



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**Desarrollo metodológico para la caracterización molecular
de bacterias ácido-lácticas de interés en alimentos aisladas
del tracto intestinal de ratón**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA :

MIRIAM MASIEL GONZÁLEZ PÉREZ

ASESORES :

**DRA. ADRIANA LLORENTE BOUSQUETS
DR. CARLOS IGNACIO SOTO ZÁRATE**

Cuatitlán Izcalli, Estado de México, 2019.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Desarrollo metodológico para la caracterización molecular de bacterias ácido-lácticas de interés en alimentos aisladas del tracto intestinal de ratón.

Que presenta la pasante: **Miriam Masiel González Pérez**

Con número de cuenta: **311093801** para obtener el Título de la carrera: **Ingeniería en Alimentos**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de abril de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en A. Jorge López Pérez	
VOCAL	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
SECRETARIO	Dra. Adriana Llorente Bousquets	
1er. SUPLENTE	M. en C. María Guadalupe Amaya León	
2do. SUPLENTE	M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Esta tesis forma parte de los proyectos del Taller Multidisciplinario de Ingeniería en Alimentos: Procesos Tecnológicos de Productos Cárnicos, Plan de estudio 2004 de la carrera de Ingeniería en Alimentos.

Se desarrolló en los Laboratorios 4 de Biología Celular y Molecular y 7 de Bioconservación de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Agradezco al proyecto DGAPA-PAPIIT IT201917: “Estudio in vitro de nuevos probióticos para nutrición animal”, por el apoyo y la beca recibidos para la realización de este trabajo de tesis.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, por todos los consejos y porque al estar lejos de ustedes los aprendí a valorar con más fuerza y a disfrutar cada momento como si fuera el último.

A mis padres, por ser mi mayor pilar, mis confidentes y mis mejores amigos. Gracias por nunca dejarme caer, apoyarme en cada locura, reírse, llorar conmigo y jalarme las riendas cuando era necesario. Gracias por prepararme para la vida y darme más de lo que necesitaba, me enseñaron el amor más bonito e incondicional en la vida, siempre los voy amar.

A mis hermanas, por estar ahí, lejos o cerca y pese a que somos tan diferentes estuvieron cuando las necesité, porque cada vez nos unimos más y me dan fuerza para seguir adelante, las amo y las admiro.

A mis asesores, por todo el apoyo desde el inicio de este proyecto, por compartir sus conocimientos con gusto y pasión. Gracias por toda su paciencia, confianza y por creer en mí al invitarme a participar en este proyecto.

Al jurado, por su tiempo y atención en cada momento de la revisión de este proyecto; sin sus comentarios nada de esto hubiera sido posible.

A mi facultad, por darme la formación personal y académica. Me brindó más que una carrera universitaria, me forjó en todos sentidos, me hizo crecer y ver todo de otra manera.

A la Universidad, por haberme adoptado como una hija desde la preparatoria y continuar en la universidad. Me dio las oportunidades y las armas para salir adelante y las mejores experiencias de mi vida, gracias por las becas, los idiomas y el intercambio que cambiaron mi vida y me hicieron valorar mi país y mi universidad, te llevaré con orgullo SIEMPRE.

A mis maestros, por todas sus enseñanzas y pasión en cada clase, siempre quedarán en mi memoria, porque tengo la fortuna de tenerlos como amigos.

A mis amigos, por hacer de mi vida más feliz, porque al tenerlos me hacen ver las cosas de otra manera y ver lo bonita que es la vida, los quiero.

Gracias a Diosito por todas las bendiciones, aprendizajes y personas que están y estuvieron en mi vida para llegar hasta aquí.

“Las personas cambian cuando se dan cuenta del potencial que tienen para cambiar las cosas”.

(Paulo Coelho)

“A menudo las personas dicen que aún no se han encontrado a sí mismas. Pero el sí mismo no es algo que uno encuentra, sino algo que uno crea.”

(Thomas Szasz)

“Lo que hacemos por nosotros mismos muere con nosotros, lo que hacemos por los demás y por el mundo permanece y es inmortal.”

(Albert Pike)

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO.....	14
1.1 Bacterias ácido lácticas.....	14
1.1.1 Características morfológicas y bioquímicas.....	16
1.1.2 Clasificación de las Bacterias ácido lácticas.....	18
1.1.3 Beneficios y Aplicaciones.....	22
1.2 Antibióticos como promotores del crecimiento.....	24
1.2.1 Probióticos y alimentos funcionales.....	27
1.2.2 Función de los probióticos.....	28
1.2.3 Cepas probióticas.....	30
1.3 El ratón lactante como modelo biológico.....	34
1.4 Pruebas de identificación del género y especie de las cepas de BAL.....	36
1.4.1 Pruebas primarias: Tinción de Gram.....	36
1.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	39
1.5 Herramientas de Bioinformática.....	48
1.5.1 Fundamento.....	49
1.5.2 Base de datos y sus aplicaciones.....	49
1.5.3 Selección de primers especie específicos en la verificación de género y especie de cepas.....	51
1.5.4 Secuenciación.....	52
1.5.5 Análisis de Similitud.....	55
JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	56
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
2.1 Esquema de investigación.....	59
2.1.1 Descripción de la secuencia experimental.....	60

2.2.1 Material biológico Microorganismos.....	64
2.2.2 Medios de cultivo.....	66
2.2.3. Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas.....	67
2.2.4 Verificación de la pureza de las cepas por pruebas primarias.....	69
2.2.5 Extracción de ADN cromosomal.....	70
2.2.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	73
CAPÍTULO 3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	79
3.1 Tinción de Gram.....	79
3.2 Cuantificación de la concentración y pureza del ADN.....	81
3.3 Visualización de los productos de la PCR.....	82
CONCLUSIONES.....	89
RECOMENDACIONES.....	90
ANEXOS.....	91
REFERENCIAS.....	95

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Bacterias ácido lácticas utilizadas en la elaboración de productos lácteos.....	15
Cuadro 2. Utilización de las principales BAL.....	16
Cuadro 3. BAL utilizadas en la elaboración de productos lácteos.....	23
Cuadro 4. Efectos positivos y negativos de los promotores de crecimiento en distintos campos relacionados con la producción animal.....	24
Cuadro 5. Efectos de los promotores de crecimiento en nutrición animal.	26
Cuadro 6. Beneficios en la salud atribuidos a probióticos.....	29
Cuadro 7. Microorganismos usados como probióticos de mayor interés aplicativo.....	32
Cuadro 8. Probióticos con efectos beneficiosos sobre la salud demostrada mediante ensayos clínicos en humanos.....	34
Cuadro 9. Parámetros a considerar para el diseño de primers.....	52
Cuadro 10. Identificación de cepas de Bacterias ácido lácticas en el tracto intestinal del ratón lactante.....	68
Cuadro 11. Primers utilizados en la experimentación.....	73
Cuadro 12. Clasificación de las cepas de acuerdo con la Tinción de Gram.	81
Cuadro 13. Concentración y pureza de ADN de Bacterias ácido lácticas aisladas del tracto intestinal de ratón lactante.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético de los géneros de Bacterias ácido lácticas, basado en la secuencia del gen del ARNr 16S.....	20
Figura 2. Dos microorganismos típicos de las BAL: a) <i>Lactobacillus Rhamnosus</i> b) <i>Lactococcus Lactis</i> .Fotografías al microscopio óptico.....	31
Figura 3. Estructura de Bacterias Gram Positiva y Bacterias Gram Negativa.....	37
Figura 4. Formación del enlace fosfodiéster mediante la DNA polimerasa.	40
Figura 5. Molécula de ADN de doble cadena.....	41
Figura 6. Molde con primers de PCR, alineación y dirección por la Taq polimerasa. La longitud del amplicón es de 162 pares de bases incluyendo los primers.....	44
Figura 7. Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	45
Figura 8. Ejemplificación de un gel de agarosa con el resultado de la PCR.	48
Figura 9. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacterina mediante secuenciación del ADNr 16S.....	55
Figura 10. Esquema de investigación.....	59
Figura 11. Cepa liofilizada de <i>L. rhamnosus</i>	64
Figura 12. Cepa liofilizada de <i>L. lactis</i>	64
Figura 13. Reactivación de las cepas liofilizadas.....	65
Figura 14. Procedimiento para la preparación de medios de cultivo.....	66
Figura 15. Ratón lactante de 4 semanas de edad.....	67
Figura 16. Identificar en la figura las placas A, B, C y E.....	68
Figura 17. Identificar en la figura las placas G, H e I.....	69
Figura 18. Procedimiento de la Tinción de Gram.....	70
Figura 19. Extracción del ADN de muestra de Bacteria ácido láctica aislada del tracto intestinal de ratón lactante.....	71

Figura 20. Cuantificación de la concentración del ADN en el espectrofotómetro.....	72
Figura 21. Preparación de la reacción para la PCR.....	75
Figura 22. Minicentrífuga con los tubos Eppendorf a 3000 RPM.....	76
Figura 23. Termociclador en el que se realizó la PCR.....	77
Figura 24. Procedimiento de armado de la celda de electroforesis horizontal.....	78
Figura 25. Corrida de dos geles de agarosa al 2%, a 90 v por 30 min.....	78
Figura 26. Cepa clasificada como A2.....	80
Figura 27. Cepa clasificada como B1.....	80
Figura 28. Cepa clasificada como C2.....	80
Figura 29. Cepa clasificada como E3.....	80
Figura 30. Cepa clasificada como G1.....	80
Figura 31. Cepa clasificada como H2.....	80
Figura 32. Cepa clasificada como I ₁	80
Figura 33. Gel de agarosa al 2%. Visualización de banda de <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	83
Figura 34. Gel de agarosa al 2%. Visualización de banda de <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	83
Figura 35. Gel de agarosa al 2%. Visualización de banda de <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	84
Figura 36. Gel de agarosa al 2%. Visualización de banda de <i>Lactobacillus plantarum</i>	85
Figura 37. Gel de agarosa al 2%. Visualización de banda de <i>Lactobacillus plantarum</i>	86
Figura 38. Gel de agarosa al 2%. Visualización de banda de <i>Lactobacillus plantarum</i>	87
Figura 39. Gel de agarosa al 2%. Visualización de banda <i>Lactobacillus plantarum</i>	88

LISTA DE ABREVIATURAS

±	Más menos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
BAL	Bacteria Ácido Láctica
°C	Grados centígrados
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EPS	Exopolisacárido
FAO	Food and Agriculture Organization (por sus siglas en inglés)
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramos
GRAS	Generally Recognized As Safe
h	Horas
ILSI	International Life Sciences Institute (por sus siglas en inglés)
L	Litros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
MPM	Marcador de peso molecular
MRSm	Medio MRS modificado
μl	Microlitros
μg	Microgramos
pb	Pares de bases
QPS	Qualified Presumption of Safety
PCR	Polymerase Chain Reaction (por sus siglas en inglés)
OMS	Organización Mundial de la Salud

RESUMEN

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representadas por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos alimentos, tierra, plantas verdes, así como también del tracto digestivo de mamíferos. Para su multiplicación requieren de azúcares como glucosa y lactosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento.

El objetivo de este proyecto fue desarrollar la metodología para la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando iniciadores especie específicos con el fin de realizar la caracterización molecular de cepas de Bacterias Ácido Lácticas (BAL), identificando género y especie de cada una. Debido a que diversas BAL tienen requerimientos similares de nutrición y de crecimiento, es generalmente difícil usar métodos microbiológicos para identificar su género y especie.

Es por eso que numerosas investigaciones se han enfocado en estudiar técnicas de Biología molecular para la detección y diferenciación rápida de las BAL.

Para su caracterización en este proyecto, fue necesario el uso de iniciadores que tienen como punto de aplicación genes que codifican el rRNA. Debido a que hay una gran variabilidad en esta región, las secuencias codificadas con el gen 16S y el gen 23S del rRNA, son los más utilizados en términos de identificación filogenética.

Se analizaron muestras de BAL extraídas de distintas porciones del tracto intestinal de ratón lactante: duodeno, yeyuno y colon. Mediante programas Bioinformáticos se diseñaron iniciadores específicos y se seleccionaron con base en la bibliografía para la detección y caracterización de especies del género *Lactobacillus* del modelo murino.

La extracción del ADN se realizó con base en el protocolo descrito por Scariot et. al (2018) con modificaciones experimentales. Se llevó a cabo la PCR para la identificación de las cepas de las BAL, mientras que, los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% en un transiluminador de UV.

Los productos obtenidos, permitieron una evaluación de la especificidad de hibridación de los iniciadores en la zona de interés en conjunto con las herramientas de bioinformática, las cuales sirvieron para realizar un análisis de similitud y así poder establecer género y especie de las cepas analizadas en el proyecto.

INTRODUCCIÓN

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) refieren a un gran grupo de bacterias benéficas que tienen propiedades similares; todas producen ácido láctico como producto final del proceso de fermentación. Se encuentran en la naturaleza y en los sistemas digestivos de animales, en donde se tiene un balance entre bacterias patógenas y benéficas (Rajoka et al., 2018). Además, son conocidas por su rol en la elaboración de productos alimenticios fermentados. Algunas BAL, como las especies de *Lactobacillus* han sido propuestas y usadas como probióticos, como suplemento alimenticio para beneficio de la salud humana, dando como resultado un incremento en el balance de la microbiota del tracto intestinal (Belkacem et al., 2009).

Las BAL son usadas extensamente en la industria alimentaria ya que tienen requerimientos similares de nutrición y de crecimiento; es generalmente difícil usar métodos microbiológicos para identificar su género y especie. Es por eso que numerosas investigaciones se han enfocado en aplicar técnicas moleculares para la detección y diferenciación rápida de las BAL (Belkacem et al., 2009).

Una típica BAL crece bajo condiciones estándar (concentración no limitada de glucosa, factores de crecimiento y limitación de oxígeno); es Gram positiva, no esporulada, catalasa negativa y aerotolerante (Rajoka et al., 2018).

En este proyecto se pretende conocer e identificar el género y especie de las BAL mediante técnicas moleculares, con el fin de que una vez identificadas sus características genotípicas se puedan seguir investigando para dar una propuesta alterna al uso de cepas de colección, debido a su alto costo económico y, adicionalmente, poder utilizarlas como bioconservadores de algún producto cárnico.

Para esta caracterización es necesario el uso de iniciadores que tienen como punto de aplicación genes que codifican el rRNA. Debido a que hay una gran variabilidad en esta región, las secuencias del rRNA codificadas en el gen 16S y el gen 23S rRNA son las más utilizadas en términos de identificación filogenética (Goberta et al., 2018).

Estas cepas aisladas y caracterizadas serán investigadas posteriormente, para su posible utilización como probióticos según los criterios de los organismos internacionales

(Belkacem et al., 2009), así mismo, serán evaluadas en sus herramientas metabólicas relacionadas con fenómenos de antagonismo que puedan servir en la conservación de los alimentos o en pruebas de reto microbianos que ayuden a mitigar los riesgos sanitarios frente a microorganismos patógenos.

Debido a las múltiples aplicaciones de las BAL que contribuyen a la vida útil y al desarrollo de alimentos fermentados madurados como bioconservadores, y a su uso como probióticos al favorecer un mejor estado de salud animal y humana, este proyecto busca lograr el aislamiento de cepas de BAL y su caracterización molecular en términos de género y especie, dada la complejidad técnica y económica que implica seguir utilizando cepas de colección.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1 Bacterias ácido lácticas

Las BAL son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria por su capacidad de conferir diferentes características sensoriales como textura, sabor y olor agradable a los alimentos fermentados.

El conocimiento de cultivos lácticos se originó en el siglo XVIII, cuando agricultores de África, Asia y Europa observaron el comportamiento de la leche cruda en los meses cálidos. Las BAL vivas pueden estar contenidas en un grupo de microorganismos llamados cultivos lácticos o iniciadores y se pueden emplear en productos que para su obtención requieren ser fermentados.

Alimentos como yogurt y bebidas fermentadas, pueden ser vehículos importantes de enormes cantidades de bacterias vivas, siendo utilizados biotecnológicamente como cultivos iniciadores dentro del cuerpo humano (Huertas, 2010).

Cuadro 1. Bacterias ácido lácticas utilizadas en la elaboración de productos lácteos

Productos	Bacterias principales	Usos
Yogurt	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> ,	Provee sabor, gusto suave y delicado y promueve la cuajada, mejora la digestión, absorción, contribuye a promover la salud
Bebidas fermentadas a base de leche	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Lactobacillus herveticus</i>	Adiciona sabor, contribuye a promover la salud
Quesos	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetilactis</i>	Promueve el cuajado, provee aroma y sabor
Mantequilla madurada	<i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetilactis</i>	Promueve moderado sabor agrio y aroma
Crema ácida	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Leuconostoc cremoris</i> <i>Streptococcus lactis ssp. diacetylactis</i>	Promover sabor característico (pequeñas cantidades de acetaldehído y grandes cantidades de diacetilo)
Yakult	<i>Lactobacillus casei</i>	Promueve moderado sabor agrio y aroma. Contribuye a promover la salud

Fuente: Ramírez-Ramírez et al., 2011

En las últimas décadas se ha explorado el potencial de las BAL como bioconservadoras naturales de productos lácteos (Cuadro 1), debido a la producción de diversos metabolitos como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y dióxido de carbono (CO₂) (Leistner, 2000).

Estas bacterias no sólo contribuyen al desarrollo de las características organolépticas y reológicas de los alimentos, sino que se generan en los mismos ambientes poco favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos debido a su marcada capacidad antagonista, la cual favorece su proliferación en el alimento, en detrimento de cualquier otro grupo microbiano presente en la materia prima (alimento crudo) o que contamine el producto posteriormente.

Las BAL se encuentran en una amplia variedad de hábitats, especialmente aquellos ricos en carbohidratos. Se encuentran en alimentos como productos cárnicos fermentados, derivados lácteos, masa panadera, vegetales fermentados, bebidas y también en el tracto intestinal del hombre y de animales (Cuadro 2).

Cuadro 2. Utilización de las principales BAL

Género	Principales especies y aplicaciones
<i>Streptococcus</i>	<i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> . Mantequilla, queso, yogurt <i>S. thermophilus</i> . Yogurt, queso.
<i>Pediococcus</i>	<i>P. cerevisiae</i> . Cerveza, carne procesada. <i>P. halophilus</i> . Salsa de soya
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. citrovorum</i> . Alimentos fermentados, producción de dextrán.
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. bulgaricus</i> . Yogurt, bebidas fermentadas a base de leche. <i>L. helveticus</i> . Queso, yogurt, bebidas a base de leche fermentada. <i>L. acidophilus</i> . Yogurt, bebidas a base de leche fermentada, preparación de <i>Lactobacillus</i> . <i>L. casei</i> . Quesos, leche refinada, bebidas a base de leche fermentada, preparación de <i>Lactobacillus</i> . <i>L. plantarum</i> . Diversos alimentos fermentados, ensilajes. <i>L. fermenti</i> , <i>L. brevis</i> . Productos fermentados.
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. adolescents</i> . Leche fermentada, preparación de bacterias lácticas. El intestino de infantes y adultos. <i>B. thermophilum</i> , <i>B. Pseudolongum</i> . El intestino de animales

Fuente: Ramírez-Ramírez et al., 2011

Estas bacterias pueden ser utilizadas en la prevención y el control de determinadas enfermedades, así como en el mejoramiento de la calidad de conservación de ciertos alimentos, por lo que su valor radica en tener a disposición sustancias procedentes de microorganismos que sirvan como punto de partida para la obtención de productos biotecnológicos aplicables a la solución de problemas de la salud tanto humana como animal.

1.1.1 Características morfológicas y bioquímicas

Las bacterias lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representadas por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benzidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o

principal producto de la fermentación de carbohidratos. Además, las BAL son ácido tolerantes, pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2, otras a valores tan altos como 9.6 y la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no soportarían la alta actividad producida por los ácidos orgánicos.

Son quimoorganotróficos y solamente crecen en medios complejos. Las BAL pueden producir una serie de sustancias conocidas como metabolitos, los cuales, pueden cumplir funciones en los alimentos.

Los carbohidratos fermentables y alcoholes pueden ser empleados como fuentes de energía para formar principalmente ácido láctico, a través de la degradación de hexosas a lactato (homofermentativas) y productos adicionales como acetato, etanol, CO₂ (heterofermentativas) (Huertas, 2010).

También, las BAL producen pequeñas cantidades de acetaldehído y diacetilo por la formación de citratos, otorgando a los alimentos sabor y aroma agradable. Además de poseer una actividad metabólica sobre proteínas, azúcares y lípidos, contribuyendo a la digestibilidad de alimentos y preservación del producto final.

Además, producen varios componentes antimicrobianos, los cuales inhiben el crecimiento de ciertos organismos. La inhibición de *B. cereus* por BAL ha sido estudiada en algunos alimentos fermentados como productos lácteos, productos basados en cereales y productos de semilla de soya (Huertas, 2010).

El peróxido de hidrógeno es otro metabolito producido por el grupo *Lactococcus* a través de la acción de NADH por oxígeno molecular. Es importante mencionar que el sistema lactoperoxidasa es un sistema antimicrobiano natural que se encuentra en la leche y ha sido utilizado para extender la vida útil de la misma; inhibiendo microorganismos como *Pseudomonas* y *Staphylococcus aureus*.

Las bacteriocinas son componentes proteínicos que son producidos por las BAL, son péptidos bioactivos con efecto bactericida o bacteriostático. Las bacteriocinas típicamente

tienen un estrecho espectro antibacterial. Por lo que, algunas bacteriocinas pueden inhibir el crecimiento de Gram-positivas patogénicas y bacterias dañinas como también levaduras y especies Gram-negativas. Entre las moléculas que presentan actividad antimicrobiana están ácido láctico y acético, etanol, diacetilo y 2-3 butanodiol.

Finalmente, se tienen a los exopolisacáridos (EPS) como metabolitos de las BAL. Los cuales, son polisacáridos de cadena larga consistentes de ramificaciones de unidades repetentes de azúcares. Muchas de las especies de BAL tienen el status de GRAS “Generally Recognized As Safe” según la Administración Norteamericana de Alimentos y Drogas (FDA) o QPS “Qualified Presumption of Safety” según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) lo que facilita su aplicación en alimentos y, por tanto, suscita su interés industrial. Las BAL son capaces de desviar una pequeña proporción de azúcares fermentables hacia la biosíntesis de EPS, los cuales, desempeñan un papel industrial en la producción de emulsificantes y suspensiones estabilizantes; su aporte contribuye a la textura, reología, sabor y estabilidad del producto. Entre los efectos benéficos que se atribuyen, se encuentran la capacidad de reducir los niveles de colesterol sérico, así como de estimular el crecimiento de la microbiota intestinal. Además, por el hecho de encontrarse asociados a la superficie de las bacterias, pueden contribuir a su potencial como probióticos posibilitando el uso de éstas en la elaboración de alimentos funcionales (Vázquez et al., 2018)

1.1.2 Clasificación de las Bacterias ácido lácticas

En 1919 se dio inicio a la clasificación de BAL por Orla-Jensen utilizando los siguientes criterios: morfología celular, el modo de fermentación de la glucosa, el rango de temperatura de crecimiento y los patrones de utilización de azúcar. Dentro de las BAL se encuentra un diverso grupo de organismos cocos y bacilos de longitud variable y de un grosor aproximado de 0.5-0.8 μm . Las BAL son un grupo de bacterias fisiológicamente uniforme, de pared Gram-positiva, anaerobias facultativas, catalasa negativa y no formadoras de esporas (Huertas, 2010).

La clasificación de las BAL en diferentes géneros se basa en su morfología, el modo de fermentación de la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas), el crecimiento a diferentes temperaturas (mesófilos que van de 20-25°C, mientras que las termófilas de 40-45°C), la configuración del ácido láctico producido (L, D o LD), habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina (Ramírez et al., 2011).

Los géneros con morfología celular esférica, o cocoide “cocos” son entre otros, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* o *Streptococcus*, con número de especies limitado, y el género que reúne mayor número de especies, *Lactobacillus*, se caracteriza por la forma de bastoncillo “bacilos” (Figura 1).

En la actualidad son más de 100 las especies que han sido descritas como pertenecientes al género *Lactobacillus* y se encuentran en continuo aumento. La principal característica del metabolismo de las bacterias lácticas es la fermentación de los azúcares, siendo su producto final, en la mayor parte de los casos, el ácido láctico. Es empleado en la industria principalmente por su capacidad como regulador de la acidez y en la industria cárnica como un agente antimicrobiano que evita el desarrollo de patógenos en los productos además de ayudar al perfil de sabor y reducir la presencia de sodio.

Además se ha clasificado como GRAS para su aplicación como aditivo alimenticio por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos de los E.U.A). Este ácido es uno de los más importantes producidos por las BAL. Dentro de los microorganismos productores pueden citarse a los Lactobacilos, siendo el *Lactobacillus delbrueckii* el microorganismo más utilizado. Este es el primer ácido orgánico funcionalmente versátil producido biotecnológicamente teniendo un amplio rango de aplicaciones. Es utilizado como acidulante/agente buffer de pH o inhibidor de esporas de bacterias en una amplia variedad de alimentos procesados (Huertas, 2010).

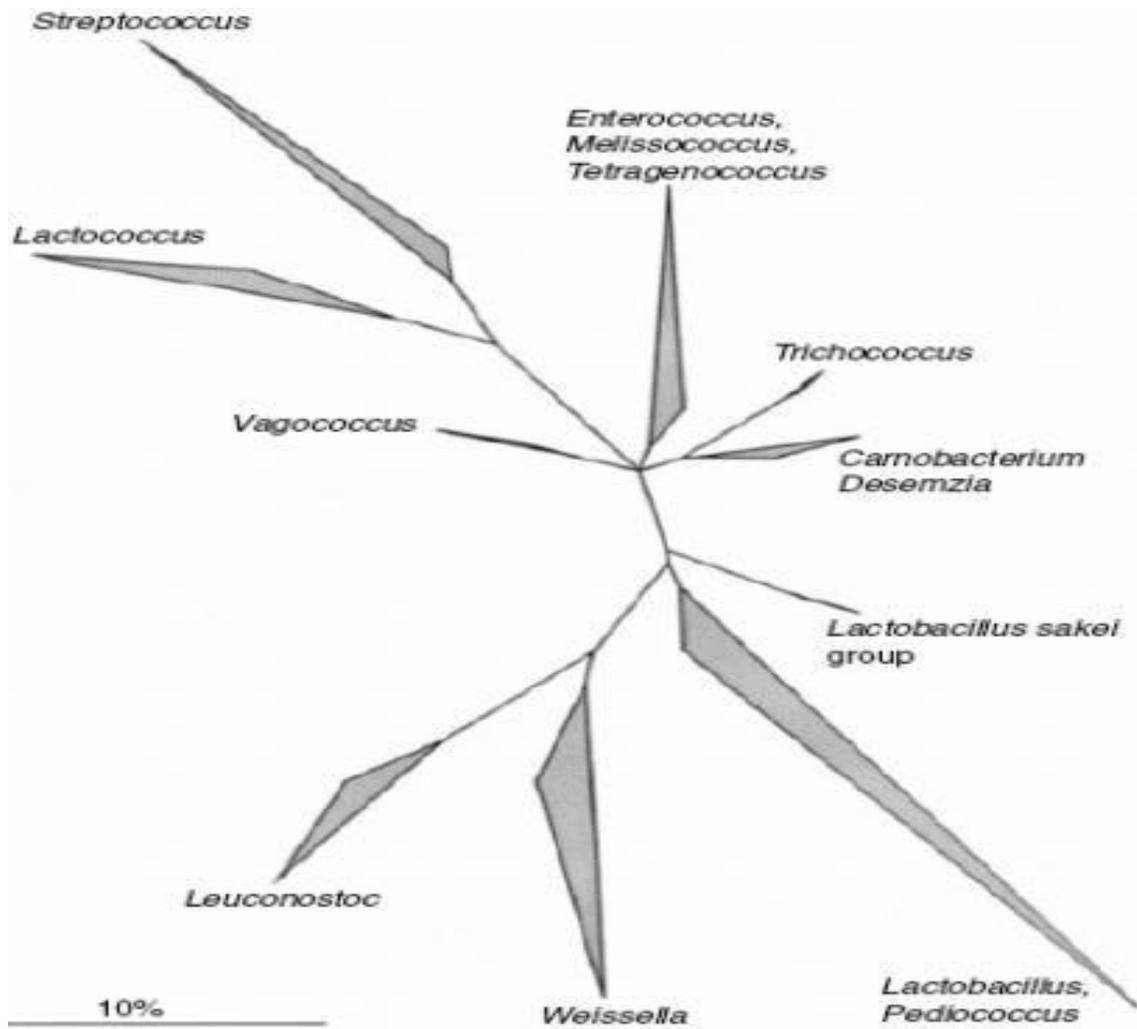


Figura 1. Árbol filogenético de los géneros de Bacterias ácido lácticas, basado en la secuencia del gen del ARNr 16S

Fuente: Olivera, J. (2011). Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácteas aisladas de la leche

Pueden fermentar hexosas como glucosa, manosa, galactosa o fructosa utilizando la llamada "vía homofermentativa", en la que el único producto final es ácido láctico, o la "vía heterofermentativa" en la que usan la vía de las pentosas fosfato produciendo cantidades equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono (CO₂) y etanol (o ácido acético) como

productos principales, mientras que a su vez se generan productos minoritarios (acetato, formiato y glicerol) a partir de rutas alternativas.

1.1.2.1 El género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* (*lactis*-leche; *bacillus*-pequeños bacilos) se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos lo cual hace que se puedan confundir con géneros aislados habitualmente de materiales clínicos.

Estos bacilos se presentan comúnmente formando cadenas y en general son no móviles, pero cuando tienen motilidad es por la presencia de flagelos peritricos. Son Gram positivos y sólo las células muertas pueden dar resultados variables a la tinción de Gram. Además, no esporulan y algunas cepas presentan cuerpos bipolares que probablemente contengan polifosfato. Los grandes bacilos homofermentativos presentan gránulos internos revelados por tinción de Gram o por tinción con azul de metileno.

La pared celular de los lactobacilos, observada al microscopio electrónico es típicamente Gram positiva y contiene peptidoglicanos (mureínas) de varios quimiotipos, de ahí que el peptidoglicano del tipo Lisina - D-Asparagina sea el más ampliamente distribuido. Esta pared también contiene polisacáridos unidos al peptidoglicano mediante enlaces fosfodiéster, pero sólo presenta ácidos teicoicos relacionados con ella en algunas especies. También pueden apreciarse al microscopio electrónico grandes mesosomas que caracterizan a este género.

Las colonias de *Lactobacillus* en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza.

1.1.3 Beneficios y Aplicaciones

Los productos derivados del metabolismo de las BAL tienen un papel decisivo, les confieren una acción conservadora a una gran variedad de alimentos tales como yogur, queso y otros productos lácteos fermentados y encurtidos, entre otros. Esta acción es debida a la inhibición de un gran número de microorganismo patógenos y dañinos. Es la formación de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico a una velocidad conveniente lo que permite una fermentación consistente y exitosa. Además, la acumulación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos producidos por las BAL, reduce el pH del ambiente con un efecto inhibitorio de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Huertas, 2010).

En ese sentido, la forma no dissociada del ácido láctico puede penetrar con mayor facilidad la pared celular microbiana donde el pH más alto del contenido celular promueve la disociación, dando lugar a la liberación de iones de hidrógeno y el anión correspondiente, de modo que, ambos iones interfieren en el metabolismo e inhiben el crecimiento celular (Ramírez et al., 2011).

Estos productos resultantes del metabolismo de las BAL, en ocasiones son responsables de la alteración del producto como por ejemplo la formación de CO₂ en productos cárnicos envasados al vacío que lleva a la hinchazón del envase, la producción de ácidos orgánicos como acético o fórmico que dan lugar a malos olores o la formación de limos que confieren viscosidad en productos cárnicos y en bebidas.

Además, las BAL disminuyen la lipólisis, lo cual evita o retarda la rancidez en los productos lácteos (Ramírez et al, 2011) y son utilizadas en otros productos (Cuadro 3).

A comienzos del siglo XX, Metchnikoff propuso su teoría sobre la “Fagocitosis” en la que explicaba que el consumo de BAL presentes en leches fermentadas (yogur) mejoraba la salud. Japón fue el primer país en etiquetar productos como alimentos funcionales y entre ellos, los probióticos constituyen uno de los subgrupos más destacados. Posteriormente,

Shirota continuó esta línea y aisló la cepa de *Lactobacillus casei* Shirota que comenzó a comercializarse como Yakult.

El potencial probiótico de esta cepa, se demostró a partir de los estudios de Matsuzaki en 1998, ya que éste estimula respuestas inmunológicas, previniendo las infecciones por cepas de la familia Enterobacteriaceae (Isolauri et al., 1995). Este fue el punto de partida del reconocimiento de las propiedades probióticas de algunas cepas de bacterias lácticas.

Cuadro 3. BAL utilizadas en la elaboración de productos lácteos

Productos	Bacterias principales	Usos
Yogurt	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> ,	Provee sabor, gusto suave y delicado y promueve la cuajada, mejora la digestión, absorción, contribuye a promover la salud
Bebidas fermentadas a base de leche	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Lactobacillus herveticus</i>	Adiciona sabor, contribuye a promover la salud
Quesos	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetylactis</i>	Promueve el cuajado, provee aroma y sabor
Mantequilla madurada	<i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetylactis</i>	Promueve moderado sabor agrio y aroma
Crema ácida	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Leuconostoc cremoris</i> <i>Streptococcus lactis ssp. diacetylactis</i>	Promover sabor característico (pequeñas cantidades de acetaldehído y grandes cantidades de diacetilo)
Yakult	<i>Lactobacillus casei</i>	Promueve moderado sabor agrio y aroma. Contribuye a promover la salud

Fuente: Ramírez-Ramírez, et al., 2011

Actualmente ésta es una de las áreas más activas en investigación básica, tanto en el campo de las bacterias lácticas como en el campo de tecnología de alimentos, llevando al desarrollo de nuevos alimentos con componentes que mejoran la salud del consumidor (alimentos funcionales).

1.2 Antibióticos como promotores del crecimiento

Desde hace tiempo se ha instalado una discusión internacional sobre la conveniencia y la factibilidad de dejar de utilizar antibióticos con fines de promoción del crecimiento. Estos medicamentos son utilizados en dosificaciones bajas, subterapéuticas, en alimentos para animales, a efectos de mejorar la calidad del producto final (una menor proporción de grasa y una mayor proporción de proteínas). Otro beneficio de la utilización de estas drogas en la dieta es el control de patógenos zoonóticos, como Salmonella, Campylobacter, *E. coli* y enterococos. Por otra parte, hay quienes argumentan que la utilización de cualquier antibiótico en estas condiciones favorece la selección de resistencia en bacterias patógenas, limitando, en consecuencia, su utilización en casos clínicos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efectos positivos y negativos de los promotores de crecimiento en distintos campos relacionados con la producción animal

Campo de acción	Efectos positivos	Efectos negativos
Pienso	Ninguno	Enmascaran mala calidad pienso Dificultan mejoras en formulación y desarrollo de alternativas
Manejo	Mejoran producción y productividad	Estimulan una mayor intensificación
Sistema producción	Reducen necesidad mano de obra al permitir sistemas más intensivos	Limitan desarrollo sistemas alternativos
Salud animal	Algunas enfermedades (entéricas) pueden controlarse hasta cierto punto	Limitan posibilidades terapéuticas por desarrollo de resistencias Ocultan enfermedades subclínicas Menos incentivos para mejorar higiene
Bienestar animal	Alivian y signos de enfermedad	Ocultan estrés por mal manejo Permiten mayores densidades de cría
Impacto ambiental	Mejor utilización del pienso Menos estiércol	Aumentan pool ambiental de genes RA Residuos de antibióticos
Salud humana	Ninguno	Transferencia de resistencias a humanos Acortan la vida de antibióticos médicos Riesgos laborales por aerosoles y polvo contaminados con antibióticos

Fuente: Briz, 2006

Muchas han sido las teorías que tratan de explicar el efecto de los antibióticos como promotores del crecimiento. Lo que es indudable es que su efecto está vinculado a la intensificación de la explotación productiva.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha pedido que los animales para consumo humano no reciban antibióticos para estimular su crecimiento o prevenir enfermedades ya que pueden provocar el desarrollo de bacterias resistentes que son transmitidas a las personas. El uso desregulado de esos medicamentos constituye una grave amenaza relacionada con la resistencia de las bacterias a los antibióticos, que la OMS considera uno de los mayores desafíos sanitarios de la actualidad.

Algunas bacterias causantes de infecciones severas en las personas ya han desarrollado resistencia a la mayoría o a todos los tratamientos conocidos, mientras que las alternativas que se investigan son muy escasas. Estudios realizados al respecto y en conjunto con la recomendación de la OMS indican que la restricción en el uso de los antibióticos en animales para el consumo humano reduce el desarrollo de la resistencia hasta en un 39 %.

Se ha descubierto que en algunos países hasta el 80 % de antibióticos importantes se utilizan en el sector animal, principalmente para estimular el crecimiento de ejemplares sanos (Torres, 2002)

Por ejemplo, se tienen casos como en la avicultura moderna, caracterizada por la sobre explotación de la producción en la que influyen distintos factores. La alta densidad de la población, vacunación, altas o bajas temperaturas, humedad inadecuada, incidencia de gases tóxicos, alta carga de microorganismos patógenos, son algunas de las problemáticas causantes de altos niveles de estrés en las aves. Estas situaciones traen consigo la aparición frecuente de diversas enfermedades y la disminución de los niveles de producción de las aves (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efectos de los promotores de crecimiento en nutrición animal

Efectos	Fisiológicos	Nutricionales	Metabólicos
Aumentan	Absorción de nutrientes Consumo de pienso	Retención de energía y nitrógeno Absorción glucosa, ácidos grasos, calcio, vitaminas, microelementos Nutrientes en plasma	Síntesis hepática proteínas Fosfatasa alcalina en intestino
Disminuyen	Tiempo tránsito intestinal Peso, longitud y diámetro de la pared intestinal Multiplicación células mucosa Humedad en heces	Pérdida de energía en intestino Síntesis de vitaminas	Producción amoniaco y aminos tóxicas Fenoles aromáticos Prod. degradación biliar Oxidación ácidos grasos Excreción grasa en heces Ureasa microbiana intestinal

Fuente: Briz, 2006

De ahí la importancia de investigar dentro de las prácticas de alimentación de los animales, la introducción de diferentes productos biológicos que contrarresten los distintos efectos ligados al estrés.

Entre los promotores de salud sugeridos se encuentran los probióticos, coadyuvantes dietéticos de origen microbiano que benefician la fisiología del hospedante al ir modificando la inmunidad de la mucosa, dando como resultado una mejora en el balance nutricional y microbiano en el tracto gastrointestinal.

Muchos antibióticos utilizados en animales son idénticos o muy parecidos a los administrados al ser humano. Esto genera el peligro de la aparición de bacterias resistentes que después pasan a las personas a través de los alimentos, del medio ambiente o de otras vías. Es importante no dejar de lado que hay alternativas al uso de los antibióticos para prevenir enfermedades, como la mejora de las condiciones de higiene, el mejor uso de las vacunas y cambios en las prácticas ganaderas (Rondón et al., 2008).

1.2.1 Probióticos y alimentos funcionales

Según el ILSI (International Life Sciences Institute por sus siglas en inglés), se describe alimento funcional como el que “logra demostrar satisfactoriamente que posee un efecto beneficioso sobre una o más funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, mejora el estado de salud y el bienestar, o bien reduce el riesgo de enfermedad” (Diplock et al., 1998).

El término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. La observación original de la función positiva desempeñada por algunas bacterias se atribuye a Eli Metchnikoff, ruso galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur a comienzos del siglo pasado, que afirmó que "la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles" (Liu, 2018).

De igual forma, a principios del siglo pasado, el pediatra francés Henry Tissier observó que los niños con diarrea tenían en sus heces un escaso número de bacterias caracterizadas por una morfología peculiar en forma de Y. Estas bacterias “bífidas” eran, por el contrario, abundantes en los niños sanos (Liu, 2018). Sugirió la posibilidad de administrar estas bacterias a pacientes con diarrea para facilitar el restablecimiento de una flora intestinal sana. Las obras de Metchnikoff y Tissier fueron las primeras en las que se hicieron propuestas científicas con respecto a la utilización probiótica de bacterias.

En el mundo actualmente, se reconocen más de 20 especies diferentes de microorganismos probióticos, los cuales pueden ser aislados de diferentes tipos de materiales: del tracto intestinal humano y de animales, carnes, frutas y vegetales fermentados, entre otros (Ramírez et al, 2011).

Las BAL fueron referidas como probióticos en la década de los 60 y a finales de los 70 se redefinieron como organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal.

La FAO ha designado la definición de los probióticos como “microorganismos vivos los cuales cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio saludable en el huésped” (Huertas, 2010).

1.2.2 Función de los probióticos

El cuerpo humano posee microorganismos que desarrollan 3 tipos de funciones básicas: metabólica (descomposición de alimentos), barrera (protección contra el exterior) e interacción con el huésped (a través del sistema inmunológico).

La microbiota se va adquiriendo en distintas fases después del nacimiento. En una primera fase, las cepas aerobias y anaerobias facultativas, colonizan el tubo digestivo y aunque cada individuo posee cepas “propias” y específicas, las funciones metabólicas permanecen relativamente constantes. Los factores limitantes del crecimiento de microorganismo en el tracto gastrointestinal son fundamentalmente el tránsito intestinal del contenido y la secreción de ácidos biliares y pancreáticos. En los últimos años se ha observado un creciente interés tanto por la comunidad científica como por parte de la población por el papel de los probióticos en la salud humana. La utilización de probióticos lleva a diversos efectos en la salud. Hay datos que demuestran en diversos grados la verificación de tales efectos, aunque se reconoció que hay informes que indican que ciertas cepas probióticas no tienen efectos clínicos en situaciones específicas (Musikasang, 2009).

Sin embargo, los efectos fisiológicos relacionados con bacterias probióticas incluye reducción de pH en el intestino, producción de algunas enzimas digestivas y vitaminas, producción de sustancias antibacteriales como: ácidos orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetaldehído, sistema lactoperoxidasa, lactonas, reconstrucción y construcción de microflora intestinal normal después de desórdenes causados por diarrea,

terapia de antibióticos, reducción de colesterol en la sangre, suspensión de infecciones bacteriales, mejoramiento de la absorción de calcio. (Huertas, 2010). También se encuentran otros efectos benéficos como se muestra en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Beneficios en la salud atribuidos a probióticos

A: Para combatir:	Desarrollo de microflora nativa en el intestino. Control de infecciones en el intestino por patógenos entéricos. Control de infecciones en el tracto urogenital. Intolerancia a la lactosa.
B: Para reducir:	Incidencia de diarreas. Tumores de cáncer en colon (y otros órganos). Colesterol sérico y enfermedades cardíacas.
C: Para estimular:	Sistema inmune. Movimiento intestinal.

Fuente: Ramírez-Ramírez, 2011

Por otro lado, estudios moleculares han demostrado resultados alentadores, atribuidos principalmente a los efectos antimicrobianos contra microorganismos productores de carcinógenos, propiedades antimutagénicas y alteración de los procesos de diferenciación celular en tumores (Ramírez et al, 2011).

Cuando se utilizan microorganismos probióticos a fin de conferir al huésped beneficios para la salud deben indicarse los regímenes de dosificación y duración recomendados por el fabricante de cada cepa o producto sobre la base de datos científicos y según lo aprobado en el país donde se vende. La concentración sugerida de BAL está en el rango 10^6 - 10^7 UFC/g de producto (Huertas, 2010). Aunque en la actualidad ésta no es la práctica habitual, se debe indicar la cantidad mínima diaria de cada producto necesario a fin de que éste confiera beneficios específicos para la salud. Estos datos deberían, siempre que sea posible, ser el resultado de estudios *in vitro*, en animales (cuando sea pertinente) y en seres humanos.

Los microorganismos probióticos utilizados en los alimentos deberían ser capaces no sólo de sobrevivir al paso por el aparato digestivo, sino también de proliferar en el intestino. Esto significa que deberían ser resistentes a los jugos gástricos y poder crecer en presencia de bilis, en las condiciones existentes en los intestinos, o ser consumidos en un alimento que, actuando como vehículo, les permita sobrevivir al paso por el estómago y a la exposición a la bilis.

La flora intestinal humana y de los animales juega un papel muy importante en su estado de salud y la presencia de enfermedades. En ambos casos los probióticos se utilizan para mejorar la salud intestinal y estimular el sistema inmunológico (Ramírez et al, 2011).

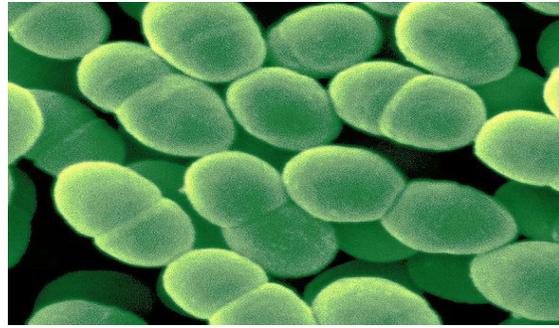
Muchos productos probióticos son utilizados por consumidores que se consideran por lo demás sanos. Lo hacen suponiendo que los probióticos les permiten mantener su salud y bienestar y reducir posiblemente el riesgo de contraer a largo plazo enfermedades intestinales, renales, respiratorias y cardíacas.

1.2.3 Cepas probióticas

El grupo de microorganismos denominados como probióticas está integrado por diversas especies incluyendo géneros como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Bifidobacterium* y *Weissella*. Otros grupos bacterianos han sido reconocidos y aceptados como probióticos, entre los que destacan: *Bacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Propionibacterium* spp. y *Streptococcus* spp (Figura 2).



a)



b)

Figura 2. Dos microorganismos típicos de las BAL: a) *Lactobacillus Rhamnosus*
b) *Lactococcus Lactis*. Fotografías al microscopio electrónico

Fuente: Ramírez-Ramírez, 2011

Dentro de las especies probióticas de mayor interés se encuentran los Lactobacilos, ampliamente utilizados en la industria. Sin embargo, para utilizarlos, es necesario realizar una adecuada evaluación de cepas de acuerdo con distintos criterios de selección, entre los que destacan:

- No ser patógeno ni toxigénico.
- Mantenerse viable en medio ácido del estómago y en contacto con la bilis en el duodeno.
- Capacidad de adherencia a las células epiteliales del tracto gastrointestinal.
- Adaptarse al tracto gastrointestinal sin desplazar a la microbiota nativa.
- Producir sustancias antimicrobianas.

Es por eso, que el éxito de un probiótico depende en gran medida de realizar una buena selección de cepas que posean la capacidad de sobrevivir y adherirse a la mucosa intestinal (Sanz et al., 2003).

En el mundo se reconocen más de 20 especies diferentes de microorganismos probióticos, los cuales pueden ser aislados de diferentes tipos de materiales: del tracto intestinal humano y de animales, carnes, frutas y vegetales fermentados, entre otros. Como microorganismos probióticos se utilizan sobretodo, aunque no exclusivamente, bacterias de los géneros

Lactobacillus y *Bifidobacterium*, y el número de alimentos probióticos puestos a disposición de los consumidores es cada vez mayor (Lorente, 2001). Para comprender la importancia del concepto de alimento probiótico para la salud humana, son necesarias algunas consideraciones ecológicas acerca de la microbiota intestinal (Cuadro 7).

Cuadro 7. Microorganismos usados como probióticos de mayor interés aplicativo

Microorganismos de mayor aplicación como probióticos	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>tolerans</i>
<i>Lactobacillus casei</i> <i>immunitis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Bifidobacterium lactis</i>
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>Saccharomyces</i> spp.

Fuente: Ramírez-Ramírez, 2011

La selección de cepas probióticas para su utilización en seres humanos se basa en que la cepa de estudio pueda ejercer sus efectos beneficiosos en el huésped mediante su crecimiento y/o actividad en el mismo (Musikasang, 2009). Sin embargo, lo que importa, es la especificidad de la acción y no la fuente del microorganismo. En mayo de 2011 la FAO y la OMS definieron conjuntamente nuevas guías para la evaluación de los probióticos; entre los puntos destacables están:

- Identificación de las cepas: mediante técnicas que incluyen métodos moleculares para establecer fenotipo, genotipo, género y especie.
- Caracterización biológica, en donde se incluye ensayos *in vivo* en modelos animales para conocer los mecanismos potenciales de acción.
- Garantizar que son microorganismos GRAS.
- La eficacia mediante estudios clínicos del efecto esperado de la cepa probiótica en seres humanos.

Con el fin de averiguar si un probiótico determinado puede prevenir o tratar una infección patógena específica, debe proyectarse un estudio clínico para verificar la exposición a dicho patógeno (estudio preventivo), o si el microorganismo que causa la infección es ese patógeno específico (estudio de tratamiento) (Cuadro 8). Es necesario perfeccionar los ensayos *in vitro* para predecir la capacidad de los probióticos de funcionar en los seres humanos. Los ensayos actualmente disponibles no son apropiados para predecir la funcionalidad de los microorganismos probióticos en el intestino.

Si el objetivo es aplicar probióticos en general para prevenir o tratar una serie de gastroenteritis infecciosas o afecciones urogenitales, el proyecto de estudio debe establecer la presentación clínica y los síntomas y signos de la infección, e incluir controles adecuados.

Dado que las propiedades probióticas están relacionadas con las cepas, es necesario que la identificación de las cepas (tipificación genética) se lleve a cabo utilizando métodos tales como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Se recomienda que se realicen primero ensayos fenotípicos, seguidos de la identificación genética mediante métodos tales como la hibridación de ADN con ADN, la determinación de secuencias del ARN 16S u otros métodos reconocidos internacionalmente.

Cuadro 8. Probióticos con efectos beneficiosos sobre la salud demostrada mediante ensayos clínicos en humanos

Probióticos con efectos beneficiosos sobre la salud demostrados mediante ensayos clínicos en humanos			
<i>Género</i>	<i>Especie</i>	<i>Cepa</i>	<i>Efecto</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>		Reducción de los síntomas del colón irritable
	<i>longum</i>	BB536	Reducción de los síntomas del colón irritable
	<i>lactis</i>	Bb12	Tratamiento de la alergia
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La5	Reducción de la diarrea por <i>Rotavirus</i> y de la incidencia de la diarrea del viajero
		Shirota	Reducción de la diarrea asociada con antibióticos
	<i>casei</i>		Reducción de la diarrea por <i>Rotavirus</i>
	<i>johnsonii</i>	La1	Inmunomodulación
	<i>plantarum</i>	299v	Reducción de la colonización por <i>Helicobacter pylori</i>
	<i>reuteri</i>	SD2112	Reducción de los síntomas del colón irritable
	<i>rhamnosus</i>	GG	Reducción del colesterol LDL
<i>salivarius</i>			Reducción de la diarrea por <i>Rotavirus</i>
		UCC118	Reducción de la diarrea por <i>Rotavirus</i> Inmunomodulación Reducción de la inflamación por colón irritable Tratamiento y prevención de las alergias

Fuente: Sanz, et al., 2003

1.3 El ratón lactante como modelo biológico

Desde que diversas patologías humanas fueron reconocidas como resultado de un defecto en la constitución genética de los individuos afectados, en forma paralela, se identificaron modelos animales de distintas enfermedades humanas. Estos modelos ayudan al estudio de la patogénesis de muchas enfermedades y favorecen el desarrollo de terapias que sustituyan la función defectiva de un gen determinado.

El uso de animales de laboratorio en estudios de investigación biomédica y producción de reactivos biológicos en general, requiere que éstos sean los apropiados para que proporcionen la seguridad en los resultados esperados, para ello, se necesita animales de calidad microbiológica y genéticamente definidos mantenidos bajo condiciones estandarizadas de acuerdo con las normas internacionales.

El ratón es un organismo modelo, al tratarse de un mamífero, en el que gran parte de sus procesos bioquímicos son similares al hombre. Además, tienen un tiempo generacional muy corto, son muy prolíficos y se adaptan fácilmente a la vida en los bioterios, lo que permite controlar las variables ambientales durante las experimentaciones.

Comparte con el hombre el ser una de las especies de mamífero mejor estudiadas desde el punto de vista genético. Actualmente, existe una gran cantidad de líneas genéticamente definidas, como las consanguíneas y congénicas, además de cientos de mutaciones y un gran número de rearrreglos cromosómicos disponibles.

Es el único animal que posee sistemas eficientes de cultivo de células embrionarias pluripotenciales (células ES).

Los modelos murinos disponibles se pueden clasificar según lo descrito por (Benavides et., al 2000) con base en su origen en:

- Modelos provenientes de mutaciones espontáneas o inducidas
- Modelos generados por transgénesis
- Modelos generados *in vitro* por manipulación de células ES.

Ventajas de su uso como animal de laboratorio:

- De fácil cuidado y mantenimiento, por su pequeño tamaño.
- Bajos costo de manutención.
- Cepa definida.
- Diversidad de características específicas que sirven como modelo
- Eficiencia reproductiva.
- Por su vida relativamente corta es excelente para su uso en ensayos crónicos de toxicología, microbiología, virología, farmacología, etc.
- Corto tiempo de generación.

Además, desde los comienzos del siglo XIX hasta la actualidad, los modelos murinos han contribuido a la comprensión de la patogénesis de muchas enfermedades y al desarrollo de nuevas terapias. La tendencia actual de las investigaciones biomédicas hace pensar que en el futuro próximo la disponibilidad de modelos murinos incrementará debido a la gran cantidad de manipulación genética y a proyectos de mutagénesis-química existentes (Hinrichsen, 2010). El manejo de estos animales una vez terminada su función como animal de estudio, debe ser preparado para proceder a la técnica de eutanasia. Esta debe ser con el fin de no causar sufrimiento al ratón.

1.4 Pruebas de identificación del género y especie de las cepas de BAL

1.4.1 Pruebas primarias: Tinción de Gram

En el área de microbiología, el microscopio se utiliza de forma rutinaria, ya que proporciona importante información para la identificación temprana y definitiva de los microorganismos. En la valoración de las muestras, es trascendente el poder de resolución del microscopio. Éste será el encargado de la calidad, claridad y nitidez detallada de la imagen, y depende de la longitud de onda (λ) del haz de luz utilizado y de la apertura numérica del objetivo empleado.

Para aprovechar la utilidad de los microscopios, se han desarrollado técnicas tintoriales que destacan las características morfológicas de los microorganismos. Existe una gran variedad de tinciones que pueden ser aplicadas en el campo de la microbiología.

Algunas técnicas tintoriales como Gram, requieren antes de su proceso la fijación de las muestras, con la finalidad de preservar la arquitectura estructural y química de las células. Existen dos tipos de fijadores: físicos y químicos. Entre los procesos de fijación físicos se tienen los siguientes: desecación, calor seco, calor húmedo, ultrasonido y microondas (López-Jácome et al., 2015).

Uno de los métodos físicos más utilizados es el calor seco, que consiste en la exposición directa de la laminilla a la flama del mechero, logrando detener así los procesos vitales de las células y los microorganismos. Es importante realizar con cuidado este proceso ya que la sobreexposición, o la exposición incorrecta a la flama (zona fría, zona caliente y zona de fusión) repercutirán en el efecto deseado; por lo que es común provocar alteraciones morfológicas y destrucción celular.

Hoy en día, sigue siendo una de las tinciones más utilizadas universalmente debido a lo económico, sencillo y eficaz que resulta. La tinción de Gram se basa en las características de la pared celular de las bacterias, la cual confiere propiedades específicas a cada microorganismo (Figura 3).

La pared de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano (confiere rigidez) y una membrana celular externa, compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo 10% - 20% de la pared de la célula Gram-negativa es peptidoglicano.

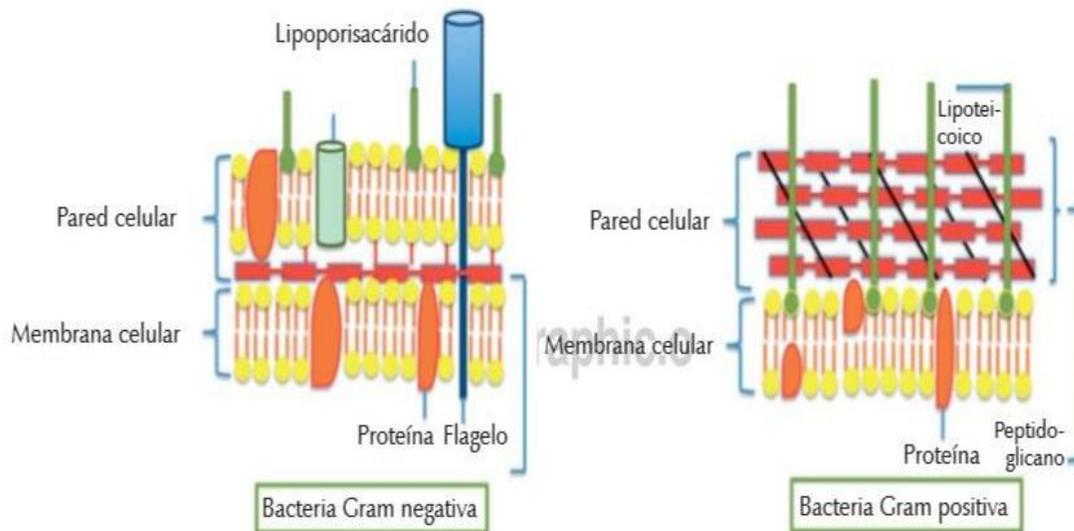


Figura 3. Estructura de Bacterias Gram Positiva y Bacterias Gram Negativa
Fuente: López-Jácome et al., 2014

En cambio las bacterias Gram positivas, poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano (generalmente un 80-90%) con la excepción de que no cuentan con

membrana celular externa (López-Jácome et al., 2014). Es así que su comportamiento durante la tinción está determinado con base en el contenido de peptidoglicano y la composición química de este grupo de bacterias.

La tinción de Gram se basa en colocar como colorante primario cristal violeta, el cual tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana. Posteriormente, se coloca lugol, el cual impide la salida del cristal violeta-yodo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana; después, se coloca una mezcla de alcohol-acetona, la cual deshidrata su pared. Además, destruye la membrana externa de las bacterias Gram negativas debido a que ésta es soluble a la acción de solventes orgánicos.

Finalmente, se coloca safranina, la cual funciona como un colorante secundario y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo. La diferencia esencial entre esos dos tipos de células está por tanto en su resistencia a la decoloración; esta resistencia se debe probablemente al hecho que en el caso de bacterias gran-negativas, la mezcla de alcohol/acetona es un solvente lipídico y disuelve la membrana exterior de la pared de la célula (y también puede dañar la membrana citoplasmica a la que se une peptidoglicano). La delgada capa de peptidoglicano es incapaz de retener el complejo cristal violeta-yodo y la célula se decolora.

Las células Gram positivas, a causa de sus paredes celulares más espesas (tienen más peptidoglicano y menos lípido), no son permeables al disolvente, provocando que el complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular. Después de la decoloración, las células Gram positivas son todavía azules, pero las Gram negativas son incoloras. Para poner de manifiesto las células Gram negativas se utiliza una coloración de contraste (López-Jácome, et al., 2014). Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina básica.

Las bacterias Gram positivas se observan de color azul oscuro a morado, mientras que las Gram negativas se observan de color rosa a rojo. Esta tinción es una herramienta elemental, vigente y de uso universal que coadyuva para el diagnóstico microbiológico.

1.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica “*in vitro*” de secuencias específicas de ADN que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos, en los que la secuencia blanco es copiada.

Se ha ampliado su uso no sólo en el campo de la genética molecular, sino en otras muchas ciencias. Las siglas PCR significan “Polimerase Chain Reaction”, Reacción en Cadena de la Polimerasa.

A menudo proclamada como uno de los avances científicos más importantes en la Biología molecular, la PCR revolucionó el estudio del ADN en tal medida que su creador, Kary B. Mullis, recibió el Premio Nobel de Química en 1993. Utilizó la PCR para la amplificación del gen de la β -globina humana y el diagnóstico prenatal de la anemia falciforme y fue, desde entonces, que la PCR ha revolucionado todos los campos que estudian y manipulan los ácido nucleicos. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.

En aquella época, Mullis se basó en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la DNA polimerasa. Esta enzima, es la encargada de realizar la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido $5' \rightarrow 3'$ usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región de doble cadena se utilizan cebadores (primers); los cuales son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de tal manera que sean complementarios a cada uno de los extremos $3'$ del fragmento de DNA que se desea amplificar (Mas et al., 2016).

Se conoce además que, una vez amplificado el ADN producido por la PCR puede usarse en muchos procedimientos de laboratorio diferentes. Por ejemplo, la mayoría de las técnicas de mapeo en el Proyecto del genoma humano (PGH) dependieron de la PCR.

Esta reacción también es valiosa en varias técnicas de laboratorio y clínicas, incluida la identificación de la huella genética, la detección de bacterias o virus (especialmente el del sida) y el diagnóstico de trastornos genéticos.

1.4.2.1 Principios de la PCR

Los elementos importantes en esta reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio (Mg^{+}), una solución amortiguadora o buffer y H_2O . Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos (Figura 4).

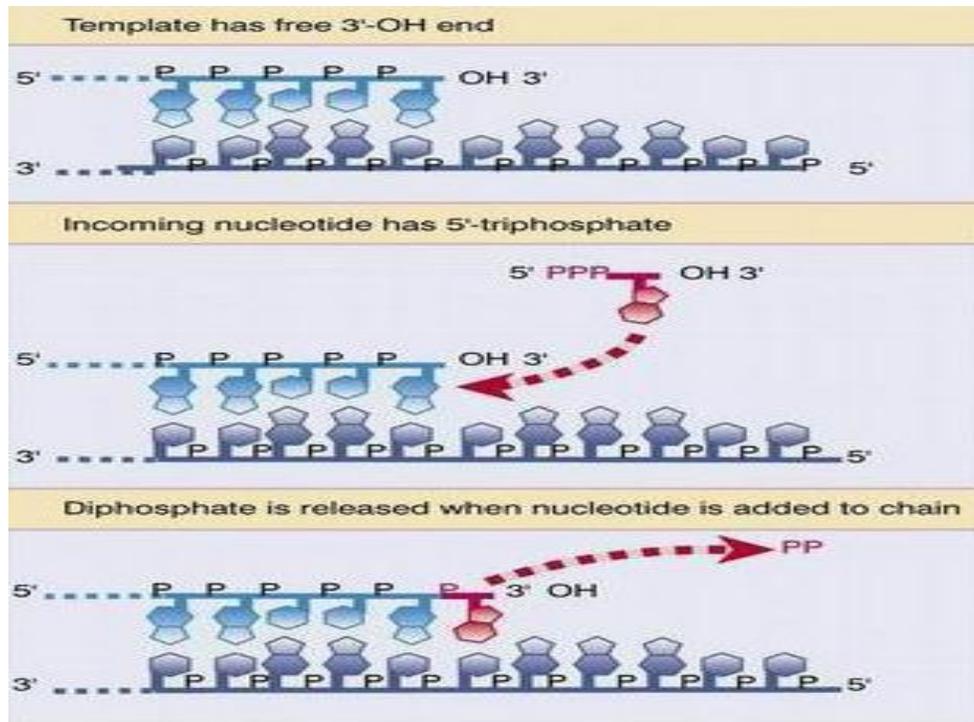


Figura 4. Formación del enlace fosfodiéster mediante la DNA polimerasa

Fuente: Basu, 2015

La reacción de amplificación contempla la participación de dos iniciadores (primers o cebadores), que se hibridan (se unen por complementariedad de bases) a cadenas opuestas del segmento “blanco”; cada iniciador se orienta de forma tal que la elongación se lleva a cabo a partir de su extremo 3'-OH, a través de la zona delimitada entre ambos iniciadores y hasta la región homóloga al “otro iniciador”. Como cada producto de la amplificación incluye la secuencia complementaria a la del “otro iniciador”, prácticamente todos los productos de cada reacción sirven de molde para el siguiente ciclo del PCR.

El elemento principal en la PCR es el ADN, es una molécula biológica extremadamente estable y de larga vida. Tiene la característica de ser específica de las especies, está presente en la mayoría de las células de un organismo y todas ellas contienen la información idéntica. Es más termoestable que muchas proteínas y puede proveer potencialmente más información que muchas proteínas. Es importante recordar que la molécula de ADN está formada por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina) que es complementaria con la base de otra cadena, de tal forma, que el ADN se estructura en una doble hélice (Figura 5). La complementariedad entre las bases está dada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, generando estabilidad a la doble hélice, la carga eléctrica del ADN es negativa y está dada por los grupos fosfato.

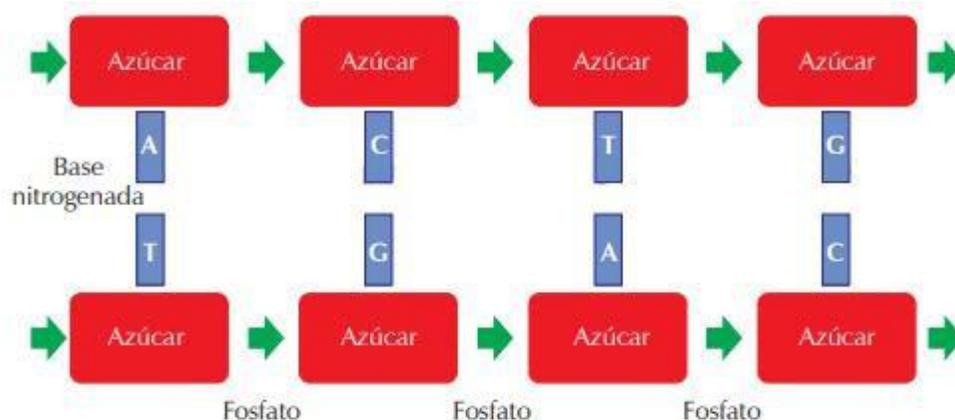


Figura 5. Molécula de ADN de doble cadena

Fuente: Tamay de Dios et al., 2013

En la PCR, el templado son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Por su parte, la ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. La enzima más usada con frecuencia se llama buffe ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila la llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas. El rasgo que distingue a esta enzima bacteriana de otras ADN polimerasas de otros organismos es su capacidad para mantener su funcionalidad a temperaturas altas (79°C a 85°C) por lo que se le considera una enzima termoestable. La PCR utiliza altas temperaturas repetidamente para desnaturalizar el molde de ADN o separar sus cadenas. También hay otras enzimas que se utilizan como la Vent, obtenida de la bacteria *Thermococcus litoralis*. Para que la enzima funcione con alta especificidad y la reacción transcurra exitosamente, se necesita de los elementos ya mencionados como primers, dNTP, Mg⁺², PCR y H₂O.

Los primers son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia. Si no se respetan estas reglas, existe la posibilidad de la formación de dímeros de primers, es decir, de productos inespecíficos. Esto repercutiría en el rendimiento de la reacción, así como en la especificidad del producto esperado.

Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada «forward» o sentido y otra «reverse» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3'.

Con la finalidad de garantizar la formación de un complejo estable entre el templado y los primers, hoy en día existen programas informáticos para diseñar primers con alta especificidad, por lo que se evita la formación de productos inesperados.

Por su parte, los dNTP son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. Son factores importantes que contribuyen a la

especificidad de la reacción, por ello es importante que su concentración sea la adecuada ya que de lo contrario pueden afectar la función de la Taq polimerasa. Normalmente, se utilizan a una concentración que oscila entre 0.2 a 1.0 mM. El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8).

El Mg^{+2} es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa; regularmente su concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM. En ocasiones ya viene incluido en el buffer, pero en otras se le tiene que agregar. El agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, que son enzimas que degradan a los ácidos nucleicos (Bessetti, 2007).

1.4.2.2 Etapas de la PCR

Se debe recordar que cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión, las cuales se explican a continuación.

Desnaturalización. Se trata de una etapa crítica ya que es de suma importancia que el ADN molde se desnaturalice completamente. En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad con la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa se tienen las cadenas separadas que servirán como templado para la siguiente etapa.

Generalmente, en la práctica, se suele añadir un período de desnaturalización antes de comenzar los ciclos para asegurar que se produce a lo largo de toda la muestra de ADN. Esta etapa suele ser de 5' a 94°C.

Hibridación. En esta etapa, la temperatura y el tiempo van a depender de 3 factores relacionados con los oligonucleótidos: la composición de bases, su tamaño y concentración.

Los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 45 y 65°C, durante un tiempo comprendido entre 30 segundos y 1 minuto. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

Elongación. En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72°C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación. En la práctica es común que al final de todos los ciclos se realice una última elongación de 5' a 72°C. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador (Figura 6).

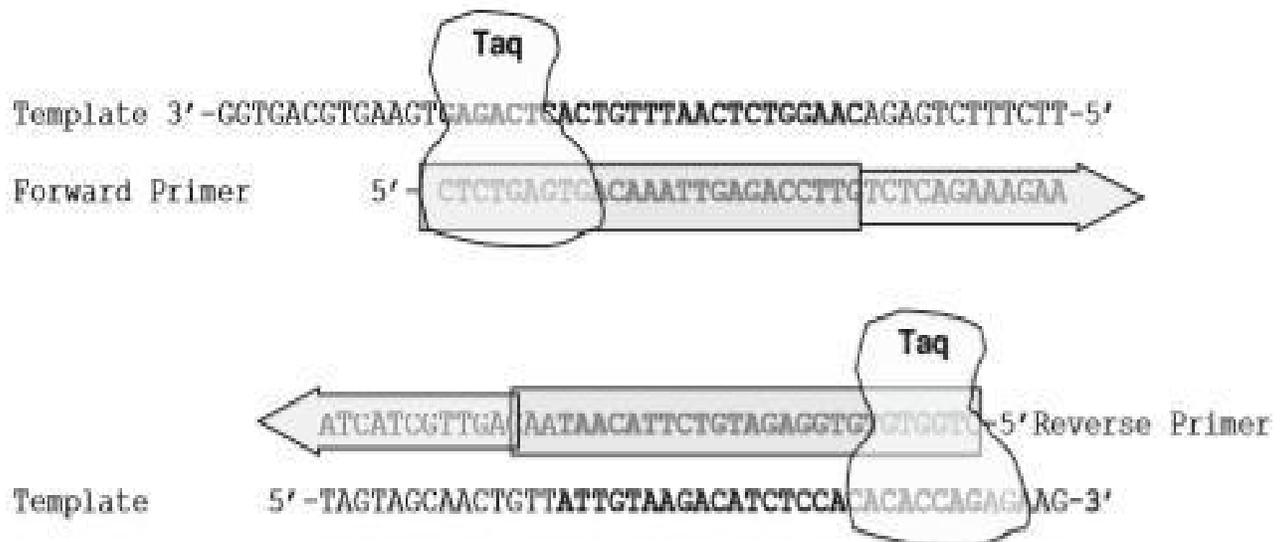


Figura 6. Molde con primers de PCR, alineación y dirección por la Taq polimerasa. La longitud del amplicón es de 162 pares de bases incluyendo los primers

Fuente: Basu, 2015

Es de gran relevancia, cuando se quiere optimizar una PCR, el número de ciclos que se utilizan. El número de ciclos dependerá de la cantidad de ADN que existe en la muestra una vez que el resto de factores han sido optimizados empíricamente (Figura 7).

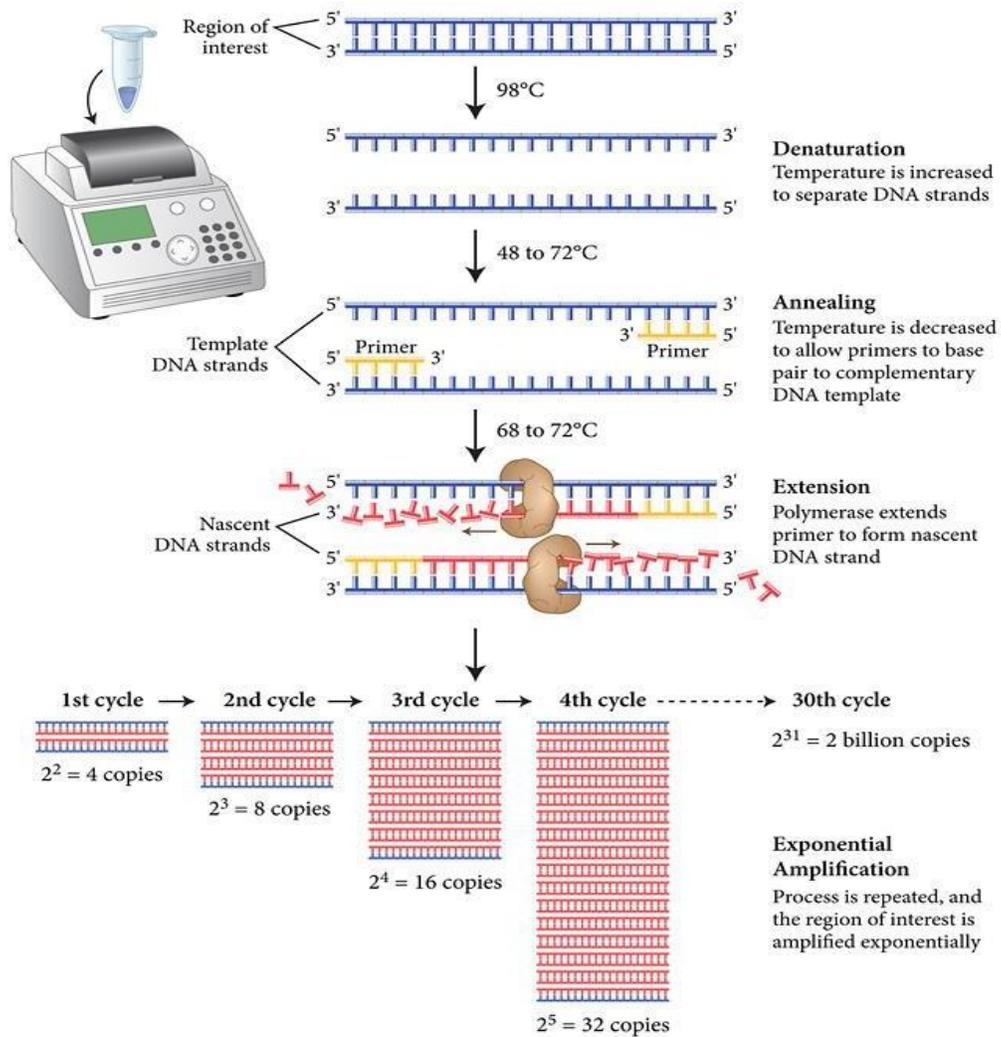


Figura 7. Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Fuente: Mas et al., 2016

1.4.2.3 Aplicaciones de la PCR

Las técnicas de biología molecular representan la herramienta diagnóstica más confiable, ya que establecen con exactitud la presencia de los agentes etiológicos en los diversos especímenes clínicos, con base en la detección de segmentos de DNA específicos de cada microorganismo. Mediante el uso de la PCR, una secuencia de ADN se puede amplificar millones o miles de millones de veces y producirá suficientes copias de ADN para que se analicen mediante otras técnicas. Por ejemplo, el ADN se puede visualizar por electroforesis en gel, enviar a secuenciar o digerir con enzimas de restricción y clonar en un plásmido.

La PCR se utiliza en muchos laboratorios de investigación y también tiene aplicaciones prácticas en medicina forense, pruebas genéticas y diagnósticas. Por ejemplo, la PCR se utiliza para amplificar genes asociados con trastornos genéticos a partir del ADN de los pacientes (o de ADN fetal, en el caso de pruebas prenatales). La PCR también puede utilizarse para detectar el ADN de una bacteria o un virus en el cuerpo de un paciente: si el patógeno está presente, es posible amplificar regiones de su ADN de una muestra de sangre o tejido (Luque, 2006).

Es precisamente en este aspecto, que el reciente desarrollo de la “reacción en cadena de la polimerasa (PCR)” ha venido a enriquecer la práctica diagnóstica molecular de las enfermedades infecciosas en los laboratorios de todo el mundo: una vez recolectada y preparada la muestra, ocurre en su seno la rápida multiplicación (amplificación) del DNA perteneciente al agente causal, y los millones de copias obtenidas incrementan notablemente la sensibilidad de cualquier otra técnica que se elija para lograr la detección correspondiente (Doménech, 2004).

1.4.2.4 Visualización de los productos de la PCR

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa. La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo con su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace adicionando un buffer o tampón que puede ser TAE (disolución tampón formada por Tris, acetato y EDTA) o TBE (disolución tampón formada por Tris, borato y EDTA).

En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Para ello, se prepara un gel diluyendo una cantidad de agarosa en el buffer, se calienta hasta que la agarosa hierva lo suficiente y posteriormente se vacía a un recipiente que sirve de base para que solidifique. Generalmente el porcentaje al que se prepara el gel es al 1.2% aunque, dependiendo del tamaño de las moléculas, puede ser de hasta el 2%.

Otro ingrediente que se agrega al gel es un compuesto conocido como bromuro de etidio, una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena. Cuando es excitado con luz ultra-violeta emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas. Es importante manipular con mucho cuidado este compuesto porque se sabe que es mutagénico y teratógeno.

Cuando los amplicones son corridos en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo que facilita la identificación de los amplicones y si su tamaño corresponde con el esperado. El tamaño está dado por el número de pares de bases del amplicón. El marcador de peso molecular es fácilmente adquirido en el mercado, ya que se ofrece una gama de marcadores con distintos pesos moleculares para elegir el de nuestro interés.

Finalmente, la visualización de los amplicones se lleva a cabo tomando una foto digital al gel de agarosa expuesto a luz UV; adicionalmente un procesador de imágenes se encarga de

analizar las bandas observadas. La combinación adecuada de todos los elementos químicos mencionados, hacen posible la síntesis *in vitro* del ADN utilizando la PCR (Figura 8).

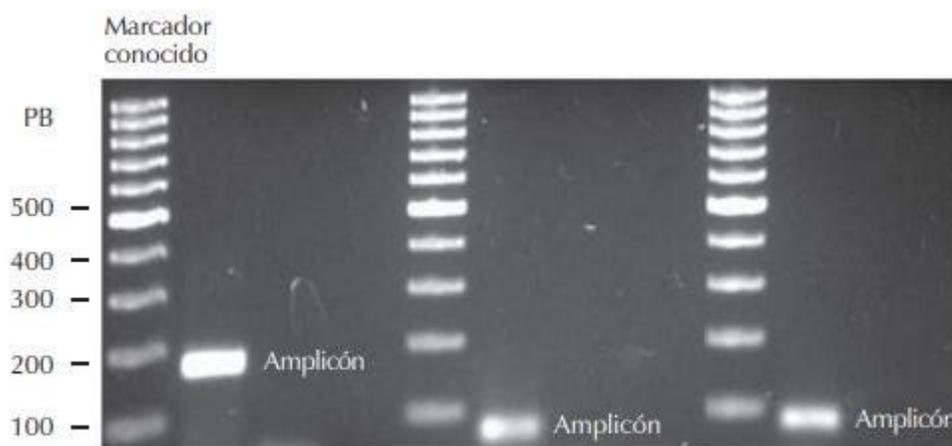


Figura 8. Ejemplificación de un gel de agarosa con el resultado de la PCR

Fuente: Tamay de Dios et al., 2013

1.5 Herramientas de Bioinformática

Durante la última década del siglo XX, los avances de la Ingeniería genética y las nuevas tecnologías de la información, condicionaron el surgimiento de una disciplina que creó vínculos indisolubles entre la Informática y las ciencias biológicas: la Bioinformática. Además, ha atraído la conjugación de varias disciplinas, entre las que se encuentran la estadística, la química, la informática y las ciencias biológicas. El término Bioinformática es relativamente reciente, y apareció en la literatura a principios de 1990, cuando comenzaba a estructurarse el llamado “Proyecto Genoma Humano” (Querts, 2013).

Por su parte, la Bioinformática tiene como reto principal ofrecer una respuesta a los precedentes de la Genómica. Consultar la secuencia del genoma de una especie en particular o de varias ha sido posible gracias a las bases de datos y técnicas de

visualización para almacenar los resultados de diversos experimentos, y a su vez, lograr su distribución a través de agentes privados, públicos e internacionales.

1.5.1 Fundamento

La Bioinformática proporciona una manera alternativa de obtener de forma muy eficiente y precisa información genómica para su posterior análisis. Dentro de los objetivos de la Bioinformática está el facilitar entender las correlaciones, las estructuras y los patrones en los datos biológicos. También se encuentra la creación de métodos computacionales para manipular, ordenar y analizar la información generada mediante experimentos y la aplicación de estos métodos para resolver problemas de índole biológico y así generar nuevo conocimiento (Martí, 2009).

La Bioinformática ha contribuido al boom de la biología molecular mediante el desarrollo de algoritmos para el análisis, clasificación y determinación de secuencias de ADN y proteínas.

1.5.2 Base de datos y sus aplicaciones

La bioinformática es actualmente utilizada en diversos campos de la ciencia, basándose en las distintas herramientas electrónicas para asegurar un nuevo conocimiento más eficiente y preciso.

Con base en su contenido, las bases de datos biológicos se pueden dividir en tres categorías:

- Base de datos primarias; son archivos de secuencia en bruto o datos estructurales (por ejemplo: *Gen Bank* y *Protein Data Bank*).
- Base de datos secundarias; contienen información procesada computacionalmente con base en datos primarios (por ejemplo: *Swiss-Prot* y *PIR*).

- Base de datos especializadas; son aquellas que están enfocadas en un campo específico de una investigación, se especializan en un organismo en particular o contienen un determinado tipo de datos (por ejemplo: *Flybase* y la *Ribosomal Database Project* y la *Base de datos de secuencias de VIH*) (Escobar et al, 2011).

Las herramientas de software también pueden clasificarse de acuerdo con su función en las siguientes clases:

- Recuperación de datos, por ejemplo: *Entrez*, sistema integrado de datos de recuperación desarrollado por la NCBI (National Center for Biotechnology Information) que proporciona un acceso a secuencias, nucleótidos, proteínas y genomas.
- Comparación de la secuencia y las herramientas de alineación, por ejemplo: BLAST, que realiza búsquedas completas a altas velocidades. También se encuentran GenBank y EMBL (European Molecular Biology Laboratory), y para alineación de secuencias múltiples está ClustalW.
- Descubrimiento de patrones, por ejemplo: Cluster y GeneQuiz utilizadas como un sistema integrado para el análisis de secuencias de ADN y proteínas.
- De visualización, permiten una visualización gráfica e interactiva de los datos genómicos, por ejemplo: *Protein Explorer* y *TreeView*. (Escobar et al., 2011).

Además de las bases de datos antes mencionadas, se encuentran las siguientes que se utilizan con gran frecuencia:

- ExPASy (Expert Protein Analysis System)
- EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute)
- NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System)
- PopGene (Population Genetic Analysis)
- Kyazma-Join Map
- WebLogo 3
- OligoAnalyzer

El uso de estas herramientas computacionales, facilita la tarea del investigador y le permiten entonces enfocar su estudio al desarrollo de proyectos que estén relacionados con medicina molecular, biotecnología, descubrimiento de fármacos, análisis del genoma, control biológico y ayudar al mejor entendimiento de los seres vivos.

1.5.3 Selección de primers especie específicos en la verificación de género y especie de cepas

Un primer también conocido como marcador molecular u oligonucleótido, es una molécula sintética de longitud generalmente entre 18 a 30 nucleótidos que deben ser complementarias al extremo 3' de cada una de las hebras sencillas del fragmento de ADN. Tales fragmentos pueden encontrarse cerca de un gen que codifica una característica de interés o en regiones que sin ser codificantes, contienen características estructurales particulares (Rocha, 2003).

Otra de sus características es que por la información que brindan, son más complejos, no se aprecian en el fenotipo de los individuos lo que significa que no se observan a simple vista y el grado de polimorfismo (variantes) es enorme si se compara con otro tipo de marcadores. La selección de oligonucleótidos es muy importante en la PCR, de este paso depende el éxito en el laboratorio. Si se tienen altas concentraciones de los primers se puede promover un cebado incorrecto y acumulación de producto no específico y puede incrementar la probabilidad de generar un templado independiente llamado dímero de primer. Los productos no específicos y los dímeros de primers son por si mismos sustratos para PCR y compiten con el producto deseado por la enzima, dNTP y primers, resultando en un bajo rendimiento del producto deseado.

Se deben tener en cuenta ciertos parámetros para su diseño como se muestra en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Parámetros a considerar para el diseño de primers

PROPIEDAD	DISEÑO OPTIMO
COMPOSICION DE LAS BASES	De un 40-60 % en el contenido de guanina-citosina, las cuatro bases deberán estar distribuidas a lo largo de toda la secuencia.
LONGITUD	Deberán tener una longitud de 18-35 nucleótidos. Es recomendable que el par de primers sea de la misma longitud o que no rebase una diferencia de 3 nucleótidos.
SECUENCIAS REPETIDAS Y COMPLEMENTARIAS A SÍ MISMAS	Tener menos de 4 pares de bases idénticas en la secuencia invertida (secuencia complementaria); esto debe ser evitado para minimizar la formación de estructuras secundarias. Estos tipos de secuencias tienden a formar estructuras tipo horquilla, las cuales pueden prevenir el annealing del oligonucleótido con su plantilla en una PCR.
TEMPERATURA DE FUSION (Tm)	Es calculada para ambos miembros del par de primers y no deben diferir en 5° o más. La Tm del producto amplificado no debe diferir más de 10°C con los valores de Tm del par de primers. Mientras que la temperatura de alineación está dentro de un rango de 55-72°C.
COMPLEMENTARIEDAD ENTRE LOS MIEMBROS DE UN PAR DE PRIMERS	Las secuencias terminales en 3' de un primer no deben ser capaces de unirse a cualquier sitio del otro primer. Aún teniendo una baja complementariedad entre ellos permite la formación de híbridos y por consiguiente la síntesis y amplificación de la plantilla de ADN.
LOCALIZACION EN SITIOS DE AMPLIFICACION	La localización de los sitios de amplificación puede estar determinada por el objeto de estudio del investigador.

Fuente: Adaptación de Sambrook et al., 2001

1.5.4 Secuenciación

Durante los últimos diez años, la secuenciación de ADN se ha automatizado, permitiendo la obtención de secuencias a gran escala en tiempos relativamente cortos. El análisis estadístico y genético de los miles de puntos de información generados mediante los primers, ha ido evolucionando junto con las distintas herramientas que actualmente existen dentro de la Bioinformática.

La secuenciación del ADN significa determinar el orden de los cuatro componentes básicos químicos, llamados “bases”, que forman la molécula de ADN. La secuencia informa al investigador la clase de información genética que se transporta en un segmento específico de ADN. Esto puede hacerse comparando las secuencias nuevas (desconocidas) con las secuencias bien estudiadas y anotadas (conocidas) (Escobar, et al., 2011).

Este análisis incluye la alineación de secuencias, la búsqueda en la base de datos de secuencias, el descubrimiento de patrones, la reconstrucción de las relaciones evolutivas y la formación y comparación del genoma.

ADN, ARN y proteínas, forman el orden del flujo de la información genética en todas las células, todos ellos identificados como polímeros lineales.

El objetivo de la secuenciación es conocer exactamente el orden de sus monómeros; del orden de los nucleótidos en el ADN y ARN se puede inferir su evolución y su función.

En la doble hélice de ADN, las cuatro bases químicas se unen siempre con la misma pareja para formar “pares de bases”. Adenina (A) siempre forma pareja con timina (T); citosina (C) siempre forma pareja con guanina (G). Este emparejamiento es la base para el mecanismo mediante el que las moléculas de ADN se copian cuando las moléculas se dividen.

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Desde la década de los 70s, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizado ampliamente para establecer relaciones filogenéticas. Es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nt, codificado por el gen rrs, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S).

El análisis de la secuencia de los ARNr 16S de distintos grupo filogenéticos reveló la presencia de oligonucleótidos firma. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos o en la mayor parte de los miembros de un grupo filogenéticos y raramente están presentes otros grupos. Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar cada bacteria dentro de su propio grupo (del Rosario, 2004).

Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios. Y dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ADNr 16S existen bases de datos amplias.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los ADNr 16S de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva (Escobar, et al., 2011).

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADN 16S incluye tres etapas: a) amplificación del gen a partir de la muestra apropiada; b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón, y c) análisis de la secuencia (Figura 9).



Figura 9. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S

Fuente: del Rosario, 2004

1.5.5 Análisis de Similitud

El término de homología molecular es definido como la correspondencia de similitud a varios niveles (nucleótido, gen y genoma), lo que se debe verificar mediante un análisis de congruencia entre caracteres. Este concepto es uno de los más importantes en sistemáticas y biología comparativa, pero también uno de los más controversiales.

La existencia de homología se da en función de dos tipos de procesos: los del desarrollo, que generan estructuras específicas y los que mantienen o conservan estructuras ya generadas (Luna, 2010).

Los científicos han encontrado que dos secuencias similares poseen el mismo papel funcional. La comparación se puede hacer desde aspectos de comportamiento bioquímico o de acuerdo con la estructura de la proteína. Si dos secuencias de diferentes organismos son similares, se dice que son secuencias homólogas.

La alineación de secuencias, es el proceso por el cual, se comparan las secuencias mediante la búsqueda de patrones de caracteres comunes y el establecimiento de los residuos de correspondencia entre las secuencias relacionadas. El alineamiento de pares de secuencias es fundamental en la búsqueda de similitudes dentro de la base de datos y el alineamiento de secuencias múltiples (Escobar, 2011).

Cuando dos secuencias son descendientes de un origen evolutivo común, se dice que tienen una relación homóloga u homología.

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Debido a las distintas aplicaciones de las Bacterias Ácido Lácticas entre ellas en los alimentos, durante siglos han contribuido a la vida útil y al desarrollo de alimentos fermentados madurados actuando como bioconservadores. Han modificado significativamente el sabor, olor, textura, características sensoriales y valor nutricional de los productos alimentarios gracias a sus propiedades metabólicas. Las BAL también desempeñan un papel en el desarrollo e innovación de productos alimentarios con base en probióticos, favoreciendo un mejor estado de salud animal y humano (Huertas, 2010).

Las BAL han estado presentes en el desarrollo de las civilizaciones desde la antigüedad, y en la actualidad presentan una gran utilidad biotecnológica en la industria alimentaria. Es por eso que las tendencias futuras abren una gran diversidad de líneas de investigación, en el estudio de su caracterización filogenética, su actividad metabólica y fenómeno de

antagonismo, para el control de microorganismos como Salmonella y E. coli, responsables de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), en la búsqueda de estrategias biológicas que promuevan alimentos inocuos. Así mismo, en el control de otras bacterias relacionadas, responsables de la alteración de los alimentos, logrando procesos más estables desde el punto de vista tecnológico y mayor innovación y hallazgos benéficos nutricionalmente hablando, en favor de la salud y de la conservación de los alimentos.

Actualmente, se ha incrementado notablemente la demanda de mercado en relación con nuevas cepas microbianas que posean capacidad como probióticos, debido a que constantemente se requieren cepas mejoradas en relación con las cepas probióticas ya comercializadas. Por lo tanto, este proyecto busca lograr mediante el aislamiento de cepas de BAL su caracterización molecular en términos de género y especie, dada la complejidad técnica y económica que implica continuar utilizando cepas comerciales de colección. Además, con base en los resultados obtenidos en este proyecto, se abren nuevas líneas de investigación en las que se consideren como objetos de estudio: el proceso de preparación y conservación de los probióticos, realización de ensayos clínicos, la viabilidad de las cepas a emplear, o de una mezcla de cepas probióticas, en condiciones de tracto gastrointestinal de los huéspedes, la dosificación específica, así como los efectos en la salud general debido al uso de los probióticos.

Hipótesis: Al comparar las secuencias de los genes del ARNr 16S, de los productos de PCR obtenidos y purificados, se podrán establecer las relaciones filogenéticas que permitan identificar género y especie de las cepas de las bacterias ácido lácticas aisladas del tracto intestinal del ratón.

Objetivo general: Establecer la metodología para realizar el aislamiento y purificación de bacterias ácido lácticas (BAL), a partir del tracto intestinal de ratón, para su identificación molecular por género y especie.

Objetivo particular 1: Establecer la metodología para el aislamiento de cepas de BAL para su caracterización microbiológica en medios selectivos y diferenciales en condiciones anaerobias y pruebas primarias, para la verificación de su pureza.

Objetivo particular 2: Establecer la metodología para la extracción, cuantificación y evaluación de la integridad del ADN, proveniente de las cepas de BAL, obtenidas del tracto intestinal de ratón, para el aseguramiento de su pureza.

Objetivo particular 3: Identificar las especies de *Lactobacillus* encontradas en el modelo murino, mediante la búsqueda en herramientas bioinformáticas, para la selección de iniciadores especie-específicos de las cepas de BAL aisladas, para su caracterización de género y especie.

Objetivo particular 4: Seleccionar las condiciones específicas para el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante ensayos previos de la técnica, que permitan la caracterización molecular de las BAL de tracto intestinal de ratón para la estandarización de la misma.

Objetivo particular 5: Establecer la metodología para la purificación de los productos de la técnica de PCR para su secuenciación.

Objetivo particular 6: Verificar el género y especie de las BAL, mediante el análisis de similitud de secuencias a partir de los productos obtenidos de la PCR utilizando programas de bioinformática.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Esquema de investigación

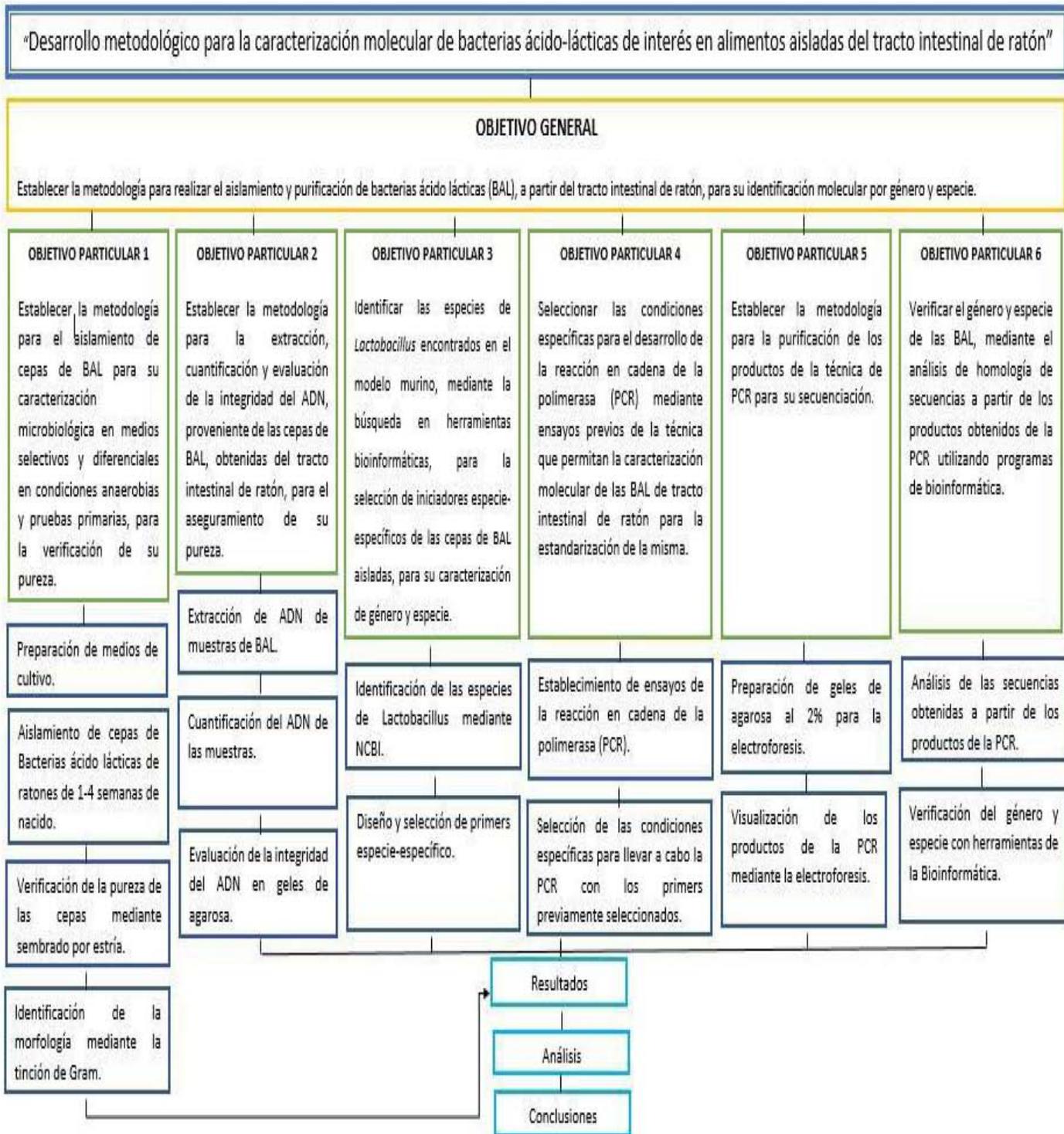


Figura 10. Esquema de investigación

2.1.1 Descripción de la secuencia experimental

Preparación de medios de cultivo

Se prepararon 2 medios de cultivo MRS; uno sólido con agar al 1% y el segundo líquido sólo con MRS.

Para la preparación del MRS al 1% de agar (sólido), se llevó a un volumen de 300 mL. Se pesaron 16.5 g MRS y 3 g de agar. Posteriormente, para el agar (sólido) se agregaron 70 mL de agua destilada en un frasco de laboratorio Autoclavable de 500 mL. Se vertieron el MRS y el agar y se llevó a un volumen aproximadamente de 300 mL y se agitó hasta suspender el agar.

Para el MRS líquido, se repitió el procedimiento anterior. Se llevó a un volumen de 200 mL de agua destilada, se pesaron 11 g de MRS y 2 g de agar.

Finalmente se colocaron ambos medios dentro de la autoclave, así como las cajas Petri y los tubos de vidrio. Se esterilizaron durante 15 min a 121°C a una presión de 15 libras.

Aislamiento de cepas de BAL

Para poder realizar lo establecido en el cuadro metodológico (2.1) se requirió de diversas muestras biológicas. Se utilizaron ratones de 1-4 semanas de nacidos de la cepa CD-1, cada uno de ellos proporcionado por el Bioterio ubicado en las instalaciones de la UIM. Se seleccionó el ratón de 4 semanas de nacido considerando que su microbiota natural proveía BAL que una vez aisladas continuarían con su crecimiento. Se procedió a dar eutanasia por medio de CO₂ según lo establecido en la NOM-ZOO-062-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. En el laboratorio 7 de la UIM, se encendió la campana de flujo laminar y se limpiaron con alcohol al 70% las tijeras y pinzas de acero inoxidable.

Una vez que el material de disección se encontró limpio, se colocó junto con 2 cajas Petri y 3 tubos de cultivo MRS líquido.

Cada uno de los ratones modelo se colocaron en la campana de flujo laminar y con alcohol al 70% se limpió su abdomen. Posteriormente se colocaron en cajas Petri para su manipulación.

Se les realizó un corte en su abdomen para la extracción del intestino delgado y el colon. Se identificaron y se separaron cada una de las porciones intestinales: duodeno, yeyuno, íleon y colon. Se lavaron cada una de las porciones con agua peptonada estéril, haciéndola pasar por la luz intestinal, con ayuda de puntas estériles, para colectar la microbiota presente en cada porción de intestino. Se tomó una asada de la muestra del lavado y se vertió en 15 mL de MRS líquido y se incubaron a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 h en condiciones anaerobias en cámara de anaerobiosis con un sobre de Gas-Pack BD™.

Para la verificación de la pureza de las cepas empleadas, se sembró por estría en placa con agar MRS y se incubó a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 h y se identificó la morfología de las colonias mediante la tinción de Gram.

Para esta tinción se tomó una impronta de células de cultivo fresco y se colocó en un portaobjetos. Se colocó una gota de agua estéril y se dejó secar al aire durante 1 min, se cubrió la muestra una vez seca con solución Cristal violeta (Cristal violeta, etanol al 95% y agua destilada). Se eliminó el exceso de las soluciones con agua destilada, se agregó una gota de solución de lugol (Yodo, KI, polivinil pirrolidona, agua destilada) dejando actuar 1 minuto. Cada uno de los reactivos utilizados fue B-D™ Gram Strain Kit.

Se dejó secar la muestra a temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$) y se observó al microscopio óptico (Olympus CX31 Tokyo, Japón) con el objetivo 100x para identificar bacterias Gram positivas o negativas. La tinción se realizó con el objetivo de proveer una identificación y clasificación con base a la morfología celular bacteriana (cocos y bacilos), resultando un valoración inicial en el análisis bacteriológico.

La extracción de ADN de muestras de las Bacteria ácido lácticas aisladas del ratón lactante se llevó a cabo basada en el protocolo descrito por ratonesok (2001) y Cheng et al. (2003) con modificaciones en ambas metodologías. Para obtener el paquete celular, se agregó fenol/cloroformo y se centrifugó. Para la evaluación de la integridad del ADN se visualizaron las muestras en geles de agarosa al 2% a 90 V por 30 minutos, determinando

previamente las condiciones idóneas en las que la integridad del mismo prevalecía en conjunto con estas dos variables.

Los primers fueron diseñados mediante el programa Primerquest Tool. Se buscaron y corroboraron las secuencias de los primers en el GenBank y BLAST. Se utilizó el gen 16S rRNA para identificar secuencias altamente conservadas entre las distintas especies de Lactobacilos. Se eligieron los primers con una temperatura de hibridación igual o que no difiriera entre más de 2°C y con un contenido de G-C del 50%. Finalmente, se llevó a cabo la técnica de PCR para verificar que los primers amplifiquen la zona de interés de acuerdo con su temperatura de hibridación.

Se inició con una desnaturalización de las muestras de ADN de las cepas de estudio a 95°C durante 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización por 30 seg a 95°C; el ciclo de alineación, se llevó a cabo por 30 s Posteriormente, se llevó a cabo el ciclo de elongación a 72°C por 30 s para llevar a cabo el ciclo de extensión final a 72°C por 5 min. Estas condiciones de tiempo y temperatura, se lograron determinar mediante diversos ensayos en los que el tiempo varió de 5-7 minutos y el número de ciclos oscilaba de 30 a 40 ciclos. Finalmente, se determinaron estas condiciones en las cuales mediante la PCR se llevó a cabo correctamente, logrando obtener los productos en su total integridad.

Se visualizaron los productos de la PCR, mediante la técnica de electroforesis. Se preparó el gel de agarosa al 2%, pesando 0.6 g de agarosa en la balanza digital y se colocó en un matraz bola y posteriormente se vertieron 30 mL de TBE.

Se colocó el matraz dentro del microondas y cada 10 s se checó si la agarosa ya se había disuelto.

Se tomaron 4 µL de Bromuro de Etidio con una micropipeta y se vertieron en el matraz bola y se agitó.

Se armó la celda de electroforesis colocando masking tape en sus bordes para evitar la salida del gel.

Una vez que se armó la celda, se vertió la solución del matraz bola y se colocó el “peine”. Posteriormente, se dejó reposar la solución durante 10 minutos hasta que gelificó.

Con una micropipeta se tomaron 5 μL de buffer de carga y se colocaron sobre un trozo de papel Parafilm. Se tomaron con la micropipeta 7 μL de la muestra de DNA y se agregaron a la cantidad previamente colocada de buffer de carga.

Dentro del gel se colocaron en el primer pozo 5 μL de marcador de 100 bp PLUS™ DNA Ladder. En los pozos subsecuentes, se tomaron 8 μL de cada una de las muestras colocadas en el Papel Parafilm y se cargaron en el pozo respectivo según las cepas y los microorganismos de control empleados en cada unidad experimental.

La electroforesis se desarrolló en dos ciclos, el primero a 70 V por 15 min y, después, 90 V por 20 minutos. El gel se visualizó y se fotografió bajo luz UV en el transiluminador.

Los resultados se obtuvieron con el análisis de la secuencia obtenida de los productos de la PCR y mediante el uso de programas de Bioinformática.

Para el establecimiento del género y especie de las bacterias de estudio, se evaluó la especificidad de hibridación de los primers en la zona de interés utilizando las diversas herramientas de la Bioinformática. Así para el análisis de similitud, se consideraron las condiciones de pureza y concentración de los productos de la PCR para así finalmente obtener una secuencia que lograra ser homóloga a alguna secuencia bibliográfica para verificar si el diseño de primers fue el adecuado así como las condiciones de la reacción fueron las idóneas.

De esta manera poder establecer género y especie de las cepas empleadas en este estudio.

2.2.1 Material biológico Microorganismos

Para la realización de este proyecto fueron requeridas diversas muestras biológicas, así como distintos microorganismos:

- *Bacterias ácido lácticas*: Para el desarrollo del proyecto se utilizaron las cepas aisladas del tracto gastro-intestinal obtenidas del ratón lactante (4 semanas de edad).
- *Microorganismos de referencia (control)*: Se utilizaron las cepas liofilizadas de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus plantarum*, de la colección ATCC con números de catálogo 53103, 11454 y 22586 respectivamente (Figuras 11 y 12).



Figura 11. Cepa liofilizada de *L. rhamnosus*



Figura 12. Cepa liofilizada de *L. lactis*

Todas las cepas fueron proporcionadas por la Dra. Adriana Llorente Bousquets del Laboratorio de Bioconservación de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC), las cuales fueron obtenidas del ATCC.

2.2.1.2 Reactivación de las cepas de referencia liofilizadas

Se reactivaron las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactococcus lactis*, para conservar su viabilidad durante el periodo de almacenamiento de la siguiente manera:

Se tomó con pinzas estériles un pellet y se depositó en un tubo cónico con caldo de cultivo MRS líquido (5 mL) y se incubó a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 h. Para su crecimiento, se tomó una asada del tubo cónico que contenía *Lactobacillus rhamnosus* y se sembró en caja (Agar) y se incubó a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 h (Figura 13).



Figura 13. Reactivación de las cepas liofilizadas

Para verificar la pureza de la cepa se realizó la tinción de Gram (Gram Stain Kit B-D™) para observar las características microscópicas de las cepas.

2.2.2 Medios de cultivo

2.2.2.1 Medio MRS para el cultivo de Bacterias Ácido Lácticas

Se utilizaron caldo MRS y agar nutritivo y se prepararon según las instrucciones de los proveedores. Se prepararon 500 mL de caldo MRS líquido, se tomaron alícuotas de 10 mL y se colocaron en tubos cónicos de plástico.

Para los medios sólidos, se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos en autoclave marca Hirayama HV-50 (California, USA) y se dejaron enfriar hasta aproximadamente 45°C y se vertieron en cajas Petri estériles agregando aproximadamente 20 mL a cada caja. Se verificó la esterilidad de los medios tras incubar las cajas invertidas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 h (Figura 14).



Figura 14. Procedimiento para la preparación de medios de cultivo

2.2.3. Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas

El animal de laboratorio utilizado fue un ratón lactante de la cepa CD-1 de 4 semanas de nacido (Figura 15) del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.



Figura 15. Ratón lactante de 4 semanas de edad

Se procedió a practicar eutanasia, en la que se eligió un método que no causara sufrimiento al ratón. Se eligió un método químico con un agente inhalatorio por medio de CO₂. Se trasladó al ratón a la campana de extracción en donde se distribuyó el agente, asegurando la distribución uniforme del gas y la rápida exposición del ratón a una concentración alta del agente. El manejo de los ratones lactantes se realizó con base a lo establecido a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, la cual indica especificaciones para el uso de animales de laboratorio.

Posteriormente, se limpió la zona abdominal del ratón con alcohol al 70% y se extrajo el intestino delgado y el colon con ayuda de pinzas y tijeras para disección.

Se identificaron las siguientes porciones intestinales: duodeno, yeyuno y colon (Cuadro 10). Se procedió a lavar cada porción con caldo de cultivo MRS líquido y se vertió el enjuague en tubos cónicos con MRS líquido. Se almacenaron cada uno de los tubos en la incubadora a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 h (Figura 16 y 17). La estandarización del procedimiento para la

obtención de microbiota de tracto intestinal de ratones lactantes se realizó con base a la metodología descrita por Sagrario, J., & Ríos, Y. (2019).

Cuadro 10. Identificación de cepas de Bacterias ácido lácticas en el tracto intestinal del ratón lactante

Nomenclatura	Porción intestinal de procedencia
A	Yeyuno
B	Yeyuno
C	Yeyuno
E	Colon
G	Duodeno
H	Duodeno

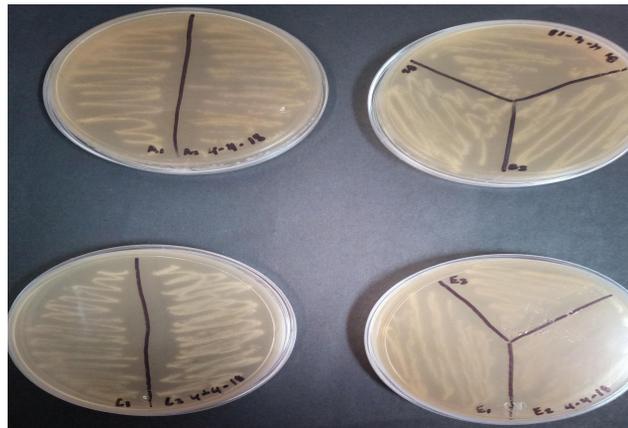


Figura 16. Identificar en la figura las placas A, B, C y E

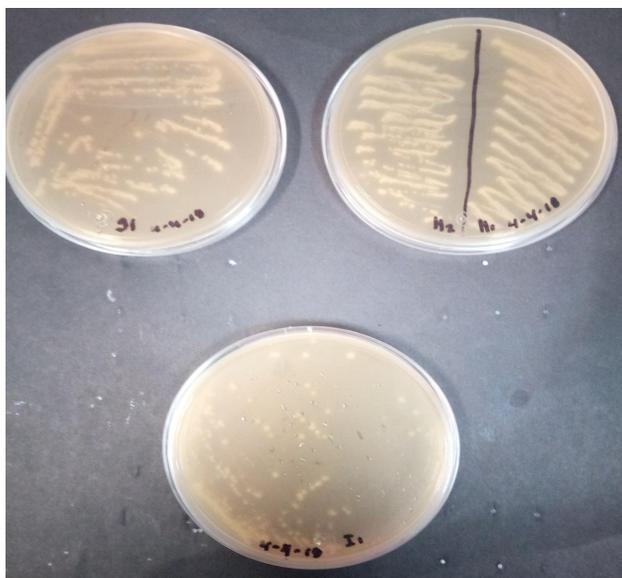


Figura 17. Identificar en la figura las placas G, H e I

2.2.4 Verificación de la pureza de las cepas por pruebas primarias

Para la verificación de la pureza de cada una de las cepas empleadas en este proyecto, se realizaron pruebas de catalasa y oxidasa; así como Tinción de Gram mediante la observación a microscopio del tamaño y morfología de las colonias.

2.2.4.1. Tinción de Gram

Para la tinción de Gram de cada una de las cepas, se utilizó el B-D™ Gram Stain Kit, se tomó una asada del cultivo de cada una de las cepas, se colocó en un portaobjetos y se fijó a la flama. Se procedió a teñir la muestra con cristal violeta durante 1 minuto, se lavó con agua destilada, se cubrió con lugol (solución yodo-yoduro al 4%) durante 1 minuto, posteriormente se decoloró con una solución de alcohol-acetona y se lavó con agua destilada. Finalmente se tiñó con safranina durante 1 minuto y se realizó un último lavado con agua destilada (Figura 18). Cada uno de los frotis, se dejó secar a temperatura ambiente y se observaron al microscopio Olympus CX31 (Tokyo, Japón) a 100x. Se observó de

acuerdo a la tinción a qué grupo pertenecía cada una de las cepas (bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas) de acuerdo a las características de la pared celular de las cepas, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo.

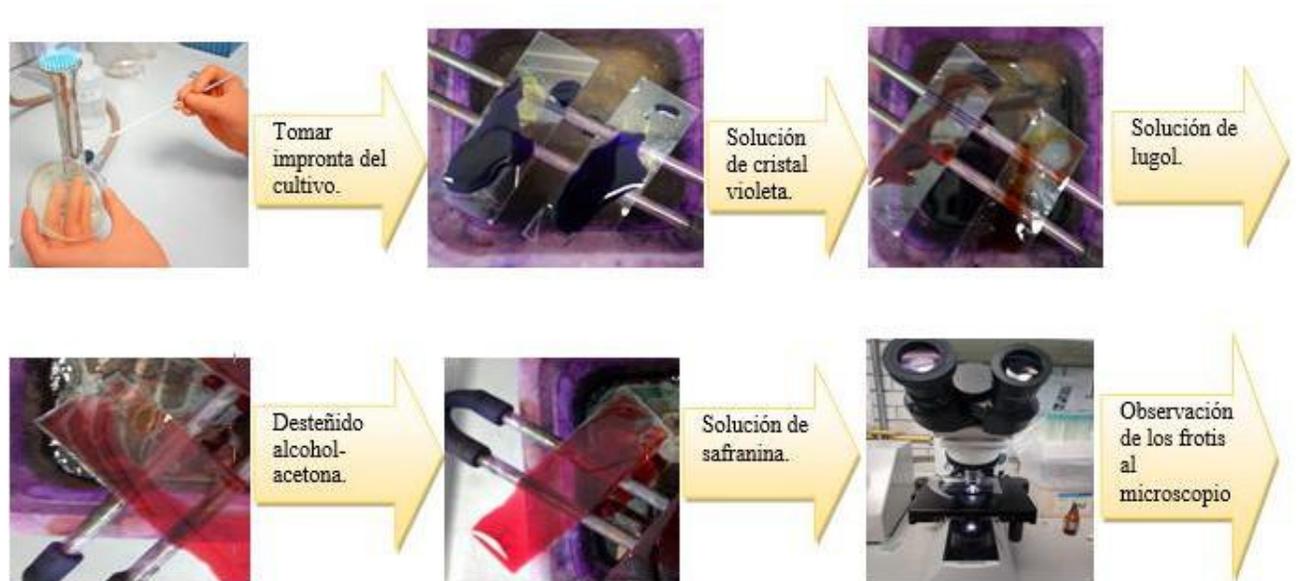


Figura 18. Procedimiento de la Tinción de Gram

2.2.5 Extracción de ADN cromosomal

La extracción de ADN de las muestras de Bacterias ácido lácticas se llevó a cabo basada en el protocolo de Scariot et al. (2018).

Se utilizaron los inóculos de Bacterias Ácido Lácticas aisladas del tracto intestinal (duodeno, yeyuno y colon) del ratón lactante conservadas a 4°C. Se resuspendieron las muestras en un volumen 1:10 en Tubos Eppendorf-1.5 mL. Posteriormente se centrifugaron en la centrífuga marca HERMLE Z 400 K (Baden-Württemberg, Alemania), se agregaron 400 µL de regulador de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 20 mM, EDTA 1Mm, SDS 0.0312%) y se marceraron con lanceta hasta que se logró la disgregación de la pared celular. Se agregó un volumen de fenol/cloroformo igual al volumen inicial de la solución, para

después mezclar las fases con movimientos repetidos de inversión durante 10 s. Posteriormente, se separaron las fases en la microcentrífuga a 12000 rpm por 2 min y se tomó con una micropipeta la fase acuosa. Después se colocó esta fase en un tubo Eppendorf nuevo.

Para la precipitación del ADN, se agregó 1/10 del volumen total recuperado de Acetato de Sodio 3 M, pH 5.2 y 375 μ L de etanol al 100%. Se mezcló utilizando el vortex por 30 seg y se incubaron en hielo por 10 min.

Se precipitó el ADN por centrifugación a 14000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el ADN se dejó a temperatura ambiente hasta la evaporación total del etanol. Finalmente, el ADN se resuspendió en 25 μ L de amortiguador TE y se almacenó a 4°C hasta su uso (Figura 19).



Figura 19. Extracción del ADN de muestra de Bacteria ácido láctica aislada del tracto intestinal de ratón lactante

2.2.6.1. Cuantificación de la concentración y pureza del ADN

Una vez obtenido el material genético, es importante determinar el rendimiento mediante espectrofotometría. Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta a 260 nm debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas de DNA.

Cuando la longitud de la celda en que se disuelve el ADN, es de 1 cm, la absorbancia es igual a la densidad óptica (DO).

En el caso de ADN genómico o de doble cadena una densidad óptica equivale a 50 ug/ml. Se debe considerar el factor de dilución para obtener la concentración en nanogramos/microlitro (ng/ul). Para una reacción de PCR se requieren de 10 a 200 ng se debe obtener al menos, 5 ng/ul de ADN en cada muestra.

Para el análisis de las cepas de estudio, se realizó una dilución 1:50 con el ADN previamente obtenido, se mezcló suavemente.

Se obtuvo la lectura de la solución blanco (100 µL de agua bidestilada), después se colocó la muestra en el espectrofotómetro y se leyó la densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm. Se consideró para los cálculos correspondientes que $1U_{A_{260}} = 50\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADN; considerando el número total de muestras por ensayo y el factor de dilución 1:50.

Para la evaluación de la muestra, se tomó una segunda lectura a 280 nm y se determinó la razón de las lecturas obtenidas a 260/280 nm. Si la proporción es mayor a 1.75, corresponderá a ácidos nucleicos; aunque si esta proporción es menor a 1.6 es posible que se encuentre proteína y otros contaminantes (Figura 20).



Figura 20. Cuantificación de la concentración del ADN en el espectrofotómetro

2.2.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la preparación de la reacción es fundamental la estandarización de las concentraciones de los componentes (primers y ADN).

2.2.7.1 Características de los primers

La determinación del diseño de los primers es la parte más importante de la etapa experimental para la realización de la técnica de la PCR. Cuando el objetivo a amplificar es un locus, la posición de los iniciadores debe ser relativa a los codones de inicio y terminación (Malvárez, 2001). A continuación se describen las propiedades de los primers (forward y reverse) utilizados para la identificación de género y especie de las cepas de bacterias ácido lácticas, se muestra la secuencia 5' → 3' para el género *Lactobacillus* que corresponde a la secuencia terminal del gen 16S ARNr en el caso de *L. plantarum*, su temperatura de fusión (TM) y su longitud. Cada uno de los primers se solubilizó a una concentración de 25 mM. Es importante que el fragmento a secuenciar no sea muy grande, debido a que los errores de lectura de secuencia aumentan. Los oligonucleótidos que se utilizaron fueron diseñados por el programa de Bioinformática Primer Blast (Cuadro 11).

Cuadro 11. Primers utilizados en la experimentación

Cepa	Primer		Longitud Amplificación (pb)	TM (°C)	Secuencia (5'-3')
L. plantarum ATCC 8014	LbLMA1 -rev	5'→3'	250	45.7°C	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC
	R16-1F	5'→3'		59.9 °C	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA
L. Rhamnosus	Lac-F	5'→3'	186	48°C	GAA TCG CTA GTA ATC G
	Lac-R	5→3'		68.2°C	GGG TTC CCC CAT TCG GA

Fuente: Dubernet, et al., 2002

Para este proyecto, se eligieron los primers de modo que tuvieran una secuencia única dentro del DNA que sería amplificado. Se utilizaron las cepas *L. plantarum* ATCC 8014 y *L. Rhamnosus* (Mora et al., 1997). Para su identificación se recurrió a la base de datos del GenBank.

Las condiciones empleadas en el proceso de amplificación para *L. plantarum* se establecieron después de diversas pruebas de laboratorio para tener la mejor relación de temperatura, tiempo y número de ciclos con respecto a los productos de la PCR.

Por tanto, comenzó con una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos consistentes en replicación a 94°C durante 45 s, alineación a 55°C por 30 s, extensión a 72°C por 30 s y una extensión final a 72°C por 10 min en termociclador (Axigen® MaxyGene™ II).

La preparación de la reacción de la PCR se realizó en un tubo Eppendorf y se agregaron los siguientes componentes: Kit Master Mix 12.5 µL, 0.5 µL para el primer reverse, 0.5 µL para el primer forward, ADN y 12 µL de agua libre de nucleasas (Dubernet et al., 2002). Posteriormente, se mezclaron los tubos en la centrífuga y se llevaron al Termociclador (Cuadro 12). Finalmente, tener los productos de la PCR y verificar si la concentración y las condiciones establecidas anteriormente para los primers fueron las idóneas para visualizar las muestras en el transiluminador de UV mediante la técnica de electroforesis.

Cuadro 12. Componentes para la preparación de la reacción de PCR

Componente	Proporción por muestra
Agua libre de nucleasas	9.5 µL
PCR Master Mix, 2x	12.5 µL
Primer forward, 10 µM	1 µL
Primer reverse, 10 µM	1 µL
Muestra de ADN	1 µL

La preparación de la reacción se realizó en un tubo Eppendorf esterilizado utilizando los componentes del cuadro 2 dentro de la campana de extracción. Se consideró que la proporción es por muestra, por lo que fue necesario multiplicar cada uno de los valores por el número de muestras a preparar (Figura 21).



Figura 21. Preparación de la reacción para la PCR

Al tener preparada la reacción se colocó en una microcentrífuga durante 30 s y se dividió el volumen final, tomando 24 μL de la preparación y se colocaron en cada uno de los tubos Eppendorf previamente seleccionados.

A cada tubo se le agregó 1 μL del ADN correspondiente a la cepa a trabajar. Finalmente se mezclaron cada uno de los tubos en la microcentrífuga para después colocarlos dentro del Termociclador (Figura 22).



Figura 22. Minicentrífuga con los tubos Eppendorf a 3000 RPM

2.2.7.2 Etapas y ciclos de la PCR (Su-Yeon et al., 2007)

Para la determinación de las condiciones de la PCR fue necesario una serie de ensayos previos, considerando diferentes pruebas de ADN provenientes de las cepas de estudio. Se varió la temperatura, el número de ciclos y el tiempo en cada etapa de la reacción.

Se inició con una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización por 30 seg a 95°C. Para el ciclo de alineación, se llevó a cabo a 63°C por 30 s Posteriormente, se llevó a cabo el ciclo de enlogación a 72°C por 30 seg para finalmente llevar a cabo el ciclo de extensión final a 72°C por 5 min en un Termociclador (Axigen® MaxyGene™ II) (Figura 23).



Figura 23. Termociclador en el que se realizó la PCR

2.2.7.3 Electroforesis de los productos amplificados (Fibi et al., 2016)

Una vez que se realizó la PCR, se preparó el gel de agarosa con 50 mL de TAE 1x, para su disolución se calentó en un horno de microondas durante 1 min por pequeños intervalos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 5 μ L de Bromuro de Etidio. Posteriormente, se vertió la mezcla en la cámara de electroforesis y se agregó buffer TAE 1x hasta que el gel quedó cubierto.

Para llevar a cabo la carga del gel, se colocaron en un trozo de Parafilm 3 μ L de Bromuro de Etidio, 3 μ L de colorante azul/naranja y 5 μ L de los productos resultantes de la PCR. Con una micropipeta, se mezclaron todos los elementos y se tomaron cada una de las muestras para colocarlas en los pocillos correspondientes. En el primer pocillo se colocaron 3 μ L de marcador de peso molecular (Figura 24). La electroforesis se desarrolló a 80 voltios durante 1 h (Figura 25). Finalmente, los geles se visualizaron y se fotografiaron bajo luz UV en transiluminador (Gel LLógica1500, Imaging System).

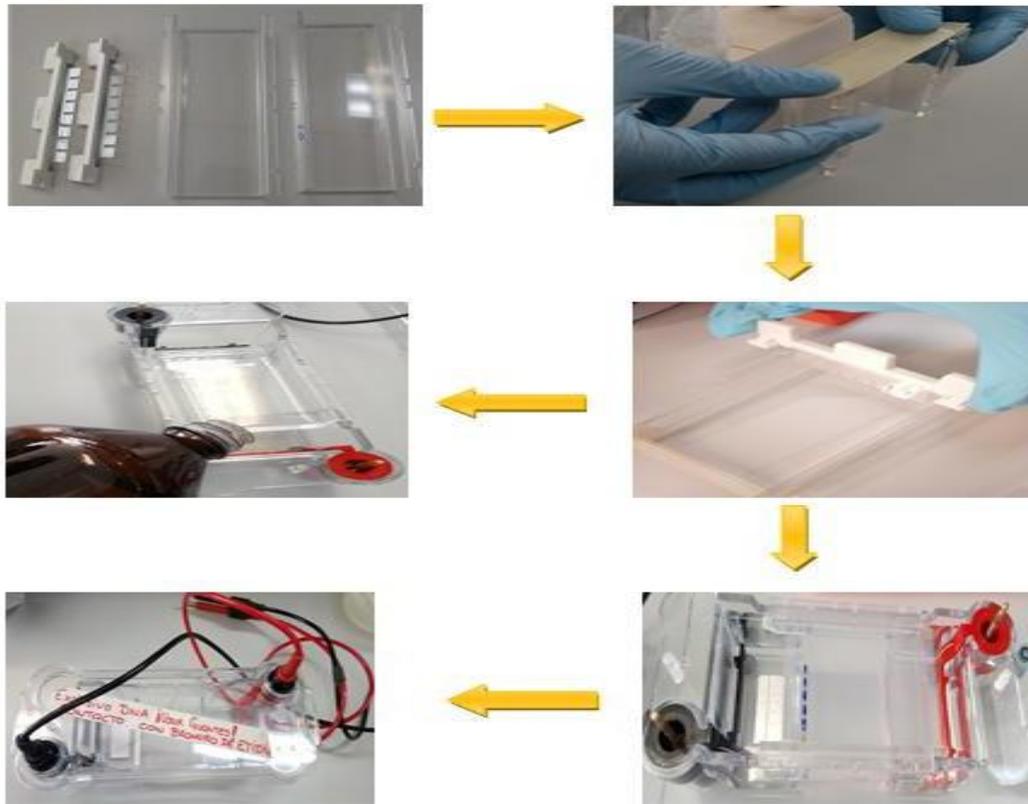


Figura 24. Procedimiento de armado de la celda de electroforesis horizontal



Figura 25. Corrida de dos geles de agarosa al 2%, a 90 v por 30 min

2.2.7.4 Secuenciación

Se amplificaron nuevamente los diferentes amplicones con el fin de obtener la concentración necesaria para realizar la secuenciación de los productos de la PCR, fueron purificados con el reactivo Exo SAP-IT PCR product cleanup (Thermo Fisher, cat. 78200) y enviados a secuenciar al Servicio de Secuenciación y Análisis de Fragmentos de ADN, Laboratorio de Bioquímica Molecular UBIPRO, FES Iztacala, UNAM. Las secuencias reportadas fueron utilizadas para realizar un alineamiento básico en el programa Blast del NCBI.

CAPÍTULO 3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Tinción de Gram

Una vez que se realizó la Tinción de Gram para cada una de las cepas de las bacterias ácido lácticas; se propuso para este proyecto una clasificación alfanumérica como se muestra a continuación.

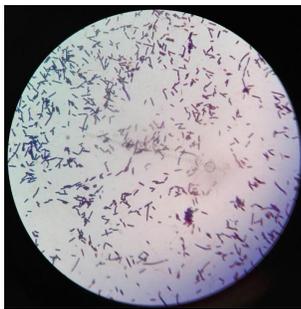


Figura 26. Cepa identificada como A2

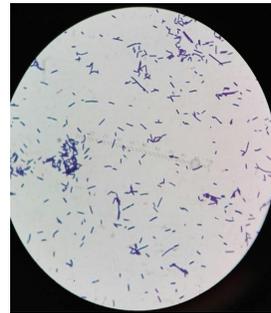


Figura 27. Cepa identificada como B1



Figura 28. Cepa identificada como C2

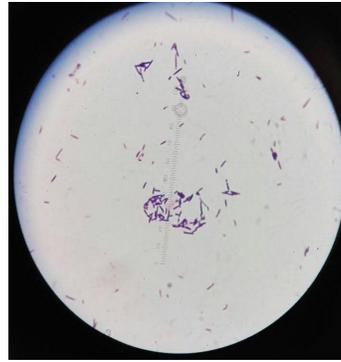


Figura 29. Cepa identificada como E3

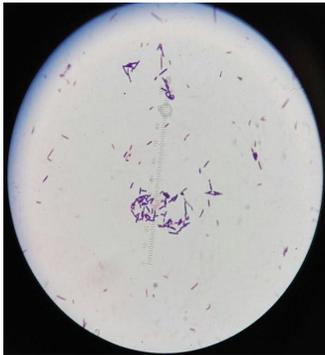


Figura 30. Cepa identificada como G1



Figura 31. Cepa identificada como H2



Figura 32. Cepa identificada como I₁

Cuadro 13. Clasificación de las cepas de acuerdo con la Tinción de Gram

Nomenclatura	Gram	Morfología	Porción intestinal de procedencia
A ₂	+	Bacilos	Yeyuno
B ₁	+	Bacilos	Yeyuno
C ₂	+	Bacilos	Yeyuno
E ₃	+	Bacilos	Colon
G ₁	+	Bacilos	Duodeno
H ₂	+	Bacilos	Duodeno
I ₁	+	Bacilos	Duodeno

La pureza de las cepas fue verificada mediante cultivo en agar MRS, en donde se observaron colonias redondas, lisas, de apariencia cremosa de color blanco y de diámetro aproximado de 1 a 2 mm. Las cepas resultaron ser de morfología Bacilos y Gram positivas (Cuadro 12). Este grupo de bacterias posee una gruesa capa de peptidoglicano y presentan ácidos teicoicos en su superficie, por lo cual tiñeron como Gram positivos.

3.2 Cuantificación de la concentración y pureza del ADN

Se extrajo el ADN de las 7 muestras de Bacterias ácido lácticas aisladas del tracto intestinal de ratón lactante, así como del control negativo (*Lactococcus lactis*) identificada como “M”. Se cuantificó el ADN mediante el espectrofotómetro marca Genova Bio (Cuadro 13) obteniendo concentraciones de ADN de 250 µg/mL a 5200 µg/mL, dado que dentro de estas muestras hubo concentraciones altas para la PCR se realizaron una serie de diluciones que permitieron tener la concentración adecuada. Los valores obtenidos en la relación 260/280 indican, a excepción de la muestra I₁, que es posible que exista una contaminación significativa y que se encuentren proteínas y otros contaminantes. Teniendo los datos de la cuantificación de las muestras concentradas y diluidas, se elaboró el gel de integridad por medio de electroforesis, obteniendo que en las muestras diluidas se presenta un poco de degradación en el ADN a comparación de las muestras más concentradas en las cuales el

ADN se presenta íntegro. Estableciendo así que el ADN es óptimo por medio del rango de valores de pureza y concentración para realizar la PCR.

Cuadro 14. Concentración y pureza de ADN de bacterias ácido lácticas aisladas del tracto intestinal de ratón lactante

Muestra	λ_{260}	λ_{280}	Relación 260/280	Concentración real ($\mu\text{g/mL}$)
G ₁	0.105	0.080	1.312	250
I ₁	0.655	0.353	1.855	1600
A ₂	0.305	0.224	1.361	650
B ₁	2.200	2.200	1	4050
E ₃	2.200	2.200	1	4050
M	2.200	2.200	1	4050
H	2.200	1.306	1.684	5200
C ₂	0.143	0.085	1.682	350

3.3 Visualización de los productos de la PCR

En la figura 33 se puede observar una banda correspondiente a la amplificación del control positivo identificado como *Lactobacillus rhamnosus*, mientras que el control negativo identificado como *Lactococcus lactis* no amplificó.

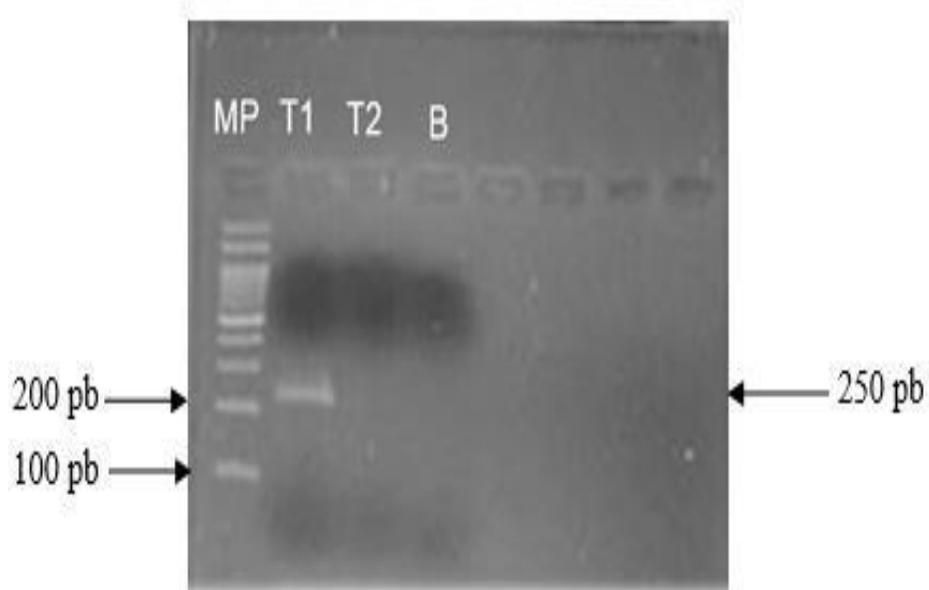


Figura 33. Gel de agarosa al 2%. Visualización de banda de *Lactobacillus rhamnosus*.

Carriles: 1) (MP) Marcador de pares de bases 100pb; 2) (T1) *Lactobacillus rhamnosus* como control positivo; 3) (T2) *Lactococcus lactis* como control negativo; 4) (B) Blanco

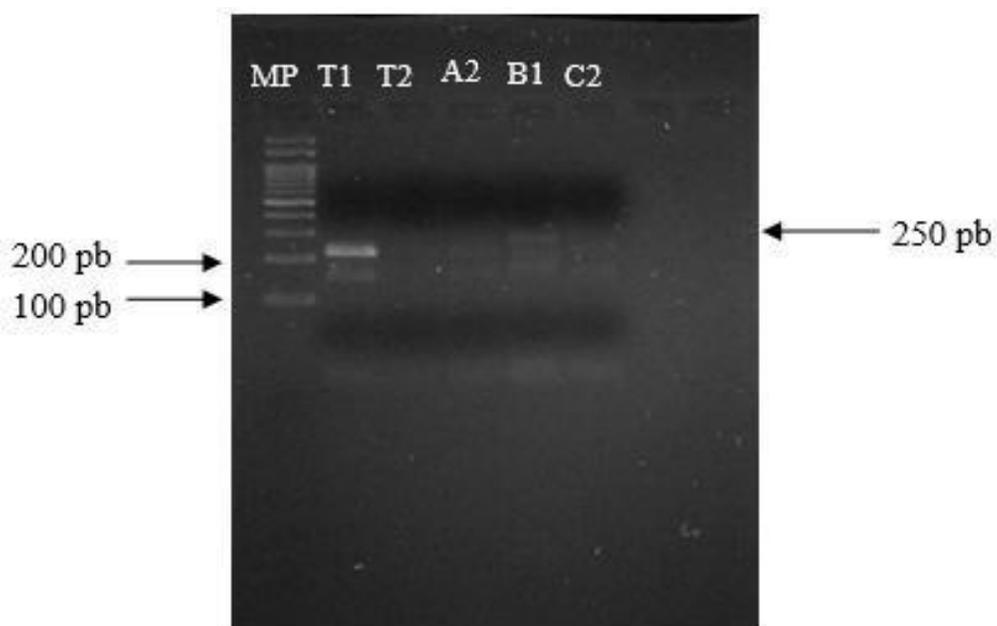


Figura 34. Gel de agarosa al 2%. Visualización de banda de *Lactobacillus rhamnosus*.

Carriles: 1) (MPB) Marcador de pares de bases 100pb; (T1) *Lactobacillus rhamnosus* como control positivo; (T2) *Lactococcus lactis* como control negativo; (A2); (B1) y (C2)

En la figura 34 se pueden observar 3 bandas de las muestras de las Bacterias ácido lácticas y una más para el control positivo. Se ven tenuemente cada una de las bandas, puede ser debido a la concentración de ADN de cada una de las muestras. Se amplificaron las muestras a un tamaño de 250 pb como se esperaba de acuerdo con lo propuesto por (Mora et al., 1997) y (Torriani et al., 2001).

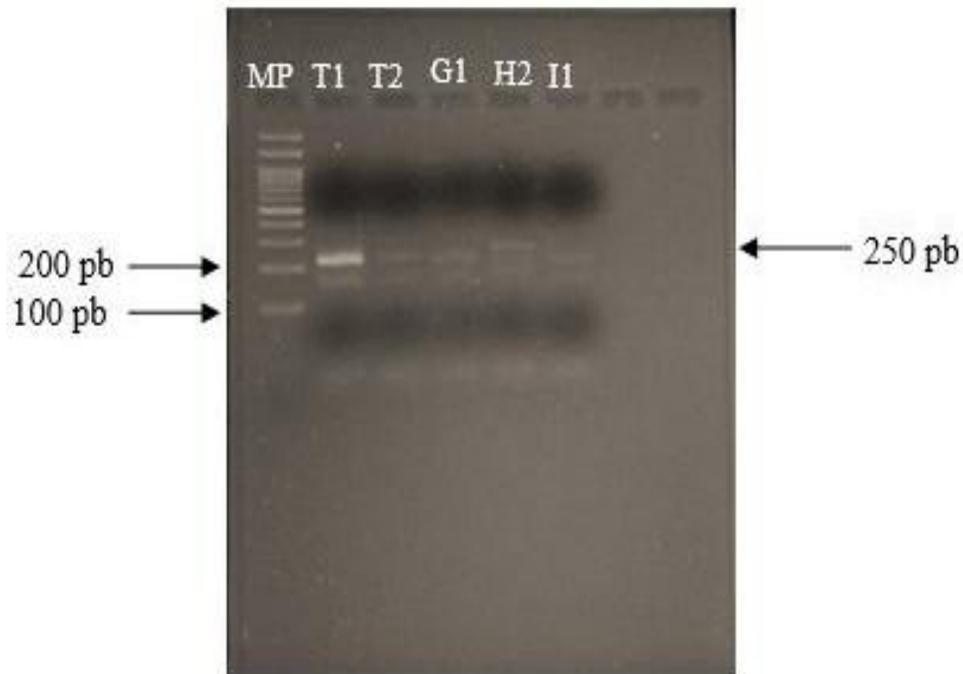


Figura 35. Gel de agarosa al 2%. Visualización de banda de *Lactobacillus rhamnosus*.

Carriles: 1) (MPB) Marcador de pares de bases 100pb; (T1) *Lactobacillus rhamnosus* como control positivo; (T2) *Lactococcus lactis* como control negativo; (G1); (H2) y (I1)

En la figura 35 se pueden observar 4 bandas de amplificación muy tenues que corresponden a las 3 muestras de las Bacterias ácido lácticas y también se ve ligeramente el control negativo (T2), lo que puede deberse a un mal manejo de la muestra. Las bandas de amplificación se encuentran en 250 pb como se esperaba. Ambos primers para estas cepas funcionaron correctamente como base para la visualización de las cepas. Sin embargo, es muy probable que la concentración del ADN de cada una de las cepas no haya sido suficiente como lo demuestra el gel de agarosa.

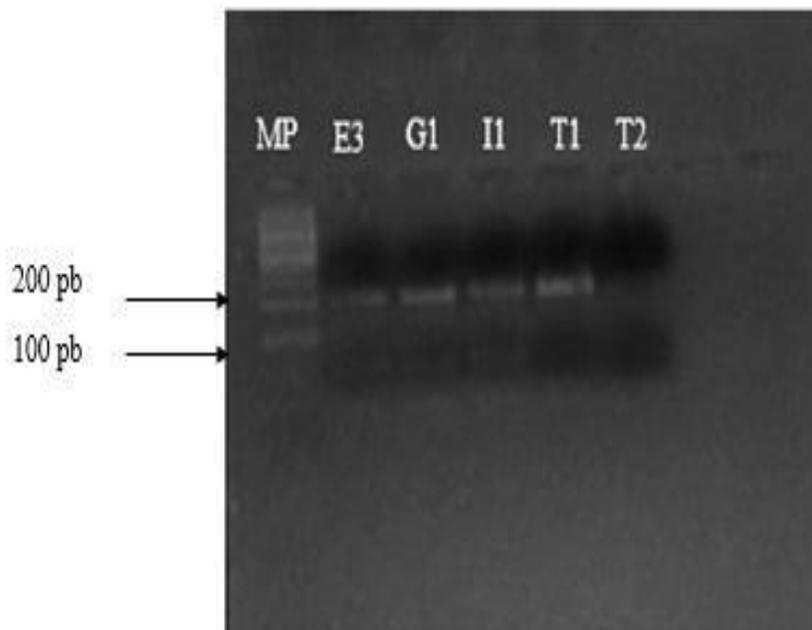


Figura 36. Gel de agarosa al 2%. Visualización de banda de *Lactobacillus plantarum*.

Carriles: 1) (MPB) Marcador de pares de bases 100pb; (E3), (G1), (I1), (T1) *Lactobacillus plantarum* como control positivo y (T2) *Lactococcus lactis* como control negativo

En la figura 36 se pueden observar 4 bandas de amplificación correspondientes a las 3 muestras de las cepas previamente seleccionadas, así como la banda del control positivo.

Estas bandas fueron mejor amplificadas en comparación de las anteriores, debido a la utilización de un nuevo PCR Master Mix, 2x. De esta manera se aseguró que todos los componentes de la reacción no estuvieran contaminados, por lo que el control negativo no se vislumbró en el gel a diferencia de los geles anteriores. En este gel, se quedó 1 mayor concentración de las cepas en la parte superior del gel por lo que es probable que haya sido necesario incrementar el número de ciclos y voltios al inicio de la electroforesis y así lograr que cada muestra se vislumbrara adecuadamente.

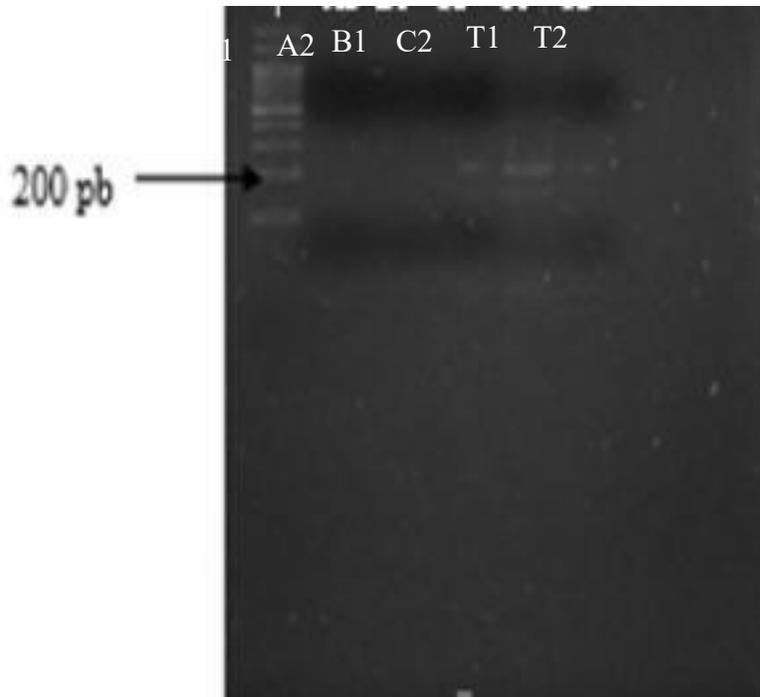


Figura 37. Gel de agarosa al 2%. Visualización de banda de *Lactobacillus plantarum*.

Carriles: 1) STD de número de bases. 1 DNA Ladder™.; 2) (A2), 3) (B1), 4) (C2), 5) (T1) *Lactobacillus plantarum* como control positivo y 6) (T2) *Lactococcus lactis* como control negativo

En la figura 37 se pueden observar 3 bandas de amplificación correspondientes a las muestras de las cepas: B1, C2 y el control positivo.

En el carril número uno, se intentó visualizar los productos sólo con STD de número de bases. 1 DNA Ladder™ para visualizar si existía alguna contaminación y debido a que el carril uno parece tener una banda es posible que hayan quedado restos de marcador en el manejo de los materiales y por este motivo se pueda observar una franja.

Los primers se vislumbraron correctamente, por lo que su concentración dentro de esta PCR fue la adecuada. Caso contrario a las cepas de estudio en este gel, es posible que la concentración de cada una no haya sido la suficiente, ya que en el gel correspondiente a la figura 34 se lograron visualizar.

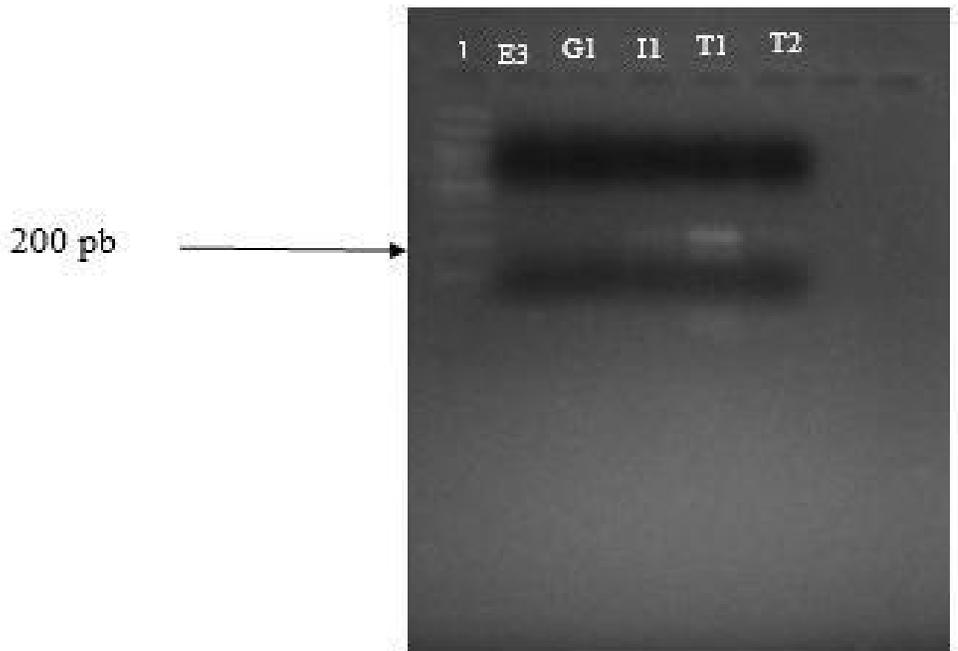


Figura 38. Gel de agarosa al 2%. Visualización de banda de *Lactobacillus plantarum*.

Carril: 1) STD de número de bases. 1 DNA Ladder™; 2) (E3), 3) (G1), 4) (I1), 5) (T1) *Lactobacillus plantarum* como control positivo y 6) (T2) *Lactococcus lactis* como control negativo

En la figura 38 se pueden observar 3 bandas de amplificación correspondientes a las muestras de las cepas: I1, control positivo y control negativo.

Se realizó el mismo procedimiento que en la figura 37 con el objetivo de ver si había contaminación y al ver el carril número 1 se comprobó que efectivamente había un mal manejo de los materiales. A pesar de que el control positivo si se logró visualizar en el gel, sólo la muestra de la cepa identificada como I1 mostró una franja muy tenue. Ninguna de las otras dos cepas se vieron; por lo que se pudo deber a una baja concentración de cada una de las muestras al llevar a cabo la reacción de PCR.

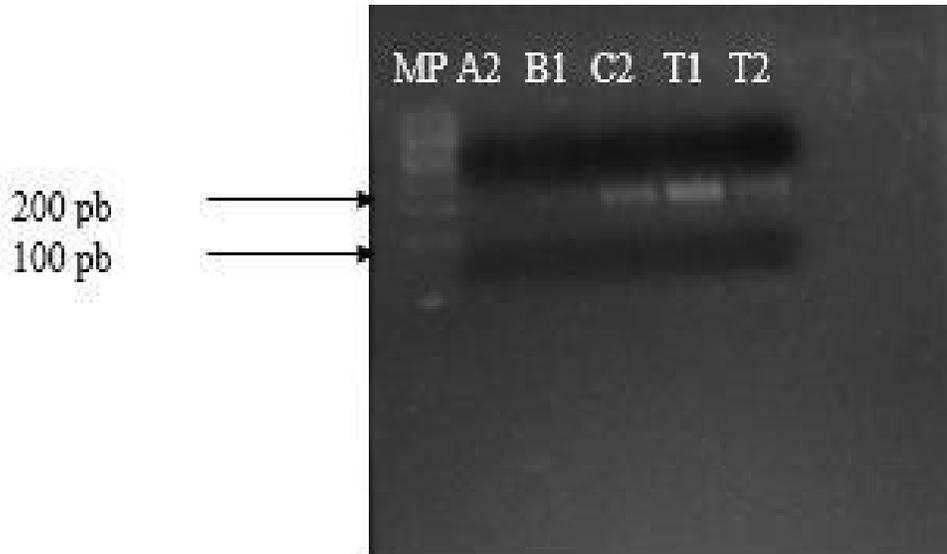


Figura 39. Gel de agarosa al 2%. Visualización de banda *Lactobacillus plantarum*.

Carriles: 1) (MP) Marcador de pares de bases 100pb; 2) (A2), 3) (B1), 4) (C2), 5) (T1) *Lactobacillus plantarum* como control positivo y 6) (T2) *Lactococcus lactis* como control negativo

En la figura 39 se pueden observar 3 bandas de amplificación correspondientes a las muestras de las cepas: B1 y C2, además la banda del control positivo.

Estas bandas fueron mejor amplificadas en comparación de las anteriores, debido a la utilización de un nuevo PCR Master Mix, 2x. Aunque posiblemente la concentración de la dilución de la cepa A2 no fue suficiente y por tanto no se logró visualizar en el gel. Sin embargo, la mayor concentración de estas muestras se localiza en el lado superior del gel, por lo que un tiempo mayor durante la electroforesis pudo haber favorecido a que cada una de las bandas del gel fuera más uniforme.

CONCLUSIONES

-El uso de la técnica de PCR para la identificación de género y especie de bacterias ácido lácticas, es altamente confiable y específica ya que se requiere del uso del material genético del género y del uso de primers especie-específicos.

-Se logró el aislamiento del nicho apropiado (Tracto intestinal de ratón) de cepas de BAL y se caracterizaron microbiológicamente resultando con una morfología de bacilos Gram positivas.

-Se logró extraer el ADN de las 7 muestras de cepas aisladas del tracto intestinal del ratón lactante por el método de Sambrook, obteniendo así el ADN íntegro y en cantidad apropiada para la ejecución del análisis con la PCR y de este modo se aseguró su pureza.

-La relación 260/280 de cada una de las muestras, no resultó idónea, sin embargo, no perjudicó el desarrollo de la PCR ya que se logró obtener el amplificado buscado en las muestras.

-El diseño de primers para la detección del género *Lactobacillus* del modelo murino mediante programas bioinformáticos, según Dubernet et al., 20002 y Torriani et al., 2001 se realizó de manera apropiada al obtener los amplificados de 250 pb aproximadamente y podrán utilizarse en trabajos posteriores con las condiciones de PCR establecidas.

-Se lograron establecer las condiciones específicas para el desarrollo de la PCR: concentración de ADN y primers, temperatura de alineación y número de ciclos.

-Se logró establecer la metodología para la visualización de los productos de la PCR, se debe cuidar el manejo de las muestras para evitar contaminación.

-El presente proyecto se desarrolló como una herramienta para la caracterización de especies de Bacterias ácido lácticas, del género *Lactobacillus*, adicionando parámetros más

estrictos a los estipulados en la bibliografía con el fin de obtener resultados más exactos y de mayor especificidad.

-El establecimiento de esta metodología permitirá una herramienta sólida para la selección, caracterización e identificación de cepas de bacterias ácido lácticas específicas, con objeto de contar con cepas propias para ser utilizadas como probióticos y que puedan ser una alternativa viable al uso de cepas de colección.

RECOMENDACIONES

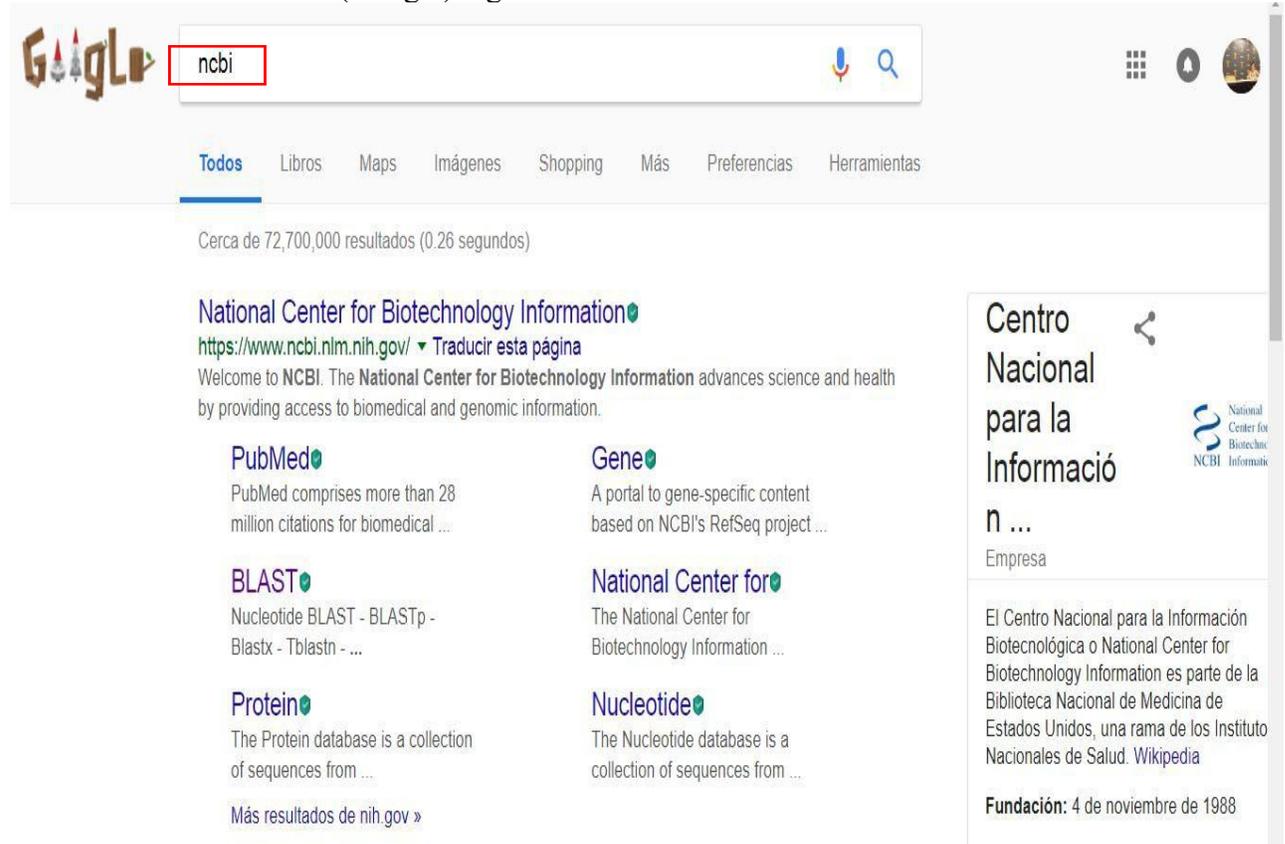
- Se recomienda aumentar el número de muestras biológicas a analizar, esto con la finalidad de proporcionar una respuesta más amplia y concreta respecto a la especificidad de los primers ya que en algunos geles faltó una concentración mayor de muestra para poder ver los amplificadores de la PCR con mayor facilidad.

ANEXOS

Anexo 1. Diseño de Primers de Lactobacillus del modelo murino

EJEMPLO:

1. Utilizando el buscador (Google) ingresar a NCBI



The screenshot shows a Google search interface with the search term "ncbi" entered in the search bar. The search results page displays the following information:

- Search results: Cerca de 72,700,000 resultados (0.26 segundos)
- Result 1: **National Center for Biotechnology Information**
 - URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Traducir esta página
 - Description: Welcome to NCBI. The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information.
 - Sub-results:
 - PubMed**: PubMed comprises more than 28 million citations for biomedical ...
 - Gene**: A portal to gene-specific content based on NCBI's RefSeq project ...
 - BLAST**: Nucleotide BLAST - BLASTp - Blastx - Tblastn - ...
 - National Center for**: The National Center for Biotechnology Information ...
 - Protein**: The Protein database is a collection of sequences from ...
 - Nucleotide**: The Nucleotide database is a collection of sequences from ...
 - Link: Más resultados de nih.gov »
- Result 2: **Centro Nacional para la Información**
 - Logo: National Center for Biotechnology Information (NCBI)
 - Text: El Centro Nacional para la Información Biotecnológica o National Center for Biotechnology Information es parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos, una rama de los Instituto Nacionales de Salud. Wikipedia
 - Fundación: 4 de noviembre de 1988

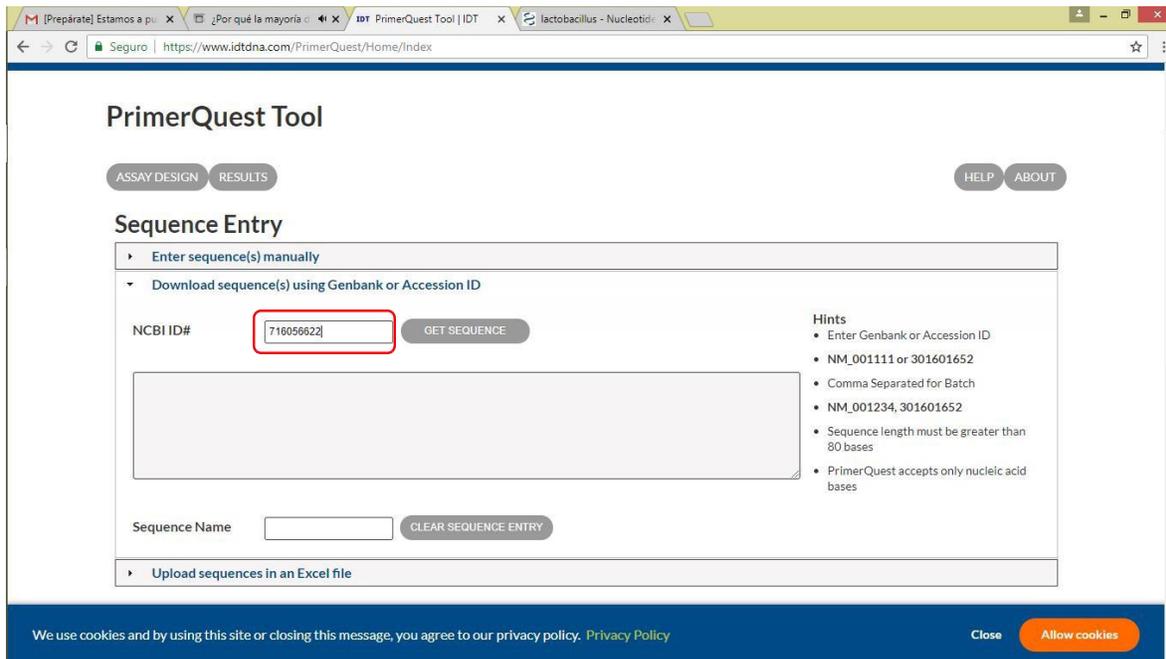
2. Colocar en la página el nombre científico de la especie de interés, para buscar una secuencia de ADN indicar la opción de “Nucleotide”. Se arrojarán distintos resultados, elegir el que corresponda al gen 16 rRNA, e identificar el GI.

NCBI Nucleotide search results for 'lactobacillus'. The search bar shows 'Nucleotide' selected and 'lactobacillus' entered. The results list four items, with the first item's GI number '716056622' highlighted in a red box. The interface includes filters for species, molecule types, and source databases, as well as a 'Results by taxon' section.

3. Se ingresa el número del GI al programa Primerquest Tool.

Google search for 'primer quest tool'. The search results show 'PrimerQuest Tool | IDT - Integrated DNA Technologies' as the top result, with the title and URL highlighted in a red box. Below the main result are several related links and articles.

4. Se ingresa el GI en la página de Primer Quest Tool.



5. Dar click en “PCR 2 primers”



6. Seleccionar el primer que cuenta con las propiedades adecuadas de Tm y del %de GC.

Set 3 GI# 27362948

Amplicon Length: 424
[View Assay Details](#)

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	58	81	23	63	47.8
Reverse	460	482	22	62	45.5

7. Comprobar las temperaturas, el % de GC y que efectivamente amplifique para la especie de interés.

Assay Design / Results / Help / About

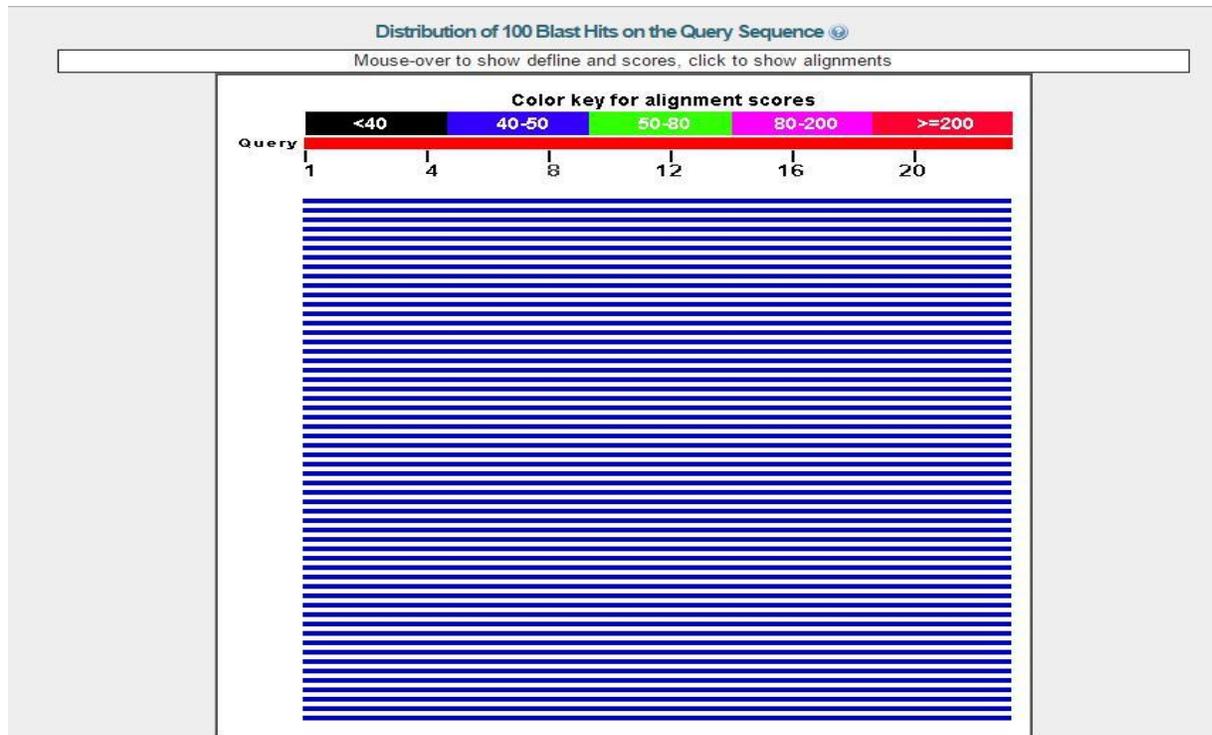
GI# 27362948 Assay Set 3 Details

[Back to Results](#)

Parameter Set: General PCR (Primers only)
Sequence Name: GI# 27362948
Amplicon Length: 424

		Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	CCACAACATCACAGTACTACGTC (Sense)	58	81	23	63	47.8
Reverse	GGGCCTGATTAAAGAACCAGAT (AntiSense)	460	482	22	62	45.5

Base	Sequence
1	TCACCCAAAGCTGAAGTCTACATAAAGCTATTCCCTTGAAAAAGCTTATTGTACAATTA CCACAACATCACAGTACTACGTC AGTATTAAAAAGTAATTTGTT
101	TTAAAAACATTTTACTGTACATATTACATACACATACACATGTACATGCTAATATTAGTCTCTCCTTGTAATATTCATATATTCATGCTATGTATTAT
201	TGTGCATTCATTTATTTCCATACGATAAGTTAAAGCTCGTATTAAATTTATTTAATTTTACATATTACATAAATATGCATCCTCTTACATATTATATATC
301	CCCTTCAATTTCAATCCCATTTATACCCATATGGTCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCGCGGTGAACCAAGCAACCCGCTTGGCAGGATC
401	CCTCTTCTCGCACCCGGGCCATATCTCGTAGGGGTAGCTAATAATGATCTTTATAAGT ATCTGGTTCTTAAATCAGGCC ATTTTAACTTAAAAATCGCC
501	CGGTCGAAATCTTAAATAGACATC



8. Verificar los primers con Mitomap.org para comprobar que realmente amplifiquen para la especie de interés.

REFERENCIAS

- AFRC, R. F. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of applied bacteriology* 66 (5): 365-378.
- Almeida, E., Serra, C., Albuquerque, P., Guerreiro, I., Teles, A., Enes, P., y Tavares, F. (2018). Multiplex PCR identification and culture-independent quantification of *Bacillus licheniformis* by qPCR using specific DNA markers. *Food Microbiology* 74: 1-10.
- Basu, C. (Ed.). (2015). PCR primer design. New York: Humana Press.
- Belkacem, B., Meriem, M., & Mebrouk, K. (2009). Probiotic potential of thermotolerant lactobacilli isolated from chicken gastrointestinal digestive and their use as poultry feed. *World Appl Sci J* 7: 951-957.
- Benavides, F., & Guenet, J. (2000). Modelos murinos de enfermedades humanas. *Medicina (Buenos Aires)* 61 (512): 215-231.
- Bessetti, J. (2007). An introduction to PCR inhibitors. *J Microbiol Methods*, 28, 159-67.
- Burbano, E., Sierra, S., Torres, K., Mercado, M., Carrascal, A., & Poutou, R. (2006). Rapid DNA extraction and PCR validation for direct detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk. *Revista MVZ Córdoba*, 11(1), 715-724.
- Bringel, F., Castioni, A., Olukoya, D. K., Felis, G. E., Torriani, S., & Dellaglio, F. (2005). *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(4), 1629-1634.
- Briz, R. C. (2006). Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la unión europea: causas y consecuencias. *Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza*.
- Carro, M. D., & Ranilla, M. J. (2002). Los antibióticos promotores del crecimiento como aditivos: efectos sobre la producción animal, situación legal y perspectivas de futuro. *Información Veterinaria*, (238), 35-45.
- Corsetti, A., Perpetuini, G., & Tofalo, R. (2015). Biopreservation effects in fermented foods. In *Advances in Fermented Foods and Beverages* (pp. 311-332).
- Claisse, O., y Lonvaud-Funel, A. (2001). Détection de bactéries lactiques produisant du 3-hydroxypropionaldéhyde (précurseur d'acroléine) à partir du glycérol par tests moléculaires. *Édition Diffusion Presse Sciences*, 81, 173-181.
- del Rosario Rodicio, M., & del Carmen Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(4), 238-245.
- Diplock, A. T., Charuleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M. & Vina-Ribes, J. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British journal of nutrition* 80 (S1), S77-S112.

- Doménech-Sánchez, A., & Vilab, J. (2004). Fundamento, tipos y aplicaciones de los arrays de ADN en la microbiología médica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(1), 46-54.
- Dubernet, S., Desmaures, N., & Guéguen, M. (2002). A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS microbiology letters* 214 (2), 271-275.
- Ennadir, J., Hassikou, R., Al Askari, G., Arahou, M., Bouazza, F., Amallah, L., Amine, S., y Khedid, K. (2014). Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées des farines de blé d'origine marocaine (Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat flour from Morocco). *Journal of Materials and Environmental Science* 4, 1125-1132.
- Escobar, C. A. M., Murillo, L. V. R., & Soto, J. F. (2011). Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. *Scientia et Technica* 3 (49), 116-121.
- Fibi, S., Klose, V., Mohnl, M., Weber, B., Haslberger, A., y Sattler, V. (2016). Suppression subtractive hybridisation and real-time PCR for strain-specific quantification of the probiotic *Bifidobacterium animalis* BAN in broiler feed. *Journal of Microbiological Methods*, 123, 94-100.
- García, A., Sáez, K., Delgado, C., & González, C. L. (2012). Low co-existence rates of *Lactobacillus* spp. and *Helicobacter pylori* detected in gastric biopsies from patients with gastrointestinal symptoms. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 104(9), 473.
- Goberta, G., Cotillard, A., Fourmestraux, C., Pruvost, L., Miguette, J., y Boyera, M. (2018). Droplet digital PCR improves absolute quantification of viable lactic acid bacteria in faecal samples. *Journal of Microbiological Methods*, 148, 64-73.
- Gilliland, S. E. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology reviews*, 7(1-2), 175-188.
- Huertas, R.A.P. (2010) Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Bioteología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 8(1), 93-105.
- Hinrichsen, L. I., & Di Masso, R. J. (2010). Empleo de un modelo murino original de Argentina en la caracterización de fenotipos complejos.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International journal of food microbiology*, 55(1-3), 181-186.
- Liu, Q., Ni, X., Wang, Q., Peng, Z., Niu, L., Xie, M., y Jing, B. (2018). Investigation of Lactic Acid Bacteria Isolated from Giant Panda Feces for Potential Probiotics *In Vitro*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8, 9381.
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 3(1), 10-18.
- Lorente, F. B., & Serra, D. J. (2001). Alimentos funcionales: probióticos. *Acta Pediatra España*, 59(3), 150-5.

- Luque Cabrera, J., & Herráez Sánchez, A. (2006). Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Elsevier.
- Luna, E., & Mishler, B. D. (2010). El concepto de homología filogenética y la selección de caracteres taxonómicos.
- Malvárez, G., Rodríguez, A., Aguilar, C., Silvera, E., & Mondino, P. (2001). Identificación de especies de *Monilinia* spp., en aislamientos obtenidos de *Prunus* spp. por PCR con primers específicos. *Agrociencia-Sitio en Reparación*, 5(1), 48-54.
- Majamaa, H., Isolauri, E., Saxelin, M., & Vesikari, T. (1995). Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 20(3), 333-338.
- Martí, M. A., & Turjanski, A. A. (2009). La bioinformática estructural o la realidad virtual de los medicamentos. *Química Viva*, 8(1).
- Mas, E., Poza, J., Ciriza, J., Zaragoza, P., Osta, R., & Rodellar, C. (2016). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Revista AquaTIC*, (15).
- Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A., y Maneerat, S. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 25, 1137-1345.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Olagnero, Gabriela, et al. Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*, 2007, vol. 25, no 121, p. 20-33.
- Olivera, J. (2011). Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácteas aisladas de la leche.
- Peña-Castro, J. M., Gregorio-Ramírez, O., & Barrera-Figueroa, B. E. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación química* 24 (2), 237-246.
- Pedrosa Amado, A. (1999). Reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Archivo Médico de Camagüey* 3 (2), 0-0.
- Pinto, M. G. V., Gómez, M. R., Seifert, S., Watzl, B., Holzappel, W. H., & Franz, C. M. (2009). Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro. *International journal of food microbiology*, 133 (1-2), 86-93.
- Querts Méndez, O. (2013). Dinámica de la formación profesional bio-antropo-social en las ciencias biomédicas. Santiago de Cuba: Universidad de Ciencias Pedagógicas Frank País García.
- Rajoka, M. S. R., Hayat, H. F., Sarwar, S., Mehwish, H. M., Ahmad, F., Hussain, N., & Shi, J. (2018). Isolation and evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from poultry intestine. *Microbiology* 87 (1), 116-126.

- Ramírez-Ramírez, J. C., Rosas Ulloa, P., Velázquez, González, M. Y., Ulloa, J. A. & Arce Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Aramara, UAN México* 2 (7).
- Rocha, P. J. (2003). Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite. *Revista Palmas*, 24 (2), 11-25.
- Rodríguez Yunta, E. (2007). Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta bioethica* 13 (1), 25-40.
- Rondón, A. J., Samaniego, L. M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ranilla, M. J. & Pérez, M. (2008). AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LAS PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE CEPAS DE *Lactobacillus* sp. PROCEDENTES DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE POLLOS DE CEBA ISOLATION, IDENTIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE PROBIOTIC PROPERTIES OF *Lactobacillus* sp. STRAINS OBTAINED FROM THE GASTROINTESTINAL TRACT OF BROILERS. *CYTA-Journal of Food* 6 (1), 56-63.
- Sagrario, J., & Ríos, Y. (2019). Aislamiento de bacterias ácido lácticas de tracto intestinal de ratón infante y caracterización bioquímica primaria y de perfil de carbohidratos. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Edo. de México.
- Sambrook, J., Russell, D. W., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3-volume set) (Vol. 999). New York: Cold spring harbor laboratory press.
- Sanz, Y., Collado, M. C., & Dalmau, J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta pediátrica española*, 61(9), 476-482.
- Scariot, M., Venturelli, G., Prudêncio, E., y Arisi, A. (2018). Quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt by propidium monoazide combined with quantitative PCR, *International Journal of Food Microbiology*, 264, 1-7.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (1999). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Torres, C; Zaragaza, M. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales: ¿Vamos por el buen camino? *Gaceta Sanitaria*, 2002, vol. 16, no 2, p. 109-112.
- Torriani, S., Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(8), 3450-3454.