



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

**EFEECTO DE LA "BACTERIOCINA" DE *Lactobacillus casei* var.  
*pseudoplantarum* SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA TOXINA LT  
DE *Escherichia coli* EN CELULAS VERO POR MICROSCOPIA  
ELECTRONICA.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
P R E S E N T A:  
AMNIN SUAYLE ALTAMIRANO FERNANDEZ

ASESORES:  
DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA  
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO  
M. C. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

*A mi Mamá*

*...que con su amor me ha ayudado a recorrer el camino sin importar cuán difícil haya sido. Porque me ha dado tanto que no encuentro palabras que expresen mi sentir.*

*A mis Hermanos*

*... que día a día me han colmado de amor y alegrías.*

## *AGRADECIMIENTOS.*

*Gracias Omar... por alentarme y apoyarme a cada instante, por dejarme compartir tantos sueños contigo, por llenar mis días de sonrisas, por enseñarme que nada es imposible, por abrirme tu corazón y darme la dicha de ser parte de mi vida.*

*David, Ceci y Tania por ser mis AMIGOS, por darme su cariño y apoyarme una y otra vez incondicionalmente. Por estar siempre aquí.*

*Dra. Susana E. Mendoza Elvira por darme la oportunidad de trabajar a su lado y compartir conmigo sus conocimientos. Por brindarme su amistad y por tantas hermosas experiencias.*

*Dr. Abel Ciprián por brindarme sus conocimientos y su apoyo.*

*M. V. Z. David Trujillo por su amistad y por todo el apoyo que me brindo durante mi estancia en el laboratorio.*

*Sr. Gabino Sánchez por su incansable sonrisa y por su apoyo técnico.*

*Ing. Draucin Celis por su apoyo técnico.*

*A mis Sinodales por sus consejos y su colaboración para hacer de este un mejor trabajo.*

*A todos los que de manera directa o indirecta han influido en mí para llegar hasta aquí.*

# INDICE

	Págs.
RESUMEN.....	i
1. Introducción.....	1
1.1 Justificación.....	18
1.2 Hipótesis.....	18
2. Objetivo General.....	19
2.1 Objetivos particulares.....	19
3. Material y métodos.....	20
3.1 Medios de cultivo.....	20
3.1.1 Medios para crecer bacterias.....	20
3.2 Cepas bacterianas.....	20
3.2.1 <i>Escherichia coli</i> (ETEC).....	20
3.2.2 <i>Lactobacillus casei var pseudopiantarum</i> .....	20
3.3 Obtención de la toxina LT de <i>Escherichia coli</i> (ETEC).....	21
3.4 Obtención de la "bacteriocina" de <i>Lactobacillus casei var pseudopiantarum</i> .....	21
3.5 Cultivo celular.....	22
3.5.1 Línea celular.....	22
3.5.2 Medio de cultivo.....	22
3.5.3 Tripsina versene.....	22
3.5.4 Pase celular.....	22

3.6	Cuantificación de proteínas.....	23
3.7	Evaluación de la actividad de la toxina LT y la "bacteriocina".....	24
3.7.1	Inhibición por gota.....	24
3.7.2	Unidades Formadoras de Colonias.....	24
3.7.3	Evaluación de la Toxina LT y la bacteriocina en células VERO.....	25
3.8	Microscopía Electrónica de Transmisión.....	26
3.8.1	Procesamiento de muestras.....	27
	a) Fijación de muestras.....	27
	b) Infiltración con Hidroxipropilmetacrilatos (HPMA).....	27
	c) Inclusión en resina.....	27
3.8.2	Realización de cortes con ultramicrotomo.....	28
3.8.3	Tinción de muestras.....	28
3.8.4	Análisis de muestras.....	28
4.	Resultados.....	32
5.	Discusión.....	49
6.	Conclusiones.....	54
7.	Referencias Bibliográficas.....	55

## INDICE DE...

### FIGURAS

	Págs.
- Células VERO blanco (Fig. N° 1).....	36
- Células VERO control positivo (Fig. N° 2).....	37
- Células VERO control negativo (Fig. N° 3).....	38
- Células VERO evaluación (Fig. N° 4).....	39
- Corte semifino células blanco (Fig. N° 5).....	41
- Corte semifino células control positivo (Fig. N° 6).....	42
- Corte semifino células control negativo (Fig. N° 7).....	43
- Corte semifino células evaluación (Fig. 8).....	44
- Microscopía electrónica células blanco (Fig. N° 9).....	45
- Microscopía electrónica células control positivo (Fig. N° 10).....	46
- Microscopía electrónica células evaluación (Fig. N° 11).....	47

### GRAFICOS

- Obtención y evaluación de toxina LT y "bacteriocina" (Diagrama N° 1).....	29
- Evaluación de la toxina LT y la "bacteriocina" en cultivo celular (Diagrama N° 2)..	30
- Evaluación por Microscopía electrónica (Diagrama N° 3).....	31

## TABLAS

- Cuantificación de proteínas.....	23
- Modelo experimental.....	26
- Prueba de inhibición de crecimiento de <i>E. coli</i> (TAB. N° 1).....	33
- Controles empleados para inhibición de crecimiento en placa (TAB. N° 2).....	34
- Unidades formadoras de colonias (TAB. N° 3).....	35

## ABREVIATURAS

<b>AMPc</b>	Adenosin monofosfato cíclico
<b>Bco.</b>	Blanco
<b>CCE</b>	Comunidad Económica Europea
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ETEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
<b>Fig.</b>	Figura
<b>GMPc</b>	Guanidin monofosfato cíclico
<b>HPMA</b>	Hidroxipropilmetacrilatos
<b>hrs.</b>	Horas
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>LAB</b>	Bacterias ácido lácticas
<b>LT</b>	Termolábil
<b>ME</b>	Microscopio electrónico
<b>μL</b>	Microlitro
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mL</b>	Mililitro
<b>Mtra.</b>	Muestra
<b>nm</b>	Nanometro
<b>PBS</b>	Solución buffer de fosfatos
<b>pp</b>	Precipitado

<b>prot.</b>	Proteínas
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>Sol.</b>	Solución
<b>SSF</b>	Solución salina fisiológica
<b>ST</b>	Termoestable
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>var.</b>	Variedad
<b>v/v</b>	Volumen/volumen

## RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar la capacidad de las bacteriocinas de bloquear *in vitro* el efecto biológico de la toxina LT y evaluarlo por Microscopía electrónica. La bacteriocina se obtuvo de la cepa de *Lactobacillus casei* var. *pseudoplantarum*, la toxina LT de *E. coli* se obtuvo de una cepa ETEC de origen porcino. La toxina y la bacteriocina fueron enfrentadas durante 4 horas a 37° C y posteriormente se inocularon en una microplaca con monocapas de cultivos celulares con la línea VERO, se colocaron por triplicado. Se hicieron diluciones de la toxina y cada una se puso en contacto con el sobrenadante del *Lactobacillus* para titular el efecto de los metabolitos inhibitorios del cultivo de *Lactobacillus* en estudio. Como controles se emplearon a la toxina LT en las mismas concentraciones del experimento, el sobrenadante del cultivo del *Lactobacillus* y células sin inocular, se incubaron por 18 horas a 37° C. Los resultados mostraron que los pozos que contenían la toxina, tenían un efecto claramente citotóxico en comparación con los pozos controles con el medio de cultivo que muestran células intactas y sin cambios morfológicos. Pozos que contenían la mezcla con diferentes diluciones mostraron que la bacteriocina fue capaz de bloquear la acción de la toxina afectando en grados mínimos a las células dando una relación de 1:7 en los pozos en donde se observó la acción de la bacteriocina. Posteriormente, se preparó otra microplaca con monocapas de la línea celular VERO colocando por triplicado y en diferentes pozos la toxina LT, la bacteriocina, medio de cultivo estéril, y la mezcla de toxina con bacteriocina, incubándose por 18 horas a 37° C. Todas las células fueron fijadas con glutaraldehído y posfijadas con OsO<sub>4</sub>, deshidratadas con alcohol del 30 hasta 100%, después fueron infiltradas en resina de Epon, cortadas y teñidas con Reynolds. Se revisaron cortes semifinos y ultra finos en cortes de fase con ME. Los resultados mostraron que las células testigo presentaban una estructura densa y sin formar grandes masas celulares mientras que con la toxina las células formaban grumos con múltiples capas celulares. Las células presentaban en el citoplasma vacuolas medianas y grandes. Por otro lado, las células que tenían tanto la toxina como el sobrenadante de *Lactobacillus* mostraron un vacuolado fino y no formaban grumos. La bacteriocina de *Lactobacillus casei* var *pseudoplantarum* fue capaz de bloquear el efecto biológico de la toxina LT de ETEC *in vitro* y posiblemente también lo hiciera en los lechones, pudiendo ser por lo tanto una buena alternativa de control y prevención de las diarreas ocasionadas por *E. coli*.

# 1. INTRODUCCIÓN

La sanidad animal es la base de una explotación productiva y económicamente rentable y ofrece un gran aporte a la salud pública veterinaria. El desarrollo de las ciencias veterinarias ha permitido el adelanto en las técnicas de manejo, nutrición, genética, sanidad y administración de los animales.

Por siglos las enfermedades animales han sido reconocidas, la intensificación de las explotaciones para volverles más rentables, el agrupamiento, el contacto directo y las altas producciones, son causas de sensibilización del organismo facilitando la difusión de los agentes.

El estudio epidemiológico de las infecciones para conocer los agentes causales, curso y lesiones características de las mismas, ha permitido desarrollar estrategias de control con la producción de nuevos fármacos y biológicos altamente confiables para los tratamientos preventivos y curativos. Sin embargo aún existen padecimientos difíciles de curar, controlar y erradicar por la variabilidad de agentes que adquieren resistencia de acuerdo al medio ambiente, prácticas de manejo y de medicaciones deficientes.

Una de estas enfermedades es la "diarrea" de naturaleza diversa según el agente causal. La etiología es compleja ya que intervienen agentes de naturaleza muy

diferente: virus, bacterias y parásitos con manifestaciones clínicas asociadas a factores predisponentes.

### 1.1 Colibacilosis

La diarrea colibacilar es una de las enfermedades más importantes en lechones. Debido a su amplia distribución y elevada morbilidad se ha convertido en una problemática económica para el porcicultor.<sup>26</sup> La colibacilosis es un desorden intestinal de los lechones recién nacidos caracterizado por diarrea severa. También es conocida como diarrea del recién nacido y afecta generalmente a los lechones antes de los siete días de nacidos.<sup>15</sup>

La colibacilosis es ocasionada por *Escherichia coli*, un microorganismo que forma parte de la flora intestinal normal de los animales, pero bajo ciertas condiciones es patógena para su hospedero.<sup>26</sup> Dicho microorganismo incide directamente en las tres fases del desarrollo de los cerdos:

- a) lechones neonatos de 1 a 15 días
- b) lechones de 20 días cuando se alterna lactancia y balanceados
- c) cerdos destetados dos a tres semanas después

La diarrea producida por *E. coli* puede clasificarse en tres tipos: a) diarrea neonatal o colibacilosis (dentro de los primeros días de nacido), b) diarrea de lechones

(de las primeras semanas de nacido hasta el destete), c) diarrea posdestete. *Escherichia coli* es el agente etiológico más importante de la diarrea neonatal y de la diarrea posdestete. Mientras que la diarrea de lechones puede ser también ocasionada por otros agentes etiológicos como rotavirus, virus de gastroenteritis transmisible o coccidia.<sup>7, 15</sup>

#### 1.1.1. Etiología

*E. coli* pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo con flagelos peritricos, fermentador de glucosa y lactosa. Crece en medios simples y en selectivos como MacConkey y EMB.<sup>29</sup>

#### 1.1.2. Patología

*Escherichia coli* ha sido reconocida como patógeno de alta virulencia con factores que permiten formar colonias intestinales, diseminarse y causar daños en los tejidos de los cerdos afectados.<sup>30</sup> Dentro de estos factores se encuentra la presencia de una membrana externa con lipopolisacaridos altamente endotóxicos, tiene capacidad invasiva y se adhiere al epitelio y tejidos con factores de colonización intestinal. Posee diversos antígenos denominados: O somático, K capsular, H flagelar y f fimbrial. En 1994, Kauffman propuso un esquema para la clasificación serológica de la bacteria mismo que fue modificado y reorganizado con base a la combinación de los antígenos presentes en la bacteria y que se emplea hasta nuestros días.<sup>17,28</sup>

Las primeras adhesinas fimbriales descritas en cerdos fueron la K88 y la K99 aunque entre las diferentes cepas de *E. coli* la expresión del antígeno fimbrial K88 es la más prevalente.<sup>4,19</sup> Se han descrito más de 30 adhesinas fimbriales pero solo 4 son de importancia en la infección de cerdos neonatos y son denominadas: F4(K88), F5(K99), F6 y F41.<sup>4</sup> Algunas cepas de *Escherichia coli* producen más de una adhesina fimbrial y/o algunas combinaciones de las mismas siendo las más comunes F5/F6, F5/F41 y F4/F6.<sup>5,17,28</sup>

Dichas fimbrias regulan la adhesión de *E. coli* a receptores específicos de la membrana y la mucosa de células epiteliales del intestino. Se ha establecido que los receptores para la fimbria K88 son detectables en la mucosa de las células epiteliales del intestino delgado de lechones.<sup>21</sup> La presencia de receptores en la mucosa tiene un papel de suma importancia en la patogénesis de *E. coli*. *Escherichia coli* productora de F5, F6 y F41 coloniza principalmente la parte posterior del yeyuno y el íleon, mientras las cepas productoras de F4 tienden a colonizar todo el intestino desde el yeyuno hasta el íleon.<sup>17, 28</sup>

Aunado a esto, existen cepas de *E. coli* productoras de una o más enterotoxinas por lo que ha sido denominada *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). Es productora de enterotoxinas termoestables (ST), termolábiles (LT) y verocitotoxinas.<sup>5, 16</sup>

La toxina termoestable (ST) es resistente al tratamiento a 100° C durante 15min. Ha sido subdividida en STa y STb de acuerdo a su solubilidad en metanol y a su actividad biológica. STa es una pequeña proteína no inmunogénica con un peso molecular de 2000 KDa. Se une al receptor epitelial intestinal guanililciclase activando a guanilato ciclase, estimulando así la producción de GMPc. Los altos niveles de GMPc en las células inhiben el sistema de cotransporte Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> y reduce la absorción de electrolitos y agua en el lumen intestinal.<sup>17</sup>

STb, es una proteína de 5000 KDa poco inmunogénica. Estimula la secreción de fluido en el estómago sin depender de un nucleótido cíclico aunque parece ser mediada por la prostaglandina E<sub>2</sub>. STb se encuentra en el 74% de ETEC aislada de cerdos, aunque su papel en el desarrollo de la diarrea aun es incierto. Experimentalmente, produce diarrea en cerdos neonatos induciendo atrofia de las vellosidades estomacales.<sup>17</sup>

LT se inactiva al ser sometida a una temperatura de 60° C durante 15min. Es una toxina oligomérica de 86 KDa compuesta por una subunidad A de 28 KDa y 5 subunidades B idénticas de 11.5 KDa las cuales se encuentran colocadas en forma de anillo. La subunidad A es la responsable de la actividad enzimática de la toxina y puede sufrir proteólisis para obtener los péptidos A1 y A2 unidos por un enlace disulfuro. La toxina se une a las membranas celulares de su hospedero, entonces es endocitada y transportada en el interior hasta llegar a su blanco que es Adenilato Ciclase localizada en la membrana basolateral de las células epiteliales intestinales, por lo que al actuar

sobre dicha enzima conduce al incremento de AMPc intracelular. El resultado es la estimulación de la secreción de  $\text{Cl}^-$  y la inhibición de la absorción de NaCl induciendo una salida pasiva de agua y por lo tanto produciendo una diarrea osmótica.<sup>16,17</sup> LT se encuentra subdividida en LTI y LTII; la toxina aislada de cerdos pertenece al subgrupo LTI.<sup>17</sup>

### 1.1.3. Signos clínicos

Es característica la diarrea de color amarillo pálido, profusa, aguada y gaseosa. La deshidratación (excesiva pérdida de agua de los tejidos) y la acidosis (disminución de la reserva de álcalis de la sangre) son comunes una vez que comienza la diarrea, seguido esto por muerte de los lechones cuando no se administra una terapia rápida y efectiva. En algunos casos los animales mueren antes de que los signos clínicos aparezcan.<sup>8,15</sup>

La diarrea neonatal puede ser observada 2 a 3 hrs. después del nacimiento del cerdo y puede afectar a un solo cerdo o a la camada completa. La materia fecal puede gotear por el ano y entonces solo ser detectada por la examinación del área perianal.<sup>15</sup>

Una pequeña porción de animales enfermos puede presentar vómito. En casos severos los animales disminuyen entre el 30 - 40% de su peso corporal debido a la pérdida de fluidos. La musculatura abdominal es flácida y atónica, los lechones están deprimidos, con los ojos hundidos y la piel de color azul-grisácea y parecida en textura

a un pergamino. Debido a la deshidratación y pérdida de peso hay una marcada prominencia de los huesos.<sup>19</sup>

En los casos crónicos, el ano y el perineo se encuentran inflamados por el contacto con la materia fecal que presenta un pH alcalino.<sup>15</sup>

Los lechones menos deshidratados pueden continuar bebiendo y si el tratamiento es adecuado se recuperan con mínimos efectos secundarios.<sup>15</sup>

#### 1.1.4. Lesiones

Las lesiones que se encuentran con mayor frecuencia, incluida la deshidratación, son la inflamación estomacal, venas infartadas en la curvatura mayor del estómago y la dilatación del intestino delgado junto con la congestión de sus paredes.<sup>15</sup>

En los cortes histológicos se pueden observar capas de ETEC F4 positiva adheridas a las células de la mucosa epitelial en el yeyuno y el íleon, y en la parte posterior del yeyuno y/o íleon en el caso de otras cepas de ETEC.<sup>8</sup> Además, las bacterias pueden encontrarse solo en las criptas de Lieberkühn o también en la punta de las vellosidades.<sup>15</sup>

Las lesiones histopatológicas pueden incluir la congestión vascular de la lámina propia con algunas hemorragias en el lumen intestinal, un incremento en el número de neutrófilos y macrófagos en la Lámina Propia junto con migración al lumen, y algunas vellosidades atrofiadas.<sup>15</sup>

### 1.1.5. Diagnóstico

Se encuentran disponibles numerosos procedimientos de laboratorio para la detección de esta enfermedad. Específicamente, las técnicas de cultivos bacterianos son utilizadas en nuestro país para confirmar la infección y también para identificar la cepa causal de la misma.<sup>15</sup>

La bacteria puede persistir en el ambiente; los cerdos infectados son el principal reservorio de la infección. Investigaciones indican que los cerdos infectados excretan más de un billón de bacterias por mililitro de heces. Esta cantidad masiva de bacterias está disponible para ser ingerida por animales susceptibles.<sup>15</sup>

La diarrea colibacilar producida por ETEC debe diferenciarse de la producida por otros agentes infecciosos tales como *Clostridium perfringens*, virus de Gastroenteritis transmisible, rotavirus y coccidia. Un diagnóstico presuntivo se puede realizar mediante la determinación del pH fecal. La diarrea ocasionada por ETEC presenta un pH alcalino mientras la ocasionada por rotavirus o el virus de la Gastroenteritis transmisible tiene un pH ácido.<sup>15</sup>

El diagnóstico de la infección entérica producida por *E. coli* puede realizarse a partir de los signos clínicos, las lesiones histopatológicas y la presencia de microorganismos gram negativos adheridos a la mucosa del intestino delgado, además del aislamiento de *E. coli*, su serotipificación y la determinación de uno o varios de sus factores de virulencia así como la producción de enterotoxinas y citotoxinas junto con la evaluación de su actividad biológica.<sup>15</sup>

La actividad biológica de la toxina termoestable a (STa) se determina en ratones, la de STb en cerdos y la de la toxina termolábil (LT) y verocitotoxina en cultivos celulares.<sup>15</sup>

El efecto de la toxina LT puede ser demostrado *in vitro* en la línea celular VERO en la que produce un efecto citotónico.<sup>3,16</sup> Aunque este efecto también ha sido demostrado en otras líneas celulares como HeLa.<sup>20</sup> Por otro lado, las células VERO y HeLa también han sido empleadas para demostrar el efecto de otras toxinas de *E. coli* como la Shiga y las citotoxinas, así como el efecto del incremento intracelular de  $Ca^{2+}$ .<sup>16, 23</sup>

Además de poder observar el efecto de la toxina y de la "bacteriocina" en un cultivo celular, también podemos hacer evaluaciones morfológicas más específicas por microscopía electrónica a dichas células.<sup>2</sup> El microscopio de transmisión nos permite observar la estructura y morfología interna de las células, así como, de sus membranas, lo cual nos brinda información muy específica de las alteraciones que pudiera presentar una célula.<sup>1,7</sup> La microscopía electrónica de transmisión se basa en un haz de electrones que manejado a través de lentes electromagnéticas se proyecta sobre una muestra muy delgada situada en una columna de alto vacío. El haz de electrones atraviesa la muestra, que ha sido contrastada con átomos pesados, y se pueden dar dos situaciones básicas: que los electrones del haz atraviesen la muestra o que choquen con un átomo de la muestra y terminen su viaje. De este modo se obtiene

información estructural específica de la muestra según las pérdidas específicas de los diferentes electrones del haz.<sup>7</sup>

El conjunto de electrones que atraviesan la muestra son proyectados sobre una pantalla fluorescente formando una imagen visible o sobre una placa fotográfica registrando una imagen latente. Este equipo permite evaluar detalladamente las estructuras físicas y biológicas proporcionando unos 120.000 aumentos sobre la muestra. Las muestras a estudiar requieren una preparación compleja específica y la obtención de secciones ultrafinas mediante ultramicrotomía. La idoneidad de estas técnicas de preparación es decisiva en la calidad final de la imagen observada. En el caso de determinadas muestras biológicas tales como bacterias, macromoléculas y otras pequeñas partículas se requieren técnicas especiales de preparación. El proceso comienza con el tejido altamente hidratado y termina con el tejido virtualmente libre de agua y preservado en una matriz de resina.<sup>7</sup>

La presencia de adhesinas fimbriales se evalúa serológicamente con pruebas de aglutinación, inmunofluorescencia y ELISA empleando antisueros policlonales. Sin embargo, F5 y F41 solo son producidas cuando *E. coli* es cultivada en Medio Mínimo Esencial (MEM), mientras que la obtención *in vitro* de F6 es muy limitada.<sup>15</sup>

Otro método para la detección de los factores de virulencia de *E. coli* son los anticuerpos monoclonales que pueden ser empleados para la rápida detección e identificación de *E. coli* usando directamente las heces fecales de los lechones infectados.<sup>15</sup>

#### 1.1.6. Tratamiento

Debe estar enfocado a eliminar el agente infeccioso, corregir y eliminar los daños y lesiones causadas y proveer de protección a los animales. Es importante que antes de iniciar el tratamiento se realice el aislamiento de ETEC y se realicen pruebas de sensibilidad a antibióticos.<sup>15</sup>

La terapia de líquidos consiste en una solución de electrolitos y glucosa, administrada vía oral para evitar la deshidratación y la acidosis. También, pueden administrarse fármacos que inhiben la diarrea producida por las toxinas siempre y cuando no causen efectos secundarios indeseables. Es importante mantener a los lechones a temperaturas constantes entre los 30 - 34° C.<sup>15</sup>

Los antibióticos son usados rutinariamente para tratar de controlar a estos patógenos, pero dichos microorganismos se vuelven resistentes a los tratamientos comúnmente empleados, haciendo la terapia con antibióticos poco confiable. Además, el uso de promotores de crecimiento antimicrobiano pueden causar el desarrollo de resistencia en un número importante de especies bacterianas patógenas.<sup>21</sup>

#### 1.1.7. Prevención

Uno de los factores más importantes para la prevención de la colibacilosis es mantener a los lechones a temperaturas ambientales adecuadas, entre los 30 - 34° C, libres de corrientes de aire y sobre una superficie tibia. Estas condiciones son

particularmente necesarias para lechones de bajo peso ya que pierden rápidamente el calor corporal y disminuyen sus defensas.<sup>15</sup>

Una buena higiene en la granja reduce el número de microorganismos presentes en los lechones lo que permite que su sistema inmunológico este en óptimas condiciones. El diseño de la granja es de suma importancia ya que de esto depende la correcta eliminación de las heces fecales de los corrales.<sup>15</sup>

La dieta debe ser modificada de manera que se reduzca la colonización intestinal por *E. coli*. Los probióticos han sido empleados para este fin. Así, se reduce el uso profiláctico de antibióticos en la industria animal. La mayoría de las bacterias probióticas son de origen intestinal y productoras de ácido láctico (LAB) como las bifidobacterias, lactobacilos y enterococos.<sup>21</sup>

#### 1.1.7.1. Probióticos

El concepto de probiótico fue introducido por Ilya Metchnikoff en 1908, quien observó que los campesinos que consumían alimentos fermentados derivados de la leche vivían por más tiempo. En 1989, Fuller definió probiótico como "un suplemento alimenticio microbiano vivo que beneficia al animal hospedero mejorando el balance microbiano intestinal".<sup>11</sup>

En resumen, los probióticos son microorganismos vivos o metabolitos de estos que proporcionan beneficios al hospedero y que le ayudan a mantener un balance

microbiano intestinal.<sup>32,33</sup> Se han propuesto varios mecanismos de acción que tratan de explicar el control de las enfermedades infecciosas a través de probióticos, entre los que se incluyen: (i) La producción de ácido láctico localizada en el tracto gastrointestinal limita el crecimiento de patógenos; (ii) las sustancias anti-patógenas (bacteriocinas) secretadas por los probióticos son directamente microbicidas; (iii) inoculando la mucosa intestinal con la bacteria probiótica se puede limitar la unión del patógeno a la misma por competencia y/o (iv) las señales inmunomoduladoras generadas por los probióticos pueden estimular suficiente la inmunidad del hospedero proporcionando protección contra el agente patógeno.<sup>22,24,25</sup>

Existen diversos microorganismos que actúan como probióticos, la mayoría de ellos son bacterias ácido-lácticas. Dentro de ellas se encuentran los Lactobacilos.<sup>13, 24,33</sup>

En términos generales, los lactobacilos tiene la habilidad a adherirse a las células, reducir o evitar la adherencia de patógenos, son organismos que persisten y se multiplican, producen ácido, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, son antagonistas del crecimiento de patógenos, son resistentes microbicidas vaginales, incluyendo espermaticidas, no son invasivos, ni carcinogénicos, ni patógenos, y son coagregativos y forman parte normal del balance de la flora microbiana.<sup>12, 25</sup>

Los lactobacilos producen un metabolito denominado bacteriocina. El termino bacteriocina fue acuñado por Jacob *et al* en 1953. Las bacteriocinas fueron específicamente definidas como antibióticos proteínicos del tipo de la colicina,

moléculas caracterizadas por una biosíntesis letal, una predominante actividad asesina intraespecies y una adsorción de receptores específicos de la membrana de células sensibles a bacteriocinas.<sup>27</sup> Las bacteriocinas de las bacterias ácido-lácticas generalmente son péptidos catiónicos permeables para las membranas de diversos agentes patógenos; y rara vez contienen más de 60 residuos de aminoácidos.<sup>9</sup>

En los últimos años, las bacteriocinas han sido definidas como compuestos proteínicos producidos por diversos grupos de bacterias, con diferentes modos de acción, espectros de actividad, pesos moleculares, propiedades bioquímicas y orígenes genéticos.<sup>10, 31</sup>

Por definición, todas las bacteriocinas tienen un componente proteico o péptido esencial para su actividad bactericida; incluso puede haber combinaciones de diferentes proteínas o compuestos de proteínas con lípidos o carbohidratos.<sup>27</sup> Debido a esto, la actividad de las bacteriocinas puede verse afectada incrementando o disminuyendo dependiendo de los factores fisicoquímicos o biológicos a los que sean sometidas tales como el pH, la concentración salina (NaCl), la presencia de nitritos o nitratos, la disponibilidad de una fase acuosa y/o el contenido graso de una superficie para una mayor solubilidad.<sup>14</sup>

Actualmente, se están empleando los probióticos para controlar las diarreas en lechones.<sup>14,19</sup> Uno de esos microorganismos empleados como probiótico es *Lactobacillus* el cual produce un pequeño péptido, denominado bacteriocina, que presenta actividad

antimicrobiana y que en cultivo celular inhibe el efecto "citotónico" de la toxina LT.<sup>3,25</sup>

Las bacteriocinas son compuestos proteínicos, producidos por diversos grupos de bacterias, con diferentes modos de acción, espectros de actividad, pesos moleculares, propiedades bioquímicas y orígenes genéticos.<sup>31</sup> Se encuentran divididas en cuatro clases: **Clase I**, denominadas lantibioticos, son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina,  $\beta$ -metil-lantionina y dihidroalanina, que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. Un ejemplo bien conocido, de estas bacteriocinas es la nisina. **Clase II**, no lantibióticos, menores a 10 KDa, relativamente termoestables, están subdivididas en tres tipos: a) Péptidos *Listeria*-activos, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P, b) Bacteriocinas formadoras de complejos de poración que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos, son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana tales como la lactocina G y las plantaricinas EF y JK c) Péptidos pequeños, termoestables, no modificados y se transportan mediante péptidos líder, activados por grupos tiol como la divergicina A y acidocina B; **Clase III**, son péptidos mayores a 30 KDa, termolábiles, en esta clase se encuentran las helveticinas J y V, acidofilicina

A, lactacinas A y B; y **Clase IV**, son complejos de bacteriocinas que contienen moléculas esenciales de lípidos o carbohidratos unidos a las proteínas.<sup>13,27,31</sup>

El modo de acción de las bacteriocinas es complejo. Es posible que las clases I y II de las bacteriocinas compartan mecanismos de acción semejantes. Al parecer, los péptidos se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente, luego se insertan a la membrana con una reorientación que depende del potencial de membrana, el cual está influenciado por el pH y la composición fosfolipídica. Los monómeros de bacteriocina forman agregados proteicos que resultan en la formación del poro con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio), pérdida de la fuerza motriz de protones (FMP), salida de ATP y aminoácidos. La fuerza motriz de protones juega un papel central en la síntesis de ATP, en el transporte activo y el movimiento bacteriano, por lo tanto, se inhibe la síntesis de macromoléculas y la producción de energía dando como resultado la muerte celular.<sup>13</sup>

Aunque es común la formación de poros y la disipación de la fuerza motriz de protones en el modo de acción de las bacteriocinas, existen algunas particularidades en cada clase. De la clase I, la nisina no requiere de un receptor unido a la membrana de la célula blanco ya que reconoce la composición fosfolipídica de la célula. En cambio, para la acción de la lactococina A y la lactoestrepicina se requiere de la unión a receptores membranales. Para las bacteriocinas de la clase IIa, se ha sugerido que la región consenso amino terminal tiene un papel importante en la capacidad de

reconocimiento de la membrana de la célula blanco. En las de la clase IIb, las plantaricinas EF y JK dependen de la acción de dos péptidos a y b para la formación de poros y consecuente disipación del potencial de membrana. En la clase III, son bacteriocinas de alto peso molecular, el mecanismo de acción se desconoce y deberá ser más estudiado.<sup>13</sup>

En general, es probable que las estructuras secundarias de los péptidos activos tengan un papel importante en la actividad biológica ya que las  $\alpha$ -hélices y láminas  $\beta$  plegada son anfifílicas, lo que sugiere una oligomerización de los monómeros en las membranas de acuerdo al mecanismo de formación de poros denominado "barrel-stave", con los lados hidrofóbicos hacia la parte lipídica de la membrana y los hidrofílicos formando el poro del canal.<sup>13</sup>

La aplicación de las propiedades de las cepas prebióticas, hace factible la reducción del uso de antibióticos evitando así la resistencia a diversos fármacos.<sup>21</sup> Una extensa prescripción de antibióticos no solo aumenta la resistencia de las cepas bacterianas patógenas a los mismos, sino que, a menudo esta asociada con la disrupción de la flora protectora nativa del hospedero. Por esta razón, el control de las infecciones a través de no-antibióticos es urgentemente necesario, reemplazando la terapia antibiótica con el uso terapéutico de bacterias no patógenas de la flora normal.<sup>6</sup>

## 1.1 Justificación

En la actualidad, los seres humanos están interesados en obtener un alto rendimiento en la producción porcícola, aunado a esto se encuentra un alto interés científico por la prevención de enfermedades en los cerdos, buscando alternativas terapéuticas que permitan evitar el abuso de antibióticos, por lo que, el uso de los probióticos como parte de la dieta de los animales es una área en franco desarrollo en la industria de alimentos y medicamentos veterinarios, lo que origina un marcado interés por las bacterias ácido lácticas y sus metabolitos, haciendo que el mundo científico se interese por conocer con mayor detalle el modo de acción de los probióticos y de las bacteriocinas en particular. Por esta razón, FES Cuautitlán ocupada en colaborar con el desarrollo y calidad de la industria porcícola, estudia las posibilidades de emplear la bacteriocina de *Lactobacillus casei* var *pseudopiantarum*, como terapia de prevención de la colibacilosis en lechones.

## 1.2 Hipótesis

Sí la "bacteriocina" de *Lactobacillus casei* var. *pseudopiantarum* inhibe el efecto citotónico producido por la toxina LT de *E. coli* en la línea celular VERO, entonces no se observarán cambios morfológicos en las células analizadas por microscopía electrónica.

## 2. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la capacidad de la "bacteriocina" de bloquear *in vitro* el efecto biológico de la toxina LT de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC).

### 2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener la toxina LT de *E. coli* enterotoxigénica por lisis celular.
- Obtener la "bacteriocina" de *Lactobacillus casei var. pseudopantarum* por centrifugación.
- Determinar la capacidad de la "bacteriocina" de *Lactobacillus casei var. pseudopantarum* de bloquear el efecto de la toxina LT de *E. coli* (ETEC) en la línea celular VERO.
- Evaluar el efecto que causa la "bacteriocina" de *Lactobacillus casei var. pseudopantarum* sobre el efecto citotónico de la toxina LT de *E. coli* en la línea celular VERO por **Microscopía Electrónica**.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Medios de cultivo

##### 3.1.1 Medios para crecer bacterias.

Los medios de cultivo empleados para el aislamiento, purificación y ensayos realizados fueron Agar McConkey (Bioxon), Agar Nutritivo (Bioxon), Agar Infusión de Cerebro y Corazón (Bioxon), Agar Rogosa, Caldo Infusión de cerebro y corazón (Bioxon), Caldo Nutritivo, Caldo Rogosa, Caldo CAYE-1, Caldo CAYE-2.

Todos los medios fueron preparados de acuerdo a las indicaciones del proveedor disolviendo la cantidad indicada de polvo en agua destilada, se esterilizaron en autoclave a 15 libras y 121°C durante 15 minutos. En el caso de los medios sólidos, se sirvieron en cajas petri agregando aproximadamente 20 mL por caja; mientras que los medios líquidos se sirvieron en tubos de ensaye adicionando 5 mL por tubo. Todos se sometieron a prueba de esterilidad incubando a 37°C durante 18 hrs.

#### 3.2 Cepas bacterianas

3.2.1 *Escherichia coli*. Cepa de campo aislada de lechones, biotipo enterotoxigénica (ETEC). Donada por la Dra. Clara Inés Álvarez del Laboratorio de Bacteriología Coordinación de Posgrado de la FESC.

3.2.2 *Lactobacillus casei var pseudopantarum*. Cepa aislada

### 3.3 Obtención de toxina de *E. coli* (ETEC)

Se tomo una colonia de *E. coli* de un cultivo puro con 18 hrs. de incubación y se inoculo a 7.5 mL de medio CAYE-1 el cual se incubo a 37°C en agitación a 120 rpm durante 24 horas. Posteriormente estos 7.5 mL fueron adicionados a 75 mL de CAYE-2 divididos en 3 matraces de 250 mL quedando 25 mL de CAYE-2 más 2.5 mL de CAYE-1 inoculado por matraz. Se incubaron a 37°C en agitación a 120 rpm por 24 hrs. Consecutivamente se centrifugo a 6000 rpm por 20 min. y se realizo un lavado con PBS estéril de pH 7.2 repitiendo la condiciones de centrifugación. La pastilla se resuspendió en 15 mL de una mezcla 2:1 de PBS-polimixina B y se incubo a 37°C en agitación a 120 rpm durante 10 min. Finalmente, se centrifugo a 4000 rpm por 15 min separando el sobrenadante.

### 3.4 Obtención de la "bacteriocina" de *Lactobacillus casei var pseudopantarum*

Para obtener la "bacteriocina" se inocularon tubos con 5 mL de caldo Rogosa con la cepa de *Lactobacillus* obtenida de un cultivo de 18 hrs en agar Rogosa. Una vez inoculados los tubos, se incubaron por 24 hrs a 37°C. Posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min. Se separo el sobrenadante colocándose en tubos estériles para su pronto empleo. Debido a que la "bacteriocina" no fue purificada se le considera extracto crudo.

### 3.5 Cultivo celular

3.5.1 Línea celular. Se emplearon células de la línea VERO (Riñón de Mono Verde Africano)

3.5.2 Medio de cultivo. Se empleo medio de crecimiento RPMI 1640 (Sigma). Su elaboración se realizo disolviendo el contenido de un frasco de medio en 1 litro agua desionizada, adicionándole piruvato de sodio, L-glutamina, antibióticos y rojo de fenol al 1%; y se ajusto el pH a 7.2. Se esterilizo por filtración y se sometió a prueba de esterilidad incubándolo a 37°C por 24 horas en la estufa. Se mantuvo en refrigeración hasta su uso. En el momento de ser empleado se agrego 10% de Suero Fetal Bovino estéril.

3.5.3 Tripsina Versene. Para la preparación se emplearon Tripsina (Sigma), EDTA (Merk) y rojo de fenol al 1%. Se disolvieron en agua desionizada y se ajustó el pH a 7.2, se esterilizó por filtración y se sometió a prueba de esterilidad incubándose a 37°C por 24 hrs. Se mantuvo en congelación.

3.5.4 Pase celular. Para mantener la línea celular se realizaron pases en cajas Falcon logrando así al mismo tiempo la producción de mayor número de células para ser empleadas. El procedimiento fue: a) despegar el monostrato celular que se ha adherido a la base de la caja agregando 3 mL de tripsina versene; se realiza un suave lavado y se desecha la tripsina. Este procedimiento se realiza tres veces y en el último lavado la caja con tripsina es incubada por 5 minutos a 37°C; b) las células son desprendidas de la caja y colocadas en un tubo para centrifugarse; c) se decantan

para eliminar la tripsina y entonces son resuspendidas con medio de cultivo (RPMI 1640); d) posteriormente se colocan en las cajas en donde ahora deberá formarse el monostrato celular incubándose a 37°C.

### 3.6 Cuantificación de proteínas.

Para la determinación de proteínas en las muestras se empleo la Técnica de Lowry modificada. Se realizó una curva de calibración con Albúmina sérica bovina como se muestra en el siguiente cuadro:

Sol(ml) / N°tubo	Bco/1	2	3	4	5	6	7	8	Mtra/9
<b>Mg prot.</b>	-	0.01	0.02	0.03	0.05	0.1	0.15	0.2	-
<b>Sol. Estándar</b>	-	0.02	0.04	0.06	0.1	0.2	0.3	0.4	-
<b>Sol. Salina</b>	0.4	0.38	0.36	0.34	0.3	0.2	0.1	-	-
<b>Muestra</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4
<b>Reactivo A</b>	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
			Mezclar	y dejar	reposar	10 min			
<b>Reactivo B</b>	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
		Mezclar	y dejar	reposar	30 min,	leer a	550 nm		

Las soluciones empleadas se prepararon de la siguiente forma:

- a) Solución estándar de proteína:
  - Albúmina sérica bovina.....0.1 g
  - Solución salina 0.85%.....100 mL
  
- b) Reactivo A:
  - Tartrato de Na y K (4%).....2 mL
  - Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / NaOH 0.1N (3%).....94 mL
  - Sulfato de Cobre (1%).....4 mL
  
- c) Reactivo B:
  - Reactivo de fenol diluido 1:2 con agua destilada

### 3.7 Evaluación de la actividad de la toxina LT y la "bacteriocina"

#### 3.7.1 Inhibición por gota

Se inocularon 3 tubos con Caldo BHI con un cultivo de 24 hrs de *Lactobacillus casei var pseudopantarum* crecido en agar Rogosa y se incubaron a 37° C por 24 hrs. posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min y se separo el sobrenadante. El precipitado de los tubos se resuspendió uno en buffer de Lactatos pH 3.52, otro en PBS pH 7.2 y otro en Solución Salina Fisiológica. Por otro lado se realizó un sembrado masivo en agar BHI con un cultivo de 24 hrs de *E. coli* crecida en caldo BHI con una concentración igual al tubo 1 del Nefelómetro de McFarland y se espero a que el inculo seicara para entonces adicionar 100 µL de sobrenadante, del precipitado de *Lactobacillus* y de las diferentes suspensiones realizadas con el precipitado en Buffer de Lactatos, PBS y SSF. Las cajas se incubaron a 37° C durante 24 hrs. Para poder evaluar el efecto del sobrenadante y del precipitado de *Lactobacillus* se emplearon como control el Buffer de Lactatos pH 3.52, el PBS pH 7.2 y la SSF. Cada muestra se trabajo por triplicado.

#### 3.7.2 Unidades Formadoras de Colonias

Se trabajo con un cultivo de 24hrs de *E. coli* en caldo BHI. De este cultivo se tomaron 100 µL y se agregaron a 5 mL de caldo BHI los cuales se incubaron a 37° C por 3hrs con agitación a 120 rpm. Posteriormente se tomaron 200 µL de este cultivo y se adicionaron a 5 mL de sobrenadante de un cultivo de 24hrs de *Lactobacillus*. Se

tomaron 0.5 mL del sobrenadante mas *E. coli* y se adicionaron a 4.5 mL de SSF al 0.85% mezclándolos, enseguida se tomaron 0.5 mL de dicha mezcla para adicionarlos a otros 4.5 mL de SSF y se siguió el mismo proceso hasta realizar diluciones de  $10^0$  a  $10^{-6}$ . Como control se emplearon 5 mL de caldo Rogosa mas 200  $\mu$ L de *E. coli* con las mismas condiciones realizándose diluciones de  $10^0$  a  $10^{-9}$ . Cada una de las diluciones se sembró colocando 10  $\mu$ L en agar McConkey y se incubaron 18hrs a 37°C. Todas las diluciones se sembraron por triplicado.

### 3.7.3 Evaluación de la Toxina LT y de la "bacteriocina" en células VERO

Se realizaron diluciones dobles seriadas desde 1:2 hasta 1:256 de la "bacteriocina" y diluciones 1:2, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50 y 1:100 de la toxina. Se prepararon microplacas con monostratos de células VERO a las cuales se les agregaron la "bacteriocina" y toxina de la siguiente forma: Se colocaron 20  $\mu$ L de "bacteriocina" y de cada una de sus diluciones por pozo y a cada pozo se le adicionaron 20  $\mu$ L de toxina. La microplaca se incubo a 37° C y posteriormente se observó la presencia de un efecto en las células. Se realizo el mismo procedimiento con cada una de las diluciones de la toxina.

Por otro lado, se llevaron a cabo mezclas de "bacteriocina" más toxina, sin diluir, con las siguientes proporciones: 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10; las cuales se incubaron por 4 hrs. a 37° C. Posteriormente a una microplaca con monostrato celular VERO se le agregaron 20  $\mu$ L de cada una de las diferentes mezclas por pozo y se incubo a 37° C por 18 hrs.

Para evaluar la influencia del tiempo en la acción de ambos biológicos; "bacteriocina" y toxina LT, y determinar en que tiempo se presenta el efecto esperado, las microplacas se incubaron a 37° C por diferentes intervalos de tiempo: 4, 9.5, 18 y 24 horas.

Una vez establecidas estas condiciones, se inoculo otra microplaca con las concentraciones elegidas desarrollando el siguiente modelo experimental:

	<i>MUESTRA</i>	<i>INOCULO (μL/pozo)</i>
CONTROL POSITIVO	Toxina	200
CONTROL NEGATIVO	"Bacteriocina"	200
EVALUACION	Mezcla 1:1 toxina/bacteriocina	200
BLANCO	Caldo Rogosa	200

Se incubo por 18 horas a 37°C. Después las muestras se observaron en el microscopio invertido, en el microscopio de contraste de fases y en el microscopio electrónico de transmisión. Todas las muestras se trabajaron por triplicado.

### 3.8 Microscopía electrónica de transmisión.

Una vez realizado el procedimiento para la evaluación de ambos biológicos, el medio de cultivo de la microplaca es retirado. Las muestras se lavan con PBS estéril pH 7.2 y son procesadas como se describe a continuación.

### 3.8.1 Procesamiento de muestras

#### a) Fijación de muestras:

- Se adiciono fijador de Karnosky (Glutaraldehido/Paraformaldehido) a cada uno de los pozos manteniéndose en refrigeración durante 2hrs.
- Posteriormente las muestras se lavaron 2 veces con PBS pH 7.2.
- Se adiciono tetróxido de osmio y se dejo actuar por 2hrs.
- Se lavaron las muestras 2 veces durante 10 min con PBS pH 7.2
- Se realizo la deshidratación agregando etanol de diferentes concentraciones (v/v), desde 50% hasta 100%, por diferentes períodos de tiempo.

#### b) Infiltración con Hidroxipropilmetacrilatos (HPMA):

- Se adiciono una mezcla 1:1 de HPMA con etanol absoluto en dos ocasiones por un período de 10 min cada una.
- Enseguida se agrego HPMA por 20 min en tres ocasiones, adicionando en el último cambio 0.5% de azul de Toluidina.

#### c) Inclusión en resina:

- Se adiciono una mezcla 1:2 de resina epoxica con HPMA por 20 min.
- Después, una mezcla 1:1 de resina epoxica con HPMA por 20 min.
- Y una mezcla 2:1 de resina epoxica con HPMA por 20 min.
- Se agrego resina pura en 3 ocasiones realizando los cambios cada 30 min. Los pozos se cubrieron nuevamente con resina pura y se polimerizo a 60°C.

### 3.8.2 Realización de cortes

Para realizar los cortes se empleó un ultramicrotomo con cuchilla de vidrio. Se obtuvieron cortes semifinos y ultrafinos.

### 3.8.3 Tinción de muestras

a) Cortes semifinos. Se empleó el colorante Azul de Toluidina al 1%. Se colocaron los cortes en un portaobjetos y se les adicionó el colorante, después de 10min se enjuagaron con agua corriente y se secaron a temperatura ambiente.

b) Cortes ultrafinos. Se utilizó la Tinción electroconductiva de Reynolds. Los cortes se colocaron en rejillas de cobre que estuvieron en contacto con acetato de uranilo durante 5min, posteriormente se lavaron con agua destilada y se secaron con papel filtro. Después, en una cámara húmeda, se pusieron con el tinte de plomo (Reynolds), se lavaron y secaron de la forma anterior.

### 3.8.4 Análisis de muestras

a) Cortes semifinos. Se observaron en el microscopio de contraste de fases con los objetivos de 40x y 100x.

b) Cortes ultrafinos. Se observaron en el microscopio electrónico de transmisión a diferentes aumentos.

Diagrama N° 1. Obtención y evaluación de toxina LT y "bacteriocina".

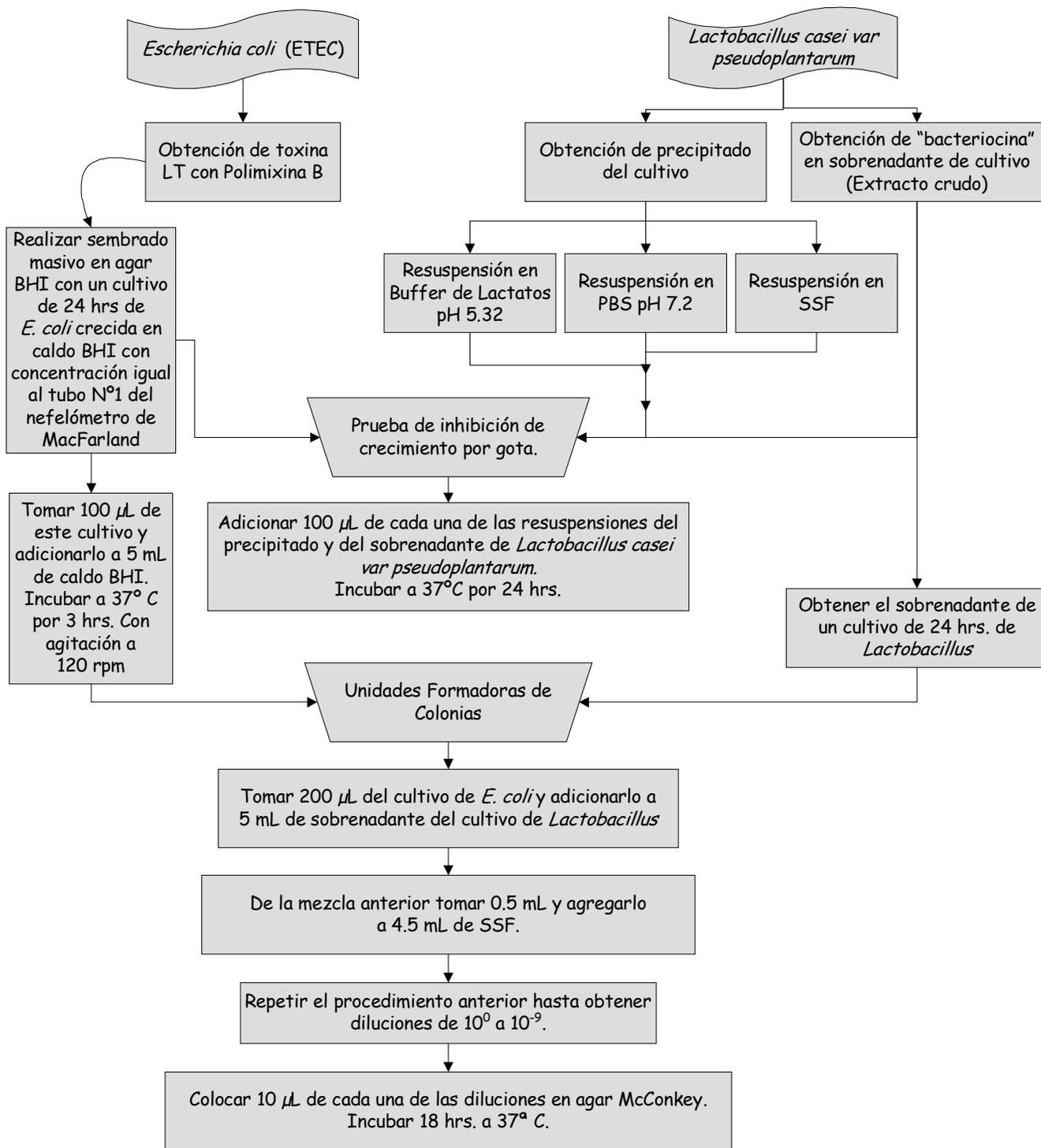


Diagrama N° 2. Evaluación de la toxina LT y la "bacteriocina" en cultivo celular.

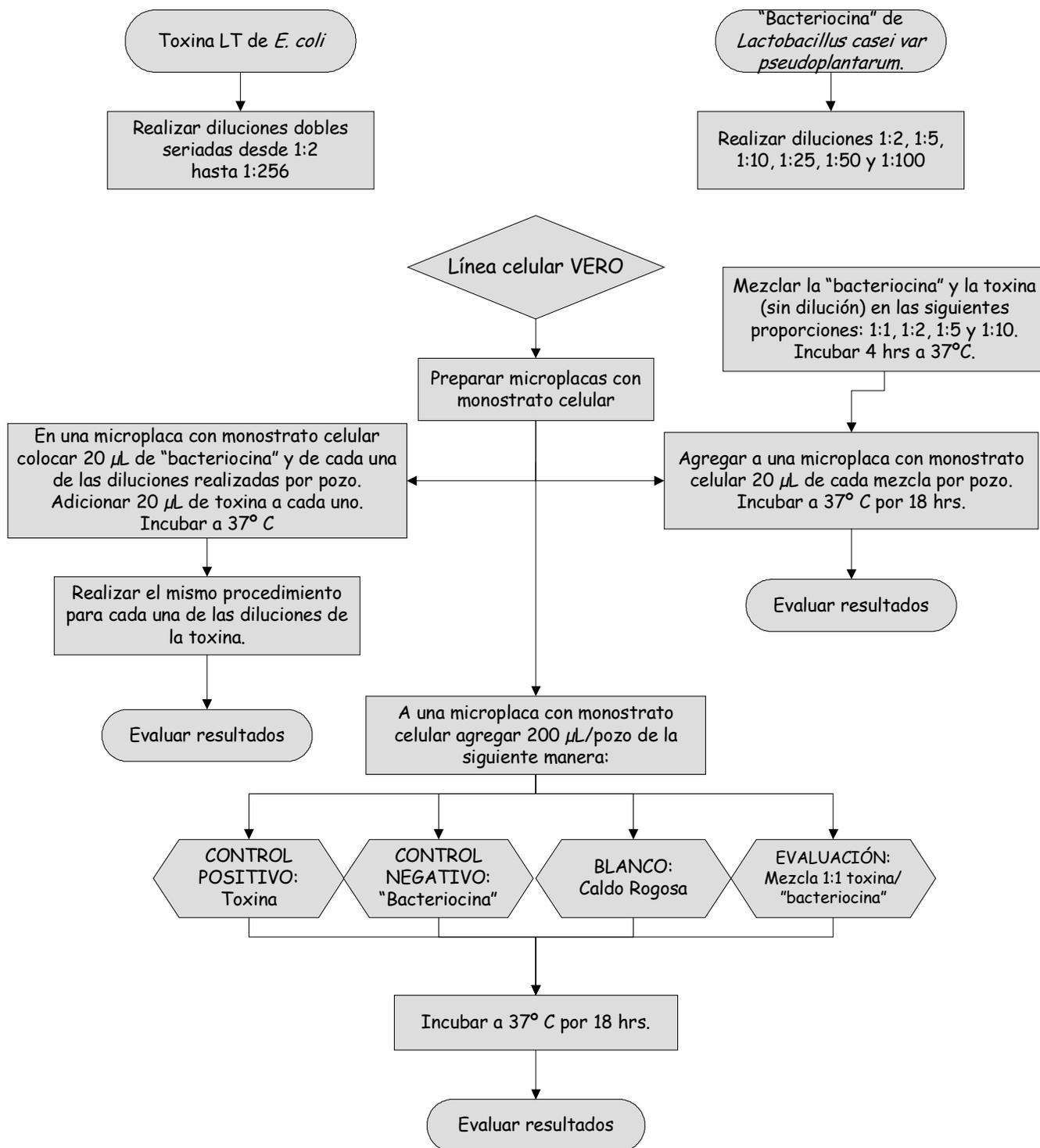
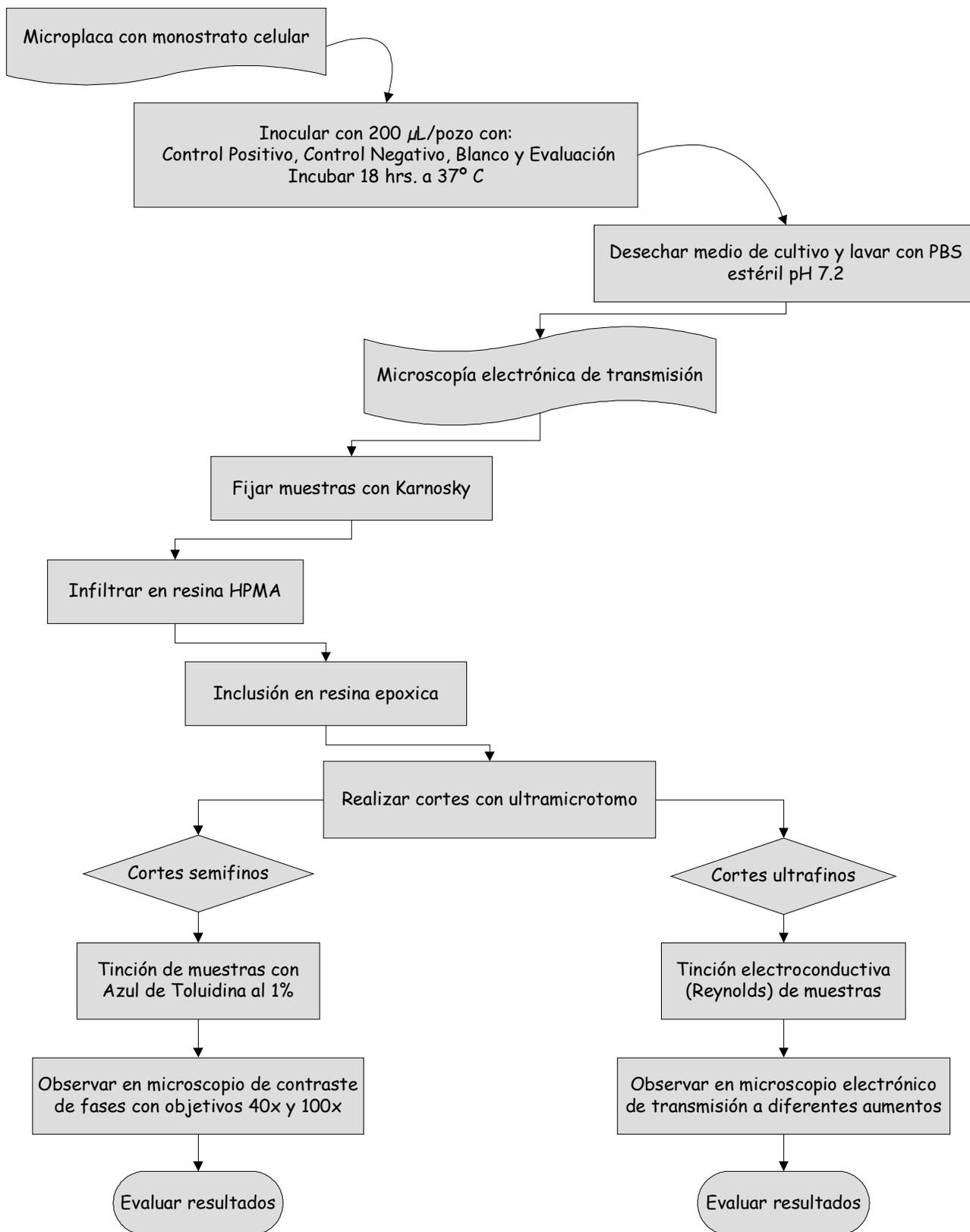


Diagrama N° 3. Evaluación por microscopía electrónica.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Evaluación de la actividad de la toxina LT y la "bacteriocina"

Para evaluar la actividad de la "bacteriocina" se realizó una prueba de inhibición de crecimiento en placas con agar BHI a las que se agregaron inóculos de 100  $\mu$ l de las diferentes suspensiones preparadas así como del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus casei var pseudopantarum*.

#### 4.1.1 Inhibición por gota

Los resultados que se obtuvieron durante este procedimiento se muestran en la **TABLA N° 1**. Como se observa hubo la inhibición de crecimiento de *E. coli* producida por el precipitado del cultivo de *Lactobacillus casei var pseudopantarum* resuspendido en Buffer de lactatos pH 5.32, en PBS pH 7.2 y en SSF, además del sobrenadante ("bacteriocina") del mismo cultivo. Se observó que para el caso de la muestra de precipitado resuspendido en Buffer de Lactatos pH 5.32 el resultado es positivo, es decir se muestra una clara inhibición en el crecimiento de *E. coli* en la zona en donde se adicionó el inóculo de dicha muestra. Por otro lado, en los casos en donde el precipitado fue resuspendido en PBS pH 7.2 y en solución salina fisiológica no se presenta ningún halo de inhibición en el crecimiento bacteriano por lo tanto se reporta como negativo. Sin embargo, el resultado obtenido con el sobrenadante del cultivo de

*Lactobacillus casei var pseudoplantarum* es positivo, lo cual indica que el sobrenadante de dicho cultivo inhibe el crecimiento de *E. coli* en la zona en donde es agregado.

**TABLA N° 1:** Prueba de inhibición de crecimiento de *E. coli* con las diferentes suspensiones preparadas.  
\* pp : Precipitado del cultivo de *Lactobacillus casei var pseudoplantarum*

N° Prueba/ Muestra	pp / Buffer Lactatos pH 5.32	pp /PBS pH 7.2	pp / SSF	Sobrenadante
Tubo 1	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
Tubo 2	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
Tubo 3	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo

Para tener la certeza de que los resultados obtenidos son correctos, como parte de la prueba de inhibición por gota se evaluaron las soluciones empleadas para la resuspensión del precipitado del lactobacilo realizando el mismo procedimiento con las 3 muestras control. Los resultados se muestran en la **TABLA N° 2**.

El Buffer de Lactatos pH 5.32 produjo inhibición de crecimiento de *E. coli*, esto debido a que pHs ácidos no favorecen el desarrollo de esta bacteria; mientras que en el caso del PBS pH 7.2 y la SSF no se presenta inhibición alguna por ser soluciones con pH neutro y de concentraciones salinas óptimas para el desarrollo de microorganismos. Esto nos indica que en la muestra de precipitado resuspendido en Buffer de Lactatos pH 5.32 quien en realidad produce la inhibición del crecimiento de *E. coli* es el Buffer

y no el precipitado del cultivo. Por esa razón en las muestras de precipitado en PBS y en SSF no hay efecto inhibitorio.

**TABLA N° 2.** Controles empleados en las prueba de inhibición de crecimiento en placa.

CONTROLES	RESULTADO
Buffer Lactatos pH 5.32	Positivo
PBS pH 7.2	Negativo
SSF	Negativo
Medio cultivo (Caldo Rogosa)	Negativo

#### 4.1.2 Unidades Formadoras de Colonias

Otro método empleado para analizar la actividad de la "bacteriocina" de *Lactobacillus casei var pseudoplantarum* fueron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) de una mezcla del cultivo de *E. coli* más el sobrenadante ("bacteriocina") del cultivo de *Lactobacillus casei var pseudoplantarum*. Los resultados se muestran en la **TABLA N°3**. Como podemos observar, en los tubos N°1 y N°2 que corresponden a las diluciones  $10^0$  y  $10^{-1}$  respectivamente, el crecimiento que se observo fue incontable, mientras que a partir de la dilución  $10^{-2}$  las UFC empezaron a disminuir de forma considerable hasta llegar a la dilución  $10^{-5}$  en donde ya no hubo crecimiento. Por otro lado, si observamos los resultados de la muestra control, cultivo de *E. coli*, desde la dilución  $10^0$  hasta la dilución  $10^{-3}$  las UFC/mL siguen siendo incontables y hasta llegar a la dilución  $10^{-6}$  ya no se presenta crecimiento.

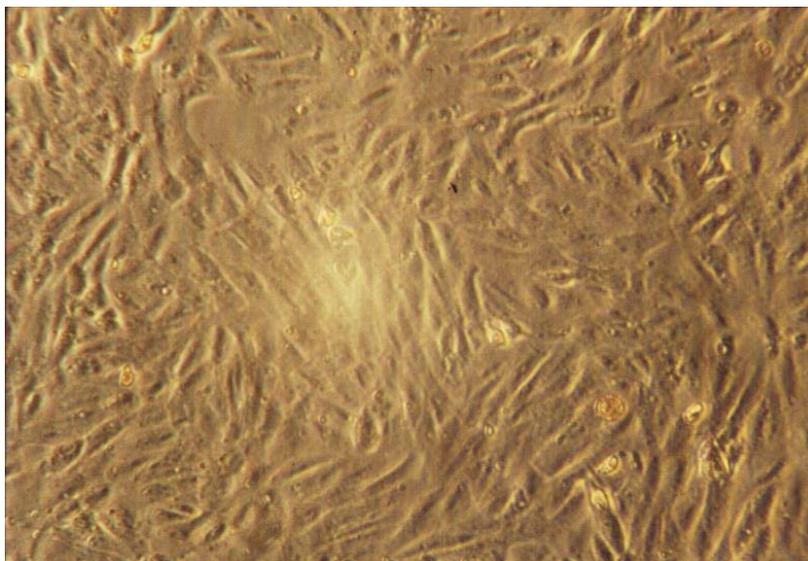
En base a el número de UFC/mL encontrado para cada dilución y a los cálculos aritméticos correspondientes podemos mencionar que en la mezcla de *E. coli* con el sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus casei var pseudopantarum* se muestra una inhibición de crecimiento de *E. coli* del 80% de acuerdo con el número de UFC/mL encontrado en el sistema control lo cual indica que el sobrenadante "bacteriocina" de *Lactobacillus* contiene metabolitos capaces de inhibir el crecimiento de *E. coli*.

**TABLA N° 3** Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) de *Escherichia coli* y del sobrenadante ("bacteriocina") de *Lactobacillus casei var pseudopantarum*.

Dilución / N° Prueba	1	2	3	Promedio	Control (Promedio)
10 <sup>0</sup>	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
10 <sup>-1</sup>	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
10 <sup>-2</sup>	208	204	200	204	Incontables
10 <sup>-3</sup>	22	15	18	18.3	Incontables
10 <sup>-4</sup>	2	1	2	1.6	92.5
10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	15.5
10 <sup>-6</sup>	0	0	0	0	0

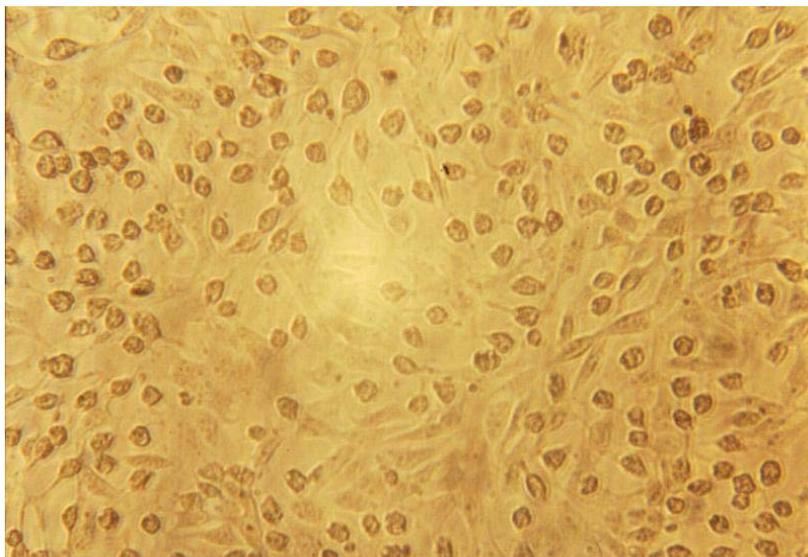
#### 4.1.3 Evaluación en células VERO.

Posterior a la evaluación en placa se realizó una valoración del efecto de la "bacteriocina" y de la toxina LT en cultivo celular, específicamente en la línea celular VERO y se tomaron fotografías de los resultados en el Microscopio invertido. En la **Fig N° 1** se muestra un cultivo con la morfología normal de la línea celular VERO. Es un cultivo con 100% de confluencia, reproducido con medio de cultivo RPMI 1640 y bajo el procedimiento ya mencionado. Todas las células empleadas durante el desarrollo del experimento fueron obtenidas mediante el mismo proceso y con las mismas características. Se observa su morfología normal ligeramente alargada y todas las células se encuentran adheridas a la microplaca. Para poder diferenciar los cambios que se producen con la adición de Toxina LT, bacteriocina o la mezcla de ambas este cultivo se empleo como BLANCO.



**Fig. N° 1.** Estrato celular VERO sin tratamiento. (BLANCO).

**Fig N° 2.** En esta imagen se observa el cambio morfológico de las células VERO una vez inoculadas 200  $\mu$ L de la toxina LT de *E. coli* (ETEC) y transcurrido el tiempo de incubación. Las células pierden su forma normal alargada, se muestran redondeadas y desprendidas del resto del monostrato celular presentando un "efecto citopático". Este cultivo se emplea como CONTROL POSITIVO de la acción de la toxina LT sobre las células VERO.



**Fig. N° 2** Estrato celular VERO con inóculo de toxina LT de *Escherichia coli*.

**(CONTROL POSITIVO)**

En la Fig N° 3 se observa otro cultivo de la misma línea celular inoculado con 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante "bacteriocina" de un cultivo de *Lactobacillus casei* var. *pseudopantarum*. Este cultivo presenta características morfológicas normales y no hay células desprendidas del resto del monostrato, se puede decir que estas células se muestran iguales a las células sin algún tratamiento (BLANCO). . Esto indica que la "bacteriocina" no produce ningún efecto sobre las células VERO. Este cultivo se empleo como CONTROL NEGATIVO.

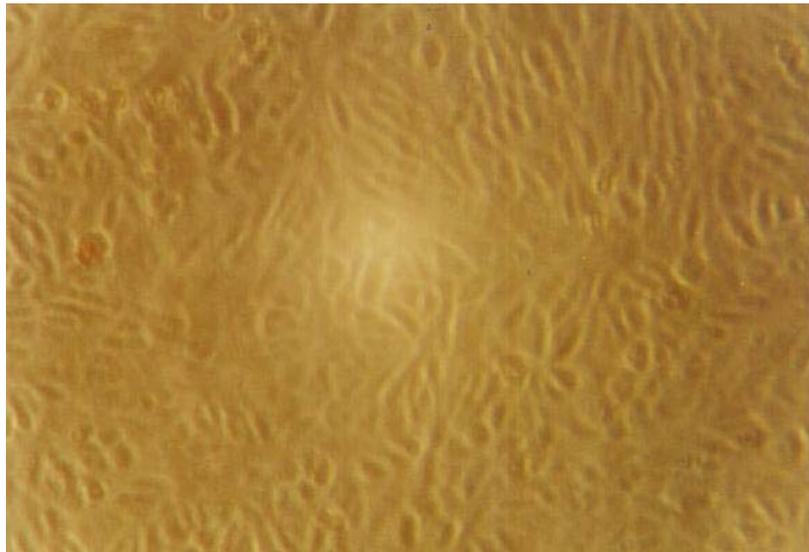


Fig. N° 3 Estrato celular VERO con sobrenadante de *Lactobacillus casei* var *pseudopantarum*  
"bacteriocina" (CONTROL NEGATIVO)

Finalmente, en la figura N° 4, se puede observar a las células inoculadas con la mezcla 1:1 de la toxina LT *E. coli* y el sobrenadante ("bacteriocina") de *Lactobacillus casei var pseudopantarum*. Este cultivo se muestra normal igual a un monostrato sin inóculo alguno sin alteraciones morfológicas ni la pérdida de confluencia, lo cual indica que la toxina LT no presenta ningún efecto sobre la línea celular. Tomando en cuenta que la toxina sola si produce un efecto "citotónico" sobre las células, estos resultados indican que la "bacteriocina" inhibe dicho efecto y por lo tanto tampoco hay alteraciones morfológicas.

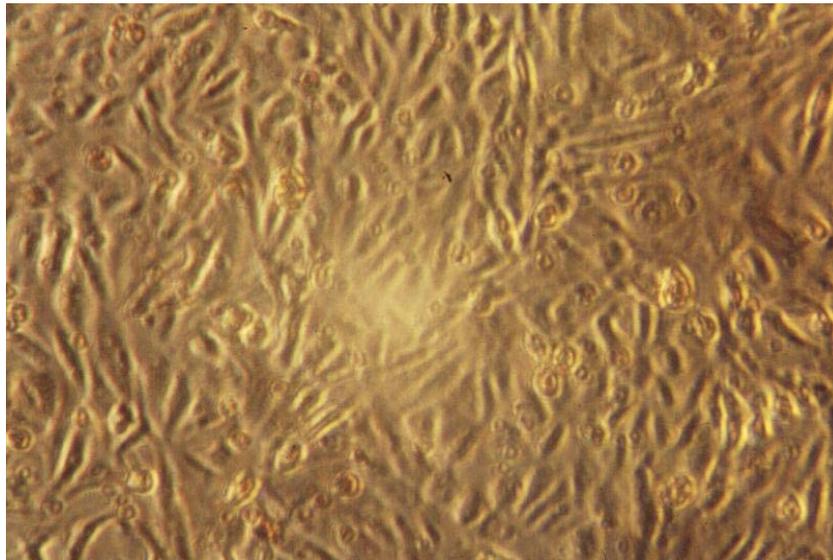


Fig. N° 4 Estrato celular VERO con mezcla 1:1 de toxina LT de *Escherichia coli* y sobrenadante con "bacteriocina" de *Lactobacillus casei var pseudopantarum*. (EVALUACIÓN)

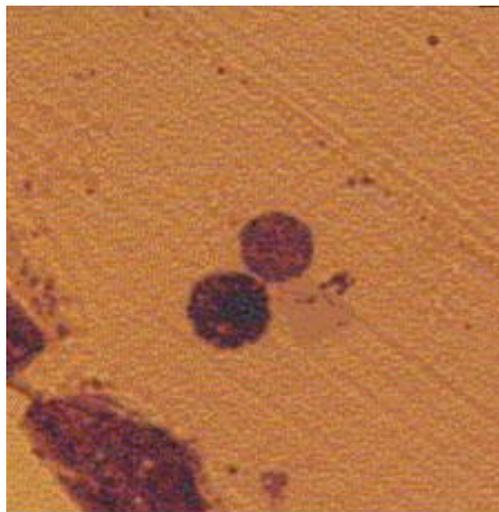
Al observar los cultivos de células VERO se puede observar claramente que al agregar la toxina LT a dichas células éstas se desprenden del estrato celular y adquieren una forma redondeada que las diferencia de las células sanas que son de forma alargada. Al ver las células adicionadas con sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus casei* var *pseudopantarum* no hay modificación en la línea celular ya que mantienen su forma original al igual que al observar el cultivo adicionado con la mezcla de sobrenadante con Toxina LT las células mantienen su estado original por lo que podemos darnos cuenta de que el sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus casei* var *pseudopantarum* "bacteriocina" inhibe el efecto citotóxico de la toxina LT de *Escherichia coli*.

## 1.1 Microscopía electrónica de transmisión.

Después de evaluar la acción de la "bacteriocina" de *Lactobacillus casei var pseudopantarum* y de la toxina LT de *E. coli* se prepararon nuevos cultivos celulares bajo las mismas condiciones experimentales para ser procesadas y analizadas en cortes semifinos y ultrafinos.

### 4.2.1 Cortes semifinos. Tinción Azul de Toluidina al 1%

En la **Fig N° 5** se muestra un corte semifino, hecho en ultramicrotomo y posteriormente teñido con azul de toluidina al 1%. Observamos células VERO normales, sin tratamiento alguno.



**Fig. N° 5** Células VERO. (BLANCO)

En la Fig. N° 6 se puede observar un corte semifino de las células VERO inoculadas con toxina LT de *Escherichia coli*. Al compararlas con las células blanco vemos que su morfología se encuentra alterada.

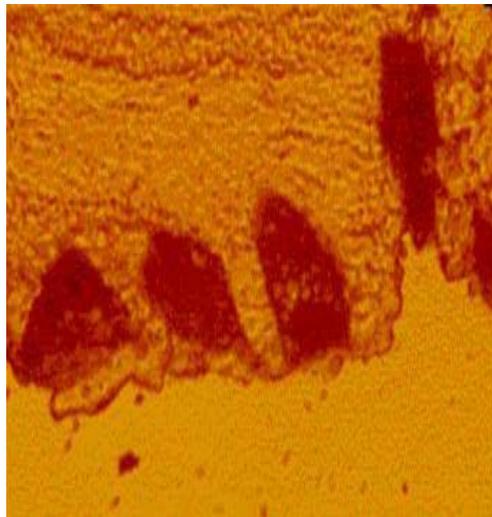


Fig. N° 6 Células VERO con toxina LT de *Escherichia coli*.

(CONTROL POSITIVO)

Esta fotografía, Fig. N° 7, muestra a las células VERO inoculadas con el sobrenadante de *Lactobacillus casei var pseudopantarum* "bacteriocina". Se observa como la morfología celular no se ve afectada con la adición de dicho inóculo.

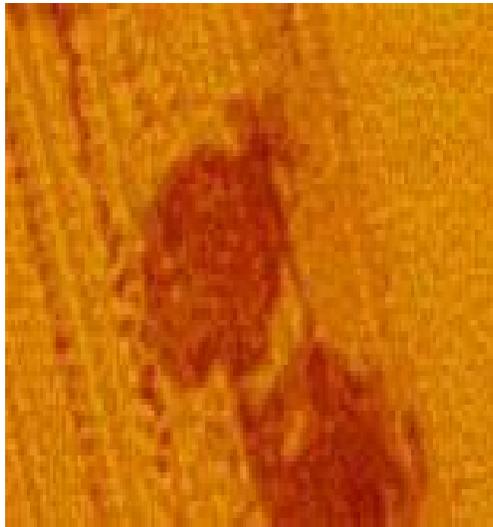
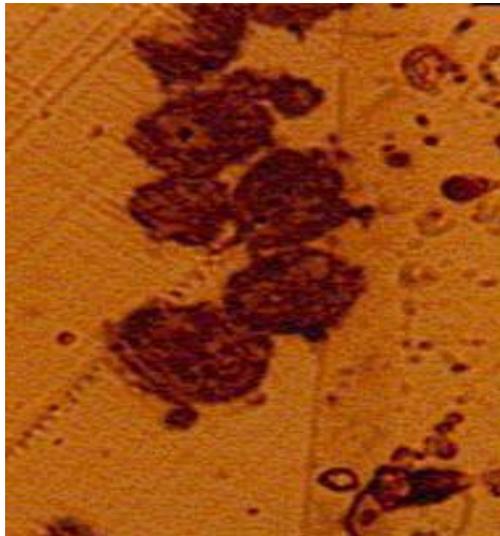


Fig. N° 7 Células VERO con sobrenadante de *Lactobacillus casei var pseudopantarum*, "bacteriocina".

(CONTROL NEGATIVO)

**Fig. N° 8.** En esta fotografía se muestra a las células VERO inoculadas con la mezcla 1:1 de toxina LT de *Escherichia coli* y sobrenadante de *Lactobacillus casei* var *pseudopantarum* "bacteriocina", observándose a las células sin alteraciones morfológicas.

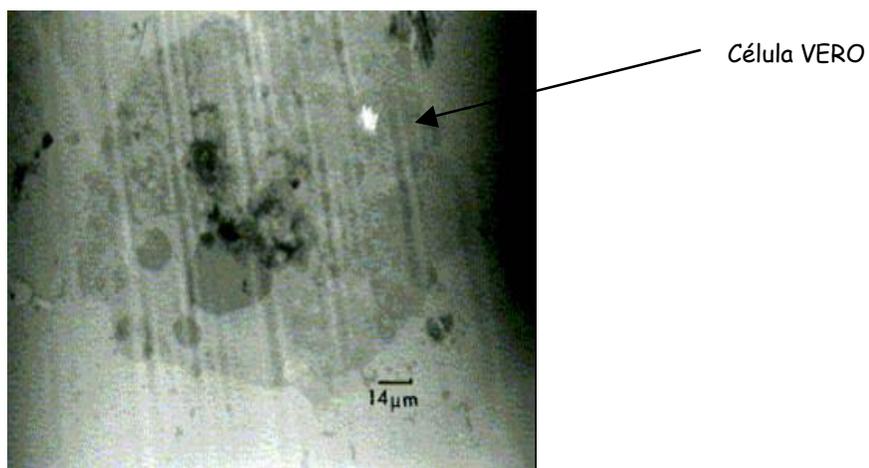


**Fig. N° 8** Células VERO con mezcla 1:1 de toxina LT de *Escherichia coli* y sobrenadante con "bacteriocina" de *Lactobacillus casei* var *pseudopantarum*. (EVALUACIÓN)

Al analizar las fotos obtenidas de los cortes semifinos se observa que las células inoculadas con la toxina LT pierden su forma normal mientras las células a las que solo se les adicionó sobrenadante "bacteriocina" o la mezcla del sobrenadante "bacteriocina" con toxina LT no hay alteración en la morfología celular.

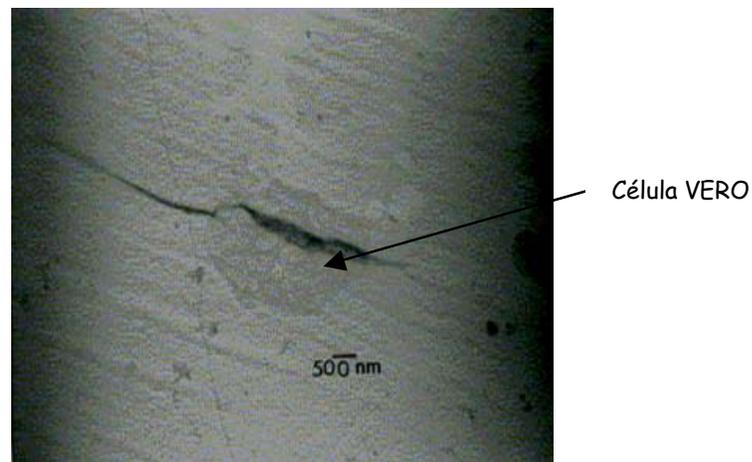
#### 4.2.2 Cortes ultrafinos. Tinción electroconductiva de Reynolds.

La **Fig. N° 9** se observa un corte ultrafino, realizado en ultramicrotomo y sometido a una tinción electroconductiva con plomo (Tinción de Reynolds). Se muestra una célula VERO sin tratamiento, la podemos observar morfológicamente normal, se aprecian sus organelos y su membrana citoplasmática bien definida.



**Fig. N° 9** Células VERO . (BLANCO).

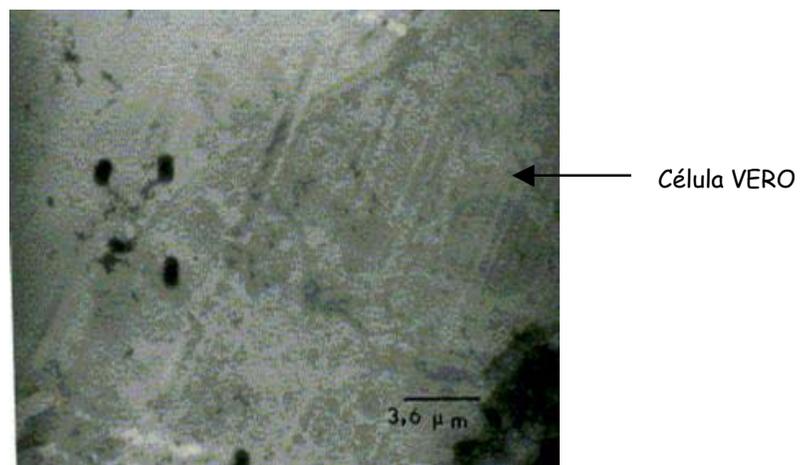
**Fig. N ° 10.** Esta fotografía muestra a las células VERO expuestas a la toxina LT, observándose que en general su morfología se encuentra alterada, algunos de sus organelos se pierden, su membrana citoplasmática se ve afectada y el citoplasma presenta la formación de varias vacuolas.



**Fig. N° 10** Células VERO con toxina LT de *Escherichia coli*.

**(CONTROL POSITIVO)**

**Fig. N° 11.** En esta fotografía se observa a las células VERO expuestas a la mezcla de toxina LT con sobrenadante "bacteriocina", observandose que su morfología es prácticamente normal, sus organelos se distinguen claramente y presenta una membrana citoplasmática bien definida.



**Fig. N° 11** Células VERO con mezcla 1:1 de toxina LT de *Escherichia coli* y sobrenadante con "bacteriocina" de *Lactobacillus casei var pseudopantarum*. (EVALUACIÓN)

Por otro lado, al observar las fotos del microscopio electrónico se puede ver que las células expuestas a la toxina LT se llenan de vacuolas y pierden algunos de sus orgánulos, lo cual indica que la toxina altera el metabolismo de las células, lo que llega incluso a producir una lisis celular, mientras que las células que son puestas en contacto con la mezcla sobrenadante "bacteriocina" más toxina LT no sufren alteración alguna, ya que mantienen su estructura original y no se presenta pérdida de orgánulos celulares.

## 5. DISCUSIÓN

Durante muchos años una serie de factores y cambios tanto biológicos como industriales han afectado el desarrollo de la ganadería porcina. La mayoría de estos cambios han sido el resultado de la presión económica competitiva en la producción de cerdos, dejando de lado la importancia tanto de la evolución en las enfermedades como en la especie porcina. El deseo por mejorar la calidad de los productos porcícolas para tener mayor cantidad de ingresos económicos, ha permitido que el sistema de producción abuse de algunas herramientas con el fin de lograr su objetivo.

Las diarreas siguen siendo un problema de salud en las granjas y no solo en una etapa de desarrollo del cerdo, ni mucho menos causada por un solo agente infeccioso, peor aún son la causa de grandes pérdidas económicas para el porcicultor.

La colibacilosis es causante de la muerte o pérdida de muchos lechones y desafortunadamente los antibióticos carecen cada vez más de la eficiencia necesaria para controlar esta enfermedad y no porque el antibiótico *per se* no actúe correctamente si no porque las bacterias patógenas han evolucionado para volverse resistentes a los mismos.<sup>26,30</sup>

Este problema se presenta a nivel mundial, no sólo en México; por eso la Comunidad Económica Europea (CCE) ha buscado la forma de corregir esta situación implementando medidas de control en el uso de antibióticos durante el proceso de producción animal. Aunque para algunos sectores pecuarios la prohibición en el uso de

antimicrobianos, como aditivos, tendrá un impacto significativo en los productores de alimentos de origen animal debido al incremento en la incidencia de diarrea en lechones debida a *E. coli* al igual que de otras enfermedades, así como, la disminución en el nivel de productividad animal y el encarecimiento de los costos de los productos derivados de estos, la actividad más intensa en la producción animal en Europa es encontrar alternativas para discontinuar el uso de antibióticos. Así pues, hay una intensa investigación iniciada por la industria de nutrición animal para encontrar nuevos productos que sustituyan a los antimicrobianos prohibidos ahora (o en corto plazo) como aditivos.<sup>18</sup>

Existen diversas herramientas mediante las cuales el productor porcícola y los nutricionistas pueden superar la prohibición del uso de antibióticos: I) un mejor manejo de los animales; II) cambios en los programas de alimentación y formulación de dietas; III) suplementación de la dieta con nuevos aditivos.<sup>18</sup>

Actualmente, hay varios aditivos que han mostrado tener efectos benéficos sobre el comportamiento productivo y el control de las enfermedades a nivel subclínico.<sup>11</sup>

Dentro de las opciones para la sustitución de antibióticos en la producción animal se encuentran los probióticos, los cuales pueden ser empleados en diversas formulaciones, en seres humanos o en animales y lo más importante como tratamiento preventivo de diversas enfermedades. Los probióticos pueden ayudar de muchas formas a los organismos; ya sea empleando microorganismos completos, casi siempre bacterias ácido-lácticas, o metabolitos o fracciones de las mismas.<sup>11,12</sup> Las

bacteriocinas son metabolitos capaces de evitar que microorganismos patógenos como *E. coli* enterotoxigénica, causante de la colibacilosis, logren afectar a su hospedero causándole una diarrea que pudiera ser mortal.<sup>13</sup>

La investigación desarrollada con el fin de conocer el efecto que puede tener el empleo de la "bacteriocina" de *Lactobacillus casei* var *pseudoplantarum*, sobre la toxina LT de *E. coli* mostró resultados sumamente favorables y aunque las pruebas que se realizaron fueron *in Vitro*, los datos obtenidos permiten saber que dicha "bacteriocina" sería capaz de inhibir el efecto de la toxina LT de *Escherichia coli* en los lechones.

Los resultados muestran claramente el efecto "citotónico" que produce la toxina LT sobre la línea celular VERO, efecto que la "bacteriocina" es capaz de inhibir cuando se pone en contacto con las células y no sólo en la línea celular, puesto que en las otras pruebas realizadas se pudo observar que la "bacteriocina" también inhibe el crecimiento de *E. coli* en medios de cultivo.<sup>3,20</sup> Además, este estudio empleó para algunas pruebas como inhibición de crecimiento y unidades formadoras de colonias (UFC/mL) a la *Escherichia coli* completa mientras que para las pruebas en cultivo celular solo se empleó su toxina, permitiéndole tener un panorama más amplio del alcance que puede tener el uso de la "bacteriocina" en estudio si es administrada a los lechones. Esto nos deja claro que dicha "bacteriocina" tiene diferentes mecanismos de acción, ya que inhibe tanto el crecimiento de *E. coli* como el efecto de la Toxina LT.<sup>27,33,</sup>

Por otro lado, las fotografías tomadas a los cultivos celulares con el Microscopio Electrónico de transmisión muestran que la estructura celular de la línea VERO se ve afectada por la Toxina LT causando la formación de vacuolas internas que probablemente inducirían muerte celular. De la misma manera, se puede confirmar que al adicionar la "bacteriocina" en una mezcla 1:1 con la toxina LT las células no se ven afectadas y mantienen su estructura sin daños o cambios perceptibles. Esto indica que la "bacteriocina" inhibe a la toxina como tal y no el efecto que pueda causar en las células; probablemente la bacteriocina se adhiera a la toxina evitando así que los receptores de las células blanco la reconozcan y no permitan su entrada; o la "bacteriocina" compite con la toxina LT por los receptores de la célula blanco.<sup>14</sup> Lo que si queda claro es que la "bacteriocina" de *Lactobacillus casei* var *pseudopantarum* evita que la toxina LT de *E. coli* produzca diarrea en los lechones.<sup>14,18</sup>

A pesar de que para otros autores el método empleado con el cultivo celular no es el más eficiente<sup>16</sup>, se obtuvieron los resultados deseados y se logro diferenciar e identificar el efecto citotónico causado por LT en las células así como la inhibición de dicho efecto al emplear la "bacteriocina".

La importancia del estudio radica en proporcionar a los porcicultores una opción para eliminar el uso de antibióticos, seguros de que esto no producirá pérdidas económicas, ya que al administrar a los animales un probiótico ("bacteriocina") al mismo tiempo que se evita o controla la colibacilosis en los cerdos, se les proporcionan otros beneficios propios de los probióticos tales como mejoras en el funcionamiento

del Sistema Inmunológico y el control o prevención de otras infecciones, sin que sea necesaria la administración simultánea de diferentes productos; no crean resistencia y no son sustancias de origen sintético.<sup>18</sup>

Cabe mencionar que los objetivos se cumplieron ya que se obtuvieron la toxina LT de *E. coli*, la "bacteriocina" de *Lactobacillus casei var pseudopantarum* y se determinó el efecto que ambas producen en la línea celular VERO además de obtener buenos resultados en la evaluación realizada por Microscopía electrónica de transmisión. Finalmente, la hipótesis planteada fue correcta.

## 6. CONCLUSIONES

- Se obtuvo la toxina LT de *Escherichia coli* (ETEC) mediante el método de lisis celular
- Se obtuvo la "bacteriocina" de *Lactobacillus casei var pseudopiantarum* con el método de centrifugación.
- La bacteriocina de *Lactobacillus casei var pseudopiantarum* es capaz de inhibir el efecto "citotóxico" de la toxina LT de *Escherichia coli* (EETEC) en la línea celular VERO.
- La bacteriocina de *Lactobacillus casei var pseudopiantarum* inhibe el efecto de vacuolización y lisis celular de la toxina LT de *Escherichia coli* (EETEC) observado por Microscopía electrónica de transmisión.

## 7. REFERENCIAS.

1. **Alexander D. Hyatt, Bryan T. Eaton.** (1993). *Imunogold Electron Microscopy in Virus Diagnosis and Reserch.* CRC Press. USA. pgs. 177 - 208.
2. **Altamirano F. A., Alvarez M. A., Trejo B. R., Ciprián C. A., Hernández B. E., González G. S., Robles G. R., Mendoza E. S.** (2001). Estudio por microscopía electrónica del efecto de la bacteriocina de *Lactobacillus casei* var *pseudoplantarum* sobre la toxina LT de *Escherichia coli*. *Memorias XXXVI Congreso AMVEC.* pg 46.
3. **Alvarez M. A., Ciprián C. A. Altamirano F. A., Hernández B. E., Mendoza E. S.** (2001). Efecto sobre la bacteriocina de *Lactobacillus casei* var *pseudoplantarum* sobre la toxina LT de *Escherichia coli* en células VERO. *Memorias XXXVI Congreso AMVEC.* pg 47.
4. **Babak N. Noamani, John M. Fairbrother, Carlton L. Gyles.** (2003). Virulence genes of O149 enterotoxigenic *Escherichia coli* from outbreaks of postweaning diarrhea in pigs. *Veterinary Microbiology* 97: 87- 101.
5. **Cicuta M. E., Miranda A. O., Roibon W. R., Benítez M. C., Boehringer S. I., Barceló M. C., Aragon L. R., Kunert J. A.** (2000). Prueba de Inmunogenicidad en una vacuna contra la colibacilosis porcina. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas* 2000.
6. **Christiane Forestier, Christophe De Champs, Catherine Vatoux, Bernard Joly.** (2001). Probiotic activities of *Lactobacillus rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research Microbiology.* 152: 167 - 173.
7. **Earl J. Kirkland.** (1998). *The Transmission Electron Microscope.* In *Advanced Computing in Electron Microscopy.* Ed. Earl J. Kirkland. 1a ed. Plenum Press. USA. pgs. 5-18.

8. **Eric Cox, Yves Van der Stede, Frank Verdonck, Veerle Snoeck, Wim Van den Broeck, Bruno Goddeeris.** (2002). Oral immunization of pigs with fimbrial antigens of enterotoxigenic *E. coli*: an interesting model to study mucosal immune mechanisms. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 87: 287 - 290.
9. **Erlend L. Anderssen, Dzung bao Diep, Ingolf F. Nes, Vicent G. H. Eijsink, Jon Nissen-Meyer.** (1998). Antagonistic Activity of *Lactobacillus plantarum* C11: Two New Two-Peptide Bacteriocins, Plantaricins EF and JK and the Induction Factor Plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(6): 2269 - 2272.
10. **Gert N. Moll, Emile van der Akker, Havard H. Hauge, Jon Nissen-Meyer, Ingolf F. Nes, Wil N. Konings, Arnold J. M. Driessen.** (1999). Complementary and Overlapping Selectivity of the Two-Peptide Bacteriocins Plantaricin EF and JK. *Journal of Bacteriology*. 181(16): 4848 - 4852.
11. **Glenn Gibson, David Heber, Simin Meydani, Eric Postaire, Mary Ellen Sanders.** (2000). *Fuctional Dairy Products*. Editions John Libbey Eurotext. Francia. pgs. 15 - 19.
12. **Gregor Reid.** (1999). The Scientific Basis for Probiotic strains of *Lactobacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 3763-3766.
13. **González Martínez Blanca Edelia, Gómez Treviño Marivel, Jiménez Salas Zacarías.** (2003). Bacteriocinas de probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 4(2).
14. **Hans Blom, Tone Katla, Beate F. hagen, Lars Axelsson.** (1997). A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*. 38: 103 - 109.
15. **H. U. Bertschianger and J. M. Fairbrother.** (1999). *Escherichia coli* Infections. In *Disease of Swine*. Ed. Barbara E. Straw, Sylvie D'Allaire, William I. Mengeling, David J. Taylor. 8a ed. Iowa, USA. pgs. 433 - 440.

16. **J. Zamora, M. V., G. Reinhardt, M. V., Dr. med. vet., M. Polette, T. M.; P. Macías, T. M.** (2000). Detección rápida en el diagnóstico de *Escherichia coli* toxigénica productora de LT y VT. Archivos de medicina veterinaria. 32(1).
17. **James P. Nataro, James B. Kaper.** (1998). Diarrheagic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews. 11: 142-201.
18. **Joaquim Brufau.** (2001) La Prohibición de la Comunidad Económica Europea del Uso de Antibióticos como Promotores de Crecimiento y sus Consecuencias: Alternativas Potenciales. IRTA, Dept de Nutrición Animal, Centre de Mas Bové. Apartat 415, 43280 Reus, España .
19. **Juan Riopérez, M<sup>a</sup>L Rodriguez Membibre.** (2004). Nutrición y patología digestiva del lechón y del cerdo en crecimiento-cebo. Mundo Ganadero. 172.
20. **Kathleen A. Taylor, Colin B. O Connell, Paul W. Luther, Michael S. Donnenberg.** (1998). The EspB Protein of Enteropathogenic *Escherichia coli* Is Targeted to the Cytoplasm of Infected HeLa Cells. Infection and Immunity. 66: 5501-5507.
21. **L. Z. Jin, R. R. Marquardt, X. Zhao.** (2000). A Strain of *Enterococcus faecium* (18C23) Inhibits Adhesion of Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to Porcine Small Intestine Mucus. Applied and Environmental Microbiology. 66: 4200-4204.
22. **Martin L Cross.** (2002). Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactocili and their role in protection against microbial pathogens. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 34: 245 - 253.
23. **Masahiro Ikeda, Yasuhiro Gunji, Shinji Yamasaki, Yoshifumi Takeda.** (2000). Shiga toxin activates p38 MAP kinase through cellular Ca<sup>2+</sup> increase in Vero cells. FEBS. 485: 94-98.
24. **Michael G. Gänzle, Christian Hertel, Jos M.B.M. van der Vossen, Walter P. Hammes.** (1999). Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of

*Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *International Journal of Food Microbiology*. 48: 21 - 35.

25. **Pathmakanthan S., Li C. K. F., Hawkey, C. J.** (1999). The protective effect of *Lactobacillus plantarum* 299 in Human intestinal epithelial cells against invasive bacteria. *Gut supplement*. 44: 65A.

26. **Piñón A. Carlos.**(1982). *Escherichia coli*. En *Diagnóstico de las enfermedades del cerdo*. Ed. Piñón A. Carlos, Ramírez N. Ramiro 1ª ed. México. pgs. 485 - 493.

27. **Ralph W. Jack, John R. Tagg, Bibek Ray.** (1995). Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Microbiological Reviews*. 59: 171-200.

28. **Rodríguez-Angeles G.** (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*. 44(5).

29. **Romero Cabello.** *Escherichia*. En *Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas*. (2000). Ed. Panamericana. 2a ed. México. Pgs 291 - 293.

30. **S. L. Booher, N. A. Cornick, H. W. Moon.** (2002). Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally infected swine. *Veterinary Microbiology*. 89: 69 - 81.

31. **Verna Carolissen-Mackay, Gottlieb Arendse, John W. Hastings.** (1997). Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *International Journal of Food Microbiology*. 34: 1-16

32. **Vincent G. H. Eijsink, Marianne Skeie, P. Hans Middelhoven, May bente Brurberg, Ingolf F. Nes.** (1998). Comparative Studies of Class IIa Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3275-3281.

33. **Y. K. Lee, C. Y. Lim, W. L. Teng, A. C. Ouwehand, E. M. Tuomola, S. Salminen.** (2000). Quantitative Approach in the Study of Adhesion of Lactic Acid Bacteria to Intestinal Cells and Their Competition to Intestinal Enterobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 3692-3697.