool-Zobel, B. 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. Am.J.Clin.Nutr. 73:451-455.

251) Wotsman, B.S. 1996. Germfree and gnotobiotic animal models. CRC Press. Boca Raton. United States.

252) Yamamoto,E.T.; Mizuno,M.; Nishikawa,K.; Miyazawa,S.; Zhang,L.; Matsuo,S. y Natori,Y. 2005. Shiga toxin 1 causes direct renal injury in rats. Infect. Immun. 73 (11): 7099-7016.

253) Yamamoto,K.; Miwa,T.; Taniguchi,H.; Nagano,T.; Shimamura,K.; Tanaka,T. y Kumagai,H. 1996. Binding specificity of *Lactobacillus* to glycolipids. Biochem. Biophys. Res. Commun. 228:148-152.

254) Yang, D.; Chertov, O. y Oppenheim, J.J. 2001. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. Cell. Mol. Life Sci. 58:978-989.

255) Yasui, H.; Kiyoshima, J y Ushijima, H. 1995. Passive protection against rotavirus-induced diarrea of mouse pups born to and nurse by dams fed *Bifidobacterium breve* YIT4064. J.Infect.Dis. 172:403-409.

256) Yasui, H.; Shida, K.; Matsuzaki, T y Yokokura, T. 1999. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 76: 383-389.

Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P

DONACION.....
A.....
Fecha.....11-02-08
Inv. E.....Inv.....B.....58455