

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TIPO BACTERIOCINAS PROVENIENTES DE  
BACTERIAS LÁCTICAS QUE PUEDAN EJERCER UNA ACTIVIDAD  
ANTAGÓNICA CONTRA *Helicobacter pylori*

MELISSA PORTILLA CHAVES

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
PROGRAMA DE BIOLOGIA  
SAN JUAN DE PASTO  
2007

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TIPO BACTERIOCINAS PROVENIENTES DE  
BACTERIAS LÁCTICAS QUE PUEDAN EJERCER UNA ACTIVIDAD  
ANTAGÓNICA CONTRA *Helicobacter pylori*

MELISSA PORTILLA CHAVES

Trabajo de Grado como requisito parcial para optar el título de Bióloga

Directores

PhD. MAURICIO CORREDOR RODRIGUEZ

cPhD. ALVARO PAZOS MONCAYO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
PROGRAMA DE BIOLOGIA  
SAN JUAN DE PASTO  
2007

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado, son responsabilidades exclusivas de su autor”.

Artículo 1° del Acuerdo No. 32 de Octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

---

Director

---

Director

---

Jurado

---

Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre 16 de 2007

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermano, por haber puesto toda su confianza en mí y haberme apoyado durante todo este tiempo para que mis sueños y deseos se cumplan.

A la Corporación para Investigaciones Biológicas, por haberme abierto sus puertas para compartir nuevas formas de investigar y por haber confiado en mí como investigadora.

Al Grupo de Genética y Bioquímica de Microorganismos, por su paciencia, su amistad, apoyo, y por haber compartido y hacer parte de esa creación de ciencia al servicio de los demás.

A mis directores Dr. Mauricio Corredor, por su inmensa confianza, apoyo y sugerencias a este trabajo; así mismo al cDr. Álvaro Pazos, por su colaboración en el desarrollo del trabajo.

A mis jurados, Dra. Maria Clara Yépez y el Dr. Jesús Cabrera, por su tiempo, paciencia y sugerencias realizadas para la culminación de la Investigación.

A mis amigos de la CIB, Julián, Gaby, Astrid, Yura, Paula, Alex, por ese apoyo, consejos, ánimos y amistad brindados durante mi tiempo en la Institución, en especial en los momentos más difíciles.

A Amalia, Elizabeth y Guido, por su amistad, apoyo, consejos y tiempo que me dedicaron y le dedicaron a la fase de laboratorio para que se puedan cumplir los objetivos que como grupo de investigación nos propusimos. Gracias de todo corazón.

A todos mis profesores que contribuyeron durante este tiempo a mi formación como una profesional integra; en especial a Jhon Jairo Calderón, por su gran colaboración, por sus consejos y sobre todo por esa gran amista que nos une y que ha crecido a través de los años.

A mis mejores cómplices Marian, Natha y Zayda, por haberme acompañado en los buenos y malos momentos, por ser mis mejores amigas y haber hecho parte de esto y mucho más. Así mismo a Iván, Juan Manuel, William, Galo, Caro, Ana lú, Dianita, Tere y Anita por haberme permitido compartir grandes momentos a través de estos años y hacer parte de mi vida y de mis mejores recuerdos.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1 INTRODUCCION	23
2 OBJETIVOS	26
3 ANTECEDENTES	27
4 MARCO TEORICO	30
4.1 BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS LABs	30
4.2 CARACTERISTICAS DE LOS MICROORGANISMOS PROBIOTICOS	30
4.3 MECANISMOS DE ACCION DE LABS PROBIOTICAS	31
4.3.1 Producción de sustancias inhibitorias	31
4.3.1.1 Ácidos orgánicos	31
4.3.1.2 Peroxido de hidrogeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	32
4.3.1.3 Dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> )	32
4.3.1.4 Diacetil	32
4.3.1.5 Reuterina	32
4.3.1.6 Acido 2-pirorolidona 5-carboxílico (PCA)	33
4.3.1.7 Bacteriocinas	33
4.3.2 Competencia por los sitios de adhesión	33
4.3.3 Estimulación de la inmunidad específica y no específica	33
4.4 USO DE LABs PROBIOTICAS	34

4.5 IMPORTANCIA DE LAS LABs PROBIOTICAS EN LA TERAPIA CONTRA PATÓGENOS	34
4.5.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	35
4.5.2 <i>Escherichia coli</i>	35
4.5.3 <i>Salmonella typhimurium</i>	36
4.5.4 <i>Campylobacter jejuni</i>	37
4.5.5 <i>Helicobacter pylori</i>	37
4.5.6 Otros beneficios	39
4.6 BACTERIOCINAS	39
4.6.1 Clasificación de bacteriocinas	39
4.6.1.1 Bacteriocinas Clase I	40
4.6.1.2 Bacteriocinas Clase II	40
4.6.1.3 Bacteriocinas Clase III	40
4.6.1.4 Bacteriocinas Clase IV	40
4.7 BACTERIOCINAS DE LABs PROBIOTICAS	41
4.8 ESPECTRO DE ACTIVIDAD O RANGO DE ACCION DE BACTERIOCINAS	42
4.9 GENETICA Y BIOSINTESIS DE BACTERIOCINAS	43
4.10 BIOSINTESIS DE BACTERIOCINAS	44
4.11 MECANISMOS DE RESISTENCIA E INMUNIDAD DE LAS BACTERIOCINAS	46
4.12 APLICACION DE BACTERIOCINAS	46
4.12.1 Aplicaciones industriales	46
4.12.2 Aplicaciones biomédicas	47

4.13 TECNICAS DE EXTRACCION DE BACTERIOCINAS	47
4.13.1 Precipitación con solventes	47
4.13.2 Cromatografía	47
4.13.2.1 Cromatografía de exclusión de tamaño	48
5. MATERIALES Y MÉTODOS	50
5.1 COLECCIÓN BACTERIANA	50
5.2 MEDIOS DE CULTIVO	51
5.3 ACTIVACIÓN, VERIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE BACTERIAS	52
5.3.1 Activación de LABs	52
5.3.1.2 Activación de la cepa industrial <i>L. casei</i> UN 014	52
5.3.2 Verificación de pureza de LABs	52
5.3.3 Conservación de LABs	53
5.3.3.1 Conservación en tubos Nunc	53
5.3.3.2 Conservación en tubos de agar MRS glucosa modificado	53
5.3.4 Activación de <i>H. pylori</i>	53
5.3.4.1 Verificación de pureza de <i>H. pylori</i>	53
5.4 COCULTIVOS DE LABs CON <i>H. pylori</i> <i>In vitro</i>	54
5.4.1 Preparación del medio	54
5.4.2 Preparación de las cepas	54
5.4.3 Siembra de <i>H. pylori</i> y preparación de las cajas de cocultivo	54
5.4.4 Siembra de LABs en los pozos	54
5.4.5 Medida de halos de inhibición	54
5.5 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE LAS LABs	54



5.5.1 Extracción de proteínas con fenol	54
5.5.2 Extracción de proteínas con ácido tricloroacético ( <i>Trichloroacetic acid, TCA</i> )	55
5.6 MONITOREO DE LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	55
5.6.1 Cuantificación por el método de Bradford	55
5.6.2 Electroforesis monodimensional de proteínas	56
5.6.2.1 Tinción con plata para proteínas	57
5.7 PRUEBAS DE ANTAGONISMO <i>In vitro</i> DE <i>H. pylori</i> CON EXTRACTOS PROTEICOS DE LAS LABs	58
5.8 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS	59
5.8.1 Liofilización	59
5.9 PREPARACIÓN DE LA RESINA Y MONTAJE DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA	59
5.9.1 Preparación y montaje de la resina	59
5.9.2 Preparación y montaje de la muestra	59
5.9.3 Detección y lectura de la muestra fraccionada	59
5.10 DIGESTIBILIDAD DE LOS EXTRACTOS	60
5.10.1 Proteínas totales vs. temperatura y pH	60
5.10.2 Proteínas totales vs. Enzimas proteolíticas	61
5.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	61
6 RESULTADOS	63
6.1 ACTIVACION Y VERIFICACION DE PUREZA DE LAS CEPAS	63
6.1.1 Activación y verificación de pureza de las LABs	63
6.1.2 Activación y verificación de pureza de la <i>H. pylori</i>	65

6.2 COCULTIVOS DE LABs CON <i>H. pylori</i> <i>In vitro</i>	66
6.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DEL SOBRENADANTE DE LABs	70
6.3.1 Extracción de proteínas	70
6.4 CUANTIFICACION DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD	73
6.4.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford para ensayos de cocultivos <i>In vitro</i>	73
6.4.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford para los ensayos de digestibilidad	74
6.5 PRUEBAS DE ANTAGONISMO <i>In vitro</i> CON PROTEÍNAS	74
6.6 Análisis estadístico de cocultivos de LABs vs. <i>H. pylori</i>	78
6.7 Análisis estadístico de antagonismos de extractos proteicos de LABs vs. <i>H. pylori</i>	81
6.8 FRACCIONAMIENTO DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR LABs	84
6.9 ESTABILIDAD Y DIGESTIBILIDAD DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS DE LABs	88
6.9.1 Estabilidad de los extractos proteicos a cambios de pH y temperatura	88
6.9.2 Digestibilidad de los extractos proteicos con proteasas	88
7 DISCUSIÓN	98
7.1 MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS	98
7.2 COCULTIVOS DE LABs vs <i>H. pylori</i>	99
7.3 EXTRACCION DE BACTERIOCINAS	101
7.4 ANTAGONISMO <i>In vitro</i> DE PROTEÍNAS DE LABs vs <i>H. pylori</i>	102
7.5 FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS BACTERIANOS	104

7.6 ESTABILIDAD DE LAS BACTERIOCINAS	105
8 CONCLUSIONES	107
9 PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES DE ESTUDIO	109
10 BIBLIOGRAFIA CITADA	110
11 ANEXOS	122



## LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Bacteriocinas producidas por LABs	42
Tabla 2. Lista de especies y cepas utilizadas en esta investigación	50
Tabla 3. Composición Caldo MRS (Diffco®)	51
Tabla 4. Composición agar base columbia	51
Tabla 4a. Composición caldo tioglicolato	52
Tabla 5. Diluciones proteína solubilizada	55
Tabla 6. Composición gel separador al 12% ( <i>running gel</i> )	56
Tabla 7. Composición gel concentrador al 4% ( <i>stacking gel</i> )	57
Tabla 8. Composición tampón de Corrida	57
Tabla 9. Composición tinción con plata rápida	58
Tabla 10. Temperatura, pH y tiempo en la reacción de proteínas	60
Tabla 11. Evaluación del cocultivo de LABs con <i>H. pylori</i> ATCC 51932	68
Tabla 12. LABs precipitadas con TCA	72
Tabla 13. Cuantificación de proteínas para ensayos de antagonismos <i>In vitro</i> y cromatografía	73
Tabla 14. Cuantificación de proteínas para ensayos de digestibilidad	74
Tabla 15. Concentraciones de proteínas producidas por las LABs	75
Tabla 16. Diámetros en milímetros de halos inhibición de cocultivos de LABs vs. <i>H. pylori</i> ATCC 51932	79
Tabla 17. Prueba Tukey para cocultivos de LABs vs. <i>H. pylori</i>	80
Tabla 18. Diámetros de inhibición de extractos de proteínas de LABs vs. <i>H. pylori</i> en milímetros	82
Tabla 19. Prueba de Tukey para antagonismos de extractos proteicos de LABs vs. <i>H. pylori</i> ATCC 51932	83
Tabla 20. Ensayo de temperatura y pH sobre UN 001	90
Tabla 21. Ensayo de temperatura y pH sobre UN 002	91
Tabla 22. Ensayo de temperatura y pH sobre UN 003	92
Tabla 23. Ensayo de temperatura y pH sobre UN 003	93
Tabla 24. Ensayo de Digestibilidad sobre UN 001–UN 002–UN 003	94
Tabla 25. Ensayo de Digestibilidad sobre UN 003–UN 004–UN 005	95
Tabla 26. Ensayo de Digestibilidad sobre UN 005–UN 006	96
Tabla 27. Ensayo de Digestibilidad sobre UN 007–UN 013	97

## LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Diagrama de la biosíntesis de Lantibióticos.	44
Figura 2. Diagrama de la biosíntesis de bacteriocinas Clase II	45
Figura 3. Observación macroscópica en medio MRS anilina cepa UN 003	63
Figura 4. Observación de características morfológicas de LABs vistas a 100X	64
Figura 5. Características típicas de <i>H. pylori</i>	65
Figura 6. Cocultivos entre LABs vs <i>H. pylori</i> con controles de medios y cepas	67
Figura 7. Halos formados de los cocultivos LABs vs. <i>H. pylori</i> ATCC 51932.	69
Figura 8. Proteínas de las LABs precipitadas con TCA (T) y fenol (F)	71
Figura 9. Precipitación con TCA de proteínas producidas por LABs	72
Figura 10. Controles de antagonismos positivos y negativos de extractos proteicos de LABs vs. <i>H. pylori</i>	76
Figura 11. Antagonismos de proteínas extraídas de LABs vs. <i>H. pylori</i>	77
Figura 12. Promedio y desviación estándar de diámetros de inhibición de LABs vs. <i>H. pylori</i> ATCC 51932	80
Figura 13. Promedio diámetros de inhibición de extractos proteicos de LABs vs. <i>H. pylori</i> ATCC 51932	83
Figura 14. Cromatograma <i>S. salivarius termophilus</i> UN 013	85
Figura 15. Gel fracciones Cromatograma <i>S. salivarius termophilus</i> UN 013	85
Figura 16. Cromatograma <i>L. paracasei paracasei</i> UNCIB 002	86
Figura 17. Gel fracciones <i>L. paracasei paracasei</i> UNCIB 002	87
Figura 18. Geles ensayo de temperatura y pH sobre UN 001	90
Figura 19. Geles ensayo de temperatura y pH sobre UN 002	91
Figura 20. Geles ensayo de temperatura y pH sobre UN 003	92
Figura 21. Geles ensayo de temperatura y pH sobre UN 004	93
Figura 22. Gel digestibilidad UN 001-UN 002-UN003	94
Figura 23. Gel digestibilidad UN 003-UN 004-UN005	95
Figura 24. Gel digestibilidad UN 005-UN 006	96
Figura 25. Gel digestibilidad UN 007-UN 013	97

## LISTA DE ANEXOS

	Pág
Anexo A. Cuantificación de proteínas por el Método de Bradford	122
Anexo B. Componentes Econo Pump	123

## GLOSARIO

**ACRILAMIDA:** molécula orgánica formada por un radical amino, un cetona y dos carbonos, que se emplea en la fabricación de plásticos. Se encuentra en los alimentos de alta fritura. Es neurotóxica. Se le sospecha una actividad cancerígena.

**ADENOCARCINOMA:** tumor que tiene su origen en glándulas de secreción externa.

**ANTAGONISMO:** acción inhibitoria del crecimiento microbiano mediante interacciones específicas con algunos de los componentes celulares.

**ANTIMICROBIANO:** perjudicial para los microorganismos, ya sea matándolos o inhibiendo su crecimiento.

**BACTERIOCINA:** proteína de bajo peso molecular, que presenta un espectro de inhibición de tipo bacteriostático o bactericida, secretados para defenderse de otros organismos en el mismo medio.

**BACTERIOCIENOGENICO:** organismo bacteriano que tiene la capacidad de producir proteínas con potencial bactericida.

**BIOTERAPEUTICO:** alimentos que contienen microorganismo benéficos para la salud humana.

**CANCER:** patología celular, donde una célula sufre cambios y adquiere capacidades diferentes de las células normales.

**CATALASA:** enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.

**CELULA BLANCO:** célula a la cual se va a atacar.

**CEPA:** población celular descendiente de una única célula.

**COCULTIVO:** mezcla de cepas de la misma o diferentes especies en un mismo soporte o cultivo para evaluar una característica fenotípica.

**COLONIA:** población de células que puede observarse macroscópicamente, y que crecen en un medio sólido.

**CROMATOGRAFIA:** técnica basada en la separación de los componentes de una mezcla.

**DIAMETRO:** máxima distancia entre dos puntos de una determinada forma geométrica.

**DINAMICA DE POBLACION:** cambios que sufren las poblaciones biológicas en cuanto a tamaño, dimensiones físicas de sus miembros, estructura de edad y sexo y otros parámetros que las definen, así como de los factores que causan esos cambios y los mecanismos por los que se producen.

**ELECTROFORESIS:** tecnología eléctrica que emplea un gel de transporte, el cual permite mover moléculas del polo negativo al positivo dependiendo de su carga y de la malla del gel.

**ESPECIES:** cepas estrechamente relacionadas con propiedades en común.

**ESPECTRO:** rango en el que se encuentran las medida.



**ESTIMULOS QUIMIOTACTICOS:** que influyen sobre una actividad o respuesta a través de sustancias químicas y el tacto.

**ENZIMAS:** catalizador compuesto de proteína, que induce reacciones o grupos de reacciones específicas.

**GASTRITIS:** inflamación de la mucosa gástrica.

**GLICOPROTEINAS:** moléculas compuestas por una [proteína](#) unida a uno o varios [hidratos de carbono](#). Se encargan del reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas plasmáticas.

**HALO:** círculo que determina el efecto antagónico.

**HUESPED:** organismo capaz de sustentar el crecimiento de otro organismo.

**INHIBICION:** disminución o eliminación completa de la actividad biológica por la acción de un agente de naturaleza variable conocido como inhibidor.

**INOCULAR:** introducción de un patógeno en una planta o en un animal. Pasar microorganismo a la superficie o en la masa de un medio de cultivo.

**IN VITRO:** en vidrio. Hace referencia a procesos biológicos que se hacen fuera del conjunto del organismo.

**LAB:** bacterias ácido lácticas, del inglés *Lactic Acid Bacteria*

**LISIS:** ruptura de de una célula que produce la pérdida del contenido celular.

**LIPOPOLISACARIDOS (LPS):** son polímeros complejos con restos de ácidos grasos y azúcares, que se encuentran en paredes de Gram negativas, constituyendo la estructura química de la membrana externa de la pared celular.

**METABOLITOS:** cualquier sustancia producida o utilizada durante el metabolismo celular.

**MICROAEROFILICO:** que necesita oxígeno pero en cantidad inferior a la atmosférica.

**MICROBIOTA INTESTINAL:** conjunto de microorganismos que se encuentran en el intestino.

**MORBIMORTALIDAD:** incidencia de una enfermedad en un población incluyendo casos mortales.

**MUCOSA GÁSTRICA:** recubrimiento de la pared del estomago. Esta formada por tres capas, el epitelio, corion y muscular.

**OXIDASA:** enzima que cataliza la oxidación de un sustrato por eliminación de hidrogeno que se combina con oxígeno molecular.

**PATÓGENO:** cualquier microorganismo capaz de producir una enfermedad infecciosa.

**POCILLO:** recipiente formado en un medio sólido con agar el cual sirve para depositar una muestra problema.

**PRECARCINOGENO:** enzimas capas de activar un agente que tiende a causar cáncer.

**POLIACRILAMIDA:** red o malla formada por acrilamida y bis-acrilamida la cual permite transportar moléculas en la electroforesis.

**PROBIOTICO:** microorganismo que habita el tracto digestivo de los mamíferos que tiene un efecto sobre la salud del huésped activando moléculas que permiten mantener un buen estado de salud.

**PROTEINASA:** proteína que tiene la capacidad de digerir otra proteína, generalmente se encuentra en el proteosoma y puede ser excretada al antro celular teniendo actividad en el aparato digestivo de mamíferos.

**REINFECCION:** infección nueva o secundaria que ya ha infectado a una persona. Ocurre constantemente aunque el organismo presente inmunidad, ya que depende de la virulencia de la cepa.

**RESISTENCIA:** capacidad adquirida por algunos microorganismos para crecer en presencia de un antibiótico o molécula que afecta su supervivencia.

**TOXINA:** sustancia de origen microbiano, orgánico o inorgánico capaz de perjudicar la salud del hospedero.

**UREASA:** enzimas con actividad catalítica sobre la urea.

**VIRULENCIA:** grado de patogenicidad.

## RESUMEN

En este estudio se evaluó la capacidad antagónica de diecisiete especies de bacterias lácticas LABs, sobre una cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 51932, de estas, ocho fueron antagonistas, evidenciando la presencia de halos de diferentes diámetros, donde *L. casei rhamnosus* y *L. paracasei paracasei* fueron las mejores. Teniendo en cuenta esto se precipitó las proteínas del sobrenadante del cultivo de LABs con TCA 5% con el fin de aislar proteínas para probar su actividad bacteriocinogénica. Se obtuvieron proteínas en un amplio rango de peso molecular, donde ocho extractos formaron halos de inhibición contra el patógeno. Entre los extractos que ejercieron mejor efecto antagónico encontramos a *Lactobacillus sp* y *S. salivarius thermophilus*. De acuerdo a lo anterior no podemos relacionar estadísticamente los ensayos con bacterias y extractos proteicos dado que no intervienen los mismos factores ni son las mismas condiciones. Sin embargo los resultados positivos de los extractos proteicos indican la presencia de bacteriocinas y su potencial con o sin la bacteria. Tratando de aislar de los extractos proteicos estas bacteriocinas utilizando columnas de Sephadex las fracciones no mostraron los resultados esperados con *H. pylori*, sin embargo en ensayos de estabilidad a factores fisicoquímicos de temperatura y pH los extractos se mostraron bastante estables. Es por eso que se requiere purificar en cantidades mayores en columnas cromatográficas con una fase estacionaria más larga. Finalmente en ensayos de digestibilidad de estos extractos proteicos se muestran susceptibles a proteasas de origen bovino y fúngico. Se considera necesario realizar ensayos con proteasas humanas. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos este proyecto pretende dar una contribución al mejoramiento de la terapia de *H. pylori* en la población nariñense con el uso de probióticos y así poder dar una alternativa para disminuir la incidencia de *H. pylori* en población, lo que a su vez llevará la reducción de las tasas de incidencia de cáncer gástrico asociado a esta bacteria en la región.

Palabras clave: bacterias lácticas, *Helicobacter pylori*, antagonismos, bacteriocinas, probiótico, bacteriocinogénico.

## ABSTRACT

In this work was evaluated antimicrobial antagonistic activity, of seventeen strains from lactic acid bacteria, LABs, against *Helicobacter pylori* ATCC 51932 strain. Between them, eight were the best antagonistic in coculture with the bacteria pathogen. Those strains displayed inhibitory halos with different diameters, of which, *L. casei rhamnosus* and *L. paracasei paracasei* were most antagonistic. According with the last question, the proteins from supernatant culture were extracted using 5% TCA, in order to isolate them and test their bacteriocinogenic activity. Proteins were isolated in a wide molecular weight arrange, between them, eight extracts draw inhibition halos. Comparing the protein extract, some ones as *Lactobacillus sp* and *S. salivarius thermophilus* were more antagonistic. According with the last matter, it cannot correlate statistically the bacteria coculture and protein extract assays, because do not take part the same factors and the same conditions. Although, the positive results point out the bacteriocin existence inside of protein extract. Also the results support their usefulness as therapeutic protein or probiotic bacteria. Trying to isolate the bacteriocins from protein extract, using Sephadex column the collected aliquots did not shown the waited result in antagonistic in vitro assessment with *H. pylori*. As advice, it will be important to purify the proteins from a large volume culture and enlarge the column length. In other hand, stability assays of the protein extract under physicochemical factor as temperature and pH exhibited low degradation. Finally, the digestibility assays of the protein extracts shown that highest susceptibility to bovine fungi proteinases. Taking together overall results, this work pretend contributed to improve the therapy treatment of nariñense population affected with *H. pylori* recommending the probiotic bacteria use, giving one alternative in order to low the *H. pylori* incidence, Therefore reducing the rate prevalence of gastric cancer associated bacterium on Nariño.

Key words: lactic acid bacteria, LAB, *Helicobacter pylori*, probiotic, bacteriocinogenic, bacteriocin, antagonism.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico se considera el segundo tumor maligno más frecuente en el mundo y su mortalidad supera a la causada por malaria, SIDA y tuberculosis<sup>1</sup>. La mayoría de muertes producidas por este tipo de cáncer, se ha registrado en países de bajos ingresos como Colombia, donde se ha convertido en un problema de salud pública al ser la principal causa de morbimortalidad tanto en mujeres como hombres.

En Nariño las tasas de incidencia y prevalencia de cáncer gástrico son las más altas del mundo, afectando principalmente a los niños entre los dos y nueve años de edad, por lo que se ha considerado a ésta como una zona hiperendémica para la enfermedad<sup>2</sup>. Varios estudios realizados en esta región han determinado algunos factores que soportan el proceso de carcinogénesis gástrica entre los cuales tenemos la interacción de factores ambientales y de huésped, como: la contaminación de las fuentes de agua por desechos industriales y domésticos, el excesivo consumo de sal, el bajo consumo de proteínas, frutas y verduras, factores socio-económicos y la infección por *Helicobacter pylori*<sup>3</sup>.

Este microorganismo es capaz de colonizar el antro gástrico humano mediante mecanismos tales como: flagelos, enzimas y citotoxinas que le permiten mantenerse en este ambiente, soportar condiciones extremas de acidez y el ambiente microaerofílico que este presenta. Por todo lo anterior, puede llegar a causar un proceso inflamatorio crónico superficial difuso que incluye el antro y el cuerpo del estómago. La colonización de *H. pylori* puede implicar competencia por el espacio a ocupar dentro de la cavidad gástrica con otros microorganismos que hacen parte de la microbiota intestinal normal como son las bacterias lácticas, que impiden su adhesión al crear una barrera entre la superficie mucosa del estómago por acción de sustancias tales como: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, proteínas de bajo peso molecular y bacteriocinas, las cuales ejercen un efecto inhibitorio al interferir en los procesos de transporte celular y crecimiento del patógeno<sup>4</sup>

---

1 ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Prevención y detección temprana pueden evitar una escalada de muertes por cáncer en las Américas. Washington, D. C., 2007.

<sup>2</sup> SANZON, G. F., CAICEDO, R. & E. A. DORADO. Cáncer incidental en el Municipio de Pasto. Dirección Municipal de Seguridad Social en Salud y Centro de Estudios en Salud Universidad de Nariño. 1999-2001.

<sup>3</sup> CERON, S. C., YEPEZ, M. C. & G. RIVAS. Estilos de vida y factores protectores y de riesgo para enfermedad gástrica. Municipio de Nariño – Colombia. Universidad y Salud. 2004, 5: 9-25.

<sup>4</sup> STRUS, M., PAKOSZ, K., GOSCINIAK, H., PRZONDO, A., ROZYNEK, E., PITUCH, H., MIEEL, F. & P. B. HECZKO. Antagonistic activity of *Lactobacillus bacteria starins* against anaerobic gastrointestinal that pathogen (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Clostridium difficile*). Med Dows Microbiology. 2001, 53 (2): 133-142.

En la terapia contra *H. pylori*, se han utilizado varias combinaciones de fármacos. Entre las más importantes se destacan la triple terapia formada por un compuesto de bismuto o también conocida como bomba de protones (omeprazol, lanzoprazol o pantoprazol)<sup>5</sup> para cuyo efecto se han reportado tasas de fracaso del 20%, y monoterapias como las basadas en bismuto y metronidazol para las cuales las tasas de fracaso alcanzan hasta un 90%<sup>6</sup>. Esta frecuente y alta falla terapéutica ha generado niveles de reinfección y recaídas constantes, lo que se ha atribuido a varias causas tales como el mal manejo de los antibióticos por parte de los pacientes, la deficiente concentración de los mismos, la resistencia adquirida por mal uso de los fármacos y la aparición de nuevas cepas con mayor poder de transmisibilidad e infección.

Actualmente los estudios de antagonismo contra *H. pylori* se han enfocado en la utilización de bacterias lácticas las cuales son capaces de producir sustancias inhibitoras del crecimiento de patógenos, unas de las más importantes son las bacteriocinas<sup>7</sup>. La búsqueda e identificación de éstas, ha sido de gran importancia por ser consideradas como uno de los principales mecanismos de la acción antagónica contra *H. pylori* y otros patógenos gastrointestinales. Además, podrían constituirse en una herramienta terapéutica debido a su potencial actividad como adyuvantes al suplementarse en alimentos no solo contra la infección ocasionada por *H. pylori*, sino además para enfermedades diarreicas y otros desórdenes gastrointestinales<sup>8</sup>.

Con el propósito de contribuir al mejoramiento del panorama de las enfermedades gastrointestinales y cáncer, este trabajo se propuso evaluar la capacidad inhibitoria de un grupo de bacterias lácticas “bacteriocinogénicas” (*bacteriocinogenics*), sobre el crecimiento de *H. pylori* utilizando aislamientos provenientes de estudios previos realizados en la Universidad de Nariño y el laboratorio de Genética y Bioquímica de Microorganismos (CIB). Las bacterias lácticas crecidas en cocultivo con *H. pylori* fueron sometidas a ensayos de antagonismo *In vitro*. Una vez realizado esto, a cada bacteria láctica, se les aisló las proteínas del sobrenadante del cultivo entre las que se encuentran bacteriocinas, las cuales presentaron un efecto inhibitorio contra *H. pylori*. Estas proteínas se sometieron a fraccionamiento y se evaluó su resistencia frente a factores como temperatura, pH y proteinasas. Los resultados confirman la capacidad bacteriocinogénica y el efecto antagónico de las bacterias lácticas sobre el crecimiento de *H. pylori*, lo que sugiere su potencial utilización hacia el

---

<sup>5</sup> McLOUGHLIN, R., RACZ, I., BUCLEY, M., O'CONNOR, H. J. & C. O'MORAIN. Therapy of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2004, 9(1): 42-48.

<sup>6</sup> SANZON, G. F., CAICEDO, R. & E. A. DORADO. Op cit. Pag. 23

<sup>7</sup> STRUS, M., PAKOSZ, K., GOSCINIAK, H., PRZONDO, A., ROSYNEK, E., PITUCH, H., MIEEL, F. & P. B. HECZKO. Op cit. Pag. 23

<sup>8</sup> GUSLANDI, M. Alternative antibacterial agents for *Helicobacter pylori* eradication. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2001, 15: 1531-1547.

desarrollo de investigaciones encaminadas a la elaboración de alimentos funcionales que permitan en un futuro prevenir, controlar y disminuir la presencia de esta y otras bacterias en la población humana disminuyendo entre otras las tasas de incidencia de cáncer gástrico asociado a *H. pylori*, contribuyendo en las investigaciones sobre terapéutica de patógenos humanos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad inhibitoria de bacterias lácticas sobre *Helicobacter pylori* y probar el efecto “*bacteriocinogénico*” de las proteínas excretadas en el medio.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Evaluar la capacidad inhibitoria de una colección de bacterias lácticas sobre el crecimiento de *H. pylori In vitro*.

Identificar cuales de esas bacterias lácticas producen bacteriocinas con capacidad antagónica contra *H. pylori*.

Evaluar el efecto antagónico de los extractos proteicos *bacteriocinogénicos* sobre *H. pylori*.

Fraccionar los extractos proteicos por medio de cromatografía por exclusión de tamaño.

Probar la estabilidad de los extractos proteicos frente a factores físicos y enzimáticos.



### 3. ANTECEDENTES

Las bacterias lácticas han sido usadas por mucho tiempo para el manejo de desordenes intestinales, como la intolerancia a la lactosa, gastroenteritis, síndrome del intestino irritable (*irritable bowel syndrome, IBS*) y enfermedades alérgicas. Este hecho se ha documentado incluso desde los tiempos de Abraham (s XVIII A.C.) quienes consumían alimentos lácteos con el fin de disminuir las enfermedades estomacales<sup>9</sup>. Sin embargo, fue hasta 1908 cuando Elie Metchnikoff propuso que la ingestión de bacterias lácticas podría tener un papel importante en el equilibrio de la microbiota del tracto intestinal, por primera vez señaló la importancia de los lactobacilos en la salud humana y su relación con la longevidad al ser ingeridos en alimentos como el yogurt<sup>10,11</sup>.

El termino probiótico se utilizó por primera vez en 1965 para referirse a aquellos microorganismos capaces de generar un efecto benéfico en la salud intestinal de los individuos que los consumen<sup>12,13</sup>. Según Pinchuk, *et al*, 2001, Parker en 1974 utilizó el termino probiótico para describir organismos y sustancias que contribuyen al balance de la microbiota intestinal<sup>14</sup>. Más tarde la definición se amplió para referirse a aquellos microorganismos que pueden ejercer efecto antagónico contra patógenos intestinales, lo que convirtió a estos agentes en potenciales adyuvantes terapéuticos de enfermedades gastrointestinales agudas o crónicas, entre las cuales se destaca la infección generada por *H. pylori*<sup>15</sup>.

Actualmente, las bacterias ácido lácticas, consideradas probióticas son importantes no solo por su capacidad de colonizar el intestino de forma benéfica, sino también por las sustancias benéficas que producen, tales como: las bacteriocinas, el ácido láctico y el peróxido de hidrógeno, entre otras, cuyas principales aplicaciones han sido en el campo médico y agroalimenticio<sup>16</sup>.

Entre las sustancias producidas por bacterias probióticas se destacan las bacteriocinas, las cuales determinan la capacidad bacteriocinogénica de estas bacterias, principalmente en su acción contra patógenos gastrointestinales. La

---

<sup>9</sup> TEITELBAUM, J. E. & W. A. WALTER. Nutritional impact of Pre-and probiotics as protective gastrointestinal organism. *Annual Review Nutrition*. 2002, 22: 107–138.

<sup>10</sup> SENOK, A. C., ISMAEEL, A. Y. & G. A. BOTTA. Probiotics: facts and myths. *Clinical Microbiology and infectious Diseases*. 2005, 11: 958-966.

<sup>11</sup> HOLZAPFEL, W. H., HABERER, P., GEISEN, R., BJORKKROTH, J. & U. SCHILLINGER. Taxonomy and important features of probiotic microorganism in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001, 73: 365-373.

<sup>12</sup> TEITELBAUM, J. E. & W. A. Walter. Op cit. Pág. 27

<sup>13</sup> PINCHUK, I. V., BRESSOLLIER, P., VERNEUIL, B., FENET, B., SOROKULOVA, I. B., MEGRAUD, F. & M. C. URDACI. In Vitro Anti – *Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001, 45 (11): 3156–3161.

<sup>14</sup> PINCHUK, I. V., BRESSOLLIER, P., VERNEUIL, B., FENET, B., SOROKULOVA, I. B., MEGRAUD, F. & M. C. URDACI. Op cit. Pág. 27

<sup>15</sup> TEITELBAUM, J. E. & W. A. Walter. Op cit. Pág. 27

<sup>16</sup> OUWEHAND, A. C. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and functional aspects*. 2ª Edición. Nueva York: Editorial Marcel Dekker, Inc. 1998, pp 139 -159.

primera bacteriocina descubierta fue descrita por Gratia en 1925 llamada inicialmente “príncipe V” la cual mas tarde recibió el nombre de colicina por aislarse a partir de *Escherichia coli*<sup>17</sup>. Chen, *et al*, 2003, reporta que Jacob *et al*, 1953, adoptan el termino bacteriocina para referirse a todas las sustancias proteicas de alta especificidad con carácter antibacterial<sup>18</sup>. Klaenhammer en 1993, definió tres tipos de bacteriocinas, 1) los lantibióticos, 2) los pequeños péptidos hidrofóbicos y 3) las grandes proteínas<sup>19</sup>. En 1994, la clasificación fue redefinida y aumentada en una clase correspondiente a péptidos grandes, considerados bacteriocinas complejas que contienen lípidos y carbohidratos en su estructura<sup>20</sup>.

En los últimos años, se han realizado estudios con diferentes bacterias lácticas para probar su efecto probiótico y antagónico sobre patógenos de importancia humana, como es el caso de *H. pylori*, que infecta a la población humana desde hace diez millones de años<sup>21</sup>. Actualmente, estudios epidemiológicos han demostrado que la infección por *H. pylori* ocurre a nivel mundial, sin embargo, la incidencia de la infección entre países desarrollados y en vía de desarrollo ha sido significativamente diferente. Desde su aparición se ha estimado que el 80% de las personas que viven en países en vía de desarrollo padecen la infección a los diez años de edad en promedio, mientras que en los desarrollados solo el 1% la desarrolla en la niñez y el 50% se mantiene infectado aún en estado adulto<sup>22</sup>.

Teniendo en cuenta lo anterior, en la última década entre los estudios más destacados en la búsqueda de alternativas que permitan eliminar o controlar el patógeno, están los de Saloff Coste en 1997 quien reporta que el consumo de leches fermentadas con *Lactobacillus acidophilus* podría jugar un papel importante en la prevención de cáncer gástrico, apoyado en resultados que demuestran la disminución de la actividad de las enzimas activadoras de precarcinógenos. Coconnier *et al*<sup>23</sup>, 1998, reportaron la actividad antagónica de una cepa de *L. acidophilus* sobre *H. pylori* *In vitro* e *In vivo*. Michetti *et al*<sup>24</sup>, 1999, sugieren que el sobrenadante producido por *L. acidophilus* tiene un efecto bactericida sobre *H. pylori* y un efecto supresivo parcial en humanos infectados con dicho microorganismo. Montes *et al*<sup>25</sup>, 2003, demostraron *In vitro* el efecto antagónico

---

<sup>17</sup> NES, I. F. & O. JOHNSBORG. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Current Opinion in Biotechnology*. 2005, 15: 100–104.

<sup>18</sup> CHEN, H. & D. G. HOOVER. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2003, 2: 82–100.

<sup>19</sup> KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993, 12: 39–86.

<sup>20</sup> OUWEHAND, A. C. Op cit. Pág. 27

<sup>21</sup> GALIANO, R. A. *Helicobacter pylori*. Instituto Químico Biológico, (online), Septiembre 12 de 2004. URL: [www.iqb.es.digestivo/patologia/helicobacter/cap01htm](http://www.iqb.es.digestivo/patologia/helicobacter/cap01htm).

<sup>22</sup> MORALES, E. M., CASTILLO, R. G., LOPEZ, V. Y. & A. CRAVIOTO. *Helicobacter pylori*. *Asociación Mexicana de Microbiología*. 2004, 1–35.

<sup>23</sup> COCONNIER, M. H., LIEVIN, V., HEMERY, E. & A. SERVIN. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *In vitro* and *In vivo* by the human *L. acidophilus* strain LB. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, 64 (11): 4573–4580.

<sup>24</sup> MICHETTI, P., DORTA, G., WIESEL, P. H., BRASSART, D., VERDE, E., HERRANZ, M., FELLE, C., PORTA, N., ROUVET, M., BLUM, A. L. & I. CORTHESEY-THEULAZ. Effect of whey based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (Jhonsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion*. 1999, 60: 203-209.

<sup>25</sup> MONTES, A., SANTACRUZ, A., SAÑUDO, A. & A. PAZOS. Efecto *in Vitro* de *Lactobacillus casei* Ssp *rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori*. *Universidad y Salud*. 2003, 4 (1): 5–12.

de *L. casei ssp rhamnosus* sobre el crecimiento de *H. pylori*. Kim *et al*<sup>26</sup>, 2003, evaluaron la capacidad inhibitoria de siete bacterias lácticas y sus bacteriocinas sobre *H. pylori*, donde todas inhibieron al patógeno *In vitro*, además de demostrar que el ácido láctico influye también en dicha inhibición. Sgouras *et al*<sup>27</sup>, 2004, utilizaron *L. casei* cepa Shirota y observaron que la disminución sobre la viabilidad de *H. pylori* estaba asociada con una disminución de la inflamación de la mucosa gástrica. Rokka, *et al*, 2006, probaron siete cepas diferentes del grupo de *L. plantarum*, encontrándolas antagónicas de *H. pylori*, este resultado se lo atribuyeron a la capacidad de estas bacterias de producir sustancias extracelulares, y proponen que estos microorganismos deben ser usados como suplemento en alimentos para uso terapéutico<sup>28</sup>.

---

<sup>26</sup> KIM, T. S., HUR, J. W., YU, M. A., CHEIGH, C. I., KIM, K.N., HWANG, J. K. & Y. R. PYUN. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*. 2003, 66 (1): 3–12.

<sup>27</sup> SGOURAS, D., MARAGKOUidakis, P., PETRAKI, K., MARTINEZ, B., ERITOU, E., MICHOPoulos., KALANTZOPOULOS, G., TSAKAÑIDOU, E. & A. Mentis. *In vitro* and *In vivo* inhibition of *H. pylori* by *L. casei* strain Shirota. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, 70 (1): 518–526.

<sup>28</sup> ROKKA, S., PIHLANTO, A., KORHONEN, H. & V. JOUTSJOKI. *In vitro* growth inhibition of *Helicobacter pylori* by lactobacilli belonging to the *Lactobacillus plantarum* group. *Letter in Applied Microbiology*. 2006, 43: 508-513.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (LABs)

Las bacterias lácticas (*lactic acid bacteria*, LAB) son un grupo de microorganismos Gram positivos, no esporulados, cocos o bacilos aerobios facultativos, ácido tolerantes y fermentativos, que utilizan la lactosa como fuente principal de carbono para producir energía para transportarla a través de su membrana celular hacia el citoplasma. Producen además, ácido láctico como el producto final más importante durante la fermentación de carbohidratos, el cual es un producto con actividad antimicrobiana; este proceso les ha permitido ubicarse dentro de los microorganismos de origen probiótico por ejercer efectos benéficos en la salud humana<sup>29</sup>.

### 4.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

Entre los criterios que se tienen en cuenta para considerar un microorganismo como probiótico están los siguientes:

- Ser de origen humano, vivir como comensal y simbiote en el organismo humano, convirtiéndose en habitante normal del intestino
- Ser de naturaleza no patogénica
- Ser resistente a la acción peristáltica del intestino
- Ser resistente a la destrucción por el ácido gástrico y biliar
- Ser capaz de adherirse al tejido epitelial intestinal y gástrico<sup>30</sup>
- Ser capaz de colonizar el tracto gastrointestinal en corto tiempo y con rápido tiempo de generación
- Producir sustancias antimicrobianas
- Modular respuestas inmunes
- Influenciar las actividades metabólicas humanas, facilitando la asimilación de sustancias de difícil digestión como la lactosa<sup>31</sup>
- Ser estables durante el proceso de producción y distribución para que pueda llegar vivo al intestino<sup>32,33</sup>.

---

<sup>29</sup> AXELSSON, L. Lactic acid bacteria : classification and physiology. En: Lactic Acid Bacteria. New York. Editorial Marcel Dekker, Segunda Edición. 1998, pp 1-72.

<sup>30</sup> DEL PIANO, M., MORELLI, L., STROZZI, G. P., ASESINA, S., BARBA, M., DEIDDA, F., LORENZINI, P., BALLARÉ. M., MONTINO, F., ORSELLO, M., SARTORI, M., GARELLO, E., CARMAGNOLA, S., PAGLIARULO, M. & L. CAPURSO. Probiotics: from research to consumer. Digestive and Liver Disease. 2006, 38 (2): 248-255.

<sup>31</sup> TEITELBAUM, J. E. & W. A. WALTER. Op cit. Pág. 27

<sup>32</sup> DE LAS CAGIGAS, R. A. & A. J. BLANCO. Prebióticos y Probióticos, una relación beneficiosa. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición. 2002, 16 (1): 63-8.

<sup>33</sup> CHANDA, R. C. Enchancing market value of milk by adding cultures. Journal OF Dairy Science. 1999, 82: 2245-2256.

### 4.3 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LABs PROBIÓTICAS

La acumulación de patógenos en la mucosa gastrointestinal puede influir en la carcinogénesis, por la producción de enzimas que transforman pre-carcinógenos en carcinógenos activos<sup>34</sup>. Algunos microorganismos pueden ejercer un efecto protector al huésped de la actividad carcinogénica por medio de varios mecanismos, entre los que tenemos<sup>35</sup>:

4.3.1 Producción de sustancias inhibitorias. Las bacterias probióticas producen una variedad de sustancias que inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas, estas sustancias incluyen ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, estos componentes no solo pueden reducir el número viable de células, sino también influir en el metabolismo y producción de toxinas<sup>36,37</sup>. Entre estos componentes tenemos:

4.3.1.1 Ácidos orgánicos. Los ácidos inhiben el crecimiento microbiano, se difunden a través de la membrana celular, reducen la tasa de síntesis macromolecular y disminuyen la efectividad del transporte sobre la membrana<sup>38</sup>. Entre los principales ácidos orgánicos que producen las bacterias lácticas están el ácido láctico y el ácido acético<sup>39</sup>. De estos, el acético es el más fuerte inhibidor y tiene un rango de actividad inhibitoria más amplio sobre el crecimiento de patógenos<sup>40</sup>.

Lorca *et al*, 2001, evaluaron *In vitro* e *In vivo* la actividad antibacteriana de los ácidos láctico y acético, utilizando para ello 17 cepas de lactobacilos en cocultivo con *H. pylori*. Ellos sugirieron que el efecto inhibitorio se debía a los ácidos producidos por estas bacterias y obtuvieron mejores resultados al utilizar una mezcla de los dos ácidos<sup>41</sup>. Cats *et al*, 2003, demostraron que el ácido láctico de una cepa de *L. casei* cepa Shirota inhibe el crecimiento de *H. pylori*<sup>42</sup>. Además, se ha probado el efecto antagonico del ácido láctico en modelos murinos con *L. salivarius*<sup>43</sup>.

---

<sup>34</sup> GOTTELAND, M., BRUNSER, O. & S. CRUCHET. Systematic review: are probiotics used in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2006, 23: 1077-1086.

<sup>35</sup> ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *American Society from Nutritional Sciences*. 2000: 396-402.

<sup>36</sup> OUWEHAND, A. C. Op cit. Pág. 27

<sup>37</sup> SULLIVAN, A. & C. E. NORD. Probiotics and gastrointestinal diseases. *Journal of internal Medicine*. 2005, 257: 78-92.

<sup>38</sup> OUWEHAND, A. C. Op cit. Pág. 27

<sup>39</sup> Ibid

<sup>40</sup> Ibid

<sup>41</sup> RAIBAUD, P. Interactions bactériennes dans le tractus digestif. En: *Bacterias Lactiques: Aspects fondamentaux et thechnologiques*. Volumen 2. Francia: Jannvier, 1994: pp 397-409.

<sup>42</sup> CATS, A., KUIPERS, E. J., BOSSCHAERTS, M. A. R., POT, R. G. J., VANDERBROUCK-GRAULS, C. M. J. E. & J. G. KUSTERS. Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei* containing milk drink in *Helicobacter pylori* colonized subjects. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2003, 17: 429-435.

<sup>43</sup> SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*. 2004, 28: 405-440.

4.3.1.2 Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Las LABs en presencia de oxígeno son capaces de generar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por medio de la acción de oxidasas. El efecto bactericida del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha sido atribuido a su fuerte efecto oxidante sobre la célula bacteriana, donde proteínas celulares y lípidos de la membrana pueden ser oxidados; además, las reacciones producidas por este compuesto liberan una gran cantidad de oxígeno volviendo el entorno aeróbico, el cual es desfavorable para ciertos organismos<sup>44,45</sup>.

Shing *et al*, 2002, sugirieron que el peróxido de hidrógeno proveniente de la leche produce la inhibición de *H. pylori*, además de reducir la actividad de la ureasa de este microorganismo<sup>46</sup>.

4.3.1.3 Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Es formado durante la ruta heterofermentativa de las hexosas. Este compuesto inhibe la descarboxilación enzimática y la acumulación de éste en la bicapa lipídica causa disfunción en la permeabilidad. En altas concentraciones impide el crecimiento bacteriano al crear un ambiente aeróbico<sup>47,48</sup>.

4.3.1.4 Diacetil. Conocido también como 2,3-butanodiol es más activo contra bacterias Gram negativas, levaduras y mohos que contra bacterias Gram positivas. Reacciona con la arginina de las proteínas de bacterias Gram negativas, interfiriendo con la utilización de este aminoácido<sup>49,50</sup>. Kim *et al*, 2006 sugieren que una concentración de 32 mM es indicada para inhibir a *H. pylori*<sup>51</sup>.

4.3.1.5 Reuterina. Compuesto orgánico de bajo peso molecular que tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana cuando entra en contacto con la célula blanco, inhibiendo la producción de ADN. Se produce en presencia de glucosa por *L. reuteri*<sup>52</sup>. Se ha encontrado que tiene actividad antibacteriana, antifúngica, antiprotozoaria y antiviral<sup>53,54</sup>. Se ha demostrado que ejerce una actividad antagonista contra *H. pylori* al interferir en la adhesión de este patógeno<sup>55</sup>. Lionetti *et al*, 2006, encontraron que *L. reuteri* es capaz de reducir los

---

<sup>44</sup> CAPLICE, E. & G. F. FITZEGARLD. Food Fermentations: role of microorganism in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology. 1999, 131-149.

<sup>45</sup> OUWEHAND, A. C. Op cit. Pág. 27

<sup>46</sup> SHIN, K., YAMAUCHI, K., TERAGUCHI, S., HAYASAWA, H. & I. IMOTO. Susceptibility of *Helicobacter pylori* and its ureasa activity to the peroxide hydrogen peroxide thiocyanate antimicrobial system. Journal of Medical Microbiology. 2002, 51: 231-237.

<sup>47</sup> OUWEHAND, A. C. Op cit. Pág. 27

<sup>48</sup> VANDERBERG, P. A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiology Reviews. 1993, 12: 221-238.

<sup>49</sup> CAPLICE, E. & G. F. FITZEGARLD. Op cit. Pág. 32

<sup>50</sup> VANDERBERG, P. A. Op cit. Pág. 32

<sup>51</sup> KIM, T. S., HUR, J. W., YU, M. A., CHEIGH, C. I., KIM, K.N., HWANG, J. K. & Y. R. PYUN. Op cit. Pág. 29

<sup>52</sup> Ibid

<sup>53</sup> VANDERBERG, P. A. Op cit. Pág. 32

<sup>54</sup> CAPLICE, E. & G. F. FITZEGARLD. Op cit. Pág. 32

<sup>55</sup> MUKAI, T., ASASAKA, T., SATO, E., MORI, K., MATSUMOTO, M. & H. OHORI. Inhibition of binding *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2002, 32: 105-110.

efectos producidos por antibióticos en contra de *H. pylori*, además de competir por la superficie del epitelio<sup>56</sup>.

4.3.1.6 Ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico (PCA). Es producido por *L. casei casei*, *L. casei pseudopantarum* y *Streptococcus bovis*. Es inhibitorio para *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas putida*<sup>57</sup>.

4.3.1.7 Bacteriocinas. Se han definido como proteínas capaces de inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes o patógenos. Una gran cantidad de bacteriocinas producidas por LABs han sido caracterizadas. Además, son utilizadas como preservantes ya que no permiten el desarrollo de contaminantes y patógenos<sup>58</sup>.

4.3.2 Competencia por los sitios de adhesión. Las LABs compiten por un lugar en la superficie del epitelio intestinal, obstaculizando la adhesión de *H. pylori* y otros patógenos en la mucosa, formando una barrera entre ésta y el patógeno, bloqueando el receptor de la adhesina de éste. El efecto conocido como “efecto barrera”, hace referencia a las interferencias que ejercen los microorganismos comensales sobre los microorganismos patógenos, es decir, la colonización por parte de los microorganismos comensales dificulta, y en muchos casos impide la colonización por parte de los microorganismos patógenos y por tanto la virulencia con la que estos actúan<sup>59</sup>.

4.3.3 Estimulación de la inmunidad específica y no específica. El consumo de productos lácticos a base de lactobacilos durante una enfermedad gastrointestinal permite un incremento en la respuesta inmune<sup>60,61</sup>. La inmunidad específica protege al huésped de infecciones al inducir un aumento de la producción de inmunoglobulinas, así como de la activación de células mononucleares y de linfocitos. Por su parte en la estimulación inmune no específica, se activan los procesos de fagocitosis, ataque de células y la producción de citocinas, produciendo la muerte celular<sup>62</sup>.

---

<sup>56</sup> LIONETTI, E., MINIELLO, V. L., CASTELLANETA, S. P., MAGISTA, A. M., DE CANIO, A., MAUROGIOVANNI, G., IERARDIS, E., CAVALLO, L., & R. FRANCAVILLA. *Lactobacillus reuteri* therapy to reduce side effects during anti *Helicobacter pylori* treatment in children: a randomized placebo controlled trial. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2006, 24: 1461-1468.

<sup>57</sup> OUWEHAND, A. C. Op cit. Pág. 27

<sup>58</sup> KLAENHAMMER, T. R. Op cit. Pág. 28

<sup>59</sup> TUOMOLA, E. M., OUWEHAND, A. C. & S. J. SALMINEN. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 1999, 26: 137-142.

<sup>60</sup> Ibid

<sup>61</sup> WENG, M. & A. WALTER. Bacterial colonization, probiotics, and clinical disease. *The Journal of Pediatrics*. 2006: 107-114.

<sup>62</sup> BLUE, S., ALVAREZ, S., HALLER, D., PEREZ, P. & E. J. SCHIFFRIN. Intestinal microflora and the interaction with immunocompetent cells. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999, 76: 199-205.

#### 4.4 USO DE LABs PROBIÓTICAS

El interés en las terapias preventivas y suplementos nutricionales ha aumentado en los últimos años, llevando a la creación de productos que contengan microorganismos vivos que puedan tener un efecto benéfico sobre la salud humana; para esto se ha escogido un tipo de microorganismos capaces de sobrevivir en la cavidad gástrica, resistir los ácidos gástricos, las sales biliares y las enzimas pancreáticas, entre otras, por eso se han utilizado las bacterias lácticas que comprenden géneros como: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*. Entre las bacterias más importantes tenemos a *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. lactis*, *S. thermophilus*<sup>63,64</sup>. Estas LABs han sido utilizadas en la industria alimenticia con el fin de modificar la microbiota intestinal de ciertos grupos de personas que están en alto riesgo de contraer enfermedades, especialmente gastrointestinales como son los infantes prematuros, niños y viajeros que han recibido terapia con antibióticos. Su perspectiva a futuro es que permitan el control de enfermedades inflamatorias, tratamiento y prevención de alergias, estimulación inmune, reducción de enfermedades respiratorias y prevención de cáncer<sup>65</sup>.

Actualmente la ingesta de las LABs probióticas afectan el proceso de carcinogénesis, al reducir los niveles de enzimas como glucosidasas, azoreductasas y nitroreductasas, que hacen parte de este proceso y que transforman pre-carcinógenos en carcinógenos activos, promoviendo una reducción en la incidencia de cáncer gástrico<sup>66</sup>. Además, se ha demostrado que aunque algunos probióticos no erradican el patógeno totalmente, si pueden disminuir los niveles de éste en la mucosa gástrica, lo que permite disminuir la inflamación y estabilizar el “efecto barrera”<sup>67</sup>.

#### 4.5 IMPORTANCIA DE LAS LABs PROBIÓTICAS EN LA TERAPIA CONTRA PATÓGENOS

Los probióticos conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores, y bioprofilácticos, son microorganismos vivos, que afectan en forma benéfica al desarrollo de la microbiota gastrointestinal, estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo<sup>68</sup> y forman una barrera protectora contra microorganismos patógenos y oportunistas que colonizan el tracto digestivo del hospedero<sup>69,70</sup>. Entre los patógenos humanos que han sido tratados con LABs encontramos:

---

<sup>63</sup> MARTEAU, P. R., DE VRESE, M., CELLIER, C. J. & J. SCHREZENMEIR. Protection from gastrointestinal diseases with the uses of probiotics. *American Journal for Clinical Nutrition*. 2001, 73: 430–436.

<sup>64</sup> THARMARAJ, N. & N. P. SHAH. Selective enumeration of *L. delbruekii ssp Bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacteria*, *L. casei*, *L. rhamnosus* and *propionibacteria*. *Journal Dairy Science*. 2003, 86: 2288–2296.

<sup>65</sup> VANDERHOOF, J. A. Probiotics: future directions. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001, 73: 1152-1155.

<sup>66</sup> SENOK, A. C., ISMAEEL, A. Y. & G. A. BOTTA. Op cit. Pág. 27

<sup>67</sup> GOTTELAND, M., BRUNSER, O. & S. CRUCHET. Op cit. Pág. 31

<sup>68</sup> REID, G. Safe and efficacious probiotics: what are they. *Trends in Microbiology*. 2006. 14 (8): 348–352.

<sup>69</sup> ROLFE, R. D. Op cit. Pág. 31

<sup>70</sup> SAAVEDRA, J. M. Clinical application of probiotic agents. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001, 73: 1147–1151.



4.5.1 *Listeria monocytogenes*. Es una bacteria Gram positiva en forma de bastón, no esporulada. En cultivos jóvenes se encuentra en forma bacilar, para volverse de forma cocoide en cultivos viejos. En condiciones de laboratorio se desarrolla a 37°C en medios enriquecidos y son aerobios facultativos. A 20°C son móviles puesto que poseen flagelos peritricos, que se pierden a medida que aumenta la temperatura quedando monotricos<sup>71</sup>.

Es un importante patógeno humano, la infección se puede presentar como una septicemia o meningitis, afectando en mayor proporción a recién nacidos, embarazadas, ancianos y personas inmunocomprometidas<sup>72</sup>.

En los últimos años, la importancia de LABs ha sido tal, que las han probado contra este patógeno, como es el caso de Schillinger, *et al*, 1998, utilizando nisina de *L. sakei*, demostraron su capacidad antagónica sobre *L. monocytogenes*, aunque las cepas mutantes de *L. monocytogenes* Scott A, fueron resistentes a la nisina, pero sensibles a la sakacina y la enterococina<sup>73</sup>. Más recientemente Héquet, *et al*, 2006, aislaron bacteriocinas de *L. sakei* proveniente de carne diseñando un medio que estimuló su producción. Las bacteriocinas aisladas fueron sakacina X y T, que pueden ser utilizadas como bioprotectores en cultivos y alimentos contaminados con *Listeria*<sup>74</sup>. Bernbom, *et al*, 2006, evaluaron si las bacteriocinas producidas por *L. plantarum* afectaban la habilidad de *L. monocytogenes* de persistir e invadir el intestino<sup>75</sup>. Corr, *et al*, 2007, demostraron que las bacterias probióticas pertenecientes al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* pueden ser utilizadas en el tratamiento contra *L. monocytogenes*, ya que impiden la adhesión a la superficie celular del intestino<sup>76</sup>.

4.5.2 *Escherichia coli*. Es un bacilo Gram negativo, aerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos que rodean su pared celular. Es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. Coloniza el intestino del hombre, pocas horas después del nacimiento, por tal motivo se lo considera un habitante normal de la flora, pero hay cepas que pueden ser patógenas causando diferentes cuadros clínicos, como lo son la diarrea y la colitis hemorrágica<sup>77</sup>.

---

<sup>71</sup> DIAZ, G. & J. FERRAN. Bacilos gram positivos aeróbicos. Fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos. 2004: 1-3

<sup>72</sup> *Ibid*

<sup>73</sup> SCHILLINGER, U., CHUNG, H. S., KEPPLER, K. & W. H. HOLZAPFEL. Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin resistant mutants of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology*. 1998, 85: 657-663.

<sup>74</sup> HEQUET, A., LAFFITTE, V., SIMON, L., DE SOUSA-CAETANO, D., THOMAS, C., FREMAUX, C. & J. M. BERJEAUD. Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to stimulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sake* 2512 on meat. *International Journal of Food Microbiology*. 2006: 1-8.

<sup>75</sup> BERNBOM, N., LICHT, T. R., SAADBYE, P., VOGENSEN, F. K. & B. NORRUNG. *Lactobacillus plantarum* inhibits growth of *Listeria monocytogenes* in an in vitro continuous flow gut model, but promotes invasion of *L. monocytogenes* in the gut of gnotobiotic rats. *International Journal of Food Microbiology*. 2006, 108: 10-14.

<sup>76</sup> CORR, S. C., GAHAN, C. G. M. & C. HILL. Impact of selected *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species on *Listeria monocytogenes* infection and the mucosal immune response. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2007, 50: 380-388.

<sup>77</sup> RODRIGUEZ – ANGELES, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*. 2002, 44 (5): 464-475.

En los últimos años, se han buscado alternativas terapéuticas a las convencionales con LABs, entre los estudios que más se destacan esta el de Sreekumar, *et al*, 2000, quienes reportan que *L. acidophilus* inhibe coliformes presentes en leche y en el intestino de ratones<sup>78</sup>. Hirano, *et al*, 2003, en cultivos *In vitro* de *L. rhamnosus* con *E. coli* (causante de infecciones enterohemorrágicas), concluyeron que el efecto patogénico de *E. coli* se puede disminuir con la presencia de la bacteria láctica, además, de que este microorganismo puede realzar la respuesta inmune<sup>79</sup>. Chung, *et al*, 2005, utilizó extractos proteicos de *L. curvatus* con las cepas *E. coli* 0157:H7 y *E. coli* p220. Para la primera de estas cepas el extracto ejerció un efecto bactericida y para la evaluaron la capacidad que tienen las proteínas extracelulares de *L. helveticus* de interferir en la adherencia de patógenos entéricos con las células epiteliales del hospedero<sup>80</sup>.

**4.5.3 *Salmonella typhimurium*.** Se describe como un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, móvil. Es capaz de fermentar glucosa, utilizando el citrato como única fuente de carbono; es catalasa positiva y oxidasa negativa. En el organismo humano es causante de síndromes tifoideos cuando se encuentra en la sangre, así mismo produce diarrea, vómito y fiebre<sup>81</sup>.

Su alta incidencia en la población ha creado la necesidad de buscar alternativas diferentes a las convencionales, por eso algunos autores como Silva, *et al*, 2004, encontraron que cepas probióticas de *Bifidobacterium*, aunque no eliminan *Salmonella*, pueden mediar en la reducción de la respuesta inflamatoria, y proponen a este género como un agente probiótico terapéutico<sup>82</sup>. De Keersmaecker, *et al*, 2006, evaluaron la capacidad de *L. rhamnosus* GG de producir sustancias antimicrobianas como el ácido acético, PCA, ácido fórmico y ácido láctico, compuestos que ejercieron un efecto antagónico contra *S. typhimurium*<sup>83</sup>.

---

<sup>78</sup> SREEKUMAR, O. & A. HOSONO. Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and fecal enzymes of rats and the *In Vitro* inhibition of *Escherichia coli* in coculture. *Journal Of Dairy Science*. 2000, 83: 931-939.

<sup>79</sup> HIRANO, J. YOSHIDA, T., SUGIYAMA, T., KOIDE, M., MORI, I. & T. YOKOCHI. The effect the *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cell *In Vitro*. *Microbiological Immunology*. 2003, 47 (6): 405-409.

<sup>80</sup> JOHNSON-HENRY, K. C., HAGEN, K. E., GORDONPOUR, M., TOMPKINS, T. A. & P. M. SHERMAN. Surface layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cellular Microbiology*. 2007, 9 (2): 356-367.

<sup>81</sup> THRELFALL, E. J. *Salmonella typhimurium* DT 104 a truly international multiresistant clone. *Journal Antimicrobial & Chemotherapy*. 2000. 46 (1): 7-10.

<sup>82</sup> SILVA, A. M., BARBOSA, F. H. F., DUARTE, R., VIERIA, L. Q., ARANTES, R. M. E. & J. R. NICOLI. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, 97: 29-37.

<sup>83</sup> DE KEERSMAECKER, S., VERHOEVEN, T., DESAIR, J., MARCHAL, K., VANDERLEYDEN, J. & I. NAGY. Stron antimicrobial activity *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due the accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiological Letters*. 2006, 259: 89-96.

4.5.4 *Campylobacter jejuni*. Al microscopio se identifica como un espiral o bacilo Gram negativo, que a medida que va envejeciendo se transforma en coco. Es un microorganismo no esporulado, que presenta uno o dos flagelos en sus extremos y que le confieren un rápido movimiento para penetrar la mucosa gástrica. En condiciones de laboratorio se desarrollan a 37°C pero tiene una temperatura óptima de crecimiento de 42°C en agar sangre con antibióticos. Se transmite al hombre a través de carne y leche de animales que han estado infectados, produciendo diarrea, degeneración y atrofia granular, pérdida de la producción de mucus, abscesos de las criptas y ulceración de la mucosa epitelial<sup>84</sup>.

Entre los estudios recientes para tratar el patógeno con probióticos se encuentran los realizados por Chaveerach, *et al*, 2004 evaluaron la capacidad de *Lactobacillus* (P93) aislada de pollos, de inhibir el patógeno gracias al ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas<sup>85</sup>. Stern, *et al*, 2006, encontraron una bacteriocina producida por *L. salivarius* NRRL B-30514 que inhibe el crecimiento de *C. jejuni* en pollos<sup>86</sup>.

4.5.5 *Helicobacter pylori*. Se describe como una bacteria Gram negativa en forma de S o bastón curvado multiflagelada<sup>87, 88</sup>. Se han descrito otras formas microscópicas de *H. pylori*, como coco, en forma de V o de U y también de forma recta (dimórfico). En condiciones de laboratorio, crece bien en agar sangre de cordero a 37°C, a bajas concentraciones de oxígeno (ambiente microaerófilico) y genera colonias pequeñas, circulares con apariencia convexa y translúcida a manera de gotas de rocío<sup>89</sup>.

Este microorganismo es considerado un patógeno que causa un proceso inflamatorio crónico superficial y difuso que incluye el antro y el cuerpo del estómago, ocasionando enfermedades gástricas tales como: gastritis atrófica crónica, úlcera péptica, linfoma asociado al tejido linfático de la mucosa gástrica (MALT) o adenocarcinoma gástrico<sup>90,91</sup>. Actualmente, se ha considerado uno de

---

<sup>84</sup> SNEATH, P. & J. G. HOLT. *Bergey's Manual systematic of bacteriology*. Estados Unidos: Editorial Williams and Wilkins Co. 1986, Vol 2. pp 1208–1234.

<sup>85</sup> CHAVEERACH, P., LIPMAN, L. J. A. & F. van KNAPAN. Antagonistic activities of several bacteria on *In Vitro* growth of 10 strains of *Campylobacter jejuni/coli*. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, 90: 43-50

<sup>86</sup> STERN, N.J., SVETICH, E. A., ERUSLANOV, B. V. PERELYGIN, V. V., MITSEVICH, E. V., MITSEVICH, I. P., POKHILENKO, V. D., LEVCHUK, V. P., SVETICH, O. E. & B. S. SEAL. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. 2006, 50 (9): 3111-3116.

<sup>87</sup> HERNÁNDEZ, T. M. *Helicobacter pylori*. La bacteria que más infecta al ser humano. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición* 2001, 15 (1) 42–54.

<sup>88</sup> HIRSCHL, A. M. Microbiología de *Helicobacter pylori*: Aspectos generales, diagnóstico y resistencia. En: *Infección por Helicobacter pylori* en lesiones gastroduodenales. España: Editorial Prous Science. 1998, pp 17-38.

<sup>89</sup> *Ibid*

<sup>90</sup> PEREZ-PEREZ, G. I. Mecanismo de patogenicidad de *Helicobacter pylori*. En: *Infección por Helicobacter pylori* en lesiones gastroduodenales. España: Editorial Prous Science. 1998, pp 107–136.

<sup>91</sup> TYTGAT, G. N. *Helicobacter pylori*: past, present and futures. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2000, 15: 30-33.

los patógenos más importantes para el humano al ser una de las principales causas de progresión a cáncer gástrico<sup>92,93</sup>.

La gastritis es considerada como una inflamación aguda o crónica de la mucosa del estómago donde se producen erosiones de las células superficiales, formaciones nodulares y algunas veces hemorragias de la pared gástrica<sup>94,95</sup>. Esta enfermedad puede ser de tipo fisiológica o infecciosa, y se ha documentado que el 80% de los pacientes con gastritis crónica poseen en su mucosa gástrica y duodenal a *H. pylori*<sup>96,97</sup>.

Las evidencias que relacionan a *H. pylori* con las enfermedades gástricas han aumentado rápidamente desde su descubrimiento en los años 70 con los descubrimientos de Warren y Marshall. Más recientemente, Bravo *et al*, 2003, describieron la asociación entre *H. pylori* y la patología gástrica<sup>98</sup>. Salas *et al*, 2005, encontraron una asociación estadísticamente significativa entre *H. pylori* y gastritis en Lima-Perú<sup>99</sup>.

Actualmente, la alta falla en la erradicación de este patógeno ha permitido buscar alternativas terapéuticas en las investigaciones realizadas con LABs como las mencionadas anteriormente y otras como por ejemplo Michetti, *et al*, 1999, encontraron que el sobrenadante de *L. acidophilus* La1 tuvo un efecto *In vitro* antagónico sobre *H. pylori* en pacientes infectados<sup>100</sup>. Lorca, *et al*, 2001, demostró que el sobrenadante del cultivo de *L. acidophilus* inhibe el crecimiento de *H. pylori*<sup>101</sup>. Wang, *et al*, 2004, fabricaron un yogurt con *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y se lo suministraron a voluntarios infectados con *H. pylori* y concluyeron que *L. acidophilus*, *B. lactis*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* suprimen el patógeno en humanos infectados<sup>102</sup>.

---

<sup>92</sup> BLANCHARD, T. G., DRAKES, M. L. & S. J. CZINN. *Helicobacter* infection: pathogenesis. Current Opinion Gastroenterology. 2003, 20: 10–15

<sup>93</sup> TYTGAT, G. N. *Helicobacter pylori*: where are we and where are we going?. Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 2000, 14 (3): 55–58.

<sup>94</sup> GRAHAM, D. Y. Visión general de la infección por *Helicobacter pylori*: historia, epidemiología, enfermedad y futuro. En: Infección por *Helicobacter pylori* en lesiones gastroduodenales. España: Editorial Prous Science. 1998, pp 3-15.

<sup>95</sup> MATYSIAK-BUDNIK, T. & F. MEGRAUD. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. European Journal of Cancer. 2006, 42: 708–716.

<sup>96</sup> PASSARO, D. J. & PARSONTE, J. Epidemiología de *Helicobacter pylori*. En: Infección por *Helicobacter pylori* en lesiones gastroduodenales. España: Editorial Prous Science. 1998, pp 59 – 82.

<sup>97</sup> TYTGAT, G. N. Op cit. Pág. 38

<sup>98</sup> BRAVO, L. E., CORTES, A., CARRASCAL, E., JARAMILLO, R., GARCIA, L. E., BRAVO, P. E., BEDEL, A. & P. A.-BRAVO. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. Colombia Medica. 2003, 34 (3): 124-131.

<sup>99</sup> SALAS SANCHEZ, W. A., BENITES GALVEZ, M. R. & C. SALINAS CERQUIN. Asociación de *Helicobacter pylori* y patología gástrica no neoplásica en una clínica privada del norte de Lima – Perú. Revista Medica Herediana. 2005, 16 (2): 89-96.

<sup>100</sup> MICHETTI, P., DORTA, G., WIESEL, P. H., BRASSART, D., VERDE, E., HERRANZ, M., FELLE, C., PORTA, N., ROUVET, M., BLUM, A. L. & I. CORTHESEY-THEULAZ. Op cit. Pág. 28

<sup>101</sup> LORCA, G. L., WANDASTROM, T., FONT DE VALDEZ, G. & A. LJUNGH. *Lactobacillus acidophilus* autolysis inhibit *Helicobacter pylori* In Vitro. Current Microbiology. 2001, 42: 39-44.

<sup>102</sup> WANG, K. Y., LI, S. N., LIU, C. S., PERNG, D. S., SU, Y. C., WU, D. C., JAN, C. M., LAI, C. H., WANG, T. N., D.C. WANG. Effects of ingesting *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. American Journal of Clinical Nutrition. 2004, 80: 737-741.

4.5.6 Otros beneficios. Entre otros beneficios, las LABs permiten mantener saludable el ecosistema vaginal humano que posee una gran cantidad de estrógenos y estimulan la producción de glicógeno en el epitelio vaginal. El glicógeno puede ser fermentado a ácidos como el acético y el láctico, los cuales eliminan los patógenos urovaginales antes de ingresar a la vejiga y causar infección del tracto urinario (UTI: vaginitis y vaginosis)<sup>103,104</sup>. También han sido utilizados para el tratamiento de alergias en la piel y diarrea, especialmente en niños lactantes que contraen infecciones al recibir estos microorganismos a través de la leche materna y la piel al momento del nacimiento<sup>105</sup>.

## 4.6 BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas son péptidos o proteínas con actividad antimicrobiana dirigida en contra de diferentes especies bacterianas, presentan un amplio rango de acción inhibitorio sobre microorganismos relacionados taxonómicamente<sup>106</sup>. Son considerados antibióticos clínicos o terapéuticos de bajo peso molecular principalmente de origen bacteriano<sup>107</sup>.

Son un grupo heterogéneo de proteínas simples y complejas combinadas con lípidos y carbohidratos, y contienen entre 20 y 60 aminoácidos en su cadena peptídica<sup>108,109</sup>. La mayoría de las bacteriocinas son producidas por LABs, las cuales se caracterizan por poseer mecanismos de transporte específicos para la liberación de las mismas<sup>110</sup>. Las bacteriocinas son antagonistas porque impiden o limitan la invasión de un microorganismo dentro de una comunidad microbiana establecida, desempeñando un papel importante en la mediación de la dinámica de las poblaciones microbianas<sup>111</sup>.

4.6.1 Clasificación de bacteriocinas. Se definen cuatro clases de bacteriocinas producidas por LABs<sup>112</sup>:

- Bacteriocinas clase I: lantibioticos
- Bacteriocinas clase II: pequeños péptidos hidrofóbicos termo-estables
- Bacteriocina clase III: largas proteínas, sensibles al calor

<sup>103</sup> VORAVUTHIKUNCHAI, S. P., BILASOI, S. & O. SUPAMALA. Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli. *Anaerobe*. 2006, 12: 221-226.

<sup>104</sup> SERVIN, A. L. Op cit. Pág. 31

<sup>105</sup> SALMINEN, S. & E. ISOLAURI. Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. *The Journal of Pediatrics*. 2006: S115-S120.

<sup>106</sup> CAPLICE, E. & G. F. FITZGARLD. Op cit. Pág. 32

<sup>107</sup> CHEN, H. & D. G. HOOVER. Op cit. Pág. 28

<sup>108</sup> EIJSINK, V. G. H., SKEIE. M., MIDDELHOVEN, H., BRURBERG, M. & I. NES. Comparative studies of Class II a bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, 64 (9): 3275 – 3281.

<sup>109</sup> TAGG, J. R., DAJANI, A. S. & L. W. WANNAMAKER. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriological Reviews*. 1976, 40 (3): 722-756.

<sup>110</sup> MUÑOZ, R. J. Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano. *Asociación Mexicana de Microbiología*. 2004: 1-20.

<sup>111</sup> JACK, R. W., TAGG, J. R. & B. RAY. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiological Reviews*. 1995, 59 (2): 171-200.

<sup>112</sup> KLAENHAMMER, T. R. Op cit. Pág. 28

- Bacteriocinas clase IV: proteínas complejas<sup>113,114</sup>

4.6.1.1 Bacteriocinas Clase I. También llamados lantibióticos, son pequeños péptidos con un peso molecular menor a 5 kDa<sup>115</sup>. Según Chen, *et al*, 2003, Klenhammer divide a esta clase de bacteriocinas en dos tipos, las de tipo A y las de tipo B, de acuerdo a su estructura química y su actividad antimicrobiana<sup>116</sup>. Los lantibióticos de tipo A son péptidos elongados en forma de hélice, forman poros en las membranas bacterianas; estos pueden subdividirse en dos subtipos, subtipo AI y el subtipo AII<sup>117</sup>. Los lantibióticos de tipo B, son pequeños péptidos globulares, con actividad antimicrobiana orientada a inhibir enzimas específicas<sup>118</sup>. En general, se puede decir que los lantibióticos, facilitan la entrada de agua lo cual incrementa la presión osmótica causando lisis celular, pero impiden el paso de componentes de alto peso molecular<sup>119,120</sup>.

4.6.1.2 Bacteriocinas Clase II. Son pequeños péptidos con un peso molecular menor de 10 kDa, se caracterizan por destruir la integridad de la membrana celular, formando poros que incrementan la permeabilidad de ésta y permiten la liberación de moléculas esenciales para la célula. Además, inhiben la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos<sup>121</sup>. Es el grupo de bacteriocinas más amplio y se divide en tres clases: La Clase IIa, incluye péptidos como la pediocina, que tiene una actividad anti-listeria, la Clase IIb contiene bacteriocinas conformadas por dos péptidos y la Clase IIc, son péptidos tiol activados<sup>122,123</sup>.

4.6.1.3 Bacteriocinas Clase III. Son proteínas termo-sensibles con peso molecular mayor a 30 kDa. Esta clase puede incluir enzimas bacteriolíticas (hemolisinas y muramidasa) que pueden imitar las actividades fisiológicas de las bacteriocinas<sup>124,125</sup>.

4.6.1.4 Bacteriocinas Clase IV. Chen, *et al*, 2003 reporta que fueron incluidas un año después de clasificar las bacteriocinas. Son las bacteriocinas más complejas, que poseen lípidos y carbohidratos en su estructura. Esta clase generalmente no es aceptada, puesto que incluyen bacteriocinas que no han sido purificadas<sup>126,127</sup>.

<sup>113</sup> CORSETTI, A. & L. SETTANNI. Lactobacilli in sourdough fermentation. Food Research International. 2006: 1–20

<sup>114</sup> OUWEHAND, A. C. Op cit. Pág. 27

<sup>115</sup> COCONIER, M. H., LIEVIN, V., HEMERY, E. & A. SERVIN Op cit. Pág. 28

<sup>116</sup> CHEN, H. & D. G. HOOVER. Op cit. Pág. 28

<sup>117</sup> BAREFOOT, S. F. & C. G. NETTLESS. Antibiosis Revisited: Bacteriocins produced by dairy starter cultures. Journal of Dairy Science. 1993, 76: 2366–2379.

<sup>118</sup> OUWEHAND, A. C. Op cit. Pág. 27

<sup>119</sup> CAPLICE, E. & G. F. FITZEGARLD. Op cit. Pág. 32

<sup>120</sup> ABEE, T. Pore forming bacteriocins of Gram positive bacteria and self protection mechanism of producer organism. FEMS Microbiology Letters. 1995, 129:1-10.

<sup>121</sup> ENNAHAR, S., SONOMOTO, K. & A. ISHIZAKI. Class II bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. Journal of Bioscience and Bioengineering. 199, 87 (6): 705–716.

<sup>122</sup> CHEN, H. & D. G. HOOVER. Op cit. Pág. 28

<sup>123</sup> EIJSINK, V. G. H., SKEIE, M., MIDDELHOVEN, H., BRURBERG, M. & I. NES. Op cit. Pág. 39

<sup>124</sup> OUWEHAND, A. C. Op cit. Pág. 27

<sup>125</sup> CHEN, H. & D. G. HOOVER. Op cit. Pág. 28

<sup>126</sup> CAPLICE, E. & G. F. FITZEGARLD. Op cit. Pág. 32

<sup>127</sup> OUWEHAND, A. C. Op cit. Pág. 27

Aunque esta clase de bacteriocinas se ha considerado compleja, Franz, *et al*, 2007, proponen una nueva clasificación de este grupo dirigido a las bacteriocinas producidas por el grupo de los enterococos, organizándolo de la siguiente manera: 1) lantibioticos como la citolisina, 2) Clase IIa como la enterocina A, 3) Clase IIb como la enterocina L50A, Clase IIc como enterocina B, propone una Clase IIc en la que ubica a enterocina AS-48 y 4) Clase IV como la enterolisina A. Esta clasificación la realizan teniendo en cuenta diferencias tanto estructurales como diferencias en las secuencias de aminoácidos<sup>128</sup>.

#### 4.7 BACTERIOCINAS DE LABs PROBIOTICAS

Los lactobacilos, tanto homofermentativos como heterofermentativos se han caracterizado por producir sustancias antimicrobianas como bacteriocinas que poseen un amplio espectro de actividad<sup>129,130</sup>. No todas han sido identificadas, caracterizadas y purificadas. Muchas de estas bacteriocinas producidas por lactobacilos han sido aisladas como macromoléculas, proteínas lipídicas complejas<sup>131</sup>.

A continuación en la tabla 1 se resumen las bacterias lácticas que producen bacteriocinas contra algunos patógenos o contra estas mismas.

---

<sup>128</sup> FRANZ, C. M., van BELBUM, M. J., HOLZAPFEL, W. H., ABRIQUEL, H. & A. GALVEZ. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. FEMS Microbiological Reviews. 2007: 1-17.

<sup>129</sup> TAGG, J. R., DAJANI, A. S. & L. W. WANNAMAKER. Op cit. Pág. 39

<sup>130</sup> OUWEHAND, A. C. Op cit. Pág. 27

<sup>131</sup> JACK, R. W., TAGG, J. R. & B. RAY. Op cit. Pág. 39

Tabla 1. Bacteriocinas producidas por LABs

Bacteriocinas	Cepa productora	Espectro de inhibición
Lantibióticos Clase I – Tipo A		
Nisina (3488 Da)	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Micrococcus luteus</i>
Lactocina (3769 Da)	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Lacticina (2300 Da)	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>
Clase IIa		
Sakacina A (4308 Da)	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Sakacina P	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Salmonella anatum</i>
Clase IIb		
Lactococcina K	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Helicobacter pylori</i>
Lactacina (6300 Da)	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Salmonella</i> sp <i>Escherichia</i> sp <i>Staphylococcus</i> sp
Plantaricina A (3500 Da)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bacillus cereus</i>
Plantaricina S		<i>Clostridium perfringens</i>
Plantaricina EF		<i>Listeria monocytogenes</i>
Plantaricina JK		
Clase IIc		
Acidocina B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus</i> sp <i>Candida</i> sp <i>Fusarium</i> sp
Clase III		
Helveticina J (37kDa)	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus delbruekii</i>

Fuente: Chen *et al*, 2003, Vanderberg 1993, Cezar Fontana, *et al*, 2006, Mauriello *et al*, 2005, Guinane *et al*, 2005, Michetti *et al*, 1999, Piard *et al*, 1992, Kim *et al*, 2006, Chumchalova *et al*, 2004, Barefoot *et al*, 1983

#### 4.8 ESPECTRO DE ACTIVIDAD O RANGO DE ACCIÓN DE BACTERIOCINAS

El bajo peso molecular de las bacteriocinas de bacterias Gram positivas, demuestra que la actividad bactericida esta dirigida principalmente a atacar a otras bacterias Gram positivas, pero que también pueden atacar Gram negativas<sup>132,133</sup>. La actividad bacteriocinogénica puede presentar las siguientes características:

- 1) Algunas cepas y especies pueden ser sensibles y otras ser más resistentes a una bacteriocina particular.
- 2) Una cepa que parece ser sensible a la bacteriocina, también puede tener algunas células en su población que sean resistentes<sup>134</sup>.
- 3)

<sup>132</sup> JACK, R. W., TAGG, J. R. & B. RAY. Op cit. Pág. 39

<sup>133</sup> CHEN, H. & D. G. HOOVER. Op cit. Pág. 28

<sup>134</sup> EIJSINK, V. G. H., SKEIE. M., MIDDELHOVEN, H., BRURBERG, M. & I. NES. Op cit. Pág. 39



Una cepa puede ser sensible a la acción de una bacteriocina y ser resistente a una bacteriocina similar. 4) Las células productoras de una bacteriocina, pueden ser sensibles a otra bacteriocina producida por otra célula<sup>135</sup>. 5) Las bacterias pueden ser sensibles a una bacteriocina, pero su espora es resistente, propiedad que se pierde en el momento de la germinación<sup>136</sup>.

Las bacterias Gram negativas, no son sensibles a las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas; aunque *L. acidophilus*, *B. cereus*, algunos estreptococos y estafilococos, inhiben Gram negativas, lo que sugiere una asociación con la membrana celular de la Gram negativa, que se convierte en el blanco de acción. Lo anterior se explica porque las bacteriocinas de estas bacterias, interactúan con las cargas negativas de la membrana aumentando así la conductividad de ésta, y haciéndole perder la capacidad hidrofóbica que le permite el paso de moléculas hacia el citoplasma y la disminución de la fuerza protón motriz que conlleva a la disminución del transporte de aminoácidos y del pH intracelular<sup>137,138</sup>.

#### 4.9 GENÉTICA Y BIOSÍNTESIS DE BACTERIOCINAS

Como todas las proteínas las bacteriocinas son sintetizadas en los ribosomas, los genes que codifican para la producción y la inmunidad intrínseca bacteriana de las bacteriocinas, están organizados usualmente en grupos de operones, los cuales contienen genes que codifican para formar un pre-péptido. Algunas bacteriocinas como plantaricinas, carnobacteriocinas y sakacinas, presentan su síntesis en un grupo de genes localizados en el cromosoma bacteriano, así como la subtilina y mesarcidina, otros genes se localizan en plásmidos como los de divergicina A y sakacina y otros en transposones, como los de nisina y lacticina 481<sup>139</sup>. La producción de bacteriocinas por plásmidos ha mostrado que estos a su vez le confieren a la cepa inmunidad. Entre los plásmidos de bacteriocinas más comunes podemos encontrar el p9B4-6, que le confiere a *L. lactis* inmunidad a las lactococinas que esta produce, además de resistencia a fagos y la actividad de proteinasas. Otro plásmido, es el que produce a la pediocina PA-1, conocido como pSRQ11, que brinda inmunidad contra esta, pero no le confiere resistencia a la  $\alpha$ -amilasa. La producción de pediocina AcH ha sido ligada a un plásmido de 9.4 Kb conocido como pSMB74 encontrado en un gran número de cepas de *Pediococcus acidilactici* de uso industrial. El género lactobacillus involucra la producción de bacteriocinas con un plásmido de 15.8 Kb conocido como pLA103<sup>140,141</sup>.

<sup>135</sup> TAGG, J. R., DAJANI, A. S. & L. W. WANNAMAKER. Op cit. Pág. 39

<sup>136</sup> ABEE, T. Op cit. Pág. 40

<sup>137</sup> ENNAHAR, S., SONOMOTO, K. & A. ISHIZAKI. Op cit. Pág. 40

<sup>138</sup> JACK, R. W., TAGG, J. R. & B. RAY. Op cit. Pág. 39

<sup>139</sup> CHEN, H. & D. G. HOOVER. Op cit. Pág. 28

<sup>140</sup> KLAENHAMMER, T. R. Op cit. Pág. 28

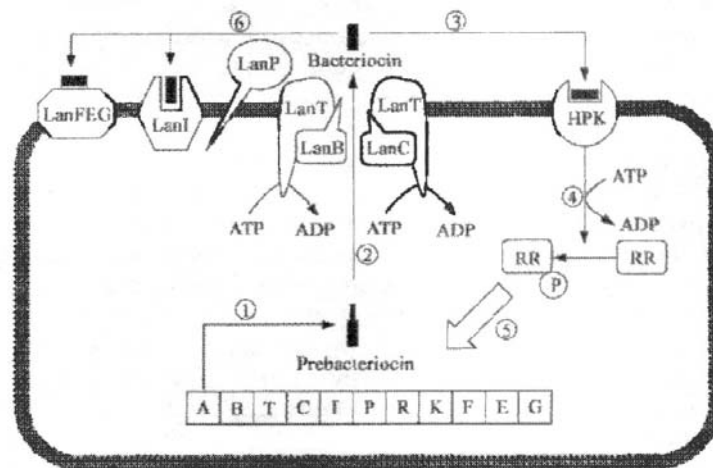
<sup>141</sup> NES, I. F., DIEP, D. B., HAVARSTEIN, L. S., BRUEBERG, M. B., EIJSINK, V. & H. HOLO. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 1996, 70: 113–1280.

#### 4.10 BIOSÍNTESIS DE LAS BACTERIOCINAS

Actualmente se han descrito algunos modelos que explican como se producen las bacteriocinas del tipo L-lantibióticos y de la Clase II, sin embargo aún no es claro el mecanismo por el cual se biosintetizan las bacteriocinas de la Clase III y de la Clase IV.

Muchas bacteriocinas son sintetizadas como un pre-péptido biológicamente inactivo, que llevan un péptido líder en su extremo N-terminal unido a un pro-péptido C-terminal<sup>142</sup>. Basándose en la ruta biosintética y en la organización genética los lantibióticos, se clasifican en dos grupos: I y II. La ruta biosintética de los lantibióticos sigue un esquema general, donde ocurre formación de pre-péptido, reacciones de modificación, clivaje proteolítico del péptido principal y la translocación del pre-péptido modificado o pro-péptido maduro a través de la membrana citoplasmática. El clivaje del péptido principal puede tener lugar antes, durante o después de la exportación en la célula<sup>143,144</sup>. Ver Figura 1.

Figura 1. Diagrama de la biosíntesis de Lantibióticos. (Tomado de Chen *et al*, 2003).



1) Formación de pre-bacteriocina; 2) La pre-bacteriocina es modificada por LanB y LanC, llevándola hacia un transportador-ABC LanT y procesada por LanP, resultando en la obtención de la bacteriocina madura; 3) La proteína histidina quinasa (HPK) detecta la presencia de la bacteriocina y la autofosforila; 4) El grupo fosforil (P) es subsecuentemente transferido al regulador de respuestas (RR); 5) RR activa la transcripción de los genes reguladores; y 6) Producen inmunidad mediada por proteínas inmunes, LanI, y proteínas dedicadas al transporte-ABC, LanFEG

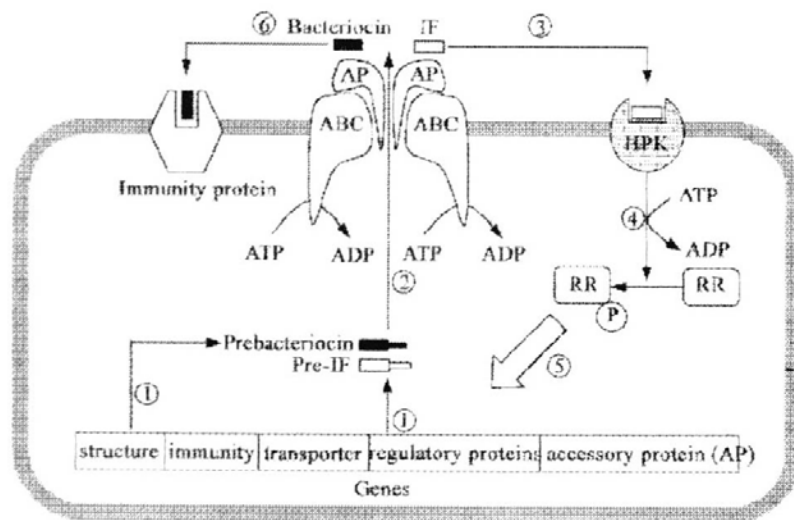
<sup>142</sup> CHEN, H. & D. G. HOOVER. Op cit. Pág. 28

<sup>143</sup> NES, I. F., DIEP, D. B., HAVARSTEIN, L. S., BRUEBERG, M. B., EIJSINK, V. & H. HOLO. Op cit. Pág. 43

<sup>144</sup> KLAENHAMMER, T. R. Op cit. Pág. 28

Las bacteriocinas de la Clase II son sintetizadas como un pre-péptido, el cual contiene un extremo líder amino terminal conservado y un sitio de procesamiento proteolítico caracterizado por dos glicinas, con la excepción de bacteriocinas Clase IIc, las cuales son producidas con una secuencia señal N-terminal típica del tipo-sec y son procesadas y secretadas por medio de la ruta general de secreción<sup>145</sup>. A diferencia de los lantibióticos, las bacteriocinas de la Clase II no sufren una modificación post-traduccional significativa. Seguida a la formación del pre-péptido que es procesado para remover el péptido líder o principal, ayudado por transportadores ABC y proteínas accesorias<sup>146,147</sup> (Figura. 2)

Figura 2. Diagrama de la biosíntesis de bacteriocinas Clase II (Tomado de Chen et al, 2003).



1) Formación de pre-bacteriocina y pre-péptido de factor de inducción (IF); 2) La pre-bacteriocina y pre-IF son procesados y movilizadas por el transportador-ABC, resultando en la obtención de la bacteriocina madura y el IF; 3) La proteína histidina quinasa (HPK) detecta la presencia del IF y autofosforila; 4) El grupo fosforil (P) es subsecuentemente transferido al regulador de respuestas (RR); 5) RR activa la transcripción de los genes reguladores; y 6) Se produce inmunidad

<sup>145</sup> ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K. & A. ISHIZAKI. Op cit. Pág. 40

<sup>146</sup> CHEN, H. & D. G. HOOVER. Op cit. Pág 28

<sup>147</sup> KLAENHAMMER, T. R. Op cit. Pág. 28

#### 4.11 MECANISMOS DE RESISTENCIA E INMUNIDAD DE LAS BACTERIOCINAS

Las cepas productoras de bacteriocinas necesitan protegerse a sí mismas de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas que producen, es por eso que han desarrollado diferentes tipos de protección<sup>148</sup>:

- Inmunidad: son capaces de producir una lipoproteína, que es insertada en la membrana celular y que permite cerrar los poros formados por su propia bacteriocina.
- Resistencia genética no enlazada a la producción o de tipo natural.
- Mutación-resistencia: la resistencia puede ser adquirida cuando hay presencia de la bacteriocina. Esta puede diferir de una cepa a otra. La mutación se puede presentar cuando hay absorción o inserción de la bacteriocina en la membrana.

La inmunidad de los lantibióticos ha sido bien definida. La protección puede ser mediada por proteínas de inmunidad LanI y LanIFEG. Estos dos sistemas trabajan en conjunto para proteger a la célula de su propia bacteriocina. LanI previene la formación de poros en la membrana celular y LanIFEG al parecer produce unas moléculas que se adhieren a la membrana celular que guardan la bacteriocina. Para las bacteriocinas de Clase II la inmunidad esta codificada en genes que expresan proteínas de varios pesos moleculares asociadas con la membrana citoplasmática<sup>149</sup>.

#### 4.12 APLICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

Se han descrito varias aplicaciones de las bacteriocinas obtenidas a partir de bacterias lácticas, principalmente en el campo de la industria de alimentos y en el campo biomédico, como complementos de antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas o como agentes antivirales<sup>150</sup>.

4.12.1 Aplicaciones industriales. Las bacteriocinas de las LABs, pueden ser consideradas como un preservante o biopreservante natural. La biopreservación hace referencia al uso de productos metabólicos que inhiben o destruyen microorganismos indeseados en alimentos, por lo tanto su aprovechamiento se basa en las LABs capaces de producir bacteriocinas, la adición de estas purificadas o semipurificadas en los alimentos, y el uso de la cepa productora de la bacteriocina como un ingrediente en el procesamiento de alimentos previamente fermentados<sup>151,152</sup>.

---

<sup>148</sup> OUWEHAND, A. C. Op cit. Pág. 27

<sup>149</sup> CHEN, H. & D. G. HOOVER. Op cit. Pág. 28

<sup>150</sup> GUINANE, C. M., COTTER, P. D., HILL, C. & R. P. ROSS. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology*. 2005, 98: 1316 – 1325.

<sup>151</sup> MUÑOZ, R. J. Op cit. Pág. 39

<sup>152</sup> GUINANE, C. M., COTTER, P. D., HILL, C. & R. P. ROSS. Op cit. Pág. 46

La bacteriocina mas importante en este campo ha sido la nisina, la cual es adicionada a productos cárnicos como salchichas, carne de búfalo, salami, pollo y productos lácteos como la leche descremada, que son sensibles a contaminación por *L. monocytogenes*. Otra bacteriocina de importancia industrial es la lactocina 3147, que se utiliza en la industria de queso cheddar, ya que aumenta la calidad del producto y reduce el número de bacterias contaminantes<sup>153</sup>.

4.12.1 Aplicaciones biomédicas. Se consideran drogas diseñadas, cuyos blancos son bacterias patógenas. El desarrollo y uso de estos antimicrobianos permite su utilización con más frecuencia que los convencionales, aumentando el número de drogas farmacéuticas, y generando así nuevas alternativas terapéuticas. Desde el punto de vista biológico esta competencia bajará el uso de los antibióticos sintéticos, posibilitando su espectro de tratamiento lo cual conllevara a una reducción en la intensidad de la selección de resistencia. Desde el punto de vista ecológico y evolutivo, el uso de estos antimicrobianos representa un redireccionamiento de la abundancia de los patógenos bacterianos multiresistentes<sup>154</sup>.

#### 4.13 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

Las proteínas de tipo bacteriocinas se comportan como macromoléculas de bajo peso molecular, permitiendo su fácil detección y extracción con técnicas convencionales analíticas, entre las cuales tenemos:

4.13.1 Precipitación con solventes. La precipitación de proteínas es el método más eficaz y rápido, depende de la interacción física y química entre la proteína y el agente precipitante, por lo tanto es importante desarrollar una técnica apropiada para obtener proteínas de alta calidad, sin que el agente cause denaturación o degradación de las proteínas de interés. Los solventes que se utilizan para la precipitación se caracterizan por no reaccionar o cambiar las propiedades biológicas de las proteínas que se están precipitando. Este tipo de precipitación, generalmente va acompañado de centrifugación, ya que dicho método permite obtener la proteína en forma concentrada o "pellet"<sup>155</sup>. Otros métodos importantes son aquellos que utilizan técnicas de ultrafiltración y diálisis.

4.13.2 Cromatografía. Las proteínas pueden ser purificadas por varias técnicas, tales como la cromatografía, la cual es una técnica de separación que se basa en las diferencias de movilidad de los componentes de una mezcla (solutos), como consecuencia de las fuerzas que se establecen entre cada uno de ellos. Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero todas ellas constan de dos fases, la móvil, que consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) y la

---

<sup>153</sup> CHEN, H. & D. G. HOOVER. Op cit. Pág. 28

<sup>154</sup> MUÑOZ, R. J. Op cit. Pág. 39

<sup>155</sup> LEROY, E., HOOD, L.E. & N.R. AEBERSOLD. Current Protocols in protein science. By Jhon Wiley & son's 2003, pp 1500.

estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. Las proteínas se desplazan a lo largo de una matriz sólida porosa, teniendo en cuenta las propiedades que se establezcan para poder ser separadas, como es el peso molecular y la carga eléctrica, entre otras. Es por esto, que esta técnica se ha convertido en el principal método de separación de especies químicas relacionadas entre sí, permitiendo la identificación tanto cualitativa como cuantitativa de dichas sustancias<sup>156</sup>. Teniendo en cuenta esto, existen varios tipos de cromatografía entre las cuales tenemos las cromatografía de: afinidad e inmunoafinidad, de intercambio iónico, líquida, y de exclusión de tamaño.

4.13.2.1 Cromatografía de exclusión de tamaño. Es también conocida como cromatografía de filtración en gel, es una técnica que se emplea para determinar el peso molecular de las proteínas y a la vez permite su separación o fraccionamiento. Se realiza empleando matrices (fase estacionaria) que contienen esferas porosas, que permiten que el buffer y las proteínas (fase móvil) migren a través de la columna. Esta matriz suele ser de dextrano polimérico denominado Sephadex y se caracteriza por ser hidrofílico, lo que le permite empaquetarse más fácilmente en la columna cromatográfica<sup>157</sup>.

Físicamente, la separación se produce cuando la mezcla disuelta en la fase móvil fluye a través de la fase estacionaria y se encuentra con los poros del gel. En esta fase, las moléculas más grandes no pueden entrar por esos poros y por tanto pasan por la columna a través del espacio vacío entre las partículas de gel, lo cual se denomina volumen muerto de la columna. Las moléculas pequeñas si pueden entrar por esos poros, por medio de los micro canales de cada partícula del gel recorriendo un camino mayor y retrasándose respecto a las moléculas de mayor tamaño<sup>158</sup>. Finalmente, estas moléculas son detectadas por un monitor UV y las fracciones son colectadas para su posterior análisis<sup>159</sup>.

El límite de exclusión de las proteínas a purificar, depende del poro de la matriz, ya que es éste el que permite que las proteínas penetren y atraviesen la columna y la separe por diferencias de peso molecular. La calidad del fraccionamiento de las proteínas depende del tamaño de la columna y el tipo de matriz utilizado en ella, con una columna larga y una matriz de poro grande se incrementará la distancia entre las proteínas pequeñas, por lo tanto también se incrementará la resolución de este sistema. Una columna pequeña, aumentará la distancia entre las proteínas<sup>160</sup>.

---

<sup>156</sup> AMERSHAN BIOSCIENCES. Gel Filtration: Principles and Methods. Amershan Biosciences 18-1022-18. 2002, URL: [www.chromatography.amershambiosciences.com](http://www.chromatography.amershambiosciences.com)

<sup>157</sup> Ibid

<sup>158</sup> WEN, J., ARAKAWA, T. & J. S. PHILO. Size exclusion chromatography with in line light scattering, absorbance, and refractive index detectors for studying proteins and their interactions. *Analytical Biochemistry*. 1996, 240: 155-166.

<sup>159</sup> LEROY, E., HOOD, L.E. & N.R. AEBERSOLD. Op. cit. Pág. 47

<sup>160</sup> AMERSHAN BIOSCIENCES. Op cit. Pág 48

Las matrices más frecuentemente utilizadas son de dextrano, poliacrilamida o agarosa. Los dextranos y la poliacrilamida separan proteínas de pequeños a moderados pesos moleculares, mientras que las matrices de agarosa poseen poros grandes que separan proteínas de mayor tamaño y complejas. Estas matrices se empaquetan en columnas, de las cuales depende la cantidad de volumen de la matriz que se necesita para procesar una muestra. Estas columnas varían en talla y sofisticación, pueden ser desde pipetas pasteur, hasta cilindros de vidrio de alto funcionamiento; esto depende de la aplicación que se le quiera dar, además estos cilindros permiten empaquetar la gran variedad de matrices que existen para esta técnica como el Sephadex, el Bio-Gel, Sephacril, Superdex y Sepharosa<sup>161, 162</sup>.

---

<sup>161</sup> AMERSHAN BIOSCIENCES. Op cit. Pág. 48

<sup>162</sup> WEN, J., ARAKAWA, T. & J. S. PHILO. Op cit. Pág 48

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nariño y el Laboratorio de Genética y Bioquímica de Microorganismos de la Corporación para Investigaciones Biológicas CIB- Medellín.

### 5.1 COLECCIÓN BACTERIANA

Inicialmente se utilizaron diecisiete preservados criogénicos de bacterias lácticas (LABs) de las cuales se seleccionaron nueve, donadas por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nariño, que se obtuvieron en el estudio “Caracterización de la microbiota láctica gástrica asociada a gastritis crónica”. Además, se utilizó una cepa industrial de origen lechero (UN014), un preservado criogénico de *H. pylori cagA(-)*, cepa de referencia ATCC 51932, donada por el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Valle y una cepa de *E. coli*, donada por la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Corporación para Investigaciones Biológicas CIB. Ver Tabla 2.

Tabla 2. Lista de especies y cepas utilizadas en esta investigación

Bacteria	Cód. Procedencia	Cód. Investigación
<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i>	PRO	UN 001
<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i>	LB 062	UN 002
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	LB 009	UN 003
<i>Lactobacillus</i> sp	LB 012	UN 004
<i>Lactobacillus salivarius</i>	LB 019	UN 005
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	IL 6177	UN 006
<i>Lactobacillus pentosus</i>	LB 072	UN 007
<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i>	IL 6188	UN 013
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	LB 038	UN 011
<i>Lactobacillus</i> sp	LB 034	UN 010A
<i>Lactobacillus</i> sp	LB 007	UN 010B
<i>Lactobacillus</i> sp	LB 045	UN 010C
<i>Lactobacillus</i> sp	LB 011	UN 010D
<i>Lactobacillus</i> sp	LB 009	UN 010E
<i>Lactobacillus</i> sp	LB 019	UN 010F
<i>Lactobacillus</i> sp	LB 075	UN 010G
<i>Lactobacillus casei</i>	-	UN 014
<i>Escherichia coli</i>	-	DA5L
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 51932	-	ATCC 51932



## 5.2 MEDIOS DE CULTIVO

Con el fin de permitir el crecimiento de los microorganismos utilizados en la investigación, se utilizaron dos medios de cultivo así: para la propagación de LABs se empleó agar y caldo MRS Diffco<sup>®</sup> (De Man Rogosa and Sharpe). Para el crecimiento de *H. pylori*<sup>163</sup> y cocultivos con LABs se empleó agar base columbia BBL<sup>®</sup> suplementado con sangre de cordero. (Tabla 3 y 4).

Tabla 3. Composición Caldo MRS (Diffco<sup>®</sup>)

Compenente	Cantidad
peptona de proteosa no 3	10 g
extracto de res	10 g
extracto de levadura	5 g
dextrosa	20 g
polisorbato 80	1 g
citrato de amonio	2 g
acetato de sodio	5 g
sulfato de magnesio	0,1g
sulfato de manganeso	0,05 g
fosfato dipotásico	2 g

El mismo medio contiene 15 gramos de agar para medio sólido, se suplementa con azul de anilina (0,2g/10 mL agua), de esta solución se adiciona 3 mL para un litro de medio.

Tabla 4. Composición agar base columbia

Componente	Cantidad
caseína digerida	12 g
tejido animal	5 g
extracto de levadura	3 g
extracto de carne bovina	3 g
Almidón	1 g
cloruro de sodio	5 g
agar	13,5 g

Se le adiciona 40 mL de sangre de cordero desfibrinada a 500 mL de medio de cultivo.

<sup>163</sup> FRESNADILLO, M. F., RODRIGUEZ, M., BLAZQUEZ, A. M., GARCIA, E., GARCIA, J. E., TRUJILLO, I., CORDERO, M., ALVAREZ, P., PAZ, J. & J. A. GARCIA. Comparative evaluation of selective and nonselective media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. *Helicobacter*. 1997, 2(1): 36-39.

Tabla 4a. Composición caldo tioglicolato

Componente	Cantidad
α- cistina	0,5 g
cloruro de sodio	2,5 g
glucosa	5,5 g
extracto de levadura	5 g
digerido pancreático de caseína	15 g
tioglicolato de sodio	6,5 g

## 5.5 ACTIVACIÓN, VERIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE BACTERIAS

5.3.1 Activación de LABs. Las cepas se activaron a partir de preservados criogénicos conservados en nitrógeno líquido a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para ello se realizó el siguiente procedimiento: se tomó 1 mL con una micropipeta BRAND<sup>®</sup> calibrada, se inoculó directamente en 40 mL de caldo MRS Diffco<sup>®</sup> dentro de una cabina de flujo laminar tipo II, y se incubó por un periodo de 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en una incubadora LAB-LINE<sup>®</sup> Imperial III.

Al cabo de este tiempo, se tomaron 4 mL de este cultivo y se inocularon en 40 mL del mismo medio, la incubación se realizó en iguales condiciones a las descritas anteriormente, este paso se realizó con el fin de garantizar la completa activación de la cepa<sup>164, 165</sup>.

5.3.1.2 Activación de la cepa industrial *L. casei* UN 014. Se tomó 1 mL de la bebida láctica con una micropipeta y se inoculó directamente en 9 mL de caldo MRS Diffco<sup>®</sup> dentro de una cabina de flujo laminar tipo II. A partir de esta dilución se realizaron tres diluciones seriadas empleando la misma relación (9:1) y posteriormente se incubaron por un periodo de 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en una incubadora LAB-LINE<sup>®</sup> Imperial III. Al cabo de este tiempo se tomó 1 mL de la dilución  $10^{-3}$  y se inoculó en el mismo medio, incubándose en las mismas condiciones antes mencionadas. Este paso se realizó para garantizar la completa activación de la cepa.

5.3.2 Verificación de pureza de LABs. La pureza de cada aislado se determinó mediante observación macroscópica a través del cultivo en agar MRS Diffco<sup>®</sup> suplementado con 3 mL de azul de anilina e incubación por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y posterior observación microscópica por medio de la coloración de Gram<sup>166, 167</sup>.

<sup>164</sup> MONTES, A., SANTACRUZ, A., SAÑUDO, A. & A, PAZOS. Op cit. Pág. 28

<sup>165</sup> PAZOS, A. Activación de bacterias lácticas. Bases Experimentales en Biotecnología. Universidad de Nariño, 2001.

<sup>166</sup> SNEATH, P. & J. G. HOLT. Op cit. Pág. 37

<sup>167</sup> PAZOS, A. Op cit. Pág. 52

5.3.3 Conservación de LABs. Con el objetivo de evitar la contaminación de las cepas activadas y mantener una colección de base, se procedió a conservarlas en criotubos Nunc<sup>®</sup> y en tubos de agar inclinado MRS glucosa al 5%.

5.3.3.1 Conservación en tubos Nunc. A partir de cepas crecidas en caldo MRS, se tomaron 750 µL y se colocaron en un tubo Nunc de 2 mL previamente esterilizado, a cada tubo se le adicionaron 250 µL de glicerol estéril. Se llevaron a conservación a -20°C<sup>168</sup>.

5.3.3.2 Conservación en tubos de agar MRS glucosa modificado. El medio MRS convencional posee en sus componentes glucosa a una concentración del 20%, para procesos de conservación es necesario bajar dicha concentración al 5%. De las cepas que se encontraban en agar MRS suplementado con azul de anilina se tomó una colonia con asa de argolla y se sembró por estría en el tendido del tubo. Se incubó a 37°C por 24 horas. Finalmente, se sellaron con papel parafilm y se guardaron a 4°C<sup>169</sup>.

5.3.4 Activación de *H. pylori*. De la cepa de *H. pylori cagA(-)*, ATCC 51932 preservada a -70°C en nitrógeno líquido, se tomó todo su contenido con una micropipeta BRAND<sup>®</sup> para evitar contaminación, este volumen era de aproximadamente 200 µL. Se inoculó directamente en 16 mL de caldo tioglicolato Oxoid<sup>®</sup> suplementado con suero bovino fetal Hyclone<sup>®</sup> (BSA) al 20%. Posteriormente, con asa de argolla se hizo un barrido del tubo que contenía el preservado y se sembró en agar base columbia BBL<sup>®</sup>, suplementado con sangre de cordero desfibrinada al 8%<sup>170</sup>.

Tanto las cajas como el cultivo líquido, se incubaron a 37°C en jarras de anaerobiosis con ambiente microaerofílico obtenido con Campypack BBL<sup>®</sup> por un periodo de 48 a 72 horas, en una incubadora LAB-LINE<sup>171</sup>.

5.3.4.1 Verificación de pureza de *H. pylori*. La pureza del aislado se determinó mediante el cultivo en agar base columbia suplementado con sangre de cordero desfibrinada al 8%. Posteriormente se realizó la observación microscópica a través de coloración de Gram y pruebas bioquímicas confirmativas como la de urea, catalasa y oxidasa.<sup>172,173</sup>

---

<sup>168</sup> PAZOS, A. Conservación de bacterias lácticas. Bases Experimentales en Biotecnología. Universidad de Nariño. 2001.

<sup>169</sup> Ibid

<sup>170</sup> MONTES, A., SANTACRUZ, A., SAÑUDO, A. & A, PAZOS. Op cit. Pág. 28

<sup>171</sup> Ibid

<sup>172</sup> MONTES, A., SANTACRUZ, A., SAÑUDO, A. & A, PAZOS. Op cit. Pág. 28

<sup>173</sup> HIRSCHL, A. M. Op cit. Pág. 37

## 5.6 COCULTIVOS DE LABs CON *H. pylori* In Vitro

5.4.1 Preparación del medio. Para cultivar las LABs se utilizó MRS. *H. pylori* creció en caldo tioglicolato. Para realizar el cocultivo se utilizaron cajas de agar base columbia suplementadas con sangre de cordero defibrinada al 8%.

5.4.2 Preparación de las cepas. Las LABs se cultivaron en 10 mL de caldo MRS y se incubaron por 24 horas a 37°C, pasado este tiempo se estandarizó un conteo de células en el cultivo a través de escala de coloración Mc Farland, llevándolo a una concentración de  $30 \times 10^8$  células/mL.

*H. pylori* se cultivo en 7 mL de caldo tioglicolato y se incubó por 24 horas a 37°C, pasado este tiempo se estandarizó un conteo de células en el cultivo a través de cámara de Newbahuer, llevándolo a una concentración de  $5 \times 10^8$  células/mL.

5.4.3 Siembra de *H. pylori* y preparación de las cajas de cocultivo. Una vez activada la cepa se inocularon 200  $\mu$ L del cultivo y se homogenizó con perlas de vidrio estériles. Posterior a esto, se procedió a perforar el agar con un tubo de vidrio estéril de 7 mm de diámetro entre 1 y 3 pozos por caja.

5.4.4 Siembra de LABs en los pozos. Una vez abiertos los pozos se procedió a servirlos con 200  $\mu$ L de LABs cultivadas con una concentración de  $5 \times 10^8$  células/mL. Para el control negativo del medio de cultivo, se utilizaron pozos con 200  $\mu$ L de caldo MRS estéril. Finalmente, las cajas se llevaron a incubación a 37°C por 24 horas en ambiente miroaerofílico.

5.4.5 Medida de halos de inhibición. Al cabo de este tiempo se evaluó la presencia o ausencia de halos de inhibición, de los cuales se midió el diámetro con una regla para medir antibiogramas. El diámetro del pozo tenía una medida de 0,7 cm, la medida del diámetro se tomó desde el centro del pozo hasta el borde del halo. Posteriormente estas medidas se sometieron a un tratamiento estadístico.

## 5.5 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE LAS LABs

Inicialmente se probaron dos técnicas analíticas no degradativas, con el fin de conocer cual de ellas permitía una mejor obtención de proteínas tanto en cantidad como en calidad.

5.5.1 Extracción de proteínas con fenol. Se cultivaron cepas de las LABs en 25 mL de caldo MRS a 37°C por 24 horas. Pasado este tiempo se centrifugó a 8.500 rpm por 15 minutos a 4°C en una centrifuga Eppendorf 5804 con el fin de precipitar las células bacterianas. Al sobrenadante se le adicionó 10 mL de fenol equilibrado con Tris HCl pH 8 y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. Se tomó con una micropipeta de 200  $\mu$ L calibrada la interfase y se le

adicionó 10 mL de etanol al 70%. Nuevamente se centrifugó. De este proceso se obtuvo un “*pellet*”, el cual se resuspendió en 1 ml de agua desionizada estéril.

5.5.2 Extracción de proteínas con ácido tricloroacético (*Trichloroacetic acid, TCA*). Las LABs se cultivaron en 100 mL de caldo MRS a 37°C por 24 horas. Pasado este tiempo se procedió a realizar la extracción de células de todas las cepas para lo cual, de cada una de ellas se tomaron 4 volúmenes de 25 mL de cultivo por separado (total 100 mL) y se centrifugaron a 8.500 rpm por 15 minutos a 4°C en una centrifuga Eppendorf 5804. Se recuperó el sobrenadante en tubos cónicos Falcon® de 50 mL y el precipitado de células se desechó. A los 25 mL de sobrenadante se le adicionó TCA Merck® a una concentración final del 5% y se centrifugó en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Al cabo de ese tiempo se descartó el sobrenadante y se recuperó el “*pellet*”, el cual se lavó con 3 mL de agua desionizada y 7 mL de etanol al 70% y se resuspendió en un volumen final de 1 mL con PMSF 1 mM y EDTA 10 mM. Para finalmente ser congelado a -20°C y liofilizado <sup>174, 175, 176</sup>.

## 5.7 MONITOREO DE LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

5.6.1 Cuantificación por el método de Bradford. Inicialmente se construyó un estándar de calibración de absorbancia en función de la concentración de proteínas, preparando una serie de diluciones en agua desionizada estéril del estándar proteico BSA (albúmina de suero bovino) cuyas concentraciones estuvieron entre 2, 4, 6, 8 y 10 mg/mL y, entre 5 y 40 mg/mL. Anexo A.

Se realizaron diluciones de las proteínas problema para que su concentración estuviera entre los límites del patrón. En un vial de 1.5 mL se realizó la siguiente preparación, dependiendo de la dilución de la proteína solubilizada que se quería conocer. Ver Tabla 5.

Tabla 5. Diluciones proteína solubilizada

Dilución	Vol. muestra (μL)	Vol. agua (μL)	Vol. Bradford μL)
1/10	100,0	700,0	200
1/20	50,0	750,0	200
1/50	20,0	780,0	200
1/100	10,0	790,0	200
1/150	6,6	793,4	200
1/200	5,0	795,0	200

<sup>174</sup> YANG, R., JHONSON, M. C. & B. RAY. Novel Method to Extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, 58 (10): 3355 – 3359.

<sup>175</sup> CALDWELL, R. B. & C. T. LATTEMANN. Simple and reliable method to precipitate proteins from bacterial culture supernatant. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, 70 (1): 610 – 612.

<sup>176</sup> WESSEL, D. & U. I. FLUGGE. Protein precipitation methods to concentrate or eliminate interferences before electrophoresis or proteins determination. *Analytical Biochemistry*. 1984, 138: 141 – 143.

Se homogenizó el contenido de cada vial, se agregaron 200 µl en cada pozo del plato de lectura y se midió la absorbancia en un Microplate reader Model 680X a 595 nm. Finalmente, con la regresión lineal del estándar se calculó la concentración de proteínas en las muestras. Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado<sup>177</sup>.

5.6.2 Electroforesis monodimensional de proteínas. La proteínas se sometieron a electroforesis monodimensional SDS–PAGE (sodio dodecil sulfato en gel de poliacrilamida) al 12% en una cámara electroforética Mini Protean II Bio-Rad®. El procedimiento llevado a cabo fue el siguiente:

Previa limpieza de los vidrios de la cámara con etanol al 70%, se dispuso entre ellos los separadores, se colocó en el soporte, se marcó los vidrios a 2 cm desde el borde superior del vidrio pequeño y se les agregó la preparación del gel separador al 12% de poliacrilamida. Ver tabla 6. Posteriormente se agregó agua hasta la marca para evitar que la superficie del gel quede rugosa y se dejó polimerizar por 30 minutos. Pasado este tiempo se retiró el exceso de agua y se adicionó sobre el gel separador la solución de poliacrilamida al 4% del gel concentrador. Ver tabla 7. Se colocó el peine y se dejó polimerizar, se depositaron las muestras en una proporción de concentración 5:1 (5 µL de muestra por 1 µL de tampón carga), antes de servirla se calentó a 100°C por 5 minutos. El gel se colocó dentro de la cámara de electroforesis, se le adicionó tampón de corrida. Ver tabla 8. Finalmente, se conectó la cámara a una fuente de poder y se corrió a 80 V / 2 horas constantes<sup>178</sup>.

Tabla 6. Composición gel separador al 12% (*running gel*)

Reactivo	Cantidad
acril 29% - bis-acril 1%	2800 µL
Tris HCl pH 8.8	1750 µL
SDS 10%	70 µL
agua desionizada	2341.5 µL
Temed	3.5 µL
persulfato de amonio	35 µL

<sup>177</sup> BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72: 248-254.

<sup>178</sup> MUÑOZ, A. Electroforesis monodimensional de proteínas. *Manual de Protocolos de Genética y Bioquímica de Microorganismos*. Corporación para Investigaciones Biológicas CIB. Medellín, 2003.

Tabla 7. Composición gel concentrador al 4% (*stacking gel*)

Reactivo	Cantidad
acril 29% - bis-acril 1%	532 $\mu$ L
Tris HCl pH 6.8	1000 $\mu$ L
SDS 10%	40 $\mu$ L
agua desionizada	2404 $\mu$ L
Temed	4 $\mu$ L
persulfato de amonio	20 $\mu$ L

Tabla 8. Composición Tampón de Corrida

REACTIVO	CANTIDAD
Tris	3.03 g
glicina	14 g
SDS	1 g
agua desionizada	1 L

5.6.2.1 Tinción con plata para proteínas. Una vez terminada la electroforesis, se separó el gel suavemente de los vidrios y se depositó en un recipiente plástico, procediendo luego a la tinción. El procedimiento llevado a cabo fue el siguiente:

Se fijo el gel con metanol, formaldehído y agua por 10 minutos. Se lavó dos veces con agua desionizada por 5 minutos. Luego, se procedió a realizar un Pre-tratamiento con una solución de tiosulfato de sodio y agua por 1 minuto, se lavó luego con agua dos veces por 20 segundos y se procedió a realizar la tinción con una solución nitrato de plata (1mg/mL) durante 10 minutos. Una vez realizada la tinción se realizó un tercer lavado, con una solución de carbonato de sodio, tiosulfato de sodio y agua por 30 segundos dos veces. Finalmente, se reveló con una solución de carbonato de sodio, tiosulfato de sodio, formaldehído y agua hasta la aparición de las bandas. Una vez sucedido esto se adicionó una solución de ácido cítrico anhidro y agua por 10 minutos para detener la reacción. Todo el procedimiento se llevo a cabo bajo una agitación suave y constante en un agitador<sup>179</sup>. Ver Tabla 9.

<sup>179</sup> MUÑOZ, A. Tinción de Plata rápida para proteínas. Manual de Protocolos DE Genética y Bioquímica de Microorganismos. Corporación para Investigaciones Biológicas CIB. Medellín, 2003.

Tabla 9. Composición tinción con plata rápida

Reactivo	Cantidad
<b>Fijación</b>	
metanol puro	10 mL
formaldehído 37%	12.5 µL
agua desionizada	15 mL
<b>Lavado A</b>	
agua desionizada	25 mL
<b>Pre tratamiento</b>	
tio sulfato de sodio	5 mg
agua desionizada	25 mL
<b>Lavado B</b>	
agua desionizada	25 mL
<b>Nitrato</b>	
nitrato de plata	25 mg
agua desionizada	25 mL
<b>Lavado C</b>	
solución de revelado	5 mL
agua desionizada	20 mL
<b>Revelado</b>	
carbonato de sodio	750 mg
tio sulfato de sodio	5 µL
formaldehído 37%	12.5 µL
agua desionizada	25 mL
<b>Parada</b>	
ácido cítrico anhidro	550 mg
agua desionizada	1 mL

#### 5.7 PRUEBAS DE ANTAGONISMO *In vitro* DE *H. pylori* CON EXTRACTOS PROTEICOS DE LAS LABs

Teniendo en cuenta las concentraciones arrojadas por el método de cuantificación Bradford, se realizaron tres diluciones de 9:1 para cada proteína extraída partiendo de la concentración inicial en tampón TE (Tris HCl al 20 mM y EDTA al 10 mM).

Los Antagonismos se realizaron en agar base columbia, suplementado con sangre de cordero desfibrinada al 8% inoculados con 200 µL de *H. pylori* previamente activado, a una concentración de  $5 \times 10^8$  células/ml, calculados en una cámara de Newbauer. El inóculo se homogenizó con perlas de vidrio y se procedió a realizar 1, 2 ó 3 pozos de 7 mm de diámetro en cada una de las cajas. En los pozos se depositaron 200 µl de las proteínas precipitadas de bacterias lácticas. Como control negativo se utilizaron pozos con 200 µl de tampón TE y una cepa con extractos proteicos no antagonista (UN 014). Finalmente, las cajas se llevaron



a incubación a 37°C por 24 horas en ambiente anaerobio, al cabo de este tiempo se evaluaron los resultados del ensayo<sup>180,181</sup>.

## 5.8 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS

5.8.1 Liofilización. Con el fin de concentrar y conservar las proteínas obtenidas en la precipitación, el concentrado de proteínas se almacenó a -20°C durante 1 hora, al cabo de ese tiempo se procedió a realizar la liofilización en un liofilizador FTS SYSTEMS® Model No. FD-1-54A por espacio de 24 horas. Finalmente, el liofilizado obtenido fue resuspendido en 1 ml de tampón TE.

## 5.9 PREPARACIÓN DE LA RESINA Y MONTAJE DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA

5.9.1 Preparación y montaje de la resina. Con el fin de evaluar la capacidad de fraccionamiento de las proteínas extraídas se utilizaron dos resinas, Sephadex G-25 y Sephadex G-100 SYGMA®. Se pesó 5 g de resina que se hidrataron en tampón PBS al 50 mM frío y estéril. Una vez hidratado, se procedió a empaquetar la resina en columnas de plástico de 1 cm de diámetro por 15 cm de longitud, evitando la formación de burbujas<sup>182</sup>.

5.9.2 Preparación y montaje de la muestra. Las columnas se montaron en un colector Econo Pump Bio-Rad®. Ver Anexo B. La muestra se corrió en tampón PBS 50 mM, se ajustó el volumen de flujo a 0.5 mL/minuto y el tiempo de recolección de cada fracción a cuatro minutos. Finalmente, se adicionó 1 mL de la proteína extraída de concentración conocida directamente sobre la cama o superficie de la resina. Por cada cromatografía realizada se recolectaron 30 ó 60 fracciones de 2 mL cada una, las cuales se recogieron en tubos de ensayo de vidrio estériles. Se taparon con parafilm y se colocaron inmediatamente en hielo<sup>183</sup>.

5.9.3 Detección y lectura de la muestra fraccionada. Para determinar en que fracciones se encontraban las proteínas, se tomó 1 mL de cada una de ellas para la lectura espectrofotométrica de luz Ultravioleta a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman Du-65®, utilizando como blanco PBS 50 mM. Todas las fracciones donde se detectó alguna concentración de proteína, se sometieron a precipitación con TCA (Ver numeral 5.5.2), seguida de electroforesis monodimensional SDS-PAGE al 12%, a 80 v/ hora constante (Ver numeral 5.6.2.)

---

<sup>180</sup> KEKESY, D. A. & J. D. PIGUET. New method for detecting bacteriocin production. Applied Microbiology. 1970, 20 (2): 282 – 283

<sup>181</sup> TAGG, J. R. & A. R. MCGIVEN. Assay system for bacteriocins. Applied Microbiology. 1971, 21 (5): 943.

<sup>182</sup> AMERSHAN BIOSCIENCES. Op cit. Pág. 48

<sup>183</sup> YAMATO, M., OZAKI, K. & F. OTA. Partial purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* YIT 0154. Microbiological Research. 2003, 158: 169 – 172.

Pasado este tiempo los geles se tiñeron con nitrato de plata (Ver numeral 5.6.2.1)<sup>184</sup>.

## 5.10 DIGESTIBILIDAD DE LOS EXTRACTOS

Con el fin de evaluar el comportamiento de las proteínas extraídas y precipitadas frente a diferentes factores como enzimas proteolíticas, temperatura, pH y tiempo, se procedió a realizar los siguientes experimentos:

5.10.1 Proteínas totales vs. temperatura y pH . Las LABs se cultivaron en 100 mL de caldo MRS a 37°C por 24 horas, pasado este tiempo se realizó la precipitación de las proteínas con TCA al 5% (Ver numeral 5.5.2) se liofilizó la muestra por 24 horas y se resuspendió en 1 mL agua desionizada. Luego de esto, las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford (Ver numeral 5.6.1). Teniendo en cuenta los datos arrojados por la cuantificación se realizaron diluciones en agua para llevar las proteínas a una concentración de 1 mg/mL.

De la solución cuantificada se tomó 10 µL con una micropipeta y se le adicionó 5 µL de tampón Tris a diferentes pHs (2, 5, 7, 9, 11) ajustados con HCL 6N y NaOH 6N. Finalmente se sometieron a diferentes temperaturas y un tiempo determinado de tratamiento<sup>185,186,187</sup>. Ver tabla 10.

Tabla 10. Temperatura, pH y tiempo en la reacción de proteínas

pH	Temperatura	Tiempo
2, 5, 7, 9, 11	-20°C	24 horas
2, 5, 7, 9, 11	4°C	24 horas
2, 5, 7, 9, 11	37°C	24 horas
2, 5, 7, 9, 11	45°C	60 minutos
2, 5, 7, 9, 11	100°C	15 minutos

Las muestras sometidas a -20°C se colocaron en un congelador, las sometidas a 4°C, ajustada con termómetro en una nevera y las de 37°C en adelante en baños con temperatura controlada.

<sup>184</sup> JIMÉNEZ-DIAZ, R., RUIZ-BARARA, J. L., CATHCART, D. P., HOLO, H., NES, I. N., SLETTEN, K. H. & P. J. WARNER. Purification and partial Amino Acid sequence of Plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of Vich depends on the complementary action of two peptides. Applied and Environmental Microbiology. 1995, 61 (12): 4459 – 4463.

<sup>185</sup> BOGOVIC-MATIJASIC, B., ROGELJ, I., NES, I. F. & H. HOLO. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. Applied Microbiological Biotechnology. 1998, 49: 606-612.

<sup>186</sup> LOZO, J., VUKASINOVIC, M., STRAHINIC, I. & L. TOPISIROVIC. Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* BGBUK2-16. Journal of Food protection. 2004, 67 (12): 2727-2734.

<sup>187</sup> AKCELIK, O., TUKEL, C., OZCENGIZ, G. & M. AKCELIK. Characterization of bacteriocins from two *Lactococcus lactis subsp lactis* isolates. Molecular Nutrition and Food Reviews. 2006, 50: 306-313.

Una vez finalizado el experimento, las muestras fueron retiradas de las condiciones, se colocaron en hielo, se les adicionó 5 µL de tampón carga, se calentaron por 5 minutos a 100°C y se montaron en geles SDS-PAGE al 12%, los cuales se sometieron después a una tinción con plata.

Como control negativo de este experimento se utilizó BSA ICN® a una concentración de 1 mg/mL en agua desionizada estéril, la cual se sometió a las mismas condiciones de pH, temperatura y tiempo de acuerdo al esquema del experimento planteado.

5.10.2 Proteínas totales vs. Enzimas proteolíticas. Con el fin de evaluar la resistencia de las bacteriocinas a la actividad proteolítica, los extractos de las proteínas precipitadas fueron digeridos de la siguiente manera:

Se extrajeron las proteínas de las LABs siguiendo el numeral 5.5.2. Una vez realizado esto, las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford (Ver numeral 5.6.1). Teniendo en cuenta los datos arrojados por la cuantificación se realizaron diluciones en agua para llevar las proteínas a una concentración de 1 mg/mL.

Las proteasas utilizadas fueron tres: tripsina, proteinasa K y quimotripsina, a una concentración de 1 mg/mL en tampón Tris HCl pH 8.0.

Para este ensayo se realizó una cinética de acción de proteasa vs. proteína en una proporción de volumen 1:5 en un volumen total de 50 µL. Se tomó una muestra de 16 µl cada 5, 10 y 15 minutos. A cada una de las muestras tomadas se les adicionó 4 µL de PMSF 20 mM y 3 µL de EDTA 100 mM con el fin de detener la digestión, a esta solución se le adicionó 6 µl de tampón carga, se calentó por 5 minutos a 100°C y se corrieron en geles SDS-PAGE al 12%, los cuales fueron teñidos con nitrato de plata<sup>188,189,190</sup>.

Para el control negativo se utilizó BSA a una concentración de 1 mg/mL en agua desionizada estéril y se sometió nuevamente a las mismas condiciones mencionadas anteriormente, con la diferencia en los valores de tiempos evaluados: 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90 minutos.

## 5.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de los diámetros de inhibición de los halos de antagonismo, fueron analizados con una prueba de Shapiro-Wilk, para determinar si se ajustaban a una normalidad estadística o no y ver si era posible aplicar pruebas paramétricas o no paramétricas. Posteriormente, se realizó una prueba de

<sup>188</sup> BOGOVIC-MATIJSIC, B., ROGELJ, I., NES, I. F. & H. HOLO. Op cit. Pág. 60

<sup>189</sup> LOZO, J., VUKASINOVIC, M., STRAHINIC, I. & L. TOPISIROVIC. Op cit. Pág. 60

<sup>190</sup> AKCELIK, O., TUKEL, C., OZCENGIZ, G. & M. AKCELIK. Op cit. Pág. 60

Kruskal-Wallis (H) para ver si en los ensayos existían o no diferencias estadísticas significativas y finalmente se hizo un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey para comparar entre que cepas se encontraban las variaciones estadísticamente significativas. A partir de esta información se pudo deducir cual era la cepa y el extracto proteico más antagónico. Lo mismo se realizó con los antagonismos *In vitro* de *H. pylori* con bacteriocinas. Para realizar este análisis se tuvieron en cuenta los valores de diámetro mayores a cero<sup>191</sup>. Los datos fueron corridos con el programa estadístico Past 1.38 2005.

---

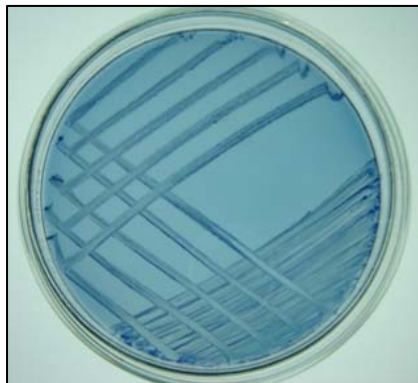
<sup>191</sup> ILUSTRUP, D. M. Statistical Methods in Microbiology. Clinical Microbiology Reviews. 1990, 3 (3): 219 – 226.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 ACTIVACION Y VERIFICACION DE PUREZA DE LAS CEPAS

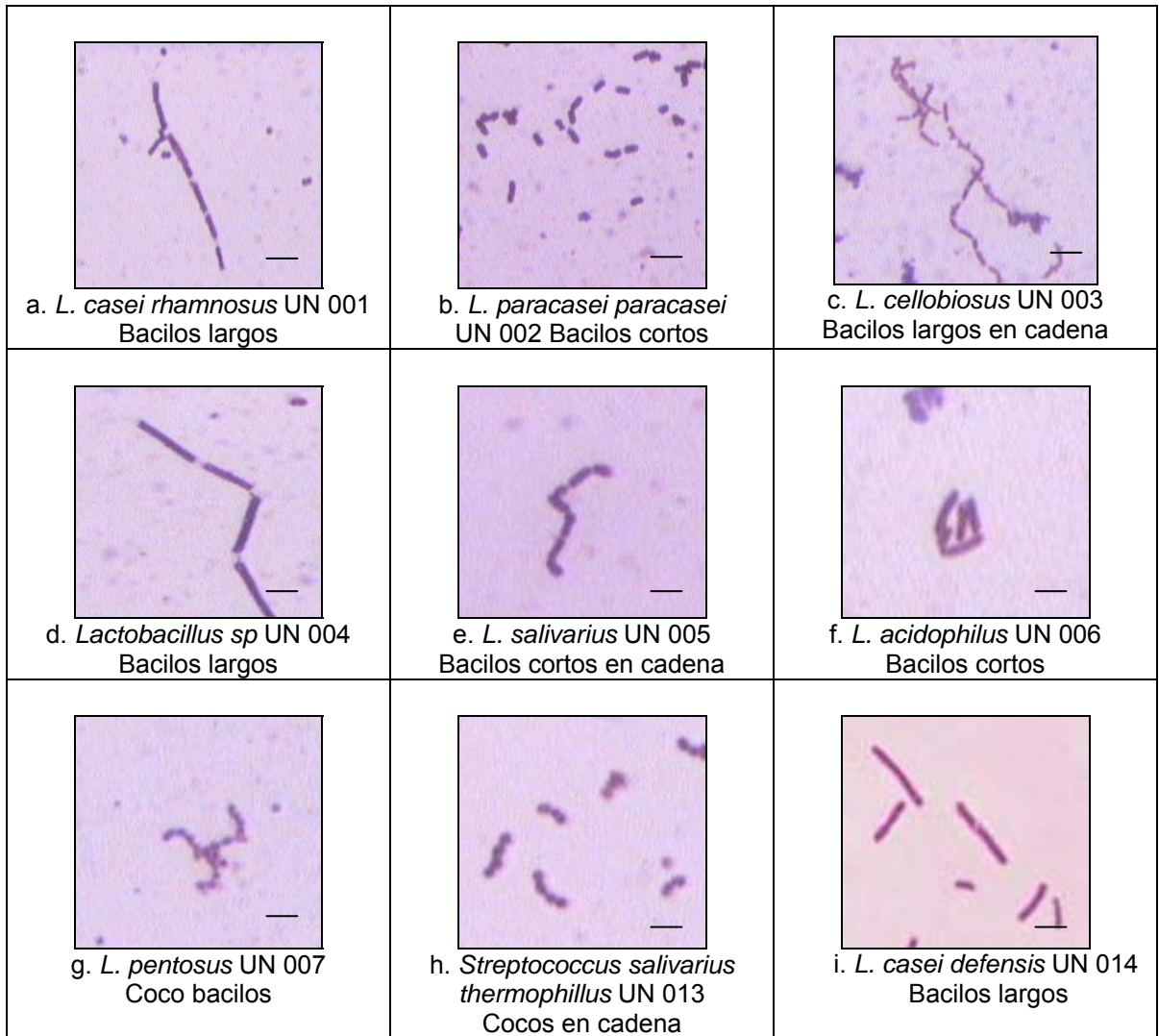
6.1.1 Activación y verificación de pureza de las LABs. Las LABs utilizadas en este estudio, mostraron características macroscópicas propias de este grupo, como la coloración de colonias o estrías de color azul en el medio agar MRS suplementado con anilina, las líneas o colonias se observan con borde entero, convexas, brillantes y cremosas como se observa en la figura 3. La tinción de Gram permitió distinguir correctamente la morfología de las bacterias e igualmente permitió determinar la coloración típica azul violeta de las Gram positivas, de otra parte la morfología correspondió tanto a bacilos para las especies del genero *Lactobacillus* (a-b-c-d-e-f-i en figura 4) como cocos para las especies del genero *Streptococcus*. (g-h en figura 4).

Figura 3. Observación macroscópica en medio MRS anilina cepa UN 003



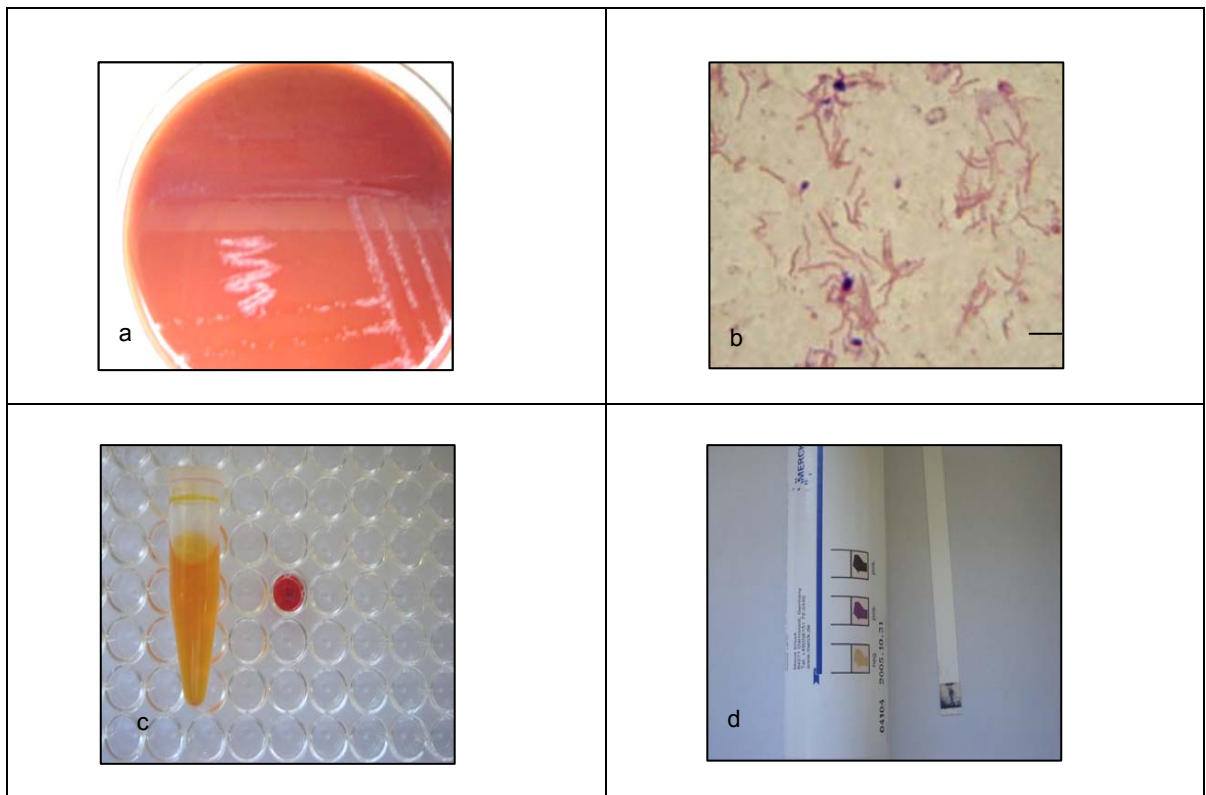
El tamaño de las bacterias correspondió a la medida estándar entre 0,5  $\mu\text{m}$  para estreptococos (h. UN 013) y bacilos cortos y hasta 6  $\mu\text{m}$  para los lactobacilos (a. UN 001). El testigo en la escala representa 2  $\mu\text{m}$ .

Figura 4. Observación de características morfológicas de LABs vistas a 100X. Las imágenes microscópicas corresponden a nueve cepas que presentaron una mejor actividad bacteriocinogénica sobre *H. pylori*



6.1. 2 Activación y verificación de pureza de *H. pylori*. La cepa activada (ATCC 51932) donada por el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Valle, presentó características típicas de esta especie, como por ejemplo la formación de colonias puntiformes, como gotas de rocío con un diámetro de 0,5 mm aprox., sobre el medio de cultivo agar sangre (figura 5a). Bajo el microscopio se observó como el típico bacilo curvado con tinción Gram negativa (figura 5b). Las pruebas bioquímicas con ureasa y oxidasa permitieron verificar la actividad específica enzimática de la bacteria (figura 5c y 5d respectivamente).

Figura 5. Características típicas de *H. pylori*. a. Crecimiento de la bacteria en medio agar sangre; b. Tinción de Gram, el testigo en la escala representa 5  $\mu$ m; c. Prueba bioquímica con Ureasa presentando reacción positiva; d. Prueba bioquímica con oxidasa mostrando reacción positiva.



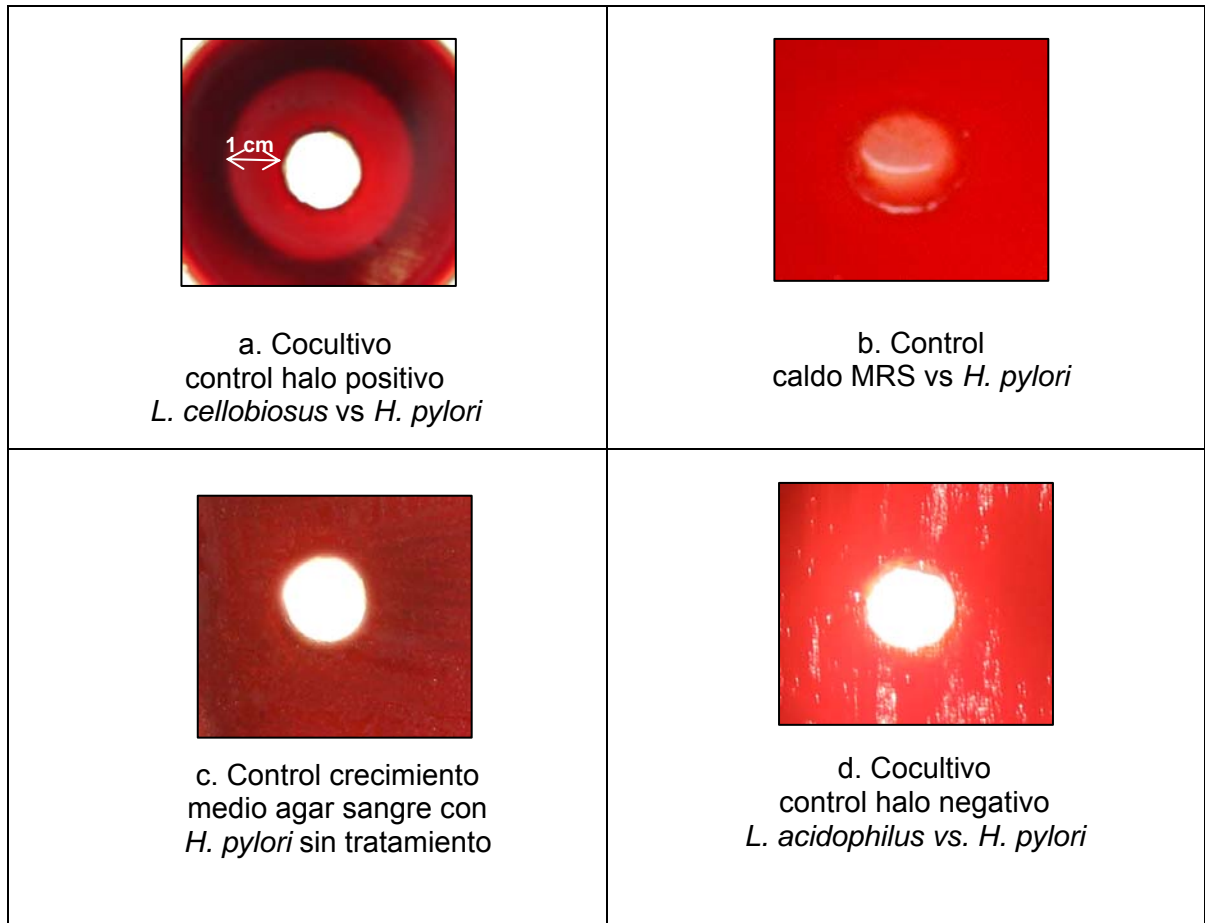
## 6.2 COCULTIVOS DE LABs CON *H. pylori* *In vitro*

Las condiciones del cocultivo fueron estandarizadas entre LABs y *H. pylori* después de realizar el proceso veinte veces. Cada colcultivo se hizo por triplicado, al cabo de lo cual se observaron la presencia o ausencia de halos de inhibición. Como controles se utilizaron siempre: un cocultivo con la cepa de *L. cellobiosus* UN 003 con *H. pylori* ATCC 51932, cuyo antagonismo siempre fue evidente como se observa en la figura 6a; un control de un cultivo de *H. pylori* con medio MRS estéril el cual nunca mostró un halo de inhibición, como se aprecia en la figura 6b; un control de *H. pylori* en agar sangre sin ningún tratamiento para verificar la pureza de la cepa, como se aprecia en la figura 6c; y un control negativo con *L. acidophilus* UN 006 con *H. pylori* ATCC 51932 el cual jamás exhibió un halo de inhibición como se observa en la figura 6d.

En la figura 6a puede observarse como *L. cellobiosus* muestra un efecto antagónico para el crecimiento de *H. pylori*, con un halo de inhibición alrededor del pozo de 1 cm aprox. de diámetro, el cual contrasta con los demás controles. Estandarizado ese proceso se procedió al análisis de la colección bacteriana de LABs. El medio MRS jamás mostró halo de inhibición ni impidió el crecimiento de *H. pylori* hasta el borde del pozo y creció idéntico al control sin tratamiento (figura 6b y 6c). El criterio para el control negativo correspondió a un cocultivo donde la cepa LAB jamás mostró halo de inhibición de crecimiento de *H. pylori* ATCC 51932.



Figura 6. Cocultivos entre LABs vs *H. pylori* con controles de medios y cepas



Posterior a la estandarización de la técnica se procedió a evaluar la actividad antagónica de diecisiete LABs probióticas (tabla 11). La tabla resume el total de ensayo realizados durante todo el tiempo de estudio correspondiente a un máximo de 25 repeticiones entre cada cepa y *H. pylori*, para los casos negativos las repeticiones fueron suficientes. Estos datos fueron evaluados estadísticamente. Los halos fueron digitalizados con una cámara Canon® Photoshop A 53, a una distancia de 50 cm de la caja con excelentes condiciones de iluminación. La figura 7 muestra las siete cepas positivas señaladas en la tabla 9, los halos de inhibición oscilaron para los negativos 10 mm ó menos y de 10 hasta 28 mm para los positivos (tabla 11).

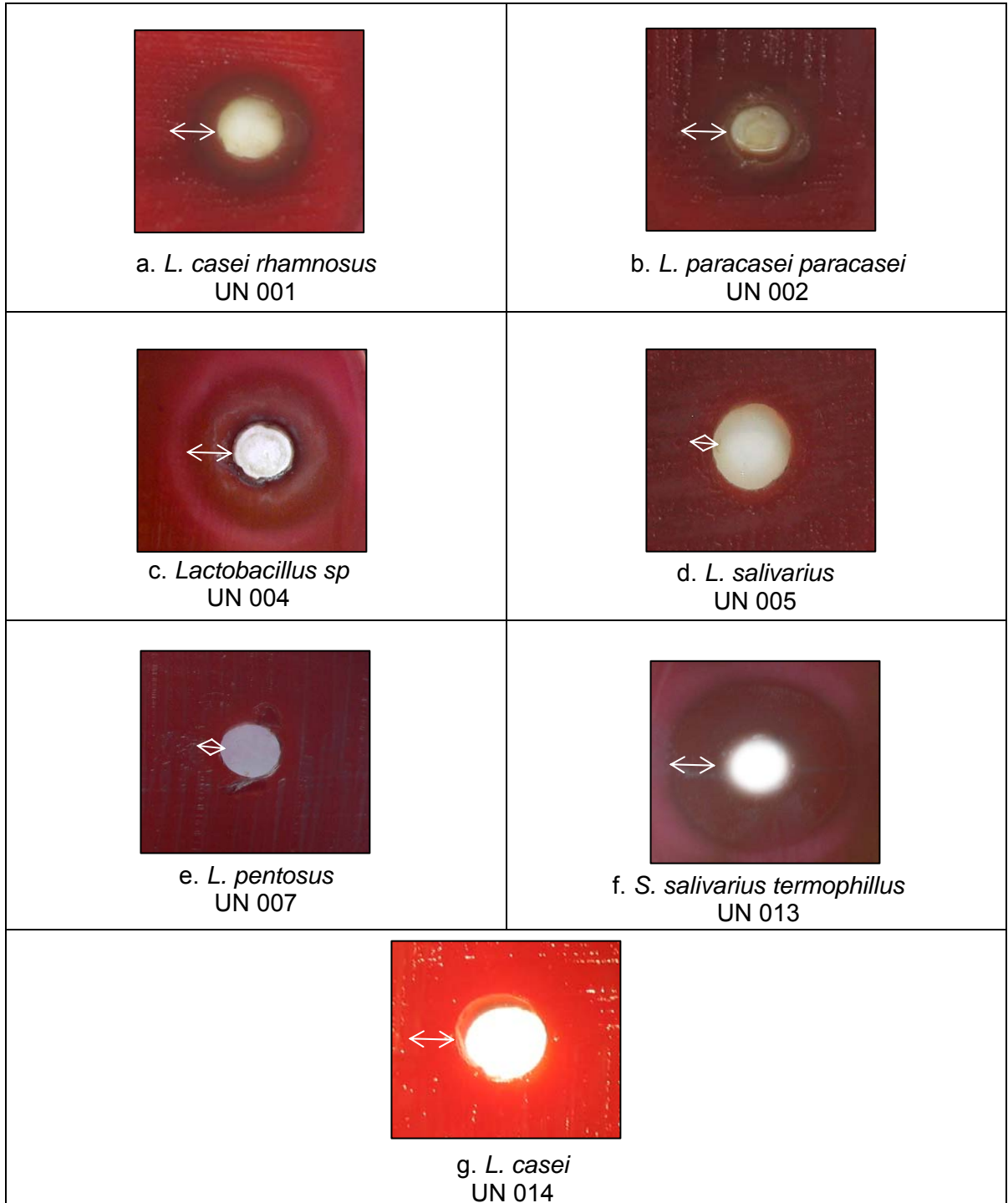
Tabla 11. Evaluación del cocultivo de LABs con *H. pylori* ATCC 51932. La columna de halo de inhibición muestra las cepas determinadas como positivas, el mayor diámetro de halo de inhibición medido durante los ensayos, esta indicado entre paréntesis.

Especie	Cepa	Halo de inhibición	No. de cocultivos
<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i>	UN 001	+ (24 mm)	20
<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i>	UN 002	+ (20 mm)	20
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	UN 003	+ (20 mm)	20
<i>Lactobacillus sp.</i>	UN 004	+ (18 mm)	20
<i>Lactobacillus salivarius</i>	UN 005	+ (22 mm)	20
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	UN 006	- (7 mm)	20*
<i>Lactobacillus pentosus</i>	UN 007	+ (14 mm)	20
<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i>	UN 013	+ (28 mm)	20
<i>Lactobacillus casei</i>	UN 014	+ (16 mm)	20
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	UN 011	-	5
<i>Lactobacillus sp.</i>	UN010A	-	5
<i>Lactobacillus sp.</i>	UN010B	-	5
<i>Lactobacillus sp.</i>	UN010C	-	5
<i>Lactobacillus sp.</i>	UN010D	-	5
<i>Lactobacillus sp.</i>	UN010E	-	5
<i>Lactobacillus sp.</i>	UN010F	-	5
<i>Lactobacillus sp.</i>	UN010G	-	5

\* Cepa control de cocultivos, halo negativo

No siempre los halos de inhibición presentaron las mismas características de coloración, sin embargo el halo fue siempre la región donde no hubo crecimiento de *H. pylori* ATCC 51932. Es importante aclarar que el medio de cultivo MRS de las bacterias lácticas se difundió en más de un 50% hacia el agar sangre durante las 24 horas del cultivo. Algunos halos presentaron coloración oscura como en el caso de las cepas *L. casei rhamnosus* UN 001, *L. paracasei paracasei* UN 002, *Lactobacillus sp.* UN 004 (figuras 7a, 7b, 7c) y otros halos presentaron coloración translúcida como en el caso de las cepas *L. salivarius* UN 005, *L. pentosus* UN 007, *S. salivarius thermophilus* UN 013, *L. casei* UN 014 (figuras 7d, 7e, 7f, 7g).

Figura 7. Halos formados de los cocultivos LABs vs. *H. pylori* ATCC 51932. La flecha indica el halo de inhibición sitio en el cual no se detectó el crecimiento de *H. pylori*.



### 6.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DEL SOBRENADANTE DE LABs

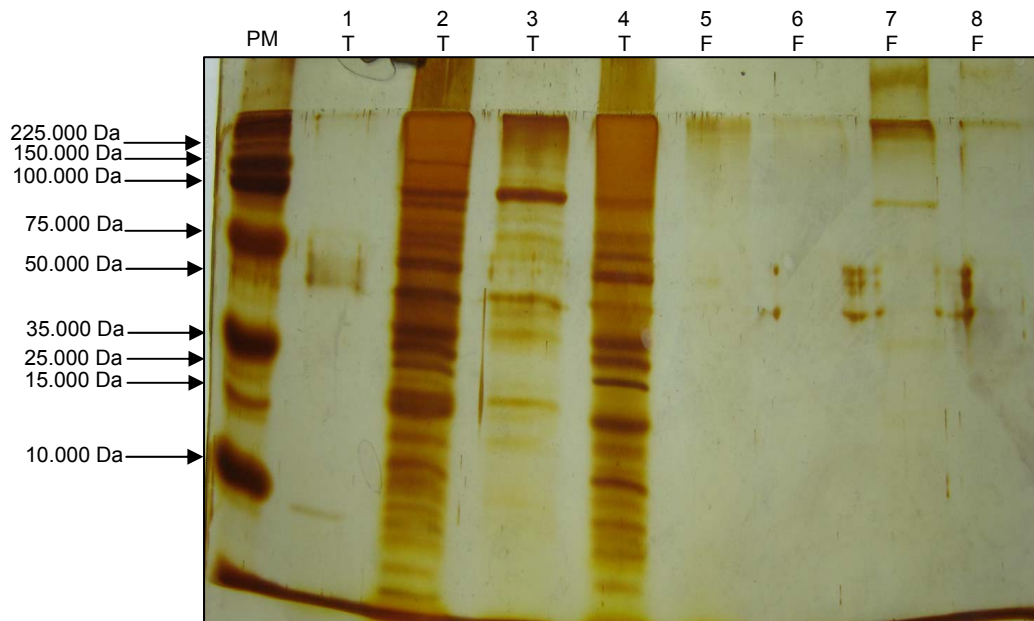
Con el fin de comprobar si los halos de inhibición fueron responsabilidad de las proteínas excretadas al medio de cultivo se procedió a la extracción para probarlas en ensayos *In vitro* contra *H. pylori* ATCC 51932. Las cepas seleccionadas para la extracción de proteínas que presentaron halo de inhibición positivo fueron: UN 001, UN 002, UN 003, UN 004, UN 005, UN 006, UN 007 y UN 013. (Ver Tabla 12)

6.3.1 Extracción de proteínas. Los dos métodos de extracción utilizados (extracción con fenol y extracción con TCA) se compararon inicialmente monitoreándose los extractos proteicos en geles de poliacrilamida. El número de bandas obtenidas fue crucial para escoger el método más eficiente. Como discutiremos después el mayor o menor número de bandas obtenidas se debió posiblemente a la capacidad de precipitación de proteínas o degradación de éstas, así como el tipo de bacteria que es otro factor a tener en cuenta.

Como se observa en la figura 8 el criterio para escoger la mejor extracción es algo subjetivo, sin embargo siempre se obtuvo muchísimo número más de bandas, o al menos en concentración comparativamente, utilizando ácido tricloroacético (TCA) que fenol-equilibrado con Tris.

La figura 8 muestra los dos tratamientos monitoreados en gel de poliacrilamida SDS (PAGE) al 12%, donde las carriles 2, 3 y 4 presentan el mayor número de bandas, las cuales fueron tratadas con TCA. Los mismos sobrenadantes tratados con fenol, carriles 6, 7 y 8 presentan muchísimo menor número de bandas (cepas UN 001, UN 002, UN 003, UN 005). Sin embargo la muestra del carril 1 tratado con TCA no presentó el número de bandas esperado, pero tampoco presentó el mismo número de bandas que la misma muestra tratada con fenol en el carril 5. Es importante saber que existen muchos factores que afectan la extracción, sin olvidar además que no todas las bacterias secretan la misma cantidad de proteínas. La misma muestra del carril 1 fue re-extraída posteriormente bajo condiciones mejor estandarizadas, incrementando mayor número de bandas extraídas (figura 8, carril 1).

Figura 8. Proteínas de las LABs precipitadas con TCA (T) y fenol (F). PM: marcador de peso molecular Promega V849A; 1T: *L. casei rhamnosus* UN 001; 2T: *L. paracasei paracasei* UN 002; 3T: *L. cellobiosus* UN 003; 4T: *L. salivarius* UN 005; 5F: *L. casei rhamnosus* UN 001; 6F: *L. paracasei paracasei* UN 002; 7F: *L. cellobiosus* UN 003; 8F: *L. salivarius* UN 005.



En la figura 9 se puede observar el total de cepas escogidas para extraerles sus bacteriocinas posterior a la estandarización del método de precipitación con TCA. Para la preparación de este gel de poliacrilamida todas las proteínas extraídas se le midieron su concentración por el método de Bradford. La cantidad de proteínas por pozo fue ajustada posteriormente a  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Como se observa en la figura 9 el gel presenta un bandeo específico, propio de la secreción de cada bacteria. Además de mostrar en el gel el peso molecular de estas proteínas oscila entre 3.000 y 225.000 Daltons. En el gel se incluyó una cepa de uso comercial de la especie *L. casei*.

En la tabla 12 se puede observar las cepas LABs tratadas, donde se muestra el número relativo de proteínas producidas, las cuales fueron contadas lo mas ajustado posible. La cantidad es relativa dado que el nivel de detección lo determina el tratamiento con nitrato de plata. Este valor no fue considerado para ningún tratamiento posterior dado que se considera muy subjetivo.

Figura 9. Precipitación con TCA de proteínas producidas por LABs. PM: Marcador de peso molecular Promega V849A; 1: *L. casei rhamnosus* UN 001; 2: *L. paracasei paracasei* UN 002; 3: *L. cellobiosus* UN 003; 4: *Lactobacillus* sp UN 004; 5: *L. salivarius* UN 005; 6: *L. acidophilus* UN 006; 7: *L. pentosus* UN 007; 8: *S. salivarius thermophilus* UN 013; 9: *L. casei* UN 014.



Tabla 12. LABs precipitadas con TCA

Bacteria	Código Investigación	Número total de bandas extraídas*
<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i>	UN 001	16
<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i>	UN 002	24
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	UN 003	31
<i>Lactobacillus</i> sp.	UN 004	23
<i>Lactobacillus salivarius</i>	UN 005	13
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	UN 006	14
<i>Lactobacillus pentosus</i>	UN 007	16
<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i>	UN 013	28
<i>Lactobacillus casei</i>	UN 014	21

\* Número aproximado de proteínas detectables. Figura 9.

## 6.4 CUANTIFICACION DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Dado que el número de bandas de proteínas no indica la actividad de la bacteriocina, este método sólo permitió calcular una cantidad o concertación de proteína aproximada para los ensayos posteriores de antagonismo *In vitro*, cromatografía y ensayos con proteinasas.

6.4.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford para ensayos de cocultivos *In vitro*. Después de varios ensayos, se estandarizó una cuantificación que utilizó una dilución 950:50 v/v (1/20) de una solución de proteína. Para la preparación del estándar, se utilizó fracción V de BSA en un rango entre 5 y 40 µg/µL. En nuestro caso todos los ensayos la dilución 950:50 (1/20) fue idónea dado que permitió determinar las concentraciones de los extractos en el rango anteriormente mencionado. (Ver tabla 13).

Tabla 13. Cuantificación de proteínas para ensayos de antagonismos *In vitro* y cromatografía

Nivel	Densidad óptica	Desviación estándar	%CV	Concentración relativa mg/mL	Concentración 1/20 ng/mL
S1	0,0925	0,017	18,35	5	
S2	0,189	0,021	10,85	10	
S3	0,2805	0,013	4,54	15	
S4	0,313	0,033	10,62	20	
S5	0,343	0,016	4,74	25	
S6	0,402	0,013	3,34	30	
S7	0,4615	0,038	8,27	35	
S8	0,5255	0,016	2,96	40	
UN 001	0,202	0,029	14,29	11,634	571.800
UN 002	0,245	0,017	7,07	15,406	770.300
UN 003	0,2193	0,028	12,91	13,147	657.300
UN 004	0,3425	0,037	10,92	23,958	1.197.900
UN 005	0,6365	0,033	5,21	49.748 <sup>1</sup>	2.487.400
UN 006	0,447	0,04	8,98	33,125	1.656.250
UN 007	0,5168	0,017	3,31	39,243	1.962.150
UN 013	0,0723	0,026	35,78	0.252 <sup>2</sup>	12.600
UN 014	0,1753	0,024	13,7	9,287	464.350
Blanco	0,3375	0,015	4,4		

(S1 – S8) Estándar de calibración

Blanco (agua desionizada y reactivo de Bradford)

6.4.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford para los ensayos de digestibilidad. Siguiendo el criterio anterior se obtuvieron los datos de concertación para ser utilizados en los ensayos de digestibilidad (Ver tabla 14).

Tabla 14. Cuantificación de proteínas para ensayos de digestibilidad

Nivel	Densidad óptica	Desviación estándar	%CV	Concentración relativa Mg/mL	Concentración 1/20 ng/mL
S1	0,111	4,24	3,82	5	
S2	0,2055	2,76	1,34	10	
S3	0,29	2,12	7,31	15	
S4	0,353	0,00	0,00	20	
S5	0,386	2,83	7,33	25	
S6	0,4165	2,33	5,60	30	
S7	0,51	2,40	4,71	35	
S8	0,486	8,20	1,69	40	
UN 001	0,585	2,97	5,08	44.628 <sup>1</sup>	2.230
UN 002	0,6235	7,07	1,13	48.174 <sup>1</sup>	2.400
UN 003	0,6685	1,77	2,64	52.319 <sup>1</sup>	2.610
UN 004	0,586	0,00	0,00	44.720 <sup>1</sup>	2.230
UN 005	0,589	4,24	7,20	44.997 <sup>1</sup>	2.240
UN 006	0,803	2,40	2,99	64.707 <sup>1</sup>	1.410
UN 007	0,528	1,41	2,68	39.378 <sup>1</sup>	1.960
UN 013	0,5015	2,12	4,23	36,937	1.250
UN 014	0,372	1,27	3,42	25,01	1.250
Blanco	0,246	4,24	1,72		

## 6.5 PRUEBAS DE ANTAGONISMO *In vitro* CON PROTEÍNAS

Teniendo en cuenta los resultados de la cuantificación por el método de Bradford, se probaron tres diferentes concentraciones, las cuales se pueden observar en la tabla 15. Estas diluciones fueron probadas en los pozos para evaluar si ejercían la actividad antagónica de las proteínas en el ensayo contra *H. pylori* ATCC 51932, lo que permitió a su vez calcular que concertación ejercía el efecto inhibitorio de *H. pylori* ATCC 51932.

En la tabla 15 la concentración escogida para el ensayo de antagonismo corresponde a la columna A. No se ajustó todos los extractos a la misma concentración dado que se quería correlacionar el cocultivo con el ensayo de proteínas *In vitro*. Como discutiremos luego, el principio activo debe estar más asociado a unidades de actividad que a cantidad de moléculas (peso).



Tabla 15. Concentraciones de proteínas producidas por las LABs

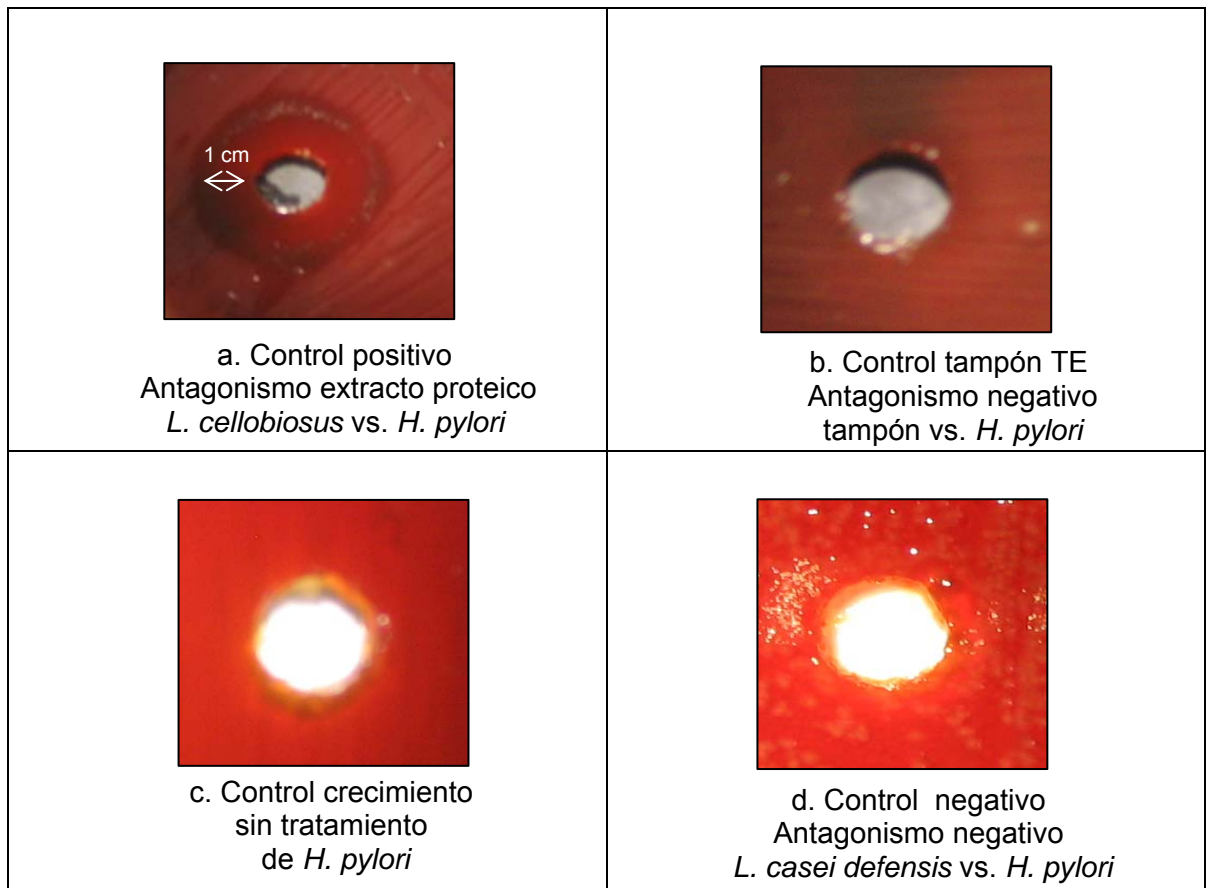
Proteína	Concentración A ng/mL	Concentración B ng/mL	Concentración C ng/mL
UN 001	581.700	58.170	5.817
UN 002	770.300	77.030	7.703
UN 003	657.300	65.730	6.573
UN 004	1.197.900	119.790	11.979
UN 005	2.487.400	248.740	24.874
UN 006	1.656.250	165.625	16.562
UN 007	1.962.150	196.215	19.621
UN 013	12.600	1.260	126
UN 014	464.350	46.435	4.643

Las condiciones del antagonismo con bacteriocinas fueron estandarizadas entre extractos de proteínas debidamente cuantificados y *H. pylori* ATCC 51932 después de realizar el proceso once veces. Cada antagonismo correspondiente a cada cepa se hizo por triplicado. Al cabo de lo cual se observaron la presencia o ausencia de halos de inhibición. Los halos fueron digitalizados de la misma manera que los de los cocultivos (Punto 6.2).

Es clave recordar que las cepas utilizadas para este ensayo corresponden a las positivas que se utilizaron en el cocultivo. Es importante aclarar que para este ensayo se utilizó como control negativo, una bacteria diferente a la utilizada en el cocultivo. El criterio se debió a que el extracto proteico de la cepa *L. acidophilus* UN 006 esta vez ejerció un efecto antagónico contra *H. pylori*.

En la figura 10a se observa como el extracto proteico a partir de *L. cellobiosus* UN 003 muestran un efecto antagónico para el crecimiento de *H. pylori*, lo cual se evidencia con el halo alrededor del pozo, de aprox. 1 cm. En la figura 10b se prueba el efecto del tampón TE que fue la solución empleada para solubilizar las proteínas, se observa como el tampón TE no tiene ningún efecto antagónico sobre *H. pylori*. Como control del crecimiento se utilizó un cultivo de *H. pylori* que no fue sometido a prueba con ninguna de las proteínas de las LABs anteriormente mencionadas (figura 10c). Un control negativo que se tuvo en cuenta fue el de las proteínas provenientes de *L. casei*, que no ejercieron ningún efecto inhibitorio contra el patógeno (figura 10d).

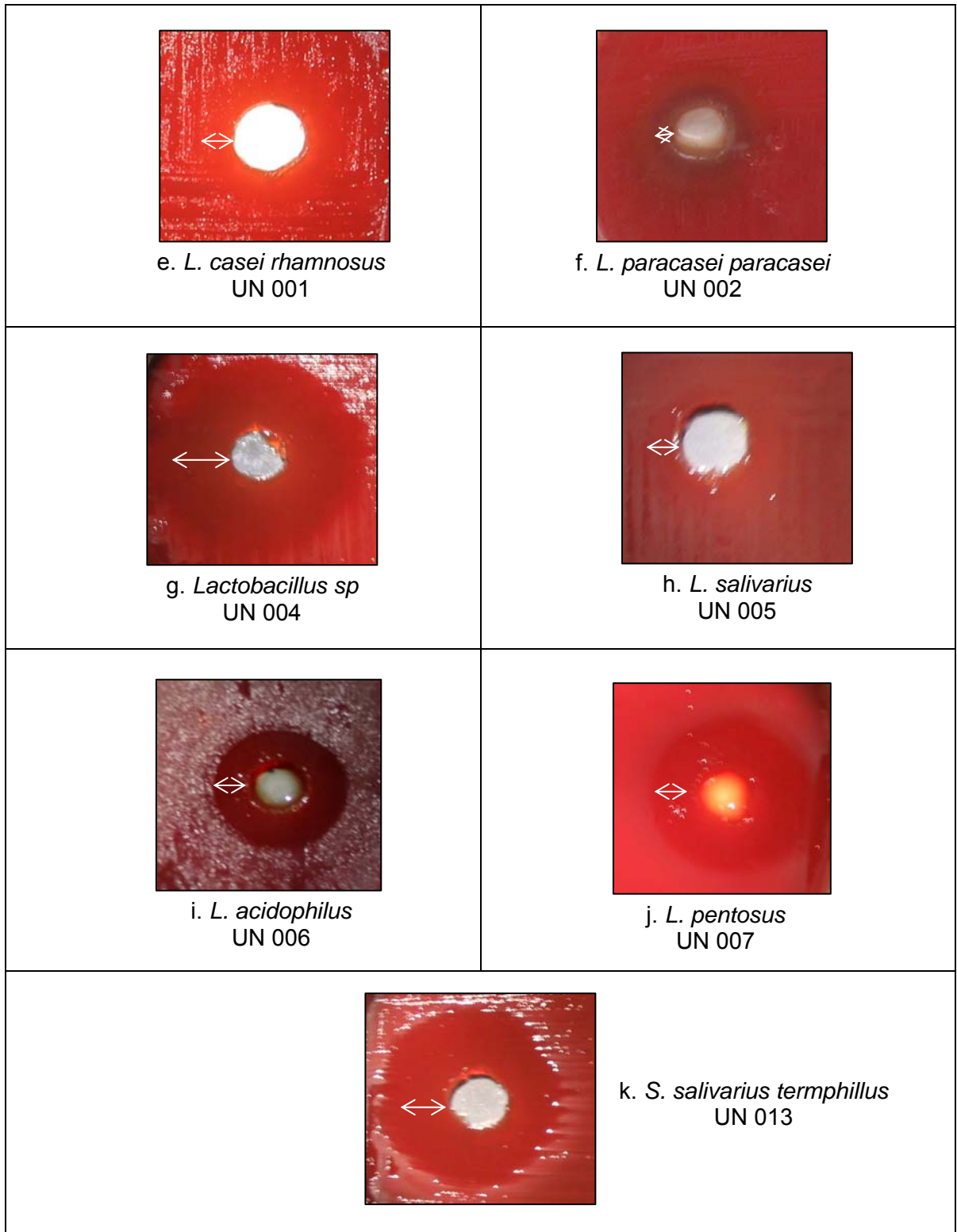
Figura 10. Controles de antagonismos positivos y negativos de extractos proteicos de LABs vs. *H. pylori*



La figura 11 resume el ensayo realizado con los extractos proteicos de LABs sobre *H. pylori* ATCC 51932, esto se evidencio con la presencia de halos de inhibición alrededor del pozo. Al igual que en el cocultivo los halos presentaron coloración diferente al medio, mientras que otros fueron translucidos, otros fueron oscuros. Igualmente que en la prueba de cocultivo la muestra se difundió sobre el agar sangre más del 50% durante las 24 horas que duró el experimento. Los halos translucidos fueron los de las figura 11a, 11c y 11e; los halos oscuros fueron formados por las cepas de las figuras 11b, 11d, 11f y 11g.

No existe una correlación entre la coloración del ensayo de cocultivo y el ensayo de extractos proteicos, salvo la cepa UN 002 que en ambos casos fue oscuro. Caso contrario si en un ensayo fue oscuro en el otro fue claro. De otra parte las medidas de los halos oscilaron entre los 12 y 30 mm.

Figura 11. Antagonismos de proteínas extraídas de LABs vs. *H. pylori*



## 6.6 Análisis estadístico de cocultivos de LABs vs. *H. pylori*

Entre las cepas seleccionadas el valor del diámetro de los halos siempre fueron superiores a aquel tomado como control negativo (*L. acidophilus* UN 006). Dado que no se tuvo una cepa externa a la colección con comprobada actividad bacteriocinogénica se decidió utilizar como control positivo a *L. cellobiosus* UN 003. Esta cepa siempre mostró un halo evidente y fue la primera cepa probada, además de ensayarse por treinta veces durante el tiempo de estudio. La validación del control positivo y negativo nos permitió evaluar todo el cepario (17 cepas). Para el análisis estadístico solo se tomaron las positivas comparadas con un solo control negativo.

Las ocho cepas de las LABs escogidas, mostraron halos de inhibición contra *H. pylori* ATCC 51932, con la formación de halos de inhibición en la muestra manipulada. La tabla 16 contiene el valor de las medidas de los diámetros en milímetros de los halos de inhibición.

Con el propósito de conocer si los datos se ajustaban a una normalidad estadística, se sometieron a una prueba de Shapiro-Wilk. Esta prueba arrojó un  $p < 0.05$ , indicando que los datos no se ajustaron a la normalidad, por lo tanto fue necesario realizar pruebas no paramétricas para conocer si los datos se correlacionaban entre halos de cada cepa. Se escogió esta prueba dado que es indicada para el tamaño de la muestra.

Posteriormente los datos se sometieron a una prueba de Kruskal-Wallis (H), la cual arrojó un H de 87,83 y un  $p < 0.001$ . El análisis de varianza nos determinó (ANOVA) que las diferencias se encontraban en los valores observados de la cepa UN 001, indicando que esta cepa es muchísimo más antagonista que las siete restantes. La hipótesis se construyó con base a la distribución normal se espera que algunas de las cepas son mucho mejores que las otras. Ver tabla 17.

Lo diámetros promedio de la cepa UN 001 fue 16.6 mm y el menor fue el de la cepa UN 007 de 11.8 mm. Al analizar de manera general los promedios de los diámetros, se observa que la cepa UN 001 tiene la mejor tendencia. Ver figura 12. La desviación estándar fue mucho mayor en las cepas con los mejores diámetros, esto se debe a la gran variabilidad en el rango de los diámetros. El control negativo siempre fue menor que todos los casos.

Tabla 16. Diámetros en milímetros de halos inhibición de cocultivos de LABs vs. *H. pylori* ATCC 51932

UN 001	UN 002	UN 003	UN 004	UN 005	UN 007	UN 013	UN 014	UN 006
18	12	12	16	12	12	16	12	10
24	10	16	18	22	12	14	12	10
14	16	20	18	14	12	28	14	8
12	18	14	14	10	10	18	12	10
12	16	12	16	10	10	12	12	10
18	18	12	14	14	12	10	14	10
20	16	12	18	10	12	10	12	8
16	14	12	18	12	10	12	12	10
14	16	16	16	14	10	12	12	10
18	16	16	16	10	12	12	14	8
18	16	12	14	12	12	10	12	8
14	20	20	16	14	12	10	16	8
16	18	14	14	14	12	10	14	8
16	14	12	16	12	12	12	14	10
20	16	12	14	16	12	12	14	7
14	14	14	12	12	12	14	16	7
16	12	14	12	12	12	12	12	7
18	14	14	14	14	14	12	12	10
18	10	12	12	12	12	12	12	8
16	18	12	12	12	14	14	13	10

Figura 12. Promedio y desviación estándar de diámetros de inhibición de LABs vs. *H. pylori* ATCC 51932

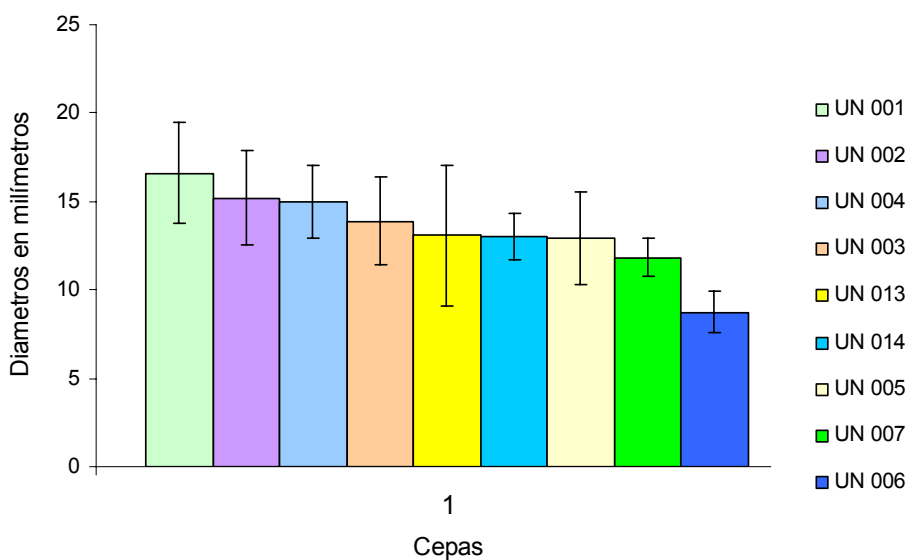


Tabla 17. Prueba Tukey para cocultivos de LABs vs. *H. pylori*

Valor Q BACTERIAS LÁCTICAS	Probabilidad BACTERIAS LÁCTICAS									
	UN001	UN002	UN003	UN004	UN005	UN007	UN013	UN014	UN006	
UN001	-	(0,69) n.s	(0,01) *	(0,51) n.s	0,0001 ***	1,03 <sup>-5</sup> ***	0,0003 ***	0,0001 ***	1,02 <sup>-5</sup> ***	
UN002	2,52	-	(0,77) n.s	(1) n.s	(0,08) n.s	0,0005 ***	(0,15) n.s	(0,11) n.s	1,02 <sup>-5</sup> ***	
UN003	4,87	2,34	-	(0,89) n.s	(0,93) n.s	(0,15) n.s	(0,98) n.s	(0,96) n.s	1,02 <sup>-5</sup> ***	
UN004	2,88	0,36	1,98	-	(0,15) n.s	0,001 **	(0,27) n.s	(0,20) n.s	1,02 <sup>-5</sup> ***	
UN005	6,67	4,15	1,80	3,78	-	(0,89) n.s	(1) n.s	(1) n.s	1,02 <sup>-5</sup> ***	
UN007	8,66	6,13	3,78	5,74	1,98	-	(0,77) n.s	(0,84) n.s	0,003 **	
UN013	6,31	3,78	1,44	3,42	0,36	2,34	-	(1) n.s	1,11 <sup>-5</sup> ***	
UN014	6,49	3,97	1,62	3,60	0,18	2,16	0,18	-	1,20 <sup>-5</sup> ***	
UN006	14,16	11,64	9,29	11,28	7,48	5,50	7,84	7,66	-	

Niveles de significancia n.s= no significativo, \* p< 0.05, \*\* p< 0.01, \*\*\* p< 0.001

## 6.7 Análisis estadístico de antagonismos de extractos proteicos de LABs vs. *H. pylori*

Para este ensayo las cepas seleccionadas fueron las mismas que en el ensayo de cocultivo, salvo que se tomó como control negativo a *L. casei* UN 014. El extracto proteico tomado como control positivo fue *L. cellobiosus* UN 003, puesto que siempre mostró antagonismo contra *H. pylori*, al ensayarse veinte veces durante el tiempo de estudio. Al igual que en cocultivo para el análisis estadístico solo se tomaron las positivas comparadas con un solo control negativo.

Los ocho extractos proteicos escogidos mostraron halos de inhibición sobre *H. pylori*. La tabla 18 contiene el valor de las medidas de los diámetros en milímetros de los halos de inhibición.

Al igual que el cocultivo, se sometieron los datos a una prueba de Shapiro-Wilk. Esta prueba arrojó también un  $p < 0.05$ , indicando nuevamente que los datos no se ajustaban a la normalidad, por lo tanto fue necesario realizar pruebas no paramétricas.

Igualmente los datos se sometieron a una prueba de Kruskal-Wallis (H), la cual arrojó esta vez un H de 75,58 y un  $p < 0.001$ . El análisis de varianza (ANOVA) nos determinó que las diferencias se encontraban en los valores observados del extracto proteico UN 002, indicando esta vez que este extracto era el mejor antagonista que los otros. De la misma forma la hipótesis se construyó con base a la distribución normal, en la cual se espera que algunos extractos sean mucho mejor que los otros. Ver tabla 19.

El promedio de los diámetros del extracto proteico UN 004 fue 27,81 mm y el menor fue el del extracto UN 002 de 14,90 mm. En este caso al analizar los promedios de los diámetros, el extracto de UN 004 muestra ser superior que los demás. Ver figura 13. La desviación estándar fue mucho mayor en los extractos con los mejores diámetros, esto se debe a la gran variabilidad en el rango de los diámetros como sucedió en el caso de los cocultivos. El control negativo siempre fue menor que todos los casos.

Tabla 18. Diámetros de inhibición de extractos de proteínas de LABs vs. *H. pylori* en milímetros

UN 001	UN 002	UN 003	UN 004	UN 005	UN 006	UN 007	UN 013	UN 014
26	16	18	26	24	20	22	22	7
22	18	16	26	20	28	22	24	7
22	14	16	34	20	24	33	28	8
18	18	16	38	20	24	29	30	8
26	16	18	26	18	28	20	26	8
26	12	16	32	20	24	16	26	7
22	12	18	22	22	20	26	28	7
24	14	18	28	24	20	26	28	7
22	16	18	26	20	16	22	30	7
26	16	16	26	20	24	22	28	8
26	12	18	22	18	20	26	24	8



Figura 13. Promedio diámetros de inhibición de extractos proteicos de LABs vs. *H. pylori* ATCC 51932

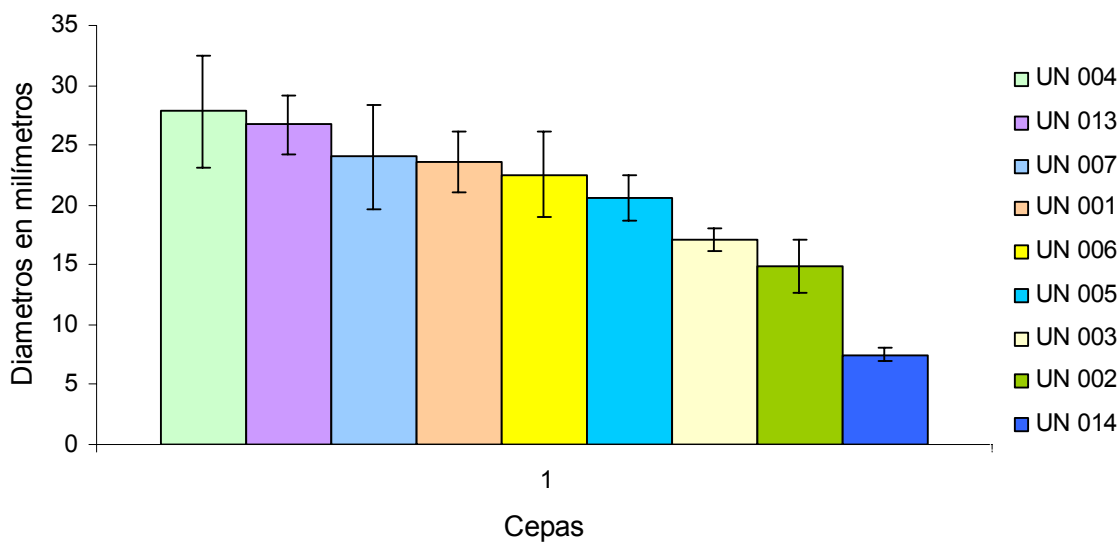


Tabla 19. Prueba de Tukey para antagonismos de extractos proteicos de LABs vs. *H. pylori*

Valor Q PROTEÍNAS BACTERIAS LÁCTICAS	Probabilidad									
	EXTRACTOS PROTEICOS BACTERIAS LÁCTICAS									
	UN001	UN002	UN003	UN004	UN005	UN006	UN007	UN013	UN014	
UN 001	-	0,0001 ***	0,0002 ***	(0,04) n.s	(0,30) n.s	(0,99) n.s	(1) n.s	(0,30) n.s	0,0001 ***	
UN 002	9,49	-	(0,75) n.s	0,0001 ***	(0,001) **	0,0001 ***	0,0001 ***	0,0001 ***	0,0001 ***	
UN 003	7,12	2,37	-	0,0001 ***	(0,17) n.s	(0,002) **	0,0001 ***	0,0001 ***	0,0001 ***	
UN 004	4,55	14,04	11,67	-	0,0001 ***	(0,003) **	(0,09) n.s	(0,99) n.s	0,0001 ***	
UN 005	3,36	6,13	3,75	7,91	-	(0,83) n.s	(0,17) n.s	0,0003 ***	0,0001 ***	
UN 006	1,18	8,30	5,93	5,73	2,17	-	(0,96) n.s	(0,04) n.s	0,0001 ***	
UN 007	0,39	9,89	7,51	4,15	3,15	1,58	-	(0,48) n.s	0,0001 ***	
UN 013	3,36	12,86	10,48	1,18	6,72	4,55	2,96	-	0,0001 ***	
UN 014	17,61	8,11	10,48	22,16	14,24	16,42	18	20,97	-	

Niveles de significancia n.s= no significativo, \* p< 0.05, \*\* p< 0.01, \*\*\* p< 0.001

## 6.8 FRACCIONAMIENTO DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR LABs

Siempre antes de cargar la muestra en la columna se procedió a cuantificar el extracto proteico; el extracto proteico de *L. paracasei paracasei* UN 002 estaba a una concentración de 770.800 ng/mL, y el de UN 013 a 12.600 ng/mL. Se realizó un total de trece cromatografías, de estas doce pertenecieron a la cepa *S. salivarius termophilus* UN 013 y una para el extracto de UN 002. La muestra se paso por una columna de 10 cm de largo por 1 cm de ancho. Se recogieron un total de 60 fracciones las cuales fueron montadas en cuatro geles de poliacrilamida. Posteriormente las fracciones fueron recuperadas en un volumen de 2 mL y precipitadas con TCA a una concertación del 5%.

Para la cromatografía de la muestra UN 013 se cargo la cantidad antes mencionada en 1mL de volumen, se recogieron un total de 30 fracciones de 2 mL cada una (Figura 14). Al cabo de 2 horas las muestras se recogieron y se reunieron de a dos para ser precipitadas y posteriormente se montaron en 2 geles de poliacrilamida (Figura 15). El gel que se muestra fue aquel donde se observan bandas.

Como lo muestra el cromatograma, una gran cantidad de proteínas salen inicialmente. Eso es respaldado con el gel de la figura 16, dado que la mayor concentración de proteínas sale en las primeras fracciones. En las fracciones posteriores como es de esperarse, la concentración de proteínas baja. Aunque en el cromatograma el detector UV detecta muestra proteica en las fracciones avanzadas en el gel con tinción con plata la detección de estas fue baja o nula.

Posteriormente la muestra precipitada se resuspendió en 100  $\mu$ L de tampón TE. De esta solución se tomo 20  $\mu$ L para ser cargados en el gel y 80  $\mu$ L se probaron en antagonismo *In vitro* con *H. pylori*, obteniendo en todos los casos resultados negativos para los halos.

Figura 14. Cromatograma *S. salivarius termophilus* UN 013

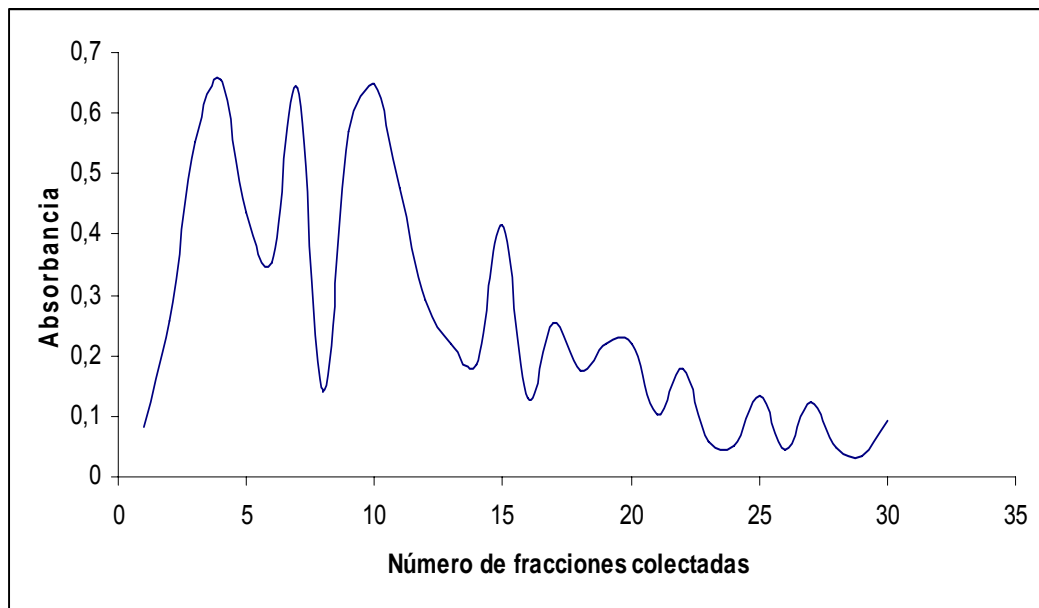
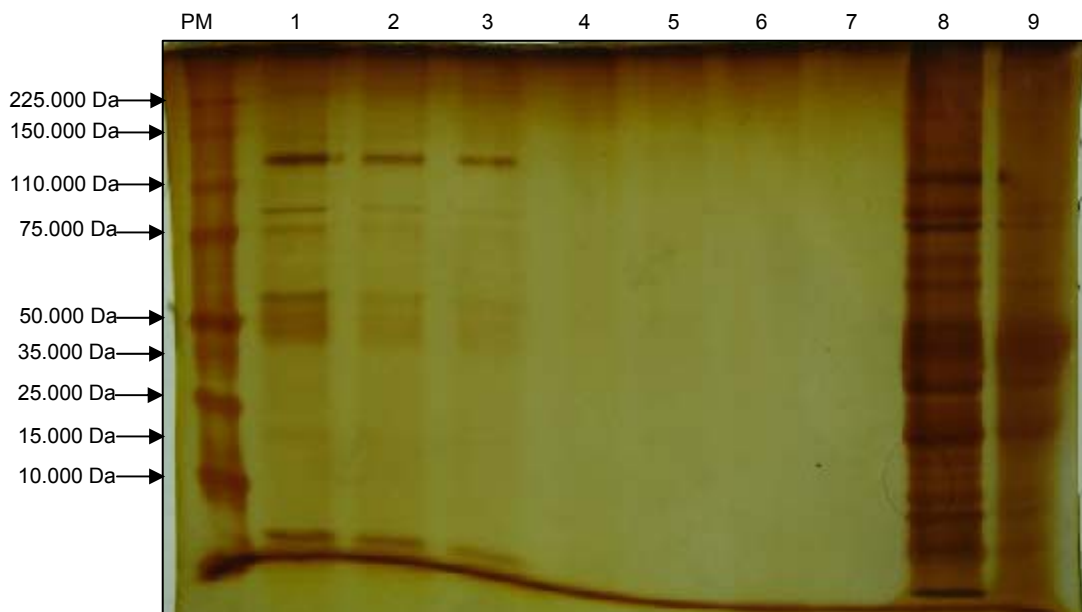


Figura 15. Gel fracciones Cromatograma *S. salivarius termophilus* UN 013. PM: marcador de peso molecular Promega V849A. 1: fracción 1-2; 2: fracción 3-4; 3: fracción 5-6; 4: fracción 7-8; 4: fracción 9-10; 5: fracción 11-12; 6: fracción 13-14; 6: fracción 15-16; 7: fracción 17-18; 8: proteína control; 9: proteína control



En la cromatografía de la muestra UN 002 se cargo la cantidad antes mencionada en 1mL de volumen, se recogieron un total de 60 fracciones de 2 mL cada una (Figura 16). Al cabo de 4 horas las muestras se recogieron y se reunieron de a tres para ser precipitadas y posteriormente se montaron en 4 geles de poliacrilamida (Figura 17). El gel que se muestra fue aquel donde aparecen bandas.

En la figura 16 se observa que en las primeras veinte fracciones salen la mayor cantidad de proteínas corroborándose en el gel de la figura 17. Como en el caso anterior las fracciones posteriores solo fueron detectadas por UV mientras que en el gel la tinción con plata no detecto ninguna banda. (Dato no mostrado)

De la misma manera que se realizó con las fracciones anteriores, la muestra precipitada se resuspendió en 100  $\mu$ L de tampón TE. De esta solución se tomó 20  $\mu$ L para ser cargados en el gel y 80  $\mu$ L se probaron en antagonismo *In vitro* con *H. pylori*, obteniendo nuevamente en todos los casos resultados negativos para los halos.

Figura 16. Cromatograma *L. paracasei paracasei* UNCIB 002

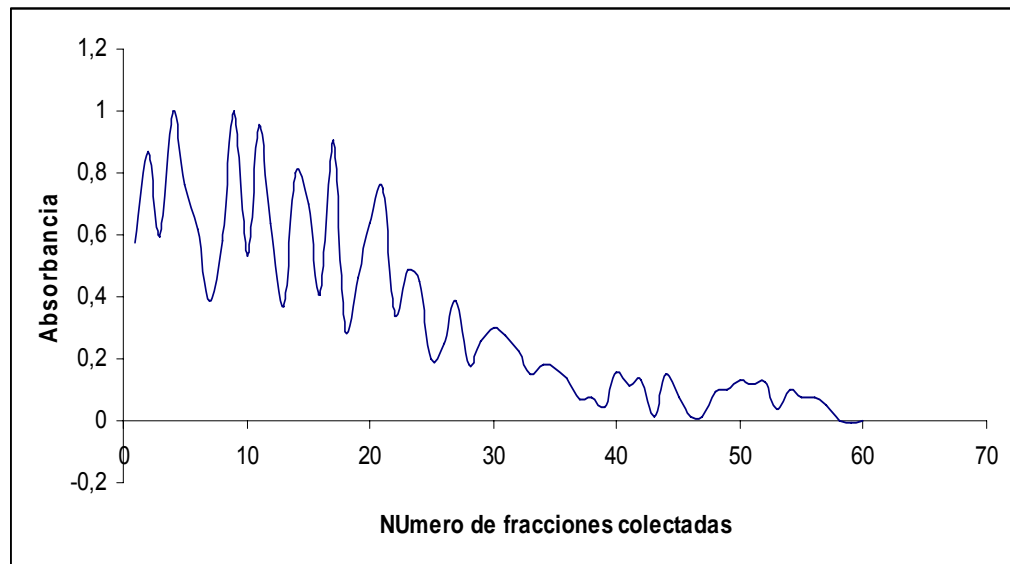
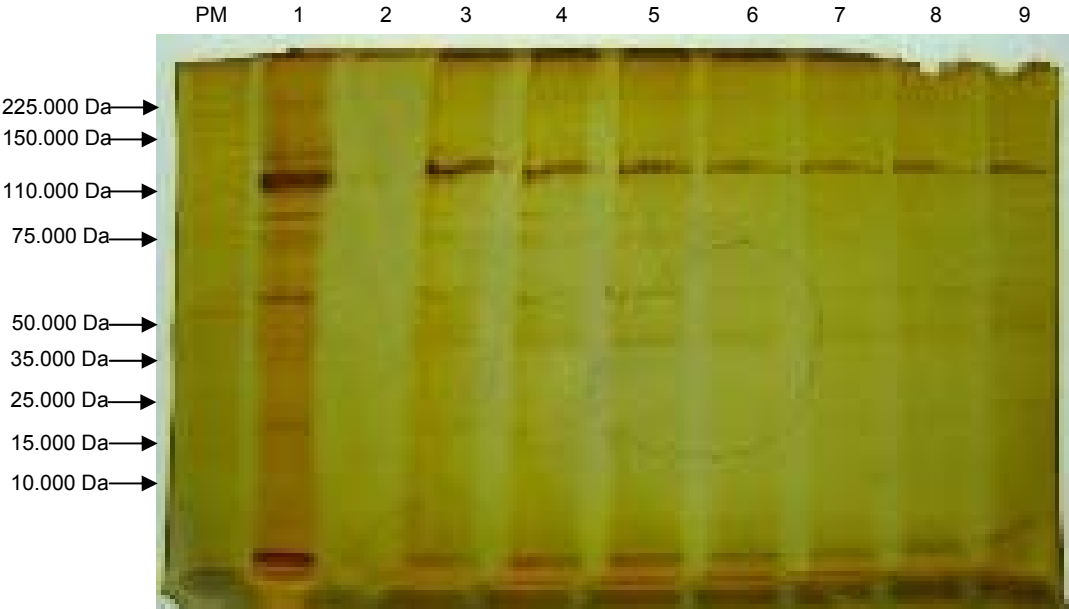


Figura 17. Gel fracciones *L. paracasei paracasei* UNCIB 002. PM: marcador de peso molecular Promega V849A; 1: proteína control; 2: fracción 1-3; 3: fracción 4-6; 4: fracción 7-9; 5: fracción 10-12; 6: fracción 13-15; 7: fracción 16-18; 8: fracción 19-21; 9: fracción 22-24



## 6.9 ESTABILIDAD Y DIGESTIBILIDAD DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS DE LABs

Con el fin de conocer si los extractos proteicos de las cepas con mejor actividad bacteriocinogénica eran estables a cambios de pH propios del estómago (ácido) y el intestino (básico), a cambios de temperatura desde fisiológicos a extremos (crio y termoestabilidad), y digeribles por proteasas como tripsina, quimotripsina y proteinasa K, se montaron ensayos de estabilidad y digestibilidad *In vitro* los cuales fueron monitoreados en geles de acrilamida.

6.9.1 Estabilidad de los extractos proteicos a cambios de pH y temperatura. Dado que nunca se observaron cambios remarcables de los extractos proteicos sometidos a solo pH o solo temperatura, se decidió combinar los tratamientos sobre las mismas muestras. Al someter las muestras a pH como 2 y 11 ó temperaturas extremas como -20°C y 100°C, en general los cuatro extractos de las cuatro cepas no presentan cambio importantes en su patrón de bandeos. (Tabla 20, tabla 21, tabla 22, tabla 23). Por ejemplo en el caso del extracto de *L. casei rhamnosus* UN 001, *L. paracasei paracasei* UN 002 y *Lactobacillus sp.* UN 004, se puede observar que la degradación de bandas fue muy baja dado que en un conteo de bandas más o menos riguroso comparando el control (C, no tratado), se observa la pérdida de una o dos bandas máximo, conservando prácticamente el mismo patrón. De otra parte, las muestras que presentaron el mayor número de cambios fueron las de *L. cellobiosus* UN 003, carriles B1, B5, B6. (Tabla 22-figura 21).

Las cinco cepas restantes seleccionadas, que tuvieron menor actividad bacteriocinogénica *L. salivarius* UN 005, *L. acidophilus* UN 006, *L. pentosus* UN 007, *S. salivarius thermophilus* UN 013, *L. casei defensis* UN 014 tampoco presentaron cambios significativos en sus bandeos (dato mostrado). En general los cambios importantes de en estos tratamientos sucedieron a 100°C con diferentes pH.

6.9.2 Digestibilidad de los extractos proteicos con proteasas. Con el fin de conocer o saber que grado de digestibilidad tenían los extractos de las cepas probióticas aisladas de adultos, se sometieron a digestión con proteasas.

En los ensayos de actividad proteasica cuatro cepas resultaron ser más susceptibles que las cuatro restantes.

Es importante aclarar que para este ensayo el conteo de bandas como se supone no tiene relación en lo absoluto con el patrón control, dado que una proteína puede ser digerida por una proteasa en un solo sitio apareciendo posteriormente una o dos bandas. Las bandas de las proteasa que normalmente deben aparecer en el gel son señaladas en un recuadro rojo para distinguir del patrón de las LABs

Los datos en las tablas se construyeron a partir de los patrones de bandeo. Cada celda indica el número de bandas posterior a la digestión y al carril en el gel que corresponde. Los patrones de bandeo provenientes de UN 001 y UN 002 se encuentran en la tabla 24 (figura 22, gel A y B). *L. cellobiosus* UN 003, se encuentra en la tabla 24 (figura 22, gel B) y tabla 25 (figura 23, gel A). *Lactobacillus sp.* UN 004 se encuentra en la tabla 25 (figura 23, gel A). El digerido de *L. salivarius* UN 005 se encuentra en la tabla 25 (figura 23, gel B) y en la tabla 26 (figura 24, gel A). *L. acidophilus* UN 006, se encuentra en la tabla 26 (figura 24, gel A y B). *L. pentosus* Un 007 se encuentra en la tabla 27 (figura 25, gel A), y UN 013 está en la tabla 27 (figura 25, gel B).

Los extractos proteicos que secretan las cepas *L. casei rhamnosus* UN 001 y *L. paracasei paracasei* UN 002, son bastante susceptibles a la actividad proteasica de tripsina, proteinasa K y quimotripsina (tabla 24-figura 22). Estimándose que el 90% del las bandas fueron digeridas completamente. En el caso del extracto de *L. cellobiosus* UN 003, presenta susceptibilidad a proteasas del aparato digestivo (tripsina y quimotripsina bovinas) pero algunas bandas son menos digeribles por proteasas excretadas al ambiente como proteinasa K (*Tritirachium album*) (tabla 24-figura 22; tabla 25-figura 23). En el caso de *Lactobacillus sp.* UN 004, fue también bastante susceptible a la actividad de las tres proteasas. (Tabla 25-figura 23). En el caso de *L. salivarius* UN 005, algunas de sus bandas no fueron digeridas totalmente por las tres proteasas (tabla 25-figura 23 y tabla 26-figura 24). Así mismo el patrón de bandeo de *L. acidophilus* UN 006, no fue digerido en su totalidad (tabla 26-figura 24, gel A y B). Para *L. pentosus* UN 007, las proteasas como proteinasa K y quimotripsina degradaron más bandas que tripsina (tabla 27-figura 25, gel A). *S. salivarius thermophilus* UN 013, fueron digeridos por proteinasa K y quimotripsina, pero algunas bandas del patrón no fueron susceptibles a tripsina (tabla 27-figura 25, gel B).

En general los extractos proteicos que contienen bacteriocinas son bastante susceptibles a la acción de las proteasas. Estos extractos tratados con cambios de temperatura-pH y proteasas no fueron considerados para incluirse dentro de los pocillos de los cultivos de *H. pylori*, dado que pueden afectar la inhibición por la bacteriocina tanto de manera positiva como de manera negativa como se discutirá mas adelante. Será ideal tratar las muestras, ajustar el pH, precipitar las proteínas y resuspender nuevamente. En el caso de las proteasas será más complejo de tratar dado que es necesario o purificar la bacteriocina para conocer la digestibilidad real o retirar la proteasa del extracto.

Tabla 20. Ensayo de temperatura y pH sobre UN 001

UN 001		TEMPERATURA				
		-20°C	4°C	37°C	45°C	100°C
pH	2	12 (A1)	12 (A6)	12 (A11)	11 (B3)	11 (B8)
	5	12 (A2)	12 (A7)	12 (A12)	11 (B4)	11 (B9)
	7	12 (A3)	12 (A8)	12 (A13)	11 (B5)	11 (B10)
	9	12 (A4)	12 (A9)	11 (B1)	11 (B6)	11 (B11)
	11	12 (A5)	12 (A10)	11 (B2)	11 (B7)	11 (B12)

Figura 18. Geles ensayo de temperatura y pH sobre UN 001

Gel A. PM: marcador de peso molecular. 1: pH 2 -20°C; 2: pH 5 -20°C; 3: pH: 7 -20°C; 4: pH 9 -20°C; 5: pH 11 -20°C; 6: pH 2 4°C; 7: pH 5 4°C; 8: pH: 7 4°C; 9: pH 9 4°C; 10: pH 11 4°C; 11: pH 2 37°C; 12: pH 5 37°C; 13: pH 7 37°C; 14: proteína control

Gel B PM: marcador de peso molecular. 1: pH 9 37°C; 2: pH 11 37°C; 3: pH: 2 45°C; 4: pH 5 45°C; 5: pH 7 45°C; 6: pH 9 45°C; 7: pH 11 45°C; 8: pH: 2 100°C; 9: pH 5 100°C; 10: pH 7 100°C; 11: pH 9 100°C; 12: pH 11 100°C; 13: proteína control

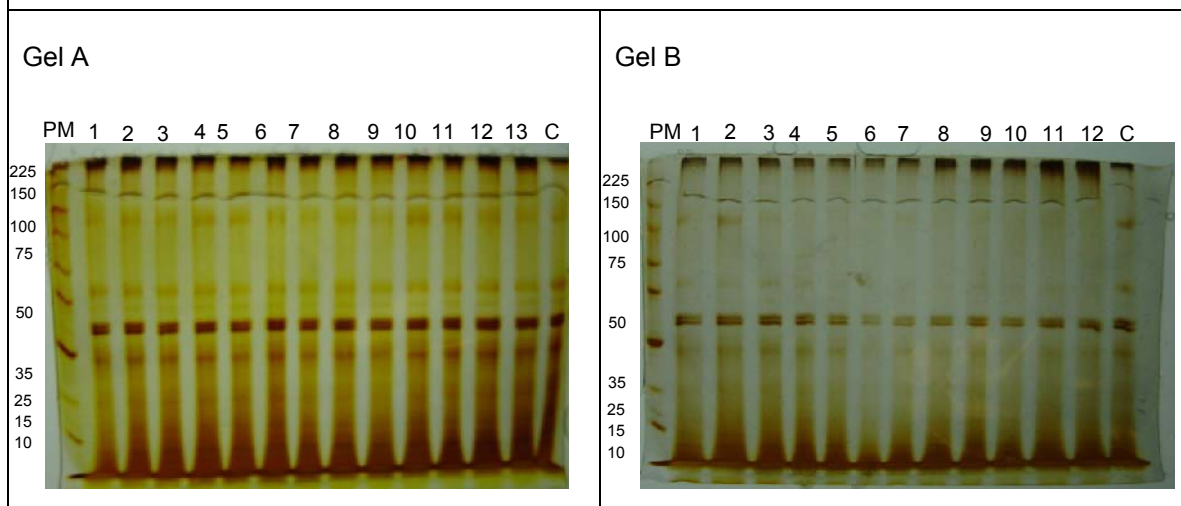




Tabla 21. Ensayo de temperatura y pH sobre UN 002

UN002		TEMPERATURA				
		-20°C	4°C	37°C	45°C	100°C
pH	2	15 (A1)	15 (A5)	15 (A10)	16 (B3)	16 (B8)
	5	15 (A2)	15 (A6)	15 (A11)	16 (B4)	16 (B9)
	7	15 (A3)	15 (A7)	15 (A12)	16 (B5)	16 (B10)
	9	15 (A4)	15 (A8)	16 (B1)	16 (B6)	16 (B11)
	11	15 (A4)	15 (A9)	16 (B2)	16 (B7)	16 (B12)

Figura 19. Geles ensayo de temperatura y pH sobre UN 002

Gel A PM: marcador de peso molecular. 1: pH 2 -20°C; 2: pH 5 -20°C; 3: pH: 7 -20°C; 4: pH 9 -20°C; 5: pH 11 -20°C; 6: pH 2 4°C; 7: pH 5 4°C; 8: pH: 7 4°C; 9: pH 9 4°C; 10: pH 11 4°C; 11: pH 2 37°C; 12: pH 5 37°C; 13: pH 7 37°C; 14: proteína control

Gel B PM: marcador de peso molecular. 1: pH 9 37°C; 2: pH 11 37°C; 3: pH: 2 45°C; 4: pH 5 45°C; 5: pH 7 45°C; 6: pH 9 45°C; 7: pH 11 45°C; 8: pH: 2 100°C; 9: pH 5 100°C; 10: pH 7 100°C; 11: pH 9 100°C; 12: pH 11 100°C; 13: proteína control

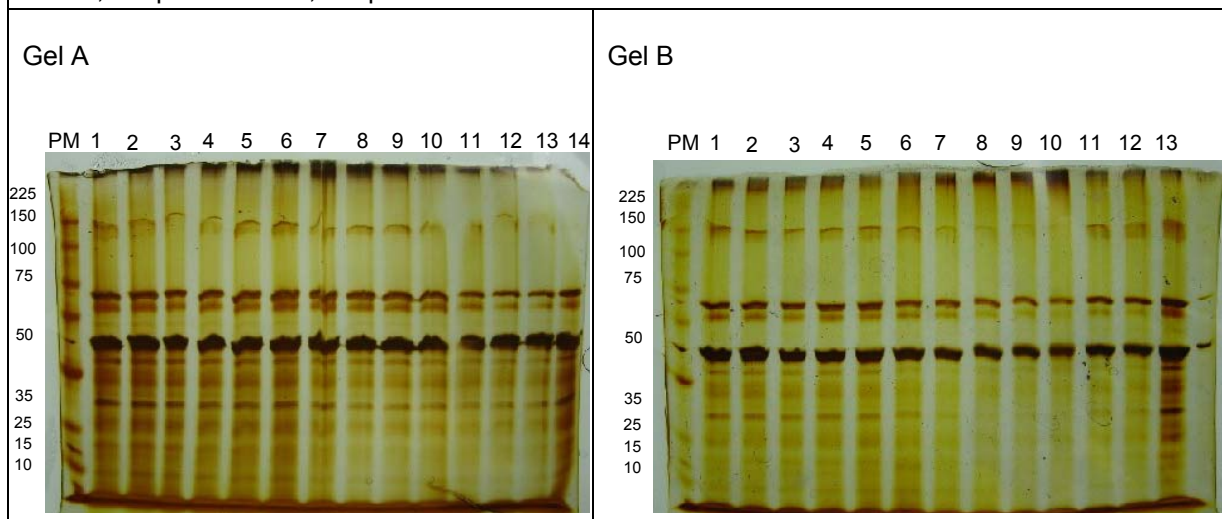


Tabla 22. Ensayo de temperatura y pH sobre UN 003

UN003		TEMPERATURA				
		-20°C	4°C	37°C	45°C	100°C
Ph	2	20 (A1)	20 (A6)	20 (A11)	19 (B3)	19 (B8)
	5	20 (A2)	20 (A7)	20 (A12)	19 (B4)	19 (B9)
	7	20 (A3)	20 (A8)	20 (A13)	19 (B5)	20 (B10)
	9	20 (A4)	20 (A9)	13 (B1)	19 (B6)	19 (B11)
	11	20 (A5)	20 (A10)	19 (B2)	19 (B7)	19 (B12)

Figura 20. Geles ensayo de temperatura y pH sobre UN 003

Gel A. PM: marcador de peso molecular. 1: Ph 2 -20°C; 2: Ph 5 -20°C; 3: Ph: 7 -20°C; 4: Ph 9 -20°C; 5: Ph 11 -20°C; 6: Ph 2 4°C; 7: Ph 5 4°C; 8: Ph: 7 4°C; 9: Ph 9 4°C; 10: Ph 11 4°C; 11: Ph 2 37°C; 12: Ph 5 37°C; 13: Ph 7 37°C; 14: proteína control

Gel B. PM: marcador de peso molecular. 1: Ph 9 37°C; 2: Ph 11 37°C; 3: Ph: 2 45°C; 4: Ph 5 45°C; 5: Ph 7 45°C; 6: Ph 9 45°C; 7: Ph 11 45°C; 8: Ph: 2 100°C; 9: Ph 5 100°C; 10: Ph 7 100°C; 11: Ph 9 100°C; 12: Ph 11 100°C; 13: proteína control

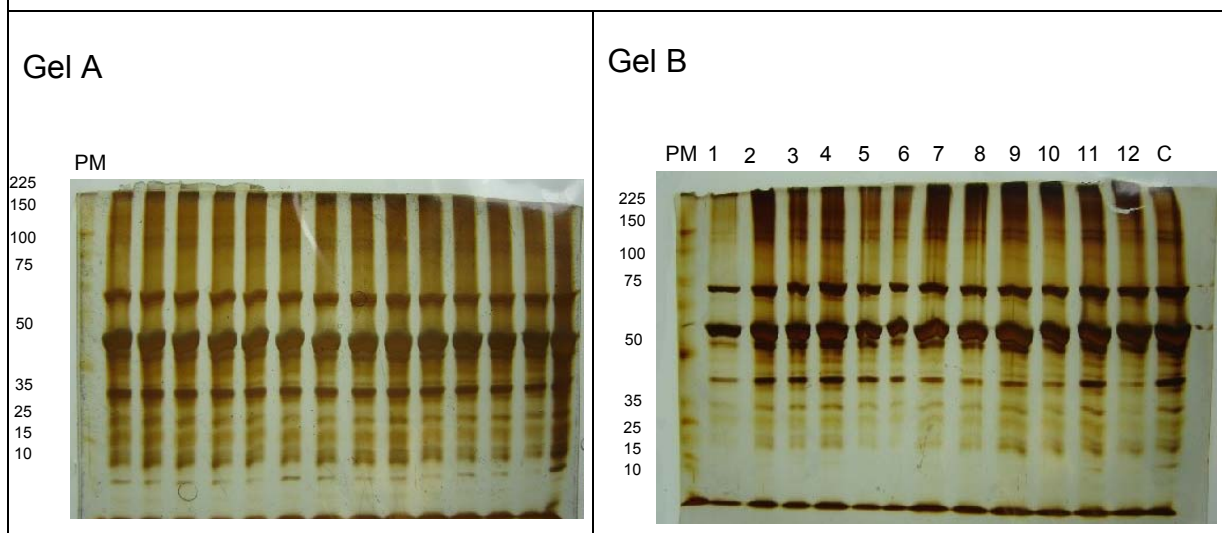


Tabla 23. Ensayo de temperatura y pH sobre UN 003

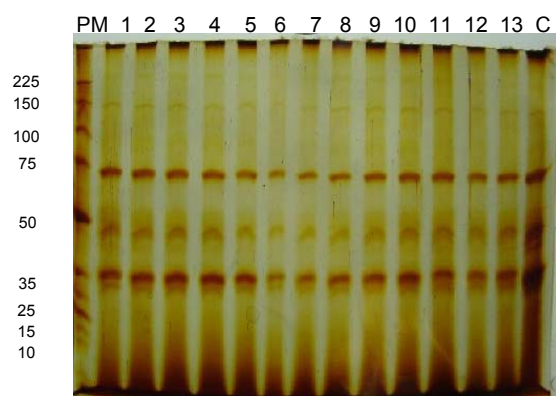
UN004		TEMPERATURA				
		-20°C	4°C	37°C	45°C	100°C
pH	2	11 (A1)	11 (A6)	11 (A11)	14 (B3)	12 (B8)
	5	11 (A2)	11 (A7)	11 (A12)	12 (B4)	12 (B9)
	7	11 (A3)	11 (A8)	11 (A13)	12 (B5)	12 (B10)
	9	11 (A4)	11 (A9)	12 (B1)	12 (B6)	12 (B11)
	11	11 (A5)	11 (A10)	12 (B2)	12 (B7)	12 (B12)

Figura 21. Geles ensayo de temperatura y pH sobre UN 004

Gel A. PM: marcador de peso molecular. 1: pH 2 -20°C; 2: pH 5 -20°C; 3: pH: 7 -20°C; 4: pH 9 -20°C; 5: pH 11 -20°C; 6: pH 2 4°C; 7: pH 5 4°C; 8: pH: 7 4°C; 9: pH 9 4°C; 10: pH 11 4°C; 11: pH 2 37°C; 12: pH 5 37°C; 13: pH 7 37°C; 14: proteína control

Gel B. PM: marcador de peso molecular. 1: pH 9 37°C; 2: pH 11 37°C; 3: pH: 2 45°C; 4: pH 5 45°C; 5: pH 7 45°C; 6: pH 9 45°C; 7: pH 11 45°C; 8: pH: 2 100°C; 9: pH 5 100°C; 10: pH 7 100°C; 11: pH 9 100°C; 12: pH 11 100°C; 13: proteína control

Gel A



Gel B

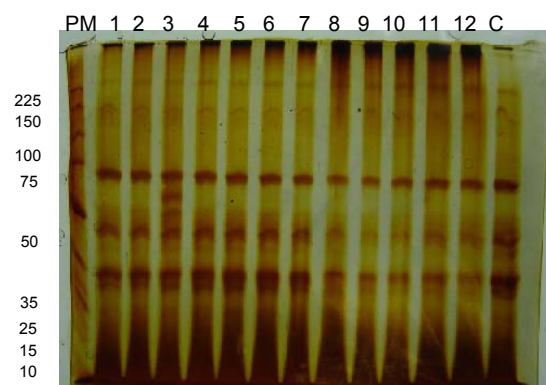


Tabla 24. Ensayo de Digestibilidad sobre UN 001–UN 002–UN 003

Tiempo (minutos)	UN 001 – UN 002 – UN 003 ENZIMAS								
	5	3 (A2T)	2 (A5P)	2 (A8Q)	2 (A12T)	8 (B2P)	6 (B5Q)	2 (B9T)	7(B12P)
	10	3 (A3T)	2 (A6P)	1 (A9Q)	1 (A13T)	8 (B3P)	7 (B6Q)	0(B10T)	6(B13P)
	15	3 (A4T)	2(A7P)	0 (A10Q)	1 (A14T)	8 (B4P)	7 (B7Q)	0(B11T)	5(B14P)

Figura 22. Gel digestibilidad UN 001-UN 002-UN003

Gel A.PM: marcador de peso molecular. 1: proteína control UN 001 ; 2: UN 001 5T; 3: UN 001 10T; 4: UN 001 15T; 5: UN 001 5P; 6: UN 001 10P; 7: UN 001 15P; 8: UN 001 5Q; 9: UN 001 10Q; 10: UN 001 15Q; 11: proteína control UN 002; 12: UN 002 5T; 13: UN 002 10T; 14: UN 002 15T

Gel B. PM: marcador de peso molecular. 1: proteína control UN 002; 2: UN 002 5P; 3: UN 002 10P; 4: UN 002 15P; 5: UN 002 5Q; 6: UN 002 10Q; 7: UN 002 15Q; 8: proteína control UN 003; 9: UN 003 5T; 10: UN 003 10T; 11: UN 003 15T; 12: UN 003 5P; 13: UN 003 10P; 14: UN 003 15P

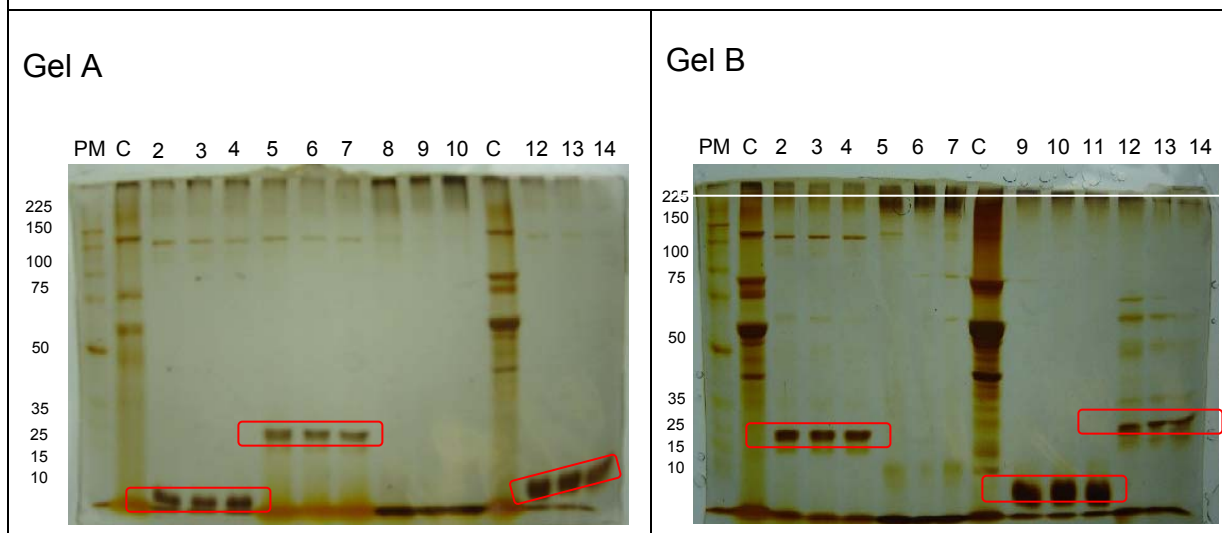


Tabla 25. Ensayo de Digestibilidad sobre UN 003–UN 004–UN 005

		UN 003 – UN 004 – UN 005 ENZIMAS					
Ph	5	2 (A2Q)	2 (A6T)	2 (A9P)	2 (A12Q)	5 (B2P)	5 (B5P)
	10	2 (A3Q)	2 (A7T)	2 (A10P)	2 (A13Q)	5 (B2P)	5 (B6P)
	15	2 (A4Q)	2 (A8T)	2 (A11P)	1 (A14Q)	5 (B4P)	5 (B7P)

Figura 23. Gel digestibilidad UN 003-UN 004-UN005

Gel A. PM: marcador de peso molecular. 1: proteína control UN 003; 2: UN 003 5Q; 3: UN 00310Q; 4: UN 003 15Q; 5: proteína control UN 004; 6: UN 004 5T; 7: UN 004 10T; 8: UN 004 15T; 9: UN 004 5P; 10: UN 004 10P; 11: UN 004 15P; 12: UN 004 5Q; 13: UN 004 10Q; 14: UN 004 15Q

Gel B. PM: marcador de peso molecular. 1: proteína control UN 005; 2: UN 005 5P; 3: UN 005 10P; 4: UN 005 15P; 5: UN 005 5Q; 6: UN 005 10Q; 7: UN 005 15Q

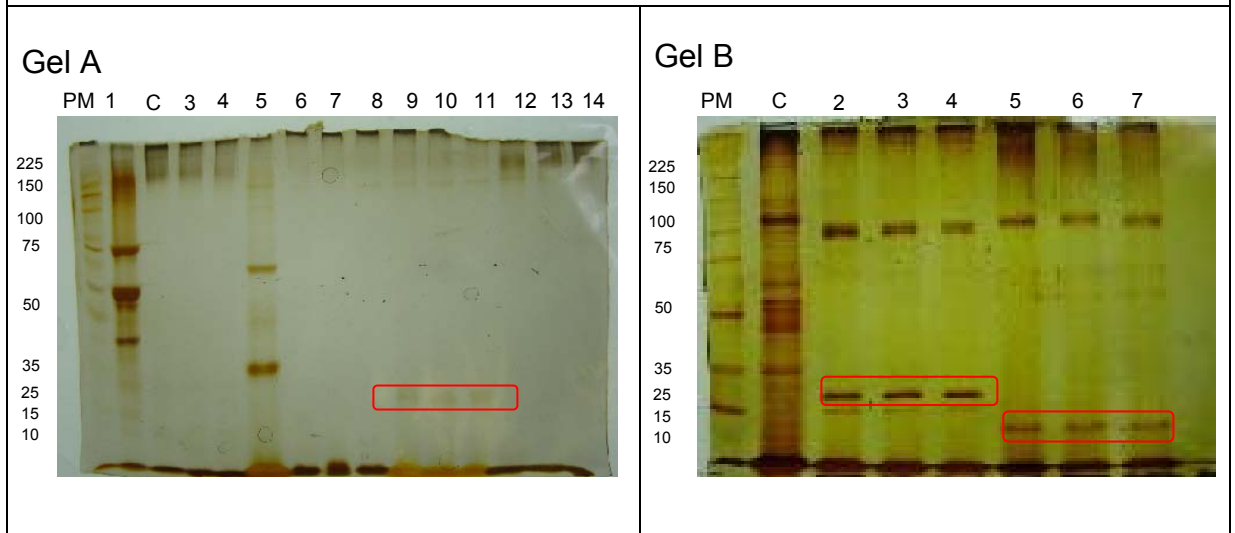


Tabla 26. Ensayo de Digestibilidad sobre UN 005–UN 006

UN 005 – UN 006 ENZIMAS					
Ph	5	10 (A2T)	8 (A6T)	12 (B2P)	8 (B5Q)
	10	10 (A3T)	7 (A7T)	10 (B3P)	6 (B6Q)
	15	10 (A4T)	7 (A8T)	12 (B4P)	5 (B7Q)

Figura 24. Gel digestibilidad UN 005-UN 006

Gel A. PM: marcador de peso molecular. 1: proteína control UN 005; 2: UN 005 5T; 3: UN 005 10T; 4: UN 005 15T; 5: proteína control UN 006; 6: UN 006 5T; 7: UN 006 10T ; 8 : UN 006 15T

Gel B. PM: marcador de peso molecular. 1: proteína control UN 006; 2: UN 006 5P; 3: UN 006 10P; 4: UN 006 15P; 5: UN 006 5Q; 6: UN 006 10Q; 7: UN 006 15Q

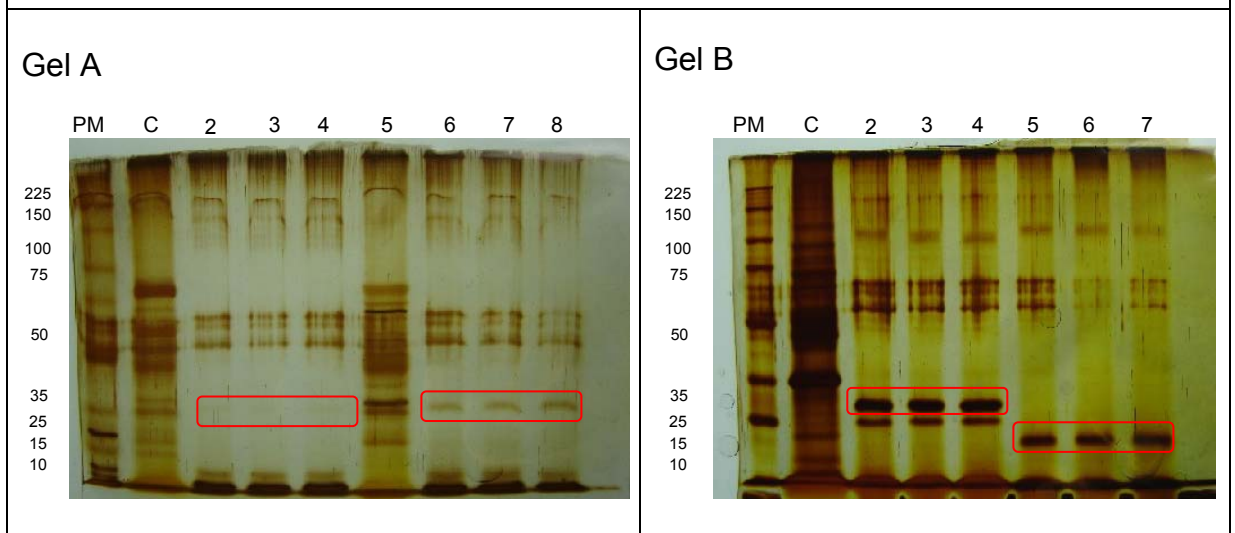


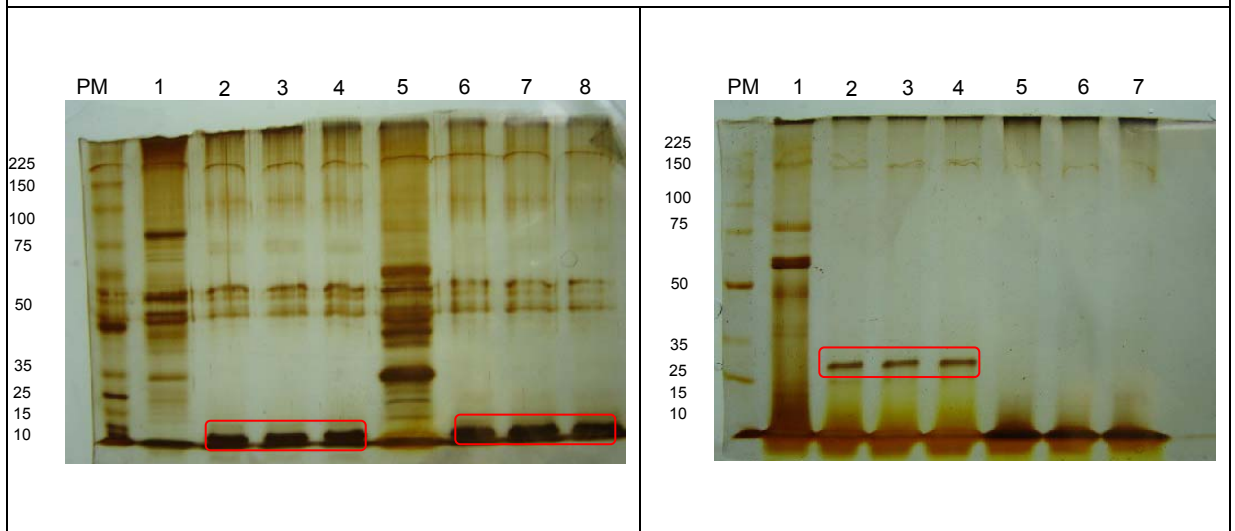
Tabla 27. Ensayo de Digestibilidad sobre UN 007–UN 013

		<b>UN 007 – UN 0013 ENZIMAS</b>				
<b>pH</b>	5	8 (A2T)	8 (A6T)	1 (B2P)	0 (B5Q)	
	10	6 (A3T)	6 (A7T)	1 (B3P)	0 (B6Q)	
	15	7 (A4T)	6 (A8T)	0 (B4P)	0 (B7Q)	

Figura 25. Gel digestibilidad UN 007-UN 013

Gel A. PM: marcador de peso molecular. 1: proteína control UN 007; 2: UN 007 5T; 3: UN 007 10T; 4: UN 007 15T; 5: proteína control UN 013; 6: UN 013 5T; 7: UN 013 10T ; 8 : UN 013 15T

Gel B. PM: marcador de peso molecular. 1: proteína control UN 007; 2: UN 007 5P; 3: UN 007 10P; 4: UN 007 15P; 5: UN 007 5Q; 6: UN 007 10Q; 7: UN 007 15Q



## 7. DISCUSION

Varios trabajos han revisado ampliamente el estudio y la aplicación de bacteriocinas<sup>192,193,194</sup> y mas específicamente algunos han estudiado su actividad contra patógenos<sup>195,196,197,198</sup> y específicamente algunos ya han investigado la actividad bacteriocinogenica de las LABs sobre *H. pylori*<sup>199,200</sup>. El propósito de este trabajo ha sido el de contribuir sobre este último aspecto, específicamente utilizando LABs nativas contra un *Helicobacter* de la colección ATCC, como ya lo han hecho otros autores<sup>201</sup>.

### 7.1 MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS

La colecta de bacterias lácticas probióticas (LABs), y el buen mantenimiento de su cepario garantiza su buen uso y estabilidad genética de las cepas en ensayos *In vitro* como los antagonismos.

No siempre es el caso para *H. pylori*, puesto que dicha bacteria es muy sensible a las condiciones a las que esta expuesta de manera *In vitro*, una de ellas es la poca viabilidad una vez aislada y repicada, la capacidad que tiene de cambiar su morfología (de bacilo a coco) y que a su vez esta implicado con el grado de patogenicidad de la cepa, así mismo esta bacteria es muy sensible a contaminación, debido a que el medio en el que se desarrolla esta suplementado con sangre la cual brinda una gran cantidad de nutrientes que facilitan la supervivencia de microorganismos oportunistas. Otro factor importante que hay que tener en cuenta es el hecho de que la cepa proviene biopsias gástricas, donde este puede estar acompañadas de microorganismos que hacen parte de la microbiota normal humana, y que puede afectar el proceso de purificación de la cepa<sup>202</sup>.

---

<sup>192</sup> BAREFOOT, S. F. & C. G. NETTLESS. Op cit. Pág. 40

<sup>193</sup> CHEN, H. & D. G. HOOVER. Op cit. Pág. 28

<sup>194</sup> JACK, R. W., TAGG, J. R. & B. RAY. Op cit. Pág. 39

<sup>195</sup> CHAVEERACH, P., LIPMAN, L. J. A. & F. van KNAPAN. Op cit. Pág. 37

<sup>196</sup> MICHETTI, P., DORTA, G., WIESEL, P. H., BRASSART, D., VERDE, E., HERRANZ, M., FELLE, C., PORTA, N., ROUVET, M., BLUM, A. L. & I. CORTHESEY-THEULAZ. Op cit. Pág. 28

<sup>197</sup> LORCA, G. L., WANDASTROM, T., FONT DE VALDEZ, G. & A. LJUNGH. Op cit. Pág. 38

<sup>198</sup> KIM, T. S., HUR, J. W., YU, M. A., CHEIGH, C. I., KIM, K.N., HWANG, J. K. & Y. R. PYUN. Op cit. Pág. 29

<sup>199</sup> SGOURAS, D., MARAGKOUidakis, P., PETRAKI, K., MARTINEZ, B., ERITOU, E., MICHOPoulos., KALANTZOPOULOS, G., TSAKAÑIDOU, E. & A. MENTIS. Op cit. Pág. 29

<sup>200</sup> ROKKA, S., PIHLANTO, A., KORHONEN, H. & V. JOUTSJOKI. Op cit. Pág. 29

<sup>201</sup> MONTES, A., SANTACRUZ, A., SAÑUDO, A. & A. PAZOS. Op cit. Pág. 28

<sup>202</sup> REBERIRO, M. L., GODOY, A. P., BENUENGO, H. B., ECLISSATO, C., MENDOCA, C. & J. PEDRAZZOLI. The influence of endoscopy procedures upon the contamination of *Helicobacter pylori* cultures. Arq Gastroenterol. 2004, 41(2): 100-103.



En nuestro caso fue muy importante hacer crecer las bacterias lácticas y mantenerlas en un medio como el de *H. pylori* dado que este era el único medio posible en el cual se hubiese podido hacer los antagonismos. El buen logro de los antagonismos obtenidos siempre dependieron del buen mantenimiento de la cepa de *H. pylori*, su preservación y la no contaminación del medio agar sangre todos los cocultivos *In vitro*. Hasta la fecha no tenemos referencia de un cocultivo de este tipo, pero otros medios para este tipo de cocultivos han permitido estandarizar técnicas similares<sup>203</sup>.

## 7.2 COCULTIVOS DE LABs vs *H. pylori*

De diecisiete cepas LABs probadas en cocultivo con *H. pylori* ATCC 51932, solo ocho resultaron ser antagonistas del patógeno (Tabla 9). Los halos de inhibición no tuvieron ni las mismas características, coloración y tamaño. Lo que sugiere que las LABs excretan diversas sustancias como metabolitos secundarios, antagonistas orgánicos y proteicos, e incluso plásmidos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos de manera *In vitro* e *In vivo*<sup>204</sup>. Esto ha sido ampliamente probado en otros trabajos llevados a cabo para especies como *L. acidophilus* CRL 639<sup>205</sup>, *L. gasseri* UO 002, *L. acidophilus* UO 001, *L. johnsonii* La1 (sinónimo *L. acidophilus*), *L. rhamnosus* HN001 (sinónimo *L. casei rhamnosus*), *L. salivarius*<sup>206,207,208</sup>, *L. casei rhamnosus*<sup>209</sup> Lcr35<sup>210</sup>, *L. casei*, y *L. reuteri*<sup>211, 212</sup>, *L. casei rhamnosus* (LGG)<sup>213</sup>. No tenemos referencia de estudio similares en *L. pentosus*, *L. paracasei paracasei*, *S. salivarius thermophilus*, *Lactobacillus sp.*

Especies como *Lactococcus lactis*, y varios *Lactobacillus sp* (UN 010A, UN 010B, UN 010C, UN 010D, UN 010E, UN 010F, UN 010G) no formaron halos en cocultivo con *H. pylori* ATCC 51932. *Lactococcus lactis* ha sido empleado como bacteria probiótica contra algunos patógenos<sup>214</sup>. En este estudio esta cepa no mostró esa potencialidad frente a *H. pylori*.

<sup>203</sup> KIM, T. S., HUR, J. W., YU, M. A., CHEIGH, C. I., KIM, K.N., HWANG, J. K. & Y. R. PYUN. Op cit. Pág. 29

<sup>204</sup> LORCA, G. L., WANDASTROM, T., FONT DE VALDEZ, G. & A. LJUNGH. Op cit. Pág. 38

<sup>205</sup> Ibid

<sup>206</sup> SERVIN, A. L. Op cit. Pág. 31

<sup>207</sup> MICHETTI, P. Lactobacilli for the mangement of *Helicobacter pylori*. Nutrition. 2001, 17 (3): 268-269.

<sup>208</sup> FELLE, C. & P. MICHETTI. Probiotics and Helicobacter pylori. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 2003, 17 (5): 785-791.

<sup>209</sup> MONTES, A., SANTACRUZ, A., SAÑUDO, A. & A. PAZOS. Op cit. Pág. 28

<sup>210</sup> DE CHAMPS, C., MARONCLE, N., BALESTRINO, D., RICH, C. & C. FORESTIER. Persistente of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Latobacillus casei* Subs., *rhamnosus* Lcr35, after oral consumption. Journal of Clinical Microbiology. 2003, 41 (3): 1270-1273.

<sup>211</sup> WENDAKOON, C. .N, THOMPSON, A. B. & L. OZIMEK. Lack of therapeutic effect of a specially designed yogurt for the eradication of *Helicobacter pylori* infection. Digestion. 2002, 65 (1): 16-20.

<sup>212</sup> MUKAI, T., ASASAKA, T., SATO, E., MORI, K., MATSUMOTO, M. & H. OHORI. Op cit. Pág. 32

<sup>213</sup> ARMUZZI, A. Effect of Lactobacillus GG supplementation on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during Helicobacter pylori eradication therapy: a pilot study. Digestion. 2001, 63 (1): 1-7

<sup>214</sup> AKCELIK, O., TUKEL, C., OZCENGIZ, G. & M. AKCELIK. Op cit. Pág. 60

La cepa control negativo *L. acidophilus* UN 006, nunca inhibió el crecimiento de *H. pylori* ATCC 51932. Llama la atención que el extracto proteico montado posteriormente si mostró un halo de inhibición (bacteriocin-like)<sup>215</sup>. Hipotetizando un poco es posible que *H. pylori* secrete compuestos que inhiban la expresión de moléculas tipo bacteriocinas, como ya ha sido reportado para otros patógenos como *L. monocytogenes*<sup>216</sup>.

La formación de halos de inhibición sobre *H. pylori* muestra diferencias en el tamaño de estos entre las especies. En este estudio se observa que *Lactobacillus casei rhamnosus* presenta una mayor diferencia con respecto a los halos de inhibición. Esto sugiere que esta bacteria puede producir un gran número de sustancias inhibitorias, proceso que se conoce como acción colectiva de productos metabólicos sobre bacterias indeseables que permite ampliar el rango de acción al combinar sus agentes antibacteriales<sup>217</sup>.

Además, el efecto inhibitorio puede variar entre el tipo de cepa, cantidad y variedad de metabolitos<sup>218,219</sup>, frecuencia de uso, vía metabólica utilizada y fase de desarrollo bacteriano<sup>220</sup>, para crear un ambiente desfavorable para el crecimiento de patógenos<sup>221,222,223,224</sup>. Este proceso se asocia con la formación de ácido láctico, ácido acético y propiónico, además de bacteriocinas, que crean un ambiente ácido desfavorable para el desarrollo del microorganismo al interferir con el potencial de membrana que inhibe el transporte activo y reduce el pH intracelular y funciones metabólicas del patógeno<sup>225,226,227,228</sup>. Sin embargo, los

---

<sup>215</sup> ZAMFIR, M., CALLEWAER, T. R., CORNEA, P. C., SAVU, L., VATAFU, I. & L. De VUYST. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *Journal of Applied Microbiology*. 1999, 87: 923-931.

<sup>216</sup> WAITE, B. L, SIRAGUSA, G. R. & R. W. HUTKINS. Bacteriocin inhibition of two glucose transport systems in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*. 1998, 84: 715-721.

<sup>217</sup> ROSS, P. R., MORGAN, S. & C. HILL. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*. 2002, 79: 3-16.

<sup>218</sup> CREMONINI, F., DI CARO, S., COVINO, M., ARMUZZI, A., GABRIELLI, M., SANTARELLI, L., NISTA, E., CAMMAROTA, G., GASBARRINI, G. & A. GASBARRINI. Effect of different probiotic preparation on anti *Helicobacter pylori* therapy related side effects: a parallel group, triple blind, placebo controlled study. *The American Journal of Gastroenterology*. 2002, 97 (11): 2744-2749.

<sup>219</sup> ROSS, P. R., MORGAN, S. & C. HILL. Preservation and Food fermentation: past, present and future. *International Journal Microbiology*. 2002, 79: 3-16.

<sup>220</sup> BRUHN, C. M., BRUHN, J. C., COTTER, A., GARRETT, C., KLENK, M., POWELL, C., STANDFORD, G., STEINBRING, Y. & E. WEST. Consumer attitudes toward use of probiotic cultures. *Journal of Food Science*. 2002, 67 (5): 1969-1972.

<sup>221</sup> SOO PARK, B., KYUNG LEE, H., EUN LEE, S., LAN PIAO, X., TAKEOKA, G. R., WONG, R. Y., JOON AHN, Y. & J. HAN KIM. Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex Dc (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006, 105: 255-262.

<sup>222</sup> ROSS, P. R., MORGAN, S. & C. HILL. Op cit. Pág. 100

<sup>223</sup> SOO PARK, B., KYUNG LEE, H., EUN LEE, S., LAN PIAO, X., TAKEOKA, G. R., WONG, R. Y., JOON AHN, Y. & J. HAN KIM. Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex Dc (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006, 105: 255-262.

<sup>224</sup> ROSS, P. R., MORGAN, S. & C. HILL. Op cit. Pág. 100

<sup>225</sup> SERVIN, A. L. Op cit. Pág. 31

<sup>226</sup> PARVEZ, S., MALIK, K. A., AH KANG, S. & H. Y. KIM. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*. 2006, 100: 1171-1185.

<sup>227</sup> AIBA, Y., SUZUKI, N., KABIR, A., TAGKAGI, A. & Y. KOGA. Lactic acid mediated supresión of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in gnotobiotic murine model. *The American Journal of Gastroenterology*. 1998, 93 (11): 2097-2101.

<sup>228</sup> MOUSTAFA, Y. M. Comparative study of probiotic cultures to control the growth of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Biotechnology*. 2004, 3 (2): 173-180.

ácidos no son los únicos que interviene en la eliminación de patógenos, se reporta que la producción de etanol, peróxido de hidrógeno y el diacetil, oxidan las membranas lipídicas y las proteínas celulares<sup>229,230</sup>.

En nuestro caso las diferencias en los halos obtenidas entre cocultivo bacteriano y antagonismo proteico (Figura 13-tabla 15 y figura 14-tabla 17,) posiblemente es debido a que las bacterias combaten al patógeno no exclusivamente con herramientas como las bacteriocinas, también participan, moléculas como ácido orgánicos, el peróxido de hidrógeno y dióxido de carbono.

En el análisis estadístico cuatro cocultivos presentaron diferencias significativas con los cuatro restantes aunque los valores promedios de los diámetros no son notorios los valores superiores de la desviación estándar de estos muestran una tendencia diferencial. Sin embargo la prueba de Tukey muestra que existen diferencias significativas entre las cuatro cepas con halos más grandes y las cuatro restantes. En el ensayo de cocultivo, la cepa *L. casei rhamnosus* UN 001 es superior a las restantes siete, pero las diferencias con las tres restantes no es significativa.

### 7.3 EXTRACCION DE BACTERIOCINAS

Posteriormente de haber tenido buen resultado en los cocultivos con las cepas de LABs se decidió hacer la extracción de las proteínas del sobrenadante. El buen resultado de todas las pruebas tanto de antagonismos, cromatografía y ensayos de estabilidad y actividad proteasica, dependió de la extracción de las proteínas del sobrenadante del medio de cultivo. Este punto es crítico para la continuación del proceso de investigación.

Las proteínas de LABs extraídas se caracterizan por poseer un amplio rango de peso molecular, que va desde los 3 kDa hasta más de los 225 kDa (Figura 10), permitiendo así ubicarlas dentro de todas las clases descritas por Klenhammer en 1993<sup>231,232</sup>. El tratamiento con TCA permitió extraer proteínas de pesos en el rango anteriormente señalado con excelente concentración dependiendo de cada cepa, dado que la producción no depende ni del peso, ni es constante en todas las cepas.

La extracción con fenol es una técnica ampliamente empleada para extraer proteínas pero no es aconsejable para extraer bacteriocinas de LABs. Es posible que la interacción MRS-fenol sea mayor dado que permite una menor extracción de proteínas. Recordemos que el MRS es muy rico en compuestos de tipo orgánico, haciendo posible una interacción fuerte con el fenol desfavoreciendo la

---

<sup>229</sup> ROSS, P. R., MORGAN, S. & C. HILL. Op cit. Pág. 100

<sup>230</sup> SULLIVAN, A. & C. E. NORD. Op cit. Pág. 31

<sup>231</sup> NES, I. F., DIEP, D. B., HAVARSTEIN, L. S., BRUEBERG, M. B., EIJSINK, V. & H. HOLO. Op cit. Pág. 43

<sup>232</sup> BOGOVIC-MATIJASIC, B., ROGELJ, I., NES, I. F. & H. HOLO. Op cit. Pág. 60

extracción. Por el contrario el TCA como ácido débil puede tener una interacción baja con los compuestos del medio y alta con las proteínas, permitiendo su extracción. Ubica dentro de un grupo heterogéneo de componentes antibacteriales dentro de la naturaleza, haciendo que varíe su modo de acción, espectro de actividad, propiedades bioquímicas y origen genético<sup>233,234</sup>.

#### 7.4 ANTAGONISMO *In vitro* DE PROTEÍNAS DE LABs vs *H. pylori*

El propósito de extraer y probar los extractos del sobrenadante producidas por las LABs fue saber si estos contenían proteínas capaces de inhibir el crecimiento de *H. pylori*. La hipótesis que se maneja durante esta investigación fue que entre las proteínas extraídas se encontraban bacteriocinas. Entre los extractos proteicos precipitados de las LABs, ocho fueron antagonistas de *H. pylori*, lo que permite asumir que estas bacterias están produciendo proteínas tipo bacteriocinas, que ejercen un efecto inhibitorio sobre patógenos Gram negativos<sup>235, 236</sup>. Esto concuerda con otros estudios realizados con sobrenadantes de cultivos lácticos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164, *L. acidophilus* P38, *Lactococcus lactis* BHE, *Lactococcus lactis* M92, *L. jhonsonii* La1, y donde se observa este comportamiento inhibitorio del patógeno de manera *In vitro*<sup>237,238</sup>.

Difícilmente creemos que otras proteínas dentro del extracto son capaces de inhibir el crecimiento de *H. pylori* por lo tanto consideramos que los extractos contienen una concentración importante de bacteriocinas de diferentes clases y tipos, dado la variedad de especies que se estudio. Se ha reportado que una cepa LAB puede producir más de una bacteriocina, como es el caso de *L. sakei* (Sakacina P, Bavaricina A, Bavaricina MN), *Lactococcus lactis lactis* (Nisina A y Nisina Z), *L. acidophilus* (Acidocin 8912, Lactacin B, Acidophilin), *L. plantarum* (Plantaricina C), *L. curvatus* (Curvaticina FS47), *Lactococcus lactis lactis* MIY23 (Lactocococina K, Nisina), entre otras<sup>239,240</sup>. Esta gran variedad y heterogeneidad, ha planteado la posibilidad de purificarlas para estudiar sus propiedades bioquímicas y antibacteriales, hecho que se ha logrado con el fin de obtener grandes cantidades de estos péptidos en forma pura y concentrada, para ser utilizados como probióticos potenciales<sup>241,242,243,244</sup>.

<sup>233</sup> ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K. & A. ISHIZAKI. Op cit. Pág. 40

<sup>234</sup> CAROLISSEN-MACKAY, V., ARENDSE, G. & J. W. HASTINGS. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. International Journal of Food Microbiology. 1997, 34: 1-16.

<sup>235</sup> LOZO, J., VUKASINOVIC, M., STRAIHINIC, I. & L. TOPOSIROVIC. Characterization and antimicrobial activity of bacteriocins 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* BGBUK2-16. Journal of Food Protection. 2004, 67 (12): 2727-2734.

<sup>236</sup> BAREFOOT, S. F. & T. R. KLAENHAMMER. Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology. 1983, 45 (6): 1808-1815

<sup>237</sup> KIM, T. S., HUR, J. W., YU, M. A., CHEIGH, C. I., KIM, K.N., HWANG, J. K. & Y. R. PYUN. Op cit. Pág. 29

<sup>238</sup> MICHETTI, P., DORTA, G., WIESEL, P. H., BRASSART, D., VERDE, E., HERRANZ, M., FELLELY, C., PORTA, N., ROUVET, M., BLUM, A. L. & I. CORTHESEY-THEULAZ. Op cit. Pág. 28

<sup>239</sup> PARENTE, E. & A. RICCIARDI. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 1999, 52: 628-638.

<sup>240</sup> ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K. & A. ISHIZAKI. Op cit. Pág. 40

<sup>241</sup> CAROLISSEN-MACKAY, V., ARENDSE, G. & J. W. HASTINGS. Op cit. Pág. 102

Durante el estudio, las proteínas precipitadas presentaron diferencias con respecto al diámetro de inhibición, donde la proteína de *Lactobacillus paracasei paracasei* UN 002, presentó más diferencias con respecto a las otras proteínas, aunque, el diámetro de esta cepa fue el más bajo entre todas. Este resultado, frecuentemente se asocia con una gran cantidad de agregados que pueden estar influyendo en el cultivo celular en el momento de la precipitación como lípidos, enzimas y otras macromoléculas<sup>245</sup>. No obstante, esto no quiere decir que las proteínas de las demás especies evaluadas no estén ejerciendo una condición inhibitoria sobre *H. pylori*.

Además, el modo de acción de cada bacteriocina es diferente<sup>246</sup> y varía de especie a especie y de cepa a cepa<sup>247</sup>. Por esta razón no todas las bacteriocinas atacan el mismo blanco, encontrando cepas que producen proteínas que causan un desbalance iónico en la membranas celulares al perder fosfatos<sup>248,249</sup>, otras disminuyen el pH del medio donde se encuentra la célula blanco, haciéndola más susceptible y permeable<sup>250</sup>. Esto ha sido evaluado por algunos autores<sup>251,252</sup>, donde algunas bacteriocinas afectan al precursor (Lípido II) de la biosíntesis de la membrana celular como también interferir en la actividad de enzimas esenciales, que favorecen la entrada de altas concentraciones de bacteriocina a la célula. Konings<sup>253</sup>, sugiere que los péptidos antimicrobianos de LAB optan por realizar “quórum-sensing”, donde se aumenta la concentración de bacteriocina cuando el patógeno al que se esta atacando la rechaza.

Las cepas que presentaron mejor actividad antagónica contra *H. pylori*, fueron *Lactobacillus sp* UN 004, *S. salivarius thermophilus* UN 013, *L. pentosus* UN 007, *L. casei rhamnosus* UN 001 (Figura 14). Teniendo en cuenta el análisis estadístico, no se presentan diferencias significativas entre los cuatro mejores extractos proteicos, presentándose algunas diferencias significativas con las cuatro restantes (Tabla 17).

---

<sup>242</sup> KIM, Y. S., KIM, M. J., KIM, P. & J. H. KIM. Cloning and production of a novel bacteriocin, lactococcin K, from *Lactococcus lactis subsp lactis* MIY23. *Biotechnology Letters*. 2006, 28: 357-362.

<sup>243</sup> OH, S., KIM, S. H. & R. W. WOROBO. Characterization and purification of bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *Journal of Dairy Science*. 2000, 83: 2747-2752.

<sup>244</sup> YANG, R., JHONSON, M. C. & B. RAY. Op cit. Pág. 55

<sup>245</sup> NES, I. F., DIEP, D. B., HAVARSTEIN, L. S., BRUEBERG, M. B., EIJSINK, V. & H. HOLO. Op cit. Pág. 43

<sup>246</sup> JOERGER, R. D. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science*. 2003, 82: 640-647.

<sup>247</sup> ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K. & A. ISHIZAKI. Op cit. Pág. 40

<sup>248</sup> Ibid

<sup>249</sup> CHIKINDAS, M. L., GARCIA-GARCERA, M. J., DRIESSEN, A. J. M., LEDEBOER, A. M., NIESSEN-MEYER, J., NES, I. F., ABEE, T., KONINGS, W. N. & G. VENEMA. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilacti* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrana of target cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993, 59 (11):3577-3584.

<sup>250</sup> ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K. & A. ISHIZAKI. Op cit. Pág. 40

<sup>251</sup> ROSS, P. R., MORGAN, S. & C. HILL. Op cit. Pág. 100

<sup>252</sup> SERVIN, A. L. Op cit. Pág. 31

<sup>253</sup> KONINGS, W. N., KOK, J., KUIPERS, O. P. & B. POOLMAN. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Current Opinion in Microbiology*. 2000, 3: 276-282.

La diferencia con respecto a los diámetros de inhibición, esta influenciada por dos grandes factores, el primero que incluye caracteres intrínsecos de la célula como son la especie, la cepa y sus genes; y el segundo factor que incluye caracteres ambientales como pH, temperatura, composición del medio, fermentaciones continuas con células recicladas, biomasa, agitación, y aireación<sup>254</sup>, que pueden disminuir la productividad de bacteriocinas<sup>255</sup>. Otros autores<sup>256, 257</sup>, han propuesto que los medios de cultivo líquido MRS, suplementado con fructosa, sacarosa, maltosa, lactosa, Tween 80, extracto de carne, tryptona y extracto de levadura, como fuentes de Nitrógeno, aumentan los niveles de producción de bacteriocinas de algunas cepas. En nuestro caso las diferencias obtenidas están influenciadas por todo lo anteriormente dicho, a pesar de todos los controles que se tubo desde la producción, extracción, ensayo *In vitro* con *H. pylori*, lo que demuestra que las bacteriocinas debieron ser o del mismo tipo en diferente concentración o diferentes en concentraciones similares (figura 10).

No sabemos si nuestras bacteriocinas son bacteriostáticas o bactericidas sin embargo la inhibición de *H. pylori* permite suponer una actividad bactericida. Varios estudios han determinado la presencia de bacteriocinas dentro de los extractos proteicos<sup>258,259</sup>.

Por otro lado la oscuridad del halo se puede deber a la reacción de los componentes del medio MRS o tampón TE con el medio agar sangre, así mismo la actividad de las proteínas no solo de tipo bacteriocina pueden reaccionar con la parte orgánica o proteica del medio. Sin embargo la coloración clara del halo no determina que se presenta este tipo de interacciones, quizás mostrando que la actividad bacteriocinogénica es mucho mas específica. No se encontró ninguna correlación en la coloración de los halos de los cocultivos y la coloración de los halos de los extractos proteicos.

## 7.5 FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS BACTERIANOS

El proceso empleado para el fraccionamiento del extracto proteico permitió observar diferentes picos en los cuales se evidenciaba la mezcla de proteínas (figura 15 y figura 17). Al pasar por la columna se recuperaba la mayoría del extracto proteico en las primeras 10 fracciones (Figura 60) y 5 (Figura 30), de esta manera no se observó ninguna dificultad en el proceso de equilibrio, carga, recolección y lavado<sup>260</sup>.

---

<sup>254</sup> DROSINOS, E. H., MATARAGAS, M., NASIS, P., GALIOTOU, M. & J. METAXOPOULOS. Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. Journal of Applied Microbiology. 2005, 99: 1314-1323.

<sup>255</sup> PARENTE, E. & A. RICCIARDI. Op cit. Pág. 102

<sup>256</sup> TODOROV, S. D. & L. M. T. DICKS. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. Microbiological Research. 2006, 161: 102-108.

<sup>257</sup> PARENTE, E. & A. RICCIARDI. Op cit. Pág. 102

<sup>258</sup> BAREFOOT, S. F. & C. G. NETTLESS. Op cit. Pág. 40

<sup>259</sup> MICHETTI, P., DORTA, G., WIESEL, P. H., BRASSART, D., VERDE, E., HERRANZ, M., FELLE, C., PORTA, N., ROUVET, M., BLUM, A. L. & I. CORTHESEY-THEULAZ. Op cit. Pág. 28

<sup>260</sup> AMERSHAN BIOSCIENCES. Op cit. Pág. 51

El tampón utilizado para la corrida en la fase móvil (PBS) y la precipitación con TCA 5% permitían precipitar cantidades no siempre detectables del eluido. El volumen de inicio del cultivo a partir del cual se recuperaban las proteínas fue de 100 mL, y el “*pellet*” final de proteína precipitada no mostraba un tamaño estándar, lo cual se corroboraba al cuantificar la cantidad de proteínas por el método de Bradford (Tabla 7).

Se escogieron dos cepas, con concentraciones bajas como UN 013 y medias como UN 002, el propósito de esto fue fraccionar el extracto sin perder las bacteriocinas. Al precipitar con TCA las 5 primeras fracciones de *S. salivarius termophilus* UN 013 y las 10 primeras fracciones de *L. paracasei paracasei* UN 002, se montaron en el ensayo de antagonismo contra *H. pylori*, sin obtener resultados (dato no mostrado). Este resultado nos permitió deducir que la baja concentración de proteína presente en el eluido probado contra *H. pylori*, se debió al bajo volumen del cultivo para obtener una alta concentración inicial de proteína y a una adecuada longitud de la fase estacionaria empleada.

## 7.6 ESTABILIDAD DE LAS BACTERIOCINAS

En el intestino donde habitan las LABs las condiciones tanto de temperatura como de pH son estables, las enzimas y proteínas están sujetas al mismo tiempo a ambos factores. Una proteína liberada al ambiente como las bacteriocinas deben tener una estructura que garantice su resistencia a cambios mínimos de temperatura y pH, e incluso si se enfrenta a un ambiente rico en proteasas como es el intestino. El éxito de una bacteriocina reside en su estructura, la cual le confiere más resistencia a las condiciones adversas del medio circundante.

Se sabe que las bacteriocinas son parte de la estrategia de las LABs dentro del mecanismo de “*quórum sensing*” lo cual les permite comunicarse entre las mismas cepas y defenderse de otras bacterias.

Por esto una forma de probar experimentalmente la acción de estos factores combinados como temperatura y pH permite estudiar la actividad de una proteína como las bacteriocinas en condiciones más reales y no ideales (temperatura o pH separados). Sin embargo además de estos dos factores, la resistencia de bacteriocinas a proteasas permite recubrir la superficie del estómago previniendo la invasión de patógenos gastrointestinales como *H. pylori*.

En general los extractos proteicos de las mejores LABs bacteriocinogénicas sometidos a temperaturas más bajas y más altas a la fisiológica se muestran relativamente estables sin presentar cambios significativos sobre el patrón. Igualmente a pH ácidos y básicos no fisiológicos, se observa que tampoco hay cambios significativos. Solo al combinar temperaturas extremas con pH extremos estos si afectan relativamente el patrón de bandas de los extractos. Esto se ha podido demostrar en otros estudios como por ejemplo en bacteriocinas de *L.*

*paracase paracasei* BGBUK2-16 y *Lactococcus lactis lactis*, que muestra actividad incluso a pH no fisiológicos<sup>261,262</sup>.

En el caso del tratamiento de los extractos proteicos de las ocho cepas con actividad bacteriocinogénica, se presentó diversidad de resultados predominando la degradación total del extracto. Sin embargo algunas cepas como *L. pentosus* UN 007 y *S. salivarius thermophilus* UN 013 mostraron en sus patrones posterior a la digestión una pérdida menor de bandas mostrando resistencia especialmente a tripsina. Aunque montar los antagonismos de los extractos para *H. pylori* tratados con proteasas puede generar resultados falsos positivos, lo ideal será digerir y retirar la proteasa para mirar la resistencia a la bacteriocina.

En este tratamiento se partió del precepto que las proteínas de mayor concentración en el extracto, algunas de ellas corresponderán a bacteriocinas. Se observó presencia de estas bandas en las dos cepas anteriormente mencionadas después del tratamiento con tripsina.

La bacteriocina ideal será aquella proteína que resista cambios de temperatura, pH y la presión selectiva de las proteasas. De esta forma podrá combatir patógenos intestinales con mayor éxito. La transferencia de información genética entre las LABs está ampliamente documentada<sup>263,264</sup>. A futuro el empleo de bacterias lácticas con fuerte actividad bacteriocinogénica en la industria alimenticia y en el campo farmacológico será una herramienta a considerar, dado su fuerte potencial antimicrobiano, haciéndolas un instrumento esencial en la salud y la alimentación humana.

---

<sup>261</sup> LOZO, J., VUKASINOVIC, M., STRAHINIC, I. & L. TOPISIROVIC. Op cit. Pág. 102

<sup>262</sup> AKCELIK, O., TUKEL, C., OZCENGIZ, G. & M. AKCELIK. Op cit. Pág. 60

<sup>263</sup> De JONG, A., Van HIJUM, S. A. F. T., BIJLSMA, J. J. E., KOK, J. & O. P. KUIPERS. Bagel: a web-based bacteriocin genome binding mining tool. Nucleic acids Researchs. 2006, 34: 273-279.

<sup>264</sup> FRANZ, C. M., van BELBUM, M. J., HOLZAPFEL, W. H., ABRIOUEL, H. & A. GALVEZ. Op cit. Pág. 41



## 8. CONCLUSIONES

Este trabajo de grado aportó en varios frentes de investigación, entre los cuales incluyo la caracterización de bacterias lácticas probióticas antagonistas de *H. pylori*, así mismo se identificó que este antagonismo podría ser debido a las proteínas que estas bacterias estaban secretando al medio, una vez comprobado eso se determinó la estabilidad de estos extractos frente a factores físicos y químicos.

De diecisiete LABs seleccionadas de la colección del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nariño, ocho resultaron ser antagonistas de *H. pylori* ATCC 51932, dado que siempre mostraron halos de inhibición en el medio de crecimiento de *H. pylori*. En este primer experimento no podemos atribuir la responsabilidad el antagonismo única y exclusivamente a las bacteriocinas. Como es sabido las LABs producen ácido láctico, acético, propiónico, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono que pueden contribuir en conjunto con las bacteriocinas a impedir el crecimiento del patógeno.

Las LABs secretan proteínas al medio para defenderse del ataque de microorganismos oportunistas, igualmente de enzimas que degradan moléculas del medio. Sin excepción todas las bacterias producen proteínas de tipo bacteriocina, las cuales son secretadas siempre en condiciones propicias o adversas. El medio MRS permitió la producción de proteínas de las LABs con pesos que oscilaron entre 3 y 225 kDa. Es muy posible que en este grupo de proteínas al menos una banda en buena concentración corresponda a una bacteriocina.

Los extractos proteicos obtenidos del sobrenadante del cultivo de ocho LABs en medio MRS mostraron una actividad antagonista frente a *H. pylori* ATCC 51932. Esta cepa fue aislada del estómago humano con comprobada actividad patogénica. Las bacteriocinas contenidas en los extractos proteicos de estas ocho cepas de LABs serían las responsables del impedimento del crecimiento de esta bacteria, dado que las restantes proteínas secretadas de las LABs cumplen más funciones de actividad metabólica.

Estadísticamente los resultados de los cocultivos y de los extractos no se pueden correlacionar, dado que intervienen factores diferentes para ocasionar la inhibición de *H. pylori*. En los cocultivos la inhibición no es solo causada por bacteriocinas, en los extractos proteicos no podemos responsabilizar totalmente la actividad bacteriocinogénica de las LABs. Los datos de distribución anormal, no paramétrica por medio de ANOVA demostraron que existen diferencias significativas en los

cultivos pero si diferencias significativas en los extractos. Lo que es completamente lógico dado que ambos experimentos solo tienen en común el patógeno. Recordemos también que no se puede comparar un ensayo *In vivo* con un ensayo *In vitro*, tampoco podemos extrapolar este resultado *In vitro* con una prueba *In vivo*. Sin embargo los resultados esperados a nivel *In vivo* serían los obtenidos a nivel *In vitro*.

Los extractos sometidos a fraccionamiento por cromatografía líquida dieron un fraccionamiento parcial debido a la carencia de una columna con mayor longitud. 100 mL de cultivo fueron suficientes para producir una cantidad de proteína para ensayos como el de inhibición y estabilidad, pero no para el fraccionamiento no fue suficiente dado que los ensayos de inhibición fueron negativos.

Las proteínas obtenidas del sobrenadante del cultivo de LABs, al someterse a tratamientos de temperatura y pH mostraron una baja pérdida de bandas con respecto al patrón, demostrando que los extractos proteicos eran estables a los cambios de estos factores. Por el contrario los mismos extractos fueron bastante susceptibles a la actividad proteolítica de proteínas no humanas, permitiendo concluir que las LABs soportan más fácilmente los cambios físicos de temperatura y pH que los cambios químicos ejercidos por proteasas.

*H. pylori* tiene una fuerte actividad en contra de proteasas, dado que sus proteasas son incluso más resistentes que las humanas. Las bacteriocinas podrían ser una de las pocas alternativas naturales que contrarrestarían esta infección. Sin embargo el bajo consumo de productos probióticos en algunas poblaciones especialmente de Nariño contribuye a la implantación del patógeno y a su dispersión en el ambiente. Bacteriocinas producidas por las LABs de la misma población nariñense tienen una fuerte actividad inhibitoria de este patógeno demostrando muy posiblemente que las cepas de *H. pylori* resisten la actividad bacteriocinogénica de las floras nativas de LABs. Además es posible que el excesivo consumo de antibióticos este generando pérdida de la microbiota gástrica normal.

## 9. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES DE ESTUDIO

Dado que los extractos proteicos presentaron una clara actividad antagonista contra *H. pylori*, será muy importante la purificación de la proteína responsable de este antagonismo. Estandarizar unas condiciones más óptimas en la cromatografía será ideal para lograr la purificación.

Igualmente será necesario trabajar independientemente con cada cepa para aislar su bacteriocina, probar su efecto y su potencial frente a cepas nativas de *H. pylori*, ya que la cepa utilizada proviene de Texas USA.

Teniendo en cuenta el efecto antagónico de bacterias y sus bacteriocinas sobre *H. pylori*, será necesario comprobar dicho efecto en modelos infectados, para así conocer su comportamiento de manera *In vivo*.

Dada la sensibilidad de los extractos proteicos a proteasas, se cree necesario utilizar una bacteriocina recombinante, que tenga la capacidad de impedir su digestión, y así puedan ser probadas de manera *In vivo*.

Teniendo en cuenta la susceptibilidad de los extractos proteicos a las proteasas, es necesario someter dichos extractos con proteasas de origen humano para conocer su reacción.

Conociendo algunas características a las que se pueden enfrentar las bacteriocinas, se podría realizar pruebas de patrones de resistencia a antibióticos, actividad metabólica, producción de toxinas, actividad hemolítica, para conocer sus posibles efectos como probiótico y los posibles efectos adversos en el consumidor.

Por último asumiendo la inocuidad de estas cepas LABs será interesante tratar productos lácteos, carnicos, etc, para dar a consumir principalmente a poblaciones infantiles altamente susceptibles y libres de *H. pylori*. Un test de inocuidad será necesario establecerlo para estas cepas.

## 10. BIBLIOGRAFIA CITADA

- ABEE, T. Pore forming bacteriocins of Gram positive bacteria and self protection mechanism of producer organism. *FEMS Microbiology Letters*. 1995, 129:1-10
- AIBA, Y., SUZUKI, N., KABIR, A., TAGKAGI, A. & Y. KOGA. Lactic acid mediated supresión of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in gnotobiotic murine model. *The American Journal of Gastroenterology*. 1998, 93 (11): 2097-2101
- AKCELIK, O., TUKEL, C., OZCENGIZ, G. & M. AKCELIK. Characterization of bacteriocins from two *Lactococcus lactis subsp lactis* isolates. *Mo. Nutr. Food Res.* 2006, 50: 306-313
- AMERSHAN BIOSCIENCES. Gel Filtration: Principles and Methods. Amershan Biosciences 18-1022-18. 2002, URL: [www.chromatography.amershambiosciences.com](http://www.chromatography.amershambiosciences.com)
- ARMUZZI, A. Effect of Lactobacillus GG supplementation on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during Helicobacter pylori eradication therapy: a pilot study. *Digestion*. 2001, 63 (1): 1-7
- BAREFOOT, S. F. & C. G. NETTLESS. Antibiosis Revisited: Bacteriocins produced by dairy starter cultures. *Journal of Dairy Science*. 1993, 76: 2366-2379
- BAREFOOT, S. F. & T. R. KLAENHAMMER. Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983, 45 (6): 1808-1815
- BERNBOM, N., LICHT, T. R., SAADBYE, P., VOGENSEN, F. K. & B. NORRUNG. *Lactobacillus plantarum* inhibits growth of *Listeria monocytogenes* in an in vitro continuous flow gut model, but promotes invasion of *L. monocytogenes* in the gut of gnotobiotic rats. *International Journal of Foods Microbiology*. 2006, 108: 10-14
- BLANCHARD, T. G., DRAKES, M. L. & S. J. CZINN. *Helicobacter* infection: pathogenesis. *Current Opinion Gastroenterology*. 2003, 20: 10–15
- BLUE, S., ALVAREZ, S., HALLER, D., PEREZ, P. & E. J. SCHIFFRIN. Intestinal microflora and the interaction with immunocompetent cells. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999, 76: 199–205.

BOGOVIC-MATIJASIC, B., ROGELJ, I., NES, I. F. & H. HOLO. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221 Applied Microbiology and Biotechnology. 1998, 49: 606-612

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. Analytical Biochemistry. 1976, 72: 248-254.

BRAVO, L. E., CORTES, A., CARRASCAL, E., JARAMILLO, R., GARCIA, L. E., BRAVO, P. E., BEDEL, A. & P. A. BRAVO. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. Colombia Medica. 2003, 34 (3): 124-131

BRUHN, C. M., BRUHN, J. C., COTTER, A., GARRETT, C., KLENK, M., POWELL, C., STANDFORD, G., STEINBRING, Y. & E. WEST. Consumer attitudes toward use of probiotic cultures. Journal of Food Science. 2002, 67 (5): 1969-1972

CALDWELL, R. B. & C. T. LATTEMANN. Simple and reliable method to precipitate proteins from bacterial culture supernatant. Applied and Environmental Microbiology. 2004, 70 (1): 610 – 612

CAPLICE, E. & G. F. FITZEGARLD. Food Fermentations: role of microorganism in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology. 1999, 131-149

CAROLISSEN-MACKAY, V., ARENDSE, G. & J. W. HASTINGS. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. International Journal of Food Microbiology. 1997, 34: 1-16

CATS, A., KUIPERS, E. J., BOSSCHAERTS, M. A. R., POT, R. G. J., VANDERBROUCK-GRAULS, C. M. J. E. & J. G. KUSTERS. Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei* containing milk drink in *Helicobacter pylori* colonized subjects. Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 2003, 17: 429-435

CERON, S. C., YEPEZ, M. C. & G. RIVAS. Estilos de vida y factores protectores y de riesgo para enfermedad gástrica. Municipio de Nariño – Colombia. Universidad y Salud. 2004, 5: 9-25

CEZAR FONTANA, M. B., FREIRE DE BASTOS, M. & A. BRANDELLI. Bacteriocins Pep 5 and epidermis inhibit *Staphylococcus epidermis* adhesion to catheters. Current Microbiology. 2006, 52: 350-353

CHANDA, R. C. Enhancing market value of milk by adding cultures. Journal OF Dairy Science. 1999, 82: 2245–2256

- CHAVEERACH, P., LIPMAN, L. J. A. & F. van KNAPAN. Antagonistic activities of several bacteria on In Vitro growth of 10 strains of *Campylobacter jejuni/coli*. International Journal of Food Microbiology. 2004, 90: 43-50
- CHEN, H. & D. G. HOOVER. Bacteriocins and their food applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2003, 2: 82–100
- CHIKINDAS, M. L., GARCIA-GARCERA, M. J., DRIESSEN, A. J. M., LEDEBOER, A. M., NIESSEN-MEYER, J., NES, I. F., ABEE, T., KONINGS, W. N. & G. VENEMA. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilacti* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrana of target cells. Applied and Environmental Microbiology. 1993, 59 (11): 3577-3584
- CHUNG, H. J. & A. E. YOUSEF. *Lactobacillus curvatus* produced a bacteriocin like agent activity against gram negative phatogenic bacteria. Journal of Food Safety. 2005, 25: 59-79
- COCONIER, M. H., LIEVIN, V., HEMERY, E. & A. SERVIN. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *In Vitro* and *In Vivo* by the human *L. acidophilus* strain LB. Applied and Environmental Microbiology. 1998, 64 (11): 4573–4580
- CORSETTI, A. & L. SETTANNI. Lactobacilli in sourdough fermentation. Food Research International. 2006: 1–20
- CORR, S. C., GAHAN, C. G. M. & C. HILL. Impact of selected *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species on *Listeria monocytogenes* infection and the mucosal immune response. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2007, 50: 380-388
- CREMONINI, F., DI CARO, S., COVINO, M., ARMUZZI, A., GABRIELLI, M., SANTARELLI, L., NISTA, E., CAMMAROTA, G., GASBARRINI, G. & A. GASBARRINI. Effect of different probiotic preparation on anti *Helicobacter pylori* therapy related side effects: a parallel group, triple bind, placebo controlled study. The American Journal of Gastroenterology. 2002, 97 (11): 2744-2749
- DE CHAMPS, C., MARONCLE, N., BALESTRINO, D., RICH, C. & C. FORESTIER. Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Latobacillus casei* Subs., *rhamnosus* Lcr35, after oral consumption. Journal of Clinical Microbiology. 2003, 41 (3): 1270-1273
- DE LAS CAGIGAS, R. A. & A. J. BLANCO. Prebióticos y Probióticos, una relación beneficiosa. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición. 2002, 16 (1): 63–8

DEL PIANO, M., MORELLI, L., STROZZI, G. P., ASESINA, S., BARBA, M., DEIDDA, F., LORENZINI, P., BALLARÉ, M., MONTINO, F., ORSELLO, M., SARTORI, M., GARELLO, E., CARMAGNOLA, S., PAGLIARULO, M. & L. CAPURSO. Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*. 2006, 38 (2): 248-255

De JONG, A., Van HIJUM, S. A. F. T., BIJLSMA, J. J. E., KOK, J. & O. P. KUIPERS. Bagel: a web-based bacteriocin genome binding mining tool. *Nucleic acids Researchs*. 2006, 34: 273-279

DIAZ, G. & J. FERRAN. Bacilos gram positivos aeróbicos. *Fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos*. 2004: 1-3

DROSINOS, E. H., MATARAGAS, M., NASIS, P., GALIOTOU, M. & J. METAXOPOULOS. Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Journal of Applied Microbiology*. 2005, 99: 1314-1323

EIJSINK, V. G. H., SKEIE, M., MIDDELHOVEN, H., BRURBERG, M. & I. NES. Comparative studies of Class II bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, 64 (9): 3275 – 3281

ENNAHAR, S., SONOMOTO, K. & A. ISHIZAKI. Class II bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 199, 87 (6): 705–716

FELLEY, C. & P. MICHETTI. Probiotics and *Helicobacter pylori*. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2003, 17 (5): 785-791

FRANZ, C. M., van BELBUM, M. J., HOLZAPFEL, W. H., ABRIOUEL, H. & A. GALVEZ. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiological Reviews*. 2007: 1-17

FRESNADILLO, M. F., RODRIGUEZ, M., BLAZQUEZ, A. M., GARCIA, E., GARCIA, J. E., TRUJILLO, I., CORDERO, M., ALVAREZ, P., PAZ, J. & J. A. GARCIA. Comparative evaluation of selective and nonselective media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. *Helicobacter*. 1997, 2(1): 36-39

GALIANO, R. A. *Helicobacter pylori*. Instituto Químico Biológico, (online), Septiembre 12 de 2004. URL: [www.iqb.es.digestivo/patologia/helicobacter/cap01htm](http://www.iqb.es.digestivo/patologia/helicobacter/cap01htm)

GOTTELAND, M., BRUNSER, O. & S. CRUCHET. Systematic review: are probiotics used in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2006, 23: 1077-1086

- GUSLANDI, M. Alternative antibacterial agents for *Helicobacter pylori* eradication. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2001, 15: 1531-1547
- GUINANE, C. M., COTTER, P. D., HILL, C. & R. P. ROSS. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology*. 2005, 98: 1316 – 1325
- HIRANO, J. YOSHIDA, T., SUGIYAMA, T., KOIDE, M., MORI, I. & T. YOKOCHI. The effect the *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cell In Vitro. *Microbiological Immunology*. 2003, 47 (6): 405-409
- HEQUET, A., LAFFITTE, V., SIMON, L., DE SOUSA-CAETANO, D., THOMAS, C., FREMAUX, C. & J. M. BERJEAUD. Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to stimulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sake* 2512 on meat. *International Journal of Food Microbiology*. 2006: 1-8
- HERNÁNDEZ, T. M. *Helicobacter pylori*. La bacteria que más infecta al ser humano. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición* 2001, 15 (1) 42–54
- HOLZAPFEL, W. H., HABERER, P., GEISEN, R., BJORKROTH, J. & U. SCHILLINGER. Taxonomy and important features of probiotic microorganism in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001, 73: 365-373
- ILUSTRUP, D. M. Statistical Methods in Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 1990, 3 (3): 219 – 226
- JACK, R. W., TAGG, J. R. & B. RAY. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microrbiological Reviews*. 1995, 59 (2): 171–200
- JIMÉNEZ-DIAZ, R., RUIZ-BARARA, J. L., CATHCART, D. P., HOLO, H., NES, I. N., SLETTEN, K. H. & P. J. WARNER. Purification and partial Amino Acid sequence of Plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of wich depends on the complementary action of two peptides. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995, 61 (12): 4459 – 4463
- JOERGER, R. D. Alternatives to antibiotics: bacterocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science*. 2003, 82: 640-647
- JOHNSON-HENRY, K. C., HAGEN, K. E., GORDONPOUR, M., TOMPKINS, T. A. & P. M. SHERMAN. Surface layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cellular Microbiology*. 2007, 9 (2): 356-367



- KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993, 12: 39–86
- KEKESY, D. A. & J. D. PIGUET. New method for detecting bacteriocin production. *Applied Microbiology*. 1970, 20 (2): 282 – 283
- KIM, T. S., HUR, J. W., YU, M. A., CHEIGH, C. I., KIM, K.N., HWANG, J. K. & Y. R. PYUN. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*. 2003, 66 (1): 3 –12
- KIM, Y. S., KIM, M. J., KIM, P. & J. H. KIM. Cloning and production of a novel bacteriocin, lactococcin K, from *Lactococcus lactis subsp lactis* MIY23. *Biotechnology Letters*. 2006, 28: 357-362
- KONINGS, W. N., KOK, J., KUIPERS, O. P. & B. POOLMAN. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Current Opinion in Microbiology*. 2000, 3: 276-282
- LIONETTI, E., MINIELLO, V. L., CASTELLANETA, S. P., MAGISTA, A. M., DE CANIO, A., MAUROGIOVANNI, G., IERARDIS, E., CAVALLO, L., & R. FRANCAVILLA. *Lactobacillus reuteri* therapy to reduce side effects durins anti *Helicobacter pylori* treatment in children: a randomized placebo controlled trial. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2006, 24: 1461-1468
- LORCA, G. L., WANDASTROM, T., FONT DE VALDEZ, G. & A. LJUNGH. *Lactobacillus acidophilus* autolysis inhibit *Helicobacter pylori* In Vitro. *Current Microbiology*. 2001, 42: 39-44
- LOZO, J., VUKASINOVIC, M., STRAHINIC, I. & L. TOPISIROVIC. Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* BGBUK2-16. *Journal of Food protection*. 2004, 67 (12): 2727-2734
- MARTEAU. P.R., DE VRESE, M., CELLIER, C. J. & J. SCHREZENMEIR. Protection from gastrointestinal diseases with the uses of probiotics. *American Journal for Clinical Nutrition*. 2001, 73: 430–436
- MATYSIAK-BUDNIK, T. & F. MEGRAUD. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *European Journal of Cancer*. 2006, 42: 708–71
- MAURIELLO, G., DE LUCA, E., LA STORIA, A., VILLANI, F. & D. ERCOLINI. Antimicrobial activity of nisin activated plastic film for food packaging. *Letters in Applied Microbiology*. 2005, 41: 464-469

- McLOUGHLIN, R., RACZ, I., BUCLEY, M., O'CONNOR, H. J. & C. O'MORAIN. Therapy of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2004, 9(1): 42-48
- MICHETTI, P., DORTA, G., WIESEL, P. H., BRASSART, D., VERDE, E., HERRANZ, M., FELLE, C., PORTA, N., ROUVET, M., BLUM, A. L. & I. CORTHESEY-THEULAZ. Effect of whey based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus (johnsonii)* La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion*. 1999, 60: 203-209
- MICHETTI, P. Lactobacilli for the management of *Helicobacter pylori*. *Nutrition*. 2001, 17 (3): 268-269
- MONTES, A., SANTACRUZ, A., SAÑUDO, A. & A. PAZOS. Efecto *in Vitro* de *Lactobacillus casei ssp rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori*. *Universidad y Salud*. 2003, 4 (1): 5-12
- MORALES, E. M., CASTILLO, R. G., LOPEZ, V. Y. & A. CRAVIOTO. *Helicobacter pylori*. *Asociación Mexicana de Microbiología*. 2004, 1-35
- MOUSTAFA. Y. M. Comparative study of probiotic cultures to control the growth of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Biotechnology*. 2004, 3 (2): 173-180
- MUKAI, T., ASASAKA, T., SATO, E., MORI, K., MATSUMOTO, M. & H. OHORI. Inhibition of binding *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2002, 32: 105-110
- MUÑOZ, R. J. Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano. *Asociación Mexicana de Microbiología*. 2004: 1-20
- MUÑOZ, A. Electroforesis monodimensional de proteínas. *Manual de Protocolos de Genética y Bioquímica de Microorganismos*. Corporación para Investigaciones Biológicas CIB. Medellín, 2003.
- MUÑOZ, A. Tinción de Plata rápida para proteínas. *Manual de Protocolos de Genética y Bioquímica de Microorganismos*. Corporación para Investigaciones Biológicas CIB. Medellín, 2003.
- NES, I. F., DIEP, D. B., HAVARSTEIN, L. S., BRUEBERG, M. B., EIJSINK, V. & H. HOLO. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1996, 70: 113-1280

NES, I. F. & O. JOHNSBORG. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Current Opinion in Biotechnology*. 2005, 15: 100–104

OH, S., KIM, S. H. & R. W. WOROBO. Characterization and purification of bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *Journal of Dairy Science*. 2000, 83: 2747-2752

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Prevención y detección temprana pueden evitar una escalada de muertes por cáncer en las Américas. Washington, D. C, 2007.

PAJARES, G. J. M., CORREA, P. & P. G. I. PEREZ. Infección por *Helicobacter pylori* en lesiones gastroduodenales. España. Editorial Prous Science. 1998, pp 314

PARENTE, E. & A. RICCIARDI. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999, 52: 628-638

PARVEZ, S., MALIK, K. A., AH KANG, S. & H. Y. KIM. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*. 2006, 100: 1171-1185

PAZOS, A. Conservación de bacterias lácticas. Bases Experimentales en Biotecnología. Universidad de Nariño. 2001

PIARD, J. C., MURIANA, P. M., DESMAZEAUD, M. J. & T. R. KLAENHAMMER. Purification and partial characterization of Lacticin 481, a lanthionine containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* Subsp *lactis* CNRZ 481. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, 58 (1): 279-284

PINCHUK, I. V., BRESSOLLIER, P., VERNEUIL, B., FENET, B., SOROKULOVA, I. B., MEGRAUD, F. & M. C. URDACI. In Vitro Anti – *Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001, 45 (11): 3156–3161

REBERIRO, M. L., GODOY, A. P., BENUENGO, H. B., ECLISSATO, C., MENDOÇA, C. & J. PEDRAZZOLI. The influence of endoscopic procedures upon the contamination of *Helicobacter pylori* cultures. *Arq Gastroenterol*. 2004, 41(2): 100-103

REID, G. Safe and efficacious probiotics: what are they. *Trends in Microbiology*. 2006. 14 (8): 348–352

- RODRIGUEZ – ANGELES, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México. 2002, 44 (5): 464-475
- ROISSART, H. & F. M. LUQUET. Bacterias lácticas : Aspects fondamentaux et technologiques. Volumen 2. Francia. Janvier, 1994, pp 614
- ROKKA, S., PIHLANTO, A., KORHONEN, H. & V. JOUTSJOKI. In vitro growth inhibition of *Helicobacter pylori* by lactobacilli belonging to the *Lactobacillus plantarum* group. Letter in Applied Microbiology. 2006, 43: 508-513
- ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. American Society from Nutritional Sciences. 2000: 396–402
- ROSS, P. R., MORGAN, S. & C. HILL. Preservation and fermentation: past, present and future. International Journal of Food Microbiology. 2002, 79: 3-16
- SAAVEDRA, J. M. Clinical application of probiotic agents. American Journal of Clinical Nutrition. 2001, 73: 1147–1151
- SALIMINEN, S. & A. V. WRIGHT. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 2ª Edición. Nueva York. Editorial Marcel Dekker, Inc. 1998, pp 617
- SALMINEN, S. & E. ISOLAURI. Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. The Journal of Pediatrics. 2006: S115-S120.
- SALAS SANCHEZ, W. A., BENITES GALVEZ, M. R. & C. SALINAS CERQUIN. Asociación de *Helicobacter pylori* y patología gástrica no neoplásica en una clínica privada del norte de Lima – Perú. Revista Medica Herediana. 2005, 16 (2): 89-96
- SALOFF COSTE, C.J. *Lactobacillus acidophilus*. Danone World Newsletter. 1997, No. 13
- SANZON, G. F., CAICEDO, R. & E. A. DORADO. Cáncer incidental en el Municipio de Pasto. Dirección Municipal de Seguridad Social en Salud y Centro de Estudios en Salud Universidad de Nariño. 1999-2001
- SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiology Reviews. 2004, 28: 405-440
- SHIN, K., YAMAUCHI, K., TERAGUCHI, S., HAYASAWA, H. & I. IMOTO. Susceptibility of *Helicobacter pylori* and its urease activity to the peroxide hydrogen peroxide thiocyanate antimicrobial system. Journal of Medical Microbiology. 2002, 51: 231-237

SILVA, A. M., BARBOSA, F. H. F., DUARTE, R., VIERIA, L. Q., ARANTES, R. M. E. & J. R. NICOLI. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, 97: 29-37

SNEATH, P. & J. G. HOLT. *Bergey's Manual systematic of bacteriology*. Estados Unidos: Editorial Williams and Wilkins Co. 1986, Vol 2. pp 1208–1234

SEKOK, A. C., ISMAEEL, A. Y. & G. A. BOTTA. Probiotics: facts and myths. *Clinical Microbiology and infectious Diseases*. 2005, 11: 958-966

SOO PARK, B., KYUNG LEE, H., EUN LEE, S., LAN PIAO, X., TAKEOKA, G. R., WONG, R. Y., JOON AHN, Y. & J. HAN KIM. Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex Dc (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006, 105: 255-262

SREEKUMAR, O. & A. HOSONO. Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and fecal enzymes of rats and the *In Vitro* inhibition of *Escherichia coli* in coculture. *Journal Of Dairy Science*. 2000, 83: 931-939

STRUS, M., PAKOSZ, K., GOSCINIAK, H., PRZONDO, A., ROZYNEK, E., PITUCH, H., MIEEL, F. & P. B. HECZKO. Antagonistic activity of *Lactobacillus* bacteria strains against anaerobic gastrointestinal pathogen (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Clostridium difficile*). *Med Dows Microbiology*. 2001, 53 (2): 133-142

SULLIVAN, A. & C. E. NORD. Probiotics and gastrointestinal diseases. *Journal of internal Medicine*. 2005, 257: 78-92

SGOURAS, D., MARAGKOUDAKIS, P., PETRAKI, K., MARTINEZ, B., ERITOU, E., MICHPOULOS., KALANTZOPOULOS, G., TSAKANIDOU, E. & A. MENTIS. *In Vitro* and *In Vivo* inhibition of *H. pylori* by *L. casei* strain Shirota. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, 70 (1): 518–526

TAGG, J. R. & A. R. MCGIVEN. Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology*. 1971, 21 (5): 943

TAGG, J. R., DAJANI, A. S. & L. W. WANNAMAKER. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriological Reviews*. 1976, 40 (3): 722–756

TEITELBAUM, J. E. & W. A. WALTER. Nutritional impact of Pre-and probiotics as protective gastrointestinal organism. *Annual Review Nutrition*. 2002, 22: 107–138

- THARMARAJ, N. & N. P. SHAH. Selective enumeration of *L. delbruekii ssp Bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacteria*, *L. casei*, *L. rhamnosus* and *propionibacteria*. *Journal Dairy Science*. 2003, 86: 2288–2296
- THRELFALL, E. J. *Salmonella typhimurium* DT 104 a truly international multiresistant clone. *Journal Antimicrobial & Chemotherapy*. 2000. 46 (1): 7-10
- TYTGAT. G. N. *Helicobacter pylori*: past, present and futures. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2000, 15: 30-33
- TYTGAT. G. N. *Helicobacter pylori*: where are we and where are we going?. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2000, 14 (3): 55–58
- TODOROV, S. D. & L. M. T. DICKS. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. *Microbiological Research*. 2006, 161: 102-108
- TUOMOLA, E. M., OUWEHAND, A. C. & S. J. SALMINEN. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 1999, 26: 137-142
- VANDERBERG, P. A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993, 12: 221–238
- VANDERHOOF, J. A. Probiotics: future directions. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001, 73: 1152-1155
- VORAVUTHIKUNCHAI, S. P., BILASOI, S. & O. SUPAMALA. Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli. *Anaerobe*. 2006, 12: 221-226
- WAITE, B. L, SIRAGUSA, G. R. & R. W. HUTKINS. Bacteriocin inhibition of two glucose transport systems in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*. 1998, 84: 715-721
- WANG, K. Y., LI, S. N., LIU, C. S., PERNG, D. S., SU, Y. C., WU, D. C., JAN, C. M., LAI, C. H., WANG, T. N., D.C. WANG. Effects of ingesting *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004, 80: 737-741
- WENDAKOON, C. .N, THOMPSON, A. B. & L. OZIMEK. Lack of therapeutic effect of a specially designed yogurt for the eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Digestion*. 2002, 65 (1): 16-20.

WENG, M. & A. WALTER. Bacterial colonization, probiotics, and clinical disease. *The Journal of Pediatrics*. 2006: 107–114

WEN, J., ARAKAWA, T. & J. S. PHILO. Size exclusion chromatography with in line light scattering, absorbance, and refractive index detectors for studying proteins and their interactions. *Analytical Biochemistry*. 1996, 240: 155-166

WESSEL, D. & U. I. FLUGGE. Protein precipitation methods to concentrate or eliminate interferences before electrophoresis or proteins determination. *Analytical Biochemistry*. 1984, 138: 141 – 143

YAMATO, M., OZAKI, K. & F. OTA. Partial purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* YIT 0154. *Microbiological Research*. 2003, 158: 169 – 172

YANG, R., JHONSON, M. C. & B. RAY. Novel Method to Extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, 58 (10): 3355 – 3359

ZAMFIR, M., CALLEWAER, T. R., CORNEA, P. C., SAVU, L., VATAFU, I. & L. De VUYST. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *Journal of Applied Microbiology*. 1999, 87: 923-931

## 11. ANEXOS

### Anexo A. Cuantificación de proteínas por el Método de Bradford

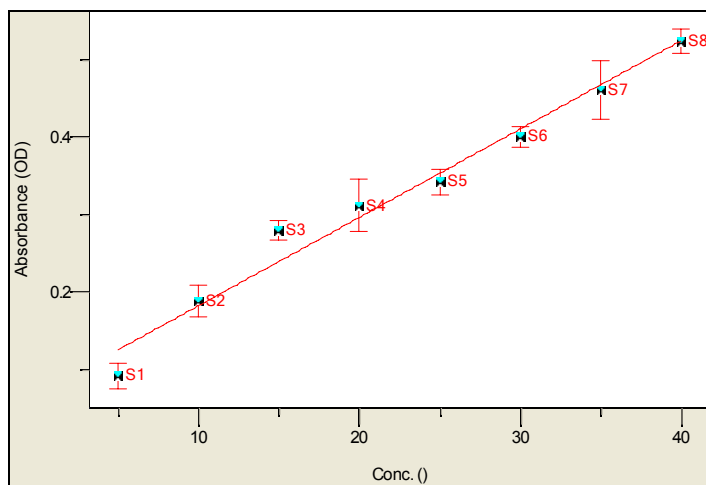
#### Principio

La unión del colorante de Coomassie a las proteínas produce un cambio de color en respuesta a varias concentraciones de proteínas, este cambio de color puede ser cuantificado por espectrofotometría., donde la absorbancia de las muestras es proporcional a la concentración de proteínas.

#### Calculo concentracion de Proteinas

Concentración  $\mu\text{g/ml}$  X Factor de dilucion / 1000  $\mu\text{g}$  = Concentración proteína  $\text{mg/ml}$

#### Curva de calibración



Coefficiente de Confidencialidad: 0.98%



## Anexo B. Componentes Econo Pump

Columna: pueden ser de varios tamaños, dependiendo de la calidad de separación que se desee lograr. Además puede ser de varias clases, dependiendo del tamaño de poro y componente de este.

Tubo: son mangueras que conectan la columna al colector de fracciones y al monitor UV. Generalmente son tubos de silicona, por su flexibilidad.

Recolector de fracciones: recibe las proteínas fraccionadas por la columna.

Bomba peristáltica: regula el volumen de buffer que se le agrega a la columna. Acelera el flujo del recorrido de la proteína.

Monitor UV: la longitud de onda ultravioleta detecta las proteínas pasadas por la columna, en un rango de 280 nm.

Impresora: revela el perfil de absorbancia de las proteínas detectadas por el monitor UV a través de un diagrama de flujo.