

MICROBIAL ECOLOGY OF THE MURINE GASTROINTESTINAL TRACT

EFFECTS OF PROBIOTICS IN HEALTH AND DISEASE

**Tesis Doctoral
Lda. Susana Fuentes Enríquez de Salamanca**

RESUMEN

Son muchas las propiedades que se le atribuyen a los microorganismos probióticos, entre las que destacan las asociadas con el tracto gastrointestinal, el sistema inmune (entre los que se incluyen los procesos alérgicos), el sistema cardiovascular o con el tracto urogenital. Aún se desconoce los efectos de los microorganismos probióticos sobre la composición de la microbiota gastrointestinal, así como las relaciones que se establecen entre las bacterias endógenas y el hospedador. En cuanto a los mecanismos moleculares de los denominados “efectos probióticos” también se conoce poco, los cuales además pueden variar de una cepa probiótica a otra, o estar producidos por un conjunto de reacciones. El estado previo del sistema inmune o del tracto gastrointestinal de los individuos que reciben tratamiento con agentes probióticos es un factor de gran influencia en la elección de las cepas y los resultados obtenidos. Una de las aplicaciones potenciales de los microorganismos probióticos es la restauración de las funciones inmunitarias deterioradas por infecciones, quimioterapia antitumoral y tratamientos inmunosupresores entre otras. Los microorganismos probióticos también han sido propuestos para su aplicación en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales. Para todas estas aplicaciones es de especial importancia considerar la seguridad de estos probióticos al ser microorganismos vivos administrados a sujetos inmunocomprometidos o con la microbiota endógena alterada.

El presente trabajo de tesis se realizó dentro de un proyecto del Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad, cuyo fin fue abordar el estudio de la capacidad de bacterias probióticas para colonizar la mucosa intestinal, interactuar con comunidades representantes de la microbiota indígena y modificar la capacidad de respuesta del sistema inmune en modelos murinos, evaluando asimismo la seguridad de dichas bacterias. Estos modelos se llevaron a cabo como aproximaciones a situaciones clínicas de inmunocompromiso y de enfermedad inflamatoria intestinal.

Para la elaboración de este proyecto se aislaron e identificaron cepas de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* aisladas de productos comerciales derivados de la leche. Se administró mediante cánula intragástrica una dosis diaria de 100µl de una suspensión en leche descremada con 10⁹ UFC del probiótico, durante distintos periodos de tiempo, a ratones hembra BALB/c de 8-10 semanas de edad. En todos los ensayos realizados se tomaron muestras de heces y de biopsias del tracto gastrointestinal completo. Los ensayos iniciales tuvieron como objeto el establecimiento de la dosis más efectiva de probiótico, y las condiciones apropiadas para la aplicación de las distintas

técnicas de análisis de la microbiota intestinal y el efecto de la administración de microorganismos probióticos así como las distintas situaciones clínicas ensayadas sobre las bacterias endógenas.

Para determinar los cambios en la microbiota gastrointestinal de ratones por los distintos tratamientos, se realizó un enfoque polifásico para el estudio de la evolución de los principales grupos de microorganismos fecales e intestinales, mediante técnicas clásicas de coprocultivo y técnicas de biología molecular basadas en el estudio del gen rRNA 16S (DGGE, T-RFLP, construcción de librerías de clones y la cuantificación por PCR a tiempo real de determinadas poblaciones bacterianas). El aislamiento del DNA y las reacciones de PCR se realizaron bajo las mismas condiciones para todas las muestras. Se utilizaron los oligonucleótidos universales para la región V6-V8 del gen rRNA 16S así como cebadores específicos de lactobacilos para la obtención de productos de PCR para los análisis de DGGE. Además, se evaluó la influencia de la respuesta inmune y/o el tratamiento probiótico sobre el grupo de bacterias filamentosas segmentadas, presentes en el intestino de ratones jóvenes hasta el desarrollo del sistema inmune. La posible diseminación de las bacterias probióticas testadas por vía hemática se investigó mediante técnicas moleculares para la evaluación de la seguridad de las cepas, con el uso de oligonucleótidos específicos sobre biopsias de ganglios linfáticos mesentéricos. Los datos obtenidos de las distintas técnicas aplicadas se integraron mediante análisis estadístico de multivariantes.

Los resultados obtenidos del análisis de las distintas muestras mediante DGGE y T-RFLP mostraron una gran diversidad en los perfiles, sin efecto importante de la administración de probióticos sobre la composición de la microbiota intestinal. Se observaron algunos efectos sobre los perfiles específicos de lactobacilos. Se detectó la cepa probiótica de manera irregular en las muestras fecales y de biopsias, posiblemente debido niveles reducidos del probiótico en comparación con el resto de la comunidad endógena de lactobacilos. En los modelos analizados de inmunosupresión no se observó efecto sobre el sistema inmune determinado mediante recuento de leucocitos periféricos por la administración de la cepa probiótica, si bien tampoco se vio agravado por la misma. Se obtuvo un efecto claro del tratamiento probiótico en la eliminación de bacterias filamentosas, bacterias asociadas con el desarrollo del sistema inmune. En el modelo de enfermedad inflamatoria intestinal se observó un aumento de la respuesta inflamatoria por la administración conjunta del microorganismo probiótico.

SUMMARY

There are many health-promoting properties attributed to probiotic microorganisms, mostly associated with the gastrointestinal tract, immune system (including allergic responses), the cardiovascular system or with the urogenital tract. Only limited knowledge, however, is available on the effect of probiotic bacteria on the composition of the gastrointestinal microbiota and their interactions with endogenous microorganisms as well as with the host. Also there is still much to learn on the molecular mechanisms of the beneficial effects, which can also vary from one probiotic strain to another or can be the result of multiple factors. The immune status of the host as well as the integrity of the gastrointestinal tract, are key factors affecting choice and outcome of probiotic treatment. One of the potential applications of probiotics is the restoration of the immune response, which is deteriorated by infections, antitumoral chemotherapy or immunosuppressant treatments among others. Probiotic bacteria have also been proposed to have therapeutic value for the treatment of inflammatory bowel disease (IBD). In all these applications, it is very important to consider the biosafety of the strains used since they are live microorganisms given to patients that are affected in their immunocompetence and/or have an altered endogenous intestinal microbiota.

This thesis work was done within a project supported by the Health Research Fund of the Spanish Ministry of Health. The objectives of the project were to study the ability of probiotic bacteria to colonize the intestinal mucosa, interact with the endogenous microbiota and modify the response of the immune system, in different mouse models, with the evaluation of the safety of probiotic bacteria. These models were approximations to clinical situations of immunosuppression and inflammatory bowel disease.

For this purpose strains of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* were isolated from different dairy products. Female BALB/c mice of 8-10 weeks old received a daily dosis of 100µl with 10⁹ CFU of bacterial suspensions in skimmed milk by intragastric canula for different periods of time. Fecal samples were collected during the trials, and the last day biopsies were taken from the complete gastrointestinal tract. Initial experiments aimed at determining the most effective probiotic dosis and appropriate conditions for the different techniques used to characterize the intestinal microbiota and its response to probiotic as well as health-compromising treatments.

To detect changes in composition of the intestinal microbiota of mice during the different treatments, the most dominant groups of microorganisms in feces were analyzed with a polyphasic taxonomy approach comprising

traditional cultivation techniques and 16S rRNA gene-targeted molecular approaches (DGGE, T-RFLP, clone libraries as well as quantification of specific bacterial populations by real-time PCR). DNA isolation and PCR reactions were performed on all samples under the same conditions. PCR products used for DGGE were obtained with universal primers targeting the V6-V8 region of the 16S rRNA gene, and with genus-specific primers for the *Lactobacillus* community. In addition, the influence of the immune response and/or probiotic treatment on the persistence, abundance and diversity of segmented filamentous bacteria (SFB), abundant inhabitants of the small intestine in mice before weaning, was evaluated by group-specific 16S rRNA-based detection. The dissemination of probiotic bacteria beyond the intestine was analyzed with molecular tools on mesenteric lymph nodes biopsies. All the data obtained with the different approaches were integrated by submission to multivariate statistical analyses.

DGGE and T-RFLP results showed very diverse profiles in all samples, with no important effects on the composition of the endogenous microbiota by the probiotic treatment. Some effects were observed in the lactobacilli specific profiles. The strain used for the treatment was detected irregularly in both fecal and biopsy samples, most probably because of the low numbers of the probiotic present in these samples compared to the rest of the indigenous *Lactobacillus* community. In the immunosuppression trials, no effects were observed on the leucocytes counts by the administration of the probiotic strain, although the immune status was also not negatively influenced by the treatment either. A clear effect was observed on the numbers of segmented filamentous bacteria, bacteria associated with the development of the immune system. In the inflammatory bowel disease mouse model an increase of the inflammatory response was observed with the joint administration of the treatment with the probiotic strain.

INTRODUCCIÓN	1
A. MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS: MITO O REALIDAD	3
A.I. Selección de bacterias probióticas	5
A.I.1. Género <i>Lactobacillus</i>	7
A.I.2. Género <i>Bifidobacterium</i>	10
A.II ¿En qué consiste el efecto probiótico?	11
A.II.1. Tracto gastrointestinal	12
a) Enfermedad inflamatoria intestinal.	12
b) Cáncer	13
c) Diarrea y estreñimiento	13
d) <i>Helicobacter pylori</i>	14
A.II.2. Respuesta inmune	14
A.II.3. Alergia	16
A.II.4. Sistema cardiovascular	17
A.II.5. Tracto urogenital	18
A.III Riesgos en la intervención con probióticos	19
B. TRACTO GASTROINTESTINAL	20
B.I. Anatomía y fisiología	20
B.II. ¿Somos lo que comemos?: Microbiota gastrointestinal	22
C. ECOLOGÍA MICROBIANA	27
C.I. Técnicas basadas en el gen rRNA 16S	28
C.II. Otras técnicas de identificación	35
D. BIBLIOGRAFÍA	38
MATERIAL Y MÉTODOS	43
A. CEPAS PROBIÓTICAS	45
A.I. Pruebas fenotípicas	45
A.I.1. Pruebas bioquímicas	45
A.I.2. Test rápido API® 50CH	45
A.I.3. Resistencia a pH ácido.	45
A.II. Caracterización molecular	46
A.II.1. Amplificación y secuenciación del gen rRNA 16S	46
A.II.2. DGGE	46
A.II.3. PFGE	47
B. MEDIOS DE CULTIVO	47
B.I. Medios para coprocultivos	47
B.I.1. Wilkins – Chalgren	48
B.I.2. Agar sangre – Columbia	48

B.I.3. MRS: de Man, Rogosa y Sharpe	49
B.I.4. Beerens	49
B.I.5. MacConkey	50
B.I.6. Clostridium reforzado	50
B.I.7. Sabouraud – cloranfenicol	51
B.II. Medios para el cultivo de lactobacilos	51
B.II.1. MRS	51
B.II.2. LAMVAB	52
B.III. Medios para la transformación de <i>Escherichia coli</i>	52
B.III.1. Luria – Bertani (LB)	52
B.III.2. SOB/SOC	52
C. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN	53
C.I. Animales de experimentación	54
C.I.1. Administración de las cepas probióticas	55
C.I.2. Toma de muestras	55
C.II. Tratamiento probiótico en ratones normales	56
C.II.1. Tratamiento probiótico a corto plazo en ratones normales	56
C.II.2. Tratamiento probiótico a largo plazo en ratones normales	57
C.III. Tratamiento probiótico en ratones normales e inmunocomprometidos	59
C.III.1. Tratamiento probiótico a corto plazo en ratones normales e inmunocomprometidos	59
C.III.2. Tratamiento probiótico a largo plazo en ratones normales e inmunocomprometidos	60
C.IV. Acción de probióticos en un modelo de inflamación intestinal	61
D. ÁCIDOS NUCLEICOS: DNA, RNA Y PLÁSMIDOS	63
D.I. Extracción de ácidos nucleicos	63
D.I.1. DNA	63
a) Biopsias	63
b) Cultivos puros	63
D.I.2. RNA	64
D.I.3. Plásmidos	64
D.II. Amplificación de ácidos nucleicos: PCR	65
D.II.1. PCR para T-RFLP	67
D.II.2. PCR cuantitativa o a tiempo real	68
D.III. Clonaje	70
D.IV. RFLP	71
E. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE COMUNIDADES	72
E.I. Coprocultivos	72
E.II. DGGE	72
E.II.1. Preparación del gel de acrilamida	73

E.II.2. Electroforesis	73
E.II.3. Tinción del gel	74
E.II.4. Análisis de los geles	75
E.III. T-RFLP	76
E.III.1. Amplificación y digestión del DNA	76
E.III.2. Separación de los fragmentos	77
E.III.3. Análisis de los resultados	77
E.IV. PFGE	78
E.IV.1. Extracción y digestión del DNA	78
E.IV.2. Electroforesis	79
F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	79
F.I. Análisis de T-RFLP “IN SILICO”	79
F.II. Análisis estadístico multivariante	80
G. BIBLIOGRAFÍA	82
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
A. CEPAS PROBIÓTICAS	87
A.I. Pruebas fenotípicas	87
A.I.1. Pruebas tradicionales	87
A.I.2. Test rápido API® 50CH	87
A.I.3. Resistencia a pH ácido	88
A.II. Caracterización molecular	89
B. MODELOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	90
C. TRATAMIENTO PROBIÓTICO A CORTO PLAZO EN RATONES NORMALES	91
C.I. Extracción de DNA	92
C.II. DGGE	93
C.III. Clones de lactobacilos	95
C.IV. Análisis estadístico	97
C.IV.1. Heces	97
C.IV.2. Biopsias	98
D. TRATAMIENTO PROBIÓTICO A LARGO PLAZO EN RATONES NORMALES	99
D.I. Coprocultivos	100
D.II. DGGE	102
D.III. T-RFLP	107
D.IV. Clones de lactobacilos	111
D.V. Aislados de lactobacilos	113

D.VI. Análisis estadístico	119
D.VI.1. Heces	119
D.VI.2. Biopsias	122
E. TRATAMIENTO PROBIÓTICO A CORTO PLAZO EN RATONES NORMALES E INMUNOCOMPROMETIDOS	124
E.I. Inmunosupresión	124
E.II. DGGE	125
E.III. “Segmented filamentous bacteria”	130
E.IV. T-RFLP	132
E.V. Análisis estadístico	137
E.V.1. Heces	137
E.V.2. Biopsias	138
F. TRATAMIENTO PROBIÓTICO A LARGO PLAZO EN RATONES NORMALES E INMUNOCOMPROMETIDOS	140
F.I. Inmunosupresión	141
F.II. Coprocultivos	142
F.III. DGGE	144
F.IV. Análisis estadístico	152
F.IV.1. Heces	152
F.IV.2. Biopsias	153
G. ACCIÓN DE PROBIÓTICOS EN UN MODELO DE INFLAMACIÓN INTESTINAL	154
G.I. Respuesta inflamatoria	155
G.II. DGGE	157
G.III. T-RFLP	163
G.IV. Análisis estadístico	167
G.IV.1. Heces	167
G.IV.2. Biopsias	169
H. BIBLIOGRAFÍA	172
DISCUSIÓN GENERAL	175
CONCLUSIONES (CONCLUSIONS)	189
ANEXO	193
Secuencias del gen rRNA 16S	195

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AFLP: “Amplified Fragment Length Polymorphism”
Ag: Antígeno
Amp: Ampicilina
ARDRA: “Amplified rDNA restriction análisis”
BLAST: “Basic Local Alignment Search Tool”
CCA: “Canonical correspondence analysis”
CD: “Crohn’s disease”
Cys: Cisteína
DGGE: “Denaturing gradient gel electrophoresis”
DCA: “Detrending correspondence analysis”
DNA: Ácido desoxirribonucleico
FAO: “Food and Agriculture Organization of the United Nations”
FISH: “Fluorescent in situ hybridization”
HDL colesterol: Colesterol de alta densidad
HIV: “Human immunodeficiency virus”
IBD: “Inflammatory bowel disease”
Ig: Inmunoglobulina
IL: Interleuquinas
IPTG: Isopropil β -D-tiogalactósido
IVET: “In vivo expression technology”
LAB: “Lactic acid bacteria”
LB: Medio Luria-Bertani
LDL colesterol: Colesterol de baja densidad
MRS: Medio de Mann, Rogosa y Sharpe
NCBI: “National Center for Biotechnology Information”
NK: Células “natural killer”
PBL: “Peripheral blood leucocyte”
PBS: “Phosphate buffer saline”
PCA: “Principal component análisis”
PCR: “Polymerase chain reaction”.
PFGE: “Pulse field gel electrophoresis”
q-PCR: PCR a tiempo real o cuantitativa.
RAPD: “Random amplification of polymorphic DNA”
RDA: “Redundancy analysis”
RDP: “Ribosomal data project”
RISA: “Ribosomal interspace spacer análisis”
RT-PCR: “Reverse transcriptase PCR”
RNA: Ácido ribonucleico
SDS: “Sodium dodecyl sulphate”
SSCP: “Single-strand conformation polymorphism”
TAE: Buffer Tris-Acetato-EDTA
TBE: Buffer Tris-Borato-EDTA
TGI: Tracto gastrointestinal
TNBS: Ácido 2,4,6-Trinitrobenceno-sulfónico
T-RFLP: “Terminal- restriction fragment length polymorphism”
T-RF: Fragmento obtenido mediante T-RFLP
UC: “Ulcerative colitis”
WHO: “World health organization”
X-Gal: 5-Bromo-4-cloro-3-indol β -D-galactósido

INTRODUCCIÓN

A. PROBIÓTICOS: MITO O REALIDAD

Fue el ruso Elie Metchnikoff (1845-1916) ganador del premio Nóbel por sus estudios sobre la fagocitosis, quien en 1907 destacó el efecto beneficioso que ciertas bacterias podían ejercer al implantarse en el cuerpo humano. Este científico interesado en el proceso del envejecimiento, sugirió que la comunidad bacteriana presente en el intestino grueso humano era una fuente de sustancias tóxicas para el sistema nervioso y vascular del hospedador. Señaló a las bacterias intestinales como las responsables de lo que denominó como “autointoxicación”, al ser capaces de degradar proteínas mediante el proceso de putrefacción, liberando amonio, aminas e indoles. Metchnikoff determinó que pequeñas concentraciones de estos productos bacterianos podían escapar de la detoxificación por parte del hígado, entrando en la circulación sanguínea. Como remedio a este proceso planteó la posibilidad de sustituir, o al menos disminuir el número de estas bacterias putrefactoras, mediante la administración oral de cultivos de microorganismos “beneficiosos” con capacidad de implantarse en el tubo digestivo, fermentar carbohidratos y con reducida actividad proteolítica. Como bacterias beneficiosas eligió a las bacterias productoras de ácido láctico o LABs (“lactic acid bacteria”) por ser conocidas como microorganismos que fermentan la leche mediante un proceso natural previniendo con ello el crecimiento de bacterias no ácido tolerantes incluyendo las especies proteolíticas. Si la fermentación láctica prevenía la putrefacción de la leche, posiblemente tuviera el mismo efecto en el tracto digestivo. De hecho, el consumo de productos lácteos en Europa del Este con su “*Bacillus bulgaro*” asociado a su larga longevidad, fue una prueba de su eficacia para su introducción en la Europa occidental, naciendo con ello el concepto de probióticos (Tannock, 2004).

En la misma época que Metchnikoff, el pediatra francés Henry Tissier (1906) observó en las heces de niños con diarrea un número de bacterias con forma peculiar de “Y” a las que denominó “*bifids*”, que por el contrario se hallaban en mucho mayor número en heces de niños sanos. Esta evidencia también le llevó a sugerir la administración de estas bacterias a niños que presentasen cuadros de diarrea, para ayudar a restaurar su microbiota intestinal (FAO/WHO, 2001).

La investigación sobre microorganismos probióticos sin duda ha experimentado su gran esplendor en los últimos 20 años. No fue hasta los años 60 que se les asignó el nombre de probióticos (de “pro-vida”, en contra del concepto antibiótico) a “aquellas sustancias producidas por microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos” (Lilly & Stillwell, 1965). Fuller, en 1989, redefinió este término probiótico como “suplemento alimentario

formado por microorganismos vivos que afectan de manera beneficiosa al hospedador mediante la mejora de su equilibrio intestinal” (Fuller, 1989), incluyendo en esta definición el concepto de suplemento alimentario y la cualidad de que el microorganismo administrado esté vivo. En la actualidad se ha demostrado que bacterias inactivadas pueden ser igualmente efectivas que los microorganismos vivos (Rachmilewitz *et al.*, 2004), así como su efecto beneficioso mediante administración subcutánea (Sheil *et al.*, 2004). La definición más aceptada hoy día se dio en el año 2002 en una reunión de expertos para la FAO/WHO (“food and agriculture organization of the United Nations/World health organization”) para la elaboración de una “Guía para la evaluación de probióticos en alimentos”, donde se definieron como “microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas ejercen en una acción beneficiosa sobre la salud del hospedador” (FAO/WHO, 2002). Algunas de las otras numerosas definiciones propuestas para los microorganismos probióticos se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1: Definiciones de probióticos.

Año	Definición	Fuente
2003	<i>Microorganismos vivos que en cantidades apropiadas ejercen un efecto beneficioso en la salud y bienestar del hospedador</i>	(Sanders, 2003)
2000	<i>Los probióticos contienen células microbianas que, en su paso por el tracto gastrointestinal benefician la salud del consumidor</i>	(Tannock <i>et al.</i> , 2000)
1999	<i>Preparaciones microbianas o componentes de células microbianas que ejercen un efecto beneficioso en la salud y bienestar del hospedador</i>	(Salminen <i>et al.</i> , 1999)
1998	<i>Alimento microbiano vivo que ejerce un efecto positivo sobre el equilibrio de la microbiota intestinal.</i>	(Zoppi, 1998)
1998	<i>Microorganismos vivos que, tras su ingesta en determinado número, provocan beneficios para la salud independientemente de sus propiedades nutritivas</i>	(Guarner & Schaafsma, 1998)
1996	<i>Cultivo microbiano vivo o producto lácteo cultivado que ejerce un efecto positivo sobre la salud y la nutrición del huésped.</i>	(Salminen, 1996)
1992	<i>Mono o policultivo de microorganismos vivos que, en el hombre o en el animal, poseen una influencia beneficiosa mejorando las propiedades de la microflora endógena.</i>	(Havenaar & Huis In't Veld, 1992)
1991	<i>Complemento alimentario microbiano vivo que ejerce una influencia beneficiosa sobre el crecimiento del animal hospedador mejorando el equilibrio de su flora microbiana intestinal.</i>	(Fuller, 1991)
1974	<i>Organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio de la flora intestinal.</i>	(Parker, 1974)
1971	<i>Extractos de tejidos que estimulan el crecimiento microbiano.</i>	(Sperti, 1971)
1954	<i>Una de las primeras indicaciones de los efectos favorables (“Probiotika”) de las bacterias beneficiosas.</i>	(Vergin, 1954)

El término prebiótico, algo más actual, generalmente alude a “ingredientes alimentarios no digeribles, que afectan al hospedador de manera beneficiosa mediante la estimulación del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de especies presentes en el colon” (Gibson & Roberfroid, 1995). Es decir, son moléculas que tienen el mismo objetivo que los microorganismos

probióticos mediante un mecanismo diferente. Con ello promueven el desplazamiento de organismos no deseables como clostridios o coliformes, por otros beneficiosos como aquellos pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*. Entre estos compuestos prebióticos encontramos disacáridos, diferentes oligosacáridos como fructooligosacáridos y galactooligosacáridos, y polisacáridos como la inulina o el almidón.

Más reciente es el término simbiótico, término el cual se define como “mezclas de probióticos y prebióticos que afectan de manera beneficiosa al hospedador mediante la mejora de la supervivencia e implantación en el tracto gastrointestinal de suplementos dietéticos de microorganismos vivos” (Roberfroid, 1998).

A.I. SELECCIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS

Para poder considerar a un microorganismo como probiótico debe cumplir una serie de requisitos indispensables según los criterios establecidos por la FAO/WHO (FAO/WHO, 2002):

- * Estar perfectamente caracterizado a nivel de género, especie y cepa, y depositado en una colección de cultivos internacional y reconocida.
- * Ser seguro para el hospedador, determinado mediante ensayos *in vitro* y/o en animales de experimentación si es necesario.
- * Ser capaz de sobrevivir a su paso por el tracto gastrointestinal, determinado esto mediante una serie de pruebas estándar:
 - Resistencia al pH gástrico y a sales biliares
 - Capacidad de adhesión a la mucosa y/o a células epiteliales humanas o a líneas celulares
 - Actividad antimicrobiana frente a potenciales microorganismos patógenos

Son varios los géneros que poseen miembros considerados como microorganismos probióticos, aunque sin duda los más estudiados son las ya mencionadas bacterias del ácido láctico o LABs, entre las que destacan los lactobacilos y las bifidobacterias. Algunas de estas especies probióticas así como los efectos que se les adjudican se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2: Microorganismos probióticos (Ouwehand *et al.*, 2002).

Género	Especie	Cepa	Efecto
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La5	Disminuye la diarrea asociada a antibióticos
	<i>casei</i>	Shirota	Acorta la diarrea asociada a <i>Rotavirus</i> . Reduce la recurrencia del cáncer de vejiga. Efectos sobre el sistema inmune
	<i>plantarum</i>	299v	Reducción del colesterol tipo LDL.

			Alivio de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal.
	<i>johnsonii</i>	La1	Mejora de la acción de vacunas orales. Disminuye la colonización por <i>Helicobacter pylori</i> .
	<i>reuteri</i>	SD2112	Acorta la diarrea asociada a <i>Rotavirus</i> .
	<i>rhamnosus</i>	GG	Acorta la diarrea asociada a <i>Rotavirus</i> . Efectos sobre el sistema inmune. Tratamiento y prevención de la alergia. Alivio de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal.
	<i>salivarus</i>	UCC118	Alivio de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal.
	<i>fermentum</i>	KLD	
	<i>paracasei</i>	F19	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>crispatus</i>		
	<i>breve</i>		Alivio de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal.
	<i>lactis</i>	Bb12	Tratamiento de la alergia. Acorta la diarrea asociada a <i>Rotavirus</i> . Disminuye la incidencia de la “diarrea del viajero”. Mejora de la acción de vacunas orales.
	<i>longum</i>	BB536	
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	Nissle 1917	Disminuye la aparición de episodios en la enfermedad inflamatoria intestinal.
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	<i>boulardii</i>	Disminuye la aparición de episodios en la enfermedad inflamatoria intestinal.
<i>Propionibacterium</i>	<i>freudenreichii</i>	JS	
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>		
	<i>cereus</i>	toyo	

En la actualidad se dispone de la secuencia completa del genoma de algunos componentes de la familia de las LABs, como es el caso de *Lactococcus lactis* y *Lactococcus cremoris*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus* y *Lactobacillus delbrueckii*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium breve*, y *Streptococcus thermophilus* entre otros. El conocimiento del genoma de los microorganismos probióticos es de gran relevancia ya que nos proporciona una herramienta valiosa para un mejor y más profundo entendimiento de sus mecanismos de acción, y con ello conseguir un mayor potencial de aplicación de los mismos ya sea en la industria alimentaria o farmacéutica. Gracias al conocimiento de su secuencia se ha podido determinar qué genes están implicados en procesos tan importantes como la resistencia a ácidos o sales biliares, la exclusión de microorganismos patógenos, su capacidad de colonización y adhesión al epitelio intestinal o el mecanismo por el cual producen una reducción en situaciones de intolerancia a la lactosa (de Vos *et al.*, 2004).

A.I.1. GÉNERO *LACTOBACILLUS*

El género *Lactobacillus* es muy diverso, inicialmente propuesto por Beijerinck en 1901 (Vandamme *et al.*, 1996). Sus características taxonómicas comunes se limitan a su forma bacilar (aunque cuando crecen en determinadas condiciones pueden parecer cocos), y su habilidad para producir ácido láctico como producto final exclusivo o mayoritario de su metabolismo. Son bacterias Gram positivas no formadoras de esporas, con un tamaño entre 0.5–1.2 μm . Su contenido en guanina y citosina (G+C%) varía entre el 32–53%, rango mucho más amplio que el que presentan otras bacterias del ácido láctico. Son organismos anaerobios facultativos, en general crecen pobremente en presencia de O_2 y su crecimiento se ve favorecido con una tensión de CO_2 al 5%. Debido a que son microorganismos auxotróficos para un gran número de nutrientes, crecen mejor en un medio complejo y rico. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30–40°C, pero pueden crecer en un rango desde 5–53°C. También son considerados microorganismos acidúricos, con un crecimiento óptimo en un pH de 5.5–5.8 pero en general pueden soportar e incluso crecer a $\text{pH} < 5$. Además del crecimiento a distintas temperaturas, rangos de pH y concentraciones de sal, otros métodos para distinguir lactobacilos incluyen el patrón de fermentación de carbohidratos (API 50CHL, Biomerieux®), la hidrólisis de arginina y el contenido en peptidoglucano. Determinadas especies de este género se han utilizado para el desarrollo de vitaminas y otros micronutrientes.

Su clasificación ha sido revisada en numerosas ocasiones, ya sea en base a análisis filogenéticos, pruebas fenotípicas, proteínas celulares totales o de componentes de la pared celular. Su estudio filogenético divide al género en tres grupos principales, y mediante el análisis de su perfil fisiológico podemos subdividir estos grupos, obteniendo una información aún más completa (Tannock, 1999). Un resumen de su clasificación se muestra en la Tabla 3:

- * Grupos filogenéticos
 - Grupo *L. delbrueckii* (grupo a): Contiene la especie *L. delbrueckii*, especie tipo del género *Lactobacillus*.
 - Grupo *L. casei-Pediococcus* (grupo b): Formado por especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus*.
 - Grupo *Leuconostoc* (grupo c): Comprende dos subgrupos, uno de los cuales fue reclasificado posteriormente como género *Weissella*.
- * Grupos basados en pruebas fenotípicas:
 - Homofermentadores obligados (grupo “A”): Degradan hexosas a ácido láctico mediante la ruta de *Embden-Meyerhof*. No pueden usar pentosas o gluconato. Este grupo engloba dos grupos filogenéticos,

creando los subgrupos *L. delbrueckii* (subgrupo aA) y *L. casei-Pediococcus* (subgrupo bA). Dentro del grupo aA encontramos a *L. acidophilus* de gran importancia por su aplicación en la industria alimentaria y médica.

- Heterofermentadores facultativos (grupo “B”): Son capaces de fermentar hexosas a ácido láctico por la ruta de *Embden-Meyerhof* o a ácidos láctico, acético y fórmico y etanol en situaciones de limitación de glucosa. Fermentan pentosas a ácidos láctico y acético mediante la enzima fosfocetolasa. También engloba dos subgrupos, subgrupo aB con *Lactobacillus acetotolerans* y *Lactobacillus hamsteri* y subgrupo bB donde encontramos las especies *L. casei* y *L. plantarum* utilizadas en esta tesis.
- Heterofermentadores obligados (grupo C): fermentan hexosas a ácido láctico, acético, etanol y CO₂ mediante la ruta del fosfogluconato. Fermentan pentosas a ácido láctico y acético. En ambas rutas interviene una enzima pentosa-fosfocetolasa.

Tabla 3: Clasificación del género *Lactobacillus*

Grupo filogenético “a”			
Homofermentadores obligados “A”		Heterofermentadores facultativos “B”	
<i>L. acidophilus</i>		<i>L. acetolerans</i>	
<i>L. amilophilus</i>		<i>L. hamsteri</i>	
<i>L. amylovorus</i>			
<i>L. crispatus</i>			
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>			
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>			
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>			
<i>L. gallinarum</i>			
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. helveticus</i>			
<i>L. jensenii</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. kefiranofaciens</i>			
<i>L. kefirgranum</i>			
Grupo filogenético “b”			
Homofermentadores obligados	Heterofermentadores facultativos	Heterofermentadores obligados	
“A”	“B”	“C”	
<i>L. aviarus</i> subsp. <i>aviarus</i>	<i>L. plantarum</i> *	<i>L. brevis</i>	
<i>L. aviarus</i> subsp. <i>araffinosus</i>	<i>L. casei</i> *	<i>L. buchneri</i>	
<i>L. farciminis</i>	<i>L. alimentarius</i>	<i>L. collinoides</i>	
<i>L. ruminis</i>	<i>L. bif fermentans</i>	<i>L. fermentum</i>	
<i>L. mali</i>	<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	<i>L. fructivorans</i>	
<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i>	<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	<i>L. hilgardii</i>	
<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. kefir</i>	
<i>L. sharpae</i>	<i>L. graminis</i>	<i>L. malefermentans</i>	
	<i>L. homohiochii</i>	<i>L. oris</i>	
	<i>L. intestinalis</i>	<i>L. panis</i>	

<i>L. murinus</i>	<i>L. parabuchneri</i>
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>L. parakefir</i>
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	<i>L. pontis</i>
<i>L. pentosus</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. agilis</i>	<i>L. suebicus</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. sanfrancisco</i>
<i>L. sake</i>	<i>L. vaccinoferus</i>
	<i>L. vaginalis</i>

Grupo filogenético “c”

Heterofermentadores obligados “C”

L. fructosus

*Cepas probióticas utilizadas en esta Tesis

Sin duda el género *Lactobacillus* es el más usado como probiótico. Como mencionó Tannock en 2004 hay una especial “afición” por los lactobacilos (Tannock, 2004) ya que durante el año 2003 sólo en una revista científica de microbiología aparecen 52 publicaciones con la palabra *Lactobacillus* en su título y resumen. Además de las ventajas que presentan por su manipulación frente a las bifidobacterias, una de sus principales ventajas es que el género *Lactobacillus* puede ser genéticamente modificado para la expresión de genes heterólogos, bien mediante electrotransformación o transferencia genética horizontal, y con ello conseguir que sus miembros puedan producir sustancias de interés biotecnológico o incluso terapéutico. Debido a la gran comunidad de lactobacilos existentes en el tracto gastrointestinal, el uso de bacterias autóctonas, es decir, aisladas inicialmente de este ecosistema, ayuda a la obtención de resultados positivos de colonización. En un trabajo de 2003 (Chang *et al.*, 2003) se utilizó una cepa recombinante de *Lactobacillus jensenii* capaz de sintetizar y secretar los primeros dos dominios humanos de CD4, y que in vitro inhibía de manera competitiva la infección de células humanas por el virus de inmunodeficiencia humano (HIV), pudiendo ser utilizada esta cepa para su implantación en grupos de riesgo. Si bien para este estudio utilizaron una cepa de *Lactobacillus* endógena, su implantación y persistencia en la vagina no quedaron claras.

Los lactobacilos además son estudiados como bacteria modelo del tracto gastrointestinal, aportando información sobre los mecanismos moleculares de la interacción de las bacterias con la mucosa intestinal, así como sobre su fisiología y aportación a la salud y bienestar del hospedador.



Fig. 1: Imagen al microscopio de *L. acidophilus*. ©Probiotics.com

A.I.2. GÉNERO *BIFIDOBACTERIUM*

Este género se considera probiótico por su uso en alimentos y su efecto beneficioso sobre el tracto gastrointestinal humano, aunque filogenéticamente están algo diferenciadas del grupo tradicional de las bacterias del ácido láctico, pertenecientes al phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, perteneciendo las bifidobacterias al phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, la cual incluye también a los géneros *Atopobium*, *Brevibacterium*, *Propionibacterium* y a las micobacterias. Las bifidobacterias son bacterias Gram positivas, anaerobias estrictas (algunas cepas pueden tolerar O₂ en presencia de CO₂), no móviles y no formadoras de esporas. Son bacilos pleomórficos pudiendo variar su morfología desde bacilos a formas ramificadas en “Y” o “V”, anheadas normalmente en uno de sus extremos. Esta ramificación depende no sólo de la especie, sino del medio de cultivo donde crezca la bacteria. Aunque esta morfología puede ser muy característica y de ayuda para su identificación, es necesario el resultado de pruebas bioquímicas para diferenciar a las bifidobacterias de géneros cercanos filogenéticamente como *Actinomyces* y *Propionibacterium*. Las bifidobacterias fermentan hexosas mediante la vía de la fructosa-6-fosfato fosfoacetolasa, siendo ésta una enzima clave para su identificación fenotípica a nivel de género, ya que son las únicas bacterias intestinales conocidas capaces de utilizar esta ruta metabólica. El producto final de su metabolismo es ácido acético y láctico, normalmente en relación 3:2. Existen 31 especies dentro de este género las cuales se muestran en la Tabla 4:

Tabla 4: Especies de *Bifidobacterium* (Tannock, 1999).

	Detectadas en heces humanas
<i>B. animalis</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>B. asteroides</i>	<i>B. angulatum</i>
<i>B. boum</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>B. choerinum</i>	<i>B. breve</i>
<i>B. coryneform</i>	<i>B. catenulatum</i>
<i>B. cuniculi</i>	<i>B. dentium</i>
<i>B. denticolens</i>	<i>B. gallicum</i>
<i>B. gallinarum</i>	<i>B. globosum</i>
<i>B. indicum</i>	<i>B. infantis</i>
<i>B. inspinatum</i>	<i>B. longum</i>
<i>B. magnum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>
<i>B. merycicum</i>	
<i>B. minimum</i>	
<i>B. pseudolongum</i>	
<i>B. pullorum</i>	
<i>B. ruminantium</i>	
<i>B. saeculare</i>	
<i>B. subtile</i>	
<i>B. suis</i>	
<i>B. termophilum</i>	

Aunque en la actualidad este género se está utilizando ampliamente por su capacidad probiótica, la información taxonómica que tenemos sobre el grupo sigue siendo limitada, tanto fisiológica como genéticamente. Aún se están desarrollando técnicas para su estudio y clasificación (Ventura *et al.*, 2004). Existen numerosas revisiones sobre el efecto probiótico de especies de este género, con especial interés en *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum* o *Bifidobacterium lactis*. Si bien en esta tesis no se han incluido cepas del género *Bifidobacterium* para su estudio, su importancia y amplio uso requería mencionarlos.

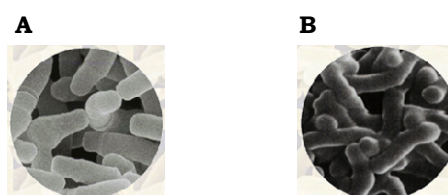


Fig. 2: Imagen al microscopio de **A.** *Bifidobacterium longum* y **B.** *Bifidobacterium bifidum*. ©Probiotics.com

A.II ¿EN QUÉ CONSISTE EL EFECTO PROBIÓTICO?

Son muchas las propiedades que se le atribuyen a los microorganismos probióticos, aunque la mayoría de ellas no están confirmadas por estudios debidamente elaborados en humanos, es decir, ensayos controlados a doble ciego, con grupos divididos de manera aleatoria y sus correspondientes grupos placebo. Entre los efectos atribuidos a los probióticos destacan los asociados con el tracto gastrointestinal, el sistema inmunitario entre los que se incluyen los procesos alérgicos, el sistema cardiovascular o con el tracto urogenital. También existen estudios sobre su efecto en individuos sanos aunque éstos resultan más complejos dada la dificultad de establecer unos valores generales o comunes de “salud”. Recientemente nuestro grupo ha publicado una revisión sobre las distintas aplicaciones de los microorganismos probióticos (Ramos-Cormenzana *et al.*, 2005).

En cuanto a los mecanismos moleculares de los denominados “efectos probióticos” aún se conoce poco, los cuales además pueden variar de una cepa probiótica a otra, o estar producidos por un conjunto de reacciones, como la producción de determinadas enzimas o metabolitos que actúen directamente sobre ellos u otros microorganismos, o sobre el hospedador. Además cada una de estas propiedades en un sistema determinado puede desencadenar un efecto secundario, beneficioso o no, en otro sistema, por lo que tal “efecto probiótico” llega a parecer todo un puzzle, el cual pieza por pieza pretende conformar un efecto final de salud y bienestar en el hospedador.

A.II.1. TRACTO GASTROINTESTINAL ✚

Los microorganismos probióticos presentan una serie de propiedades que los hacen de gran interés para el tracto gastrointestinal. Son capaces de sobrevivir el paso por el tracto gastrointestinal, es decir, el pH ácido del estómago, enzimas pancreáticas y sales biliares. Dada su capacidad de adhesión a la mucosa intestinal, ayudan a curar posibles daños presentes en la pared intestinal así como a la exclusión de patógenos. Los mecanismos probióticos para el control de patógenos intestinales incluyen:

- * Estimulación del sistema inmune
- * Cambios en el pH del tracto gastrointestinal por la producción de ácido láctico
- * Producción de compuestos antimicrobianos
- * Competición por:
 - Receptores o sitios de adhesión
 - Nutrientes y factores de crecimiento

Las aplicaciones de mayor interés son su uso en la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) o el cáncer, dada la evolución que estas enfermedades presentan en la sociedad actual.

a) Enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal o IBD (“inflammatory bowel disease”) es una afección crónica que causa inflamación en el tubo o las paredes del tracto gastrointestinal (TGI). Ésta puede provocar úlceras que sangran, dolor abdominal y diarrea entre otros síntomas. Los tipos más comunes de IBD son la colitis ulcerosa o UC (“ulcerative colitis”), donde la inflamación está localizada en las capas superiores de la pared del intestino grueso o colon, y la enfermedad de Crohn o CD (“Crohn’s disease”) cuya inflamación es más profunda, pudiendo darse en cualquier parte del tubo digestivo desde la boca hasta el ano. Ambas enfermedades presentan periodos de remisión y recaídas (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/>, actualizado en 2004).

La microbiota intestinal juega un papel importante en los periodos inflamatorios de la enfermedad, en cuyo caso un tratamiento probiótico podría remediar la inflamación a través de su interacción con la microbiota autóctona. Son numerosos los estudios que se han realizado en este campo, aunque aún es necesario un mayor conocimiento de la relación que se establece entre los probióticos y las células del hospedador, la mucosa intestinal y el sistema inmune para una mejor intervención. Recientes revisiones en este campo, entre muchas otras, son las publicadas por Schultz, Marteau o Sanan (Schultz &

Rath, 2002; Marteau *et al.*, 2003; Sartor, 2004; Shanahan, 2004). En particular hay un ensayo realizado con *L. rhamnosus* GG en pacientes que sufren de enfermedad de Crohn, en el que se obtuvo una leve mejora o alargamiento en el tiempo de remisión de la misma, aunque los resultados no son del todo concluyentes (Schultz *et al.*, 2004). Estudios más detallados sobre el efecto de los probióticos en estas enfermedades deben incluir análisis de la microbiota no sólo fecal sino intestinal con las más novedosas técnicas moleculares, además de ensayos a largo plazo, entre 5-10 años.

b) Cáncer

El caso del cáncer es aún más complicado ya que es un área de investigación todavía en desarrollo especialmente en cuanto a ensayos clínicos se refiere. En el tracto gastrointestinal podemos encontrar sustancias carcinogénicas bien producidas por la microbiota autóctona o sustancias exógenas. Este es un posible objetivo para un tratamiento probiótico, tratamiento que podría eliminar el carcinógeno o modificar la microbiota intestinal hacia una con menor actividad productora de carcinógenos. En el estudio de El-Nezami y colaboradores, la administración de cepas de *Lactobacillus* y *Propionibacterium* disminuyeron los niveles de aflatoxina B₁, un potente carcinógeno, del duodeno de aves (El-Nezami *et al.*, 2000). También se han utilizado microorganismos probióticos como coadyuvantes para el alivio de determinados efectos secundarios, como el control en la infección producida por *Candida* por la administración de una preparación con *L. acidophilus*, tras tratamientos de quimioterapia en pacientes con leucemia (Tomoda *et al.*, 1983).

c) Diarrea y estreñimiento

Entre los efectos más documentados se encuentra la prevención y el tratamiento de la diarrea provocada por ciertas bacterias y virus. Como ejemplo de estudio de prevención, se le administró a niños hospitalizados de edades comprendidas entre 5-24 meses, una fórmula suplementada con cepas de *Bifidobacterium bifidum* y *Streptococcus thermophilus*, donde se consiguió no sólo una disminución del número de casos de diarrea provocada por rotavirus sino la prevención de la diseminación del mismo (Saavedra *et al.*, 1994). También han sido utilizados microorganismos probióticos para el tratamiento de la diarrea aguda, como en el estudio llevado a cabo en 1991 en el que se mejoraba el estado de niños afectados con casos de diarrea aguda tras su rehidratación y consiguiente administración de cepas probióticas (Isolauri *et al.*, 1991). Además se ha demostrado el efecto beneficioso de microorganismos probióticos sobre la diarrea “del viajero” (Hilton *et al.*, 1997).

Existen otros estudios *in vitro* que demuestran que ciertas cepas probióticas pueden inhibir el crecimiento y la adhesión de microorganismos

patógenos como *Salmonella* a la mucosa intestinal (Shu *et al.*, 2000). Uno de los principales problemas en tratamientos antibióticos es la aparición de diarrea por el aumento en el número de clostridios, principalmente *Clostridium difficile*, el cual sintetiza una serie de toxinas que desencadenan el proceso diarreico. En estos pacientes la administración exógena de bacterias comensales o probióticos puede prevenir esta infección (Vanderhoof *et al.*, 1999) o ayudar a restaurar la microbiota normal anterior al tratamiento antibiótico, aliviando con ello los síntomas producidos por la infección (Biller *et al.*, 1995).

El estreñimiento es un caso algo más complejo ya que principalmente ha sido estudiado en ancianos hospitalizados, y los resultados obtenidos no son concluyentes. Es cierto que estos pacientes presentan una microbiota anormal, pero esto puede ser más una consecuencia del proceso de estreñimiento que la causa del mismo, por lo que un tratamiento probiótico no sería lo más importante, dada la influencia de otros factores como la dieta, medicación o inactividad física.

d) *Helicobacter pylori*

Estudios *in vitro* y ensayos en modelos animales de experimentación revelan la capacidad que poseen las bacterias del ácido láctico (LAB) de inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori*, patógeno Gram negativo responsable de la gastritis tipo B, úlcera péptica y el cáncer gástrico. Además son capaces de inhibir la actividad ureasa de esta bacteria, necesaria para su supervivencia en el pH gástrico (Midolo *et al.*, 1995). En humanos existen algunos indicios de este efecto inhibitorio, como el caso de *L. johnsonii* La1 administrado a individuos que presentaban una infección por *Helicobacter pylori*, consiguiendo una mejora sintomática aunque no una completa desaparición de la infección (Michetti *et al.*, 1999).

A.II.2. RESPUESTA INMUNE

Si bien el tracto gastrointestinal es uno de los principales objetivos para el uso de microorganismos probióticos, la mejora de la respuesta inmune no resulta menos importante. El sistema inmune humano está formado por toda una compleja red de reacciones conectadas entre sí y perfectamente organizadas. Un reciente compendio de los efectos que los microorganismos probióticos ejercen sobre nuestro sistema inmune lo encontramos en la revisión de Erika Isolauri en 2004 (Isolauri *et al.*, 2004). Atribuye a los probióticos la capacidad de estimular el sistema inmune así como propiedades antiinflamatorias.

El organismo humano posee una serie de barreras naturales que lo protegen de infecciones, así como una protección biológica proporcionada por la microbiota natural. El sistema inmunitario humano consta de varias "líneas de defensa", una primera línea de inmunidad innata (natural o inespecífica) que permite controlar la mayor parte de los agentes patógenos, y la inmunidad adquirida (adaptativa o específica) que suministra una respuesta específica frente a cada agente infeccioso. Si el antígeno (Ag) logra atravesar las barreras naturales, se pone en marcha el sistema inmune innato, el cual consta de:

- * Células:
 - Fagocitos: en sangre los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y monocitos, y en tejidos los macrófagos diferenciados a partir de los monocitos.
 - Células asesinas naturales o NK ("natural killer"): leucocitos activados por interferones. En experimentos realizados con ratones inyectados con la cepa de *L. casei* Shirota, se consiguió un aumento de la actividad de estas células, aumentando por tanto esta respuesta inmune natural (Matsuzaki & Chin, 2000).
- * Factores solubles:
 - Proteínas de fase aguda: Facilitan los procesos de fagocitosis.
 - Sistema del complemento: Formado por un grupo de unas 20 proteínas del suero que interaccionan entre sí y con otros componentes de los sistemas inmunes innato y adquirido. Se activa por dos rutas, la ruta clásica, que corresponde al sistema de inmunidad específica y depende de interacciones antígeno-anticuerpo, y la ruta alternativa perteneciente al sistema natural.

Por otro lado el sistema de inmunidad adquirida presenta dos tipos de respuesta:

- * Inmunidad adquirida humoral: Mediada por linfocitos B, que tras un estímulo antigénico se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos, y en células B memoria las cuales permiten una respuesta secundaria más rápida.
- * Inmunidad adquirida celular: Mediada por linfocitos T diferenciados en el timo. Los linfocitos T reconocen fragmentos de Ag presentado por células propias (nunca el Ag nativo) en combinación con las proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad. Las principales poblaciones de linfocitos T son:
 - linfocitos T citotóxicos: son células capaces de reconocer y matar a células portadoras de Ag extraños.
 - linfocitos T colaboradores o "*helper*": Existen varias subpoblaciones de linfocitos T colaboradores, algunas producen citoquinas que activan a macrófagos, otras colaboran con las respuestas de linfocitos B y T

citotóxicos, y por último hay subpoblaciones reguladoras que producen citoquinas antiinflamatorias como interleuquina-10 o TGF- β . Hay evidencias de que algunos componentes de la microbiota intestinal ejercen efectos estimuladores sobre esta última subpoblación de células, cuyas citoquinas actúan sobre las células del epitelio intestinal inhibiendo la ruta del factor de transcripción NF- κ B evitando así reacciones inflamatorias (Neish *et al.*, 2000)

En un estudio realizado con cepas de *L. rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* HN017 y *Bifidobacterium lactis* HN019 administradas a animales modelos de experimentación, se consiguió un considerable aumento de la capacidad fagocítica de leucocitos y macrófagos así como un aumento en la respuesta a mitógenos tanto de células B como T, además de una mayor producción de IFN- γ por las células del bazo. Tras la administración de Ag por vía tanto oral como sistémica, estas cepas probióticas fueron capaces de aumentar los niveles de anticuerpos en suero (Gill *et al.*, 2000).

En humanos, la administración de esta misma cepa de *L. rhamnosus* a ancianos por un periodo de tres semanas consiguió un notable aumento de la actividad fagocítica así como del número de células polimorfonucleares y monocitos en sangre periférica (Gill & Rutherford, 2001).

A.II.3. ALERGIA

En las últimas décadas, la aparición de procesos alérgicos, sobre todo en la sociedad desarrollada, ha experimentado un aumento importante pudiendo estar éstas provocadas por la conocida como “hipótesis de la higiene” (Sheikh & Strachan, 2004). Ésta alude a la excesiva higiene y cuidado de los niños así como el abuso de antibióticos como la causa de alergias, al evitar el contacto en edades tempranas con distintos antígenos o microorganismos impidiendo así la creación de defensas por el sistema inmune frente a ellos.

Son varias las evidencias que muestran el efecto beneficioso de microorganismos probióticos para el tratamiento o prevención de alergias, principalmente aquellas relacionadas con la intolerancia a derivados lácteos, o dermatitis atópicas de la infancia, revisados estos efectos recientemente (Miraglia del Giudice & De Luca, 2004). Se ha demostrado que la administración de *L. rhamnosus* GG a mujeres embarazadas 4 semanas antes del parto y posteriormente a los neonatos de alto riesgo (ambos padres presentaban algún tipo de alergia) durante seis meses adicionales, redujo la aparición de alergias a la mitad comparado con el grupo control (Kalliomaki *et al.*, 2001). Esta misma cepa administrada a niños alérgicos a leche de vaca con

dermatitis asociada a IgE, inmunoglobulina responsable de procesos de hipersensibilidad inmediata, consiguió un alivio de los síntomas aumentando los niveles de IFN- γ (Pohjavuori *et al.*, 2004). Aunque aún se desconocen los mecanismos de los probióticos para estos efectos, son varias las funciones que se les atribuyen en este campo (Isolauri, 2001; Kalliomaki *et al.*, 2001). Entre otras encontramos:

- * Capacidad de revertir el incremento en la permeabilidad intestinal
- * Mejora de la respuesta inmune intestinal asociada a IgA
- * Mejora de la función de barrera intestinal mediante su efecto sobre la microbiota endógena
- * Desviación de la respuesta de anticuerpos hacia la clase IgG en detrimento de la formación de IgE.

También se ha utilizado *L. paracasei* para el tratamiento y alivio de los síntomas producidos por la rinitis alérgica perenne, con una considerable mejora de la calidad de vida de los pacientes (Wang *et al.*, 2004).

A.II.4. SISTEMA CARDIOVASCULAR

Parece ser que el mecanismo por el cual las bacterias probióticas tienen un efecto sobre este sistema se debe a su capacidad de fermentar los carbohidratos indigestibles de los alimentos, produciendo con ello ácidos grasos de cadena corta en el intestino, los cuales provocan una disminución en los niveles de lípidos en sangre mediante la inhibición de la síntesis de colesterol hepático y/o la redistribución del colesterol de plasma a hígado. Además, algunas bacterias pueden interferir en la absorción de colesterol por el intestino bien mediante su actividad hidrolítica sobre las sales biliares, impidiendo su metabolismo, o bien mediante su absorción directa (Pereira & Gibson, 2002).

La administración a mujeres con problemas de hipercolesterolemia de un preparado con cepas de *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum* adicionado de oligofructosa (lo que conformaría un compuesto simbiótico) aumenta la concentración de HDL, colesterol considerado como beneficioso, favoreciendo así el índice entre LDL/HDL sin aumentar los niveles de colesterol total o de LDL (Kiessling *et al.*, 2002). Otro estudio más reciente también con *Bifidobacterium longum* en ratas y posteriormente humanos, si bien concluye que el probiótico no influye en los niveles de HDL, consiguió un considerable descenso en los niveles de colesterol total en sangre, descenso el cual es mayor en pacientes con cuadros de hipercolesterolemia (Xiao *et al.*, 2003). El probiótico *L. plantarum* 299v administrado a un grupo de pacientes durante seis semanas obtuvo una disminución en niveles de ciertos marcadores de

riesgo de enfermedad cardiovascular, lo cual lo convierte en un posible protector (en un nivel primario de intervención) de la aparición de arteriosclerosis (Naruszewicz *et al.*, 2002).

A.II.5. TRACTO UROGENITAL

Dentro de este grupo se engloban enfermedades infecciosas vaginales y del tracto urinario, así como las vaginitis provocadas por bacterias y levaduras, especialmente *Candida albicans*. Algunas de estas enfermedades pueden presentarse asintomáticas, aunque existe el riesgo de que evolucionen con serias complicaciones. La mayoría de ellas están asociadas a la desaparición de los lactobacilos de la microbiota normal vaginal. Existen recientes revisiones en este campo (Reid & Bruce, 2003; Reid *et al.*, 2004). Si bien en el caso de infecciones por *Candida* son pocas las cepas de *Lactobacillus* capaces de inhibir su crecimiento o capacidad de adhesión, la creación de una barrera vaginal de estas bacterias del ácido láctico previene frente a la ascensión de patógenos hacia la vejiga.

Son varios los criterios que conviene tener en cuenta para obtener un efecto probiótico en estas zonas, principalmente las cepas objeto de estudio deben presentar capacidad de colonización vaginal tras su administración oral o intravaginal, además de no presentar efectos adversos, y ser capaces de estimular el sistema inmune. Estas capacidades pueden estar influenciadas por el estado fisiológico previo del paciente, por factores como por ejemplo los niveles hormonales. Con el fin de tener en cuenta todos estos factores existen unos criterios para la selección de cepas probióticas de aplicación urogenital (Reid & Bruce, 2001).

Debido a la gran incidencia que presentan las infecciones urinarias (cada año la sufren alrededor de varios cientos de millones de mujeres), se está dedicando especial atención a esta aplicación. El 85% de los casos tienen como etiología a *Escherichia coli* uropatogénica posiblemente de origen intestinal. La combinación de las cepas *L. rhamnosus* GR-1 y *L. fermentum* RC-14 no sólo no presenta efectos adversos tras su administración diaria durante 60 días, sino que reduce la colonización vaginal por bacterias potencialmente patógenas y levaduras. Los mecanismos de este efecto parecen estar relacionados con la secreción de factores anti adhesivos como productos de su metabolismo, como peróxido de hidrógeno o bacteriocinas, además del efecto sobre el sistema inmune (Reid *et al.*, 2003).

A.III RIESGOS EN LA INTERVENCIÓN CON PROBIÓTICOS

Son muchos los estudios publicados que aluden a la importancia de los microorganismos probióticos para el mantenimiento de la salud y la prevención y tratamiento de numerosas enfermedades, pocos de los cuales están realizados correctamente desde el punto de vista epidemiológico, llevando a resultados, si no equívocos, al menos confusos o no del todo fiables. Un resumen cronológico de éstos estudios lo encontramos en una excelente revisión de Reid de 1999 (Reid, 1999).

Es necesario establecer una serie de criterios para determinar la seguridad en el uso de microorganismos probióticos en alimentos o preparados médicos. Cuando un determinado producto se está desarrollando para su uso médico, debe superar cuatro fases clínicas en humanos una vez obtenidos resultados prometedores en ensayos *in vitro* y animales si se requiere. En estos ensayos se puede determinar un efecto probiótico previo al establecimiento de la enfermedad (ensayos preventivos) o su carácter beneficioso en una enfermedad ya en curso (ensayos terapéuticos). Todos estos diseños deben incluir controles apropiados así como síntomas a monitorizar bien definidos, incluyendo en los objetivos del estudio aspectos del uso final propuesto para el organismo probiótico. Los grupos objeto de estudio deben separarse de manera aleatoria incluyendo un grupo placebo. La administración del preparado debe realizarse idealmente a doble ciego, es decir, con desconocimiento de la cualidad probiótica o placebo del preparado tanto por parte del paciente como del médico o investigador encargado, y elegir un número adecuado de sujetos según la fase del ensayo para conseguir resultados estadísticamente fiables. Además es preferible que los resultados estén corroborados por más de un centro de investigación independiente.

Existe cierta reticencia en el uso en alimentos de bacterias probióticas que presenten en su genoma genes de resistencia a antibióticos de uso clínico, especialmente aquellas cepas que puedan transmitir esta resistencia a otras especies intestinales o presentes en alimentos mediante elementos genéticos.

Además, en los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* es necesario realizar un análisis más detallado de su capacidad de resistencia a antibióticos, ya que aunque si bien los lactobacilos han sido usados a lo largo de la historia sin presentar riesgo en humanos, y no se han encontrado propiedades patogénicas o virulentas tanto en lactobacilos como bifidobacterias y lactococos, es cierto que bajo determinadas circunstancias pueden presentar efectos adversos (Salminen *et al.*, 1998). Uno de los principales efectos adversos de los microorganismos probióticos, aunque se da en muy bajo

número de casos, es la aparición de bacteriemia, es decir, aparición de bacteria en sangre al atravesar el microorganismo la barrera intestinal y llegar a órganos y finalmente a sangre. Existen una serie de factores que predisponen a un paciente frente a este cuadro clínico, como son un estado de inmunosupresión, hospitalizaciones prolongadas o intervenciones quirúrgicas. Este efecto se ha estudiado con más detalle para el género *Lactobacillus*, ya que si bien se considera un género de baja patogenicidad, algunas especies han aparecido en cultivos sanguíneos en casos de bacteriemia (Salminen *et al.*, 2004). Uno de los factores que parece estar implicado en este proceso es una mayor capacidad de adhesión por parte de las cepas aisladas de sangre, si bien necesitan de otros mecanismos de patogenicidad (Apostolou *et al.*, 2001). Existe un estudio realizado en hospitales de Finlandia donde se demuestra que el aumento en el consumo del probiótico *L. rhamnosus* GG en dicho país en los últimos años no ha conllevado a un aumento en las bacteriemias provocadas por estos lactobacilos (Salminen *et al.*, 2002).

B. TRACTO GASTROINTESTINAL

B.I. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA

El tracto gastrointestinal (TGI) humano ocupa una parcela importante de nuestro cuerpo, con una longitud de 7 metros y medio dividido en distintas zonas anatómicas cada una de las cuales posee una función específica (fig. 3).

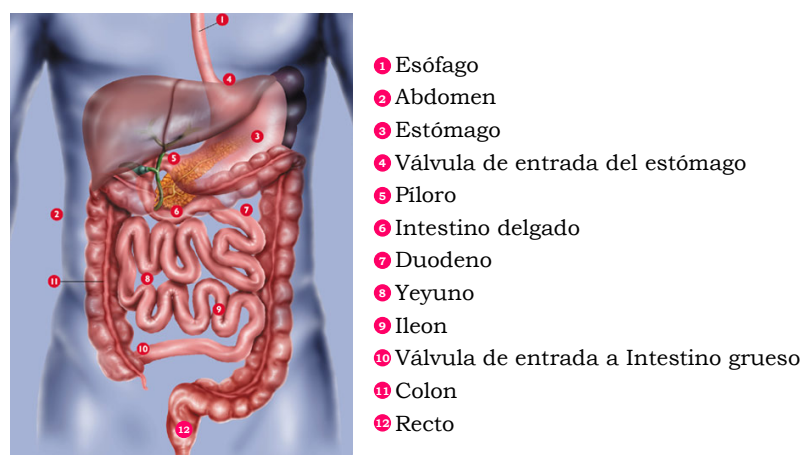


Fig. 3: Imagen del tracto digestivo humano

El esófago es un tubo muscular que mueve la comida desde la boca al estómago. En el estómago, situado en la parte superior del abdomen, es donde se mezcla la comida con los ácidos gástricos, los cuales van a facilitar la ruptura de proteínas complejas, grasas y carbohidratos en unidades más pequeñas y de fácil absorción. A la entrada del estómago existe una válvula

que permite el paso de la comida desde el esófago, y a su vez impide que los ácidos gástricos suban al esófago. El píloro es un músculo pequeño y redondo situado a la salida del estómago y en la entrada del duodeno. Su función es cerrar el estómago mientras se digiere la comida a fragmentos más pequeños, momento en el cual se abre y permite su paso al intestino delgado. El intestino delgado mide entre 4.5 – 6 metros, y es el lugar donde se realiza la mayor parte de la absorción de nutrientes de los alimentos. Se divide en tres secciones: duodeno, yeyuno e íleon. El duodeno es la primera sección y es donde la comida se mezcla con la bilis producida por el hígado y con otros jugos procedentes del páncreas. En yeyuno se realiza prácticamente todo el proceso de digestión. En íleon, se absorben las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) además de otros nutrientes. Otra válvula separa el intestino delgado del grueso impidiendo el paso de bacterias del colon al intestino delgado. En el intestino grueso es donde se absorben la mayor parte de los fluidos y en caso necesario proteínas, y es donde se forman las heces sólidas.

El tracto gastrointestinal en ratones es anatómicamente casi igual al humano, aunque tanto la estructura de las distintas regiones así como su metabolismo es distinto. El estómago murino se divide en dos zonas, una zona superior no secretora, y un cuerpo secretor posterior, el cual está continuamente segregando jugos gástricos. El intestino delgado también se divide en duodeno, yeyuno e íleon. El intestino grueso esta formado por ciego, zona muy vascularizada y que llega a pesar hasta un 2% del peso corporal, y colon.

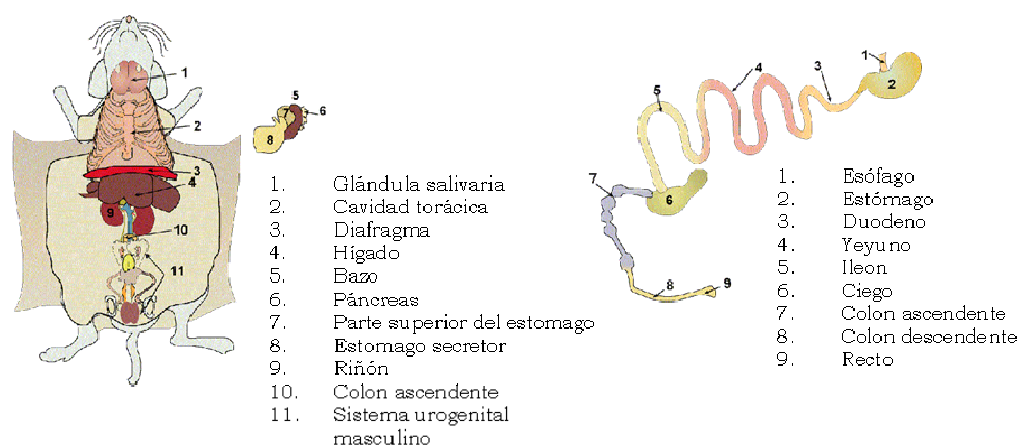


Fig. 4: Imagen del tracto digestivo murino (<http://www.geocities.com/virtualbiology/necropsy.html>)

El intestino delgado murino, al igual que el humano, posee un sistema inmune que consiste en una compleja red de distintas poblaciones celulares interaccionando entre sí. El epitelio intestinal presenta una barrera física frente a la traslocación microbiana. Además, las células de Paneth, células epiteliales especializadas localizadas en la base de las vellosidades del intestino

delgado, secretan de manera activa proteínas antimicrobianas en respuesta a diversas señales bacterianas, como parte de la respuesta innata. Ésta se encuentra reforzada mediante una respuesta inmune adaptativa dirigida, algo más lenta en desarrollarse, llevada a cabo mediante los linfocitos T y B. Estos linfocitos se sintetizan en las placas de Peyer, estructuras linfoides especializadas que se distribuyen en intervalos a lo largo del intestino delgado. Las células dendríticas de las placas de Peyer recogen antígenos bacterianos y los presentan a los linfocitos en proceso de maduración. Las células B y T salen de las placas de Peyer y previenen la traslocación microbiana en regiones subepiteliales a lo largo del TGI. Las bacterias comensales del intestino delgado contribuyen a esta inmunidad innata mediante la activación de la expresión de angiogenina-4, una proteína bactericida producida en las células de Paneth (Cash & Hooper, 2005). La angiogenina-4 ataca específicamente a bacterias Gram positivas, mientras que los organismos Gram negativos se salvan. Esta interacción posiblemente sea importante para el establecimiento y mantenimiento de las distintas poblaciones de bacterias Gram negativas del intestino adulto. Esto sugiere que las bacterias comensales juegan un papel central en la composición del arsenal antimicrobiano de las células, si bien las señales moleculares utilizadas para comunicarse con estas células de Paneth se desconocen aún. Un esquema de este proceso se muestra en la fig. 5 (Cash & Hooper, 2005):

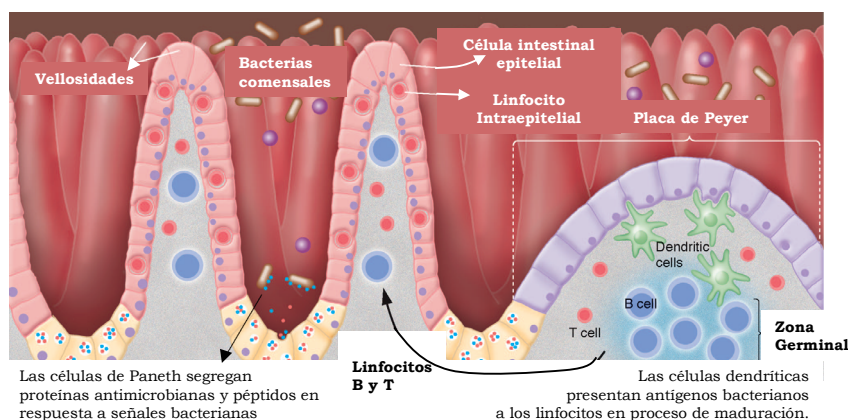


Fig. 5: Mecanismo de acción del sistema inmune de la mucosa intestinal. Interacción con la microbiota comensal.

B.II. ¿SOMOS LO QUE COMEMOS?: MICROBIOTA INTESTINAL

El TGI humano también comprende todo un ecosistema dinámico y complejo, formado por microorganismos, conocidos como microbiota intestinal endógena o autóctona, un epitelio cubierto por una capa de mucus que lo protege frente a daños enzimáticos y mecánicos además de ser un aporte constante de nutrientes para la microbiota, un sistema inmune propio y todos los componentes derivados de la digestión de los alimentos. La principal

función de este tracto gastrointestinal es la digestión y absorción de nutrientes, aunque también ejerce una gran influencia en factores tanto fisiológicos como inmunológicos.

La microbiota es un componente de gran importancia en el tracto gastrointestinal. Se calcula que el número de bacterias presentes en el tubo digestivo supera en diez veces el número de células totales del cuerpo humano, lo cual nos da una idea de su repercusión. Una excelente revisión sobre la historia del estudio de la microbiota intestinal la publicó Savage en 2001 (Savage, 2001). Cuando hablamos de microbiota se entiende como especies autóctonas aquellas las cuales tienen una asociación con el hospedador a largo plazo, formando una población estable, de un tamaño característico, en una zona determinada del intestino y con una función ecológica demostrable. Esta microbiota endógena se encuentra desigualmente distribuida a lo largo del tubo digestivo, siendo menos numerosa en estómago e intestino delgado debido al pH ácido gástrico y al tránsito rápido de los alimentos en esta zona. Empiezan a ser más numerosos a partir del íleon, y sin duda el mayor número se encuentra en colon, aportando éste del 50% de la microbiota fecal, con un tiempo de tránsito de los alimentos de aproximadamente 60 horas.

La microbiota intestinal está formada por alrededor 10^{14} bacterias divididas en aproximadamente unas 500 especies, englobadas principalmente en los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* y *Ruminococcus*, si bien hoy día aún no se conoce completamente su composición (Savage, 1986). El ser humano nace con un colon estéril y su microbiota empieza a desarrollarse durante el parto. Varios factores influyen no sólo en la composición sino en el ritmo de desarrollo de la microbiota, como son el tipo de parto, tiempo de gestación en el momento del nacimiento, la alimentación o el uso de antibióticos. Los primeros microorganismos en colonizar al neonato son enterobacterias y estreptococos, los cuales aparecen inmediatamente en heces tras el parto. La microbiota de bebés alimentados de leche materna está dominada por bífidobacterias durante la primera semana, reduciéndose el número de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, y cuando la dieta sólida o semisólida comienza se desarrolla un cambio en su microbiota haciéndola mucho más diversa. En cambio, en niños alimentados con fórmulas infantiles la microbiota intestinal inicial es más diversa y está dominada por distintos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y enterococos. Posteriormente dominan enterococos, especies del género *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Clostridium*, y *Bacteroides*, género el cual parece estar inversamente relacionado con el número de bífidobacterias. En ambos tipos de alimentación aparece un gran número de bacterias del género *Ruminococcus* (Favier *et al.*, 2002).

La microbiota gastrointestinal es una comunidad individualmente estable, es decir, que no sólo depende de factores como la dieta o el estilo de vida, sino también del genotipo del hospedador. En un artículo publicado por Zoetendal en 2001 se muestra como la relación genética entre individuos influye más en la similitud en la microbiota intestinal que otros factores, sugiriendo que cada microbiota es, en cierto modo, específica del hospedador, si bien existen ciertos grupos principales siempre presentes en mayor o menor número (Zoetendal *et al.*, 2001). El conocimiento de las especies que conforman la microbiota nos da la posibilidad de mejorar todas sus funciones. Especies de los géneros *Ruminococcus* y *Bifidobacterium* son productoras de glucosidasas extracelulares, capaces de degradar las cadenas de mucina de la capa de mucus del tubo digestivo, resultando en mono y disacáridos que pueden ser utilizados por un gran número de bacterias fecales. Este potencial enzimático juega un papel esencial en el ecosistema intestinal, tanto en la microbiota como en el hospedador. Una colonización normal del TGI humano por bacterias comensales estimula un importante número de funciones, como la maduración postnatal de la mucosa intestinal y la absorción de nutrientes. La boca posee una microbiota única, compuesta por microorganismos aerobios y anaerobios. Aunque un gran número de bacterias pasan de la boca al estómago cada día, el pH gástrico inhibe su paso hacia otras zonas del tubo digestivo. En estómago encontramos *Helicobacter pylori*, bacteria que actúa tanto como comensal como patógena, siendo una de las principales causas de la úlcera gástrica. En el estómago dominan los lactobacilos al igual que en duodeno. En la zona distal del íleon empieza a crecer el número de microorganismos, con la aparición de estreptococos. En ciego la mayor parte de los microorganismos son anaerobios pertenecientes a los géneros *Bacteroides*, *Clostridium* y microorganismos metanogénicos (Farthing, 2004). A veces esta microbiota no ejerce un papel beneficioso en el hospedador, como el caso de algunas bacterias con capacidad de desconjugar sales biliares, con la consecuente malabsorción de lípidos y expansión bacteriana en intestino delgado debido al efecto tóxico sobre el epitelio de las sales biliares no conjugadas.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la microbiota endógena ejerce un papel importante en el desarrollo de la estructura de la mucosa gastrointestinal, así como en el correcto funcionamiento del sistema inmune asociado a ella (fig. 5). Estudios realizados en animales “germ-free” o estériles demuestran como el establecimiento de una microbiota normal aumenta la masa de la mucosa, el área de la superficie intestinal y el número de células epiteliales. Estas alteraciones estructurales están directamente relacionadas con la absorción de nutrientes, fluidos y electrolitos para la regeneración y reparación del epitelio intestinal. La microbiota también contribuye al sistema

inmune del hospedador, facilitando el establecimiento de una población residente de inmunocitos y otras células inflamatorias en el epitelio y lamina propia intestinal, los cuales son la línea principal de defensa del hospedador frente a microorganismos patógenos (Farthing, 2004). Recientemente se ha sugerido la propiedad inmunoactivadora por parte de la microbiota comensal frente a sustancias como el lipopolisacárido o LPS, peptidoglucanos o diversos antígenos, así como frente a enfermedades multifactoriales complejas como son la enfermedad inflamatoria intestinal, la artritis reumatoide, arteriosclerosis, alergias e incluso cáncer de colon. Con el fin de obtener mas información acerca de la etiología de estas enfermedades, así como de la relación existente entre microbiota endógena y hospedador, se han desarrollado distintos modelos animales de enfermedades humanas. Mediante el uso de ratones “germ-free” y distintas estrategias de colonización selectiva combinada con técnicas modernas de biología molecular, se pueden esclarecer factores como la actividad inmunológica de la mucosa intestinal, o los diversos mecanismos de procesos infecciosos, inflamatorios, autoinmunes y neoplásicos.

Por lo tanto la regulación de la composición de la microbiota intestinal ofrece la posibilidad de influir en el desarrollo del sistema inmunológico, tanto de la mucosa como el sistémico, así como ejercer un papel importante en la prevención y tratamiento de numerosas enfermedades (Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 2004), de ahí el gran interés que los microorganismos probióticos presentan al influir directa e indirectamente sobre esta microbiota intestinal. Mediante la comparación de características bioquímicas y fisiológicas entre ratones “germ-free” y convencionales, se ha logrado establecer la influencia de la microbiota intestinal en el hospedador, como por ejemplo en el estudio sobre el impacto del establecimiento de *Bacteroides thetaiotaomicron* en ratones “exgerm-free”, bacteria que se encuentra en condiciones normales en el tracto gastrointestinal murino y humano (Hooper *et al.*, 2001). El análisis transcripcional de la respuesta a la colonización por esta bacteria, se realizó mediante el uso de “microarrays” de DNA, los cuales revelaron que esta bacteria comensal es capaz de modular la expresión de genes implicados en varias funciones intestinales importantes, como la absorción de nutrientes, la función de barrera que presenta la mucosa intestinal, distintos metabolismos, el proceso de angiogénesis y la maduración intestinal postnatal.

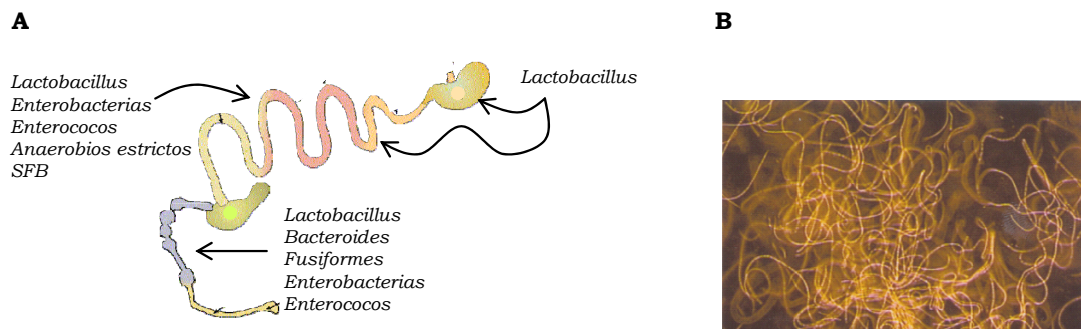


Fig. 6: **A.** Distribución de la microbiota intestinal murina descrita **B.** Hibridación in situ de SFBs en intestino de trucha (Urdaci *et al.*, 2001).

La microbiota intestinal murina se caracteriza por su gran estabilidad, la cual se ve aumentada debido al carácter coprófago de estos animales, aunque cambios en la dieta o factores como el estrés pueden afectar a su composición. La microbiota intestinal de ratones utilizados en investigación especialmente aquellos mantenidos en ambientes libres de patógenos (también llamados “SPF” o “specific pathogen free”) es menos compleja que en humanos. Encontramos microorganismos a lo largo de todo el tubo digestivo, con géneros específicos de cada región. Un esquema de los grupos presentes en las distintas zonas del tracto gastrointestinal lo encontramos en la figura 6, **A**. En íleon y ciego encontramos un grupo muy característico de bacterias llamadas bacterias filamentosas segmentadas o SFB (“segmented filamentous bacteria”) (fig. 6, **B**), presentes en ratones jóvenes desde el momento que dejan de tomar leche materna y que desaparecen cuando el sistema inmune se desarrolla, también descrito en otros animales como truchas (Urdaci *et al.*, 2001), pollos o ratas (Snel *et al.*, 1995). En ratones “knock-out” modelos de inmunosupresión, al no desarrollarse el sistema inmune de manera adecuada, este grupo bacteriano permanece presente durante toda la vida del ratón, lo cual sugiere una estrecha relación entre estas bacterias y el sistema inmune del hospedador (Snel *et al.*, 1998). La mayor parte de la microbiota intestinal la encontramos en ciego y colon, del orden de 10^{10} bacterias/g. En ciego los principales géneros presentes son *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae* y *Eubacterium*, así como la especie *Escherichia coli*, bacterias fusiformes y otros enterococos (Tannock, 1997). En colon los microorganismos anaerobios estrictos son los dominantes. Debido a la producción de ácidos grasos de cadena corta como butírico por el género *Bacteroides* y microorganismos fusiformes, existe una inhibición del crecimiento de bacterias del género *Enterobacteriaceae*. Sin duda el grupo más numeroso presente en el tracto digestivo de estos roedores es el género *Lactobacillus*, presente desde el estómago hasta el colon. En el epitelio de la parte superior del estómago de ratones encontramos la especie *L. reuteri* en forma de biofilm, conformando un modelo excelente para el estudio molecular de la interacción microbiana con el hospedador. Mediante el sistema IVET (“in vivo expression technology”) se han

identificado una serie de genes que se activan específicamente en el TGI murino, algunos de los cuales se inducen durante el proceso de colonización (Walter *et al.*, 2003; Bron *et al.*, 2004). Estos genes corresponden a una xilosa isomerasa (*xylA*) y a una metionina sulfóxido reductasa (*msrB*). La xilosa es un azúcar derivado de plantas que se encuentra normalmente en intestino introducido mediante los alimentos. También puede ser un producto final de la fermentación de xilanos y pectinas por otros microorganismos. Esta xilosa parece actuar como fuente de energía en el momento de colonización de *L. reuteri*. La reductasa es una enzima de reparación, protegiendo a bacterias de daños oxidativos como los producidos por el óxido nítrico, el cual se forma en las células epiteliales de íleon y colon actuando como barrera oxidativa e impidiendo la traslocación bacteriana de intestino a sangre.

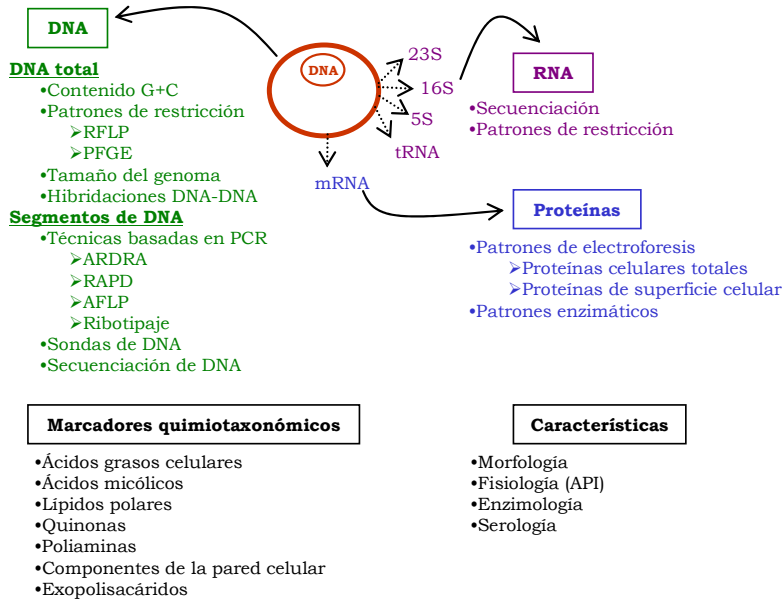
C. ECOLOGÍA MICROBIANA

Con el fin de estudiar el ecosistema presente en el tracto gastrointestinal hacemos uso de la taxonomía polifásica, es decir, una combinación entre métodos tradicionales o dependientes de cultivo y técnicas de biología molecular, la mayoría de ellas independientes de cultivo. El uso de estas técnicas independientes de cultivo nos permite obtener una información más completa sobre la composición de la microbiota gastrointestinal o sobre características de las distintas comunidades microbianas presentes, ya que como se ha mencionado anteriormente, solo de un 10-50% de la microbiota intestinal se puede cultivar en los medios que existen en la actualidad (Vaughan *et al.*, 2000).

La taxonomía polifásica engloba información obtenida mediante pruebas fenotípicas, genotípicas y filogenéticas. Este término fue introducido por Colwell (Colwell, 1970), también denominada clasificación polifásica o identificación polifásica. Tradicionalmente la taxonomía se ha utilizado como sinónimo de sistemática, dividiéndose en tres partes: clasificación, nomenclatura e identificación de nuevos organismos. En la taxonomía actual incluimos la genética de poblaciones y la filogenia, mediante el estudio del gen rRNA 16S. Un esquema de los distintos estudios que se engloban en la taxonomía polifásica la encontramos en la figura 7, **A** (Vandamme *et al.*, 1996):

A

I. INFORMACIÓN GENOTÍPICA



B

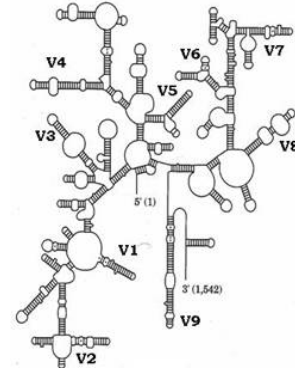


Fig. 7: A. Esquema de taxonomía polifásica. **B.** rRNA 16S. V1-V9 muestra las regiones variables del gen.

Según esta información se define especie como la unidad básica de la taxonomía bacteriana, grupo de cepas incluida la cepa tipo de la especie, que presentan al menos un 70% de similitud en estudios de hibridación DNA-DNA y 5°C o menos de diferencia en sus temperaturas de fusión de DNA o Tm.

Si bien los estudios basados en técnicas moleculares se han establecido como líderes a la hora de analizar la composición microbiana de ecosistemas complejos, el uso de métodos tradicionales de cultivo en distintos medios (hoy día numerosos y de alto grado de selectividad) y de caracterización fisiológica, aunque laboriosos siguen resultando de gran utilidad e incluso en cierto modo necesarios.

C.I. TÉCNICAS BASADAS EN EL GEN rRNA 16S

Durante la última década los métodos moleculares de “fingerprinting” o de análisis de poblaciones, han experimentado un espectacular desarrollo, especialmente todas aquellas técnicas basadas en el estudio del gen rRNA 16S y su amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (“polymerase chain reaction”). Su primera aplicación en el estudio del tracto gastrointestinal fue para la detección de *Bacteroides vulgatus* en heces mediante una sonda específica para esta especie (Kuritza & Salyers, 1985). En la actualidad existen numerosas sondas y cebadores para el análisis tanto de

la microbiota general, como específico de determinados géneros como *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* (Satokari *et al.*, 2003).

El rRNA 16S forma parte del ribosoma, orgánulo implicado en la síntesis proteica en todos los organismos. Es un marcador filogenético ideal debido a que presenta distintos dominios de conservación, lo cual nos permite el diseño de oligonucleótidos con distinta selectividad frente a diferentes grupos bacterianos (fig. 7, **B**). El análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S y su comparación en bases de datos mediante herramientas de bioinformática, ofrece información precisa de las especies presentes en un ecosistema, si bien su secuenciación completa resulta costosa y por lo tanto no es adecuado para ecosistemas complejos. En estos casos resulta necesario el uso de técnicas alternativas que nos permita no sólo una visión más completa del sistema complejo, sino la observación en las variaciones temporales que se produzcan en el mismo. Son numerosas las técnicas de biología molecular utilizadas para el estudio de la composición del tracto gastrointestinal tanto humano como de animales utilizados en investigación, técnicas especialmente útiles por ejemplo en el estudio del impacto que distintos tratamientos con microorganismos probióticos pueden ejercer sobre dicho ecosistema (McCartney, 2002).

Para la cuantificación de distintos grupos filogenéticos presentes en heces se utiliza la hibridación in situ fluorescente o FISH (“fluorescent in situ hybridization”) previa fijación y permeabilización de las bacterias presentes en la muestra. Mediante el uso de sondas descritas hasta hoy día existe la posibilidad de contar alrededor de dos tercios de la comunidad total bacteriana presente en heces. Esta técnica se puede acoplar a un sistema de citometría de flujo y con ello no sólo cuantificar y aislar diversos grupos microbianos, sino determinar la viabilidad de las células en el momento de toma de la muestra (Amor *et al.*, 2002; Ben-Amor *et al.*, 2005). También podemos cuantificar mediante “PCR cuantitativa” o “PCR a tiempo real” determinados grupos bacterianos (con el uso de cebadores específicos) o la totalidad de las bacterias presentes en una muestra (por medio de cebadores universales) (Suzuki *et al.*, 2000). Gracias a esta técnica evitamos los errores introducidos mediante el proceso de PCR convencional, al ir observando el proceso de amplificación de la muestra a tiempo real y no solamente el producto final de la misma. Por lo tanto podemos concretar el momento exacto en el que un determinado grupo bacteriano comienza a multiplicarse. El momento en el que la amplificación de un determinado grupo comienza es directamente proporcional a la cantidad del mismo en una muestra, siendo más temprano a medida que la cantidad sea mayor (figura 8). Mediante curvas de calibrado podemos luego extrapolar y realizar la cuantificación bacteriana.

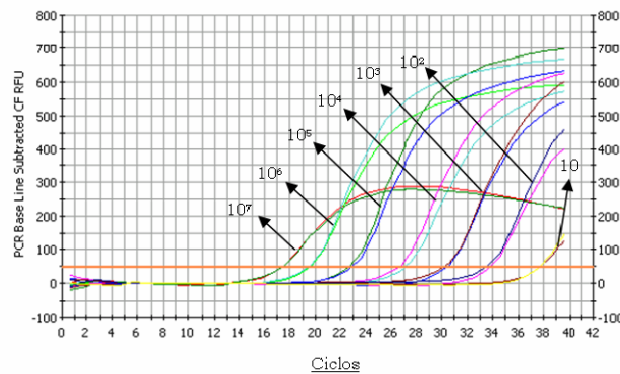


Fig. 8: Gráfica del proceso de amplificación mediante PCR cuantitativa de una serie de diluciones bacterianas.

Para la identificación específica de las especies presentes en heces también se ha utilizado la PCR asociada a la creación de librerías de clones de rRNA 16S al azar, y la posterior identificación de los clones mediante secuenciación. Al realizar librerías de clones de rRNA 16S no conseguimos reflejar la diversidad real de la población bacteriana en el ecosistema estudiado debido a la diferencia de eficiencia en el proceso de lisis, los errores introducidos en el proceso de PCR (von Wintzingerode *et al.*, 1997) y la selección al azar de las secuencias analizadas. Estas librerías de clones también se pueden combinar con diversas técnicas moleculares para la caracterización de comunidades, especies e incluso cepas microbianas. Son numerosas las técnicas basadas en la amplificación por PCR del gen rRNA 16S, como, entre otras, el DGGE (“denaturing gradient gel electrophoresis”), T-RFLP (“terminal restriction fragment length polymorphism”), SSCP (“single strand conformational polymorphism”), ARDRA (“amplified rDNA restriction analysis”), RISA (“rRNA intergenic spacer analysis”), RAPD (“random amplification of polymorphic DNA”) o AFLP (“amplified fragment-length polymorphism”). Mediante las cuatro primeras técnicas se obtienen amplicones del mismo tamaño molecular, y por lo tanto su separación depende de la secuencia nucleotídica de los mismos. Con el resto se obtiene un perfil característico de bacterias individuales o bien perfiles de muestras complejas. Un esquema del proceso de caracterización de la comunidad presente en una muestra compleja se muestra en la figura 9:

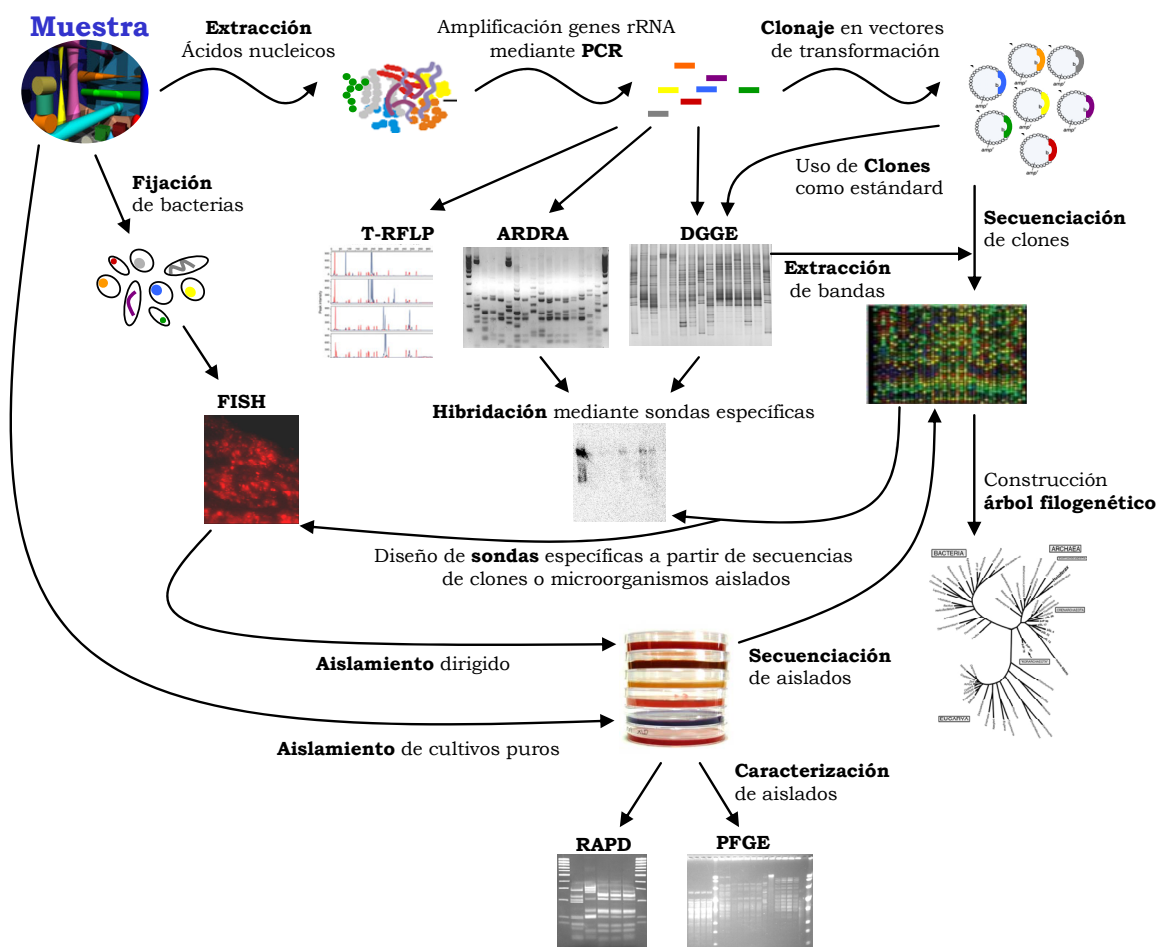


Fig. 9: Técnicas de análisis de la comunidad microbiana presente en una muestra compleja.

Las técnicas principalmente utilizadas en este estudio son DGGE y T-RFLP, combinadas con análisis de librerías de clones del gen rRNA 16S. Estas técnicas se basan en la separación de los distintos amplicones generados mediante PCR, todos del mismo tamaño, gracias a las diferencias en la secuencia de nucleótidos de los mismos, aunque esta separación se realiza de distinta manera: el DGGE se basa en la desnaturalización de la doble cadena de DNA mediante desnaturalizantes químicos y el método de T-RFLP en la separación de los fragmentos de restricción generados tras la digestión enzimática de los amplicones.

La electroforesis en gel con gradiente creciente de desnaturalizante de DNA o DGGE se introdujo en estudios de ecología microbiana, para la separación de amplicones de la región V3 del gen rRNA 16S de bacterias sulfato reductoras en ecosistemas marinos. Estas bacterias se detectaban posteriormente tras la transferencia a membrana del gel de DGGE, e hibridación con sondas específicas (Muyzer *et al.*, 1993). Tras este estudio inicial, la aplicación de esta técnica para estudios de ecología microbiana creció enormemente.

La separación de los amplicones de rRNA 16S generados por PCR en un gel de DGGE se basa en su contenido en G+C y su estructura secundaria, y se realiza mediante un gradiente creciente de un desnaturizante de la doble cadena de DNA a temperatura constante. También existe la desnaturización por un gradiente creciente de temperatura paralelo a la dirección de avance del gel como en el caso del TGGE, o el TTGE donde el gradiente de temperatura se produce en función del tiempo. Éstas técnicas utilizan amplicones del mismo tamaño molecular, el cual varía entre las 50 y 500 pares de bases (pb), y de secuencias nucleotídicas distintas, lo cual permite su separación en un gel de poliacrilamida con desnaturizantes como urea y formamida. En el proceso de PCR se introduce en uno de los extremos de los amplicones una cola de alto contenido en Guanina y Citosina o “cola GC” mediante uno de los cebadores. Durante la electroforesis, los amplicones comienzan a separarse en los llamados “dominios de separación”. La movilidad eléctrica de los amplicones desnaturizados, es decir, aquellos que ya no poseen una estructura de doble hélice, cae. La cola de GC, dominio de gran estabilidad frente a la desnaturización, previene la separación completa de los amplicones los cuales de esta manera quedan anclados al gel. La variación en la secuencia de los amplicones provoca la diferencia en su comportamiento de separación. En principio, una diferencia en un solo par de bases en amplicones de tamaño de hasta 500pb permite la diferenciación de los mismos. Un esquema del proceso de desnaturización se muestra en la figura 10:

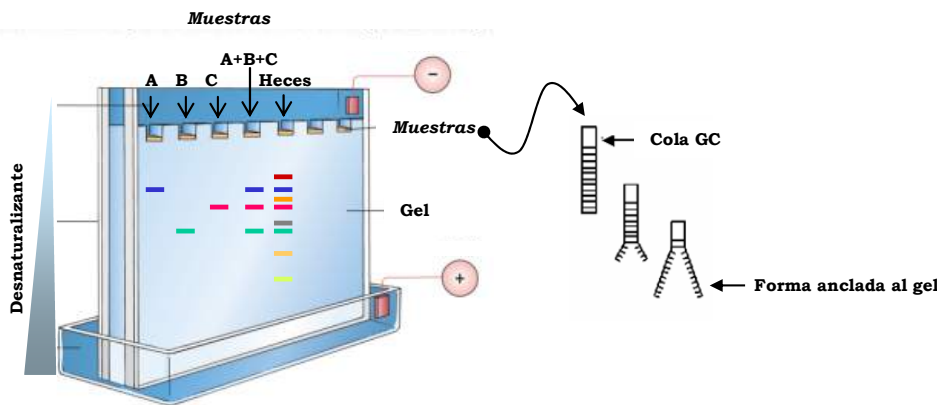


Fig. 10: Proceso de desnaturización de amplicones en un gel de DGGE de muestras simples (cultivos puros A, B, C) y complejas (heces o biopsias).

La presencia de genes heterogéneos de rRNA 16S en el genoma de una bacteria, es decir, genes que contienen pequeñas variaciones en su secuencia distribuidos en el genoma, pueden resultar en varias bandas en su perfil de DGGE.

Por medio de esta técnica se han estudiado distintos ecosistemas, así como comparado métodos de extracción de DNA de diversas muestras

(Zoetendal *et al.*, 2001), también utilizada para el chequeo de clones de librerías de rRNA 16S, para determinar heterogeneidades en la secuencia del gen rRNA de una bacteria (Nubel *et al.*, 1996), e incluso para determinar posibles errores introducidos durante el proceso de PCR y clonaje.

Para la descripción total o al menos de las comunidades mayoritarias de un ecosistema mediante DGGE, se utilizan oligonucleótidos universales para el gen rRNA 16S. Varios estudios demuestran que mediante esta técnica se pueden detectar grupos presentes en un 1% con respecto a la totalidad de la comunidad presente en la muestra. Por el contrario, si no queremos una idea de la composición total sino que estamos interesados en un determinado grupo microbiano, se puede hacer uso de cebadores específicos de grupo o incluso de especie, y con ello restringir el análisis. En este estudio no sólo se han utilizado cebadores universales sino también específicos de grupos como los descritos para los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Satokari *et al.*, 2001; Walter *et al.*, 2001; Heilig *et al.*, 2002).

El DGGE también se ha utilizado para la descripción de la expresión de genes funcionales, mediante el análisis de mRNA por PCR mediante transcripción inversa (Muyzer, 1999). La combinación del análisis mediante DGGE del rRNA 16S y de genes funcionales se puede utilizar para estudiar la relación que existe entre estructura y función de un ecosistema. Dado que el análisis mediante DGGE es una técnica basada en un proceso previo de amplificación por PCR, es una técnica semicuantitativa, debido a los posibles errores introducidos mediante este proceso.

El análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos terminales de restricción o T-RFLP es otro método de estudio de poblaciones utilizado para la caracterización de comunidades microbianas en distintos entornos (Liu *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 1998). Mediante el uso de uno o ambos cebadores marcados con un fluorocromo en la amplificación del gen rRNA 16S, seguido de una digestión mediante una enzima de restricción, los fragmentos terminales de la digestión marcados con el fluorocromo (también denominados TRFs) pueden ser visualizados y registrados mediante un sistema automático de secuenciación. Normalmente se utilizan enzimas que reconocen sitios de restricción de cuatro nucleótidos para una mayor frecuencia de corte en el amplicón. Esta técnica, al igual que el DGGE, puede realizarse con genes funcionales distintos al rRNA, y comparar resultados entre estructura y función. En principio, cada TRF obtenido corresponde a una población individual presente en la comunidad, y el área del pico corresponde a la abundancia de dicha población. Gracias al uso de estándares de DNA adicionados a cada muestra, se puede comparar entre distintas muestras

incluso si no se encuentran en el mismo gel de secuenciación. El T-RFLP no sólo permite la cuantificación de comunidades microbianas sino la determinación de cambios en la abundancia relativa de una población en una comunidad, y con ello la comparación a distintos tiempos o en distintos tratamientos realizados.

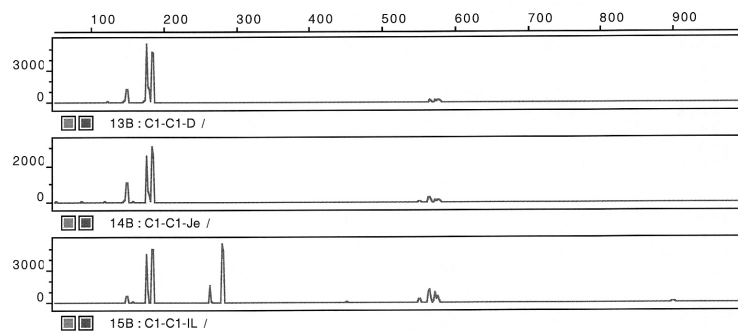


Fig. 11: Diagrama obtenido de un estudio de T-RFLP.

Por lo general el T-RFLP es una técnica reproducible y precisa para el análisis de comunidades (Liu *et al.*, 1997). Hay que tener en cuenta que ésta también es una técnica basada en un proceso previo de PCR, por lo que incluye los errores derivados de la misma. Además es conveniente determinar otros posibles factores que influyen en el resultado final. Se ha identificado cómo afectan a los perfiles de T-RFLP factores como la concentración inicial de DNA, el número de ciclos de amplificación, la temperatura de anillamiento de los cebadores e incluso el tipo de enzima polimerasa utilizada (Osborn *et al.*, 2000). Además también se ha observado cómo influyen sobre el perfil final de T-RFLP, factores como la digestión enzimática y la formación de productos parcialmente digeridos, ya sea en muestras complejas o en cultivos puros, aunque la diferencia en la digestión de amplicones de cultivos puros puede deberse a la heterogeneidad de la secuencia de las distintas copias del gen rRNA 16S presente en su genoma. La digestión incompleta de los productos de PCR de una muestra compleja pueden resultar en T-RFs adicionales, con la consiguiente sobreestimación de la diversidad de la muestra (Osborn *et al.*, 2000). En un estudio realizado en 2003 se analizó la frecuencia en la aparición de RFs inesperados no terminales tras la digestión de clones individuales del gen rRNA 16S de muestras ambientales. Se designó a estos fragmentos no terminales en los perfiles de T-RFLP como pseudo-TRFs, los cuales parecen estar formados por amplicones con zonas de cadena sencilla en su secuencia (Egert & Friedrich, 2003). Recientemente se está utilizando esta técnica para el estudio de determinadas poblaciones, mediante el uso de cebadores específicos de grupo, como en el estudio de la influencia de la administración de probióticos del género *Lactobacillus* en individuos sujetos a tratamientos antibióticos (Jernberg *et al.*, 2005) o el estudio del género *Bifidobacterium* en la

microbiota de heces de niños alimentados con distintas dietas (Sakata *et al.*, 2005).

C.II. OTRAS TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN

Si el análisis del gen rRNA 16S es útil para la caracterización de ecosistemas complejos, el estudio del genoma individual de bacterias aisladas de diversas muestras nos proporciona mayor información. Una vez más resulta útil el uso de un enfoque polifásico, mediante el aislamiento de cepas y su caracterización fisiológica usando técnicas tradicionales como el cultivo en medios selectivos, diversas tinciones y galerías de identificación por la fermentación de azúcares o sistemas API, y técnicas de biología molecular como la amplificación al azar de DNA polimórfico o RAPD (“random amplification of polymorphic DNA”), o la electroforesis en campo pulsado o PFGE (“pulse field gel electrophoresis”), técnicas usadas en este estudio.

La electroforesis en campo pulsado fue descrita en 1984 para la separación de cromosomas de levadura (Schwartz & Cantor, 1984). Desde entonces se ha utilizado para separar fragmentos de DNA de gran tamaño, los cuales tienen poca movilidad en un gel de electroforesis convencional. Este sistema utiliza pulsos de campos eléctricos orientados perpendicularmente de manera alternativa y no uniforme, con el fin de extender y relajar la estructura superenrollada que poseen estos fragmentos. El DNA genómico de la cepa objeto de estudio se digiere previamente mediante enzimas de restricción, proceso también llamado RFLP (“restriction fragment length polymorphism”), y los fragmentos obtenidos se separan mediante este sistema. Las enzimas de restricción usadas son de secuencia de corte rara, es decir, de baja frecuencia de corte. Con el fin de evitar el fraccionamiento del DNA mediante su proceso de extracción, las células se incluyen en bloques de agarosa donde posteriormente serán lisadas y digeridas, sin necesidad de procesos de centrifugación y resuspensión. El perfil de bandas obtenido mediante esta técnica es característico de cada especie, donde se pueden observar diferencias entre cepas incluso cuando la secuencia difiere en un solo par de bases.

Mediante la amplificación al azar de fragmentos de DNA polimórfico o sistema RAPD, también se obtienen perfiles característicos de cada especie bacteriana con el mismo rango de discriminación. Este análisis se basa en la reacción en cadena de la polimerasa pero donde no es necesario el conocimiento previo de la secuencia de la cepa estudiada (Williams *et al.*, 1990). Este proceso de PCR se basa en la amplificación de DNA genómico mediante oligonucleótidos de secuencia arbitraria, los cuales accederán y amplificarán segmentos del DNA al azar. Estos cebadores detectan

polimorfismos en la secuencia del DNA amplificado los cuales sirven como marcadores y pueden utilizarse para la construcción de mapas genéticos.

En la siguiente tabla se muestran las ventajas e inconvenientes de las técnicas más utilizadas para el estudio microbiológico de la microbiota intestinal.

Tabla 5: Ventajas e inconvenientes de algunas de las distintas técnicas utilizadas en ecología microbiana.

Método	Usos-ventajas	Inconvenientes
Cultivo	Técnica tradicional, también conocida como el “estándar de oro”. Se pueden recuperar aislados de las muestras para análisis adicionales.	No es representativo. Laborioso.
Métodos moleculares	Permite una identificación rápida de la composición bacteriana en una muestra. Se pueden detectar bacterias que aún no se han cultivado. Las muestras se pueden conservar para realizar los análisis con posterioridad.	No se pueden recuperar aislados de las muestras.
• DGGE (TGGE, TTGE)	Técnicas rápidas y reproducibles para realizar un análisis de diversidad microbiana. Se pueden realizar análisis comparativos. Permite la extracción de bandas del gel. Se puede realizar hibridación por Southern blot.	Sujetas a errores introducidos por la PCR. Semicuantitativas. Para la identificación de bandas es necesario realizar clonaje y secuenciación.
• T- RFLP	Técnica rápida y de alta sensibilidad de detección. Se pueden realizar análisis comparativos “high throughput” entre geles. Permite el análisis del tamaño de los fragmentos en bases de datos.	Sujeto a errores introducidos por la PCR. No se pueden realizar estudios de hibridación por Southern blot.
• FISH	Detección, enumeración. Se pueden realizar análisis comparativos automatizados.	Sin automatización es muy laborioso. Se necesita conocimiento previo de la secuencia. Es necesario realizar el diseño y validación de las sondas.
• Hibridación dot-blot	Detección y cuantificación de la abundancia relativa de RNA ribosomal.	Es necesario realizar el diseño y validación de las sondas. Es difícil asociar la cantidad relativa de rRNA a número de bacterias. Laborioso para identificar a nivel de especie.
• PCR a tiempo real	Detección rápida y cuantificación.	Sujeto a errores introducidos por la reacción de PCR.
• Secuenciación del gen rRNA 16S	Identificación filogenética.	La monitorización a gran escala es laboriosa. Sujeto a errores introducidos por la PCR.

• Análisis genéticos no basados en el rRNA 16S	Análisis comparativo rápido.	Requiere del uso adicional de análisis basados en el rRNA 16S.
• “Arrays” de diversidad	Detección “High throughput”. Se puede cuantificar la abundancia relativa.	Alto coste, aún en desarrollo. No cuantitativo.

D. BIBLIOGRAFÍA

- Amor, K. B., P. Breeuwer, P. Verbaarschot, F. M. Rombouts, A. D. Akkermans, W. M. De Vos and T. Abee (2002). Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead bifidobacterium cells during bile salt stress. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5209-16.
- Apostolou, E., P. V. Kirjavainen, M. Saxelin, H. Rautelin, V. Valtonen, S. J. Salminen and A. C. Ouwehand (2001). Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia? *FEMS Immunol Med Microbiol* **31**: 35-9.
- Ben-Amor, K., H. Heilig, H. Smidt, E. E. Vaughan, T. Abee and W. M. de Vos (2005). Genetic diversity of viable, injured, and dead fecal bacteria assessed by fluorescence-activated cell sorting and 16S rRNA gene analysis. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4679-89.
- Billir, J. A., A. J. Katz, A. F. Flores, T. M. Buie and S. L. Gorbach (1995). Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **21**: 224-6.
- Bron, P. A., C. Grangette, A. Mercenier, W. M. de Vos and M. Kleerebezem (2004). Identification of *Lactobacillus plantarum* Genes That Are Induced in the Gastrointestinal Tract of Mice. *J. Bacteriol.* **186**: 5721-5729.
- Cash, H. L. and L. V. Hooper (2005). Commensal Bacteria Shape Intestinal Immune System Development. *ASM News* **71**: 77-83.
- Clement, B. G., L. E. Kehl, K. L. DeBord and C. L. Kitts (1998). Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods* **31**: 135-142.
- Colwell, R. R. (1970). Polyphasic taxonomy of the genus vibrio: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol* **104**: 410-33.
- Chang, T. L., C. H. Chang, D. A. Simpson, Q. Xu, P. K. Martin, L. A. Lagenaur, G. K. Schoolnik, D. D. Ho, S. L. Hillier, M. Holodniy, J. A. Lewicki and P. P. Lee (2003). Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain CD4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11672-7.
- de Vos, W. M., P. A. Bron and M. Kleerebezem (2004). Post-genomics of lactic acid bacteria and other food-grade bacteria to discover gut functionality. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 86-93.
- Egert, M. and M. W. Friedrich (2003). Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2555-62.
- El-Nezami, H., H. Mykkanen, P. Kankaanpaa, S. Salminen and J. Ahokas (2000). Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B, from the chicken duodenum. *J Food Prot* **63**: 549-52.
- FAO/WHO (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, Argentina, FAO/WHO: 33.
- FAO/WHO (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada, FAO/WHO: 12.
- Farthing, M. J. (2004). Bugs and the gut: an unstable marriage. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**: 233-9.
- Favier, C. F., E. E. Vaughan, W. M. De Vos and A. D. Akkermans (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* **68**: 219-26.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* **66**: 365-78.
- Fuller, R. (1991). Probiotics in human medicine. *Gut* **32**: 439-42.
- Gibson, G. R. and M. B. Roberfroid (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* **125**: 1401-12.
- Gill, H. S. and K. J. Rutherfurd (2001). Probiotic supplementation to enhance natural immunity in the elderly: effects of a newly characterized immunostimulatory strain *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20™) on leucocyte phagocytosis. *Nutrition Research* **21**: 183-189.
- Gill, H. S., K. J. Rutherfurd, J. Prasad and P. K. Gopal (2000). Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br J Nutr* **83**: 167-76.
- Guarner, F. and G. J. Schaafsma (1998). Probiotics. *Int J Food Microbiol* **39**: 237-8.
- Havenaar, R. and J. H. Huis In't Veld (1992). Probiotics: a general view. *Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. B. J. B. Wood. London, Elsevier Applied Science Publishers. **1**: 151-170.
- Heilig, H. G., E. G. Zoetendal, E. E. Vaughan, P. Marteau, A. D. Akkermans and W. M. de Vos (2002). Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* **68**: 114-23.
- Hilton, E., P. Kolakowski, C. Singer and M. Smith (1997). Efficacy of *Lactobacillus* GG as a Diarrheal Preventive in Travelers. *J Travel Med* **4**: 41-43.
- Hooper, L. V., M. H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P. G. Falk and J. I. Gordon (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* **291**: 881-4.
- Isolauri, E. (2001). Probiotics in the prevention and treatment of allergic disease. *Pediatr Allergy Immunol* **12 Suppl 14**: 56-9.

- Isolauri, E., M. Juntunen, T. Rautanen, P. Sillanaukee and T. Koivula (1991). A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* **88**: 90-7.
- Isolauri, E., S. Salminen and A. C. Ouwehand (2004). Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**: 299-313.
- Jernberg, C., A. Sullivan, C. Edlund and J. K. Jansson (2005). Monitoring of antibiotic-induced alterations in the human intestinal microflora and detection of probiotic strains by use of terminal restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol* **71**: 501-6.
- Kalliomaki, M., S. Salminen, H. Arvilommi, P. Kero, P. Koskinen and E. Isolauri (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **357**: 1076-9.
- Kiessling, G., J. Schneider and G. Jahreis (2002). Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *Eur J Clin Nutr* **56**: 843-9.
- Kuritza, A. P. and A. A. Salyers (1985). Use of a species-specific DNA hybridization probe for enumerating *Bacteroides vulgatus* in human feces. *Appl Environ Microbiol* **50**: 958-64.
- Lilly, D. M. and R. H. Stillwell (1965). Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science* **147**: 747-8.
- Liu, W. T., T. L. Marsh, H. Cheng and L. J. Forney (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4516-22.
- Marteau, P., P. Seksik and F. Shanahan (2003). Manipulation of the bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **17**: 47-61.
- Matsuzaki, T. and J. Chin (2000). Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol Cell Biol* **78**: 67-73.
- McCartney, A. L. (2002). Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *Br J Nutr* **88 Suppl 1**: S29-37.
- Michetti, P., G. Dorta, P. H. Wiesel, D. Brassart, E. Verdu, M. Herranz, C. Felley, N. Porta, M. Rouvet, A. L. Blum and I. Corthesy-Theulaz (1999). Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion* **60**: 203-9.
- Midolo, P. D., J. R. Lambert, R. Hull, F. Luo and M. L. Grayson (1995). In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J Appl Bacteriol* **79**: 475-9.
- Miraglia del Giudice, M. and M. G. De Luca (2004). The role of probiotics in the clinical management of food allergy and atopic dermatitis. *J Clin Gastroenterol* **38**: S84-5.
- Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **2**: 317-22.
- Muyzer, G., E. C. de Waal and A. G. Uitterlinden (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**: 695-700.
- Naruszewicz, M., M. L. Johansson, D. Zapolska-Downar and H. Bukowska (2002). Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *Am J Clin Nutr* **76**: 1249-55.
- Neish, A. S., A. T. Gewirtz, H. Zeng, A. N. Young, M. E. Hobert, V. Karmali, A. S. Rao and J. L. Madara (2000). Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science* **289**: 1560-3.
- Nubel, U., B. Engelen, A. Felske, J. Snaidr, A. Wieshuber, R. I. Amann, W. Ludwig and H. Backhaus (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* **178**: 5636-43.
- Osborn, A. M., E. R. Moore and K. N. Timmis (2000). An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol* **2**: 39-50.
- Ouwehand, A. C., S. Salminen and E. Isolauri (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**: 279-89.
- Parker, R. B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health* **29**: 4-8.
- Pereira, D. I. and G. R. Gibson (2002). Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**: 259-81.
- Pohjavuori, E., M. Viljanen, R. Korpela, M. Kuitunen, M. Tiittanen, O. Vaarala and E. Savilahti (2004). *Lactobacillus* GG effect in increasing IFN-gamma production in infants with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* **114**: 131-6.
- Rachmilewitz, D., K. Katakura, F. Karmeli, T. Hayashi, C. Reinus, B. Rudensky, S. Akira, K. Takeda, J. Lee, K. Takabayashi and E. Raz (2004). Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* **126**: 520-8.
- Ramos-Cormenzana, A., S. Fuentes, R. Ferrer-Cebrián and M. Monteoliva-Sánchez (2005). Probiotics and biotherapy. *Recent Res. Devel. Microbiology* **9**: 31.
- Reid, G. (1999). Testing the efficacy of probiotics. *Probiotics: a critical review*. G. W. Tannock. Norfolk, England, Horizon Scientific Press: 129-140.
- Reid, G. and A. W. Bruce (2001). Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. *J Infect Dis* **183 Suppl 1**: S77-80.

- Reid, G. and A. W. Bruce (2003). Urogenital infections in women: can probiotics help? *Postgrad Med J* **79**: 428-32.
- Reid, G., J. Burton and E. Devillard (2004). The rationale for probiotics in female urogenital healthcare. *MedGenMed* **6**: 49.
- Reid, G., D. Charbonneau, J. Erb, B. Kochanowski, D. Beuerman, R. Poehner and A. W. Bruce (2003). Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**: 131-4.
- Roberfroid, M. B. (1998). Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *Br J Nutr* **80**: S197-202.
- Saavedra, J. M., N. A. Bauman, I. Oung, J. A. Perman and R. H. Yolken (1994). Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* **344**: 1046-9.
- Sakata, S., T. Tonooka, S. Ishizeki, M. Takada, M. Sakamoto, M. Fukuyama and Y. Benno (2005). Culture-independent analysis of fecal microbiota in infants, with special reference to *Bifidobacterium* species. *FEMS Microbiol Lett* **243**: 417-23.
- Salminen, M. K., H. Rautelin, S. Tynkkynen, T. Poussa, M. Saxelin, V. Valtonen and A. Jarvinen (2004). *Lactobacillus* bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic *L. rhamnosus* GG. *Clin Infect Dis* **38**: 62-9.
- Salminen, M. K., S. Tynkkynen, H. Rautelin, M. Saxelin, M. Vaara, P. Ruutu, S. Sarna, V. Valtonen and A. Jarvinen (2002). *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin Infect Dis* **35**: 1155-60.
- Salminen, S. (1996). Uniqueness of probiotic strains. *Nutrition Newsletter* **5**: 18-19.
- Salminen, S., A. C. Ouwehand, Y. Benno and Y. K. Lee (1999). Probiotics: how should they be defined. *Trends Food Sci. Technol.* **10**: 107-110.
- Salminen, S., A. von Wright, L. Morelli, P. Marteau, D. Brassart, W. M. de Vos, R. Fonden, M. Saxelin, K. Collins, G. Mogensen, S. E. Birkeland and T. Mattila-Sandholm (1998). Demonstration of safety of probiotics -- a review. *Int J Food Microbiol* **44**: 93-106.
- Sanders, M. E. (2003). Probiotics: considerations for human health. *Nutr Rev* **61**: 91-9.
- Sartor, R. B. (2004). Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* **126**: 1620-33.
- Satokari, R. M., E. E. Vaughan, A. D. Akkermans, M. Saarela and W. M. de Vos (2001). Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **67**: 504-13.
- Satokari, R. M., E. E. Vaughan, H. Smidt, M. Saarela, J. Matto and W. M. de Vos (2003). Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Syst Appl Microbiol* **26**: 572-84.
- Savage, D. C. (1986). Gastrointestinal Microflora in Mammalian Nutrition. *Annual Review of Nutrition* **6**: 155-178.
- Savage, D. C. (2001). Microbial biota of the human intestine: a tribute to some pioneering scientists. *Curr Issues Intest Microbiol* **2**: 1-15.
- Schultz, M. and H. C. Rath (2002). The possible role of probiotic therapy in inflammatory bowel disease. *Probiotics and prebiotics: where are we going?* G. W. Tannock. Norfolk, England, Caister: 175-237.
- Schultz, M., A. Timmer, H. H. Herfarth, R. B. Sartor, J. A. Vanderhoof and H. C. Rath (2004). *Lactobacillus* GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol* **4**: 5.
- Schwartz, D. C. and C. R. Cantor (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**: 67-75.
- Shanahan, F. (2004). Probiotics in inflammatory bowel disease--therapeutic rationale and role. *Adv Drug Deliv Rev* **56**: 809-18.
- Sheikh, A. and D. P. Strachan (2004). The hygiene theory: fact or fiction? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* **12**: 232-6.
- Sheil, B., J. McCarthy, L. O'Mahony, M. W. Bennett, P. Ryan, J. J. Fitzgibbon, B. Kiely, J. K. Collins and F. Shanahan (2004). Is the mucosal route of administration essential for probiotic function? Subcutaneous administration is associated with attenuation of murine colitis and arthritis. *Gut* **53**: 694-700.
- Shu, Q., H. Lin, K. J. Rutherford, S. G. Fenwick, J. Prasad, P. K. Gopal and H. S. Gill (2000). Dietary *Bifidobacterium lactis* (HN019) enhances resistance to oral *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Microbiol Immunol* **44**: 213-22.
- Snel, J., P. P. Heinen, H. J. Blok, R. J. Carman, A. J. Duncan, P. C. Allen and M. D. Collins (1995). Comparison of 16S rRNA sequences of segmented filamentous bacteria isolated from mice, rats, and chickens and proposal of "Candidatus Arthromitus". *Int J Syst Bacteriol* **45**: 780-2.
- Snel, J., C. C. Hermsen, H. J. Smits, N. A. Bos, W. M. Eling, J. J. Cebra and P. J. Heidt (1998). Interactions between gut-associated lymphoid tissue and colonization levels of indigenous, segmented, filamentous bacteria in the small intestine of mice. *Can J Microbiol* **44**: 1177-82.
- Sperti, G. S. (1971). Probiotics. Westpoint, Connecticut, USA., Avi Publishing Co.

- Suzuki, M. T., L. T. Taylor and E. F. DeLong (2000). Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4605-14.
- Tannock, G. W. (1997). Normal microbiota of the gastrointestinal tract of rodents. *Gastrointestinal Microbiology*. R. I. Mackie, B. A. White and R. E. Isaacson. New York, Chapman & Hall Microbiology Series. **2**: 187-215.
- Tannock, G. W. (1999). Probiotics: A Critical Review. Norfolk, England, Horizon Scientific Press.
- Tannock, G. W. (2004). A special fondness for lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3189-94.
- Tannock, G. W., K. Munro, H. J. Harmsen, G. W. Welling, J. Smart and P. K. Gopal (2000). Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2578-88.
- Tlaskalova-Hogenova, H., R. Stepankova, T. Hudcovic, L. Tuckova, B. Cukrowska, R. Lodinova-Zadnikova, H. Kozakova, P. Rossmann, J. Bartova, D. Sokol, D. P. Funda, D. Borovska, Z. Rehakova, J. Sinkora, J. Hofman, P. Drastich and A. Kokesova (2004). Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett* **93**: 97-108.
- Tomoda, T., Y. Nakano and T. Kageyama (1983). Variation of intestinal *Candida* of patients with leukemia and the effect of *Lactobacillus* administration. *Japanese Journal of Medical Mycology* **24**: 356-358.
- Urdaci, M. C., B. Regnault and P. A. Grimont (2001). Identification by in situ hybridization of segmented filamentous bacteria in the intestine of diarrheic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Res Microbiol* **152**: 67-73.
- Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters and J. Swings (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* **60**: 407-38.
- Vanderhoof, J. A., D. B. Whitney, D. L. Antonson, T. L. Hanner, J. V. Lupo and R. J. Young (1999). *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr* **135**: 564-8.
- Vaughan, E. E., F. Schut, H. G. Heilig, E. G. Zoetendal, W. M. de Vos and A. D. Akkermans (2000). A molecular view of the intestinal ecosystem. *Curr Issues Intest Microbiol* **1**: 1-12.
- Ventura, M., D. van Sinderen, G. F. Fitzgerald and R. Zink (2004). Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **86**: 205-23.
- Vergin, F. (1954). [Antibiotics and probiotics.]. *Hippokrates* **25**: 116-9.
- von Wintzingerode, F., U. B. Gobel and E. Stackebrandt (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* **21**: 213-29.
- Walter, J., N. C. Heng, W. P. Hammes, D. M. Loach, G. W. Tannock and C. Hertel (2003). Identification of *Lactobacillus reuteri* genes specifically induced in the mouse gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2044-51.
- Walter, J., C. Hertel, G. W. Tannock, C. M. Lis, K. Munro and W. P. Hammes (2001). Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2578-85.
- Wang, M. F., H. C. Lin, Y. Y. Wang and C. H. Hsu (2004). Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatr Allergy Immunol* **15**: 152-8.
- Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**: 6531-5.
- Xiao, J. Z., S. Kondo, N. Takahashi, K. Miyaji, K. Oshida, A. Hiramatsu, K. Iwatsuki, S. Kokubo and A. Hosono (2003). Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *J Dairy Sci* **86**: 2452-61.
- Zoetendal, E. G., A. D. Akkermans, W. M. Akkermans-van Vliet, J. A. G. M. de Visser and W. M. de Vos (2001). The Host Genotype Affects the Bacterial Community in the Human Gastrointestinal Tract. *Microbial Ecology in Health and Disease* **13**: 129-134.
- Zoetendal, E. G., K. Ben-Amor, A. D. Akkermans, T. Abee and W. M. de Vos (2001). DNA isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. *Syst Appl Microbiol* **24**: 405-10.
- Zoppi, G. (1998). [Probiotics, prebiotics, synbiotics and eubiotics]. *Pediatr Med Chir* **20**: 13-7.

MATERIAL Y MÉTODOS

A. CEPAS PROBIÓTICAS

Las cepas probióticas utilizadas en este estudio fueron aisladas de dos productos comerciales, yogur líquido y kéfir, y caracterizadas mediante técnicas de microbiología clásica y biología molecular.

A.I. PRUEBAS FENOTÍPICAS

Se seleccionaron según su morfología una serie de colonias aisladas en medio MRS para el cultivo de lactobacilos. Se realizó su caracterización inicial mediante las pruebas fenotípicas que se describen a continuación.

A.I.1. Pruebas bioquímicas

Con el fin de diferenciar los miembros del género *Lactobacillus* de microorganismos como las levaduras, capaces de crecer en el medio utilizado para su aislamiento, se realizó su identificación mediante pruebas fenotípicas clásicas:

- * Tinción de Gram
- * Prueba de la oxidasa
- * Prueba de la catalasa

A.I.2. Test rápido API® 50CH

El sistema para el análisis del metabolismo de carbohidratos API® 50CH (Biomerieux) se realizó según instrucciones del fabricante. Esta galería permite el estudio del metabolismo de 49 carbohidratos y está adaptada a la identificación de cepas del género *Lactobacillus* usando el medio API® 50 CHL en 48 horas.

A.I.3. Resistencia a pH ácido.

Para la determinación de la resistencia y la capacidad de supervivencia de las cepas aisladas a su paso por el tracto gastrointestinal, se les realizó un estudio de crecimiento a pH ácido aproximadamente igual al gástrico. Para este ensayo se utilizaron matraces con medio de cultivo MRS a pH normal (pH 7.0) y a pH ácido similar al del estómago (aproximadamente 2.5). El medio se acidificó mediante HCl. Estos matraces se inocularon con la misma concentración bacteriana de un cultivo fresco de las cepas probióticas, así como un control negativo sin inóculo. Estos matraces se cultivaron a 37°C en aerobiosis y con agitación mínima. Se realizó tanto la curva de crecimiento de las cepas en ambos entornos como la supervivencia de los probióticos

determinada a distintos periodos de tiempo mediante el cultivo de muestras del medio a pH ácido en medio sólido.

A.II. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Dos de las cepas aisladas se identificaron mediante técnicas de biología molecular. Algunas de las técnicas utilizadas se describen con mayor profundidad en el apartado E. donde se detallan las distintas técnicas de análisis de comunidades.

A.II.1. Amplificación y secuenciación del gen rRNA 16S

A partir del DNA aislado de los cultivos puros de las cepas aisladas se realizó la reacción de PCR del gen rRNA 16S con los cebadores específicos de eubacterias 27-F y 1492-R. La reacción se llevó a cabo como se describe más adelante en el apartado de amplificación de ácidos nucleicos. Los productos de PCR obtenidos de aproximadamente 1500pb, se purificaron mediante "QIAquick nucleotide removal Kit" (Qiagen®) según instrucciones del fabricante, y se cuantificaron para su posterior secuenciación. Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación se describen en la tabla 6 (357-F, 519-R y 945-F) (Fox *et al.*, 1992). La preparación de las muestras para secuenciación se realizó según instrucciones del servicio de secuenciación del Departamento de Genética de la Universidad de Granada.

Todas las secuencias obtenidas en esta tesis se analizaron para su identificación en la base de datos del NCBI mediante la herramienta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) (McGinnis & Madden, 2004). El alineamiento y análisis filogenético de las secuencias parciales del gen rRNA 16S así como de las secuencias de referencia se realizó mediante el paquete informático ARB (Ludwig *et al.*, 2004). Los árboles filogenéticos se construyeron mediante el procedimiento de máxima parsimonia, utilizando el filtro de conservación *Firmicutes* 50% suministrado con la última versión de bases de datos de subunidad pequeña del rRNA (ssu_jan04_corr). Los números de acceso de las secuencias de referencia se indican en los árboles finales. La línea de escala 0.1 indica el largo de rama que representa un 10% de diferencia en la secuencia.

A.II.2. DGGE

La reacción de PCR y posterior electroforesis en gradiente de desnaturizante de DNA (DGGE) se realizó según se indica en el apartado de técnicas de análisis de comunidades E.II. A partir del DNA genómico obtenido

de los cultivos puros de las cepas probióticas, se amplificó por PCR distintas regiones del gen rRNA 16S tanto con oligonucleótidos universales (Nubel *et al.*, 1996) como con cebadores específicos del género *Lactobacillus* (Walter *et al.*, 2001; Heilig *et al.*, 2002).

Para la caracterización de los lactobacilos presentes en el tracto gastrointestinal de ratones se ensayaron distintas parejas de cebadores, resultando de mayor resolución aquellos descritos por Walter y colaboradores. Así mismo se ensayaron geles con distintos gradientes de desnaturizante según los cebadores utilizados. Finalmente se utilizaron los siguientes gradientes:

- * 30-60% DGGE universal
- * 30-55% DGGE lactobacilos

A.II.3. PFGE

Para la realización de la electroforesis en campo pulsado de las cepas probióticas aisladas, se crearon bloques de agarosa de bajo punto de fusión con una suspensión de una cantidad determinada mediante densidad óptica de un cultivo bacteriano fresco. La extracción de DNA se realizó sobre estos bloques para evitar así el fraccionamiento del mismo durante su manipulación. La técnica se realizó como se describe más adelante en el apartado de técnicas de análisis de comunidades E.IV.

Para la restricción del DNA obtenido de las cepas probióticas, al ser éstas pertenecientes al género *Lactobacillus*, se utilizó como enzima de restricción de elección *ApaI* según recomendado en bibliografía (McCartney *et al.*, 1996).

B. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados en esta tesis se dividen en medios para coprocultivos, medios para el crecimiento de lactobacilos y medios necesarios para la transformación de *Escherichia coli*. Todos se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante, excepto en los medios no comerciales en cuyo caso se describe su preparación.

B.I. MEDIOS PARA COPROCULTIVOS

Los medios utilizados para el recuento de los distintos grupos de microorganismos presentes en heces se listan a continuación:

B.I.1. Wilkins – Chalgren

El medio de Wilkins-Chalgren utilizado en este estudio es un medio comercial (Wilkins-Chalgren anaerobe agar® Oxoid) para el cultivo de microorganismos anaerobios. Este medio fue descrito por Wilkins y Chalgren para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de antibióticos sobre bacterias anaerobias (Wilkins & Chalgren, 1976). No necesita de la adición de sangre para un crecimiento satisfactorio de la mayoría de los microorganismos anaerobios. El extracto de levadura aporta vitaminas y otros factores de crecimiento como purinas y pirimidinas necesarios para el crecimiento de *Peptostreptococcus anaerobius* y *Prevotella melaninogenica*. La arginina es un suplemento para asegurar el crecimiento de *Eubacterium lentum*. El piruvato sódico aporta una fuente de energía para cocos no sacarolíticos como *Veillonella*. Además actúa como catalasa degradando el peróxido de hidrógeno que se forma en el medio. La hemina es esencial para el crecimiento de especies de *Bacteroides* y la vitamina K para *Prevotella melaninogenica*. Este medio se esterilizó por autoclave 30'/115°C y se incubó a 37°C en ambiente anaerobio (Anaerojar® de Oxoid) durante 24h.

Formula por Litro:

Compuesto	Cantidad (g)
Triptona	10
Peptona de gelatina	10
Extracto de levadura	5
Glucosa	1
Cloruro sódico	5
L-arginina	1
Piruvato sódico	1
Hemina	0.005
Vitamina k	0.0005
Agar	1.5%
pH final de 7.1 ± 0.2 a 25°C	

B.I.2. Agar sangre – Columbia

Este medio favorece el crecimiento de microorganismos aerobios incluso aquellos de difícil cultivo. Gracias a sus componentes permite la formación de zonas de hemólisis así como una buena diferenciación colonial. Se comercializa en forma de placas listas para su uso, y su incubación se realizó a 37°C en ambiente aerobio durante 24-48h.

Formula por Litro:

Compuesto	Cantidad (g)
Peptona caseína	12
Peptona de carne	11
Almidón	1.5

Cloruro sódico	5
Agar	1.5%
pH final de 7.3 ± 0.2 a 25°C	

B.I.3. MRS: de Man, Rogosa y Sharpe

Este medio comercial (MRS broth (de Man, Rogosa, Sharpe)[®] Difco) no es selectivo, aunque favorece el aislamiento y cultivo de bacterias del ácido láctico como el género *Lactobacillus* (Sharpe *et al.*, 1966), formando éstas típicas colonias blanquecinas. Se esterilizó por autoclave 30'/115°C y se incubó durante 24h a 37°C en ambiente anaerobio (Anaerojar[®] de Oxoid) al ser los lactobacilos microorganismos anaerobios facultativos y en algunos casos estrictos.

Formula por Litro:

Compuesto	Cantidad (g)
Peptona	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
Glucosa	20
Citrato amónico	2
Sulfato magnésico - 7H ₂ O	0.2
K ₂ HPO ₄	2
Acetato sódico	5
Sulfato de manganeso - 7H ₂ O	0.05
Tween-80	2.1ml
Agar (para medio sólido)	1.5%
pH final de 5.2 ± 0.2 a 25°C	

B.I.4. Beerens

Existe un gran número de medios selectivos para el cultivo de especies de *Bifidobacterium* la mayoría de ellos con antibióticos, aunque ninguno selecciona todas las especies de este género. El medio utilizado en esta tesis no sólo es selectivo para las bífidobacterias sino que consigue este objetivo. Se preparó según la fórmula publicada por Beerens en 1990 para el aislamiento selectivo de especies de *Bifidobacterium* (Beerens, 1990). Este medio no requiere esterilización, aunque se recomienda su uso en las 24-48h posteriores a su preparación. Al ser las bífidobacterias microorganismos anaerobios estrictos las heces se resuspendieron en tampón PBS con cisteína, y se cultivaron a 37°C en anaerobiosis total (Anaerojar[®] de Oxoid) durante 48-72h.

Formula por Litro:

Compuesto	Cantidad (g)
Peptona	5
Triptona	12
Extracto de levadura	3
Extracto "Heart infusion"	3
Almidón	1
Cloruro sódico	5
Glucosa	5
Cisteína - HCl	5
Agar	1.5%
Llevar a ebullición hasta disolución completa	
Ácido propiónico	5ml
pH final de 5.0 ± 0.2 a 25°C	

El medio basal con agar se llevó a ebullición para disolver todos los ingredientes. Se dejó enfriar hasta aproximadamente 70°C momento en el que se le añadió 5ml de ácido propiónico. Finalmente se ajustó el pH a 5.0 con NaOH 10N.

B.I.5. MacConkey

Es un medio comercial (MacConkey agar® Oxoid) diferencial para la detección, aislamiento y recuento de coliformes y patógenos intestinales de distintas muestras. Además permite la determinación de resistencia a sales biliares, identificación de morfología colonial y cromogénesis (Stewart, 1962). Si se utiliza como medio diagnóstico debe usarse en combinación de otro medio no selectivo como el agar sangre. Se esterilizó por autoclave 30'/115°C y se incubó a 37°C en aerobiosis durante 24-48h.

Formula por Litro:

Compuesto	Cantidad (g)
Peptona	20
Lactosa	10
Sales biliares	5
Cloruro sódico	5
Rojo neutral	0.075
Agar	1.5%
pH final de 7.4 ± 0.2 a 25°C	

B.I.6. Clostridium reforzado

Es un medio sólido comercial (Reinforced clostridial agar® Oxoid) para el cultivo y recuento de clostridios y otros organismos anaerobios, desarrollado a partir del medio descrito anteriormente para el recuento de clostridios de alimentos (Angelotti *et al.*, 1962). Con el fin de seleccionar únicamente el

crecimiento de clostridios, al ser estos microorganismos esporulados, se procedió a la esterilización de la muestra previa a su cultivo mediante incubación durante 10 minutos a 80°C. Mediante esta esterilización únicamente sobreviven los organismos esporulados. Este medio se esterilizó por autoclave 30'/115°C y se incubó a 37°C durante 48-72h en anaerobiosis (Anaerojar® de Oxoid).

Formula por Litro:

Compuesto	Cantidad (g)
Peptona	10
Extracto de levadura	3
Extracto de carne	10
Glucosa	5
Cloruro sódico	5
Acetato sódico	3
Almidón soluble	1
Cisteína-HCl	0.5
Agar	1.5%
pH final de 6.8 ± 0.2 a 25°C	

B.I.6. Sabouraud – cloranfenicol

Es un medio sólido comercial (Sabouraud Chloramphenicol® Scharlau) para el aislamiento de hongos y levaduras. Se diferencia del clásico medio Sabouraud en la adición de cloranfenicol, un antibiótico termoestable de amplio espectro antibacteriano que asegura el crecimiento selectivo de levaduras en muestras muy contaminadas como es el caso de las muestras fecales. Se esteriliza por autoclave 30'/115°C. Tras su siembra el cultivo se realizó en aerobiosis a temperatura ambiente durante al menos 7 días, condiciones favorables para el desarrollo de estos organismos.

Formula por Litro:

Compuesto	Cantidad (g)
Peptona caseína	5
Peptona de carne	5
Glucosa	40
Cloranfenicol	0.5
Agar	1.5%
pH final de 5.6 ± 0.2 a 25°C	

B.II. MEDIOS PARA EL CULTIVO DE LACTOBACILOS

B.II.1. MRS

Descrito en la sección previa de medios para coprocultivos (C.I.3.).

B.II.2. LAMVAB

Los medios tradicionalmente usados para el cultivo de lactobacilos son Rogosa, MRS y en menor número LBS. Estos medios no inhiben el crecimiento de otros organismos ácido resistente como es el caso de enterococos, estreptococos y bifidobacterias, normalmente presentes en muestras complejas como las muestras fecales. Su preparación se realizó según Hartemink y colaboradores (Hartemink *et al.*, 1997), utilizando placas frescas en cada ocasión.

Formula por Litro:

Compuesto	Cantidad (g)
MRS	104.4
Vancomicina (a partir de una solución de 2mg/ml en agua)	0.020
Cisteína - Hcl	0.5
Verde de Bromocresol	0.05
Agar	1.5%
pH final de 5.0 ± 0.1 a 25°C ajustado mediante una solución de HCl 4M	

Para su preparación se esterilizó el medio MRS y se llevó a temperatura aproximadamente de 60°C, momento en el cual se le adicionó en condiciones estériles el antibiótico y se ajustó el pH a 5.0. Finalmente se le añadió el indicador. Este medio se incubó en aerobiosis a 37°C durante 24-48h.

B.III. MEDIOS PARA LA TRANSFORMACIÓN DE ESCHERICHIA COLI

B.III.1. Luria - Bertani (LB)

Este es un medio simple para el crecimiento de *Escherichia coli* tras el proceso de transformación. Se esterilizó por autoclave 30'/115°C y se incubó en aerobiosis a 37°C durante aproximadamente 24h.

Formula por Litro:

Compuesto	Cantidad (g)
Triptona	10
Cloruro sódico	10
Extracto de levadura	5
Agar (para medio sólido)	1.5%
pH final de 7.0 ± 0.1 a 25°C	

Para la selección de colonias positivas en el proceso de clonaje mediante el criterio “azul-blanco” se preparó LB sólido adicionado del antibiótico adecuado según el vector de transformación además de IPTG y X-Gal:

- * **X-Gal:** Es un sustrato cromogénico que indica la actividad galactosidasa, produciendo un color en la colonia azul intenso. Se disuelven 100 mg de X-Gal en 5ml de dimetilformamida en un recipiente estéril protegido de la luz. No es necesario esterilizar por filtración. Se adicionó cantidad suficiente al medio para obtener una concentración final de 80 µg/ml.
- * **IPTG:** Es un inductor de la actividad galactosidasa utilizado para detectar la actividad del gen *lac* en experimentos de clonaje. Se disuelven 2 g de IPTG en un total de 10ml de agua destilada en un recipiente estéril. Esta solución se esterilizó mediante filtración con un filtro de tamaño de poro de 0.22µm. Se adicionó cantidad suficiente al medio para obtener una concentración final de 20 mM.
- * **Ampicilina:** antibiótico de elección para el uso del vector de transformación pGEM-T. Se esterilizó por filtración y se utilizó a concentración 0.1mg/ml.

B.III.2. SOB/SOC

Es el medio de crecimiento de *Escherichia coli* en el proceso de transformación. La triptona y el extracto de levadura aportan nutrientes al medio que favorecen el crecimiento. Los cloruros sódico y potásico se añaden para obtener un equilibrio osmótico adecuado. El sulfato magnésico aporta magnesio, necesario para la acción de numerosas enzimas como aquellas implicadas en la replicación de DNA.

Formula por Litro:

Compuesto	SOB	SOC
Triptona	2%	2%
Extracto de levadura	0.5%	0.5%
Cloruro sódico	10mM	10mM
Cloruro potásico	2.5mM	2.5mM
*1 M MgCl ₂	10ml	10ml
*1 M MgSO ₄		
*Glucosa	-	20mM
pH final de 7.0 ± 0.1 a 25°C		

* Se adicionan al medio tras su esterilización a partir de soluciones esterilizadas mediante filtro de tamaño de poro de 0.22µm.

C. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN

Un cuadro resumen de los distintos modelos utilizados en esta tesis se muestra en la figura 12:

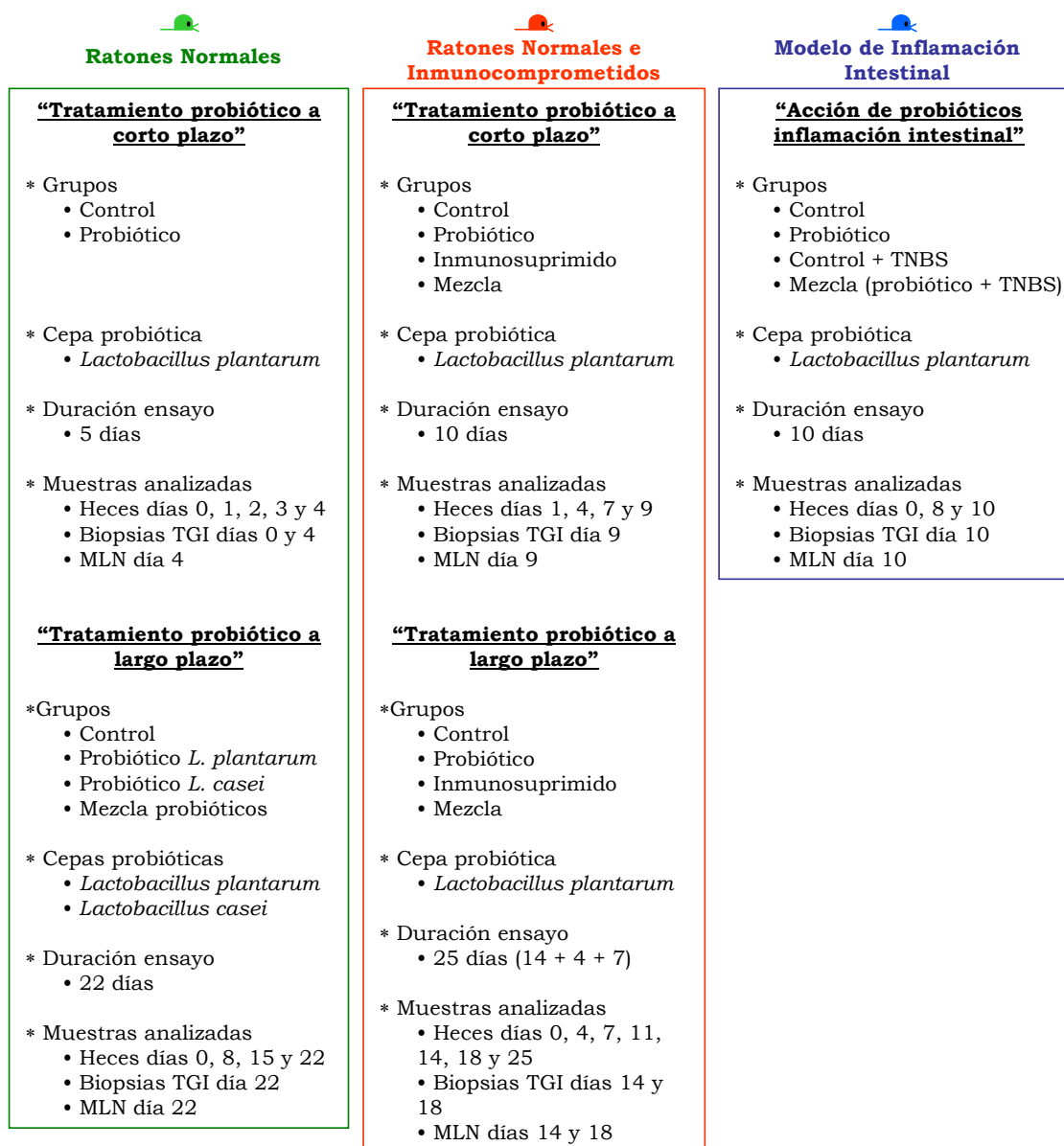


Fig. 12: Modelos animales utilizados en esta tesis.

C.I. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratones hembras BALB/c de 6 a 10 semanas de edad y 18 a 22g de peso procedentes de la Unidad de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada, mantenidos en condiciones libres de patógenos o instalaciones SPF (“specific pathogen free”) (fig. 13, **A**) con acceso *ad libitum* a pienso estándar y agua. Los ensayos fueron aprobados y supervisados por el comité ético local de la Universidad de Granada.

Los ratones se dividieron de manera aleatoria en los distintos grupos de estudio, formados cada grupo por al menos cuatro ratones. En los modelos estudiados sobre animales mantenidos en condiciones normales los ensayos son monoespecie o multiespecie dependiendo del número de cepas probióticas

administradas (Timmerman *et al.*, 2004). Los modelos animales estudiados de situación clínica de inmunosupresión son de carácter preventivo o terapéutico dependiendo si la administración de la cepa probiótica se realizó previa o posteriormente a la creación de la condición de inmunosupresión. El modelo de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) es de carácter preventivo.

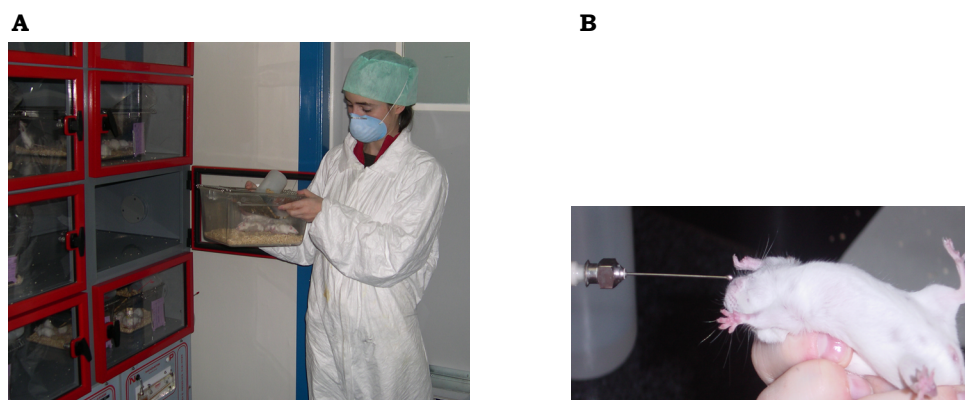


Fig. 13: **A.** Animalario de la UGR, instalaciones “SPF”. **B.** Administración de la suspensión probiótica mediante cánula intragástrica.

C.I.1. Administración de las cepas probióticas

Para la administración del microorganismo probiótico en los distintos modelos animales se preparó una suspensión bacteriana de una concentración aproximada de 1×10^{10} CFU/ml en leche desnatada, concentración determinada mediante recuentos en medios selectivos. En tratamientos de larga duración el inóculo se preparó fresco cada 7 días, y el recuento se realizó tanto al inicio como al final de cada preparado.

En todos los ensayos realizados, la administración de la cepa probiótica se realizó mediante cánula intragástrica (fig. 13, **B**), 100 μ l de una suspensión homogénea en leche desnatada. Los grupos control recibieron mediante el mismo sistema la misma cantidad de leche sin el inóculo probiótico.

C.I.2. Toma de muestras

Se tomaron muestras de heces a distintos tiempos según el ensayo, bien aleatoriamente de distintos ratones en un grupo, o del mismo ratón por grupo para un seguimiento individualizado.

El último día de cada ensayo los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical. Tras el sacrificio los animales se fijaron sobre la tablilla de operaciones, en posición decúbito prono. Se asepticizó la piel con etanol, y usando tijeras y pinzas de disección se cortó la piel de la cavidad abdominal.

Se tomaron biopsias de dos ratones por grupo del tracto gastrointestinal completo, ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y en ocasiones bazo e hígado para la determinación de una posible traslocación bacteriana a través de la pared gastrointestinal.

C.II. TRATAMIENTO PROBIÓTICO EN RATONES NORMALES

Se realizó el estudio del efecto de la administración diaria, a corto o largo plazo, de una cepa de *Lactobacillus plantarum* o de la combinación de esta con *Lactobacillus casei* sobre animales mantenidos en condiciones normales durante distintos periodos de tiempo. Para este ensayo se dividieron los animales en grupos en control y probiótico. En el estudio a largo plazo el grupo probiótico se dividió a su vez en tres, recibiendo cada uno *L. plantarum*, *L. casei* o una mezcla de ambas.

C.II.1. Tratamiento probiótico a corto plazo en ratones normales

Para el ensayo de la forma de administración del probiótico así como de las condiciones a aplicar en la realización de las distintas técnicas para la caracterización de la microbiota intestinal, se estudió el efecto de la administración diaria de la cepa probiótica aislada de *L. plantarum* durante un periodo de 5 días según se muestra en la siguiente figura:

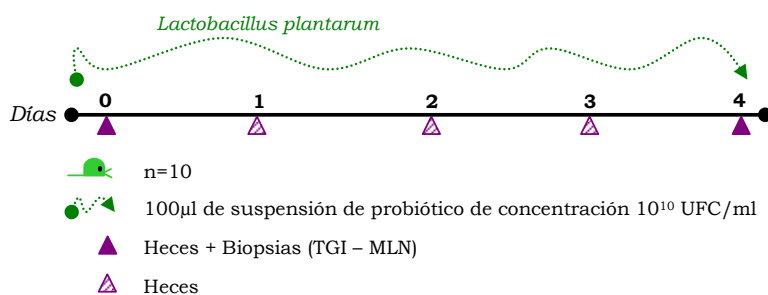


Fig. 14: Tratamiento a corto plazo en animales normales.

Se tomaron muestras de heces de manera aleatoria de dos ratones por grupo cada día del ensayo, y biopsias del tracto gastrointestinal completo el primer y último día. También se tomaron muestras de ganglios linfáticos mesentéricos, hígado y bazo.

Las muestras fecales de todos los días se dividieron a partes iguales para ensayar distintas condiciones de extracción de DNA a partir de heces, al ser considerado este un paso crítico en el análisis de muestras complejas (Zoetendal *et al.*, 2001).

Todas las muestras se analizaron mediante PCR-DGGE para la obtención del perfil de la composición total de la microbiota intestinal mediante el uso de oligonucleótidos universales para la región V6-V8 del gen rRNA 16S. También se estudió el efecto del probiótico administrado sobre la población de lactobacilos mediante el uso de cebadores específicos de género.

Para la caracterización de las bandas dominantes en los geles de DGGE específicos del género *Lactobacillus* se realizó el clonaje de dos productos de PCR, de una muestra fecal y de biopsia intestinal, seleccionados por presentar la mayor diversidad según el perfil obtenido. Los clones se analizaron mediante estudios de restricción y secuenciación, y se alinearon frente al perfil original para la identificación de las bandas correspondientes a cada clon.

C.II.2. Tratamiento probiótico a largo plazo en ratones normales

A partir de los resultados obtenidos del ensayo anterior, establecidas las condiciones para la realización de las distintas técnicas para el estudio de la microbiota gastrointestinal de ratones, se decidió realizar un ensayo más extenso sobre el efecto de la administración a largo plazo de microorganismos probióticos. Para ello se procedió a la administración diaria de las cepas probióticas *L. casei* y *L. plantarum*, así como de una mezcla de ambas sobre animales mantenidos en condiciones normales durante un periodo de 22 días:

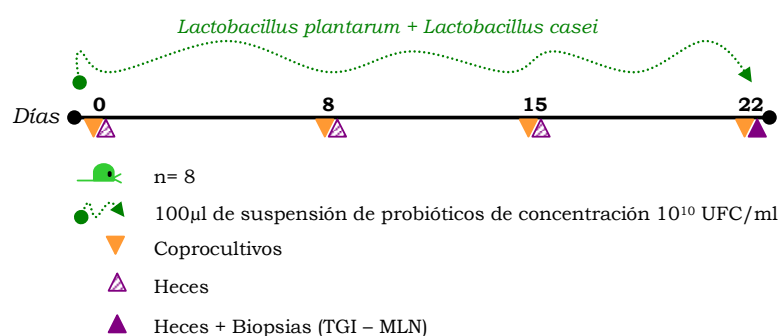


Fig. 15: Tratamiento a largo plazo en animales normales.

Se tomaron muestras de heces de manera individual de dos ratones marcados por grupo a lo largo del tratamiento, y el último día se tomaron biopsias del tracto gastrointestinal completo y de los ganglios linfáticos mesentéricos de los mismos ratones marcados para la determinación de una posible traslocación bacteriana.

Se realizaron coprocultivos en 7 medios selectivos para los principales grupos de microorganismos presentes en heces en los días 0, 8, 15 y 22. (medios de cultivo descritos en el apartado B.I.).

Las muestras de heces de los días 0, 8, 15 y 22 se analizaron mediante PCR-DGGE para la obtención tanto del perfil de la composición total de la microbiota intestinal, como específica para los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, para el estudio del efecto de la administración a largo plazo de las cepas probióticas no sólo en miembros del mismo género sino también sobre la familia de bífidobacterias.

Para completar los resultados obtenidos mediante DGGE estas mismas muestras de heces se analizaron por T-RFLP (“Terminal restriction fragment length polymorphism”). Mediante este análisis obtenemos resultados cuantitativos y cualitativos de las distintas especies presentes en heces, si bien las bases de datos utilizadas para la identificación de las especies productoras de los distintos fragmentos detectados son muy complejas, por lo que cada fragmento puede corresponder a distintas bacterias.

Para la identificación de las especies mayoritarias del género *Lactobacillus* presentes en heces de ratones mediante técnicas de biología molecular se procedió a la elaboración de una librería de clones de lactobacilos a partir del DNA aislado de heces tanto del grupo control como del grupo mezcla. Para ello se realizó la amplificación por PCR del DNA obtenido de las muestras seleccionadas por presentar mayor diversidad de perfiles mediante el uso del cebador universal 27-F y el cebador específico de lactobacilos 679-R. Estos productos de PCR se purificaron y clonaron en el vector de expresión pGEM-T. De los clones obtenidos se seleccionaron aquellos pertenecientes al género *Lactobacillus* mediante amplificación por PCR en este caso con ambos cebadores específicos de género (352-F y 679-R (Walter *et al.*, 2001)). Finalmente a los clones identificados como positivos se les realizó un estudio de restricción o RFLP con las enzimas *MspI*, *CfoI* y *AluI* y se agruparon según el perfil obtenido. Así mismo se identificaron frente al perfil de la muestra original en un gel de DGGE para la correcta asociación de las bandas obtenidas. Los clones seleccionados para la identificación de cada una de las bandas se secuenciaron mediante los cebadores específicos del vector de clonaje pGEM-T, SP6 y T7.

Para la caracterización de la comunidad de lactobacilos presente en heces mediante técnicas de microbiología clásica, con el fin de comparar la resolución de los métodos tradicionales de cultivo (selección e identificación de colonias al azar) frente al uso de técnicas moleculares (construcción de una librería de clones), se seleccionaron un total de 100 colonias aisladas de los coprocultivos del medio para *Lactobacillus* (MRS), 50 correspondientes al grupo testigo tomadas de distintos días y 50 pertenecientes al coprocultivo del grupo mezcla en el último día del tratamiento. Las colonias seleccionadas se

caracterizaron inicialmente mediante técnicas tradicionales (tinción de Gram, catalasa, oxidasa) para eliminar aquellos microorganismos capaces de crecer en MRS que no pertenecen al género *Lactobacillus*. Además se les determinó el crecimiento en medio selectivo y diferencial para lactobacilos LAMVAB (Hartemink *et al.*, 1997), medio de gran selectividad para este grupo al ser de bajo pH, al cual son sensibles los microorganismos Gram negativos presentes en heces, y estar adicionado del antibiótico Vancomicina al que son sensibles bífidobacterias, estreptococos y enterococos también presentes en heces y para el cual los lactobacilos son resistentes. También contiene el indicador verde de bromocresol con el que diferenciamos aquellas colonias que utilizan los azúcares del medio al virar las colonias a amarillo. Posteriormente se realizó la caracterización de las colonias positivas mediante el estudio de metabolismo de carbohidratos por galerías API® 50CH. Finalmente se caracterizaron mediante técnicas moleculares:

- * PCR-DGGE con cebadores específicos de grupo
- * PFGE
- * Secuenciación del gen rRNA 16S.

C.III. TRATAMIENTO PROBIÓTICO EN RATONES NORMALES E INMUNOCOMPROMETIDOS

Se realizó el estudio del efecto de la administración diaria de la cepa probiótica *L. plantarum*, sobre animales modelo de condición clínica de inmunosupresión durante distintos periodos de tiempo. Los ensayos se realizaron sobre cuatro grupos de animales: control, probiótico, animales inmunosuprimidos y un grupo mezcla del animal tratado más probiótico.

Para la determinación del estado de inmunosupresión se realizó el recuento de leucocitos en sangre periférica según descrito en bibliografía (Jimenez-Valera *et al.*, 2003).

C.III.1. Tratamiento probiótico a corto plazo en ratones normales e inmunocomprometidos

Se ensayó el efecto de la administración de la cepa probiótica *L. plantarum* sobre el sistema inmune tras la inducción del estado de inmunosupresión mediante inyección intraperitoneal de ciclofosfamida (Asta Medica, Prarfarma S.A.) como agente mielotóxico a una dosis de 100mg/Kg con la pauta que se muestra en la siguiente figura:

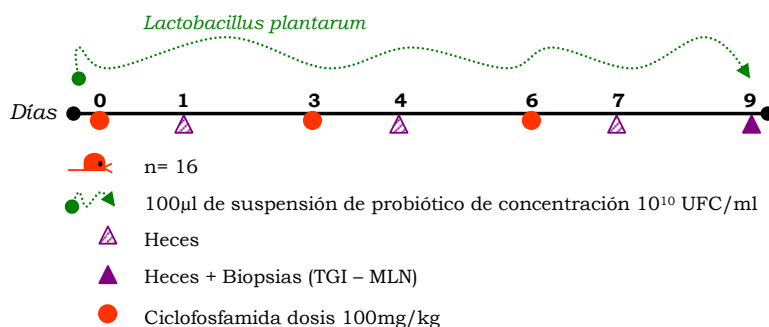


Fig. 16: Tratamiento a corto plazo en animales normales e inmunocomprometidos.

Se tomaron muestras de heces de manera aleatoria de animales de cada uno de los cuatro grupos en los días 1, 4, 7 y 9. Este último día también se tomaron biopsias del tracto gastrointestinal completo y ganglios linfáticos mesentéricos. Todas las muestras obtenidas se analizaron mediante PCR-DGGE universal para la caracterización de la microbiota total presente así como específica del género *Lactobacillus*.

Al tratarse de animales inmunosuprimidos se determinó en las muestras de biopsias la presencia del grupo bacteriano de las bacterias segmentadas filamentosas o SFB (“segmented filamentous bacteria”), ya que se ha demostrado que existe una gran relación entre este grupo y el sistema inmune (Snel *et al.*, 1998). La determinación de la presencia de estas bacterias en las biopsias analizadas se realizó mediante PCR tradicional con oligonucleótidos específicos. Su cuantificación se realizó mediante PCR a tiempo real o cuantitativa. Los productos obtenidos se clonaron e identificaron mediante secuenciación para la validación de los oligonucleótidos utilizados en este ensayo. La cuantificación de este grupo se realizó en relación al número total de bacterias presentes en las muestras.

Para la caracterización de la microbiota intestinal así como la identificación del grupo de las SFB en muestras de biopsias, se realizó el análisis mediante T-RFLP de las muestras de íleon, ciego y colon de 2 animales de cada grupo, muestras previamente analizadas mediante PCR-DGGE.

C.III.2. Tratamiento probiótico a largo plazo en ratones normales e inmunocomprometidos

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo anterior se decidió realizar un estudio más extenso y a largo plazo de la administración de un agente probiótico en un modelo de inmunosupresión. Este ensayo constó de dos fases, una fase preventiva donde la cepa probiótica se administró previa a la inducción de la situación de inmunosupresión, y una fase terapéutica donde

se siguió administrando la cepa posterior al periodo de inmunodeficiencia, para la determinación del potencial del probiótico sobre la capacidad de recuperación del ratón. La inducción del estado de inmunosupresión se realizó mediante inyección intraperitoneal de ciclofosfamida (Asta Medica, Prarfarma S.A.) como agente mielotóxico a una dosis de 150mg/Kg. el día 10 y de 100mg/Kg. el día 13.

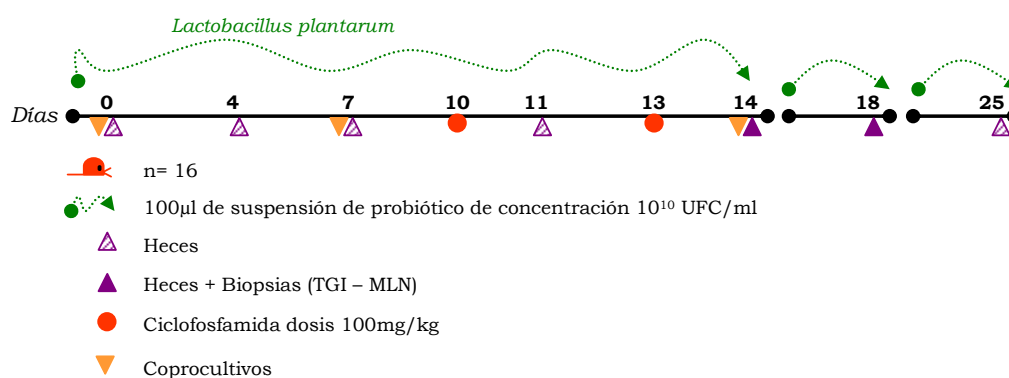


Fig. 17: Tratamiento a largo plazo en animales normales e inmunocomprometidos.

Se realizaron coprocultivos en 7 medios selectivos para los principales grupos de microorganismos presentes en heces en los días 0, 7 y 14 de los grupos control y probiótico.

Se tomaron muestras de heces individualmente de animales marcados de los cuatro grupos en los días 0, 4, 7, 11, 14, 18 y 25. Los días 14 y 18 también se tomaron biopsias del tracto gastrointestinal completo y ganglios linfáticos mesentéricos. Las muestras se analizaron mediante PCR-DGGE universal para la caracterización de la microbiota total presente así como específica de grupo *Lactobacillus*.

Las muestras fecales además se analizaron mediante T-RFLP con el fin de identificar y cuantificar las especies presentes en heces y posteriormente comparar los resultados.

C.IV. ACCIÓN DE PROBIÓTICOS EN UN MODELO DE INFLAMACIÓN INTESTINAL

Se estudió el efecto beneficioso del microorganismo probiótico *L. plantarum* sobre un modelo murino de enfermedad inflamatoria intestinal. Este ensayo se realizó con el agente químico TNBS o ácido picrilsulfónico ("trinitrobenzene sulfonic acid") el cual provoca un episodio de inflamación, principalmente en colon, que asemeja a la fase aguda del proceso inflamatorio en la enfermedad de Crohn.

Se utilizó TNBS (Sigma-Aldrich, n° cat. 92822 solución 1 M) a una dosis de 150mg/Kg. de ratón (aproximadamente unos 3mg para los ratones utilizados en nuestro estudio de 20g). De la solución 1M se preparó una solución al 50% en etanol de la cual se administró aproximadamente 40µl mediante cánula anal a una distancia de 3cm del ano en animales anestesiados.

Los animales se dividieron en dos grupos inicialmente, uno de los cuales recibió la dosis de probiótico. El día 9 la mitad de los animales del grupo control y del grupo probiótico recibieron el tratamiento inflamatorio. Un esquema de este ensayo se muestra a continuación:

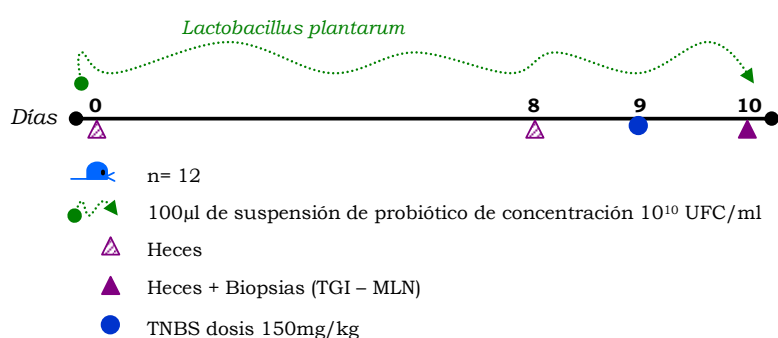


Fig. 18: Tratamiento inflamatorio con TNBS.

Para la determinación y cuantificación del proceso inflamatorio se conservó un fragmento de 0.5cm de colon de cada ratón marcado en 2ml de RNAlater® (Ambion) para la posterior extracción del mRNA y determinación de la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF-α, IL-1β e IL-6 mediante RT-PCR cuantitativa.

Se tomaron muestras de heces los días 0, 8 y 10, de manera individual de ratones marcados en cada grupo. El último día también se tomaron biopsias de TGI completo así como de los ganglios linfáticos mesentéricos. Todas las muestras tanto fecales como de biopsias se analizaron mediante PCR-DGGE universal y específica para el grupo *Lactobacillus*.

Las muestras fecales también se analizaron mediante T-RFLP con el fin de completar y comparar los resultados obtenidos de los estudios anteriores.

D. ÁCIDOS NUCLEICOS: DNA, RNA Y PLÁSMIDOS

D.I. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

D.I.1. DNA

Las extracciones de DNA tanto de heces, biopsias, como de cultivos microbianos puros se realizaron mediante el protocolo de agitación por “bead-beating” con los kits “FastDNA® SPIN Kit for Soil” (BIO101 Systems) y el sistema “FastPrep® Instrument” (FP120, Savant Instruments, Farmingdale, USA). Este kit consta de una matriz de lisis, formado por distintos tamaños de cuentas o “beads”. Durante el procesamiento de la muestra ésta se mezcla con los “beads” y una solución que estabiliza el DNA, una mezcla de distintos detergentes y sales. El detergente inactiva a las nucleasas que se liberan al medio una vez rota las células, además de proveer lubricación al proceso de extracción y evitar la ruptura de la red de DNA. Esta mezcla se agita en el “FastPrep® Instrument” a gran velocidad hacia arriba y abajo, lo cual facilita la completa homogeneización de la muestra. Debido a la gran resistencia a lisis de las cepas probióticas usadas en este estudio (especialmente *L. plantarum*) las extracciones se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante pero multiplicando por tres las repeticiones en el proceso de agitación, incubando entre cada agitación 5’ en hielo para evitar así el recalentamiento de la muestra y con ello la posible degradación de los ácidos nucleicos.

a) Biopsias

Para la extracción de DNA a partir de biopsias se les sometió a un tratamiento previo de incubación durante 1h/55°C en la solución de lisis descrita a continuación:

Solución de lisis	
PBS	1ml
SDS 10%	50µl
Proteinasa K (20mg/ml)	10µl

Tras este periodo de incubación el tejido se homogeneizó por agitación simple y se procedió a la extracción del DNA mediante el kit “FastDNA® SPIN Kit for Soil” (BIO101 Systems) según instrucciones del fabricante.

b) Cultivos puros

Para la extracción de DNA de las cepas probióticas utilizadas en este estudio se procedió a su cultivo en 5ml de MRS líquido durante 24h. Posteriormente se centrifugaron y el pellet se lavó con 1ml de PBS, tras lo cual se resuspendió en 900µl de PBS y se procedió al proceso de extracción.

D.I.2. RNA

Para la cuantificación de la expresión de citoquinas inflamatorias en colon de ratones en el ensayo del microorganismo probiótico en modelo de enfermedad inflamatoria intestinal, en el momento del sacrificio se conservaron 0.5cm de tejido en 2ml de RNA later® (Ambion) para su posterior análisis.

Para la extracción del RNA total se utilizó un homogeneizador de tejidos, enjuagado en cada uso con cloroformo, seguido de etanol y finalmente en agua DEPC a máxima velocidad. Se colocó el tejido en un tubo de 10ml con 3ml del agente Trizol® (Invitrogen) y se homogeneizó a velocidad máxima. El homogeneizado se dividió en 3 partes iguales las cuales se congelaron a -80°C inmediatamente.

Una de las muestras se descongeló 5 minutos a temperatura ambiente para la extracción del RNA según el siguiente protocolo:

- * Se adicionaron 200µl de cloroformo y se agitó por vortex hasta adquirir la mezcla un color rosa claro y homogéneo, tras lo que se dejó la muestra en reposo 2-3 minutos a temperatura ambiente
- * Centrifugación 15'/10000rpm/4°C
- * Se transfirió la capa acuosa (RNA) a un eppendorf limpio, donde se añadió 500µl de isopropanol, se mezcló por inversión 3-4 veces y se dejó a temperatura ambiente de 5-10 minutos.
- * Centrifugación 10'/10000rpm/4°C
- * Se eliminó el sobrenadante y se añadió 1ml de etanol al 75%, mezclando bien.
- * Centrifugación 5'/6500rpm/4°C.
- * Se volvió a eliminar el sobrenadante para secar el precipitado durante 5-10 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió el RNA en 100µl de agua DEPC durante una hora en hielo.

Las muestras obtenidas se conservaron a -80°C. Para la cuantificación del mRNA se realizó la posterior amplificación del mRNA a cDNA por RT-PCR o PCR mediante transcriptasa inversa.

D.I.3. Plásmidos

Para la extracción de plásmidos para la identificación de los clones seleccionados en los distintos experimentos de clonaje, éstos se cultivaron en medio LB líquido adicionado de ampicilina. La extracción del plásmido se realizó mediante el kit “QIAprep Spin Miniprep Kit” de Qiagen según indicaciones del fabricante.

D.II. AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS: PCR

Para amplificar fragmentos del DNA aislado de las muestras en cada ensayo, principalmente del gen rRNA 16S, se utilizaron distintos cebadores dependiendo del análisis a realizar. Una lista de todos los oligonucleótidos usados en esta tesis se muestran en la tabla 6:

Tabla 6: Oligonucleótidos utilizados en esta tesis:

Objetivo	Secuencia (5' - 3')	**Nombre	Uso	Referencia
Universales	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	27-F	Amplificación	(Lane, 1991)
	TACGGYTACCTTGTACGACTT	1492-R	rRNA 16S	
Universales	CTCCTACGGGAGGCAGCA	357-F	Secuenciación	(Fox <i>et al.</i> , 1992)
	GWATTACCGCGGCKGCTG	519-R	rRNA 16S	
	GGGCCCGCACAAGCGGTGG	945-F		
Universales	*AACGCGAAGAACCTTAC	968-F	DGGE	(Nubel <i>et al.</i> , 1996)
	CGGTGTGTACAAGACCC	1401-R		
Universales	GTTTGATCCTGGCTCAG	s27 ^{FAM} -F	T-RFLP	(Egert <i>et al.</i> , 2003)
	CCGTC AATTCCTTTRAGTTT	907-R		
Universales	CGGTGAATACGTTTCYCGG	1369-F	Q-PCR	(Suzuki <i>et al.</i> , 2000)
	GGWTACCTTGTTACGACTT	1492-R		
<i>Lactobacillus</i>	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	352-F	DGGE	(Walter <i>et al.</i> , 2001)
	*ATTYCACCGCTACACATG	679-R		
<i>Lactobacillus</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	27-F	DGGE	(Heilig <i>et al.</i> , 2002)
	CACCGCTACACATGGAG	677-R		
	GGAAACAC(A/G)TGCTAATACCG	159-F		
	*ATCGTATTACCGCGGCTGCTGGCA	515-R		
<i>Bifidobacterium</i>	GGGTGGTAATGCCGATG	164-F	DGGE	(Satokari <i>et al.</i> , 2001)
	*CCACCGTTACACCGGGAA	662-R		
SFBs	TGTGGGTTGTGAATAACAAT	779-F	Q-PCR	Este estudio
	GCGAGCTTCCCTCATTACAAGG	1008-R		(Urdaci <i>et al.</i> , 2001)
SFBs		(779-F)	Q-PCR	(Snel <i>et al.</i> , 1995)
	GGTTAGCCACAGGTTTCGG	1380-R		
Plásmidos	TAATACGACTCACTATAGG	T7	Secuenciación	Promega
	GATTTAGGTGACACTATAG	SP6		
Plásmidos	TGGCGGCCGCGGAATTC	PG1-F	RFLP	(Heilig, unpublished)
	GGCCGCGAATTCACCTAGTG	PG2-R		
IL-6	CTTCCATCCAGTTGCCTTCTTG	F	Q-PCR	(Stienstra <i>et al.</i> , unpublished)
	AATTAAGCCTCCGACTTGTGAAG	R		
TNF- α	CAACCTCCTCTCTGCCGTC AA	F	Q-PCR	(Stienstra <i>et al.</i> , unpublished)
	TGACTCCAAAGTAGACCTGCC	R		
IL-1 β	TGGTGTGTGACGTTCCCAT	F	Q-PCR	(Stienstra <i>et al.</i> , unpublished)
	CAGCACGAGGCTTTTGTGTG	R		
Actina	GATCTGGCACCACACCTTCT	F	Q-PCR	(Stienstra <i>et al.</i> , unpublished)
	GGGGTGTGAAGGTCTCAA	R		

* Cola GC de 40 pares de bases

** El número se refiere a la posición según la numeración de la secuencia de *E. coli*. F/R indica cebadores "forward" o aguas abajo y "reverse" o aguas arriba.

Las reacciones para la amplificación del gen rRNA 16S por PCR para DGGE, RFLP y secuenciación se realizaron, preparando una mezcla con los siguientes componentes sin el DNA a amplificar:

Compuesto	Cantidad (µl)	Concentración stock
Buffer PCR	5	10x
MgCl ₂	3	50nM
Cebador "forward"	1	10µM
Cebador "reverse"	1	10µM
dNTP's	1	10mM
Taq DNA polimerasa	0.25	5U/µl
Agua	37.75	
Volumen total	49	

Las cantidades de los componentes se multiplicaron por el número de reacciones a realizar, y posteriormente la mezcla se dividió en el número de muestras para añadirle 1µl del DNA a amplificar.

Los programas de PCR utilizados en esta tesis se muestran a continuación:

Objetivo	Ciclos - repeticiones	Tiempo - Temperatura
Gen rRNA 16S Universal <i>Amplificación 1500 pb</i>	1 - (1x)	Pre-desnaturalización 2 min - 94°C
	2 - (35x)	1. Desnaturalización 30 seg - 94°C
		2. Anillamiento 40 seg - 52°C
		3. Elongación 1.30 min - 72°C
	3 - (1x)	Post-elongación 5 min - 72°C
4 - (∞)	Conservación ∞ - 4°C	

Objetivo	Ciclos - repeticiones	Tiempo - Temperatura
DGGE V6-V8 <i>Amplificación 450 pb</i>	1 - (1x)	Pre-desnaturalización 2 min - 94°C
	2 - (35x)	1. Desnaturalización 30 seg - 94°C
		2. Anillamiento 40 seg - 56°C
		3. Elongación 1 min - 72°C
	3 - (1x)	Post-elongación 5 min - 72°C
4 - (∞)	Conservación ∞ - 4°C	

Objetivo	Ciclos - repeticiones	Tiempo - Temperatura
Lactobacillus específica (27-F / 677GC-R) <i>Amplificación 700 pb</i>	1 - (1x)	Pre-desnaturalización 2 min - 94°C
	2 - (35x)	1. Desnaturalización 30 seg - 94°C
		2. Anillamiento 40 seg - 66°C
		3. Elongación 1 min - 72°C
	3 - (1x)	Post-elongación 5 min - 72°C
4 - (∞)	Conservación ∞ - 4°C	

Objetivo	Ciclos - repeticiones	Tiempo - Temperatura
Nested Lactobacillus específica (159-F / 515GC-R) <i>Amplificación 400 pb</i>	1 - (1x)	Pre-desnaturalización 2 min - 94°C
	2 - (35x)	1. Desnaturalización 30 seg - 94°C
		2. Anillamiento 40 seg - 52°C
		3. Elongación 1.30 min - 72°C
	3 - (1x)	Post-elongación 5 min - 72°C
4 - (∞)	Conservación ∞ - 4°C	

Objetivo	Ciclos - repeticiones		Tiempo - Temperatura
Bifidobacterium específica <i>Amplicón 500 pb</i>	1 - (1x)	Pre-desnaturalización	2 min - 94°C
	2 - (35x)	1. Desnaturalización	30 seg - 94°C
		2. Anillamiento	40 seg - 62°C
		3. Elongación	1 min - 72°C
	3 - (1x)	Post-elongación	5 min - 72°C
4 - (∞)	Conservación	∞ - 4°C	

Objetivo	Ciclos - repeticiones		Tiempo - Temperatura
Chequeo inserto pGEM-T Tamaño variable Elongación 1min/kb	1 - (1x)	Pre-desnaturalización	2 min - 94°C
	2 - (35x)	1. Desnaturalización	30 seg - 94°C
		2. Anillamiento	40 seg - 55°C
		3. Elongación	x - 72°C
	3 - (1x)	Post-elongación	5 min - 72°C
4 - (∞)	Conservación	∞ - 4°C	

D.II.1. PCR para T-RFLP

Para la reacción de la amplificación de DNA para su análisis por T-RFLP se realizó una mezcla distinta a la descrita anteriormente, con los compuestos y a las concentraciones que se muestran a continuación.

Compuesto	Cantidad (μl)	Concentración stock
Buffer PCR	5	10x
MgCl ₂	1.5	50mM
Cebador "forward"	0.5	50 μ M
Cebador "reverse"	0.5	50 μ M
dNTP's	5	500 μ M
BSA	3	10x
<i>Taq</i> DNA polimerasa	0.25	5U/ μ l
Agua	33.25	
Volumen total	49	

Las cantidades de los componentes se multiplicaron por el número de reacciones a realizar, y posteriormente la mezcla se dividió en el número de muestras para añadirle 1 μ l del DNA a amplificar. En este caso se utilizó el siguiente programa:

Objetivo	Ciclos - repeticiones		Tiempo - Temperatura
T-RFLP <i>Amplicón 900 pb</i>	1 - (1x)	Pre-desnaturalización	3 min - 94°C
	2 - (35x)	1. Desnaturalización	30 seg - 94°C
		2. Anillamiento	30 seg - 52°C
		3. Elongación	1 min - 72°C
	3 - (1x)	Post-elongación	5 min - 72°C
4 - (∞)	Conservación	∞ - 4°C	

D.II.2. PCR cuantitativa o a tiempo real

La reacción de PCR cuantitativa permite determinar la concentración de un determinado grupo bacteriano o el total de las bacterias presentes en una muestra, así como diversas expresiones genéticas en tejidos o bacterias. Mediante esta técnica podemos observar las curvas exponenciales obtenidas en el proceso de amplificación de la muestra a tiempo real, al contrario que en la reacción de PCR tradicional donde solamente detectamos el producto final de la reacción, que al ser este un producto de saturación no nos proporciona información cuantitativa. Las curvas de amplificación son directamente proporcionales con, por ejemplo, la cantidad de bacterias presentes en una muestra (fig. 19).

Si la bacteria objeto de estudio permite su cultivo, podemos realizar la extracción de DNA de una concentración conocida de la misma y utilizarla como curva control, permitiendo mostrar posteriormente los resultados obtenidos del análisis de una muestra como CFU/ml. Al utilizar en una misma reacción una serie de diluciones de la muestra analizada, podemos asociar el momento o ciclo donde comienza la replicación de una muestra (Ct) con la concentración bacteriana presente en la misma mediante asociación con la curva control. En el caso de bacterias que no permiten su cultivo, los resultados se muestran en porcentaje frente a la concentración total de bacterias presentes en una muestra. Así mismo la expresión genética en nuestro caso de citoquinas proinflamatorias se representó en porcentaje frente a la expresión basal de actina.

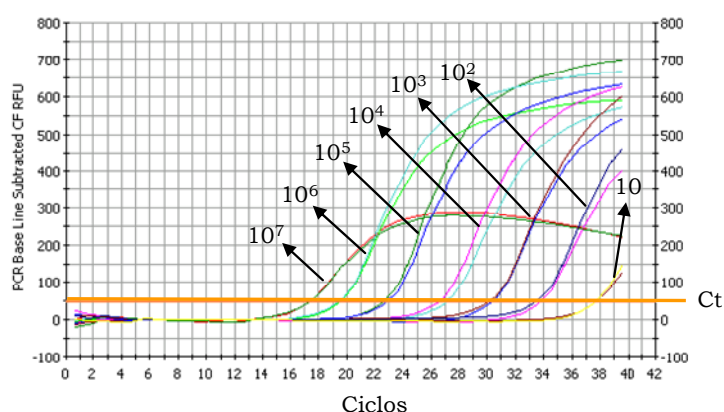


Fig. 19: Curva de amplificación en el proceso de Q-PCR

La PCR a tiempo real se realizó mediante el sistema de detección de Sybr Green “MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System” y “iQ™ SYBR® Green Supermix” (Biorad). La mezcla se realizó según se muestra a continuación.

Compuesto	Cantidad (μl)	Concentración stock
BioRad master mix	12.5	2x
Cebador "forward"	0.5	10 μ M
Cebador "reverse"	0.5	10 μ M
Agua	6.5	
Volumen total	20	



Las cantidades de los componentes se multiplicaron por el número de reacciones a realizar, y posteriormente la mezcla se dividió en el número de muestras para añadirle 5 μ l de distintas diluciones del DNA a amplificar.

Cada reacción se estandarizó con una curva de calibrado realizada mediante una dilución seriada de un DNA de concentración conocida. Cada muestra se analizó por duplicado en la misma placa de reacción y cada reacción se estudió por duplicado. Cada programa se completó con un último ciclo donde se creó una curva para la desasociación del producto de PCR, con el fin de comprobar la especificidad del producto obtenido, evitando así los errores introducidos por la detección de quimeras o dímeros de cebadores. Los programas utilizados en esta tesis se muestran a continuación:

Objetivo	Ciclos - repeticiones	Tiempo - Temperatura
Universal	1 - (1x)	3 min - 95°C
	2 - (40x)	15 seg - 95°C
		45 seg - 56°C
		45 seg - 72°C
	Toma de datos a tiempo real	
	3 - (1x)	1 min - 95°C
SFB	4 - (1x)	1 min - 65°C
	5 - (60x)	10 seg - 65°C
	La temperatura va incrementando a 0.5°C por repetición	

Objetivo	Ciclos - repeticiones	Tiempo - Temperatura
SFB	1 - (1x)	3 min - 95°C
	2 - (40x)	15 seg - 95°C
		45 seg - 59°C
		45 seg - 72°C
	Toma de datos a tiempo real	
	3 - (1x)	1 min - 95°C
SFB	4 - (1x)	1 min - 65°C
	5 - (60x)	10 seg - 65°C
	La temperatura va incrementando a 0.5°C por repetición	

Objetivo	Ciclos – repeticiones	Tiempo - Temperatura
PCR de Gradiente (validación de los cebadores usados para SFB)	1 – (1x)	3 min - 95°C
	2 – (40x)	15 seg - 95°C
		45 seg - 48°C - 60°C
	A: 60.0°C B: 59.2°C C: 57.7°C D: 55.5°C	
	E: 52.4°C F: 50.3°C G: 48.9°C H: 48.0°C	
	Toma de datos a tiempo real	1 min - 72°C
3 – (1x)		1 min - 95°C
4 – (1x)		1 min - 65°C
5 – (60x)		10 seg - 65°C
	La temperatura va incrementando a 0.5°C por repetición	

Para la cuantificación de la expresión de citoquinas inflamatorias en el colon de los animales estudiados en el modelo de enfermedad inflamatoria intestinal, se realizó primero la síntesis de cDNA a partir del RNA aislado para su posterior amplificación y cuantificación por Q-PCR. El cDNA se sintetizó mediante el kit “iScript™ cDNA synthesis kit” según instrucciones del fabricante. En este caso la curva patrón se realizó mediante diluciones seriadas de una mezcla de los RNA obtenidos de todas las muestras. Se realizó una curva patrón para cada citoquina estudiada con sus cebadores correspondientes. Así mismo se utilizó la expresión del gen codificante para actina como control interno, al asumirse una expresión basal de la misma. A partir de ésta se calculó la expresión relativa de las citoquinas.

Objetivo	Ciclos – repeticiones	Tiempo - Temperatura
Citoquinas (y Actina)	1 – (1x)	2 min - 94°C
	2 – (45x)	15 seg - 94°C
		45 seg - 60°C
	Toma de datos a tiempo real	
	3 – (1x)	1 min - 95°C
	4 – (1x)	1 min - 60°C
5 – (60x)	10 seg - 65°C	
	La temperatura va incrementando a 0.5°C por repetición	

D.III. CLONAJE

Para la caracterización por secuenciación de los productos de PCR obtenidos de algunas de las muestras analizadas se procedió a su clonaje en el vector comercial “pGEM®-T easy vector” (Promega).

Para ello los productos de PCR se purificaron mediante “QIAquick nucleotide removal Kit” (Qiagen®) según instrucciones del fabricante, y se cuantificaron. Para la transformación se utilizaron como células competentes *Escherichia coli* XL1-blue (Stratagene). El inserto clonado en el vector pGEM-T se amplificó con distintos oligonucleótidos dependiendo del análisis a realizar. Tanto para comprobar los insertos como para realizar el análisis de restricción

de los mismos (RFLP) se utilizaron los oligonucleótidos PG1-F y PG2-R, al encontrarse estos directamente en las limitaciones del sitio de inserción del fragmento, evitando así errores en los patrones de restricción por inserción del fragmento en un sentido u otro dentro del vector. Para la secuenciación de los fragmentos clonados se utilizaron los oligonucleótidos comerciales T7 y SP6.

D.IV. RFLP

Para la determinación del patrón de restricción de los insertos clonados en vectores de transformación se realizó su análisis por RFLP (“restriction fragment length polymorphism”). Mediante esta técnica se obtiene un perfil correspondiente al patrón de restricción del producto de PCR analizado, el cual será similar entre clones o especies en caso similitud de la secuencia, al mantenerse los sitios de corte de las enzimas de restricción, dando lugar a fragmentos del mismo tamaño.

Para la reacción de la restricción del amplicón obtenido en la reacción de PCR con los cebadores PG1/PG2, se realizó una mezcla con los compuestos y a las concentraciones que se muestran a continuación.

Compuesto	Cantidad (μl)	Concentración stock
Buffer común para las enzimas utilizadas	1	10x
BSA	0.05	100x
* <i>MspI</i>	0.25	3000U
* <i>CfoI</i>	0.25	2000U
* <i>AluI</i>	0.25	3000U
Agua	3.2	
Volumen total (por muestra)	5	

*Enzimas de restricción de Fermentas Life Sciences. *CfoI* denominada *Hin6I*.

Se multiplicaron las cantidades mencionadas en la tabla por el número de reacciones a realizar, y posteriormente se mezclaron 5μl de esta mezcla con 5μl del DNA a digerir. La digestión se llevó a cabo durante 1h30'/37°C. Los productos obtenidos de la digestión se analizaron por electroforesis en geles preparados 12% Poly (NAT)[®] Wide-Mini S-4x25 (Elchrom Scientific). La electroforesis se realizó en tampón TAE 1x a 55°C, durante aproximadamente una hora a 100V. El revelado del gel se realizó en la misma solución de electroforesis con bromuro de etidio, y se examinaron mediante luz UV.

E. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE COMUNIDADES

E.I. COPROCULTIVOS

Para el análisis de los principales grupos de microorganismos presentes en heces de ratones en los distintos modelos estudiados, se procedió al cultivo de las muestras de heces en una serie de medios selectivos y/o diferenciales, los cuales se describen en el apartado medios de cultivo para coprocultivos (B.I.).

Se realizó una dilución 1/10 de las heces sólidas en tampón salino de fosfato o PBS adicionado de cisteína para favorecer la supervivencia de las especies anaerobias. A partir de esta dilución se realizaron diluciones seriadas hasta la 10^{-10} . Se sembraron por triplicado 10µl de todas las diluciones en los distintos medios. El cultivo se realizó en aerobiosis o anaerobiosis dependiendo del medio utilizado, y los recuentos obtenidos se anotaron a las 24, 48 y 72 horas del cultivo, excepto para el medio específico para levaduras para el que las lecturas se realizaron a la semana del cultivo.

E.II. DGGE

Esta técnica se basa en el principio según el cual una concentración creciente de un agente desnaturizante de DNA va a separar gradualmente la doble hebra de DNA en distintos dominios, según su secuencia o contenido en Guanina y Citosina (GC), al estar estas unidas por un triple puente de hidrógeno. Cuando el punto de fusión del menor dominio se alcanza, la doble hebra se separa parcialmente, creando una molécula ramificada con movilidad reducida en un gel de poliacrilamida. El ambiente desnaturizante se crea mediante una temperatura de electroforesis uniforme de 60°C y un gradiente lineal de desnaturizante creado con formamida y urea. La separación total de las hebras de DNA se evita mediante una cola GC que se acopla al extremo del oligonucleótido usado en la reacción de PCR, el cual ancla el fragmento desnaturizado al gel.

Se realizó la separación de los amplicones del gen rRNA 16S generados por PCR de las distintas muestras. Si los fragmentos obtenidos poseen una secuencia rica en GC, la desnaturización será más costosa y por lo tanto avanzarán más trayecto en la electroforesis hasta quedar anclados en el gel tras la desnaturización. Por lo tanto la posición final de los amplicones en el gel depende directamente del comportamiento de separación o de la secuencia nucleotídica, además del tiempo de electroforesis. Para aumentar la eficiencia en la separación se debe elegir un gradiente de desnaturización óptimo según

la muestra o fragmentos a analizar. En principio amplicones que poseen un sólo nucleótido de diferencia en su secuencia pueden separarse si se utiliza un gradiente adecuado, si bien a veces existen amplicones que no se pueden separar, incluso con una secuencia nucleotídica distinta, debido a problemas de co-migración (Gafan & Spratt). La intensidad de una banda se puede relacionar con la abundancia de una especie en un perfil, aunque es una técnica basada en la reacción de PCR y por lo tanto hay que tener en cuenta las limitaciones que esto implica.

E.II.1. Preparación del gel de acrilamida

Para la realización del gel de acrilamida se preparó el “sándwich” o los cristales donde se vierte. Con el fin de poder trabajar con mayor facilidad con este gel debido a su gran fragilidad (gel de 0.2mm de grosor) se colocó un film transparente flexible de poliéster (“GelBond® PAG Film for Acrylamide gels” de Cambrex) diseñado para el uso con geles de poliacrilamida. Los monómeros de acrilamida se adhieren de manera covalente al film durante el proceso de polimerización. El gel queda permanentemente adherido a este film durante la electroforesis y los siguientes procesos de tinción.

Para la preparación del gel se utilizaron soluciones de acrilamida de 0% y 100% de desnaturizante para crear el gradiente deseado. Como sustancias polimerizantes se utilizó una solución al 10% de APS (persulfato amónico) y TEMED (N,N,N,N tetrametiletilendiamina). Los geles se dejaron polimerizar al menos 1h antes de la electroforesis. Los distintos gradientes utilizados en esta tesis dependen del grupo analizado, y se muestran en la tabla 7:

Tabla 7: Gradientes de electroforesis

Grupo	Gradiente	0% (ml)	100% (ml)	TEMED (μ l)	APS (μ l)
Universal	30%	9.1	3.9	13	50
	60%	5.2	7.8	13	50
<i>Lactobacillus</i>	30%	9.1	3.9	13	50
	55%	5.85	7.15	13	50
<i>Bifidobacterium</i>	45%	7.15	5.85	13	50
	55%	5.85	7.15	13	50

* Para evitar el goteo del gel al inicio se preparó un tapón de 1ml de solución del 0% previo al vertido

** Una vez terminado el gradiente cada gel lleva 9ml de la solución del 0% como gel apelmazante

E.II.2. Electroforesis

El proceso de electroforesis se realizó en el sistema “DCode Universal Mutation Detection System®” (BioRad) en tampón 0.5x TAE a 60°C. Tras poner la muestra en el gel se procedió a aplicar una corriente de 200V durante 5

minutos y posteriormente se realizó la separación por electroforesis a 85V durante 16h.



Fig. 20: Sistema de electroforesis “DCode universal mutation detection system”

E.II.3. Tinción del gel

La tinción de los geles se realizó mediante tinción de plata descrita en bibliografía con modificaciones (Sanguinetti *et al.*, 1994). Tras la electroforesis el gel se incubó en las distintas soluciones de revelado:

- * Cairn’s 1x, 200ml → 3’
- * Solución de tinción de plata, 200ml → 10’
- * Agua destilada → 2’
- * Solución de revelado, 200ml → hasta color deseado
- * Cairn’s 1x, 200ml → 5’
- * Agua destilada → 2’
- * Solución de conservación, 200ml → 7’

Finalmente el gel se cubrió con celofán (“cellophane sheets”, Amersham Biosciences) y se secó en horno a 60°C durante 24h.

A continuación se muestra una tabla resumen de las soluciones utilizadas en la elaboración de esta técnica.

Tabla 8: Soluciones para DGGE

Solución	Componentes	Cantidad
50xTAE (1L)	Tris base	242g
	Acido acético glacial	57.1ml
	EDTA 0.5M pH 8.0	100ml
	Agua hasta vol. final.	
100% Desnaturalizante 8% Poliacrilamida (250ml)	Urea	105.4g
	Acrilamida:Bisacrilamida 40% (37.5:1)	50ml
	Formamida	100ml
	50x TAE	2.5ml
	Glicerol	5ml
	Agua hasta vol. final	
0% Desnaturalizante 8% Poliacrilamida (250ml)	Acrilamida:Bisacrilamida 40% (37.5:1)	50ml
	50x TAE	2.5ml
	Glicerol	5ml

	Agua hasta vol. final	
Solución de fijación Cairn's 8x (250ml)	Etanol 96%	200ml
	Ácido acético	10ml
	Agua hasta vol. final	
Solución de fijación Cairn's 1x	Cairn's 8x	50ml
	Agua destilada	350ml
Solución de tinción de plata (200ml)	Cairn's 1x	200ml
	Nitrato de Plata	0.4g
Revelado (250ml)	Solución de NaOH 1,5%	250ml
	Formaldehído	750µl
	Borohidrato sódico (NaBH ₄)	punta espátula
Solución de conservación (1L)	Etanol 96%	250ml
	Glicerol	100ml
	Agua hasta vol. final	

E.II.4. Análisis de los geles

Los geles de DGGE se analizaron mediante el programa informático Bionumerics® 4.0 (Applied Maths BVBA, Belgium). Para compensar las diferencias entre geles o las distorsiones internas ocurridas durante el proceso de electroforesis, los geles se alinearon y normalizaron mediante un patrón de referencia externo, incluido en ambos extremos de cada gel y en el carril central. El fondo “no linear” se eliminó mediante el procedimiento de “rolling disk”. La similitud entre perfiles de DGGE se calculó mediante índices de similitud de las curvas densitométricas de cada perfil por correlación de Pearson “Pearson product-moment correlation” (Hane *et al.*, 1993; Zoetendal *et al.*, 2001). Para la construcción de los dendrogramas, se aplicó el algoritmo UPGMA.

Para el análisis estadístico de los geles se utilizó el programa CANOCO 4.5 software (CANOCO 4.5, Biometris, Wageningen, The Netherlands). Las bandas presentes en cada carril se identificaron mediante la herramienta de búsqueda automática de bandas del programa Bionumerics, y confirmadas manualmente mediante comparación con la curva densitométrica. Las bandas se clasificaron y cuantificaron tomando como medida la superficie de banda, con tolerancia y optimización establecidos en 1% y 0.5% respectivamente, y omitiendo las bandas de intensidad <1%. La intensidad relativa de cada banda se calculó dividiendo el área de su superficie por la suma de todas las áreas de superficie de todas las bandas presentes en cada carril, dando resultados entre 0 y 1. Esta normalización se realizó para corregir las diferencias entre intensidades absolutas de cada banda causadas por distintas intensidades en la tinción de los geles, así como la variación en la cantidad de producto de PCR cargado de cada muestra.

E.III. T-RFLP

Esta técnica se basa en la separación y detección por fluorescencia de los fragmentos obtenidos tras la digestión de los amplicones resultantes de la reacción de PCR de diversas muestras. Cada fragmento detectado corresponde con una especie bacteriana, y la intensidad de su fluorescencia con la cantidad de esta bacteria presente en la muestra, por lo que es una técnica cuantitativa. Los perfiles obtenidos se pueden analizar frente a bases de datos para la identificación y asociación de los distintos tamaños a una especie concreta, si bien estas bases de datos son complejas y cada fragmento puede corresponder con más de una especie.

E.III.1. Amplificación y digestión del DNA

Se realizó la amplificación por PCR del gen rRNA 16S de las distintas muestras mediante los oligonucleótidos universales 27-F, marcado con el fluorocromo FAM o 6-carboxyfluoresceína y 907(TES)-R según descrito en el apartado amplificación de ácidos nucleicos para T-RFLP (D.II.1.). Los productos de amplificación obtenidos se purificaron y cuantificaron para conocer su concentración exacta mediante el sistema NanoDrop® (NanoDrop Technologies). Todas las muestras se diluyeron a la misma concentración para realizar la reacción de restricción según la siguiente fórmula:

Compuesto	Cantidad	
Producto de PCR	75 ng	
* Mezcla	1.35µl	
	* Mezcla:	
	- Buffer 10x	1µl
	- BSA 100x	0.1µl
	- Enzima de restricción (<i>MspI</i> 10U/µl)	0.25µl
Agua	Hasta 10µl	

La reacción de restricción se llevó a cabo a 37°C durante 3 horas. Para su análisis se mezcló 1.25µl de la digestión con la misma cantidad de una mezcla formada por 0,75µl de buffer de carga de formamida (Amersham Biosciences) y 0,5µl del estándar “GeneScan®-1000 [ROX]™” (Applied Biosystems). De esta mezcla se utilizó 2µl para la separación de los fragmentos en un gel de secuenciación de poliacrilamida al 5% realizado según la siguiente fórmula:

Compuesto	Cantidad
Urea	15.75g
Agua (Grado de pureza HPLC)	15ml
Acrilamida:Bisacrilamida 40% (37.5:1)	6.3ml

* TBE 10x	4.5ml	* TBE 10x	
		Tris	108g
		Ácido bórico	55g
		EDTA	7.4g
		disódico	
		Agua hasta	
		1L	
Persulfato amónico 10%	225µl		
TEMED	15µl		

E.III.2. Separación de los fragmentos

La detección de fluorescencia se llevó a cabo mediante el sistema “ABI PRISM® 377 DNA Sequencer” (Applied Biosystems) en el modo GeneScan. Se realizó la lectura en buffer TBE 1x en el módulo GS 36A-1200, durante 14 horas bajo las siguientes condiciones:

- * Voltaje de electroforesis → 2500V
- * Corriente de electroforesis → 40mA
- * Corriente → 30W
- * Temperatura → 51°C
- * CCD gain → 2
- * CCD offset → 250

E.III.3. Análisis de los resultados

A partir de los resultados obtenidos del análisis de las distintas muestras de un ensayo, ya que en el gel de secuenciación analizamos la misma cantidad de cada muestra, la altura total de todos los picos (fluorescencia total) debe ser igual entre muestras. Se determinó esta altura total de fluorescencias y se dividió entre el número de muestras analizadas, obteniendo la fluorescencia media total por muestra. Con esta fluorescencia media se determinó el factor de conversión de las muestras, dividiendo la fluorescencia total real medida en cada ensayo entre esta media. Mediante este factor de conversión se normalizan los resultados obtenidos de cada una de las muestras para la eliminación de los posibles errores introducidos en la elaboración de esta técnica.

La altura corregida es la altura real dividida entre el factor de conversión, que normalizará cada pico obtenido dentro de una muestra. Se ignoraron aquellos valores de fluorescencia <100. La altura corregida relativa es la altura corregida de cada pico dividida entre la altura total de cada muestra, mediante lo que se consigue normalizar los valores de cada pico entre valores 0-1 para su posterior análisis mediante el programa informático de estadística CANOCO (apartado F.).

E.IV. PFGE

La electroforesis en campo pulsado se utilizó para confirmar la similitud entre las cepas de lactobacilos aisladas de los coprocultivos realizados en el ensayo de la administración de la mezcla de las cepas probióticas. Estos aislados se agruparon previamente por caracterización del gen rRNA 16S. Mediante esta técnica obtenemos una identificación de las cepas aún más precisa al utilizar ésta no sólo el gen rRNA 16S sino el genoma completo. Una lista de las soluciones utilizadas en este proceso se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 9: Soluciones para PFGE

Solución	Componentes	Cantidad
Buffer SE 1x	NaCl	75mM
	EDTA pH 8.0	25mM
Solución lisozima - mutanolisina	EDTA pH 8.0	50mM
	Na-lauril sarcosina	0.05%
	Lisozima	2mg/ml
	Mutanolisina	3U/ml
Solución proteinasa K	Tris pH 8.0	10mM
	EDTA pH 8.0	50mM
	SDS	1%
	Proteinasa K	2mg/ml
Solución de restricción	<i>Apal</i> (MBI Fermentas)	10U
	Buffer B+ 10x	1x
TBE 10x	Tris	108g
	Ácido bórico	55g
	EDTA disódico	7.4g
	Agua hasta 1L	

E.IV.1. Extracción y digestión del DNA

La extracción de DNA se realizó mediante la inclusión del cultivo bacteriano en bloques de agarosa de bajo punto de fusión para evitar así la ruptura mecánica del DNA durante el proceso. Para ello se midió la densidad óptica de los cultivos celulares a 600nm y se resuspendieron en un volumen de buffer SE igual a la densidad óptica dividida por diez. De esta suspensión se tomaron 100µl para mezclarlos con el mismo volumen de agarosa de bajo punto de fusión al 2%. Esta mezcla se dejó enfriar en moldes de tamaño 5x2x10mm. Los bloques sólidos de agarosa se incubaron a 37°C durante 16 horas en la solución de lisozima – mutanolisina, y posteriormente tras retirar este buffer, en la solución de proteinasa K a 50°C durante 16 horas.

Una vez digeridas las células y eliminadas las proteínas presentes, se lavaron los bloques de agarosa 4 veces en buffer SE 1x a temperatura

ambiente, usando PMSF (fluorofenilmetilsulfónico) a 1mM sólo en el segundo lavado con el fin de inactivar la proteinasa K.

Para la digestión enzimática se utilizó sólo un tercio de los bloques. Se realizaron las siguientes incubaciones:

- * Buffer SE 0.1x → 1 hora a temperatura ambiente
- * Buffer B+ 1x → 1 hora a temperatura ambiente
- * Solución de restricción → 16 horas a 30°C
- * Buffer de electroforesis TBE 0.5x → 30' a temperatura ambiente

E.IV.2. Electroforesis

Una vez realizada la digestión se colocaron los bloques en los pocillos de un gel de agarosa al 1%, evitando la formación de burbujas. Se procedió a la electroforesis en campo pulsado mediante el sistema “CHEF-DR III System” (BioRad) refrigerado a 10°C. El pulso inicial fue de 1 segundo y el pulso final de 12 segundos. La electroforesis se realizó durante 20 horas, según recomendación para la identificación de cepas de *Lactobacillus* (McCartney *et al.*, 1996). El ángulo incluido es de 120°, ángulo de cambio de orientación de la corriente. La corriente de electroforesis fue de 5V/cm. Los geles se tiñeron mediante bromuro de etidio durante aproximadamente 2 horas y se examinaron mediante luz UV.

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados obtenidos de los distintos experimentos se realizó mediante el programa informático CANOCO 4.5 software (CANOCO 4.5, Biometris, Wageningen, The Netherlands). Esta herramienta permite ordenar datos ecológicos obteniendo resultados sobre la estructura de comunidades, las relaciones que se establecen entre ellas y el medio ambiente o el efecto de diversos tratamientos experimentales sobre distintas comunidades biológicas. Mediante este programa se obtienen diagramas bidimensionales en los que se puede observar las diferencias según las covariables establecidas, así como los efectos por interacciones entre las mismas (ter Braak & Šmilauer, 2002).

F.I. ANÁLISIS DE T-RFLP “IN SILICO”

La predicción de las especies asociadas a los fragmentos obtenidos de los ensayos de T-RFLP también denominados “TRF” se realizó mediante la herramienta integrada en ARB “TRF-CUT” (Ricke *et al.*, 2005), con la última

versión de bases de datos de subunidad pequeña del rRNA (ssu_jan04_corr_opt.arb).

F.II. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE

Se utilizó el programa informático CANOCO (CANOCO 4.5; Biometris, Wageningen, The Netherlands) de análisis de multivariantes, para estudiar las relaciones existentes entre la composición de las comunidades microbianas con variables relevantes a los distintos ensayos animales, como tratamientos, tiempo de duración de los ensayos, origen de las muestras o zona de las biopsias...etc.

Como datos de entrada (denominados en CANOCO “especies” o “variables de respuesta”) se utilizaron distintos grupos de datos para describir la microbiota según el ensayo estudiado:

- * matrices de intensidad relativa de las bandas de los perfiles de DGGE totales y específicos de *Lactobacillus*.
- * altura relativa de los picos de los fragmentos de T-RFLP
- * abundancia relativa de las bacterias SFB determinada mediante Q-PCR.
- * coprocultivos realizados en 7 medios distintos.

El análisis de multivariantes es una técnica que tiene como fin la organización de las muestras en un espacio reducido bidimensional donde los ejes atribuidos explican la variabilidad en la composición de la microbiota. Es decir, las muestras se organizan de manera que su proximidad en el diagrama indica el grado de similitud entre ellas (Lepš & Šmilauer, 2003).

En el análisis de gradiente indirecto ("principal component análisis" o PCA) el orden de los resultados no está regido por ninguna consideración asumida a priori, como en el caso de las impuestas en las variables ambientales. Estas variables se proyectan en el esquema sólo después de ordenar los resultados. Por el contrario, las técnicas de ordenación directas (orden canónico) están regidas por variables ambientales, y los ejes son combinaciones lineares de éstas. Los métodos de orden canónicos incluyen el análisis de redundancia ("redundancy analysis" o RDA) para datos homogéneos, mientras que el análisis de correspondencia canónico ("canonical correspondence analysis" o CCA) será utilizado para los grupos de datos heterogéneos (ter Braak & Šmilauer, 2002).

Los análisis se realizaron con datos no transformados pero normalizados para obtener valores entre 0 y 1 previo al análisis con CANOCO (descrito en los apartados para DGGE y T-RFLP). Para analizar la heterogeneidad entre los

datos estudiados se utilizó el análisis DCA (“detrending correspondence analysis”). Para tamaños de gradiente menores a 3.0 los datos se consideraron homogéneos, mientras que valores mayores a 4.0 corresponden con heterogeneidad (ter Braak & Šmilauer, 2002; Lepš & Šmilauer, 2003). Para grupos de datos homogéneos se utilizaron los análisis lineales PCA y RDA. En ambos tipos de análisis se realizó la escala mediante distancias entre muestras, y los índices de especies no fueron post-transformados. El centrado se realizó por especies, aunque no se seleccionaron para las muestras ni el centrado ni la estandarización por norma.

En general, el tiempo como variable se consideró como una variable cualitativa, mientras que tratamientos y situación en el tracto digestivo se consideraron nominales. En los esquemas de ordenación, las variables nominales se mostraron como “centroids” o flechas. Las flechas se mostraron para una interpretación más fácil de estos esquemas, al estar relacionados tanto el tamaño como la inclinación de las flechas con los ejes (por ejemplo, flechas largas con poca inclinación corresponden a una alta correlación). Además, el ángulo entre vectores indica la correlación entre variables. Por lo tanto, vectores que apuntan en la misma dirección están relacionados positivamente (ter Braak, 1987; Salles *et al.*, 2004). Las muestras se mostraron en los esquemas según los índices de *Samp*, basados en la composición de muestras por especies. Si no fuera así, todas las muestras correspondientes a un mismo tratamiento (por ejemplo la mezcla de inmunosupresión más probiótico) automáticamente se agruparían juntas en el diagrama, en vez de agruparse según la composición de las especies que lo forman (Lepš & Šmilauer, 2003).

Para analizar el significado de la relación entre la composición de la microbiota en respuesta a variables ambientales (como tiempo, tratamiento, anatomía...) se realizó la permutación “Monte Carlo” (499 permutaciones). La hipótesis nula considerada fue la independencia de la estructura de la comunidad de los datos ambientales, y las relaciones se consideraron significantes cuando $p < 0.05$.

G. BIBLIOGRAFÍA

- Angelotti, R., H. E. Hall, M. J. Foter and K. H. Lewis (1962). Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. *Appl Microbiol.* **10**: 193-199.
- Beerens, H. (1990). An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Lett Appl Microbiol* **11**: 155-157.
- Egert, M., B. Wagner, T. Lemke, A. Brune and M. W. Friedrich (2003). Microbial community structure in midgut and hindgut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl Environ Microbiol* **69**: 6659-68.
- Fox, G. E., J. D. Wisotzkey and P. Jurtshuk, Jr. (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 166-170.
- Gafan, G. P. and D. A. Spratt Denaturing gradient gel electrophoresis gel expansion (DGGE) - An attempt to resolve the limitations of co-migration in the DGGE of complex polymicrobial communities. *FEMS Microbiology Letters* **In Press, Corrected Proof**.
- Hane, B. G., K. Jager and H. G. Drexler (1993). The Pearson product-moment correlation coefficient is better suited for identification of DNA fingerprint profiles than band matching algorithms. *Electrophoresis* **14**: 967-72.
- Hartemink, R., V. R. Domenech and F. M. Rombouts (1997). LAMVAB—A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods* **29**: 77-84.
- Heilig, H. G., E. G. Zoetendal, E. E. Vaughan, P. Marteau, A. D. Akkermans and W. M. de Vos (2002). Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* **68**: 114-23.
- Jimenez-Valera, M., E. Moreno, M. A. Amat and A. Ruiz-Bravo (2003). Modification of mitogen-driven lymphoproliferation by ceftriaxone in normal and immunocompromised mice. *Int J Antimicrob Agents* **22**: 607-12.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acids techniques in bacterial systematics*. E. Stackebrandt and M. Goodfellow. Chichester, United Kingdom., John Wiley & Sons: 115-147.
- Lepš, J. and P. Šmilauer (2003). Multivariate analysis of ecological data using CANOCO., Cambridge, University Press.
- Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode and K. H. Schleifer (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**: 1363-71.
- McCartney, A. L., W. Wenzhi and G. W. Tannock (1996). Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. *Appl Environ Microbiol* **62**: 4608-13.
- McGinnis, S. and T. L. Madden (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* **32**: W20-5.
- Nubel, U., B. Engelen, A. Felske, J. Snaird, A. Wieshuber, R. I. Amann, W. Ludwig and H. Backhaus (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* **178**: 5636-43.
- Ricke, P., S. Kolb and G. Braker (2005). Application of a newly developed ARB software-integrated tool for in silico terminal restriction fragment length polymorphism analysis reveals the dominance of a novel *pmoA* cluster in a forest soil. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1671-3.
- Salles, J. F., J. A. van Veen and J. D. van Elsas (2004). Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: effect of crop and land use history. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4012-20.
- Sanguinetti, C. J., E. Dias Neto and A. J. Simpson (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* **17**: 914-21.
- Satokari, R. M., E. E. Vaughan, A. D. Akkermans, M. Saarela and W. M. de Vos (2001). Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **67**: 504-13.
- Sharpe, M. E., T. F. Fryer and D. G. Smith (1966). Identification of the Lactic Acid Bacteria. *Identification Method for Microbiologists Part A*. B. M. Gibbs and F. A. Skinner, London and New York, Academic Press.: 65-79.
- Snel, J., P. P. Heinen, H. J. Blok, R. J. Carman, A. J. Duncan, P. C. Allen and M. D. Collins (1995). Comparison of 16S rRNA sequences of segmented filamentous bacteria isolated from mice, rats, and chickens and proposal of "Candidatus Arthromitus". *Int J Syst Bacteriol* **45**: 780-2.
- Snel, J., C. C. Hermsen, H. J. Smits, N. A. Bos, W. M. Eling, J. J. Cebra and P. J. Heidt (1998). Interactions between gut-associated lymphoid tissue and colonization levels of indigenous, segmented, filamentous bacteria in the small intestine of mice. *Can J Microbiol* **44**: 1177-82.
- Stewart, D. J. (1962). A selective-diagnostic medium for the isolation of pectinolytic organisms in the Enterobacteriaceae. *Nature* **8**: 1023.
- Suzuki, M. T., L. T. Taylor and E. F. DeLong (2000). Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4605-14.
- ter Braak, C. J. F. (1987). The analysis of vegetation-environment relationships by canonical correspondence analysis. *Vegetatio* **69**: 69-77.

- ter Braak, C. J. F. and P. Šmilauer (2002). CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Ithaca NY, USA, Microcomputer Power.
- Timmerman, H. M., C. J. Koning, L. Mulder, F. M. Rombouts and A. C. Beynen (2004). Monostrain, multistrain and multispecies probiotics--A comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol* **96**: 219-33.
- Urdaci, M. C., B. Regnault and P. A. Grimont (2001). Identification by in situ hybridization of segmented filamentous bacteria in the intestine of diarrheic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Res Microbiol* **152**: 67-73.
- Walter, J., C. Hertel, G. W. Tannock, C. M. Lis, K. Munro and W. P. Hammes (2001). Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2578-85.
- Wilkins, T. D. and S. Chalgren (1976). Medium for use in antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **10**: 926-928.
- Zoetendal, E. G., A. D. Akkermans, W. M. Akkermans-van Vliet, J. A. G. M. de Visser and W. M. de Vos (2001). The Host Genotype Affects the Bacterial Community in the Human Gastrointestinal Tract. *Microbial Ecology in Health and Disease* **13**: 129-134.
- Zoetendal, E. G., K. Ben-Amor, A. D. Akkermans, T. Abee and W. M. de Vos (2001). DNA isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. *Syst Appl Microbiol* **24**: 405-10.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. CEPAS PROBIÓTICAS

Para la realización de los ensayos en modelos animales se seleccionaron dos cepas del género *Lactobacillus* aisladas de yogur líquido y kéfir. Los resultados obtenidos de la caracterización de estas cepas, caracterización mediante técnicas de microbiología clásica y de biología molecular, se muestran a continuación.

A.I. PRUEBAS FENOTÍPICAS

A.I.1. Pruebas tradicionales

Las colonias seleccionadas fueron aisladas del medio para lactobacilos y se denominaron C1 y C4. Su caracterización inicial se realizó mediante pruebas fenotípicas clásicas, necesarias para evitar la selección de microorganismos como las levaduras capaces de crecer en el medio utilizado para el aislamiento de lactobacilos. Los resultados se muestran a continuación:

Cepa	Gram	Oxidasa	Catalasa
C1	+	-	-
C4	+	-	-

A.I.2. Test rápido API® 50CH

Para la identificación a nivel de especie de los aislados se realizó el sistema API para el análisis del metabolismo de carbohidratos según instrucciones del fabricante. Se inocularon las galerías con un cultivo de las cepas C1 y C4 en medio API CHL y la lectura se realizó a 24 y 48 horas. Los resultados finales obtenidos a las 48 horas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 10: Resultados lecturas API.

C1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
48h						+					+	+	+	+			+		+	+	+	+	+	+	+
C1	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	37	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
48h	+	+	+	+			+	+	+	+						+		+							
C4	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
48h						+					+	+		+		+			+	+			+	+	+
C4	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	37	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
48h	+	+		+	+	+	+	+		+	+					+							+		

Las lecturas se analizaron mediante el programa de perfiles analíticos para sistemas API obteniendo como resultado la identificación inicial de las especies seleccionadas como:

- * C1 – *Lactobacillus casei/paracasei*
- * C4 – *Lactobacillus plantarum*

A.I.3. Resistencia a pH ácido.

Para la determinación del crecimiento de las cepas probióticas al pH gástrico (pH=2-2.5) se inocularon matraces con medio de cultivo MRS al pH ácido similar al del estómago. Como control positivo se cultivaron las cepas en medio de cultivo a pH normal (pH 7.0) con la misma concentración de inóculo, y se realizó un control negativo sin inóculo. La lectura de la densidad óptica se llevó a cabo a distintos periodos de tiempo para la obtención de la curva de crecimiento de las cepas. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura:

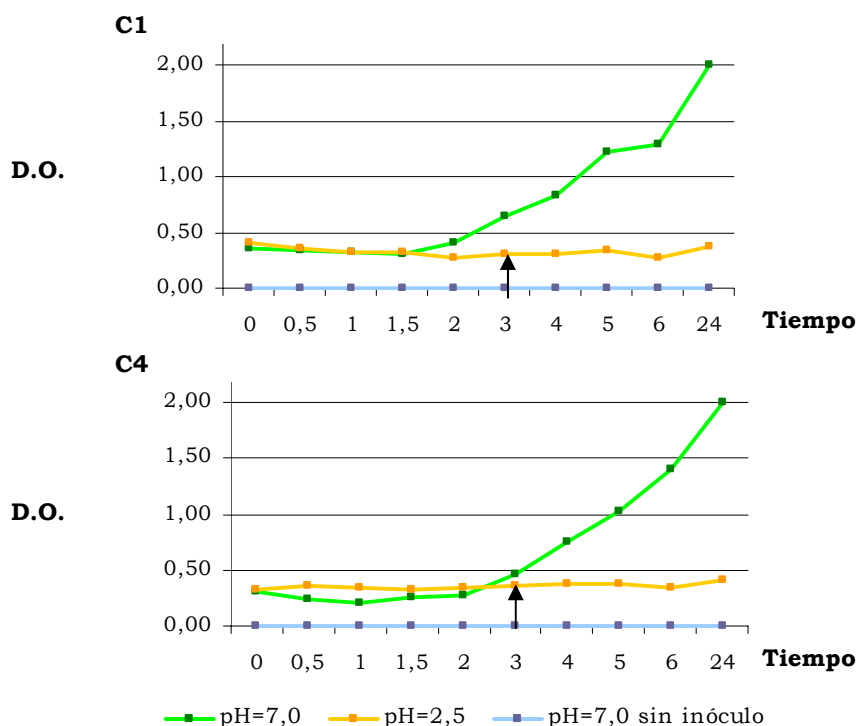


Fig. 21: Crecimiento a pH normal y ácido de las cepas probióticas C1 y C4. La flecha indica el tiempo de supervivencia a pH ácido.

La determinación de la capacidad de supervivencia de las cepas se realizó mediante siembra en medio sólido de inóculos del matraz a pH ácido en los mismos periodos de tiempo de lectura de la densidad óptica. El resultado fue de 3 horas en ambos casos, tiempo tras el cual no se obtuvo crecimiento en medio sólido.

Aunque estas cepas deben soportar el ambiente ácido como condición para ser considerados microorganismos probióticos, se observó una considerable disminución en el recuento de CFU/ml incluso tras 30 minutos de cultivo a pH ácido. Este tiempo de supervivencia se consideró suficiente ya que el tiempo de vaciado gástrico suele ser de aproximadamente 1-2 horas. Además, los microorganismos probióticos suelen administrarse en una matriz láctea (leche, yogur...) que los protege aún más del ambiente ácido.

A.II. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Una vez realizada la identificación fenotípica se procedió a la caracterización de las cepas seleccionadas mediante técnicas de biología molecular. Para ello se amplificó el gen rRNA 16S mediante cebadores universales para eubacterias. Los productos obtenidos de tamaño aproximado de 1500pb se purificaron y cuantificaron para su secuenciación mediante los oligonucleótidos de secuenciación 357-F, 519-R y 945-F. Las secuencias obtenidas (tabla 11) se analizaron para su identificación frente a la base de datos del NCBI mediante la herramienta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) (McGinnis & Madden, 2004). Las secuencias completas se muestran en el anexo.

Tabla 11: Resultados de secuenciación.

Aislado	Tamaño secuencia	Especie más próxima	"Identities"	"Gaps"	% Similitud
C1	1472bp	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1466/1466	0/1466	100
		<i>Lactobacillus casei</i>	1466/1466	0/1466	100
C4	1465bp	* <i>Lactobacillus plantarum</i>	1445/1445	0/1445	100
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	1440/1440	0/1440	100

*El resultado es frente a *Lactobacillus arizonensis* la cual fue reclasificada en 2005 como *L. plantarum* (Kostinek et al., 2005).

Los resultados obtenidos de los métodos de identificación o "fingerprinting" nos servirán para su posterior seguimiento en el análisis de las muestras obtenidas en los distintos ensayos. Sus perfiles se muestran en la siguiente figura:

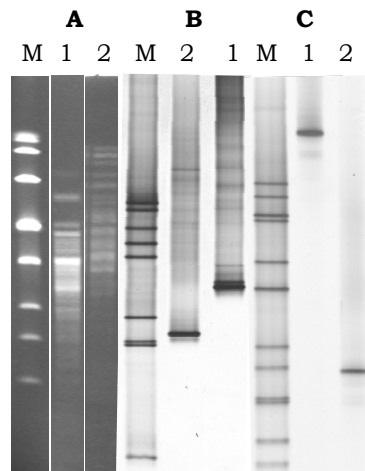


Fig. 22: M: marcador 1. *L. plantarum* 2. *L. casei*.

A. PFGE. **B.** DGGE región V6V8 gradiente 30%-60%. **C.** DGGE específico para el género *Lactobacillus* gradiente 30%-55%

B. MODELOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para el estudio del efecto probiótico de las cepas aisladas, se utilizaron distintos modelos de salud, de situación clínica de inmunosupresión o modelo de enfermedad inflamatoria intestinal como se detalló en el capítulo Material y Métodos. A continuación se muestran de manera individual los resultados obtenidos de las distintas técnicas realizadas para el análisis de las muestras de cada modelo experimental ensayado.

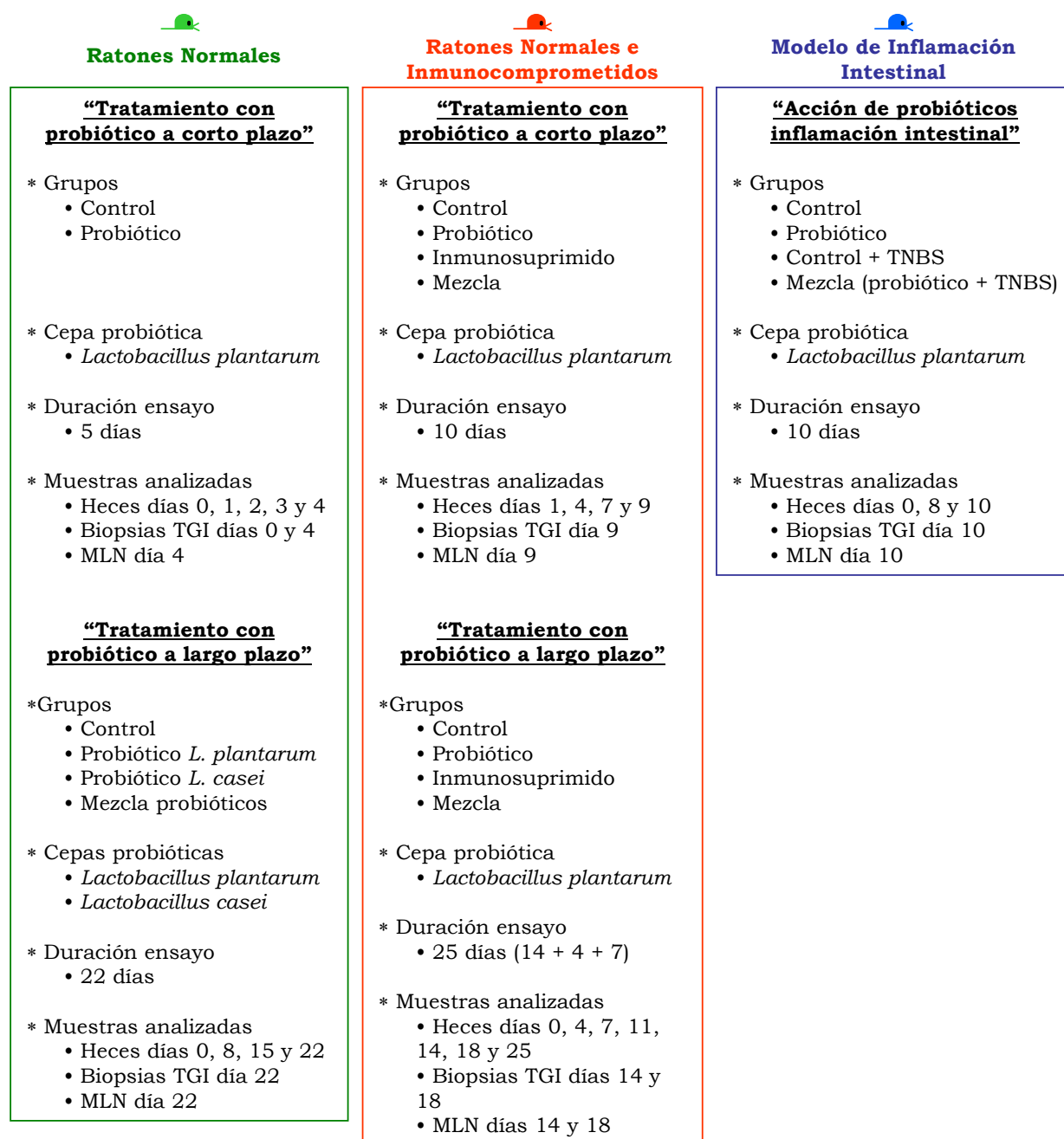


Fig. 23: Modelos animales utilizados en esta tesis.

C. TRATAMIENTO PROBIÓTICO A CORTO PLAZO EN RATONES NORMALES

Para el ensayo de la forma de administración del probiótico y de las distintas condiciones de análisis para la caracterización de la microbiota intestinal, se estudió el efecto de la administración diaria del aislado C4 caracterizado como *L. plantarum* sobre animales mantenidos en condiciones normales durante un periodo de 5 días según se muestra en el siguiente esquema:

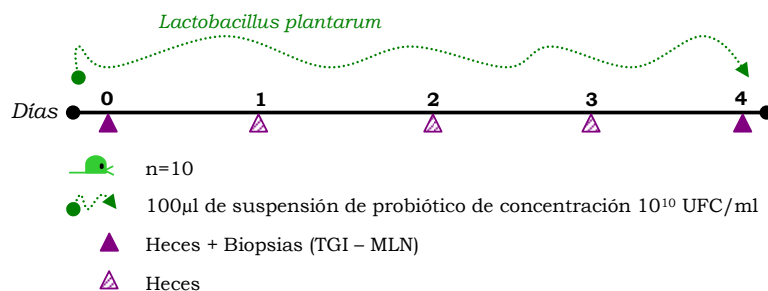


Fig. 24: Tratamiento a corto plazo en animales normales.

C.I. EXTRACCIÓN DE DNA

Con el fin de determinar las condiciones óptimas para la extracción de DNA de las distintas muestras, y aplicar las mismas condiciones en todos los estudios realizados posteriormente, ya que este es considerado uno de los pasos críticos en el análisis de muestras complejas (Zoetendal *et al.*, 2001), se realizó el estudio comparativo de distintas condiciones en el proceso de extracción de DNA de las muestras fecales obtenidas en este estudio. Para ello se dividieron las heces en dos partes iguales y se procedió a la extracción de DNA mediante el mismo sistema de agitación (“bead-beating”), con un tiempo de agitación (30”/máx. revolución) frente a 3 repeticiones de esta misma agitación con una pausa de 5’ en hielo entre cada una para evitar la degradación de los ácidos nucleicos por recalentamiento en el proceso de extracción. Mediante estas repeticiones en la extracción se favorece la ruptura de aquellos microorganismos de difícil lisis, entre ellos el microorganismo probiótico utilizado en este estudio.

Para la extracción de DNA a partir de biopsias del tracto gastrointestinal se tomó el intestino completo desde el estómago hasta el colon en condiciones estériles, eliminando la mayoría del contenido intestinal y se dividió según su anatomía. Para ello el intestino delgado se fraccionó en 3 partes iguales, eliminando los extremos de cada parte y denominando a la zona central de los fragmentos duodeno, yeyuno e íleon respectivamente. El ciego y colon en el intestino grueso son fácilmente distinguibles (fig. 25). La extracción de DNA de ganglios linfáticos, bazo e hígado se realizó bajo las mismas condiciones. Una vez extraído el DNA se procedió al análisis de las muestras mediante PCR-DGGE.

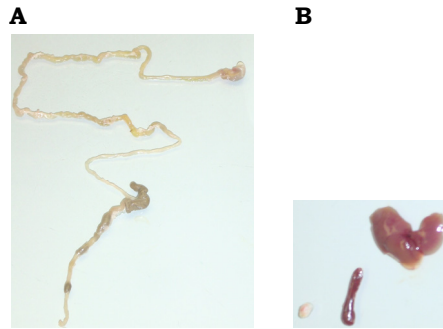


Fig. 25: A. Tracto gastrointestinal completo de ratón. **B.** Biopsias de ganglios linfáticos, bazo e hígado.

A partir del DNA obtenido de las biopsias de ganglios mesentéricos, bazo e hígado se realizó la reacción de PCR con cebadores específicos del género *Lactobacillus* (Walter *et al.*, 2000) para la determinación de una posible translocación bacteriana de la cepa probiótica administrada. No se obtuvo producto de amplificación en ninguna de las muestras analizadas.

C.II. DGGE

El DNA obtenido de las distintas condiciones de extracción de las muestras fecales, así como el obtenido a partir de las biopsias del tracto gastrointestinal completo se analizó mediante PCR-DGGE para la obtención de distintos perfiles según los cebadores utilizados en la reacción de PCR:

- * Perfil de la composición total de la microbiota fecal e intestinal mediante el uso de oligonucleótidos universales para la región V6-V8 del gen rRNA 16S.
- * Perfil de la población de lactobacilos mediante el uso de cebadores específicos de género.

Todos los geles se analizaron mediante el programa informático Bionumerics para su normalización y comparación de los distintos perfiles. En la figura 26 se muestra el análisis realizado a los geles obtenidos del estudio de las distintas condiciones de extracción de DNA de las muestras fecales, tanto para la microbiota fecal total (**A**) como específico de lactobacilos (**B**).

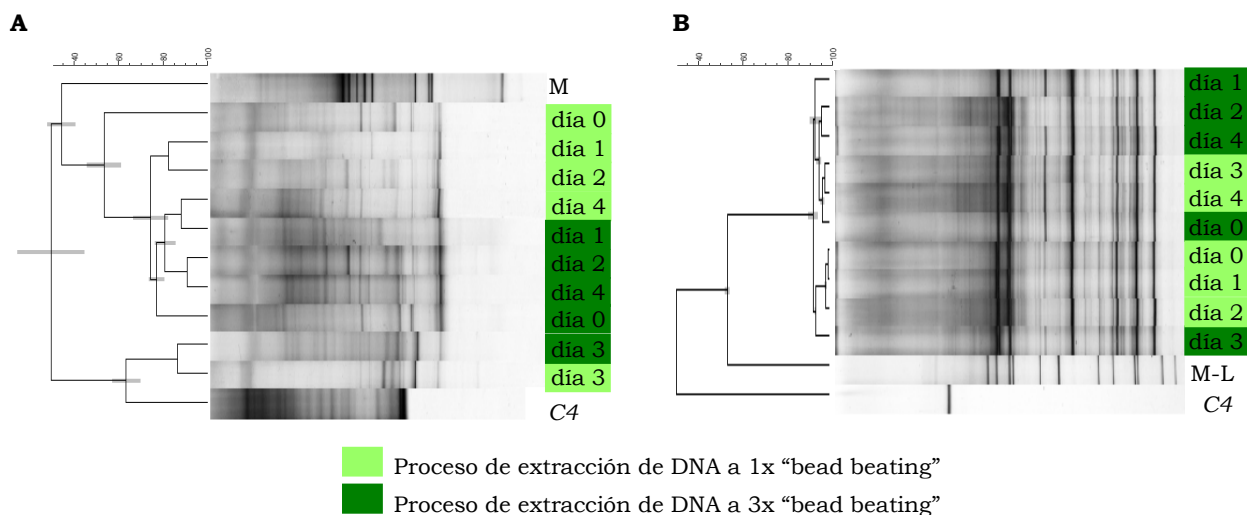


Fig. 26: **A.** DGGE de la región V6-V8 del gen rRNA 16S, gradiente 30-60%. **B.** DGGE específico del género *Lactobacillus*, gradiente 30-55%. M, M-L: marcadores de DGGE. C4: *L. plantarum*.

Según los resultados obtenidos no se observó gran diferencia entre los perfiles resultantes de un tiempo de agitación frente a las tres repeticiones, si bien en el perfil universal se observó mayor diversidad o número de bandas en aquellas muestras con mayor agitación. En el perfil obtenido para el género *Lactobacillus* sorprende la gran estabilidad y similitud entre las distintas muestras, de $89.41 \pm 2.87\%$. Al realizar los alineamientos por separado de las muestras sometidas a las distintas condiciones de extracción de DNA, la similitud entre los perfiles de las 3 repeticiones de agitación aumentó hasta un $91.07 \pm 1.67\%$ (dato no mostrado).

No se detectó la presencia de la cepa probiótica administrada en ninguno de los perfiles analizados, tanto general como específico de lactobacilos. Detectar la cepa probiótica en el perfil general por simple observación y asociación frente a la banda del aislado original sería muy inexacto debido a la gran diversidad que presentan estos perfiles. Además se debe considerar que los lactobacilos se encuentran presentes en heces en un bajo porcentaje con respecto a la microbiota fecal total. La ausencia de la cepa probiótica en los perfiles de DGGE específicos para el género *Lactobacillus* puede deberse a que su cantidad en heces sea inferior al límite de detección necesario para esta técnica, normalmente alrededor del 1%.

En la siguiente figura se muestra el análisis de los gels de DGGE realizados con el DNA de las biopsias del primer y último día del ensayo, tanto para la microbiota total intestinal como para la comunidad de lactobacilos respectivamente.

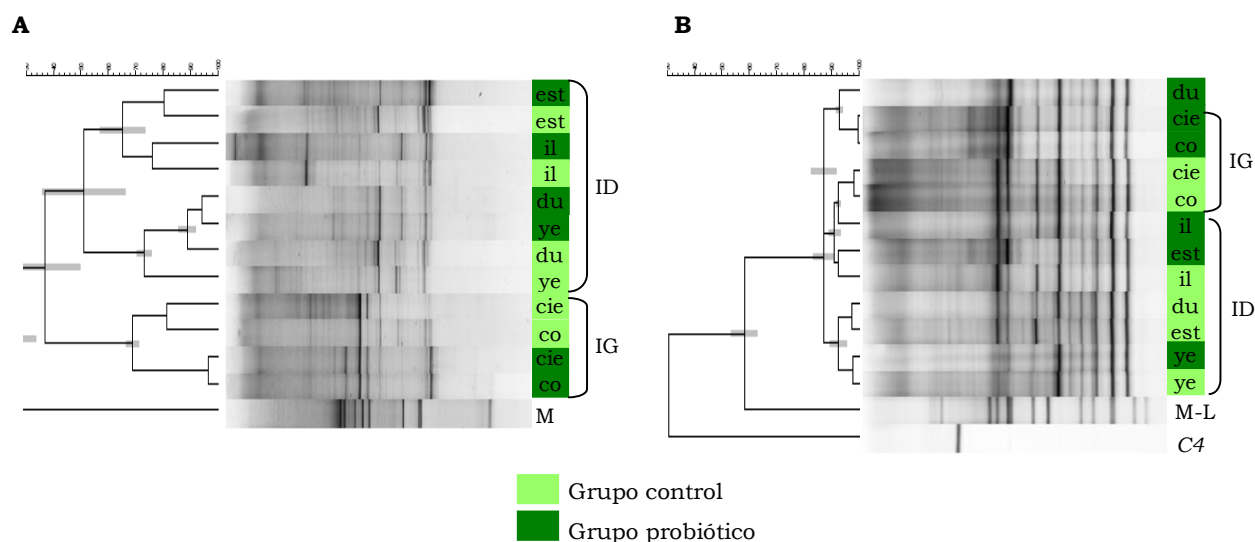


Fig. 27: **A.** DGGE región V6-V8 del gen rRNA 16S, gradiente 30-60%. **B.** DGGE específico del género *Lactobacillus*, gradiente 30-55%. Est: estómago; du: duodeno; ye: yeyuno; il: íleon; cie: ciego; co: colon. M y M-L: marcadores de DGGE. C4: *L. plantarum*. ID: Intestino delgado. IG: Intestino grueso.

En el análisis realizado sobre las muestras de biopsias del tracto gastrointestinal completo de animales del primer y último día del ensayo, no se distinguió diferencia entre los distintos grupos. En el perfil universal hay una clara agrupación de las muestras según la zona anatómica, diferenciándose los perfiles obtenidos de intestino delgado de aquellos procedentes del intestino grueso. Esto también ocurre en el perfil de lactobacilos, aunque la similitud entre las muestras, al igual que en heces es muy elevada, del $80,17 \pm 2,87\%$. La cepa probiótica de *L. plantarum* tampoco se detectó en biopsias, lo cual podría indicar ausencia de colonización por parte de este microorganismo en intestino o al menos la colonización no ha superado el límite de detección, posiblemente debido al corto tiempo de administración del probiótico.

Para posteriores estudios se seleccionó el método de extracción con mayor número de agitaciones, para conseguir con ello la mayor diversidad posible en la identificación de las muestras.

C.III. CLONES DE LACTOBACILOS

Con el fin de identificar las especies o bandas mayoritarias presentes en el perfil obtenido en los geles de DGGE para el género *Lactobacillus*, se procedió al clonaje y caracterización de los productos de PCR específica de lactobacilos de tamaño aproximado de 355pb (Heilig *et al.*, 2002) obtenidos de muestras de heces del día 0 y de biopsias de yeyuno también en el día 0, al considerarse estos perfiles los más completos y por lo tanto los más interesantes para su análisis. Si bien no se consiguió la creación de una librería completa para la identificación de todas las bandas presentes en los perfiles originales, se

obtuvieron la mayoría de las bandas dominantes así como algunas bandas de menor intensidad en las muestras iniciales.

Los clones obtenidos de ambos productos de PCR se caracterizaron mediante análisis de restricción o RFLP con las enzimas *MspI*, *CfoI* y *AluI* para su agrupación según los perfiles obtenidos. Se seleccionaron dos clones de cada grupo de restricción para su identificación mediante DGGE frente al perfil de la muestra original. Finalmente se seleccionaron las bandas principales para su secuenciación (fig. 28). Los resultados obtenidos de secuenciación se muestran en la tabla 12:

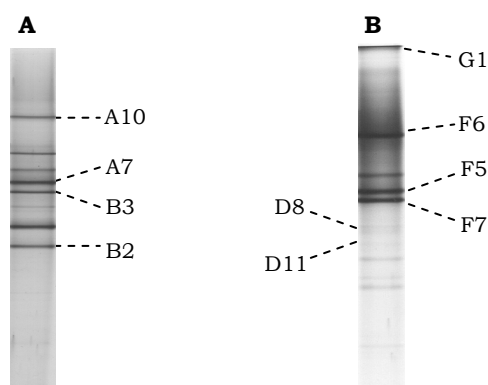


Fig. 28: Perfiles de DGGE específico de lactobacilos del grupo control. **A.** Heces día 0. **B.** Biopsia de yeyuno.

Tabla 12: Resultados de secuenciación.

Clon	Origen	Especie más próxima	"Identities"	"Gaps"	% Similitud	Nº clones
A7	Heces	<i>Uncultured bacterium</i>	294/304	1/304	96	10
		<i>Lactobacillus murinus</i>	294/305	2/305	96	
A10		<i>Lactobacillus murinus</i>	302/314	1/314	96	6
B2		<i>Lactobacillus intestinalis</i>	384/391	1/391	98	2
B3		<i>Lactobacillus reuteri</i>	380/389	1/389	97	2
A6*		<i>Lactobacillus reuteri</i>	350/357	1/357	98	7
D8	ID - ye	<i>Uncultured bacterium</i>	369/390	4/390	94	8
		<i>Lactobacillus gasseri</i>	368/390	4/390	94	
D11		<i>Uncultured bacterium</i>	379/384	1/384	98	11
		<i>Lactobacillus murinus</i>	379/385	2/385	98	
F5		<i>Uncultured bacterium</i>	385/389	1/389	98	14
		<i>Lactobacillus murinus</i>	385/390	2/390	98	
F6		<i>Lactobacillus reuteri</i>	377/391	1/391	96	10
F7		<i>Uncultured bacterium</i>	382/391	1/391	97	8
		<i>Lactobacillus reuteri</i>	380/390	1/390	97	
G1		<i>Lactobacillus reuteri</i>	368/391	1/391	94	1

*Esta banda no se muestra en la figura.

En la siguiente figura se muestra un gráfico de distribución de las especies presentes en los distintos entornos según la información obtenida mediante secuenciación.

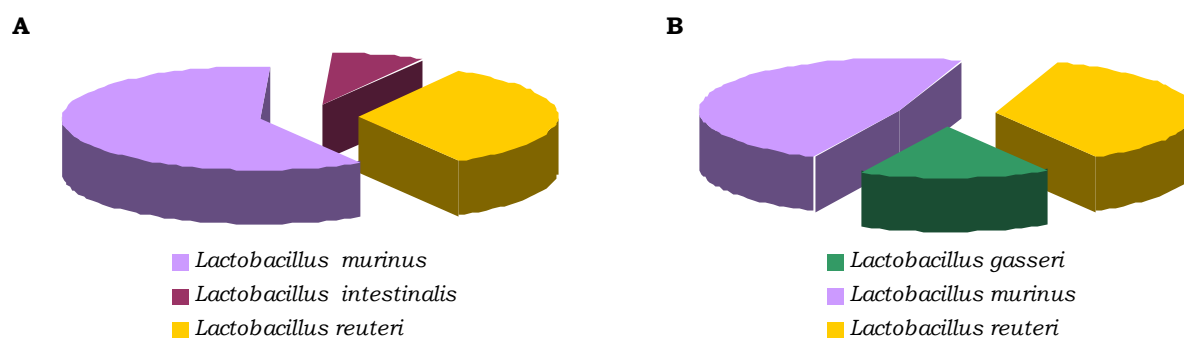


Fig. 29: Distribución de clones según su origen. **A.** Heces día 0. **B.** Biopsia de yeyuno.

Si bien los productos de PCR son de un tamaño reducido (355pb) lo cual limita su identificación por secuenciación, se observó baja diversidad de las especies presentes en ambas muestras. La distribución resultó muy similar independientemente del origen del producto de PCR (fecal o intestinal), con amplia presencia de *L. murinus* y *L. reuteri* en ambos casos. Esto confirmó los resultados obtenidos en el análisis de los perfiles de DGGE específicos de lactobacilos, con una similitud entre muestras superiores al 85-90%. Aunque existen ciertas diferencias entre las especies presentes en ambas muestras (*L. intestinalis* en heces y *L. gasseri* en biopsia de yeyuno), sería necesario la creación de una librería de clones más completa con el fin de identificar y comparar las diferencias entre las especies presentes en ambos entornos.

C.IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

C.IV.1. Heces

Se utilizó el análisis de redundancia o RDA para estudiar el efecto de las distintas condiciones de agitación durante el proceso de extracción de DNA de heces (1x y 3x) y los tiempos de toma de muestra (días 1, 2, 3 y 4) sobre los perfiles de DGGE obtenidos para la microbiota fecal total (*T:*) y específica de lactobacilos (*L:*). Los valores de los ejes indican el porcentaje de variables que pueden explicarse mediante este esquema. Sólo se muestran aquellas bandas de DGGE con mayor significancia.

Según los resultados obtenidos se determinó que, aunque ninguna de las variables ambientales contribuyó de manera significativa en la variabilidad de los perfiles, se pudo observar agrupación por las condiciones de extracción de DNA.

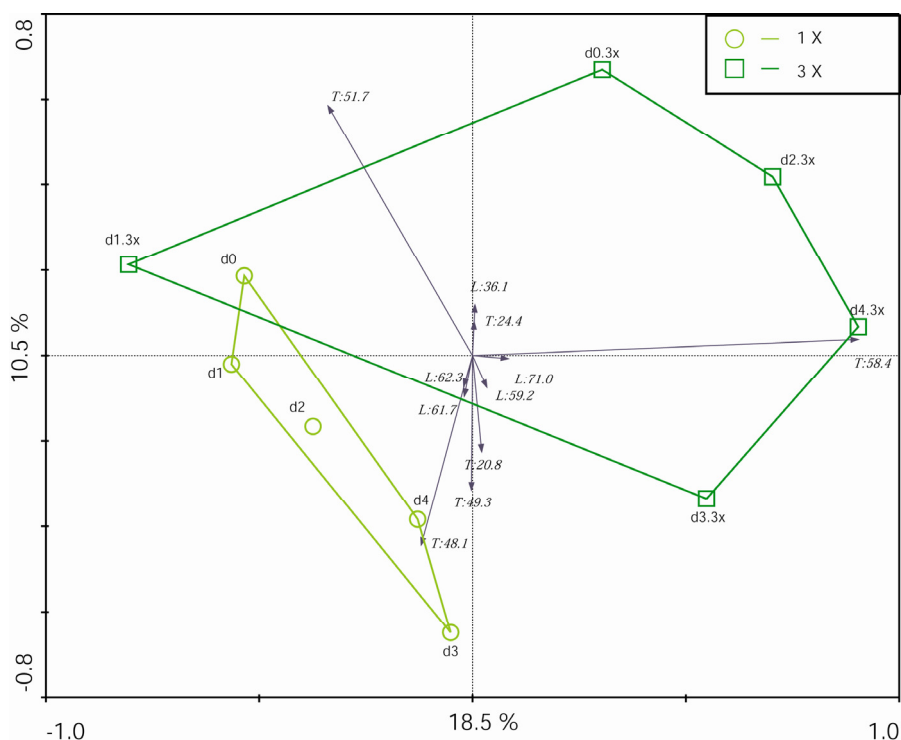


Fig. 30: Esquema de ordenación de los resultados obtenidos del análisis de muestras fecales.

C.IV.2. Biopsias

Se realizó el esquema de ordenación de la microbiota gastrointestinal a lo largo del tubo digestivo (estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon) a distintos periodos de tiempo, día 0 (ratón 2) y día 4 (ratón 10). El esquema se generó mediante el análisis RDA con la intensidad de banda relativa de los perfiles de DGGE de la comunidad total (*T:*) y específicos para el género *Lactobacillus* (*L:*). Los valores de los ejes indican el porcentaje de variables que pueden explicarse mediante este esquema. Sólo se muestran aquellas bandas de DGGE con mayor significado.

Sólo las muestras de estómago, duodeno e íleon contribuyeron de manera significativa a la variabilidad de los perfiles de la microbiota intestinal, con agrupación de estas muestras separada frente al resto. Tampoco se observó efecto del tiempo de toma de muestra sobre los resultados.

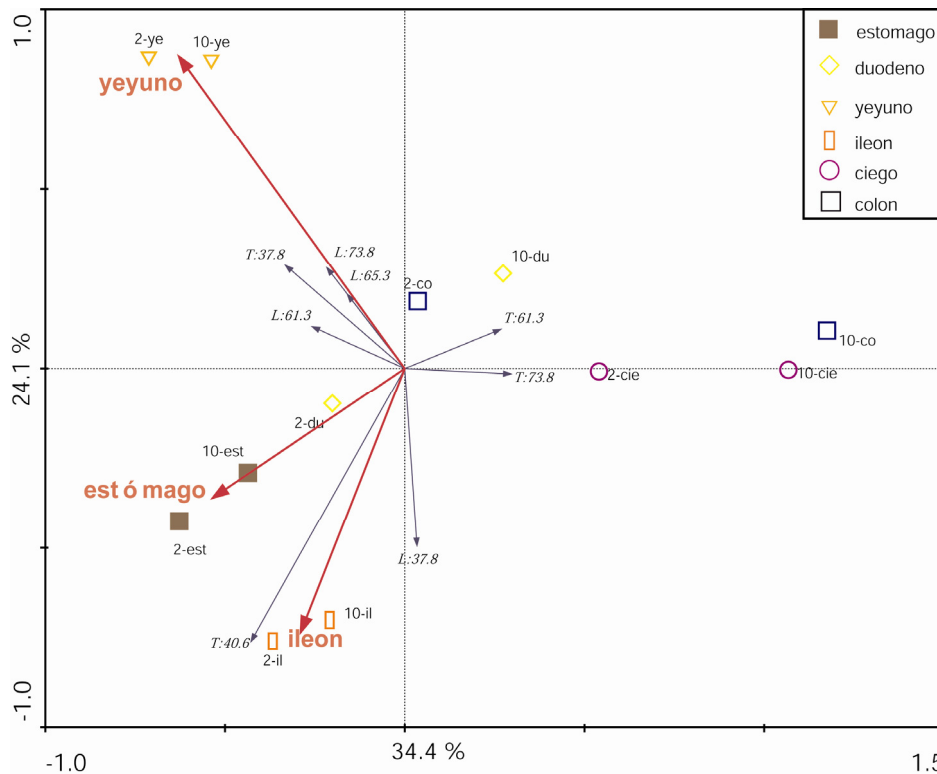


Fig. 31: Esquema de ordenación de los resultados obtenidos del análisis de biopsias intestinales.

D. TRATAMIENTO PROBIÓTICO A LARGO PLAZO EN RATONES NORMALES

A partir de los resultados obtenidos del ensayo anterior, establecidas las condiciones para la realización de las distintas técnicas para el estudio de la microbiota gastrointestinal de ratones, se decidió realizar un ensayo más extenso sobre el efecto de la administración a largo plazo de microorganismos probióticos. Para ello se procedió a la administración diaria de las cepas probióticas aisladas C1 y C4, caracterizadas como *L. casei* y *L. plantarum*, así como de una mezcla de ambas sobre animales mantenidos en condiciones normales durante un periodo de 22 días según se muestra en la siguiente figura:

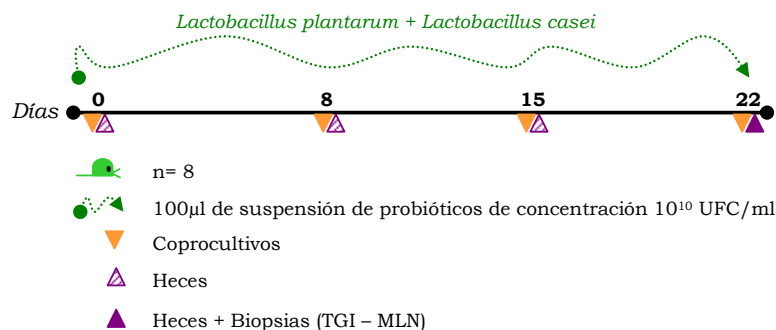


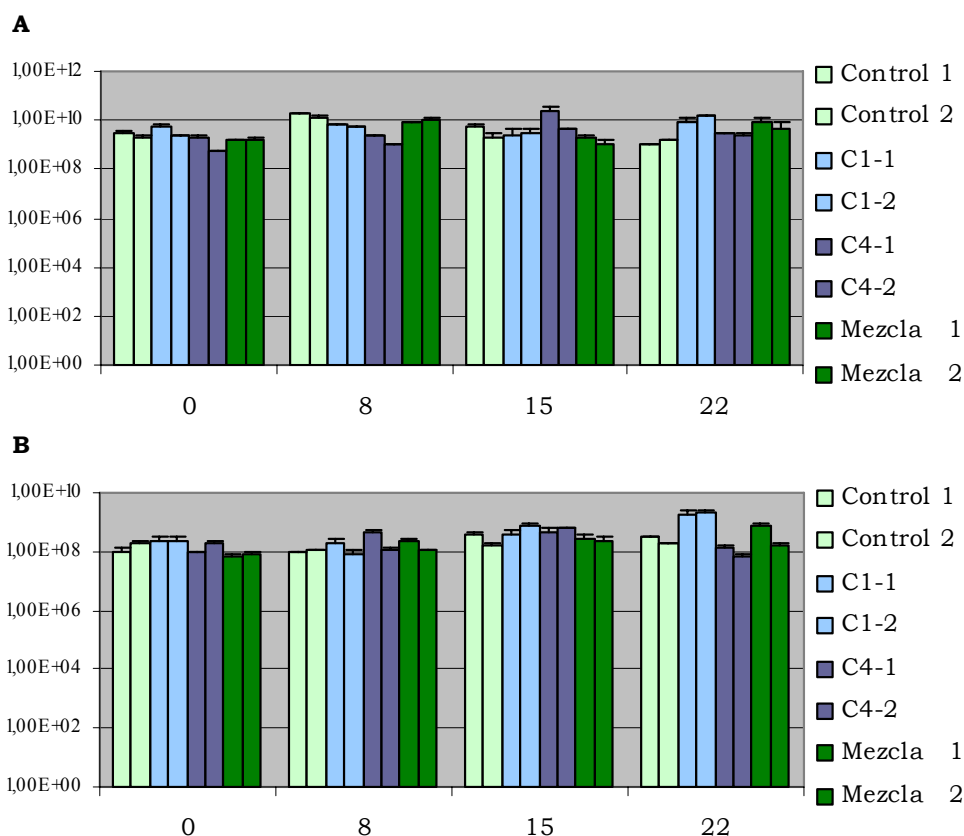
Fig. 32: Tratamiento a largo plazo en animales normales.

Se realizó la reacción de PCR con cebadores específicos del género *Lactobacillus* sobre el DNA obtenido de las biopsias de ganglios mesentéricos, para la determinación de una posible translocación bacteriana de las cepas probióticas administradas a través de la pared intestinal. No se obtuvo producto de amplificación específico en ninguna de las muestras analizadas.

D.I. COPROCULTIVOS

Para la caracterización de la microbiota fecal mediante técnicas tradicionales de coprocultivo se tomaron muestras de heces individualmente de dos ratones marcados por grupo en los días 0, 8, 15 y 22. Se realizaron diluciones seriadas de las heces en tampón PBS+Cys hasta la dilución 10^{-10} , y se cultivaron 10 microlitros de cada dilución en 7 medios selectivos para los principales microorganismos presentes en heces. Las siembras se realizaron por triplicado en cada medio e individualmente para cada ratón.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 33, donde se representan las UFC por gramo de heces. En cada medio de cultivo ensayado se observó la evolución de cada animal (2 animales por grupo) a lo largo de los días de administración del probiótico. Los grupos analizados son animales control, C1 los que recibieron la dosis de *L. casei*, C4 ratones que recibieron *L. plantarum* y mezcla animales a los que se les administraron ambas cepas.



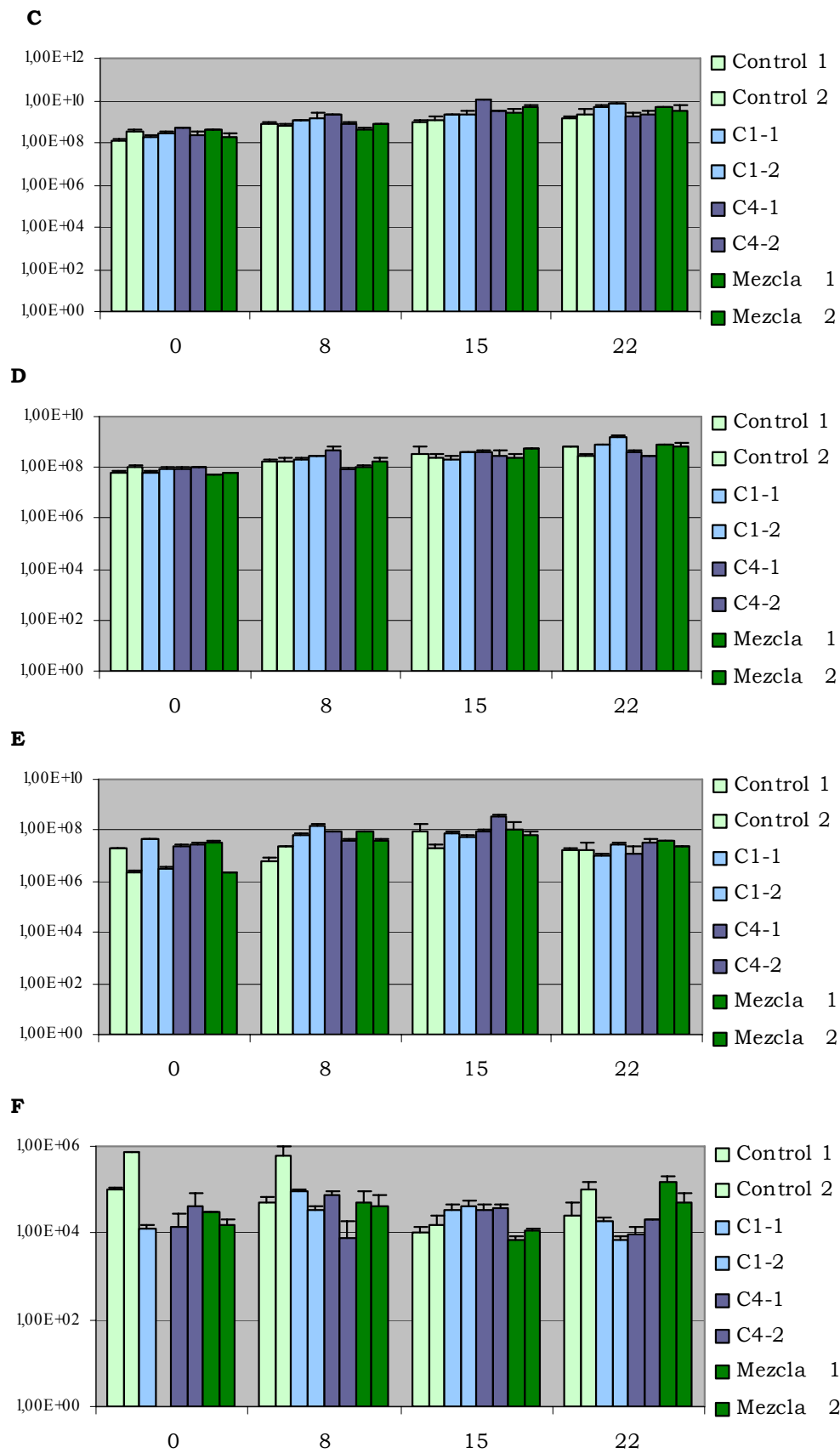


Fig. 33: Coprocultivos para los principales grupos de microorganismos presentes en heces. **A.** Anaerobios totales. **B.** Aerobios y anaerobios facultativos. **C.** Lactobacilos. **D.** Bifidobacterias. **E.** Enterobacterias. **F.** Levaduras.

Sólo se obtuvo crecimiento en el medio de clostridios (Clostridium Reforzado) en el día 15 para el grupo control, valores entre 10^3 y 10^4 UFC/g heces.

Según los resultados obtenidos se observó que existe una gran estabilidad en la composición de la microbiota fecal de cada individuo, estabilidad que se mantuvo a lo largo del tratamiento probiótico. Es decir, la administración de microorganismos probióticos exógenos, bien aislados o su mezcla, no alteran de manera drástica la composición de la microbiota fecal.

El último día se observó un ligero aumento en los recuentos de microorganismos aerobios totales tanto en el grupo que recibió la cepa de *L. casei* como en el grupo mezcla, algo menor en este último. Los niveles se mantienen en medias de 10^8 UFC/g heces en los grupos control y los animales que recibieron *L. plantarum* frente a 10^9 UFC/g heces de los otros.

Una vez finalizado el tratamiento se observó un ligero ascenso en el recuento de bífidobacterias y lactobacilos en los cuatro grupos pasando de 10^8 UFC/g heces al inicio del ensayo, a 10^9 UFC/g heces en el último día para las bífidobacterias y a 10^{10} UFC/g heces para los lactobacilos. No se observaron mayores diferencias en los distintos medios ensayados frente al grupo control, siendo la media aproximadamente de 10^{10} UFC/g heces para los microorganismos anaerobios totales, y 10^8 UFC/g heces para los aerobios totales. Las levaduras están presentes en el orden de 10^{4-5} , siendo este grupo de mayor variabilidad en sus recuentos.

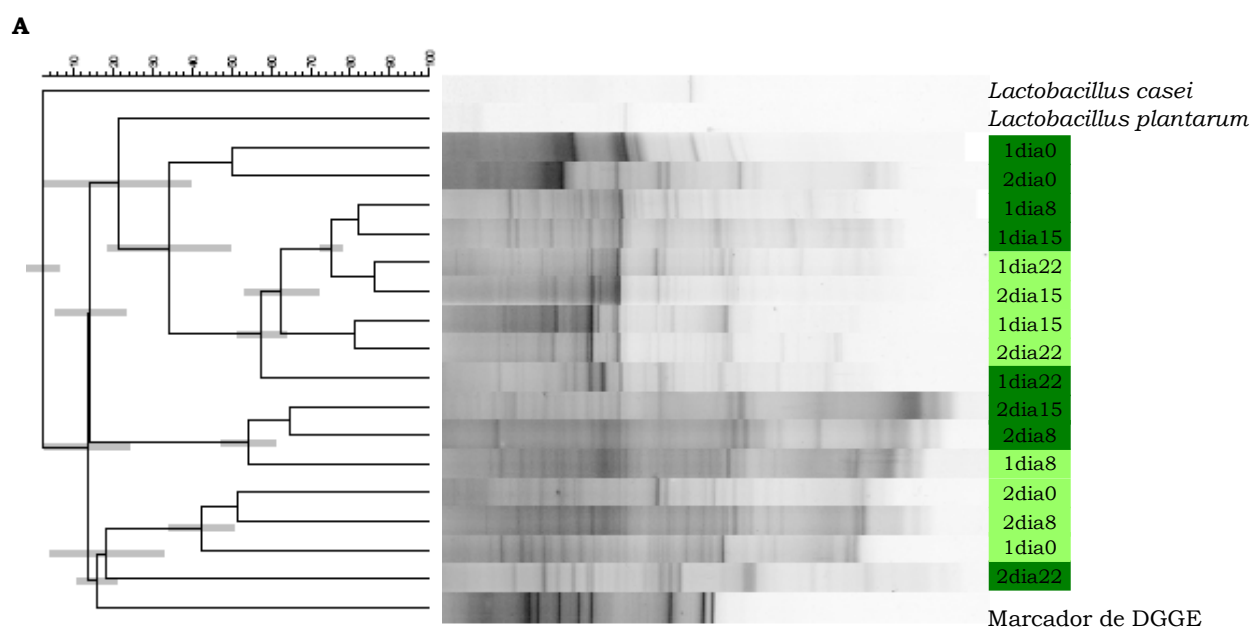
D.II. DGGE

Para completar el análisis de la microbiota fecal debido a que un gran porcentaje de las especies presentes en heces no se pueden cultivar en los medios descritos en la actualidad, las muestras de heces de los días 0, 8, 15 y 22 de los mismos ratones marcados de los grupos control y mezcla se analizaron mediante PCR-DGGE para la obtención tanto del perfil de la composición total de la microbiota intestinal, como específica para los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, para estudiar la influencia del tratamiento probiótico sobre estos géneros. Los geles se normalizaron y analizaron mediante el programa Bionumerics y se realizó su análisis estadístico mediante Canoco según descrito en materiales y métodos.

Los perfiles obtenidos en el análisis de las muestras de heces para la microbiota fecal total (fig. 34, **A**), mostraron una gran diversidad de especies presentes en las mismas, independientemente del día de toma de muestra o del

grupo de procedencia. Las muestras con mayor similitud entre ellas (superior al 80%) fueron los días 15 y 22 del grupo control, que también presentaron similitud con los días 8 y 15 del grupo probiótico, siendo ésta menor en el ratón 2, de aproximadamente de un 65%.

En el análisis de los perfiles obtenidos de DGGE específico de lactobacilos a partir de heces (fig. 34, **B**), se observó una clara separación entre los grupos control y mezcla. En el análisis de las muestras por separado de cada grupo (dato no mostrado) existe una similitud del $92.64 \pm 2,16\%$ entre los perfiles obtenidos del grupo control frente a un $84.05 \pm 5.31\%$ del grupo probiótico. Esta menor similitud entre perfiles puede deberse a una mayor diversidad de las especies presentes en el grupo mezcla frente al control. El perfil de lactobacilos es estable no sólo a lo largo del tratamiento sino comparado entre distintos ratones, obteniendo valores de similitud entre los ratones 1 y 2 del grupo testigo en el día 15 del 95%. Se detectó la presencia de las cepas probióticas administradas en todos los días del grupo probiótico, más visible para el caso de *L. plantarum*. Así mismo se identificaron bandas de mayor intensidad, posiblemente de especies presentes en mayor número en el grupo al que se le administró la mezcla de probióticos (recuadro amarillo). Según estudios de secuenciación estas bandas pertenecen mayoritariamente a las especies de *Lactobacillus helveticus*, *L. johnsonii* y *L. gasseri* (resultados de secuenciación Tabla 13).



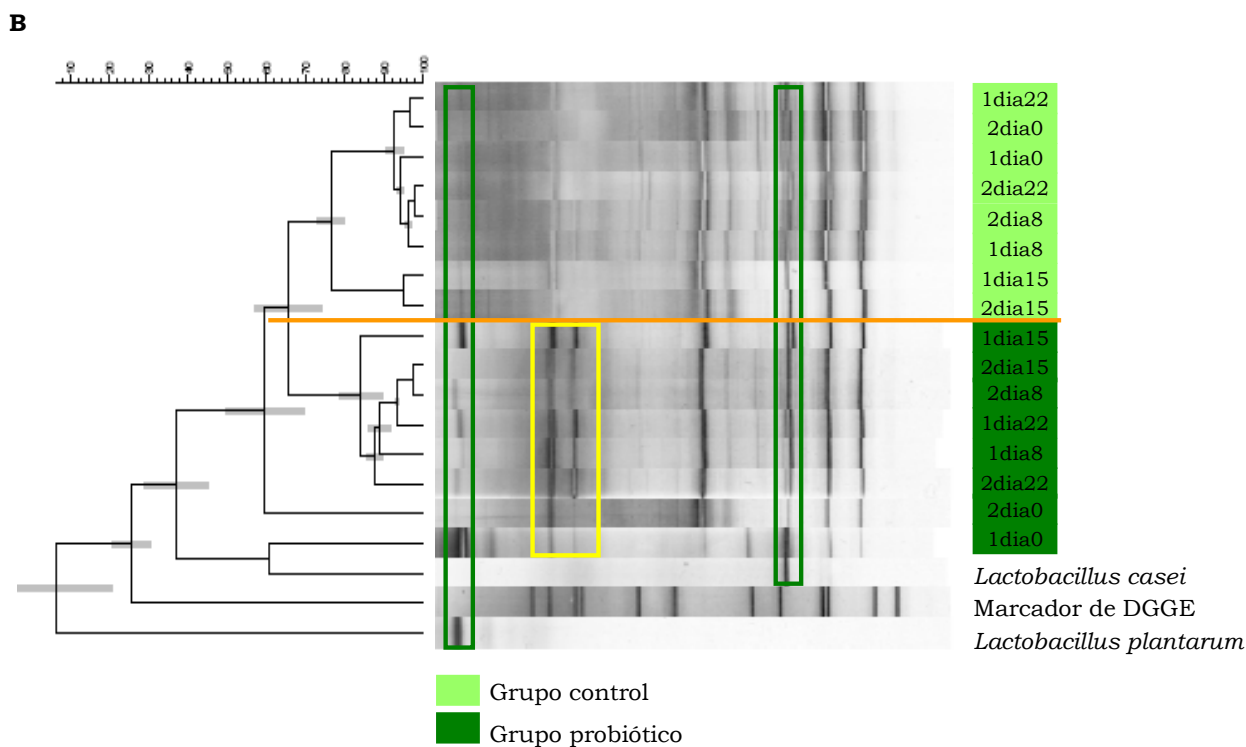


Fig. 34: DGGE de muestras fecales. **A.** Microbiota total, gradiente 30-60%. **B.** Especifico de lactobacilos, gradiente 30-55%.

En el estudio de la microbiota total en biopsias del tracto gastrointestinal completo (fig. 35, **A**), si bien la diversidad sigue siendo muy elevada y por tanto la similitud entre las distintas muestras muy baja, existe cierta agrupación entre animales de las muestras obtenidas de los grupos control y probiótico.

La separación entre grupos control y probiótico se volvió a observar mejor en el caso del perfil específico para el género *Lactobacillus* (fig. 35, **B**), donde se detectó de nuevo la presencia de las cepas probióticas administradas aunque con menor intensidad que en las muestras fecales. Esto podría deberse a que su colonización sea menor a su expulsión en heces. La similitud obtenida entre las muestras del grupo control es del $91.60 \pm 2.50\%$, volviendo a disminuir este índice entre muestras del grupo probiótico a $88.47 \pm 3.29\%$, posiblemente por un aumento de la diversidad en los perfiles. También se observó en las biopsias del grupo probiótico mayor intensidad de determinadas bandas (recuadro amarillo), especialmente aquella perteneciente a la especie de *L. helveticus* según se identificó en los estudios de secuenciación (resultados de secuenciación Tabla 13).

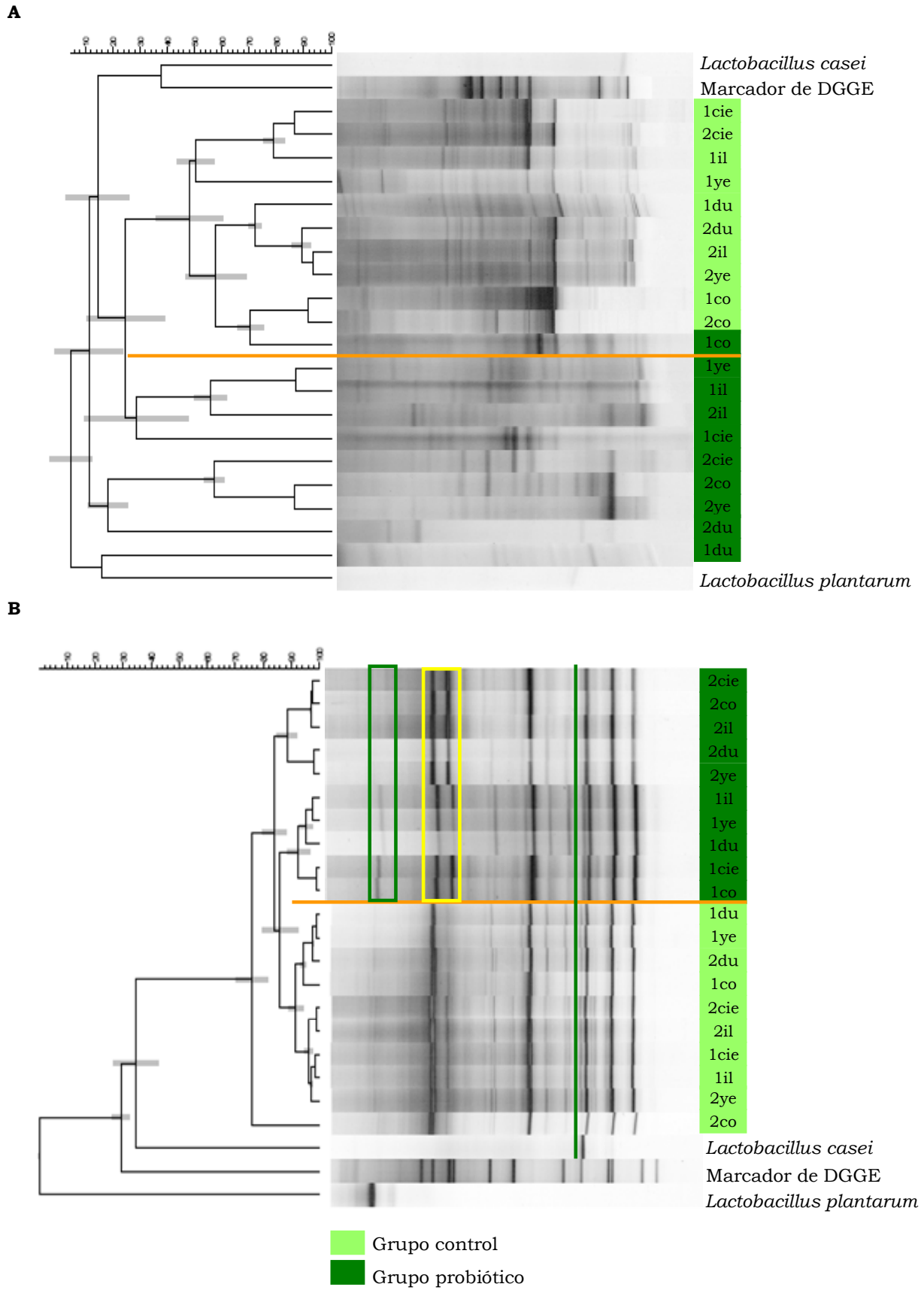


Fig. 35: DGGE de biopsias del tracto gastrointestinal. **A.** Microbiota total, gradiente 30-60%. **B.** Específico de lactobacilos, gradiente 30-55%. Du: duodeno; ye: yeyuno; il: íleon; cie: ciego; co: colon.

En los gels realizados mediante PCR específica para el género *Bifidobacterium*, se observó la presencia de una única banda en todas las muestras analizadas, tanto heces como en biopsias (fig. 36), de mayor intensidad en las muestras fecales de los últimos días de tratamiento para el grupo probiótico. En el análisis de las muestras de biopsias intestinales no se consiguió obtener producto de PCR para las muestras de duodeno y yeyuno en el grupo control, aunque sólo resultó negativa la muestra de duodeno en el grupo probiótico, lo que indica una posible expansión de bífidobacterias durante el tratamiento probiótico a zonas del intestino delgado en las que no se encuentran en condiciones normales. En muestras de colon en el grupo control, aunque su diversidad sigue siendo baja, se observó la presencia de otras bandas (recuadro naranja). Mediante el estudio de los perfiles de bífidobacterias se determinó que si bien es un grupo que se encuentra en heces en número elevado según los recuentos obtenidos en los coprocultivos, la diversidad de especies presente es muy baja. Esto también puede deberse a una pérdida de diversidad por dificultad en la lisis de estas bacterias en el proceso de extracción de DNA.

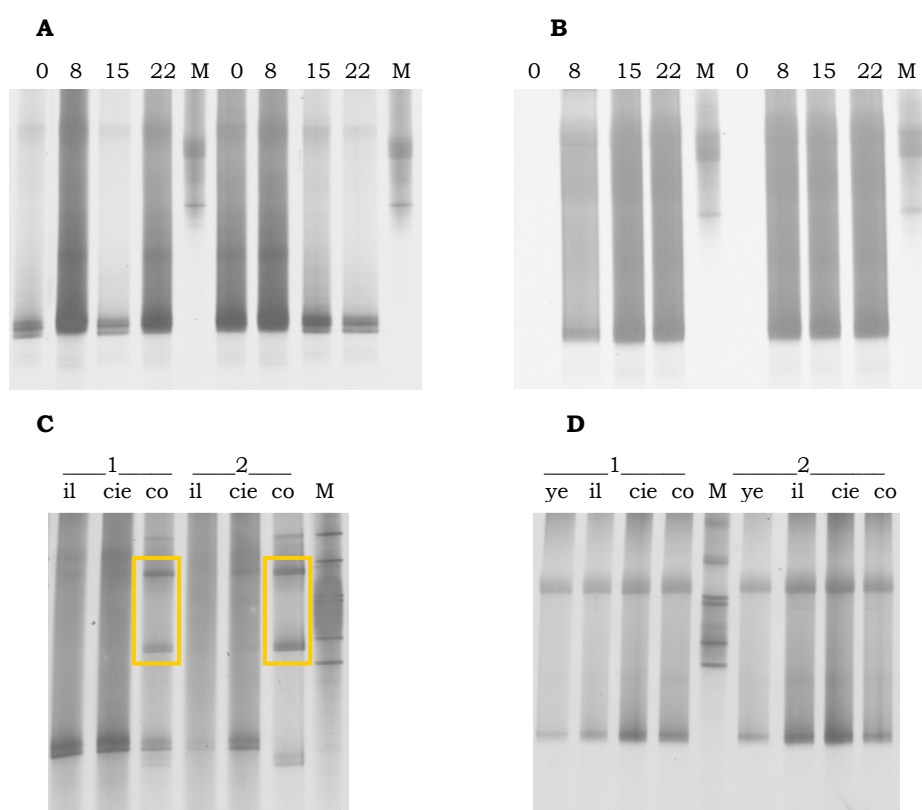


Fig. 36: DGGE específico del género *Bifidobacterium*, gradiente 45-55%. **A.** Heces del grupo testigo. **B.** Heces del grupo mezcla. **C.** Biopsias del grupo testigo. **D.** Biopsias del grupo mezcla. M: marcador de DGGE. Ye: yeyuno; il: íleon; cie: ciego; co: colon.

Se realizó el estudio del perfil de bífidobacterias mediante clonaje y secuenciación del producto de PCR de la muestra de ciego del animal 1 del

grupo mezcla. De los 48 clones seleccionados se analizaron 10 en gel de DGGE frente al perfil original, coincidiendo todos los clones con la banda principal. Según los resultados obtenidos de la secuenciación de 4 de esos clones, la banda predominante presente en muestras tanto fecales como intestinales corresponde a *Bifidobacterium pseudolongum* con un índice de similitud del 99%. Las bandas presentes en colon del grupo testigo no pudieron caracterizarse mediante secuenciación.

En la actualidad existe publicada una librería de clones del gen rRNA 16S de la microbiota intestinal de ratón (Salzman *et al.*, 2002), y si bien caracterizan un grupo nuevo de bacterias a las cuales denominan MIB (“Mouse intestinal bacteria”) no existe ningún clon perteneciente al género *Bifidobacterium*. Esto puede deberse a que la librería descrita sea incompleta, ya que según se observó mediante coprocultivos este grupo es muy abundante al menos en heces, aunque de baja diversidad.

A partir de estos análisis podemos determinar que si bien cuantitativamente la microbiota intestinal no se ve afectada, según los recuentos realizados en los coprocultivos, si existe cierto cambio cualitativo, determinado por la agrupación de las muestras pertenecientes a los distintos grupos ensayados. Además, la aparición de nuevas bandas en el perfil de lactobacilos puede asociarse al incremento en el recuento de este grupo. Para una identificación mas completa de las especies presentes en los perfiles específicos del género *Lactobacillus*, se realizó la identificación de las bandas principales mediante la construcción de una librería de clones de una muestra de cada grupo, seleccionando aquellas que presentaron una mayor diversidad.

D.III. T-RFLP

Con el fin de completar y comparar los resultados obtenidos de los análisis realizados mediante coprocultivos y DGGE para la caracterización de la microbiota fecal, se realizó el análisis por T-RFLP de las muestras utilizadas para DGGE, es decir, heces de ratones del grupo control y mezcla de los días 0, 8, 15 y 22. Mediante esta técnica se obtiene un perfil de la composición total de la microbiota fecal según el tamaño del fragmento de restricción detectado, así como un análisis cuantitativo de los mismos. Cada tamaño de fragmento se puede comparar con bases de datos para asignar la especie o grupo bacteriano que lo produce, si bien estas bases de datos son muy complejas ya que cada fragmento resulta en numerosas posibles especies, por lo que para asociar una especie concreta a un solo fragmento sería necesario realizar una librería de clones para su secuenciación e identificación correcta.

Con el fin de simplificar las gráficas obtenidas de este ensayo, sólo se muestran aquellas especies o fragmentos cuya presencia sea >5% con respecto al total de las especies presentes en heces. Los fragmentos restantes presentes en cantidades <5% se representan en un mismo grupo. Cada fragmento representado en las gráficas corresponde al tamaño que se indica ± 1 ó 2pb, margen de error para esta técnica.

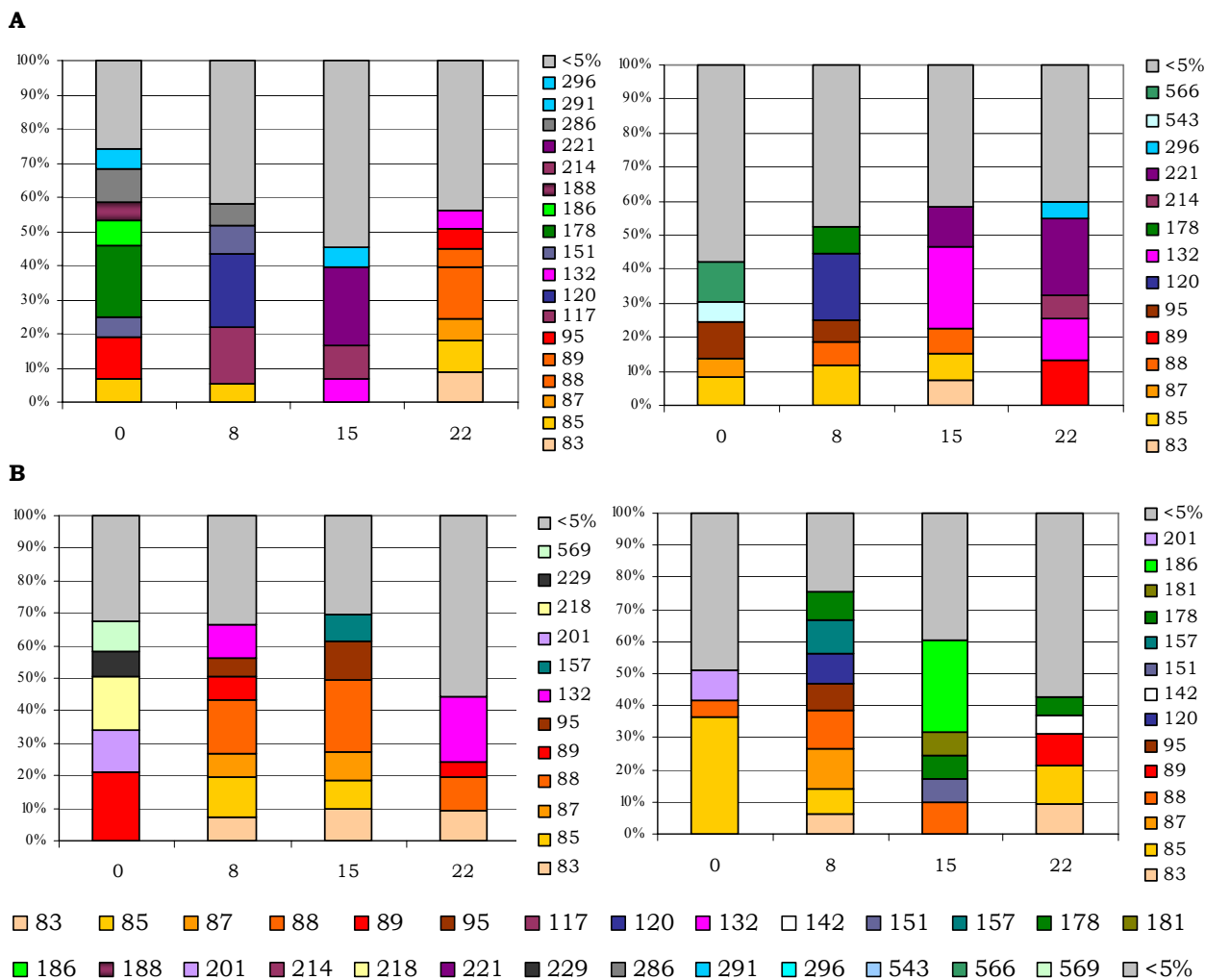
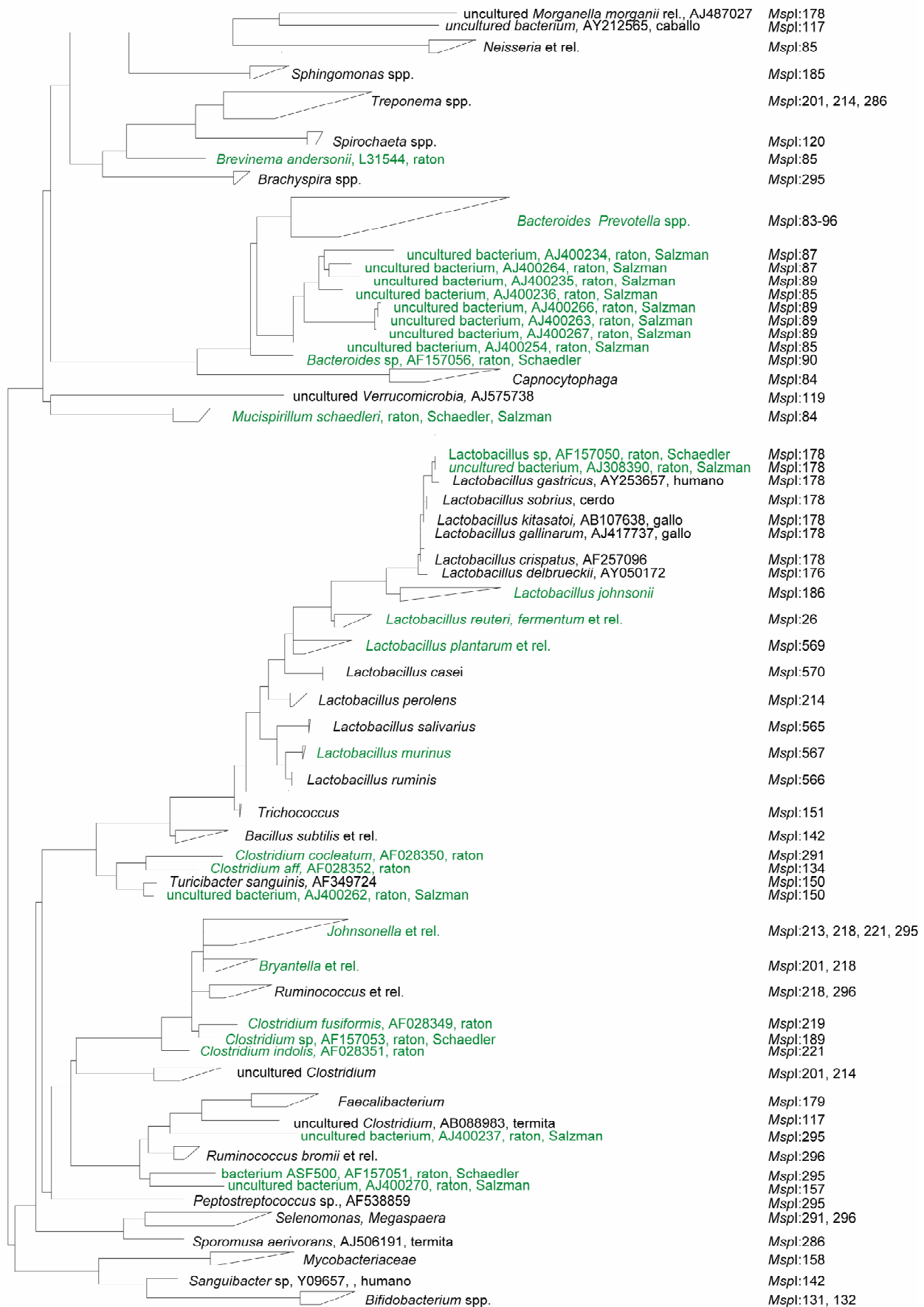


Fig. 37: Perfiles de T-RFLP para el estudio de la microbiota gastrointestinal total de muestras de heces. **A.** Grupo control, animales 1 y 2. **B.** Grupo mezcla, animales 1 y 2.

En los perfiles obtenidos del análisis de las muestras fecales por T-RFLP se observó una gran variabilidad de fragmentos, con abundante presencia de especies del grupo *Bacteroides* (tonos naranja-rojo, fragmentos 83-96) en todas las muestras, también descritas en la librería de clones publicada por Salzman y col. (Salzman *et al.*, 2002). En tonos verdes se muestran aquellos fragmentos posiblemente pertenecientes a especies del género *Lactobacillus*, con especial abundancia de *L. johnsonii* (fragmento 186). Las bífidobacterias (fragmento 132) se muestran en tono rosa, presentes también en gran parte de las muestras analizadas, sin encontrarse clones de éstas en la librería publicada

por Salzman y col. En tonalidades moradas se muestran las especies del género *Clostridium*, más abundantes en el grupo control y el día 0 del grupo mezcla desapareciendo en días posteriores en este grupo. También se obtuvieron fragmentos relacionados con el género *Ruminococcus*. Para una visión más concreta de los grupos filogenéticos representados, se construyó un árbol filogenético con todos los fragmentos obtenidos de las muestras analizadas mediante esta técnica. En verde se muestran aquellas especies previamente descritas en el tracto gastrointestinal de ratones (Orcutt *et al.*, 1987; Dewhirst *et al.*, 1999; Salzman *et al.*, 2002). También se indican aquellas secuencias que corresponden con especies descritas en humano, caballo, cerdo, termita o gallo.



0.10

Fig. 38: Árbol filogenético de los fragmentos obtenidos por T-TFLP

Se consideró realizar el estudio mediante T-RFLP específica para el género *Lactobacillus* presente en estas muestras mediante el cebador universal 27-F y el específico de lactobacilos 679-R tal y como se describe en bibliografía (Jernberg *et al.*, 2005). Para confirmar realmente la especificidad de esta pareja de cebadores se realizó una librería de clones (siguiente apartado) de dos productos de PCR obtenidos a partir de los mismos. De los clones obtenidos sólo un bajo porcentaje resultó positivo posteriormente en la reacción de PCR con ambos cebadores específicos para el género *Lactobacillus* (entre 40-60% de clones positivos para la reacción específica de lactobacilos). Debido a estos falsos positivos obtenidos en la primera reacción no se utilizó esta pareja de cebadores para el estudio del grupo de los lactobacilos presentes en las muestras por T-RFLP.

D.IV. CLONES DE LACTOBACILOS

Para identificar las especies pertenecientes al género *Lactobacillus* presentes en heces se procedió a la elaboración de una librería de clones. Con este fin se seleccionaron las muestras de heces del grupo control del día 8 y del grupo mezcla del día 15, al presentar éstas la mayor diversidad en sus perfiles de DGGE. Para la construcción de la librería se realizó la amplificación del gen rRNA 16S de las muestras mediante el uso del cebador universal 27-F y el cebador específico de lactobacilos 679-R (Walter *et al.*, 2001). Estos productos de PCR se purificaron y clonaron en el vector comercial “pGEM®-T easy vector” (Promega). Se seleccionaron un total de 94 clones positivos. Al ser uno de los cebadores utilizados universal, se realizó la amplificación mediante los cebadores específicos 352-F y 679-R para la selección únicamente de aquellos clones pertenecientes al género *Lactobacillus*. A los clones identificados como positivos para este género (41.4% para la muestra control y 61.1% para la muestra mezcla) se identificaron en geles de DGGE frente a los perfiles de las muestras originales. Finalmente se identificaron mediante secuenciación.

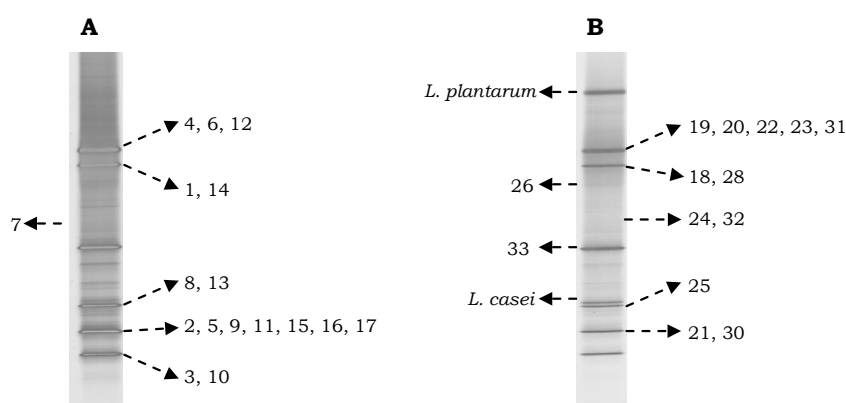


Fig. 39: Perfiles de DGGE específico de lactobacilos de muestras de heces. **A.** Grupo control día 8. **B.** Grupo mezcla día 15.

Tabla 13: Resultados de secuenciación.

Clon	Origen	Especie más próxima	"Identities"	"Gaps"	% Similitud	Nº clones
1	Control	<i>Lactobacillus helveticus</i>	349/349	0/349	100	2
	Día 8	<i>Lactobacillus crispatus</i>	349/349	0/349	100	
2		<i>Uncultured bacterium</i>	751/760	0/760	98	2
		<i>Lactobacillus reuteri</i>	748/760	0/760	98	
3		<i>Uncultured bacterium</i>	318/319	0/319	99	1
		<i>Lactobacillus reuteri</i>	318/319	0/319	99	
4		<i>Lactobacillus johnsonii</i>	790/799	0/799	98	3
7		<i>Uncultured bacterium</i>	602/645	0/645	93	1
		<i>Clostridium sp.</i>	595/645	0/645	92	
8		<i>Uncultured bacterium</i>	717/720	0/720	99	2
		<i>Lactobacillus reuteri</i>	713/720	0/720	99	
9		<i>Lactobacillus reuteri</i>	423/427	0/427	99	1
10		<i>Uncultured bacterium</i>	750/759	0/759	98	1
		<i>Lactobacillus reuteri</i>	747/759	0/759	98	
11		<i>Uncultured bacterium</i>	713/716	0/716	99	2
		<i>Lactobacillus reuteri</i>	709/716	0/716	99	
16		<i>Lactobacillus reuteri</i>	487/488	0/488	99	2
18	Mezcla	<i>Lactobacillus helveticus</i>	253/253	0/253	100	1
	Día 15	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	253/253	0/253	100	
19		<i>Lactobacillus johnsonii</i>	789/799	0/799	98	1
20		<i>Lactobacillus gasseri</i>	598/603	0/603	99	1
21		<i>Uncultured bacterium</i>	306/308	0/308	99	2
		<i>Lactobacillus sp.</i>	306/308	0/308	99	
22		<i>Lactobacillus reuteri</i>	304/308	0/308	98	1
		<i>Uncultured Lactobacillus sp.</i>	549/550	0/550	99	
23		<i>Lactobacillus gasseri</i>	548/550	0/550	99	1
		<i>Uncultured Lactobacillus sp.</i>	422/422	0/422	100	
26		<i>Lactobacillus gasseri</i>	421/422	0/422	99	1
		<i>Lactobacillus helveticus</i>	489/498	0/498	98	
28		<i>Lactobacillus crispatus</i>	489/498	0/498	98	1
		<i>Lactobacillus gasseri</i>	489/498	0/498	98	
31		<i>Lactobacillus sp.</i>	605/643	2/643	94	1
		<i>Lactobacillus psittaci</i>	491/511	0/511	96	
33		<i>Lactobacillus jensenii</i>	490/511	0/511	95	1
		<i>Lactobacillus johnsonii</i>	709/712	0/712	99	
33		<i>Uncultured bacterium</i>	365/366	0/366	99	1
		<i>Lactobacillus murinus</i>	365/366	0/366	99	

En la siguiente figura se muestra un gráfico de distribución de los clones obtenidos de las distintas muestras según los estudios de secuenciación.

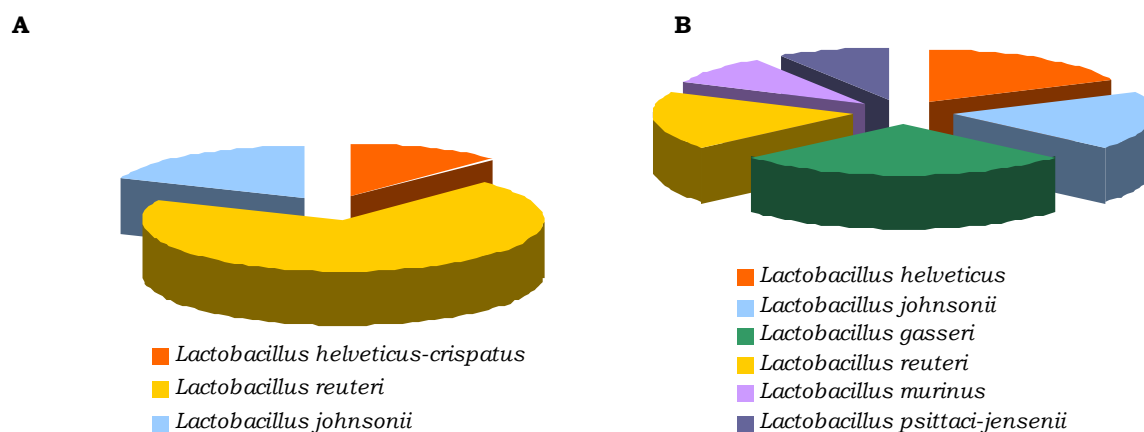


Fig. 40: Distribución de clones. **A.** Grupo Control Día 8. **B.** Grupo Mezcla día 15.

La distribución de las especies mayoritarias resultó muy similar en ambas muestras, aunque existe mayor diversidad de especies presentes en la muestra del grupo mezcla según los clones obtenidos. Al observar los perfiles de DGGE, éstos muestran la presencia de las mismas bandas en ambos grupos. El resultado de una mayor diversidad en los clones o un mayor número de especies presentes en la muestra del grupo mezcla corresponde con lo observado en el apartado del análisis de las muestras mediante DGGE, donde hay mayor intensidad en determinadas bandas. Esta mayor diversidad puede deberse a un aumento en el recuento de ciertas especies de lactobacilos durante el tratamiento probiótico pudiendo ello favorecer a la aparición de clones de estas especies minoritarias a partir de la muestra mezcla, que no se obtienen en el análisis de la muestra control.

Al observar los resultados de los coprocultivos vemos como el tratamiento probiótico no influye en los recuentos de lactobacilos. Todo esto nos indica como el tratamiento probiótico tiene una influencia principalmente cualitativa sobre la comunidad de lactobacilos en el tracto gastrointestinal de ratones, más que cuantitativa.

D.V. AISLADOS DE LACTOBACILOS

Con el fin de comparar la diferencia de resolución entre los métodos tradicionales de cultivo frente al uso de técnicas moleculares para la identificación de los miembros del género *Lactobacillus* de la microbiota fecal de ratones, se realizó la caracterización de lactobacilos presente en heces a partir de los coprocultivos en medio MRS mediante técnicas de microbiología clásica.

Para este ensayo se seleccionaron un total de 100 colonias aisladas del medio para *Lactobacillus*, 50 correspondientes al grupo testigo tomadas de distintos días de coprocultivos, y 50 del coprocultivo del grupo mezcla en el

último día del tratamiento. Estas colonias se caracterizaron inicialmente mediante tinción de Gram, pruebas de la catalasa y oxidasa para eliminar aquellos microorganismos capaces de crecer en MRS que no pertenecen al género *Lactobacillus*. Posteriormente se determinó el crecimiento en medio selectivo y diferencial para lactobacilos LAMVAB (Hartemink *et al.*, 1997), medio de gran selectividad al estar adicionado del antibiótico Vancomicina y ser de bajo pH. Una vez seleccionados los aislados pertenecientes al género *Lactobacillus* y con el fin de identificarlos a nivel de especie, se realizó el estudio de su metabolismo de carbohidratos mediante galerías API® 50CH. Para una identificación más precisa de estos aislados se realizó la secuenciación del gen rRNA 16S, para lo cual inicialmente se agruparon según los perfiles obtenidos mediante PCR-DGGE con cebadores específicos de grupo, y PFGE.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de las distintas pruebas realizadas:

- * Agrupación de aislados por los perfiles de DGGE específico de *Lactobacillus*
- * Electroforesis en campo pulsado de aislados de los distintos grupos
- * Resultados de secuenciación del gen rRNA 16S de cada grupo

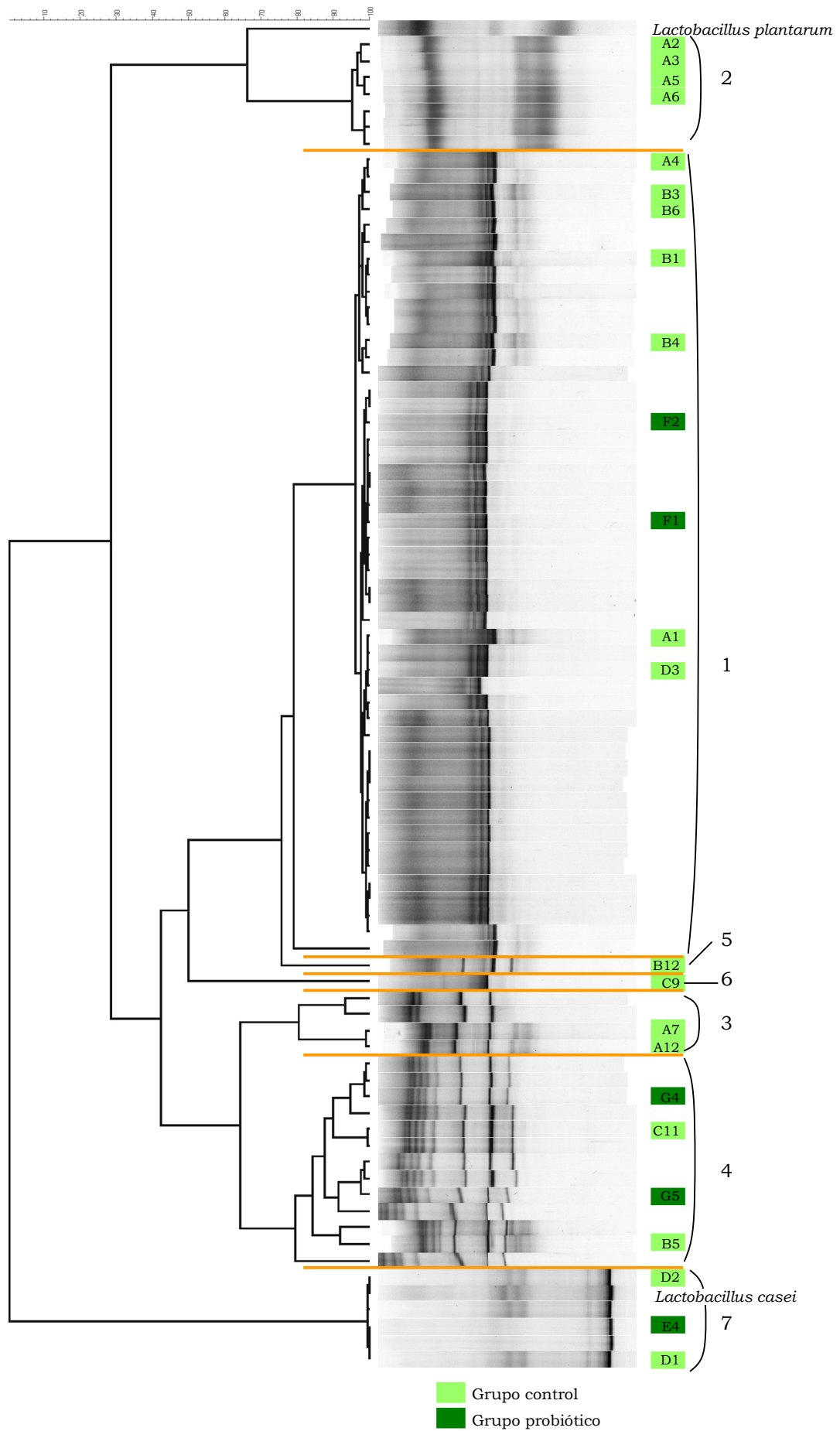


Fig. 41: Agrupación de aislados según perfil de DGGE específico de lactobacilos, gradiente 30-55%.

A partir de los resultados obtenidos del análisis del gen rRNA 16S de los aislados mediante PCR-DGGE, se realizó su agrupación en 7 grupos característicos según sus perfiles. Se seleccionaron determinados aislados de cada perfil, tanto del grupo control como probiótico para su posterior estudio mediante PFGE, tomando al menos un aislado de cada grupo o perfil.

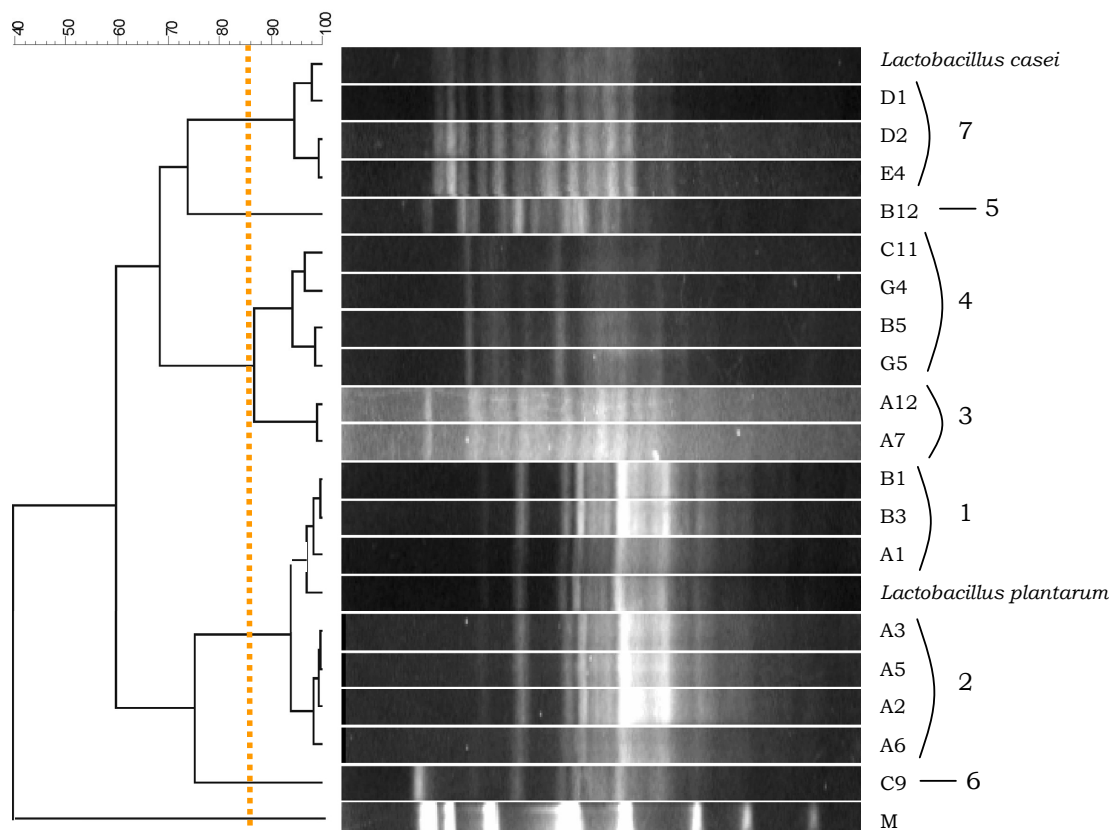


Fig. 42: Agrupación de los aislados seleccionados según su perfil de PFGE.

No se consiguió la lisis de los aislados A4, B6, B4, F1, F2, D3, B5, pudiendo esto estar relacionado con su posible pertenencia a la especie *L. plantarum* y por lo tanto ser microorganismos de difícil lisis. Los resultados o agrupamientos obtenidos de los geles de DGGE se repiten en el análisis del gel de electroforesis en campo pulsado, si bien este análisis resulta más completo al utilizar el genoma completo de las bacterias objeto de estudio. Se reagruparon los grupos 1 y 2 en uno solo, así como los grupos 3 y 4, comprobándose posteriormente mediante estudios de secuenciación la pertenencia de los dos a la misma especie en ambos casos. Así mismo ambos estudios coinciden en el agrupamiento con las especies probióticas administradas. Mediante el estudio por PFGE podemos determinar la pertenencia de varias cepas a una misma especie cuando muestran una similitud en sus perfiles superior al 85%.

Finalmente se seleccionaron una serie de aislados representativos de cada grupo para su identificación por secuenciación del gen rRNA 16S. Las secuencias obtenidas se analizaron frente a la base de datos del NCBI mediante la herramienta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) (McGinnis & Madden, 2004). Las secuencias completas se muestran en el anexo II.

Tabla 14: Resultados de secuenciación.

Aislado	Grupo	Origen	Especie más próxima	"Identities"	"Gaps"	% similitud
B3	1	Grupo control	<i>*Lactobacillus plantarum</i>	1394/1394	0/1394	100
A2	2		<i>*Lactobacillus plantarum</i>	1397/1397	0/1397	100
A3	2		<i>*Lactobacillus plantarum</i>	1468/1468	0/1468	100
A12	3		<i>Uncultured bacterium</i>	1453/1456	1/1456	99
			<i>Lactobacillus reuteri</i>	1449/1455	0/1455	99
B5	4		<i>Uncultured bacterium</i>	1345/1347	1/1347	99
			<i>Lactobacillus reuteri</i>	1341/1346	0/1346	99
B12	5		<i>Uncultured bacterium</i>	1325/1325	0/1325	100
			<i>Lactobacillus murinus</i>	1325/1325	0/1325	100
C9	6		<i>Lactobacillus murinus</i>	1455/1457	0/1457	99
D1	7		<i>Lactobacillus paracasei</i>	1378/1378	0/1378	100
G4	4	Grupo mezcla	<i>Uncultured bacterium</i>	1448/1450	1/1450	99
			<i>Lactobacillus reuteri</i>	1444/1449	0/1449	99
E4	7		<i>Lactobacillus paracasei</i>	1326/1326	0/1326	100

*El resultado es frente a *Lactobacillus arizonensis* la cual fue reclasificada en 2005 como *L. plantarum* (Kostinek et al., 2005).

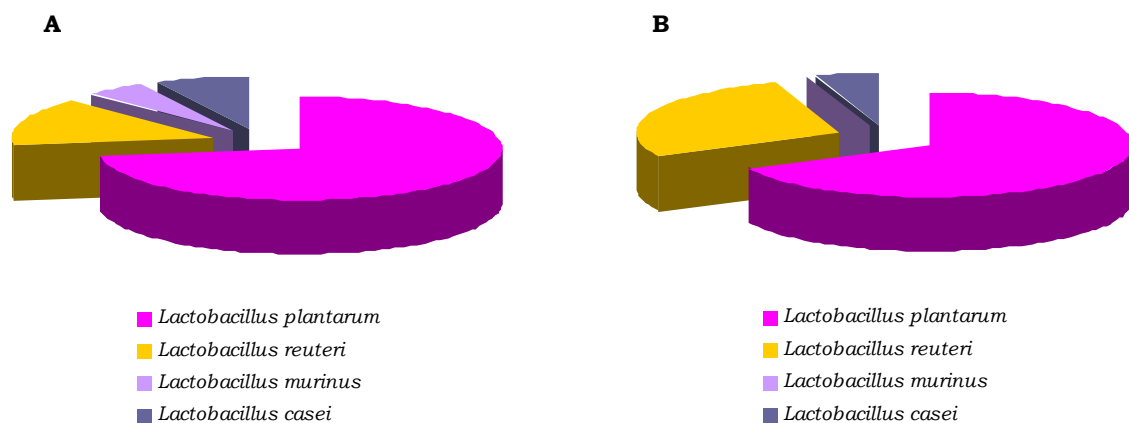


Fig. 43: Distribución de los aislados de lactobacilos obtenidos a partir de coprocultivos. **A.** Aislados del grupo control. **B.** Aislados del grupo mezcla.

Para obtener una visión general del conjunto de lactobacilos presentes en la microbiota fecal en ratones, se construyó un árbol filogenético mediante la herramienta ARB a partir de las secuencias tanto de los clones obtenidos de las muestras fecales de ambos grupos (apartado D.IV.), como de los aislados caracterizados en este apartado obtenidos a partir de los coprocultivos realizados en medio MRS. A partir de esta figura podemos comprobar como la caracterización molecular o librería de clones resulta más completa a la hora de identificar las distintas especies presentes en las muestras fecales. Los

aislados coinciden con los clones identificados en la presencia en ambos casos de las especies *L. reuteri* y *L. murinus*, siendo la primera considerada la especie mayoritaria de este género presente en el tracto gastrointestinal de ratones.

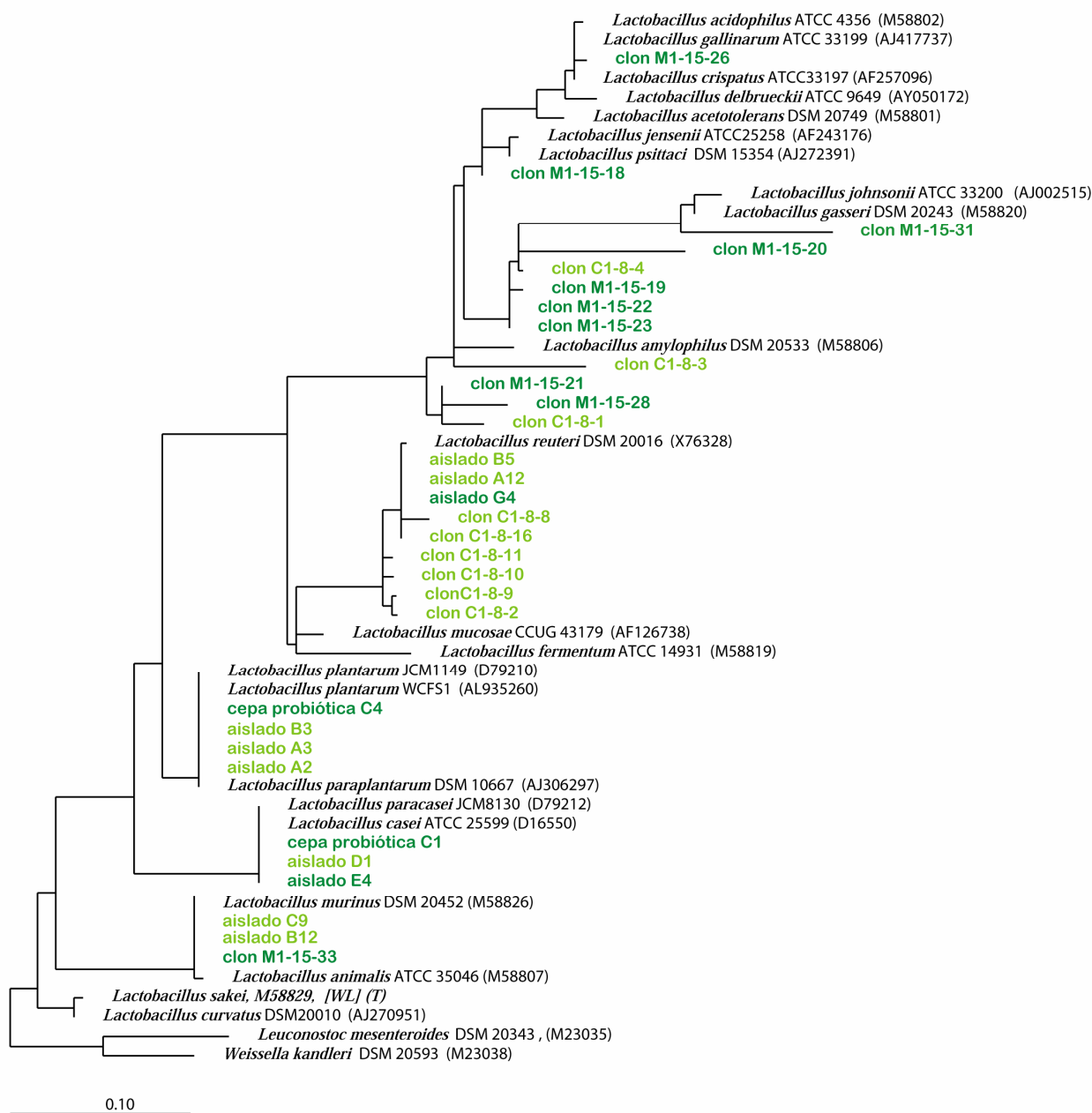


Fig. 44: Árbol filogenético de los miembros del género *Lactobacillus* de las secuencias obtenidas de clones de muestras de heces y de aislados de coprocultivos. La línea de escala indica el largo de rama que representa un 10% de diferencia en la secuencia. Verde claro corresponde con clones o aislados del grupo control y verde oscuro del grupo probiótico.

Destaca la ausencia de clones pertenecientes a la especie de *L. plantarum*, cepa probiótica seleccionada para esta tesis, frente al gran número de aislados obtenidos de ésta. También se ensayó el uso de sondas específicas para la hibridación por Southern blot de los geles de DGGE con el fin de detectar la presencia de nuestra cepa probiótica (Quere *et al.*, 1997). Mediante técnicas de biología molecular no podemos distinguir entre la cepa de *L.*

plantarum administrada frente a la endógena, siendo necesario en este caso el uso de una cepa recombinante con algún marcador (GFP, resistencia a antibióticos, actividad beta-glucosidasa...etc). En la actualidad se están desarrollando oligonucleótidos específicos para la cuantificación de determinadas especies bacterianas o incluso determinadas cepas que no pueden distinguirse de otra manera, con el fin de solucionar este problema (Konstantinov *et al.*, 2005).

Destaca la presencia de *L. casei*, también seleccionada como cepa probiótica en esta tesis, en la microbiota normal de ratones, es decir detectada en el grupo control en ambos casos mediante aislamiento. Al observar los perfiles de DGGE comprobamos como las especies probióticas no aparecen en el grupo control en condiciones normales. El alto número de aislados de estas especies o su ausencia en los perfiles de DGGE puede deberse a distintas razones:

- * Dificultad a la hora de cultivar el resto de las especies endógenas de lactobacilos presentes en heces, por lo que existe cierto grado de selección en la elaboración de los coprocultivos
- * Dificultad en la lisis de estas bacterias probióticas, y por lo tanto pérdida de gran parte de las mismas durante el proceso de extracción de DNA

Es importante tener en consideración todas estas cuestiones a la hora de realizar un estudio de ecología microbiana de la microbiota gastrointestinal, siendo siempre la combinación de las distintas técnicas la solución más adecuada.

D.VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

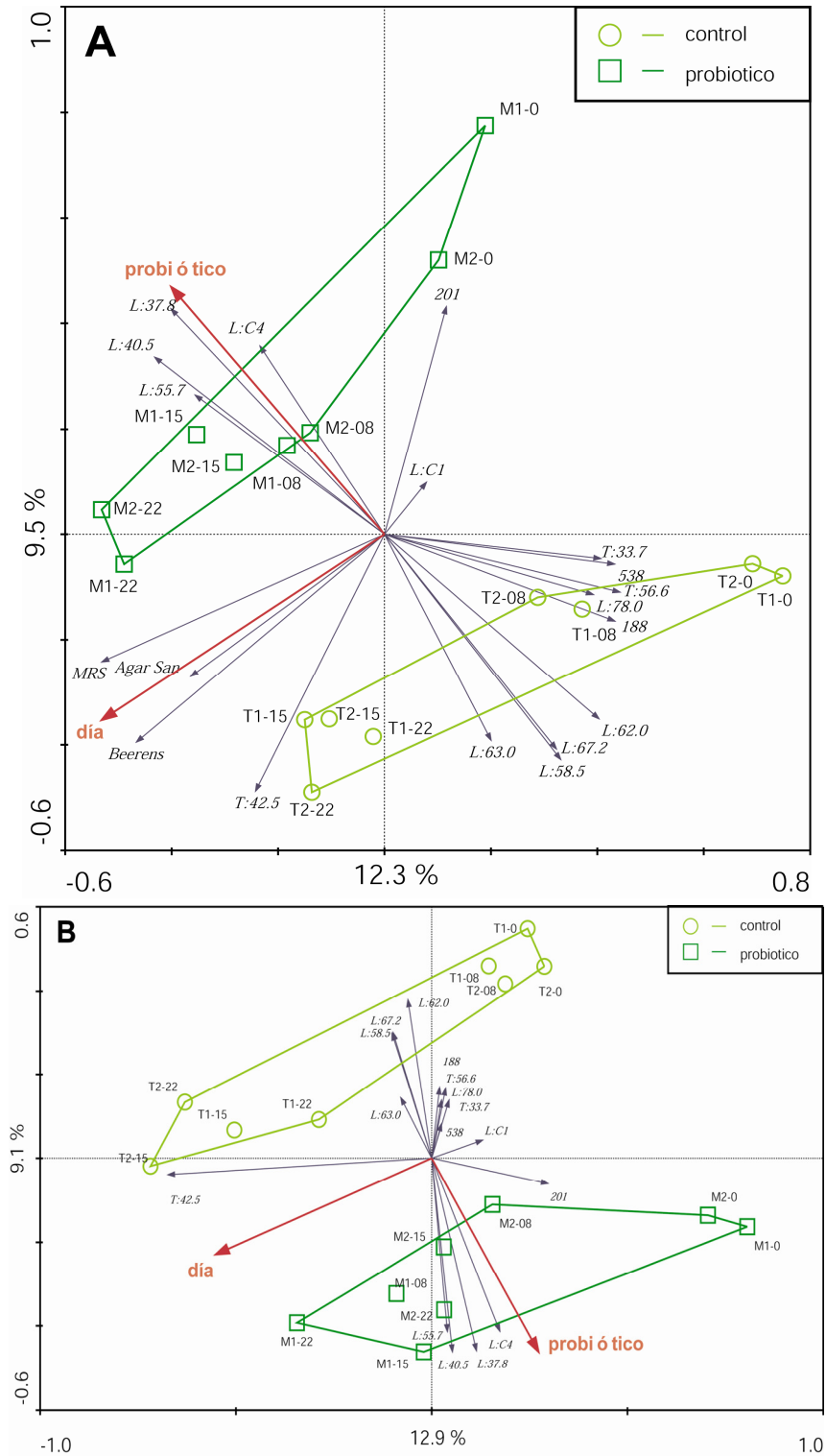
D.VI.1. Heces

Se utilizó el análisis de redundancia (RDA) para el estudio del efecto del tratamiento probiótico y los días de toma de muestra (0, 8, 15 y 22) sobre la microbiota fecal. Para este análisis se agruparon los resultados obtenidos de:

- * Intensidad de banda relativa de los perfiles de DGGE obtenidos para la microbiota fecal total (*T*;) y específica de lactobacilos (*L*;))
- * Altura relativa de los fragmentos de T-RFLP
- * Recuentos de CFU/g de heces en los 7 medios analizados mediante coprocultivo

Previo al análisis se transformaron los recuentos de CFU/g de heces a valores logarítmicos. Sólo se muestran en el esquema aquellas variables que influyen la variabilidad de la composición de la microbiota fecal, según el

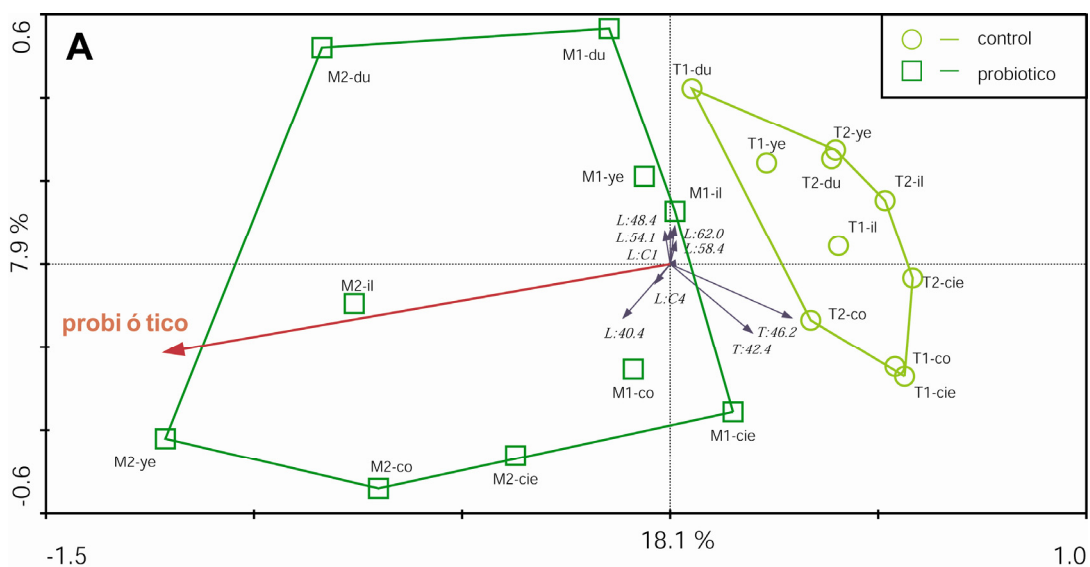
análisis de permutación Monte Carlo. Los valores de los ejes indican el porcentaje de variables que pueden explicarse mediante este esquema.



D.VI.2. Biopsias

Se realizó el esquema de ordenación de la microbiota presente en el tracto gastrointestinal (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon) y la respuesta al tratamiento probiótico. Los esquemas se realizaron mediante el análisis RDA con la intensidad relativa de banda de los geles de DGGE para la microbiota total (*T*;) y específicos de lactobacilos (*L*:). Los valores en los ejes muestran el porcentaje de variables que pueden explicarse mediante estos dos ejes. Sólo se muestran aquellas bandas de DGGE con mayor similitud con los ejes. Se muestran aquellas variables ambientales con significancia estadística según el análisis de permutación Monte Carlo.

En este ensayo las distintas zonas anatómicas u origen de las biopsias no contribuyeron a la explicación de la variabilidad en la composición de la microbiota intestinal. El tratamiento probiótico se utilizó como variable ambiental y el origen de las biopsias como covariable para eliminar su efecto. Para identificar de manera separada los efectos del tratamiento probiótico y el origen de la muestra, también se realizaron los análisis de las biopsias (fig. 46, B) o del tratamiento (fig. 46, C) utilizando el otro factor como covariable.



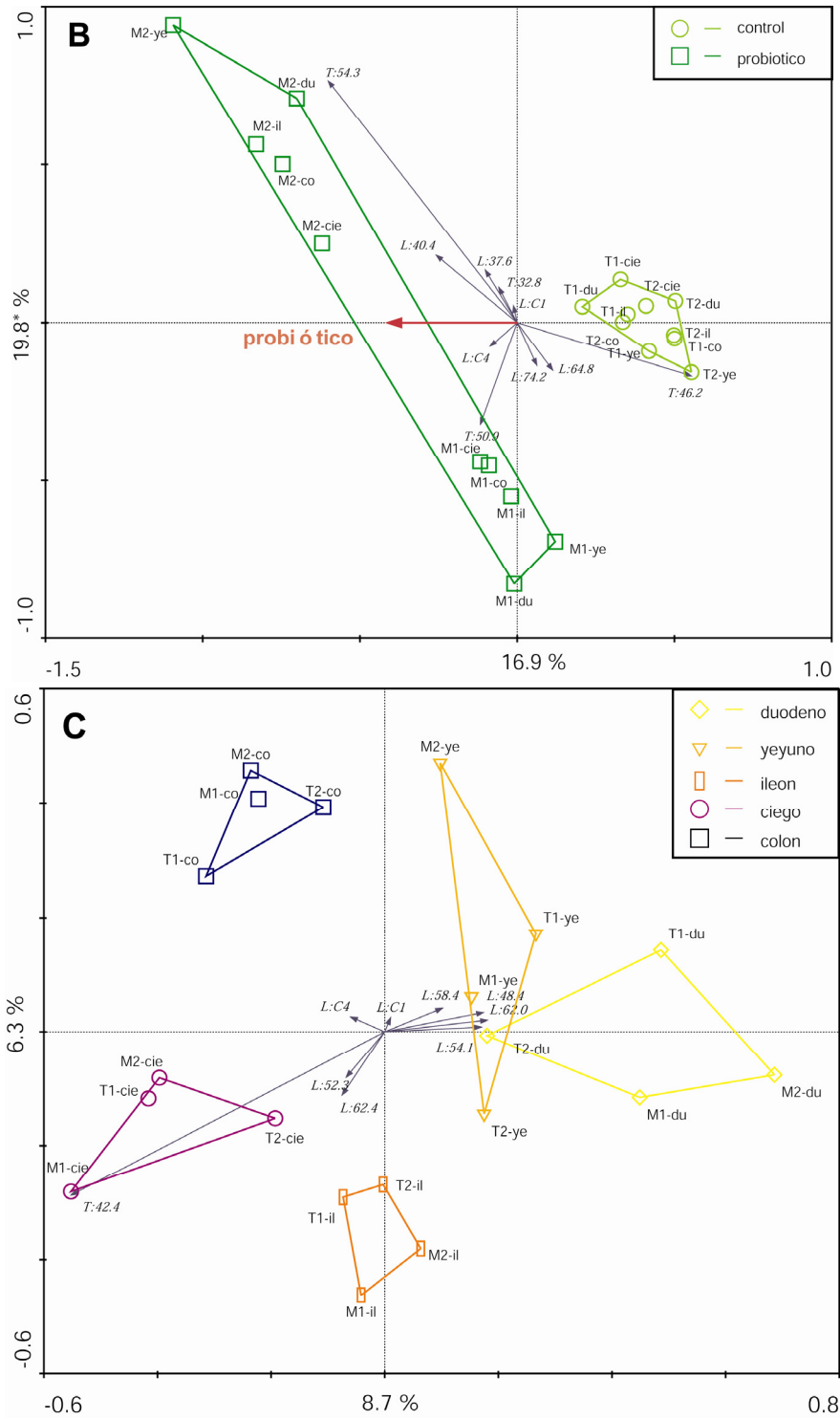


Fig. 46: **A.** Esquema de ordenación de las variables obtenidas. **B.** Orden para el tratamiento probiótico (+/- probiótico). El segundo eje de este diagrama no es canónico (no regido por variables ambientales). **C.** Análisis con el tratamiento probiótico como covariable.

E. TRATAMIENTO PROBIÓTICO A CORTO PLAZO EN RATONES NORMALES E INMUNOCOMPROMETIDOS

Se realizó el estudio del efecto de la administración diaria de la cepa probiótica C4 caracterizada como *L. plantarum*, sobre animales modelo de condición clínica de inmunosupresión durante 10 días. Los ensayos se realizaron sobre cuatro grupos de animales: control, probiótico, animales inmunosuprimidos y un grupo mezcla del animal inmunosuprimido al que se le administró la cepa probiótica.

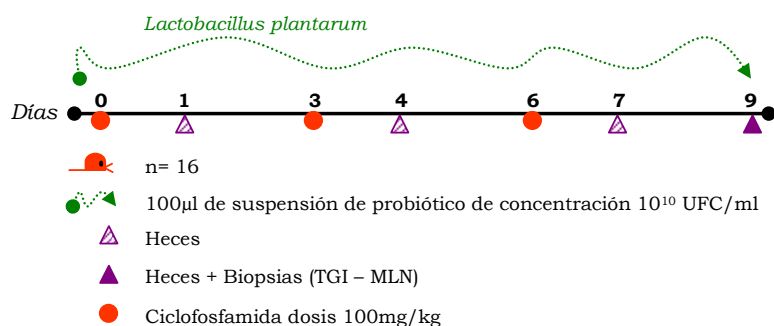


Fig. 47: Tratamiento a corto plazo en animales normales e inmunocomprometidos.

La inducción del estado de inmunosupresión se realizó mediante inyección intraperitoneal de ciclofosfamida (Asta Medica, Prarfarma S.A.) como agente mielotóxico a una dosis de 100mg/Kg. en los días 0, 3 y 6. Se realizó la reacción de PCR con cebadores específicos del género *Lactobacillus* sobre el DNA obtenido de las biopsias de ganglios mesentéricos, para la determinación de una posible translocación bacteriana de la cepa probiótica administrada. No se obtuvo producto de amplificación específico en ninguna de las muestras analizadas.

E.I. INMUNOSUPRESIÓN

Se estudió el efecto inmunomodulatorio de la cepa probiótica *L. plantarum* mediante el recuento de leucocitos de sangre periférica (PBL). Para ello se tomaron muestras mediante punción retro-orbital con tubos capilares heparinizados en animales anestesiados. Los recuentos se realizaron según descrito previamente en bibliografía (Jimenez-Valera *et al.*, 2003).

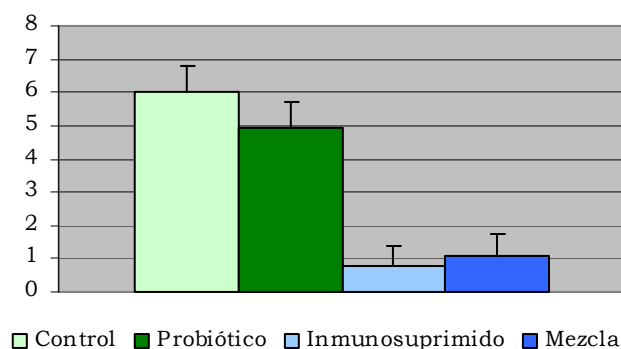


Fig. 48: Niveles de PBL ($\times 10^3$) por μl en el día 9. Los valores representan la media de la medida de 4 ratones por grupo \pm la desviación estándar.

La administración de ciclofosfamida intraperitoneal resultó en una disminución en el recuento de linfocitos en sangre periférica de los grupos inmunosuprimido y mezcla en comparación con el grupo control. Los valores más bajos de PBL los presentaron los animales del grupo inmunosuprimido (fig. 48). Existe cierta recuperación de estos niveles que podría deberse a que las lecturas se realizaron el día del sacrificio (día 9), 3 días después de la última dosis de ciclofosfamida, con cierta recuperación de los niveles de leucocitos en los grupos inmunosuprimidos.

E.II. DGGE

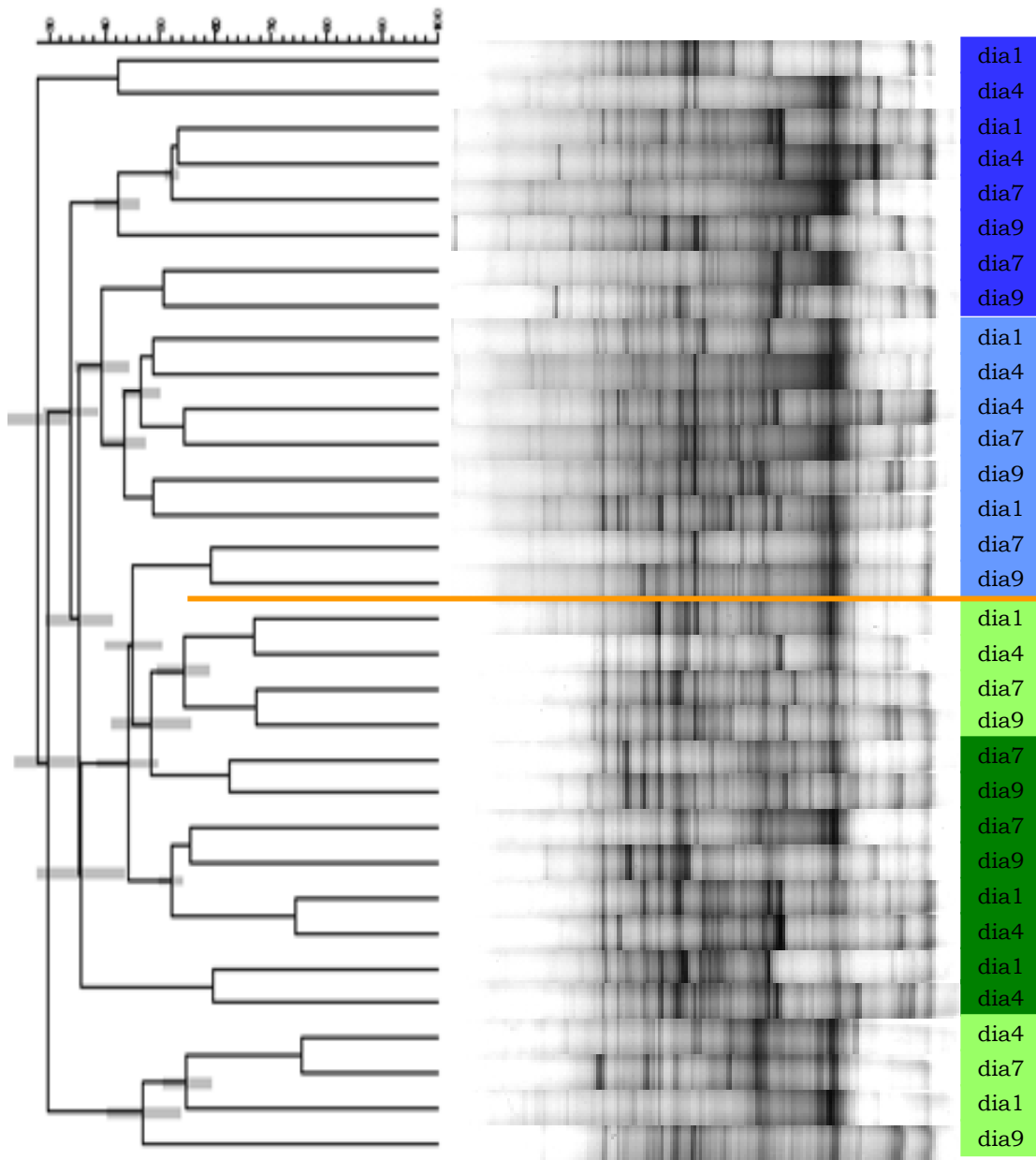
Se tomaron muestras de heces de dos animales de cada uno de los cuatro grupos de manera aleatoria en los días 1, 4, 7 y 9. Este último día también se tomaron biopsias del tracto gastrointestinal completo. Las muestras se analizaron mediante PCR-DGGE universal para la caracterización de la microbiota total presente así como específica del género *Lactobacillus*. Los geles obtenidos se normalizaron y analizaron mediante el programa Bionumerics.

En la figura 49 se muestran los resultados obtenidos del estudio de las muestras fecales, tanto de la microbiota total como específico de lactobacilos. En el análisis de los perfiles obtenidos para la caracterización de la microbiota total de las muestras fecales se observó una elevada diversidad de especies o bandas presentes, por lo que la similitud entre las distintas muestras es muy baja. Se observó cierta agrupación entre los perfiles obtenidos de aquellos grupos que presentaron la condición de inmunosupresión (fig. 49, **A**).

Esta agrupación también se observó en el análisis del perfil específico para el género *Lactobacillus*. La similitud entre los perfiles de lactobacilos de las distintas muestras es mucho más elevada que en el universal, de un $73.89 \pm 8.05\%$ para casi todas las muestras. Además se detectó la presencia de

la cepa probiótica administrada en algunas de las muestras de los grupos probiótico y mezcla (fig. 49, **B**).

A



B

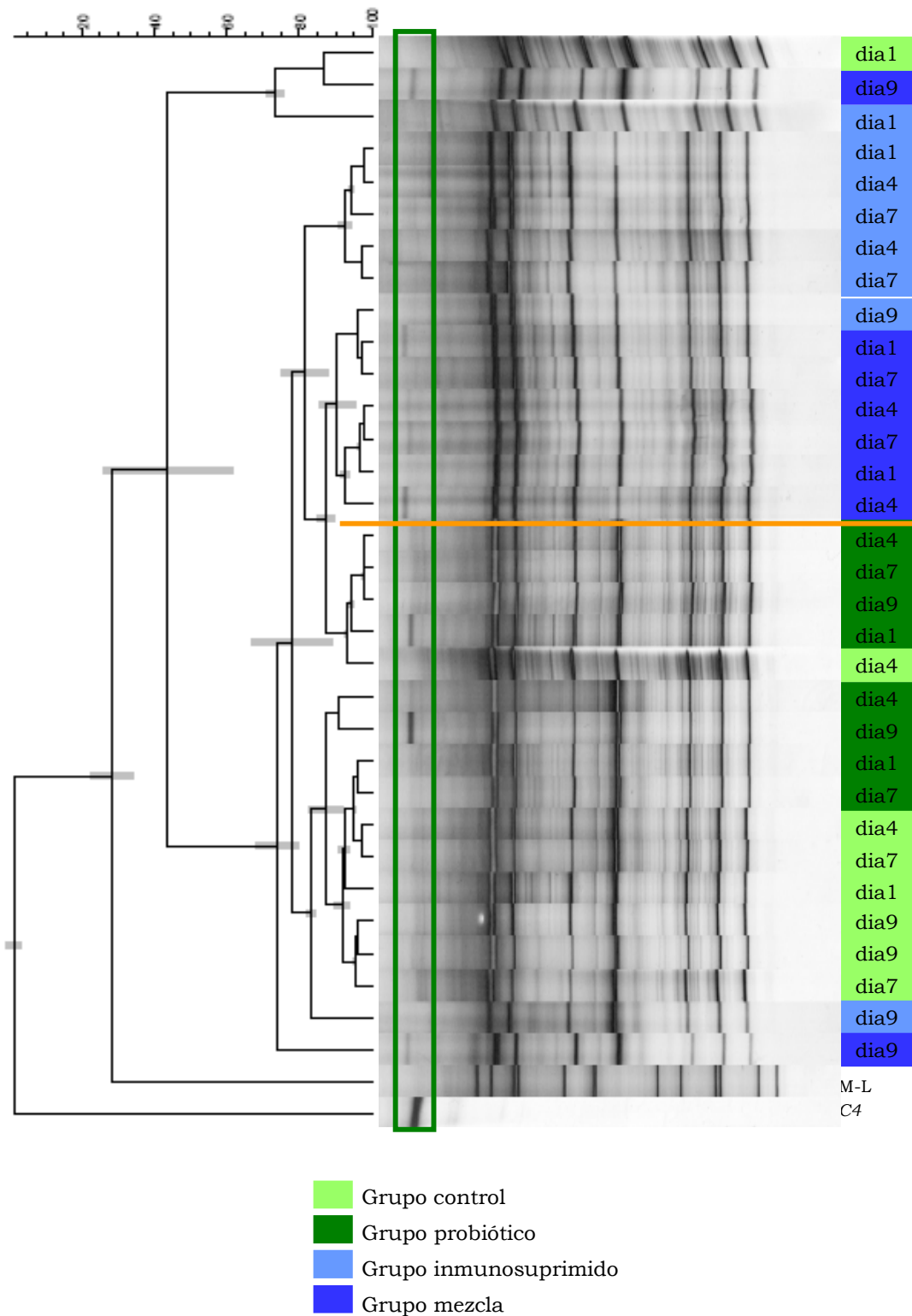
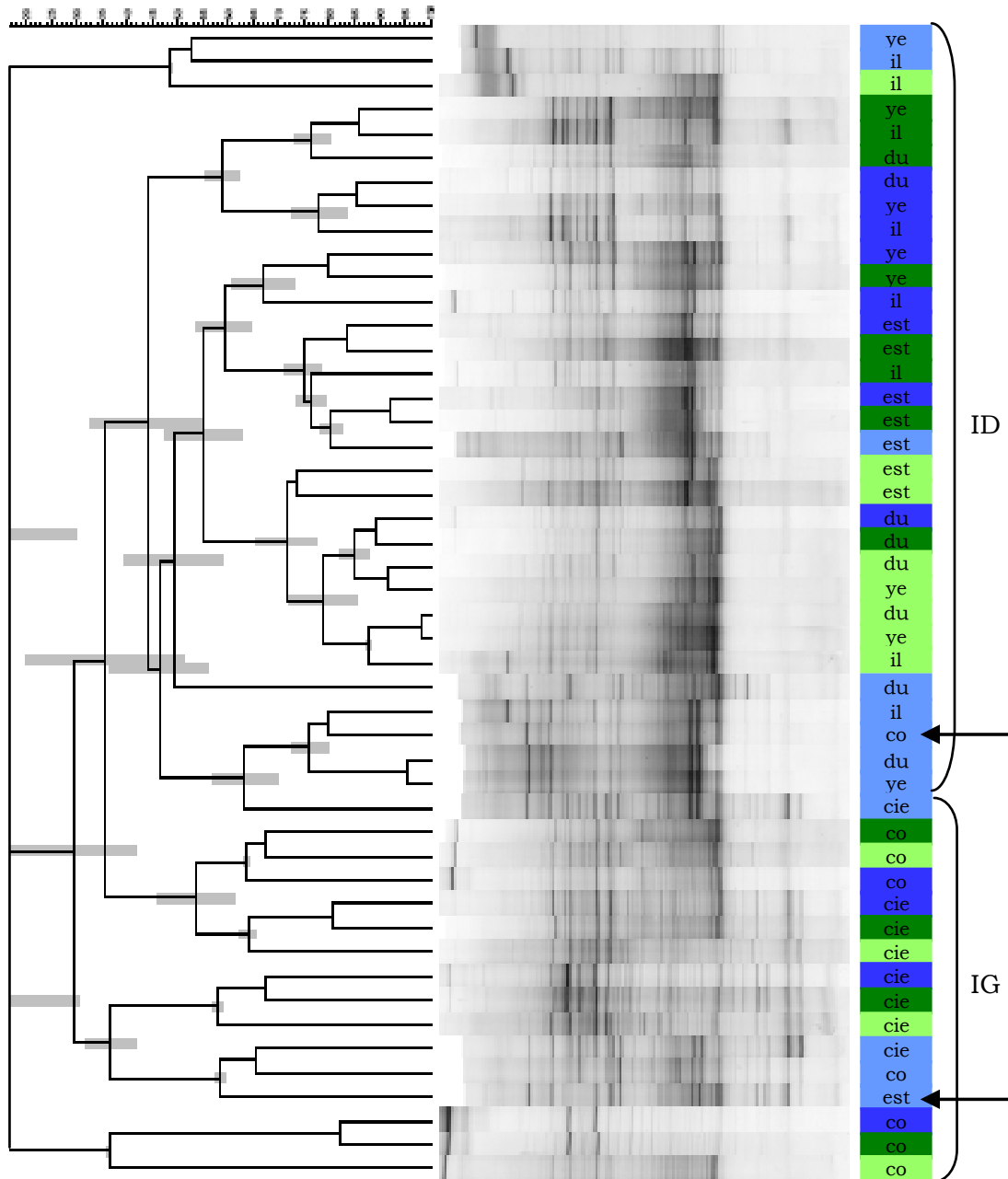


Fig. 49: DGGE de muestras fecales. **A.** Microbiota total, gradiente 30-60%. **B.** Especifico de lactobacilos, gradiente 30-55%. M-L: marcador de DGGE. C4: *L. plantarum*.

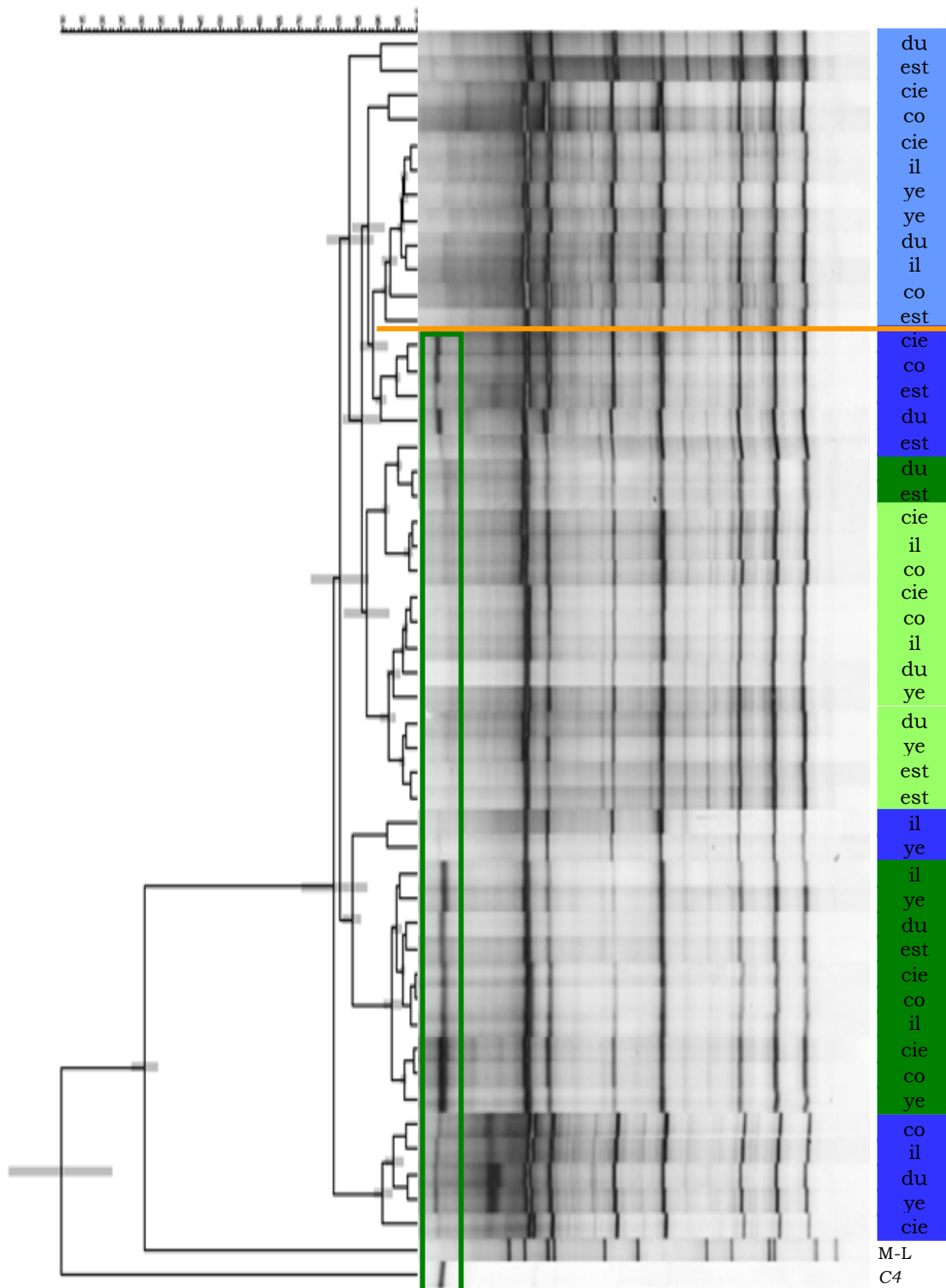
En el análisis de las muestras de biopsias del tracto gastrointestinal de ratones de los cuatro grupos estudiados se observó de nuevo una gran diversidad de los perfiles obtenidos para la microbiota total (fig. 50, **A**). En este

estudio no se produjo la agrupación de las muestras según el tratamiento, sino que se agruparon anatómicamente según la región del intestino, separando aquellas muestras pertenecientes al intestino delgado de las procedentes del intestino grueso. Destacan dos muestras que no siguen esta agrupación (indicadas mediante flechas): muestra de colon y estómago, agrupados con intestino delgado y grueso respectivamente. Ambas pertenecen a un animal del grupo inmunosuprimido. Esto podría ser indicativo de una alteración de la microbiota intestinal producida directa o indirectamente por el tratamiento por ciclofosfamida, lo cual coincide con lo observado anteriormente en el análisis de las muestras fecales, al agruparse éstas según su condición de inmunosupresión.

A



B



- Grupo control
- Grupo probiótico
- Grupo inmunosuprimido
- Grupo mezcla

est: estómago; du: duodeno; ye: yeyuno; il: íleon; cie: ciego; co: colon

Fig. 50: DGGE de muestras de biopsias del tracto gastrointestinal. **A.** Microbiota total, gradiente 30-60%. **B.** Específico de lactobacilos, gradiente 30-55%. Du: duodeno; ye: yeyuno; il: íleon; cie: ciego; co: colon. ID: Intestino delgado. IG: Intestino grueso. M-L: Marcador de lactobacilos. C4: *L. plantarum*.

Los perfiles obtenidos del análisis específico de lactobacilos mostraron una similitud entre ellos del $79.05 \pm 8.19\%$ (fig. 50, **B**). Se observó separación de las muestras de aquellos grupos que recibieron la cepa probiótica (grupos probiótico y mezcla) y el grupo control, frente al grupo inmunosuprimido. Se detectó la presencia de *L. plantarum* a lo largo de todo el tracto gastrointestinal en los grupos probiótico y mezcla.

E.III. “SEGMENTED FILAMENTOUS BACTERIA”

Las bacterias del grupo SFB (“Segmented filamentous bacteria”) están directamente relacionadas con el estado del sistema inmune, descritas como parte de la microbiota normal de íleon de ratones jóvenes hasta el momento en que desarrollan el sistema inmune, momento en el cual sus niveles disminuyen hasta llegar a desaparecer. En situaciones de inmunodeficiencia, bien genética o química, estas bacterias mantienen sus niveles elevados (Snel *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2004).

Se procedió a determinar la presencia de estas bacterias filamentosas mediante estudios de PCR tradicional (fig. 51), al no estar siempre presentes en el tracto digestivo de ratones. Para la reacción de PCR se utilizó la combinación de los oligonucleótidos 779-F y 1008-R ya descritos para la detección de estas bacterias, el primero como cebador para PCR para la detección en intestino de trucha (Urdaci *et al.*, 2001), y el segundo como sonda para hibridación mediante Southern blot de DNA de muestras fecales de ratones (Snel *et al.*, 1995). Las muestras analizadas fueron las biopsias del tracto gastrointestinal completo de dos ratones por grupo de cada grupo.

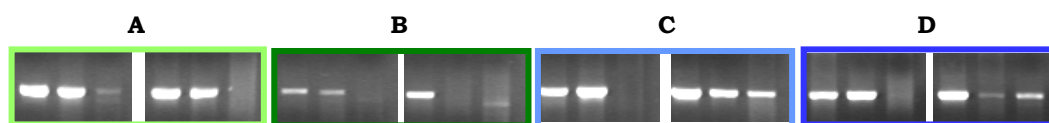


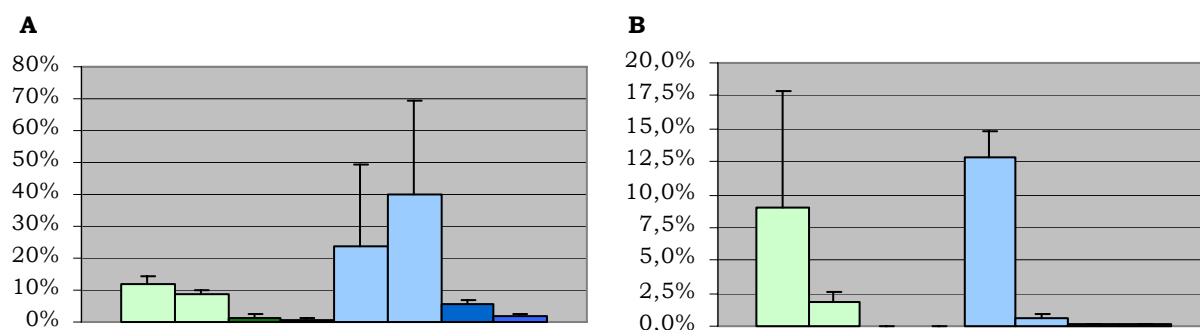
Fig. 51: Producto de PCR de SFB en muestras de íleon, ciego y colon respectivamente. **A.** Grupo control. **B.** Grupo probiótico. **C.** Grupo inmunosuprimido. **D.** Grupo mezcla.

Sólo se obtuvo producto de PCR en muestras de duodeno y yeyuno en el grupo inmunosuprimido. En los resultados obtenidos de esta reacción se observó como los grupos control e inmunosuprimido parecen presentar una mayor intensidad de bandas que aquellos grupos que recibieron la cepa probiótica. Debido a que no se puede realizar la cuantificación de bacterias mediante la observación en gel de agarosa de un producto de reacción de PCR tradicional y que no se ha conseguido aún el cultivo de este grupo bacteriano, se procedió a la determinación mediante PCR cuantitativa del número de bacterias presentes en estas muestras.

Al no estar descrito el uso conjunto de los cebadores utilizados ni su uso mediante Q-PCR, se procedió a la validación de los mismos por clonaje y secuenciación de los productos obtenidos de la reacción de PCR cuantitativa. También se procedió a la validación de otra pareja de cebadores tampoco descrita para este uso para la obtención de un fragmento de mayor tamaño, el anteriormente mencionado 779-F junto con 1380-R (Urdaci *et al.*, 2001). Para la validación se seleccionaron dos productos de PCR de un animal del grupo inmunosuprimido, de muestras donde las bacterias SFB se encuentran de manera normal (íleon) así como en biopsia de colon, hábitat no natural de este grupo, amplificados mediante Q-PCR con ambas parejas de oligonucleótidos. Los productos de PCR de aproximadamente 230pb y 600pb se purificaron y clonaron en el vector pGEM-T. Se seleccionaron un total de 96 clones, 24 de cada muestra para cada pareja de cebadores. Debido al reducido tamaño del inserto no se analizaron mediante estudios de restricción, y se realizó directamente la secuenciación de todos los clones positivos.

El 100% de las secuencias analizadas muestran una similitud entre el 99-100% con secuencias del gen rRNA 16S de bacterias segmentadas filamentosas.

En la siguiente figura se representa el número de bacterias segmentadas filamentosas representadas en % frente a la microbiota total de las muestras analizadas, determinada mediante los cebadores universales 1369-F y 1492-R (Suzuki *et al.*, 2000). La cuantificación se realizó por duplicado para cada muestra dentro de la misma reacción y cada reacción se repitió dos veces. Observamos como el número de SFB en los animales que pertenecen al grupo inmunosuprimido así como al grupo control, son mucho más elevados que en los grupos que recibieron la cepa probiótica, incluso llegando a desaparecer por completo los niveles de las mismas en estos grupos en algunas muestras.



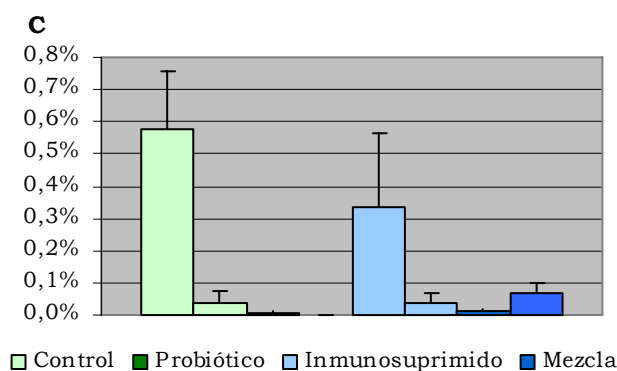


Fig. 52: % de SFB frente a la microbiota intestinal total determinado mediante PCR cuantitativa. **A.** Íleon. **B.** Ciego. **C.** Colon.

Mediante los resultados obtenidos se puede establecer una relación directa entre la administración de *L. plantarum* con la disminución en los niveles de las bacterias SFB, si bien los mecanismos de interacción no se pueden establecer con las pruebas realizadas. Se plantean varias hipótesis:

- * Existe un desplazamiento de las bacterias autóctonas especialmente de las SFB, por la colonización observada de esta bacteria en el tracto gastrointestinal.
- * Producción de agentes antimicrobianos por la cepa probiótica.
- * Se establece una relación entre la cepa probiótica administrada y el sistema inmune del hospedador, relación no detectada mediante el recuento de PBL, la cual provoca una respuesta del mismo que conlleva a la eliminación de este grupo bacteriano.

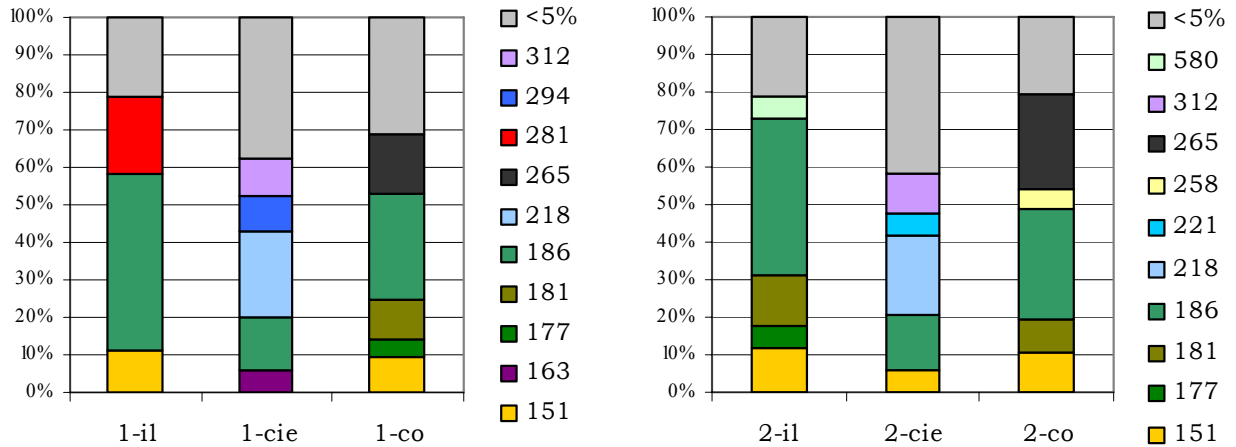
Sería necesario realizar el estudio de la expresión genética del probiótico en presencia de las bacterias SFB en intestino de ratones con el fin de establecer la interacción que se establece entre las mismas así como con el hospedador.

E.IV. T-RFLP

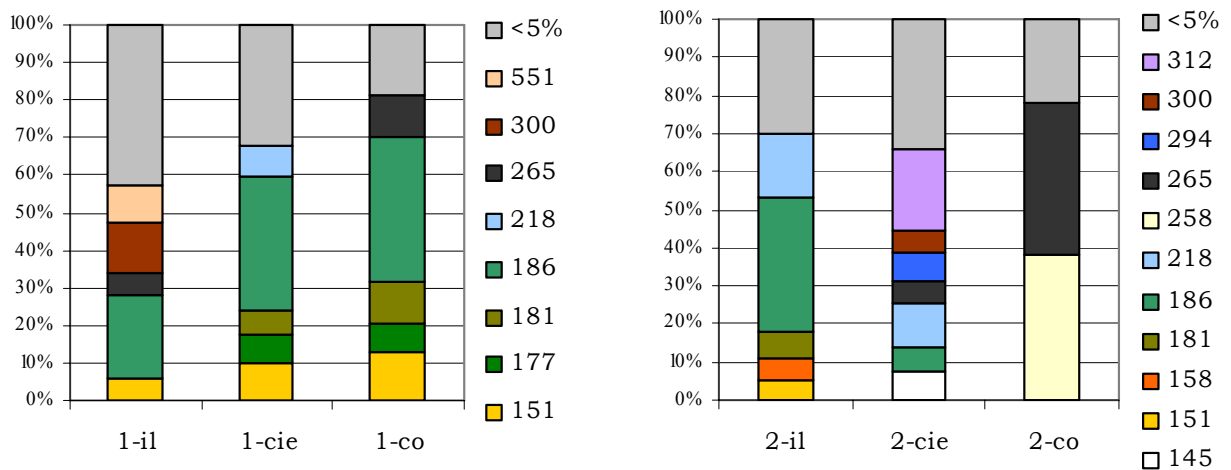
Para completar los resultados obtenidos del estudio de las muestras de biopsias mediante DGGE, así como detectar la localización y expansión de las bacterias SFB mostrada mediante Q-PCR, se realizó el análisis por T-RFLP de las muestras de íleon, ciego y colon de los animales estudiados de los cuatro grupos. Mediante esta técnica se obtiene un perfil de la composición total de la microbiota intestinal al utilizar cebadores universales. Según el tamaño del fragmento de restricción detectado se puede comparar con bases de datos para asignar la especie o grupo bacteriano que lo produce, si bien cada fragmento resulta en numerosas posibles especies, por lo que para identificarlos de forma correcta sería necesaria la elaboración de una librería de clones a partir de los productos de PCR. Con el fin de simplificar las gráficas obtenidas de este

análisis sólo se muestran aquellas especies o fragmentos cuya presencia sea >5% del total de las especies presentes en heces. Los fragmentos restantes presentes en cantidades <5% se representan en un mismo grupo. Cada pico representado en las gráficas corresponde al tamaño que se indica ± 2 pb.

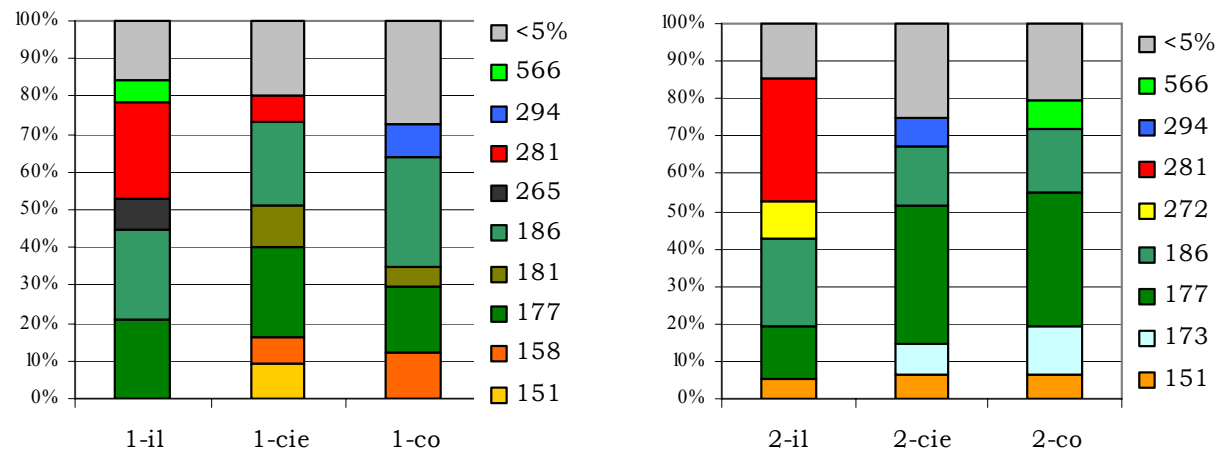
A



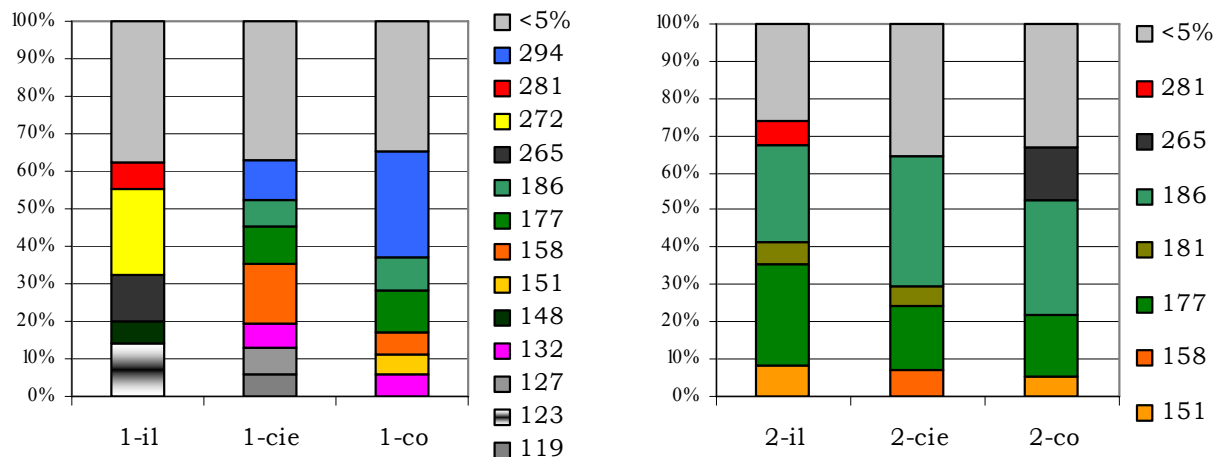
B



C



D



■ 119 ■ 123 ■ 127 ■ 132 □ 145 ■ 148 ■ 151 ■ 158 ■ 163 □ 173 ■ 177 ■ 181 ■ 186
 ■ 218 ■ 221 ■ 258 ■ 265 ■ 272 ■ 281 ■ 294 ■ 300 ■ 312 ■ 551 ■ 566 □ 580 ■ <5%

Fig. 53: Perfiles de T-RFLP de las muestras de biopsias de ileon, ciego y colon para los animales 1 y 2. **A.** Grupo control. **B.** Grupo probiótico. **C.** Grupo inmunosuprimido. **D.** Grupo mezcla.

En comparación con los estudios de T-RFLP realizados en muestras fecales en otros ensayos (apartado D.III.) no se observó tanta diversidad de especies presentes en los perfiles obtenidos de las biopsias de íleon, ciego y colon. Para la identificación de las bacterias SFB en los perfiles de T-RFLP se analizó la secuencia completa del gen rRNA 16S de las mismas y se calculó el número de bases entre el cebador utilizado (27-F) y el primer sitio de restricción de la enzima *MspI*, resultando en un fragmento de 281pb (fig. 53, fragmento representado en color rojo). Al igual que en los resultados de cuantificación mediante PCR a tiempo real, se observó mayor presencia de este fragmento en los perfiles obtenidos de las muestras de íleon de los animales del grupo control e inmunosuprimido. En el grupo inmunosuprimido se observó su existencia también en muestra de ciego. El porcentaje de SFB fue mucho menor en el grupo mezcla, y no se detectó la presencia de este fragmento en muestras del grupo probiótico.

En tonos verdes se muestran los fragmentos asociados con bacterias del género *Lactobacillus*. Destaca la abundancia de este género en la microbiota gastrointestinal de ratones. Además hay una gran presencia del fragmento 186 correspondiente con *L. johnsonii*. Esta especie también aparece en alto porcentaje en la librería de clones realizada para muestras fecales de los grupos control y probiótico (apartado D.IV.), aunque no se obtuvo ningún aislado de la misma mediante la identificación de colonias de los coprocultivos realizados en el mismo ensayo (D.V.). En la mayoría de las muestras de colon encontramos el fragmento 265 correspondiente con el género *Helicobacter*, llegando a formar hasta un 40% de la microbiota presente en colon de ratones

del grupo probiótico. Esto corresponde con resultados obtenidos del análisis mediante DGGE de biopsias de animales modelo de enfermedad inflamatoria intestinal (apartado G.II.), donde la banda correspondiente a este género es de gran intensidad en varios animales. En tonos azules se muestran fragmentos posiblemente correspondientes con especies de los géneros *Johnsonella*, *Ruminococcus* y *Clostridium*. El fragmento 258, muy abundante especialmente en colon del grupo probiótico, no se pudo relacionar con ninguna especie descrita previamente en el tracto gastrointestinal. En este caso resulta necesaria la realización de estudios de clonaje y secuenciación del fragmento para conseguir su identificación. Para obtener una visión más concreta de los grupos representados mediante esta técnica, se construyó un árbol filogenético con todos los fragmentos obtenidos de las muestras analizadas. En verde destacamos las especies previamente descritas en el tracto gastrointestinal de ratones (Orcutt *et al.*, 1987; Dewhirst *et al.*, 1999; Salzman *et al.*, 2002). También se indican aquellas secuencias que corresponden con especies descritas en humano, cerdo, termita o gallo.

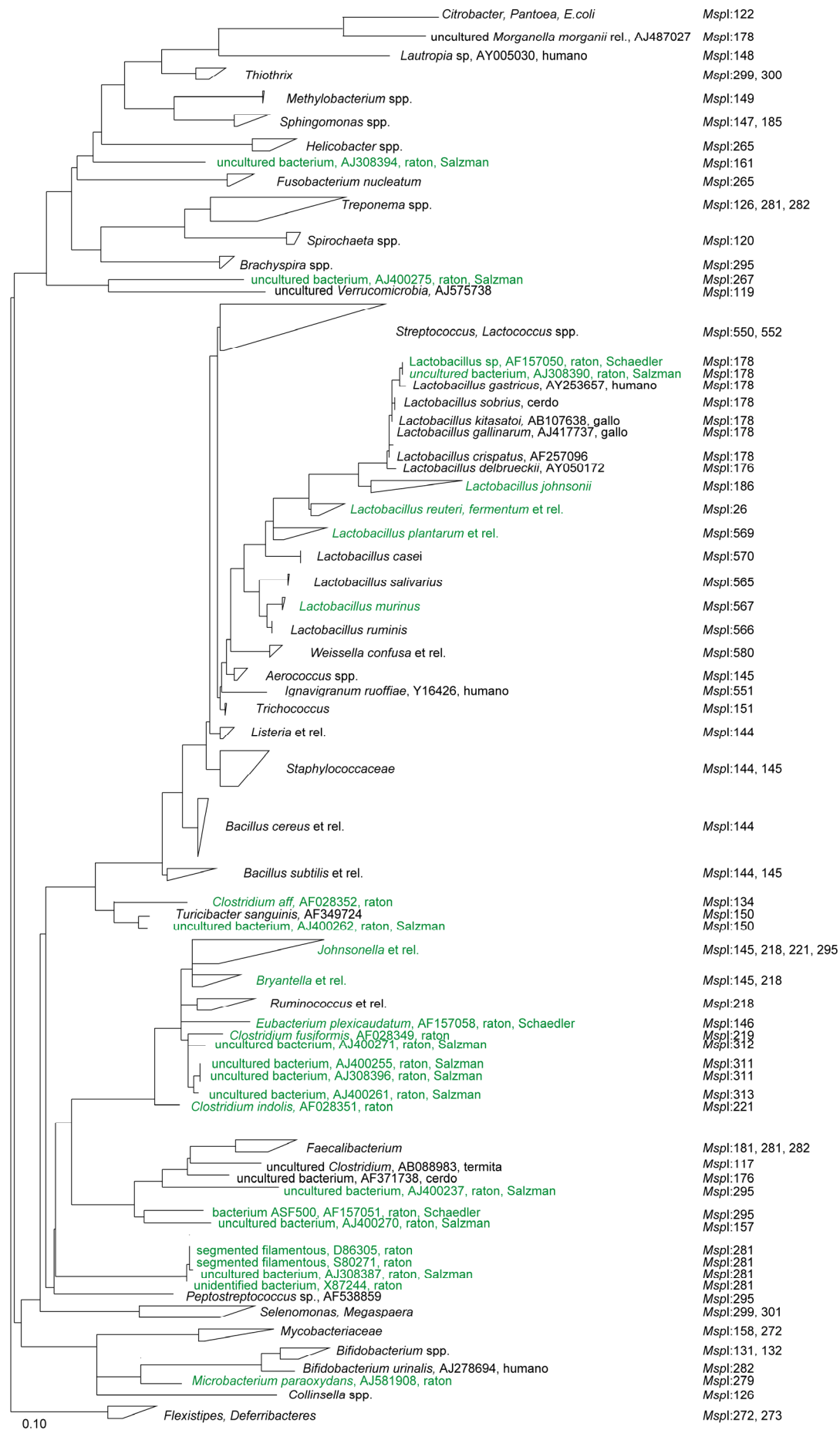


Fig. 54: Árbol filogenético de los fragmentos obtenidos por T-RFLP

En la siguiente figura se muestran los electroferogramas obtenidos de las distintas muestras de los cuatro grupos estudiados, destacando en naranja el pico correspondiente al grupo de las bacterias SFB. En éstos se determinó el aumento en la cantidad de bacterias pertenecientes al grupo SFB, pico correspondiente al tamaño de 281pb, presente principalmente en muestras de íleon de animales inmunocomprometidos.

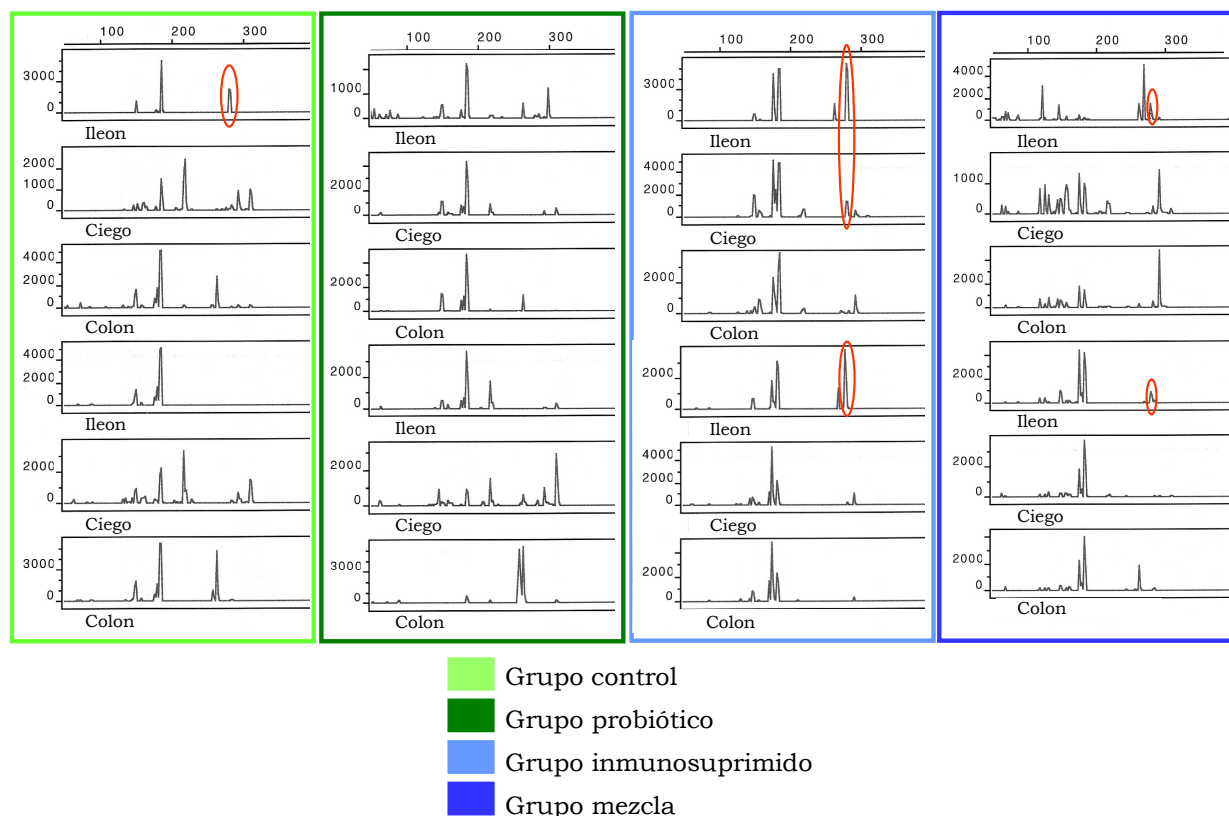


Fig. 55: Perfiles de T-RFLP de muestras de biopsias de íleon, ciego y colon. Destacado en naranja el pico correspondiente a las bacterias SFB.

E.V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

E.V.1. Heces

Se realizó el esquema de ordenación de la microbiota fecal en muestras de heces tomadas los días 1, 4, 7 y 9. Los días de toma de muestras se utilizaron como variables cualitativas. Los esquemas se realizaron mediante el análisis RDA con las intensidades de banda relativas de los geles de DGGE de la microbiota total (*T*) y específicos de lactobacilos (*L*). Sólo se muestran aquellas bandas que presentaron mayor relación con los dos ejes utilizados. Se muestran las variables ambientales con significancia estadística según el análisis de permutación Monte Carlo.

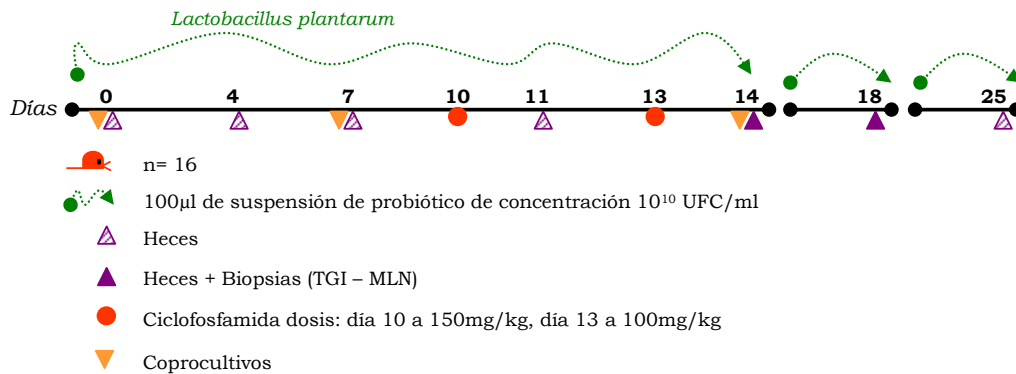


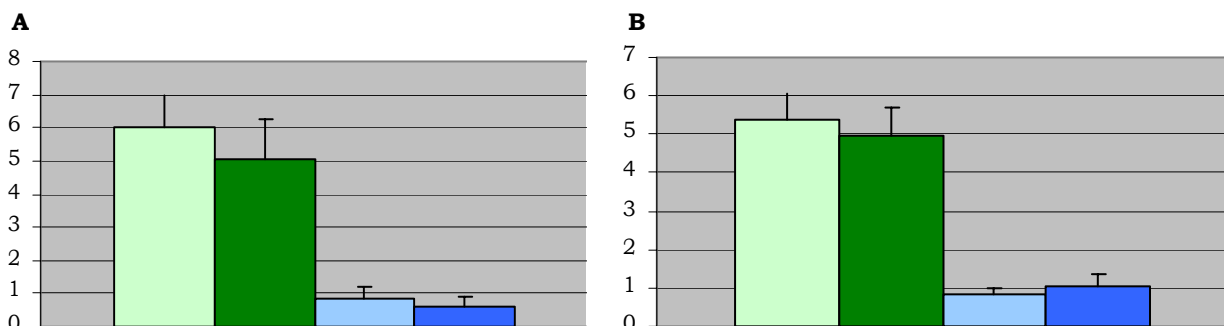
Fig. 58: Tratamiento a largo plazo en animales normales e inmunocomprometidos.

Se realizó la reacción de PCR con cebadores específicos del género *Lactobacillus* sobre el DNA obtenido de las biopsias de ganglios linfáticos mesentéricos, para la determinación de una posible translocación bacteriana de la cepa probiótica administrada. No se obtuvo producto de amplificación específico en ninguna de las muestras analizadas.

F.I. INMUNOSUPRESIÓN

Se estudió el efecto inmunomodulatorio de la administración de la cepa probiótica *L. plantarum* sobre el sistema inmune. La inducción del estado de inmunosupresión se realizó mediante inyección intraperitoneal de ciclofosfamida (Asta Medica, Prasfarma S.A.) como agente mielotóxico a una dosis de 150mg/Kg. el día 10 y de 100mg/Kg. el día 13.

Los recuentos de leucocitos de sangre periférica (PBL) se llevaron a cabo según descrito en bibliografía (Jimenez-Valera *et al.*, 2003). Para ello se tomaron muestras de sangre mediante punción retro-orbital con tubos capilares heparinizados en animales anestesiados.



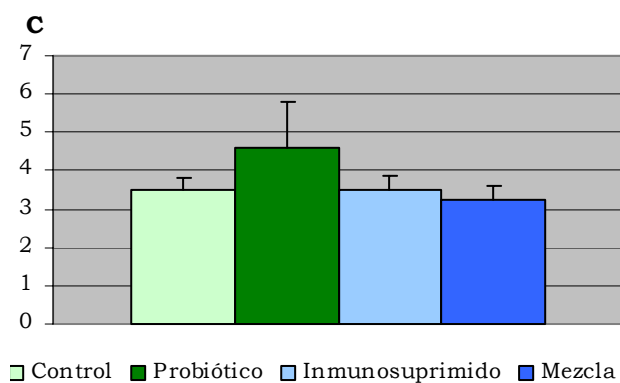


Fig. 59: Niveles de PBL ($\times 10^3$) por μl . **A.** Día 14. **B.** Día 18. **C.** Día 25. Los valores representan la media de la medida de 4 ratones por grupo \pm la desviación estándar.

Observamos como la administración de ciclofosfamida provocó una importante disminución en los recuentos de PBL tras 1 y 5 días de la última inyección (días 14 y 18) en los grupos inmunosuprimido y mezcla. El grupo probiótico mostró niveles similares al grupo control. El día 25, 12 días después de la última inyección del agente mielotóxico, los niveles de los grupos inmunosuprimido y mezcla volvieron a mostrar valores normales, presentando el grupo probiótico un ligero aumento de los mismos.

F.II. COPROCULTIVOS

Para la obtención del análisis más extenso de la microbiota fecal de ratones se decidió realizar el análisis de las muestras de heces mediante técnicas tradicionales de coprocultivo de ratones de los grupos control y probiótico. Se realizaron los coprocultivos de estos dos grupos para estudiar el efecto de la administración del microorganismo probiótico sobre la microbiota fecal, y comparar los resultados obtenidos mediante dos ensayos independientes (apartado D., tratamiento probiótico a largo plazo en ratones normales)

Se tomaron muestras de heces individualmente de animales marcados de los grupos control y probiótico en los días 0, 7 y 14. Se realizaron diluciones seriadas de las heces en tampón PBS+Cys hasta la dilución 10^{-10} , y se cultivaron 10 microlitros de cada dilución en 7 medios selectivos para los principales microorganismos presentes en heces. Las siembras se realizaron por triplicado en cada medio e individualmente para cada ratón. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 60, donde se representan las UFC por gramo de heces. En cada medio de cultivo ensayado se observó la evolución de cada animal a lo largo de 14 días de administración del probiótico.

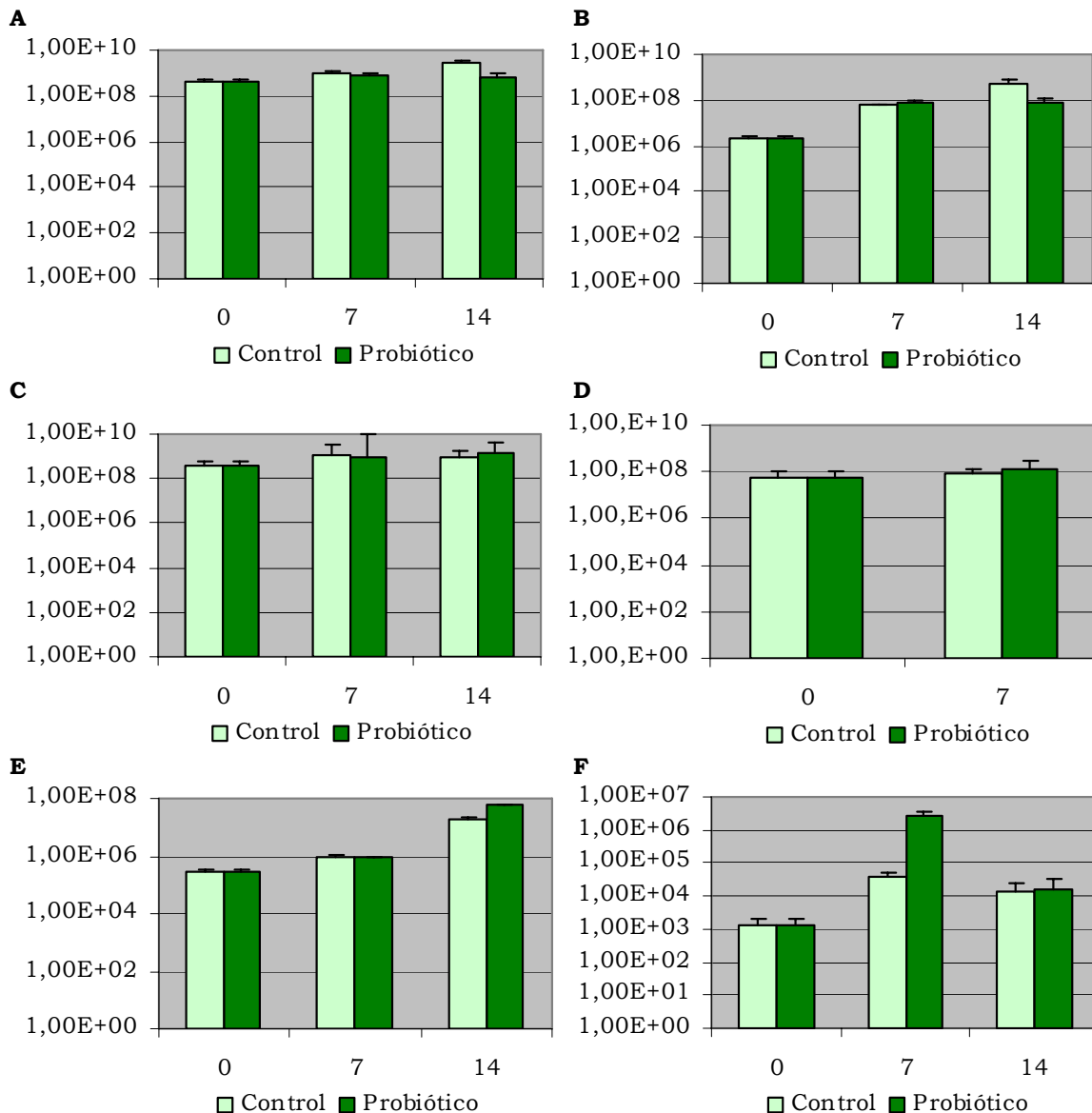


Fig. 60: Coprocultivos para los principales grupos de microorganismos presentes en heces. **A.** Anaerobios totales. **B.** Aerobios y anaerobios facultativos. **C.** Lactobacilos. **D.** Bifidobacterias. **E.** Enterobacterias. **F.** Clostridios.

En el recuento del día 14 del medio para bifidobacterias no se obtuvo crecimiento, posiblemente debido a algún error en la preparación del medio. Tampoco se detectó crecimiento de levaduras en este ensayo por encima de 10UFC/g heces.

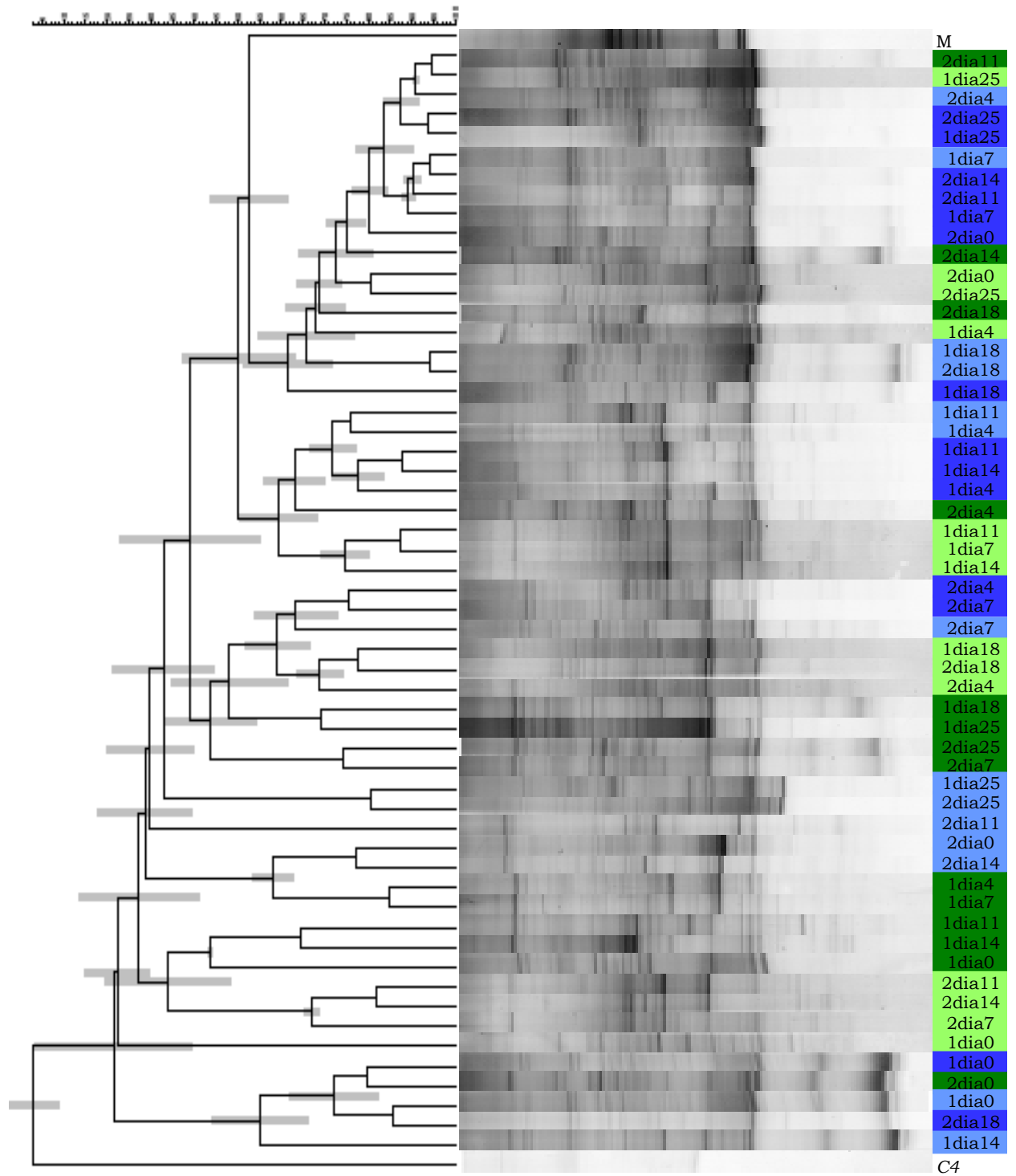
Existe una gran estabilidad en la composición de la microbiota fecal de cada individuo, estabilidad que se mantiene incluso con el tratamiento probiótico. Es decir, no existe una alteración de la composición de la microbiota intestinal por este tratamiento. Los microorganismos anaerobios totales presentaron valores de alrededor de 10^9 UFC/g heces, no observándose tampoco un cambio significativo en los niveles de lactobacilos o bifidobacterias en ninguno de los dos grupos animales. Se observó un incremento importante en los recuentos obtenidos del medio agar sangre, medio para microorganismos

aerobios y anaerobios facultativos, pasando de niveles de 10^6 UFC/g heces a 10^9 UFC/g heces en el grupo control, siendo algo menor en el grupo probiótico, 10^8 UFC/g heces. Esto corresponde con un incremento en los recuentos obtenidos del grupo de las enterobacterias en el día 14 en animales control y probiótico. También se observó un aumento en los niveles de clostridios tras 7 días de la administración del probiótico, los cuales vuelven a igualarse con el grupo control en el día 14, lo que puede deberse a un efecto transitorio sobre la microbiota endógena por la administración de la cepa probiótica (Alander *et al.*, 1999; Dunne *et al.*, 1999).

F.III. DGGE

Para la caracterización molecular de la microbiota fecal e intestinal de ratones en los cuatro grupos estudiados, se realizó el análisis mediante PCR-DGGE de las muestras de heces de los días 0, 4, 7, 11, 14, 18 y 25 y biopsias del tracto gastrointestinal completo de los días 14 y 18. No se analizaron las biopsias del día 25 al considerar que cualquier efecto del tratamiento inmunosupresor sobre la microbiota gastrointestinal se habría recuperado tras 12 días desde la última inyección de ciclofosfamida. Las muestras se analizaron mediante PCR-DGGE universal para la caracterización de la microbiota total presente así como específica para el género *Lactobacillus*. Los geles se normalizaron y analizaron mediante el programa informático Bionumerics para la comparación de los perfiles obtenidos de las distintas muestras. En la figura 61 se muestran los resultados obtenidos del análisis de las muestras fecales, tanto de la microbiota total como específico de lactobacilos.

A



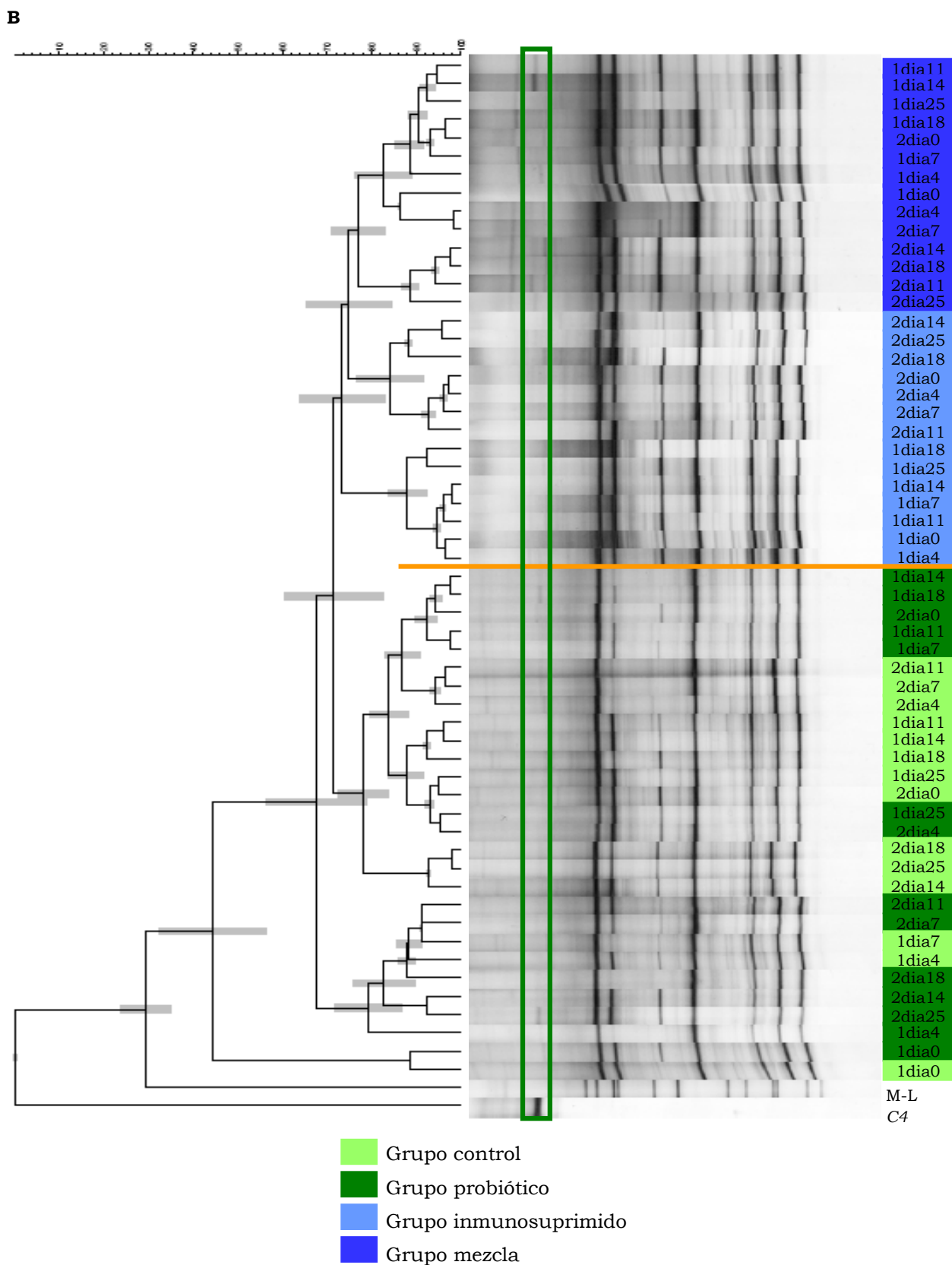
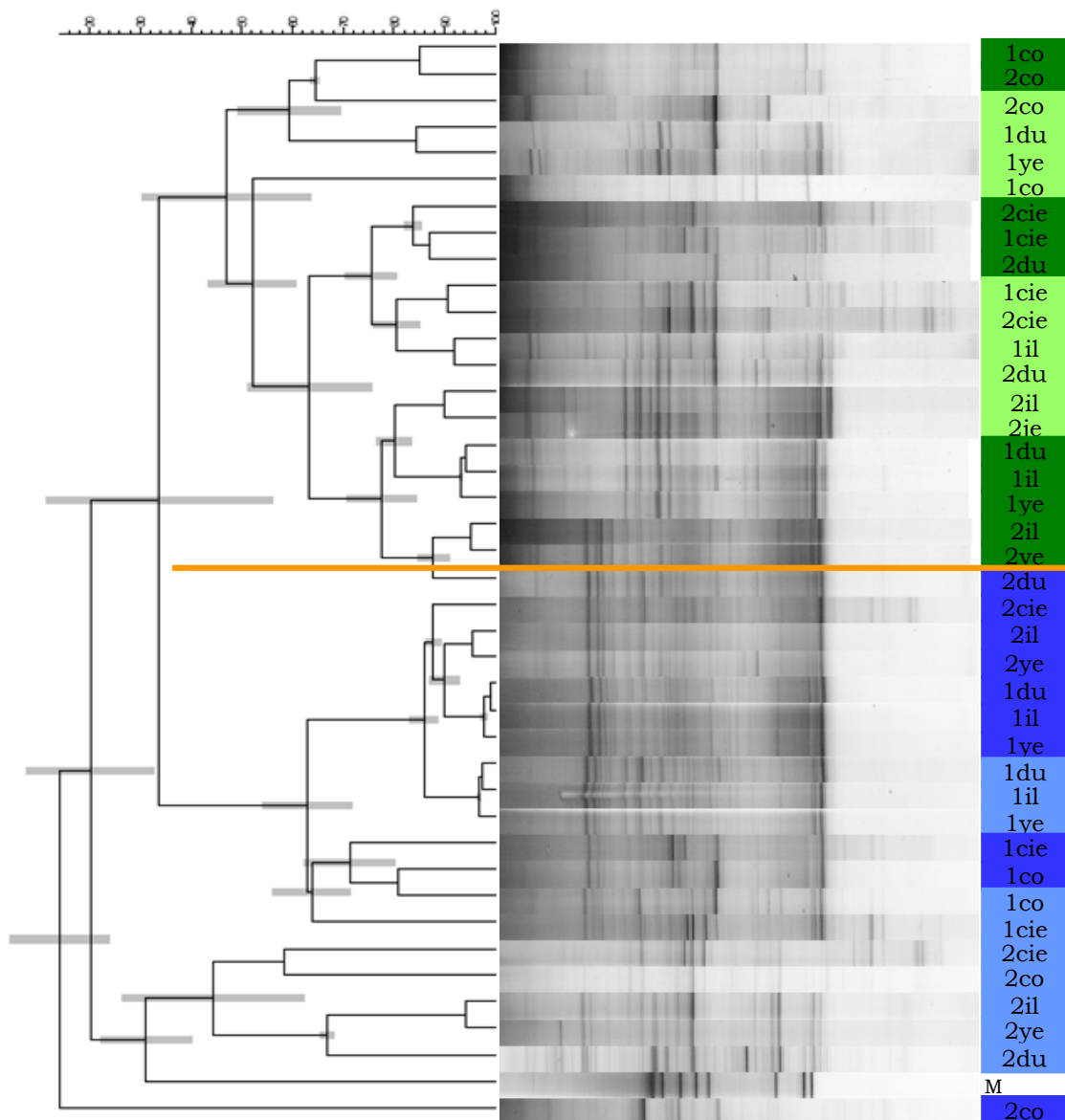


Fig. 61: DGGE de muestras de heces. **A.** Microbiota total. **B.** Específico de lactobacilos. M, M-L: Marcador de DGGE. C4: *L. plantarum*.

En el análisis de la microbiota total se observó de nuevo una elevada diversidad de las especies presentes o del número de bandas, sin formarse

ninguna agrupación por tratamientos o días de toma de muestra. Por el contrario se observó una clara separación por grupos en el perfil específico de lactobacilos, con agrupación entre los animales control y probiótico frente a los que recibieron la inyección de ciclofosfamida. En el grupo inmunosuprimido se observó separación incluso por animales, con similitud entre los perfiles obtenidos del ratón 1 del $88.04 \pm 4.19\%$ y del $84.10 \pm 7.27\%$ para el ratón 2, siendo este porcentaje de un 72% entre ellos. En la zona correspondiente al agrupamiento de las muestras obtenidas de los animales control y probiótico existe una mayor mezcla entre grupos, con similitud entre grupos del $78.03 \pm 5.53\%$. Se detectó la presencia de la cepa probiótica administrada en algunas de las muestras obtenidas de los grupos probiótico y mezcla.

A



B

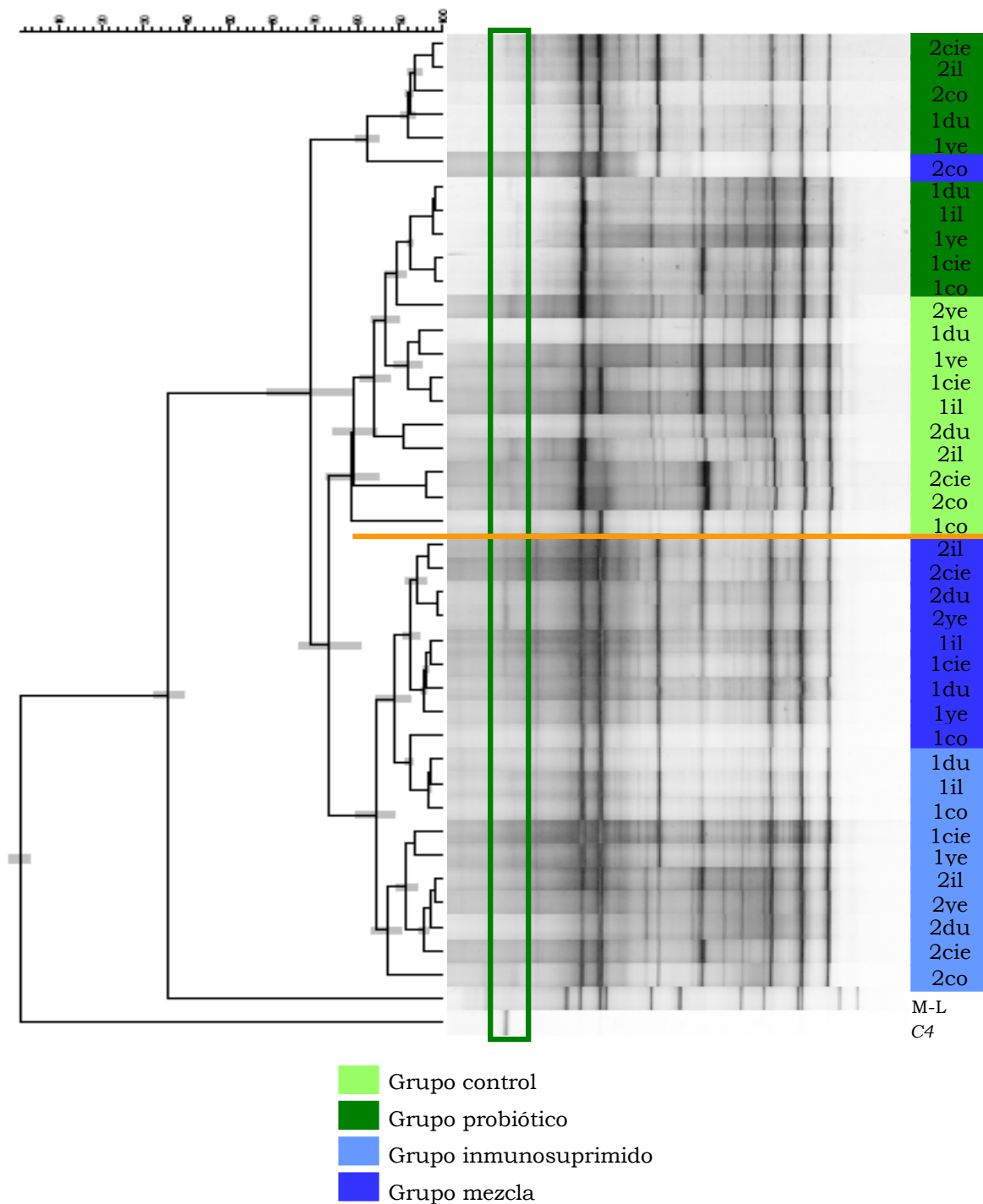


Fig. 62: DGGE de muestras de biopsias del tracto gastrointestinal del día 14. **A.** Microbiota total, gradiente 30-60%. **B.** Específico de lactobacilos, gradiente 30-55%. Du: duodeno; ye: yeyuno; il: íleon; cie: ciego; co: colon. M, M-L: Marcador de DGGE. C4: *L. plantarum*.

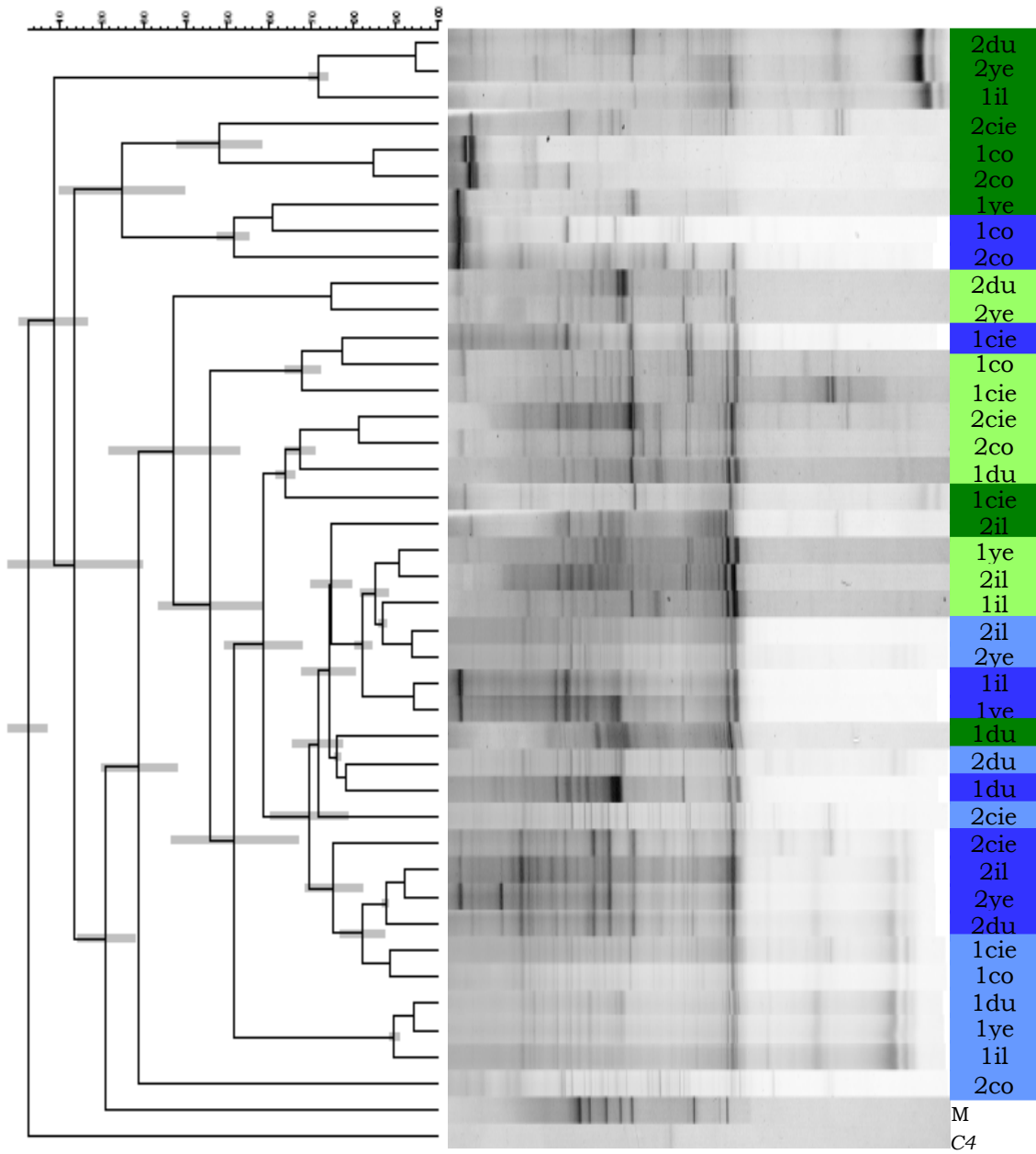
En el análisis de los geles obtenidos de las biopsias del día 14 se observó una clara agrupación entre animales inmunocomprometidos y ratones sanos, presentando los perfiles de los grupos control y probiótico mayor similitud entre ellos, de aproximadamente un 50%, frente al 20% que presentan los grupos inmunosuprimido y mezcla. Esto puede deberse a una alteración de la

microbiota intestinal provocada por el tratamiento inmunosupresor la cual es más acusada que la posible alteración provocada por la administración de la cepa probiótica, al ser los perfiles de los animales del grupo probiótico muy similares a aquellos del grupo control.

Esta agrupación observada en el análisis de la microbiota total se repite en los geles de DGGE específicos para lactobacilos. Se detectó un bajo nivel de colonización de la cepa administrada de *L. plantarum* en biopsias del grupo probiótico, algo más intensa en el grupo mezcla. Así mismo aparecen unas bandas débiles que pueden corresponder a esta bacteria en muestras de ratones control. Esto puede estar relacionado con el alto nivel de aislados de *L. plantarum* obtenidos de muestras fecales en el ensayo realizado previamente en animales sanos (apartado D.V.).

La separación por grupos según el estado del sistema inmune es mucho menor en los perfiles obtenidos del análisis de la microbiota total de biopsias del día 18, 5 días después de la última inyección del agente mielotóxico, aunque se mantiene en los geles específicos de lactobacilos según se muestra en la siguiente figura.

Día 18
A



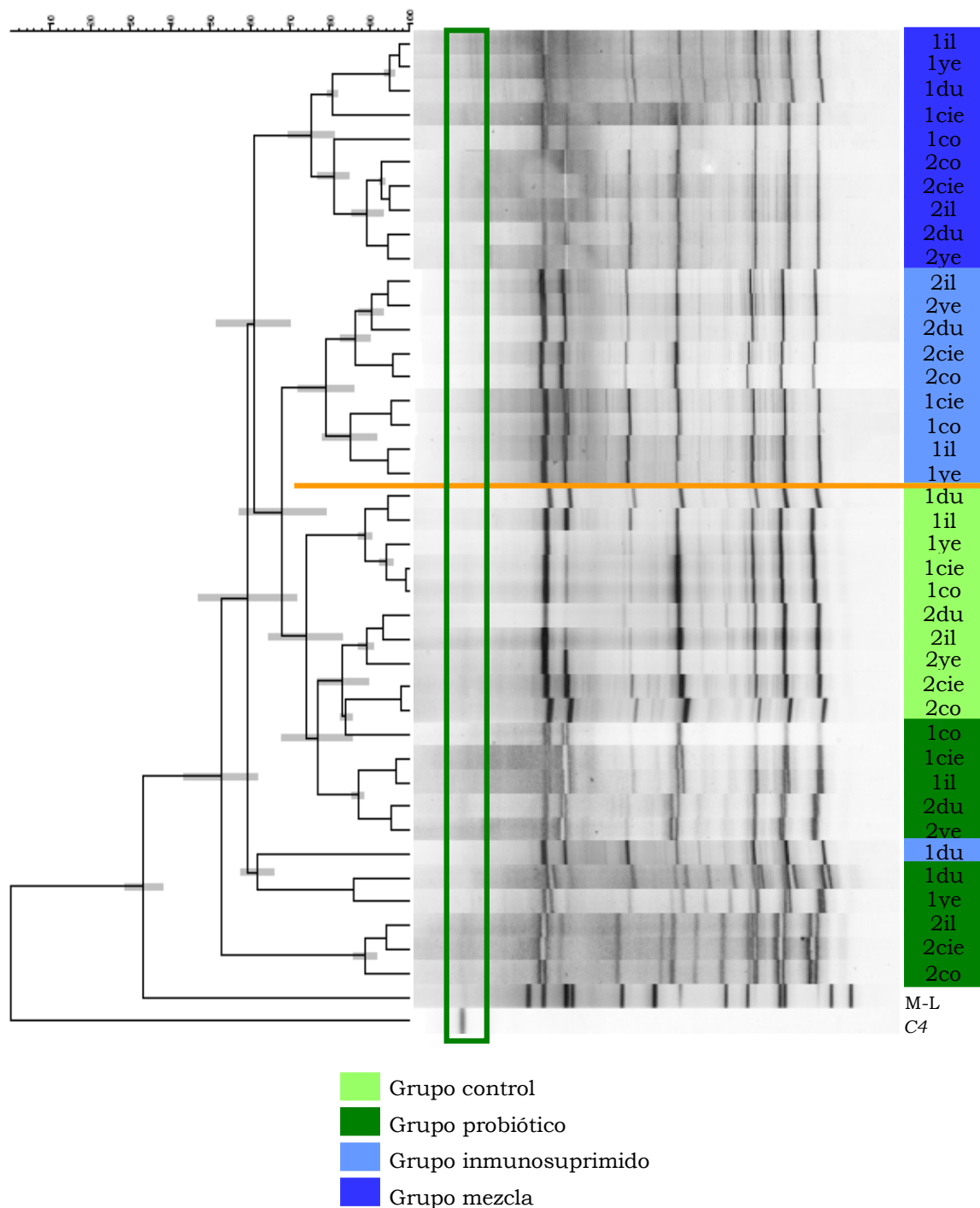
B

Fig. 63: DGGGE de muestras de biopsias del tracto gastrointestinal en el día 18. **A.** Microbiota total. **B.** Específico de lactobacilos. Du: duodeno; ye: yeyuno; il: íleon; cie: ciego; co: colon. M, M-L: Marcador de DGGGE. C4: *L. plantarum*.

No se detectó colonización por la cepa de *L. plantarum* en ninguna de las muestras de biopsias analizadas. La separación entre los grupos inmunocomprometidos es más clara que entre los grupos control y probiótico.

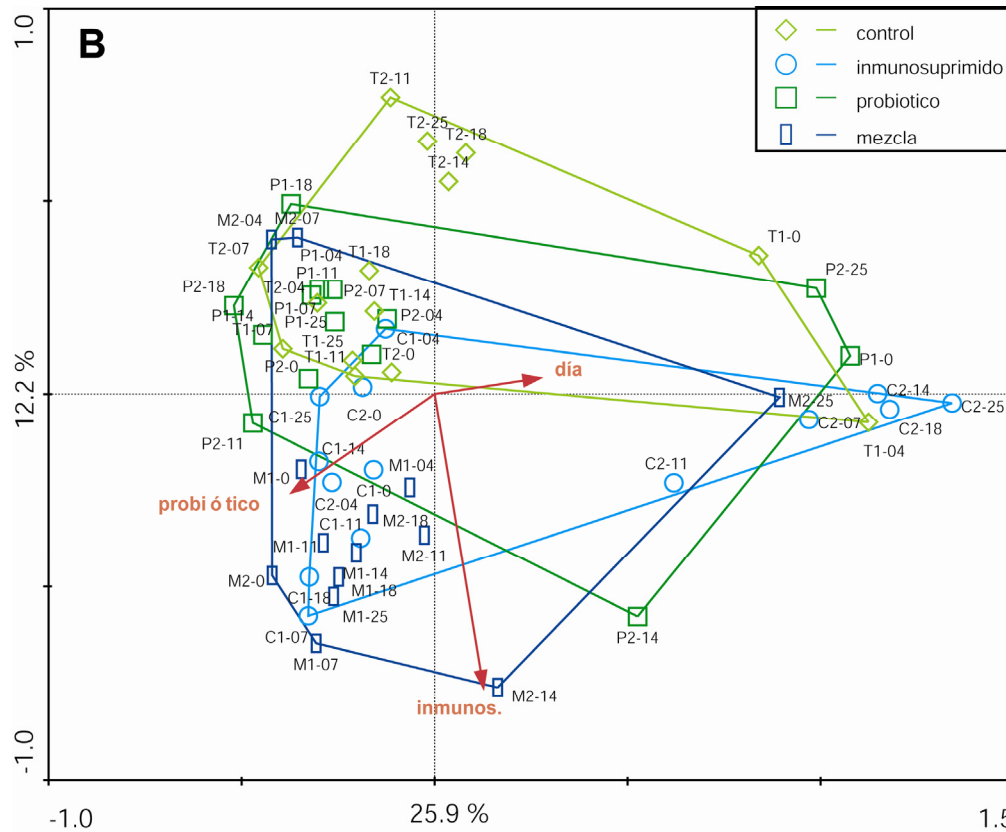


Fig. 64: Esquemas de ordenación de los resultados obtenidos del análisis de las muestras fecales. **A.** Análisis RDA. **B.** Análisis PCA.

F.IV.2. Biopsias

Se realizaron los diagramas de ordenación de la microbiota gastrointestinal de las distintas zonas (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon) y la respuesta de ésta a los distintos tratamientos. Los esquemas se realizaron mediante el análisis RDA con las intensidades de banda relativas de los geles de DGGE. Los valores mostrados en los ejes corresponden con el tanto por ciento de variables que pueden explicarse mediante estos ejes. Sólo se muestran aquellas bandas de DGGE con mayor similitud con los ejes. Las iniciales *T*: y *L*: indican bandas de DGGE de la microbiota total o específico de lactobacilos respectivamente. En la figura 65, **A**, se utilizaron todas las variables ambientales para el análisis, y sólo se muestran aquellas con mayor significancia estadística según el análisis de permutación Monte Carlo. En la figura B las variables relacionadas con los tratamientos (probiótico e inmunosupresor) se utilizaron como variables ambientales mientras que la localización de la muestra en el tracto gastrointestinal se utilizó como covariable para eliminar su efecto.

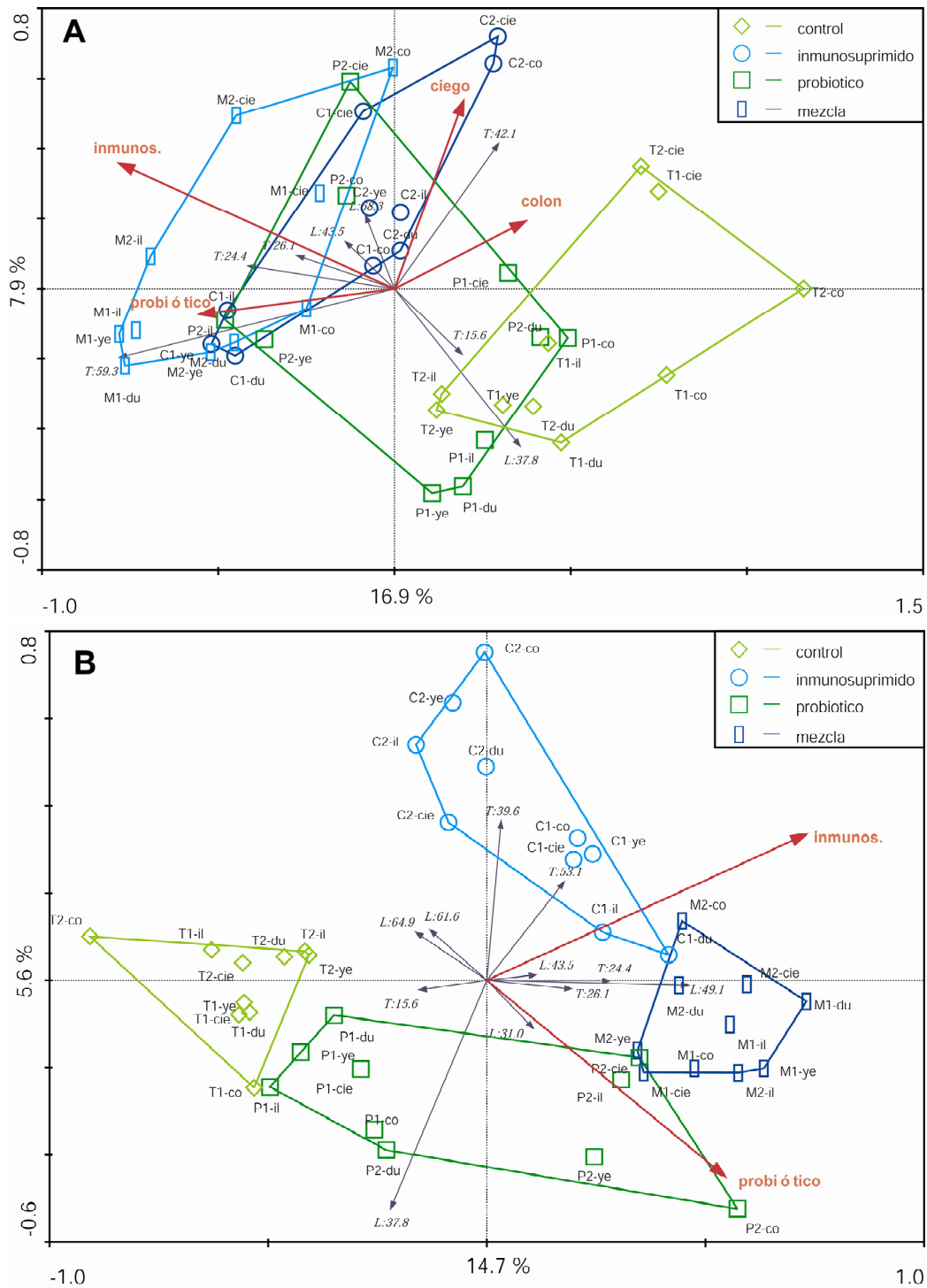


Fig. 65: Esquema de ordenación de los resultados obtenidos del análisis de la microbiota gastrointestinal. **A.** Todas las variables. **B.** Zona anatómica utilizada como covariable.

G. ACCIÓN DE PROBIÓTICOS EN UN MODELO DE INFLAMACIÓN INTESTINAL

El modelo murino de enfermedad inflamatoria intestinal se realizó provocando una respuesta inflamatoria en colon similar a la fase aguda del la

enfermedad de Crohn con el agente químico TNBS administrado mediante cánula anal. El ensayo se realizó según se muestra en la siguiente figura.

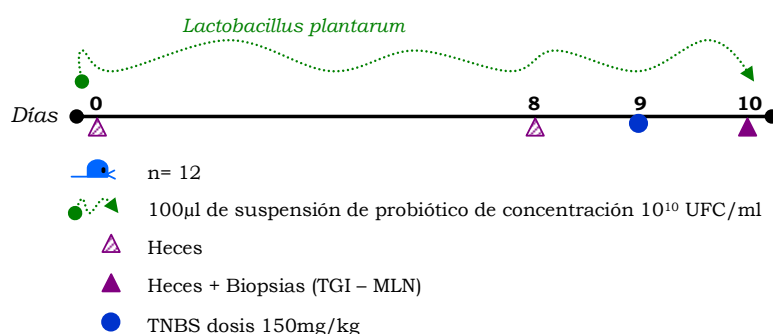


Fig. 66: Ensayo en animales modelo de IBD.

Los ensayos se realizaron sobre cuatro grupos de animales: control, probiótico, animales control que recibieron el tratamiento inflamatorio y un grupo mezcla de probiótico más TNBS. Éste fue administrado a animales anestesiados a una dosis de 150mg/Kg de ratón, en solución al 50% de etanol. El grupo control recibió la misma dosis de una mezcla de agua y etanol al 50%.

Se realizó la reacción de PCR con cebadores específicos del género *Lactobacillus* sobre el DNA obtenido de las biopsias de ganglios linfáticos mesentéricos, para la determinación de una posible translocación bacteriana de la cepa probiótica administrada. No se obtuvo producto de amplificación específico en ninguna de las muestras analizadas.

G.I. RESPUESTA INFLAMATORIA

Para la determinación de la respuesta inflamatoria se seccionó un fragmento de 0.5cm de biopsia de colon de cada ratón para su conservación en RNAlater® con el fin de evitar la degradación del RNA del tejido. Posteriormente se procedió a la extracción de mRNA y determinación de la expresión de citoquinas proinflamatorias mediante RT-PCR cuantitativa.

La cuantificación de la expresión de TNF- α , IL-1 β e IL-6 se realizó mediante PCR cuantitativa con cebadores específicos utilizando como control interno la transcripción del gen codificante de actina, al tener ésta una expresión basal similar en todas las muestras. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura.

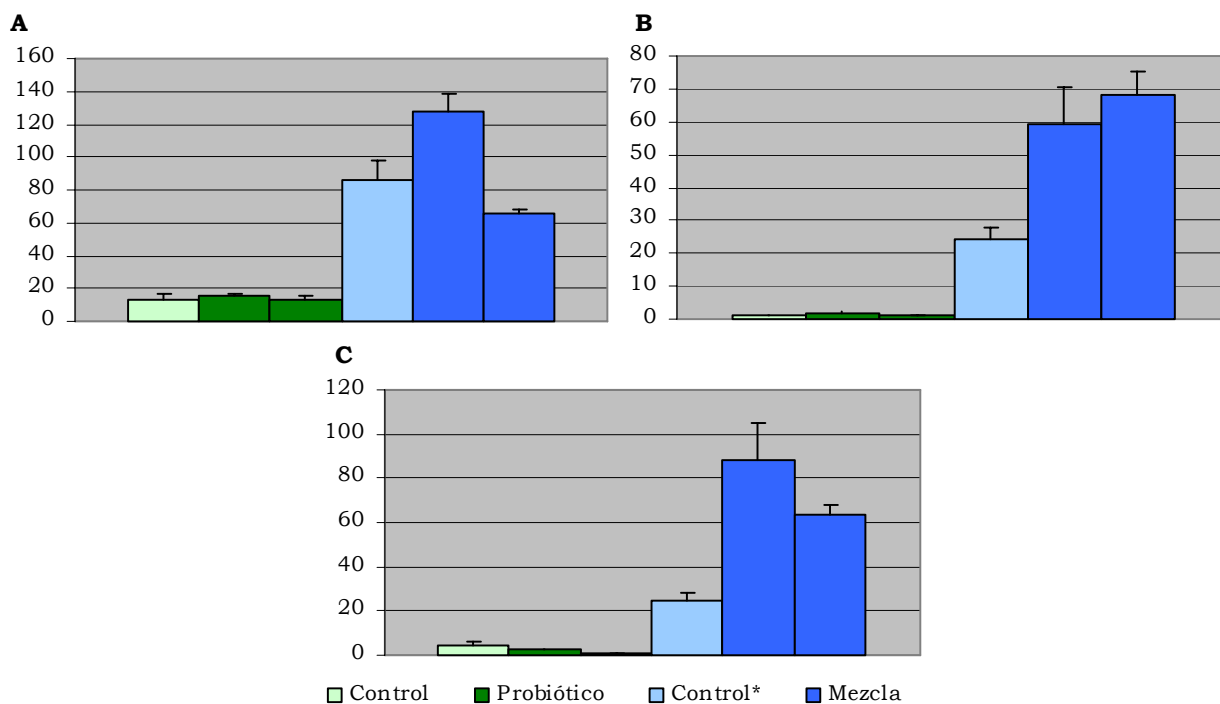


Fig. 67: Cuantificación de la expresión de citoquinas representado en % frente a Actina. **A.** TNF- α . **B.** IL-1 β . **C.** IL-6. Los grupos analizados fueron control, probiótico, control con tratamiento inflamatorio (control*) y mezcla de probiótico con TNBS.

Se observó una clara inducción en la expresión de las 3 citoquinas proinflamatorias analizadas en ambos grupos que recibieron la dosis del agente químico TNBS. Esta respuesta es incluso superior en aquellos animales que recibieron además la dosis diaria de *L. plantarum*. Este efecto del probiótico administrado sólo ocurre en combinación con el agente TNBS, ya que la administración del probiótico por sí solo no provocó el efecto inflamatorio. Según descrito en bibliografía algunas cepas de lactobacilos modulan las funciones inmunes de la mucosa intestinal cuando se administran por vía oral. Algunas promueven la respuesta Th1, respuesta inmune humoral, a través de la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β o TNF- α , mientras que otras cepas son inmunosupresoras. La activación de la respuesta inmune por cepas del género *Lactobacillus* puede ser incluso superior cuando se asocia el tratamiento probiótico a otros factores como infección por virus o bacterias patógenas (Maassen *et al.*, 2000). Esto se podría aplicar también a la situación de inducción de un proceso inflamatorio mediante agentes químicos. Se ha demostrado que la atenuación o potenciación de algunas enfermedades autoinmunes depende de la cepa utilizada, asociada las distintas cepas de lactobacilos con un determinado perfil de inducción de la expresión de citoquinas (Bleau *et al.*, 2005).

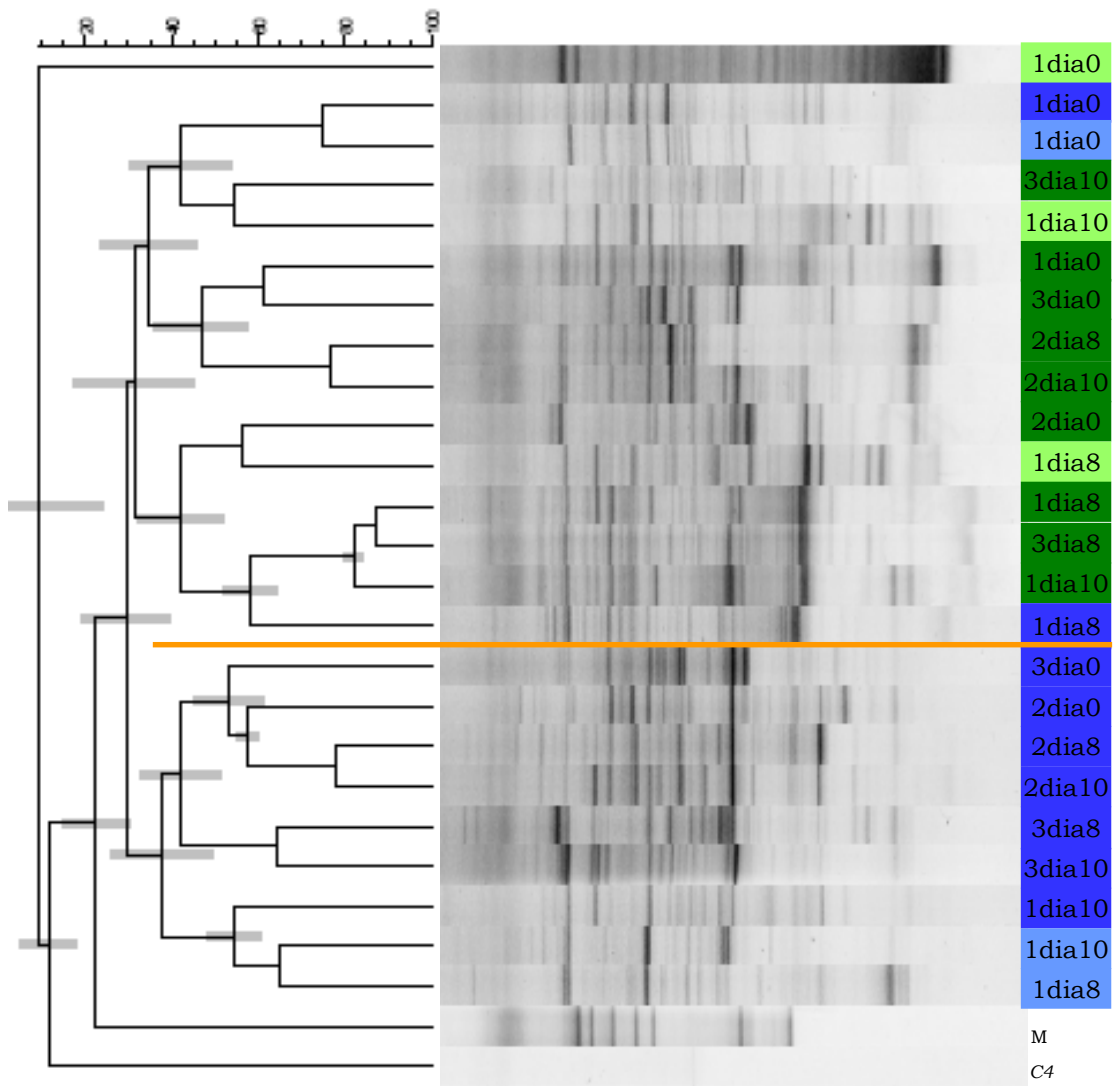
G.II. DGGE

Para el análisis de la microbiota fecal e intestinal mediante PCR-DGGE, se tomaron muestras de heces los días 0, 8 y 10 de manera individual de ratones marcados de cada grupo. El día 10 también se tomaron biopsias del tracto gastrointestinal completo y de ganglios linfáticos mesentéricos. Todas las muestras se analizaron mediante PCR tanto universal para la microbiota total como específica del género *Lactobacillus*.

En el análisis de la microbiota fecal total se observó gran diversidad de todas las muestras tomadas, con cierta agrupación de los grupos que recibieron la dosis de TNBS, excepto de algunas muestras del día 0, momento en el cual todos los animales se encontraban en las mismas condiciones (fig. 68, **A**).

En el perfil específico para el grupo de los lactobacilos se detectó una gran excreción de la bacteria probiótica en el grupo mezcla en el día 10 (fig. 68, **B**). No se detectó la presencia del probiótico en ninguna de las otras muestras, ni de los mismos animales en días anteriores ni del mismo día del grupo probiótico sin TNBS. Esto sugirió que el estado inflamatorio podría tener influencia durante el proceso de colonización o en la capacidad de eliminación durante la administración de microorganismos probióticos.

A



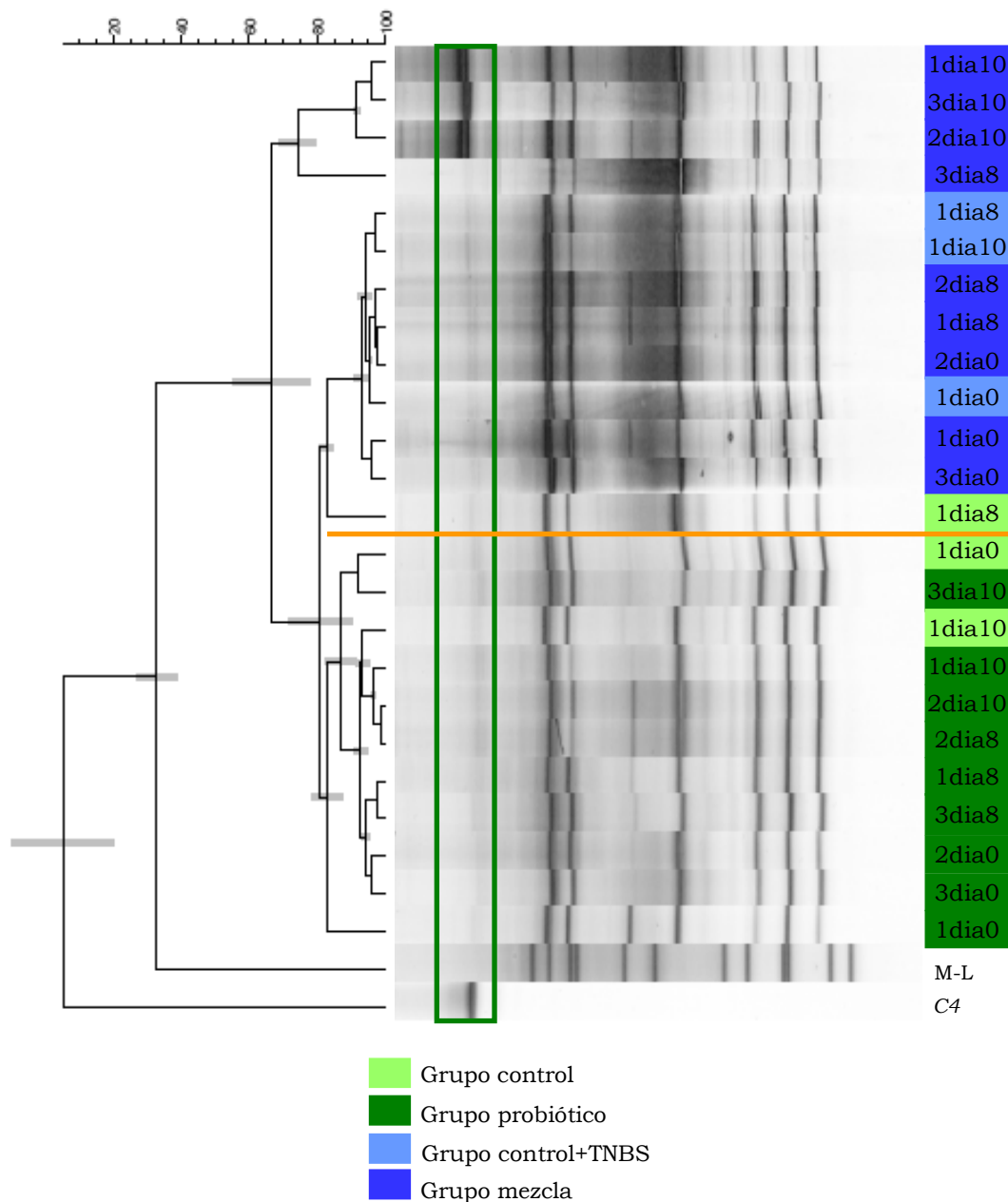
B

Fig. 68: DGGE de muestras de heces. **A.** Microbiota total. **B.** Específico de lactobacilos. M: Marcador de DGGE. C4: *L. plantarum*.

En el análisis de la microbiota total de las muestras de biopsias tomadas de los distintos animales estudiados, se observó de nuevo gran diversidad de los distintos perfiles, con cierta agrupación entre aquellos animales que presentaron el proceso inflamatorio. La mayoría de las muestras tomadas del grupo probiótico formaron un grupo apartado del resto (fig. 69, **A**). En biopsias de colon de animales con proceso inflamatorio se detectó muy baja diversidad, con la presencia de una banda de mayor intensidad (recuadro rojo) frente al resto de las bandas presentes en estos perfiles (circulo rojo). Esta banda también está presente en muestras de colon de animales control, aunque la diversidad es mayor en este perfil. Para la identificación de la banda se realizó

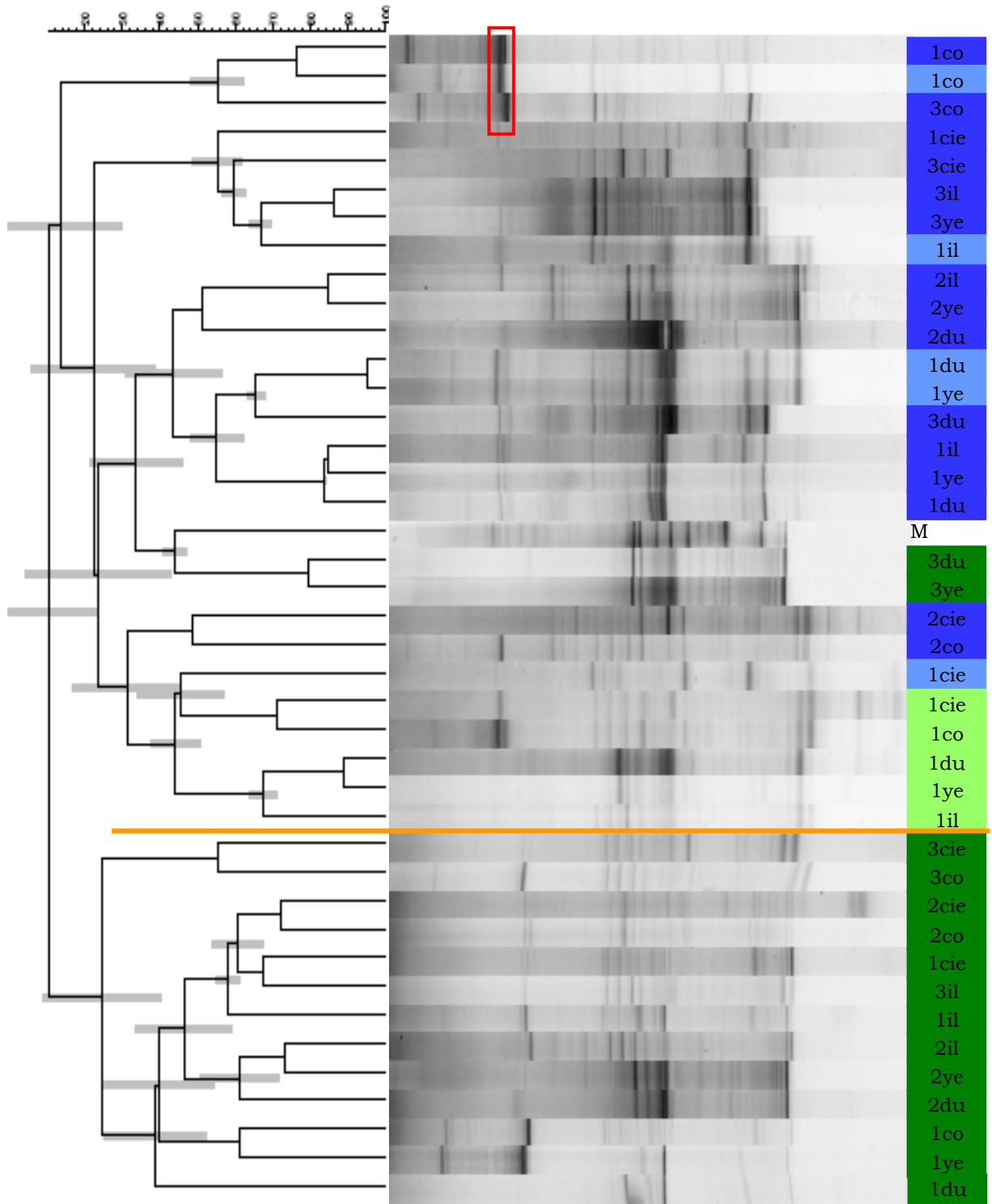
el clonaje y secuenciación del producto de PCR de tamaño aproximado a 450pb de la muestra de biopsia de colon de un animal del grupo mezcla. Se seleccionaron 48 clones, 18 de los cuales se analizaron frente al perfil original para la identificación de la banda. Prácticamente todos los clones analizados correspondieron con la banda más intensa presente en los perfiles a excepción del clon 38. Finalmente se identificó la banda como perteneciente al género *Helicobacter*, especie previamente aislada en muestras fecales de ratones de laboratorio según aparece en el título de las secuencias con las que se obtuvo mayor % de similitud en la base de datos del NCBI (“*Helicobacter rodentium* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from laboratory mice”). Este género también se detectó en elevado número en muestras de colon de ratones determinado mediante T-RFLP (apartado E.IV.). Los resultados de secuenciación se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 15: Resultados de secuenciación

Clon	Origen	Especie más próxima	“Identities”	“Gaps”	% similitud
38	<i>Biopsia colon</i>	<i>*Uncultured bacterium clone</i>	421/427	0/427	98
	<i>Grupo mezcla</i>	<i>Clostridium-like sp.</i>	328/361	0/361	90
39		<i>Helicobacter sp.</i>	434/435	0/435	99
41		<i>Helicobacter sp.</i>	434/435	0/435	99
44		<i>Helicobacter mesocricetorum</i>	218/228	0/228	95

* “The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage” (Backhed *et al.*, 2004)

A



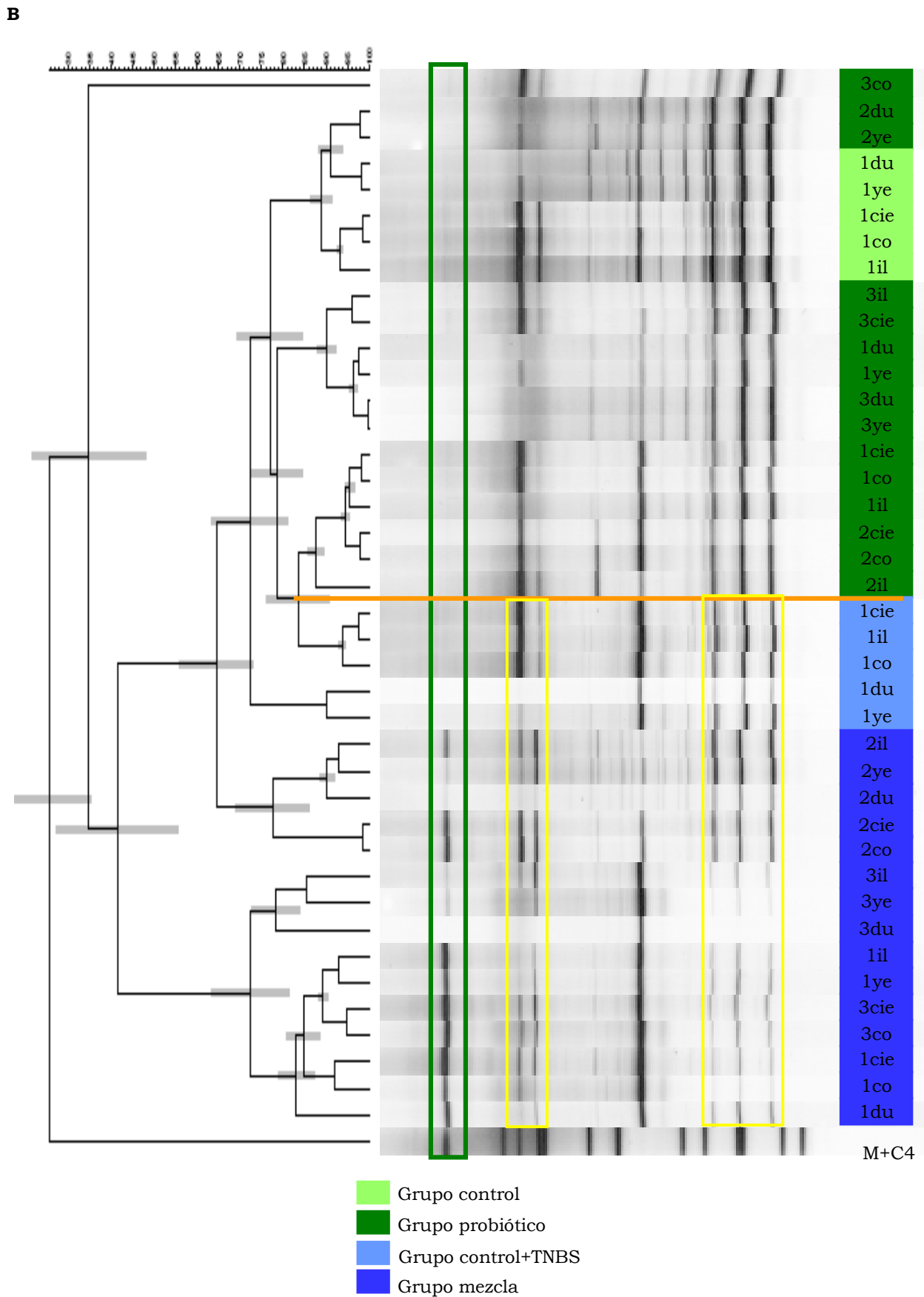


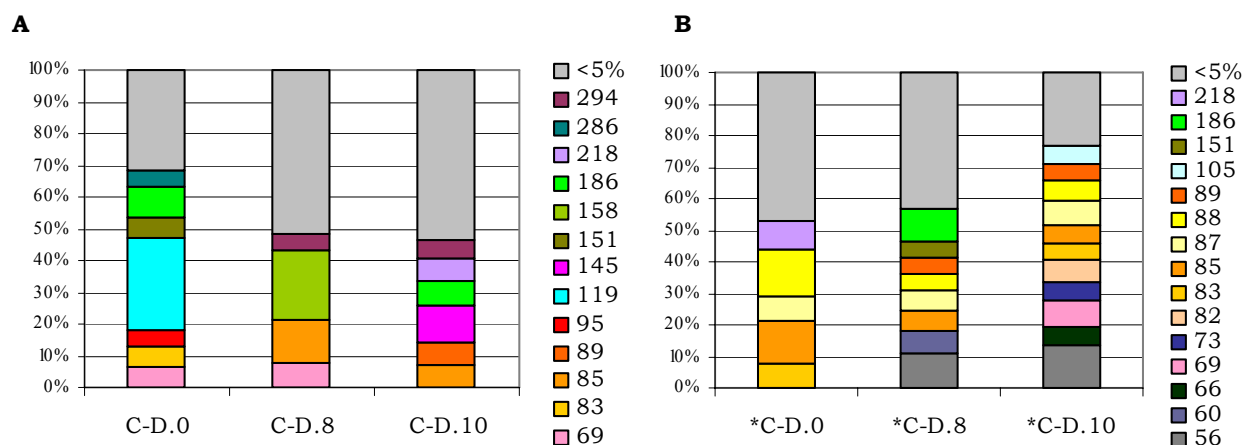
Fig. 69: DGGE de muestras de biopsias del tracto gastrointestinal. **A.** Microbiota total. **B.** Especifico de lactobacilos. Du: duodeno; ye: yeyuno; il: íleon; cie: ciego; co: colon. M, M-L: Marcador de DGGE. C4: *L. plantarum*.

En el perfil específico del género *Lactobacillus* se volvió a observar agrupación según el estado inflamatorio de los animales. Se detectó la presencia de la cepa probiótica de *L. plantarum* en prácticamente todas las muestras de biopsia del grupo mezcla, sin aparecer en aquellas de animales del grupo probiótico. En los perfiles de los grupos control + TNBS y mezcla aparecen con mucha menor intensidad el resto de las bandas de lactobacilos comparados con los grupos control o probiótico. Especialmente se observa disminución en la intensidad de las bandas pertenecientes a las especies de *L. reuteri*, *L. helveticus* y *L. johnsonii*, frente a una mayor intensidad en la correspondiente a *L. murinus* (recuadros amarillos).

Estos datos obtenidos del perfil específico de lactobacilos así como los obtenidos del análisis de la microbiota total y del estudio mediante secuenciación de especies mayoritarias presentes en las mismas, confirman el efecto que el proceso inflamatorio ejerce sobre la composición de la microbiota intestinal, tanto cualitativa como cuantitativamente.

G.III. T-RFLP

Con el fin de comparar los resultados obtenidos de la caracterización de la microbiota total mediante PCR-DGGE, se realizó el análisis por T-RFLP de las muestras de heces de los cuatro grupos de los días 0, 8 y 10. Cada tamaño de fragmento detectado se comparó con bases de datos para asignar la especie o posibles especies que lo producen. Con el fin de simplificar las gráficas obtenidas de este ensayo, sólo se muestran aquellos fragmentos cuya presencia sea >5% del total de las especies presentes en heces. Los fragmentos restantes presentes en cantidades <5% se representan en un mismo grupo. Cada pico representado en las gráficas corresponde al tamaño que se indica ± 1 ó 2pb, margen de error para esta técnica.



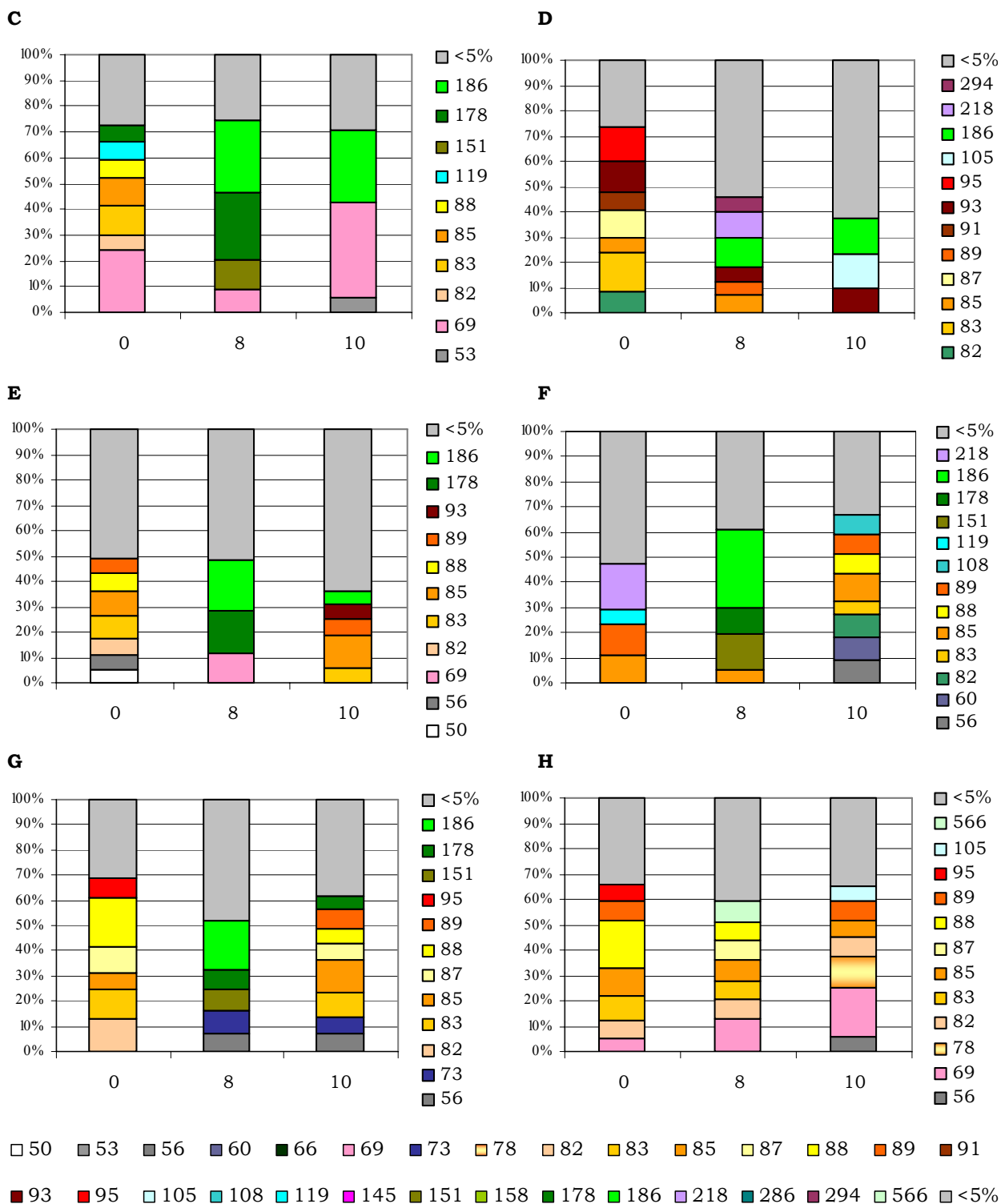


Fig. 70: Perfiles de T-RFLP de muestras de heces. **A.** Grupo control. **B.** Grupo control + TNBS. **C-E.** Grupo probiótico. **F-H.** Grupo mezcla (probiótico + TNBS).

Se observó una gran diversidad de especies presentes en las muestras fecales de todos los grupos, siendo mayor esta diversidad en el día 10 (posterior a la inducción del proceso inflamatorio) en el grupo que recibió el tratamiento con TNBS. En tonos anaranjados se muestran los fragmentos asociados al género *Bacteroides* (tamaños de 83-96). En tonos verdes se muestran aquellos fragmentos obtenidos por especies del género *Lactobacillus*, siendo

especialmente abundante el 186 de *L. johnsonii*, como se observó en otros ensayos. Se construyó un árbol filogenético con todos los fragmentos o especies obtenidas del análisis de las muestras fecales mediante T-RFLP. En verde destacamos las especies previamente descritas en el tracto gastrointestinal de ratones (Orcutt *et al.*, 1987; Dewhirst *et al.*, 1999; Salzman *et al.*, 2002). También se indican aquellas secuencias que corresponden con especies descritas en humano, caballo, cerdo, termita o gallo.

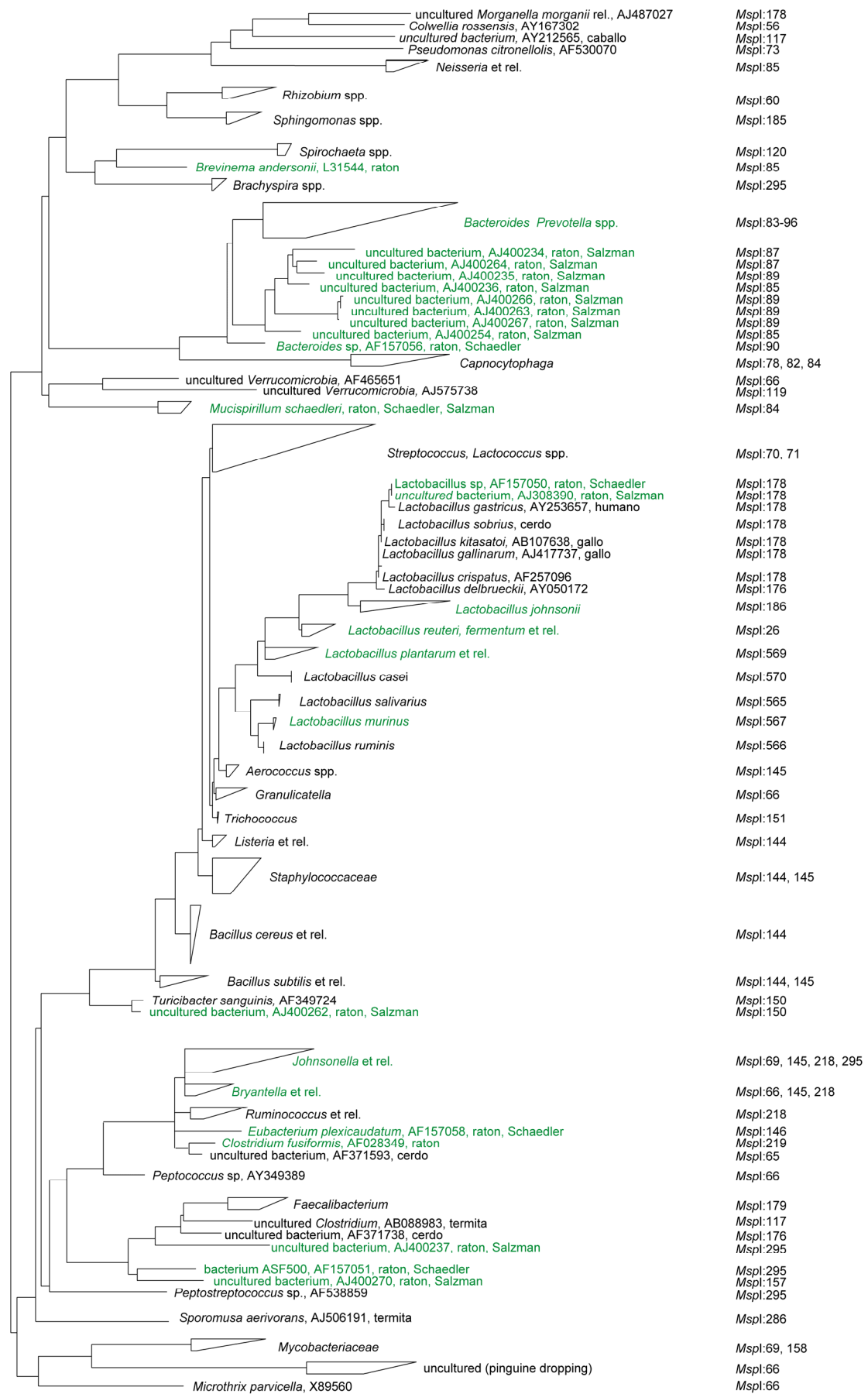
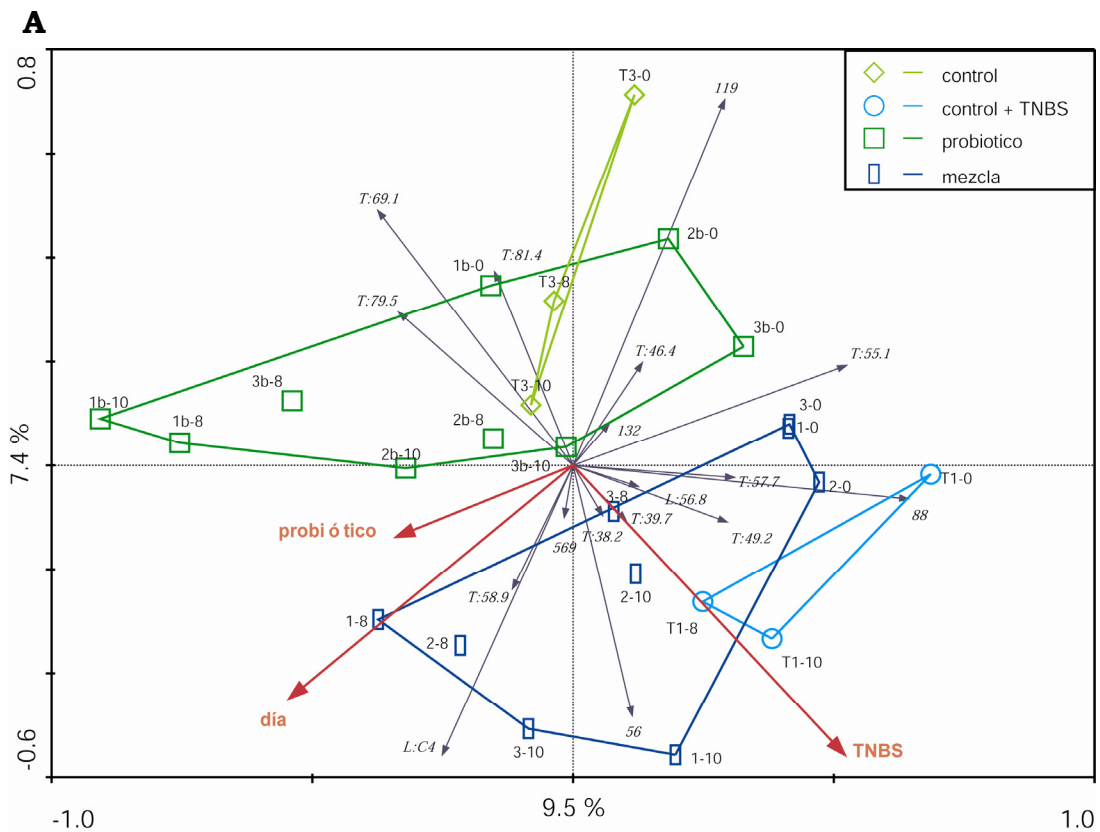


Fig. 71: Árbol filogenético de los fragmentos obtenidos por T-TFLP

G.IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

G.IV.1. Heces

Se realizó el análisis de gradiente directo o RDA con la intensidad de banda relativa de los geles de DGGE de la microbiota total (*T:*) y específicos del género *Lactobacillus* (*L:*) y con los fragmentos obtenidos mediante T-RFLP, para estudiar la respuesta de la microbiota fecal a los tratamientos probiótico e inflamatorio. Los días de toma de muestra se utilizaron como variable cualitativa. Sólo se muestran en el diagrama aquellas variables que contribuyeron de manera significativa a la composición de la microbiota fecal, analizado mediante la permutación Monte Carlo. Los valores en los ejes indican el porcentaje de variables que se explican mediante estos ejes.



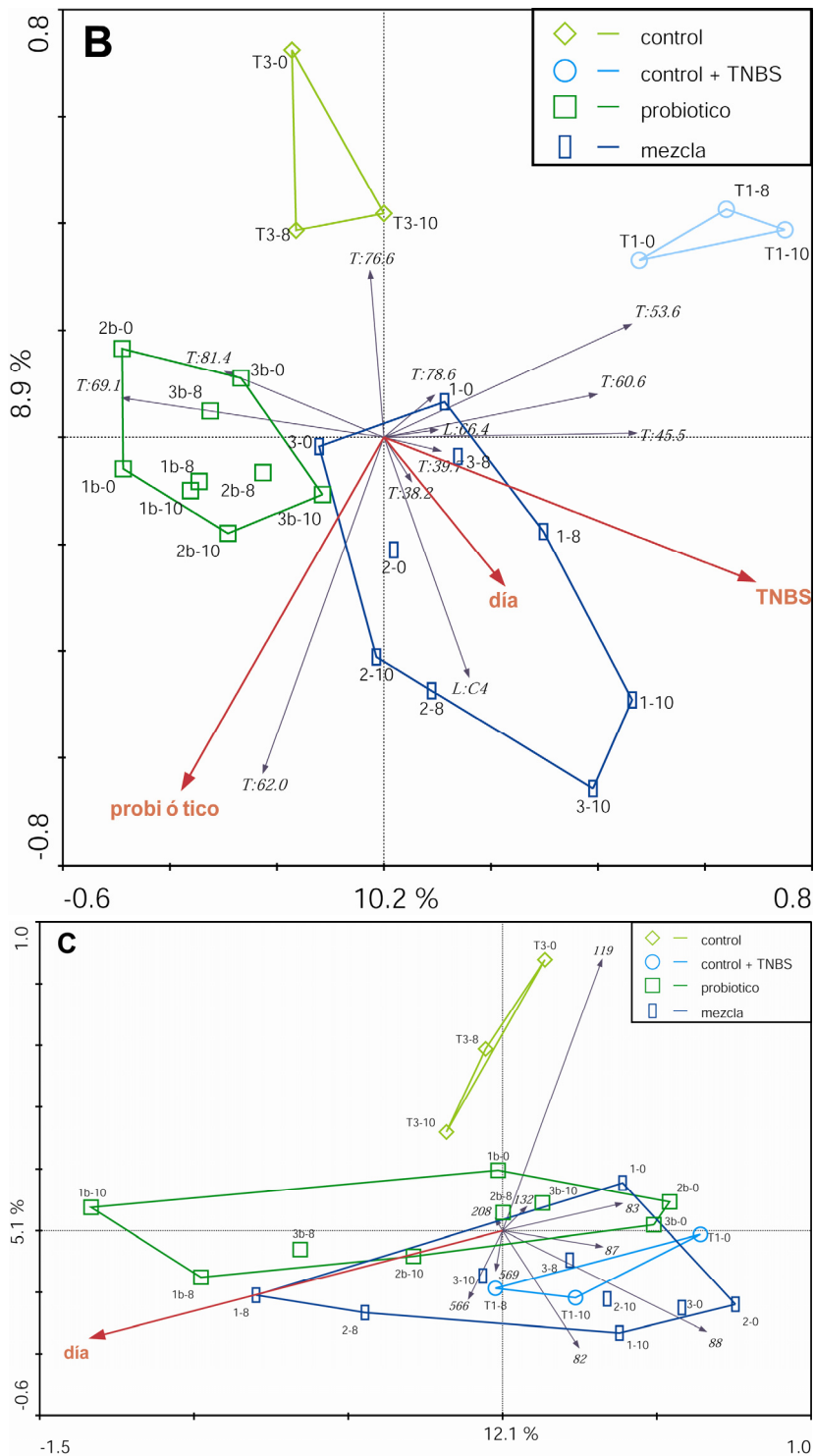
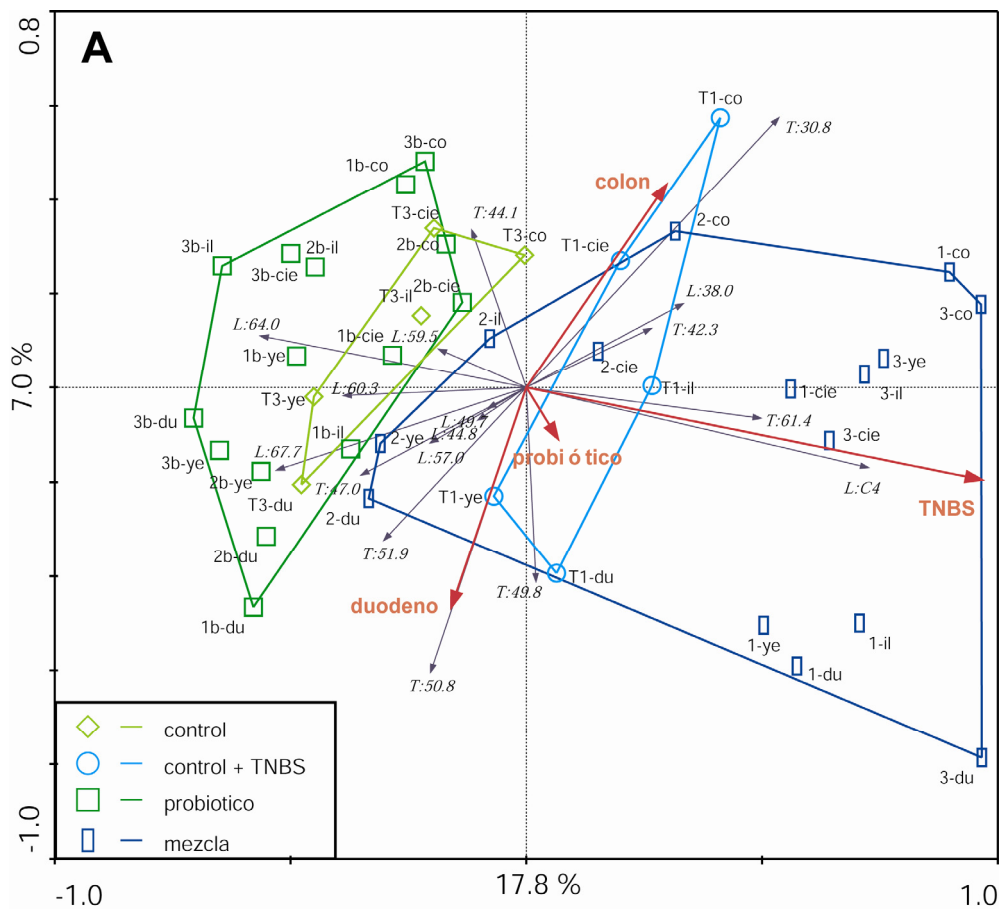


Fig. 72: A. Ordenación basada en todas las variables, bandas de DGGE y fragmentos de T-RFLP. **B.** Análisis de los resultados de DGGE. **C.** Análisis RDA de los datos de T-RFLP.

Aunque todas las variables analizadas (administración de probióticos, tratamiento con TNBS y días de toma de muestra) contribuyeron de manera significativa en la variabilidad de los perfiles de DGGE entre las distintas muestras, dando lugar a una clara separación entre los distintos grupos analizados, sólo los días de toma de muestra explicaron la variabilidad observada en los perfiles de T-RFLP.

G.IV.2. Biopsias

Para relacionar la localización de las biopsias tomadas (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon) y los tratamientos probiótico e inflamatorio, a las variaciones observadas en los análisis de DGGE de la microbiota total (*T*) y específico de lactobacilos (*L*), se realizó el análisis de redundancia RDA. En todos los diagramas de ordenación, sólo se muestran las variables que contribuyen de manera significativa a la variabilidad entre los perfiles de DGGE de las distintas muestras. Los valores en los ejes indican el porcentaje de variables explicadas por el diagrama.



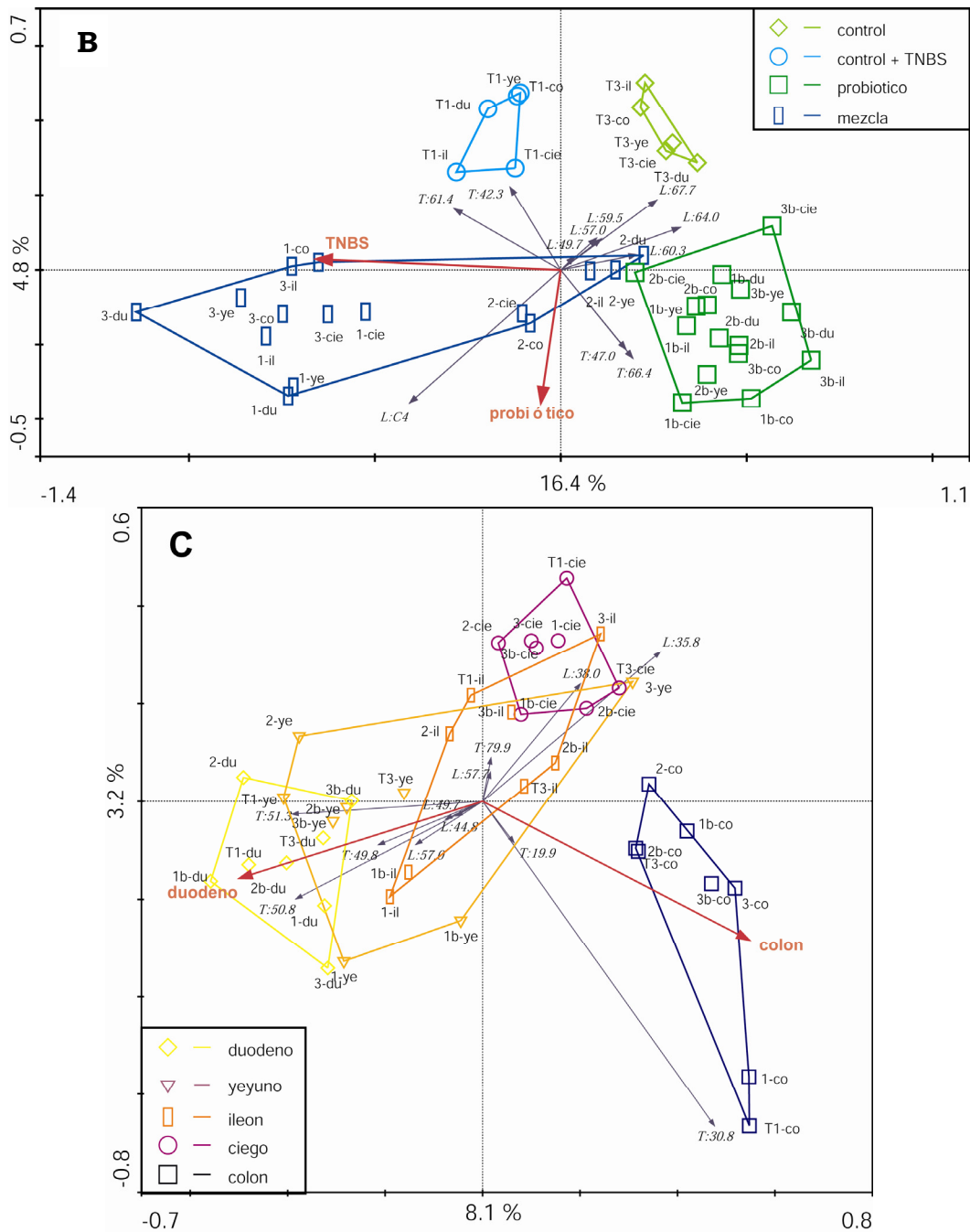


Fig. 73: **A.** Diagrama RDA utilizando tratamientos y zonas anatómicas de las biopsias como variables ambientales. **B.** Ordenación con los tratamientos como variable ambiental y biopsias como covariables. **C.** Ordenación con tratamiento como covariable y localización de las biopsias como variable ambiental.

En los diagramas se observó la asociación de la cepa C4 con el tratamiento con TNBS en las muestras mezcla. El análisis RDA muestra que los tratamientos probiótico e inflamatorio contribuyeron con mayor significancia a la diversidad de los perfiles de DGGE, con una suma de porcentaje de variables explicadas por los dos ejes del 21.2%, mientras que el origen de las biopsias sólo tuvo un efecto moderado (11.3%). Esto está confirmado por la clara separación entre las muestras en función del tratamiento en el esquema B. Al suprimir el efecto del tratamiento sobre la composición de la microbiota (esquema C), se observó un cambio gradual a lo

largo del tracto gastrointestinal, desde duodeno hasta colon. Estos resultados muestran las ventajas de los análisis de multivariantes para separar los efectos obtenidos por distintos factores ambientales en la composición de una comunidad microbiana.

H. BIBLIOGRAFÍA

- Alander, M., R. Satokari, R. Korpela, M. Saxelin, T. Vilpponen-Salmela, T. Mattila-Sandholm and A. von Wright (1999). Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl Environ Microbiol* **65**: 351-4.
- Backhed, F., H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich and J. I. Gordon (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15718-23.
- Bleau, C., L. Lamontagne and R. Savard (2005). New *Lactobacillus acidophilus* isolates reduce the release of leptin by murine adipocytes leading to lower interferon- production. *Clinical and Experimental Immunology* **140**: 427-435.
- Dewhirst, F. E., C. C. Chien, B. J. Paster, R. L. Ericson, R. P. Orcutt, D. B. Schauer and J. G. Fox (1999). Phylogeny of the defined murine microbiota: altered Schaedler flora. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3287-92.
- Dunne, C., L. Murphy, S. Flynn, L. O'Mahony, S. O'Halloran, M. Feeney, D. Morrissey, G. Thornton, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, E. M. Quigley, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan and J. K. Collins (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**: 279-92.
- Hartemink, R., V. R. Domenech and F. M. Rombouts (1997). LAMVAB—A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods* **29**: 77-84.
- Heilig, H. G., E. G. Zoetendal, E. E. Vaughan, P. Marteau, A. D. Akkermans and W. M. de Vos (2002). Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* **68**: 114-23.
- Jernberg, C., A. Sullivan, C. Edlund and J. K. Jansson (2005). Monitoring of antibiotic-induced alterations in the human intestinal microflora and detection of probiotic strains by use of terminal restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol* **71**: 501-6.
- Jiang, H. Q., N. A. Bos and J. J. Cebra (2001). Timing, localization, and persistence of colonization by segmented filamentous bacteria in the neonatal mouse gut depend on immune status of mothers and pups. *Infect Immun* **69**: 3611-7.
- Jimenez-Valera, M., E. Moreno, M. A. Amat and A. Ruiz-Bravo (2003). Modification of mitogen-driven lymphoproliferation by ceftriaxone in normal and immunocompromised mice. *Int J Antimicrob Agents* **22**: 607-12.
- Konstantinov, S. R., H. Smidt and W. M. de Vos (2005). Representative difference analysis and real-time PCR for strain-specific quantification of *Lactobacillus sobrius* sp. nov. Submitted for publication.
- Kostinek, M., R. Pukall, A. P. Rooney, U. Schillinger, C. Hertel, W. H. Holzappel and C. M. A. P. Franz (2005). *Lactobacillus arizonensis* is a later heterotypic synonym of *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 2485-2489.
- Maassen, C. B., C. van Holten-Neelen, F. Balk, M. J. den Bak-Glashouwer, R. J. Leer, J. D. Laman, W. J. Boersma and E. Claassen (2000). Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine* **18**: 2613-23.
- McGinnis, S. and T. L. Madden (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* **32**: W20-5.
- Orcutt, R. P., F. J. Gianni and R. J. Judge (1987). Development of an "Altered Schaedler Flora" for NCI gnotobiotic rodents. *Microecol. Ther.* **17**: 59.
- Quere, F., A. Deschamps and M. C. Urdaci (1997). DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. *J Appl Microbiol* **82**: 783-90.
- Salzman, N. H., H. de Jong, Y. Paterson, H. J. Harmsen, G. W. Welling and N. A. Bos (2002). Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. *Microbiology* **148**: 3651-60.
- Snel, J., P. P. Heinen, H. J. Blok, R. J. Carman, A. J. Duncan, P. C. Allen and M. D. Collins (1995). Comparison of 16S rRNA sequences of segmented filamentous bacteria isolated from mice, rats, and chickens and proposal of "Candidatus Arthromitus". *Int J Syst Bacteriol* **45**: 780-2.
- Snel, J., C. C. Hermsen, H. J. Smits, N. A. Bos, W. M. Eling, J. J. Cebra and P. J. Heidt (1998). Interactions between gut-associated lymphoid tissue and colonization levels of indigenous, segmented, filamentous bacteria in the small intestine of mice. *Can J Microbiol* **44**: 1177-82.
- Suzuki, K., B. Meek, Y. Doi, M. Muramatsu, T. Chiba, T. Honjo and S. Fagarasan (2004). Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 1981-6.
- Suzuki, M. T., L. T. Taylor and E. F. DeLong (2000). Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4605-14.
- Urdaci, M. C., B. Regnault and P. A. Grimont (2001). Identification by in situ hybridization of segmented filamentous bacteria in the intestine of diarrheic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Res Microbiol* **152**: 67-73.
- Walter, J., C. Hertel, G. W. Tannock, C. M. Lis, K. Munro and W. P. Hammes (2001). Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-

- specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2578-85.
- Walter, J., G. W. Tannock, A. Tilsala-Timisjarvi, S. Rodtong, D. M. Loach, K. Munro and T. Alatosava (2000). Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol* **66**: 297-303.
- Zoetendal, E. G., K. Ben-Amor, A. D. Akkermans, T. Abee and W. M. de Vos (2001). DNA isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. *Syst Appl Microbiol* **24**: 405-10.

DISCUSIÓN GENERAL

El tracto gastrointestinal de animales vertebrados está colonizado por una microbiota compleja que contiene varios cientos de especies distintas, algunas de las cuales están presentes en elevados niveles. Cada día existe más evidencia sobre la influencia que la microbiota gastrointestinal ejerce sobre la salud del hospedador. Un estudio reciente incluso apunta a la relación existente entre la microbiota y la obesidad, influyendo en aspectos como la reserva energética o la acumulación de grasa en células (Backhed *et al.*, 2004). También, la microbiota y la mucosa intestinal actúan como barrera frente a potenciales invasiones por patógenos.

Bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* son habitantes normales del ecosistema intestinal, y han recibido una considerable atención por sus posibles efectos beneficiosos sobre la salud cuando se toman como probióticos. Los lactobacilos forman una parte muy pequeña de la microbiota total de las heces humanas, pero en animales como cerdos, gallinas, ratones y ratas, los lactobacilos son dominantes en distintas zonas del intestino. Para sobrevivir en el tracto gastrointestinal, ecosistema de alta competitividad, las bacterias deben presentar una velocidad de multiplicación determinada y actividades metabólicas apropiadas, o ser capaces de establecer nichos específicos mediante colonización de la superficie de la mucosa intestinal. Estudios de ecología microbiana sugieren que solo una pequeña cantidad de los lactobacilos que se encuentran en muestras intestinales cumplen estos requerimientos, y son absolutamente autóctonos, pero los factores bacterianos que permiten que se establezcan y persistan los lactobacilos en el tubo digestivo aún no están determinados (Walter *et al.*, 2003).

Los microorganismos probióticos pueden afectar a la salud del hospedador mediante su interacción con la microbiota intestinal. Son numerosos los mecanismos asociados a la acción beneficiosa de bacterias probióticas (Gibson *et al.*, 2005; Saxelin *et al.*, 2005), entre los que se encuentran efectos sobre el sistema inmune, por su unión a receptores de la superficie epitelial intestinal, provocando la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias. En el estudio de los probióticos *Bifidobacterium breve* y *Streptococcus thermophilus* sobre enfermedades inflamatorias intestinales se observó que inhiben la secreción de TNF- α inducida por LPS. También se ha demostrado su efecto mediante el refuerzo de la barrera intestinal, previniendo y reparando los daños producidos en la mucosa por antígenos presentes en los alimentos o por fármacos, induciendo la expresión de mucina o aumentando la proliferación celular en las vellosidades intestinales. Algunas cepas probióticas previenen la disrupción del citoesqueleto y de las proteínas de las uniones herméticas en las células epiteliales del intestino. Los microorganismos probióticos pueden actuar por exclusión competitiva por la ocupación de los

sitios de colonización. Se ha demostrado que la microbiota láctica endógena (bifidobacterias y lactobacilos) también puede inhibir la invasión por patógenos como *Escherichia coli*, *Campylobacter*, especies de *Salmonella* e incluso *Helicobacter pylori*. Su efecto sobre la colonización y actividad de patógenos posiblemente ocurra mediante mecanismos inmunológicos o por la secreción de productos finales de su metabolismo como ácidos que pueden bajar el pH del nicho en el que se encuentran a niveles inferiores a aquellos necesarios para la supervivencia de diversos patógenos. Con este fin, aquellas cepas bacterianas capaces de adherirse a la superficie intestinal serían más eficaces que los microorganismos que no presenten esta cualidad. Este sería un factor más para la selección de bacterias probióticas (Donnet-Hughes *et al.*, 1999). Para su uso como vacunas, se han construido lactobacilos recombinantes que expresan proteínas heterólogas en su superficie, que sirven como antígenos para la inducción de la respuesta inmune y de las células B memoria (Maassen *et al.*, 2000). La siguiente tabla muestra las principales especies utilizadas como microorganismos probióticos en la actualidad, así como los distintos productos comerciales que las incluyen:

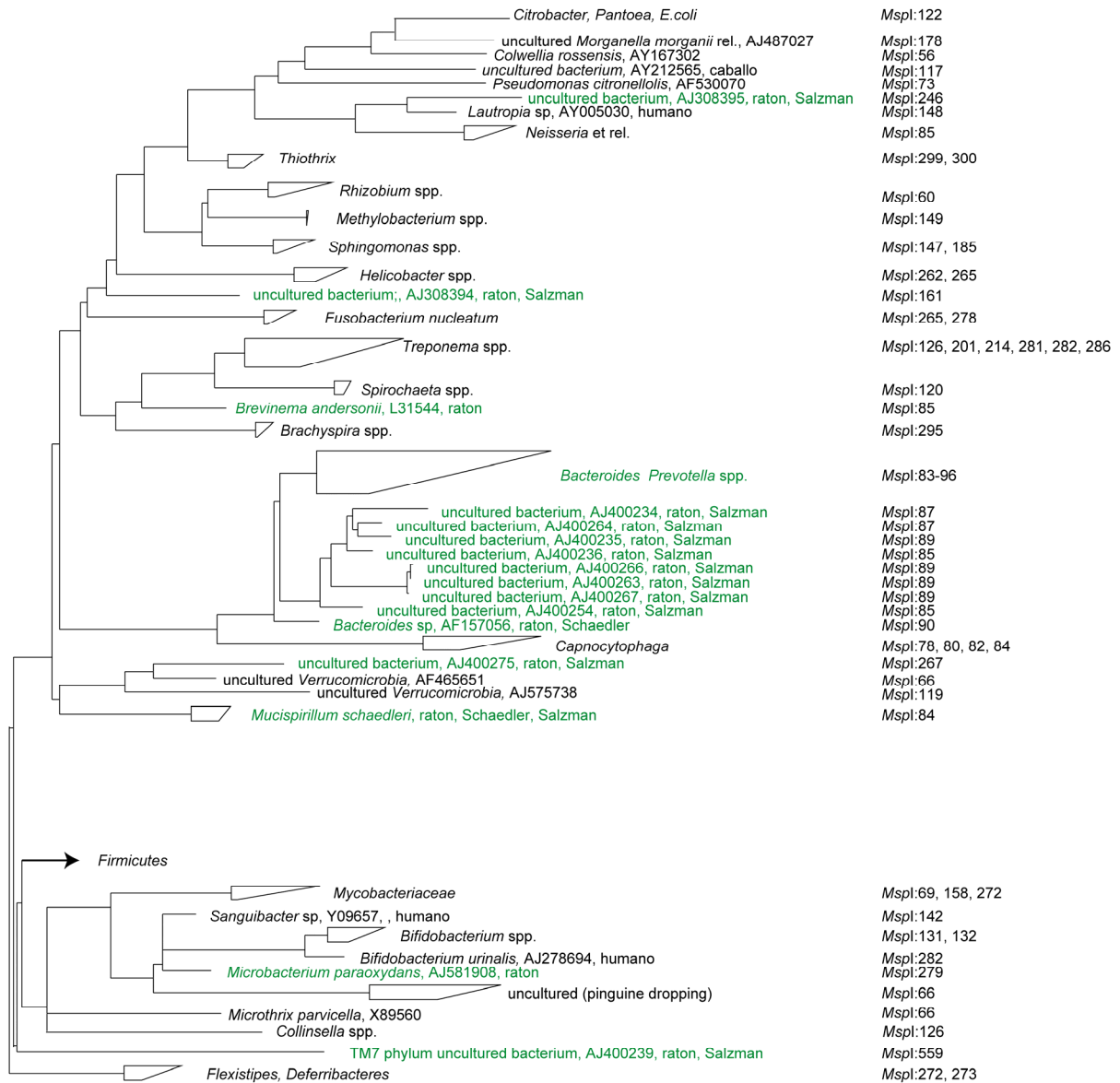
Tabla 16: Cepas probióticas en productos comerciales (Saxelin *et al.*, 2005)

Especies	Cepa	Nombre del producto(s) comercial
<i>Lactobacillus casei</i>	DN114001	Actimel
<i>Lactobacillus casei</i>	Shirota	Yakult
<i>Lactobacillus plantarum</i>	299v	ProViva
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	GG	ActifitPlus, Gefulus, LGG, Onaka He GG!, Vifit, etc.
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	La1	LC11
<i>Bifidobacterium lactis</i>	BB12	Varias marcas

Cuando el ruso Metchnikoff habló de las propiedades beneficiosas que algunos microorganismos podían ejercer al implantarse en el tracto gastrointestinal del hospedador, olvidaba el concepto de homeostasis, concepto por el cual todo entorno tiende a permanecer igual frente a cualquier cambio. La homeostasis en las comunidades microbianas consiste en un equilibrio de competición por nutrientes y espacio, inhibición de un grupo mediante los productos metabólicos de otros o el parasitismo. Todo esto contribuye a la regulación de las distintas poblaciones en el ecosistema gastrointestinal hasta alcanzar proporciones adecuadas. Este fenómeno se denomina “exclusión competitiva”, mencionada anteriormente (Tannock, 2004). El concepto de exclusión competitiva es importante para la introducción de bacterias probióticas en el tracto gastrointestinal. Las bacterias probióticas son exógenas para la comunidad intestinal, y como se ha demostrado en varios estudios su presencia en el intestino es transitoria (Alander *et al.*, 1999; Dunne *et al.*, 1999). En un estudio realizado en humanos a los que se les administró *L. rhamnosus* en leche durante 6 meses, el probiótico se detectó en heces

únicamente durante la ingesta del mismo, desapareciendo al final del tratamiento. Aún más, los niveles detectados en heces de este probiótico eran relativamente bajos, del orden de 10^5 a 10^6 CFU/g de heces, y su detección fue irregular, presente en un 40% de las muestras obtenidas de los sujetos que ya tenían una comunidad de lactobacilos estable en su tubo digestivo. Los sujetos que no tenían una comunidad estable de *Lactobacillus*, la cepa probiótica se observó en todas las muestras fecales durante el consumo del preparado, probablemente debido a que el número de lactobacilos residentes no es mayor al probiótico administrado (Tannock *et al.*, 2000). Esto puede ser una de las razones por la cual la observación de la cepa probiótica administrada en los perfiles obtenidos específicos para el género *Lactobacillus* en nuestros distintos ensayos sea bastante irregular.

La microbiota gastrointestinal murina es muy compleja, demostrado en los distintos estudios realizados en esta tesis, con variaciones incluso entre animales de un mismo grupo. En la siguiente figura se muestran todas las especies detectadas en el estudio de la microbiota gastrointestinal de ratones mediante T-RFLP. En verde se muestran aquellas especies previamente descritas en el tracto gastrointestinal de ratones (Orcutt *et al.*, 1987; Dewhirst *et al.*, 1999; Salzman *et al.*, 2002).



0.10

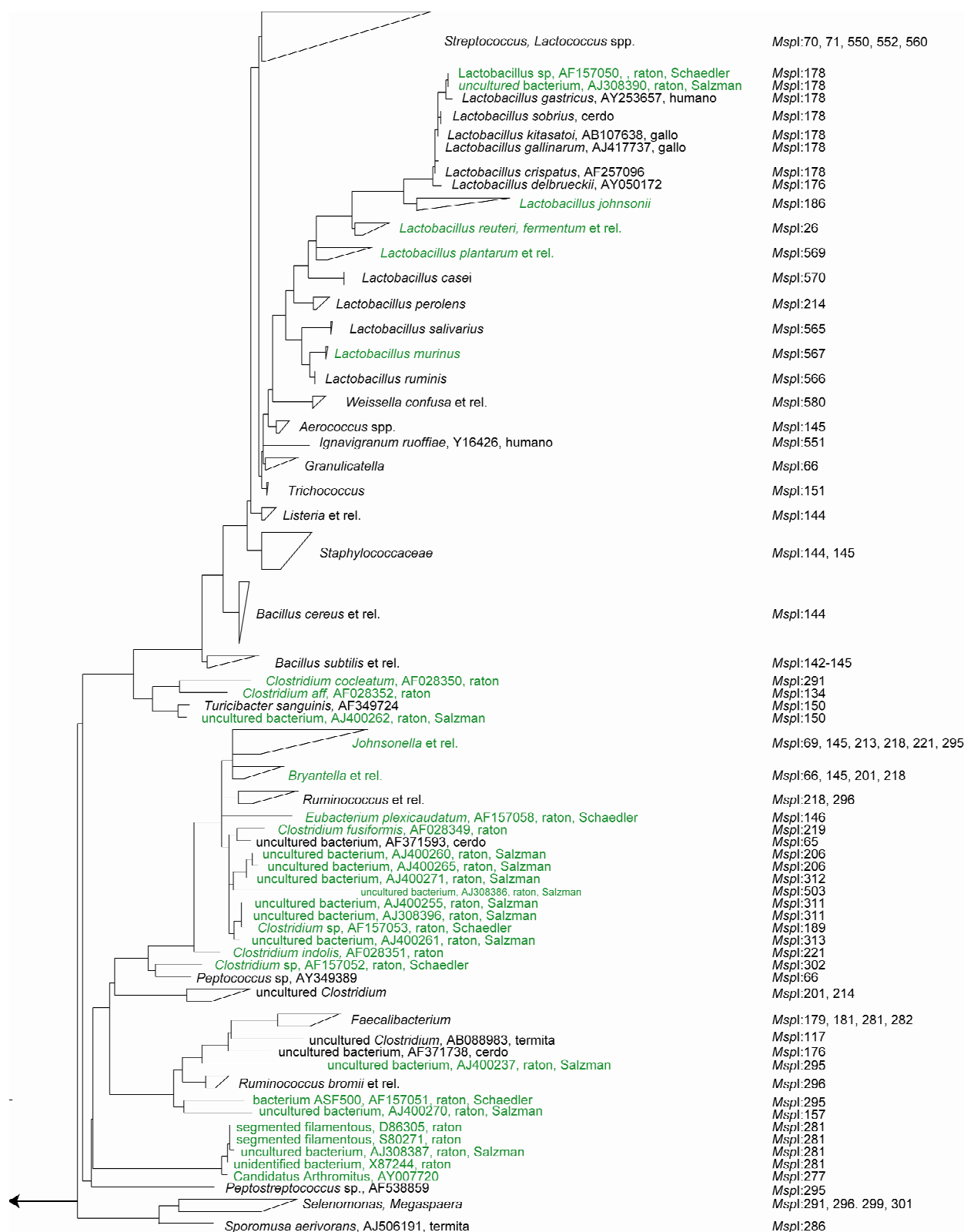


Fig. 74: Árbol filogenético de los fragmentos obtenidos mediante el estudio por T-RFLP de la microbiota intestinal en los distintos ensayos realizados.

Existen numerosos estudios en la actualidad donde se hace uso de animales “germfree” para evitar esta complejidad y poder establecer la relación entre la administración de un probiótico y su efecto sobre el hospedador. Este modelo sigue sin ser idóneo al proporcionar un entorno irreal y por lo tanto

resulta más difícil la extrapolación de los datos obtenidos. Lo ideal sería el desarrollo de modelos animales con una microbiota gastrointestinal definida, o de composición específica según la situación clínica a ensayar (Sarma-Rupavtarm *et al.*, 2004). Así mismo es importante la elaboración de modelos animales donde se pueda observar un efecto probiótico, ya que el estudio de la inmunosupresión por ciclofosfamida o la respuesta inflamatoria por TNBS realizados en esta tesis, conllevó a resultados demasiado drásticos para establecer el efecto probiótico. Debido al carácter transitorio de la presencia de la cepa probiótica en el tracto gastrointestinal, también resulta necesario estandarizar condiciones de suministro de probiótico, dosis y tiempo para conseguir la mejor colonización y/o el mayor efecto beneficioso, ya que existen estudios que demuestran que la colonización no es necesaria para su acción.

Las cepas aisladas para su estudio como probióticas en la presente tesis fueron *L. casei* y *L. plantarum*, siendo la última la principal cepa probiótica utilizada en todos los ensayos. La secuencia completa del genoma de esta bacteria la convirtió en una especie de gran interés para su uso como agente probiótico, dada su amplio estudio genómico (Kleerebezem *et al.*, 2003). Debido al límite de detección de las técnicas utilizadas en esta tesis, no se consiguió la observación de la cepa probiótica administrada en perfiles para la microbiota total, perfiles de gran diversidad y por lo tanto con una presencia minoritaria del probiótico. En los análisis realizados de los perfiles específicos para el género *Lactobacillus*, los probióticos administrados aparecen de manera irregular en muestras fecales y en biopsias del tracto gastrointestinal, con menor intensidad en éstas que en las muestras fecales, posiblemente debido a que su colonización fue menor que su expulsión en heces. Su detección mediante el aislamiento de colonias obtenidas de los coprocultivos realizados para lactobacilos resultó elevada. El alto número de aislados de estas especies o su ausencia en los perfiles de DGGE puede deberse a distintas razones:

- * Dificultad a la hora de cultivar el resto de las especies de lactobacilos presentes en heces, por lo que existe cierto grado de selección en la elaboración de los coprocultivos
- * Dificultad en la lisis de estas bacterias probióticas, y por lo tanto pérdida de gran parte de las mismas durante el proceso de extracción de DNA

Mediante las técnicas moleculares utilizadas en esta tesis no se pudo distinguir entre cepas endógenas de *L. plantarum* o la cepa probiótica administrada. En este caso sería necesario el uso de una cepa recombinante con algún marcador (GFP, resistencia a antibióticos, actividad beta-glucosidasa...etc). En la actualidad se están desarrollando oligonucleótidos específicos para la cuantificación de determinadas especies bacterianas con el fin de solucionar este problema (Konstantinov *et al.*, 2005). Tampoco se pudo

determinar la actividad metabólica de la cepa probiótica, siendo para ello necesario la aplicación de técnicas como la citometría de flujo asociada a hibridación in situ por fluorescencia para estudiar la viabilidad de las células (Amor *et al.*, 2002; Ben-Amor *et al.*, 2005). En un estudio realizado por Bron y col., en ratones inoculados con cepas de *L. casei* y *L. plantarum* se demostró que estas bacterias están activas en su paso por el tracto digestivo, desde estómago hasta colon, incluso realizando síntesis de proteínas. Aproximadamente se han caracterizado un total de 70 genes de *L. plantarum* activos en su paso por el tracto gastrointestinal murino (Bron *et al.*, 2004).

En el tratamiento probiótico a corto plazo en ratones normales se comprobó como el proceso de extracción de DNA para el análisis de muestras complejas, como heces o biopsias, fue un paso crítico para la obtención de la mayor diversidad de especies presentes en las muestras. Se observó una clara agrupación de los perfiles obtenidos de DGGE para la caracterización de la microbiota total según la zona anatómica, lo cual nos indicó que las condiciones experimentales aplicadas en la tesis, de extracción y amplificación de ácidos nucleicos, proporcionaron una imagen representativa de la microbiota presente en el tracto gastrointestinal.

En todos los modelos ensayados se observó una comunidad de lactobacilos a lo largo del tubo digestivo muy similar y estable. Mediante el uso de distintas técnicas moleculares se ha comprobado que la mayoría de los lactobacilos tomados como probióticos que sobreviven al tracto gastrointestinal humano no afectan a la microbiota total dominante, pero si tienen un efecto en los números y en la diversidad de las especies pertenecientes al género *Lactobacillus* (Saxelin *et al.*, 2005).

En el tratamiento probiótico a largo plazo en ratones normales se detectó un efecto de la administración de las cepas probióticas sobre la comunidad de lactobacilos, con la aparición de bandas tanto en muestras fecales como de biopsias que no están presentes en perfiles de muestras de los animales control. Según los resultados obtenidos mediante técnicas tradicionales de cultivo y técnicas de biología molecular realizadas en distintos modelos experimentales, las especies representadas tanto en heces como en biopsias de ratones fueron principalmente *L. reuteri*, *L. murinus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. helveticus*, *L. intestinalis* y *L. jensenii*. La distribución de las especies mayoritarias resultó muy similar en muestras de animales control y tratados con las cepas probióticas, aunque estos últimos presentan mayor diversidad de especies. Al observar los perfiles de DGGE se observó la presencia de las mismas bandas en ambos grupos. Esta mayor diversidad puede deberse a un aumento en el recuento de ciertas especies minoritarias de lactobacilos

durante el tratamiento probiótico pudiendo ello favorecer a la aparición de clones de estas especies a partir de muestras de animales tratados que no se obtienen en el análisis de muestras de animales control. Se comprobó como la caracterización molecular o la realización de una librería de clones resultó más completa a la hora de identificar las distintas especies presentes en las muestras fecales, con excepción de *L. plantarum* y *L. casei*, cepas probióticas utilizadas en esta tesis, aisladas de la microbiota normal de ratones control, si bien su detección se consiguió mediante cultivo no apareciendo ningún clon de estas especies en las distintas librerías construidas. Los aislados coinciden con los clones identificados en la presencia en ambos casos de las especies *L. reuteri* y *L. murinus*, siendo la primera considerada la especie mayoritaria de este género en el tracto gastrointestinal de ratones. La caracterización de los aislados obtenidos de los coprocultivos mediante DGGE resultó eficaz para su agrupación, si bien el análisis de su genoma completo mediante PFGE proporcionó una identificación más precisa. Mediante el análisis estadístico de los resultados obtenidos para las distintas técnicas aplicadas en este ensayo se comprobó como la mayoría de las bandas pertenecientes a geles específicos del género *Lactobacillus* apuntan en la misma dirección que el tratamiento probiótico. También se observó la coincidencia total en las flechas pertenecientes a la banda de la cepa probiótica de *L. plantarum* (C4) con la banda L40:4, pudiendo por tanto ser esta la banda perteneciente a la cepa probiótica en los perfiles obtenidos de las distintas muestras.

En los distintos ensayos realizados sobre animales inmunocomprometidos, se observó como la bacteria probiótica administrada no tuvo ningún efecto protector frente a la leucopenia producida por la inyección intraperitoneal de ciclofosfamida, si bien tampoco agravó la misma. Tampoco contribuyó a una más rápida recuperación de los animales inmunosuprimidos. En algunos casos se observó cierta agrupación de los perfiles obtenidos del análisis de las muestras de heces y biopsias mediante DGGE según el estado del sistema inmune de los ratones, pudiendo esto indicar un efecto del tratamiento inmunosupresor sobre la microbiota gastrointestinal. En tratamientos prolongados, el cese del tratamiento con ciclofosfamida produjo cierta recuperación de la microbiota gastrointestinal según observado en los perfiles de DGGE del análisis de biopsias 5 días después de la última inyección.

En el ensayo del tratamiento probiótico a corto plazo en ratones normales e inmunocomprometidos, sin duda el dato más destacado fue la influencia del tratamiento probiótico sobre las bacterias segmentadas filamentosas (SFB). Estas bacterias están relacionadas con el desarrollo del sistema inmune, siendo habitantes normales de la microbiota del íleon de

ratones jóvenes desde el momento del destete y desapareciendo en condiciones normales tras la maduración del sistema inmune (Snel *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2001). En animales inmunocomprometidos los niveles de esta población bacteriana se mantienen elevados toda su vida. Inicialmente se realizó su cuantificación por PCR mediante los cebadores ya descritos (Suzuki *et al.*, 2004), aunque su validación mediante clonaje y secuenciación demostró una gran cantidad de bacterias no pertenecientes a este grupo bacteriano también amplificadas mediante los oligonucleótidos utilizados. El desarrollo de cebadores específicos para estas bacterias permitió su cuantificación en muestras de biopsias de los distintos grupos de estudio. También se detectó estas SFB mediante T-RFLP. Se observó como el tratamiento inmunosupresor con ciclofosfamida provocó un aumento en los niveles de SFB por encima de valores normales. El tratamiento conjunto con la cepa probiótica de *L. plantarum* provocó un descenso de estas bacteria hasta cantidades incluso por debajo de los valores determinados para los animales control. Mediante los resultados obtenidos se puede establecer una relación directa entre la administración de *L. plantarum* y las bacterias SFB, si bien los mecanismos de interacción no se pueden establecer con las pruebas realizadas. Las hipótesis planteadas son un desplazamiento de las bacterias autóctonas especialmente de las SFB, por la colonización de la cepa probiótica en el tracto gastrointestinal, la producción de agentes antimicrobianos por la cepa probiótica o el establecimiento de una relación entre la cepa probiótica administrada y el sistema inmune del hospedador, relación no detectada mediante el recuento de leucocitos periféricos, la cual provoca una respuesta del sistema inmune que conlleva a la eliminación de este grupo bacteriano. Para establecer las bases moleculares de la acción probiótica sería necesario realizar el estudio de la expresión genética del probiótico en presencia de las bacterias SFB en intestino de ratones con el fin de establecer la interacción que se establece entre las mismas así como con el hospedador. El análisis estadístico de los resultados de las distintas técnicas aplicadas en este ensayo demostró una agrupación de muestras según el estado del sistema inmune del hospedador, con los tratamientos probiótico y de ciclofosfamida apuntando en la misma dirección que los resultados obtenidos del análisis de las muestras de animales tratados con el probiótico e inmunosuprimidos respectivamente. Esto indica que los tratamientos permiten explicar las diferencias observadas en la microbiota de animales de los distintos grupos.

En el ensayo a largo plazo en ratones normales e inmunocomprometidos, el análisis estadístico de los resultados obtenidos mostró un reducido número de variables representados en diagramas generados tanto con análisis de redundancia o RDA como de gradiente lineal o PCA, sin influencia de factores como el día de toma de muestra o los tratamientos probióticos en

inmunosupresor sobre los resultados obtenidos. En los resultados obtenidos de los análisis realizados sobre las biopsias, se consiguió una más clara agrupación de los animales cuando se utilizó el origen de las biopsias como covariable.

En el estudio de la acción de microorganismos probióticos en un modelo de inflamación intestinal no se obtuvo efecto inhibitorio en la expresión de citoquinas TNF- α , IL-1 β o IL-6, siendo los niveles de éstas incluso mayores con la administración conjunta de la bacteria probiótica, si bien la administración del probiótico por sí solo no produjo efecto alguno. Algunas cepas de lactobacilos modulan las funciones inmunes de la mucosa intestinal cuando se administran por vía oral. Algunas promueven la respuesta Th1 a través de la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β o TNF- α , mientras que otras cepas son inmunosupresoras. Se ha demostrado que la atenuación o potenciación mediante lactobacilos de algunas enfermedades autoinmunes depende de la cepa utilizada, asociada con un determinado perfil de inducción de citoquinas (Bleau *et al.*, 2005). Se ha descrito la existencia de cepas de lactobacilos capaces de inducir un perfil de citoquinas inflamatorias, como IL-2, IL-1 β y TNF- α , provocando con ello una inflamación local (Maassen *et al.*, 2000).

Hay una clara separación de los perfiles obtenidos a partir de muestras de los animales sometidos al proceso inflamatorio frente a los animales control, con una gran excreción de *L. plantarum* en muestras fecales tras el tratamiento inflamatorio en ratones tratados con esta cepa probiótica. En el análisis de las muestras de biopsias mediante DGGE se observó una mayor colonización de la cepa probiótica durante la inflamación intestinal producida por TNBS, con menor intensidad de las bandas correspondientes al resto de las especies endógenas de lactobacilos. En biopsias de colon de animales con proceso inflamatorio se detectó la presencia de una banda de mayor intensidad frente al resto de las bandas presentes en estos perfiles. Se identificó la banda como perteneciente al género *Helicobacter*, especie previamente aislada en muestras fecales de ratones de laboratorio. Este género también se detectó en elevado número en muestras de colon de distintos ratones en el ensayo del tratamiento probiótico a corto plazo en ratones normales e inmunocomprometidos determinado mediante T-RFLP. Estudios de la microbiota total fecal mediante T-RFLP mostraron una diversidad aumentada en muestras obtenidas de ratones tras el proceso inflamatorio en comparación con los animales control.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el análisis de las muestras fecales mostró una mejor agrupación de los animales por su estado inflamatorio con los datos obtenidos mediante DGGE que con T-RFLP. En el

análisis de las biopsias se observó un mayor porcentaje de variables explicadas mediante los diagramas obtenidos de con los resultados de DGGE que con los de T-RFLP. Cuando se utilizó el tratamiento probiótico e inflamatorio como covariables, se obtuvo agrupación de los datos según las zonas de las biopsias, con un cambio gradual desde el duodeno hasta el colon. Esta es una de las principales ventajas en un análisis estadístico de multivariantes, donde se puede estudiar el efecto de distintas variables ambientales sobre la composición de distintas comunidades microbianas.

El futuro del área de investigación de los microorganismos probióticos y sus aplicaciones, apunta en tres direcciones principalmente. La primera y tradicional, su uso para mantener o mejorar el estado de salud del hospedador, donde posiblemente aparecerán nuevas aplicaciones o campos de acción. La segunda, como suplemento dietético o incluso fármacos dirigidos a un grupo específico de consumidores, para el tratamiento de determinadas situaciones clínicas o riesgos de enfermedad. Por último, posiblemente se desarrollará el uso de cepas transgénicas mediante inducción o genéticamente modificadas, para la expresión de factores con propiedades beneficiosas para el hospedador. Los mecanismos de acción de los microorganismos probióticos se estudiarán a nivel molecular mediante análisis postgenómicos (Saxelin *et al.*, 2005), pudiendo establecer relaciones entre probióticos y microbiota gastrointestinal así como la respuesta producida en el hospedador.

BIBLIOGRAFÍA

- Alander, M., R. Satokari, R. Korpela, M. Saxelin, T. Vilpponen-Salmela, T. Mattila-Sandholm and A. von Wright (1999). Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl Environ Microbiol* **65**: 351-4.
- Amor, K. B., P. Breeuwer, P. Verbaarschot, F. M. Rombouts, A. D. Akkermans, W. M. De Vos and T. Abee (2002). Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead bifidobacterium cells during bile salt stress. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5209-16.
- Backhed, F., H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich and J. I. Gordon (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15718-23.
- Ben-Amor, K., H. Heilig, H. Smidt, E. E. Vaughan, T. Abee and W. M. de Vos (2005). Genetic diversity of viable, injured, and dead fecal bacteria assessed by fluorescence-activated cell sorting and 16S rRNA gene analysis. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4679-89.
- Bleau, C., L. Lamontagne and R. Savard (2005). New *Lactobacillus acidophilus* isolates reduce the release of leptin by murine adipocytes leading to lower interferon- production. *Clinical and Experimental Immunology* **140**: 427-435.
- Bron, P. A., C. Grangette, A. Mercenier, W. M. de Vos and M. Kleerebezem (2004). Identification of *Lactobacillus plantarum* Genes That Are Induced in the Gastrointestinal Tract of Mice. *J. Bacteriol.* **186**: 5721-5729.
- Dewhirst, F. E., C. C. Chien, B. J. Paster, R. L. Ericson, R. P. Orcutt, D. B. Schauer and J. G. Fox (1999). Phylogeny of the defined murine microbiota: altered Schaedler flora. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3287-92.
- Donnet-Hughes, A., F. Rochat, P. Serrant, J. M. Aeschlimann and E. J. Schiffrin (1999). Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J Dairy Sci* **82**: 863-9.
- Dunne, C., L. Murphy, S. Flynn, L. O'Mahony, S. O'Halloran, M. Feeney, D. Morrissey, G. Thornton, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, E. M. Quigley, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan and J. K. Collins (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**: 279-92.
- Gibson, G. R., A. L. McCartney and R. A. Rastall (2005). Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. *Br J Nutr* **93 Suppl 1**: S31-4.
- Jiang, H. Q., N. A. Bos and J. J. Cebra (2001). Timing, localization, and persistence of colonization by segmented filamentous bacteria in the neonatal mouse gut depend on immune status of mothers and pups. *Infect Immun* **69**: 3611-7.
- Kleerebezem, M., J. Boekhorst, R. van Kranenburg, D. Molenaar, O. P. Kuipers, R. Leer, R. Turchini, S. A. Peters, H. M. Sandbrink, M. W. Fiers, W. Stiekema, R. M. Lankhorst, P. A. Bron, S. M. Hoffer, M. N. Groot, R. Kerkhoven, M. de Vries, B. Ursing, W. M. de Vos and R. J. Siezen (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1990-5.
- Konstantinov, S. R., H. Smidt and W. M. de Vos (2005). Representative difference analysis and real-time PCR for strain-specific quantification of *Lactobacillus sobrius* sp. nov. Submitted for publication.
- Maassen, C. B., C. van Holten-Neelen, F. Balk, M. J. den Bak-Glashouwer, R. J. Leer, J. D. Laman, W. J. Boersma and E. Claassen (2000). Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine* **18**: 2613-23.
- Orcutt, R. P., F. J. Gianni and R. J. Judge (1987). Development of an "Altered Schaedler Flora" for NCI gnotobiotic rodents. *Microecol. Ther.* **17**: 59.
- Salzman, N. H., H. de Jong, Y. Paterson, H. J. Harmsen, G. W. Welling and N. A. Bos (2002). Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. *Microbiology* **148**: 3651-60.
- Sarma-Rupavtarm, R. B., Z. Ge, D. B. Schauer, J. G. Fox and M. F. Polz (2004). Spatial distribution and stability of the eight microbial species of the altered schaedler flora in the mouse gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2791-800.
- Saxelin, M., S. Tynkkynen, T. Mattila-Sandholm and W. M. de Vos (2005). Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology* **16**: 204.
- Snel, J., C. C. Hermsen, H. J. Smits, N. A. Bos, W. M. Eling, J. J. Cebra and P. J. Heidt (1998). Interactions between gut-associated lymphoid tissue and colonization levels of indigenous, segmented, filamentous bacteria in the small intestine of mice. *Can J Microbiol* **44**: 1177-82.
- Suzuki, K., B. Meek, Y. Doi, M. Muramatsu, T. Chiba, T. Honjo and S. Fagarasan (2004). Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 1981-6.
- Tannock, G. W. (2004). A special fondness for lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3189-94.
- Tannock, G. W., K. Munro, H. J. Harmsen, G. W. Welling, J. Smart and P. K. Gopal (2000). Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2578-88.
- Walter, J., N. C. Heng, W. P. Hammes, D. M. Loach, G. W. Tannock and C. Hertel (2003). Identification of *Lactobacillus reuteri* genes specifically induced in the mouse gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2044-51.

CONCLUSIONES

1. El estudio de las comunidades microbianas presentes en el tracto gastrointestinal de ratones necesitan la integración de técnicas de microbiología dependientes de cultivo junto con técnicas de biología molecular.
2. Las distintas técnicas utilizadas en la realización de esta tesis, tales como PCR-DGGE, PCR-T-RFLP y PCR a tiempo real, para la identificación tanto de la microbiota total como de poblaciones bacterianas mediante el análisis del gen rRNA 16S, no resultaron redundantes sino que los resultados obtenidos contribuyeron en la obtención de una imagen más completa de la composición de la comunidad bacteriana intestinal con distintos niveles de resolución.
3. El tratamiento probiótico con especies de *Lactobacillus* en las condiciones ensayadas en el desarrollo de esta tesis no mostró cambios relevantes en la composición de la microbiota gastrointestinal de ratones, aunque se observaron efectos en la composición de la comunidad de lactobacilos endógenos, permitiendo la detección de especies minoritarias de la microbiota normal al producir un incremento en sus niveles.
4. En los ensayos de inmunosupresión el tratamiento probiótico no contrarrestó el efecto de leucopenia causado por la ciclofosfamida, si bien tampoco lo agravó.
5. Los animales tratados con ciclofosfamida presentaron un aumento significativo en los niveles de bacterias segmentadas filamentosas, bacterias asociadas con procesos inmunomodulatorios. El tratamiento conjunto con microorganismos probióticos consiguió una disminución de los niveles de estas bacterias hasta valores incluso menores a los obtenidos para animales sanos control.
6. La cepa probiótica de *L. plantarum* ensayada en nuestros estudios no inhibió el perfil de citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 en el modelo experimental de inflamación intestinal, provocando incluso un aumento en los niveles de algunas citoquinas. Se consiguió una mayor colonización del tracto gastrointestinal por la cepa probiótica administrada durante la inflamación intestinal.
7. El análisis estadístico de multivariantes de los datos obtenidos a partir de técnicas dependientes de cultivo y de estudios moleculares resultó fundamental para la identificación de los efectos de la administración de microorganismos probióticos en situaciones de salud y enfermedad.

1. The integrated application of classical cultivation-dependent techniques and molecular biological approaches is required for the comprehensive study of the microbial communities present in the gastrointestinal tract.
2. The different general and population-specific 16S ribosomal RNA gene-targeted molecular ecological approaches used in this study, namely PCR-DGGE, PCR-T-RFLP and real-time PCR, are not redundant, but rather contribute to a more complete picture on intestinal microbial community composition at different levels of resolution.
3. Under the conditions tested in this study, probiotic treatment with *Lactobacillus* spp. did not result in large changes in composition of the gastrointestinal microbiota of healthy mice, but did have a marked effect on the *Lactobacillus* community, allowing the detection of species present in lower numbers in the normal microbiota by an increase in their levels.
4. Probiotic treatment did not counteract the immunosuppressant effect of cyclophosphamide, while it also did not worsen it.
5. Animals treated with cyclophosphamide showed a significant increase in intestinal population sizes of segmented filamentous bacteria, which are associated with immunomodulatory processes. Treatment with a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* resulted in reduction of SFB numbers to levels that can be found in healthy control animals.
6. The probiotic strain of *L. plantarum* used in this study did not diminish the strongly increased transcription of genes coding for the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6 during TNBS-induced intestinal inflammation, but rather resulted in a further increase. Colonization of the murine gastrointestinal tract with the probiotic strain was strongly increased during intestinal inflammation induced by TNBS.
7. Multivariate statistical analyses of cultivation-based and molecular ecological datasets proved instrumental for the identification of effects of probiotics on the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract in health and disease.

ANEXO

SECUENCIAS DEL GEN rRNA 16S DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS

Cepa probiótica aislada C1

TGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGACCCGAGATTCAACAT
 GGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACA
 GATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCCTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGGA
 TGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACCTGAGA
 GGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGgCAGCAGTAGGgAaTCTTCCaC
 AaTGgACGCAAGTcTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGG
 AGAAGAATGGTTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
 CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGG
 TTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAG
 AAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCG
 GCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
 CATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCA
 TTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAaCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG
 CATGTGGTTTAATTCGAAGCaACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAG
 GTTTCCCcTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTA
 AGTCCCgCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGT
 GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC
 AATGGATGTTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGT
 AGGCTGCAACTCGCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTGAATACGTTCC
 CCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCCTTTT
 AGGGAGCGAGCCGTCTAAGGTGGACAAAG

Cepa probiótica aislada C4

GGCGGCGTGCCTATCATGCAGTCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCTTGATCATGATTTACATTTGAGT
 GAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGC
 TAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTC
 CCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGT
 AATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATG
 GAGGAAAGTCTGATGAGGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGA
 AGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTtAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTT
 TAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGA
 GGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCT
 GTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATA
 CCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCG
 CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATG
 TGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTT
 CCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAA
 ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
 ATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCT
 GCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG
 CTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACC
 AGCCGCCTAAGGTGGACAGAG

SECUENCIAS DE AISLADOS DEL GÉNERO *LACTOBACILLUS*.

B3

AGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGA
 TGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATG
 GTCCCGCGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAG
 GGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCAC
 AATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAaCTCTGTTGTTA
 AAGAAGAACATATCTGAGAGTAACCTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTG
 CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGG
 TTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAG
 AAGAGGACAGTGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCG
 GCTGTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
 CATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCAT
 TCCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
 CATGTGGTTTAATTGAAAGCTACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGA
 CGTTCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA
 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTG
 ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA
 ATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGATTGTA
 GGTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
 CGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAG
 GAACCAGCCGCTAAGGTGGACAGAGTAG

A2

STGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTT
 GAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAG
 ATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGAT
 GGTCCCGCGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGA
 GGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCA
 CAATGAGCAAAATCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTT
 AAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACCTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGT
 GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCG
 GTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCA
 GAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGC
 GGCTGTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
 CCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCA
 TTCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA
 GCATGTGGTTAATTGCAAGCTACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAG
 ACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTA
 AGTCCCGAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTCCCGGT
 GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC
 AATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGATTGT
 AGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
 CGGGCCTTGACACACCGCCGCTCACT

A3

TGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTT
 GAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAG
 ATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGAT
 GGTCCCGAACGATATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGA
 GGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCA
 CAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTT
 AAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACCTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGT
 GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCG
 GTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCA
 GAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGC
 GGCTGTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
 CCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCA
 TTCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA
 GCATGTGGTTAATTGCAAGCTACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAG
 ACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTA
 AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGT
 GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC
 AATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGATTGT

AGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCGGGCCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTGAACCAGCCGCTAAGGTGGACAGAGTAG

A12

CTCTGTCCGCTTAGGCGGCTCCCTCCATAAAGGTTAGGCCACCGACTTTGGGCGTTACAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAGTCCGAACTGAGAACGGCTTTAAGAGATTAGCTTRCTCTCGCGAGCTTGCAGACTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCACCTTCCCTCCGTTTTGTACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCACTTAATGCTGGCAACTAGTAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACGACCATGCACCACTGTCAATTGCGTCCCGAAGGGAACGCCTTATCTCTAAGGTAGCGCAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTCGCGTAGCTTCAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTTCTTTGAGTTCAACCTTGCGGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTAGCACTCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAAGTTGCAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATCCACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCTTCTGCACTCAAGTCGCCCGTTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTAAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACCTAAGCAACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGACTTCTGTTGGATACCGTCACTGCGTGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCAACAACAGAGCTTACGAGCCGAAACCCTTCTCACTCACGCGGTGTGCTCCATCAGGCTTGCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCA GTTCCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCACTAGTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCAAAAGCCATCTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTTTGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCAAATGTTATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCGTCCGCCACTCACTGGTGATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACTTGCATGATAGCACACCGC

B5

CGTGTGCTATCATGCAAGTCGTACGCACTGGCCCACTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCGGAGCGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCACATGGCTTTTGTGTTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAACCTGAGACACGCTCCATACTCAAGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGAGAAGAACGTGCGTGAGAGTAACTGTTACGCGAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTACAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGTCTTGACATCTTGCCTAACCTTAGAGATAAGGCTTCCCTTCGGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTGTCAGTCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC

G4

GGCGGTGTGCTATCATGCAGTCGTACGCACTGGCCCACTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCGGAGCGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCACATGGCTTTTGTGTTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGACTGATCGGCCACAATGGAACCTGAGACACGCTCCATACTCAAGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGAGAAGAACGTGCGTGAGAGTAACTGTTACGCGAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTACAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGTCTTGACATCTTGCCTAACCTTAGAGATAAAGGCTTCCCTTCGGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTGTCAGTCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC

GTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTC
GGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAA
TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAAACGCCAAAAGTCGGTGGCCTAA
CCTTTATGGAGGGAGCCGCCTAAGGCGGACAGAGANG

B12

CGTGCCTATCATGCAGTCGAACGAAACTTCTTTATCACCGAGTGCTTGCACTCACCGATAAAGAGTTGAGTGG
CGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCAAAAGAGGGGATAAACTTGGAAACAGGTGCTAATACC
GCATAACCATAGTTACCGCATGGTAACTATGTA AAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCCCGCGGC
GCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCC
ACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAA
GCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCTTCCGATCGTAAAACCCTGTTGTTAGAGAAGAAAAGT
GCGTGAGAGTAACTGTTACGTTTCGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACGGAGTAGTGCATTGAAAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG
TGAAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGCGGAAAAGCGGCTCTCTGGT
CTGTAACTGACGCTGAGGTTGAAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAATAAGCATTCCGCCTGG
GGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTTGACATCTTTGACAATCCTAGAGATAGGACTTCCCTTC
GGGGACAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTA
CAACGAGTCGCAAGACCCGCGAGGTTTAGCAAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGATTGTAGGCTGCAACT
CGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC

C9

CACCTTAGACGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCCACCGGCTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGG
CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGCATGSTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCA
TG TAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAGCGGCTTTAAGAGATTGCTAAACCTCGCGGTCTTGC
GACTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCC
CACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCAACTTAATGCTGGCAACTAACAATAAGGGT
TGCGCTCGTTGCGGGACTTAAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCA^tTTT
GTCCCCGAAAGCGAAAGTCTATCTCTAGGAT^tGTCAAAGATGTCAAGACTGGTAAGGTT^eTTCCGCTTGCTT
CGAATTA AACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCTTTGAGTTTCAACCTTCCGCTGCTA
CTCCCAGGCGGAATGCTTATTGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAAACCTCCAACACTTAGCATTCA
TCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTACCCACGCTTTGAAACCTCAGCGTCAGTTA
CAGACCAGAGAGCCGCTTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACCCGCTACACATGGAGTTC
CACTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGCACTACTCCGGTTAAGCCGAAGGCTTTCACATCA
GACTTAAAAGACCGCCTGCGTTCCCTTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGC
GGCTGTGTCACGTAAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCGAAACGTGAACAGTTACTCTCACGCA
CTTTCTTCTAACAACAGGGTTTACGATCCGAAGACCTTCTTACCCACGCGGCTTGTCCATCAGGCTTT
CGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCGCTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCC
GATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGCATCATTGCCTTGGTAAGCCTTTACCCACCAACTAGCTAATGCGCCGC
GGGCCATCCAAAAGCGGTAGCATAGCCACCTTTTACATAGTTACCATGCGGTAACCTATGGTTATGCGGTATT
AGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCCTCTTTTGGGCGAGGTTGCCACGTGTTACTACCCGTTCCGCCACTCA
ACTCTTTATCGGTGAGTGCAAGCACTCGGTGATAAAGAAGTTTCGTTGACTTGTCATGTATTAGGCACGCCG
A

D1

TGGCGCGTGCCTATCATGCAGTCGAACGAGTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCAACCGAGATTCAACATGG
AACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTAAGTGGGGGATAAACATTTGAAACAGAT
GCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCAGTGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTGGATGG
ACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGTAGGTAATGGCTACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGT
TGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAAT
GGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTAGTGAAGAAGGCTTTCCGGTTCGTA AAAACTCTGTTGTTGGAG
AAGAATGGTTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAAGCCAGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTT
TTAAGTCTGATGTGAAAAGCCCTCGGCTTAAACGAGGAAGCGCATCGGAAAACCTGGGAAAACCTGAGTGCAGAA
GAGGACAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
CTGTCTAGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTGAAAAGCATGGGTATGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCC
ATGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTGGAGGTTTCCGCCCTTCAAGTTCAGTGCCGCAAGCTAACGTTAAGCATT
CCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAaCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTTAATTCGAAGCAaCGCGAAGAAcCTTACCAGTCTTGACATCTTTTGTATCACCTGAGAgATCAGGTTt
CCCCTtCGGGGgCAAAaTGACAGGtGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGTTGACAA

ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
 ATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCT
 GCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG
 GCCTTGACACACCGCCCGTCACACC

E4

AAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAAGTGGGGGATAACATTTGAAACAGA
 TGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGATG
 GACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACCTGAGAG
 GTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACA
 ATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGG
 AGAAGAATGGTTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGaAAGCCACGGCTAACTACGTG
 CCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGG
 TTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAAACGAGGAAGCGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAG
 AAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCG
 GCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
 CATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCA
 TTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAG
 CATGTGTTTTAaTTCGAAGCAaCGCGAAGaAcCTTAcCAGGTCTTGACATCTTTtGATCACCTGAGAGATCAGG
 TTTCCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAA
 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTG
 ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA
 ATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTA
 GGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCC
 CGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACC

F1

TGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAAACTTCTTTATCACCGAGTGCTTGCCTCACCGATAAAGA
 GTTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCAAAAGAGGGGATAACACTTGAAACAGG
 TGCTAATACCGCATAACCATAGTTACCGCATGGTAACCTATGTA AAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGATGG
 GCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACCTGAGAGG
 TTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAA
 TGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGGGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACCCTGTTGTTAGA
 GAAGAAAGTGCCTGAGAGTAAGTTCACGTTTCGACGGTATCTAACCAAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC
 CAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGT
 CTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACGAGTAGTGCATTGGA AACTGGGAGACTTGAGTGCAGA
 AGAGGAGAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAAGCGG
 CTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGTTGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
 ACGCCGTA AACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGTTTCCGCCCTCAGTGCTGCAGCTAACGCAATAAGCATT
 CCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACaAGCGGTGGAGCA
 TGTGGTTTTAATTCGAaGCAACGCGAAgAACCTTAcCAGGTCTTGACATCTTTTGACAATCCTAGAGATAGGACTT
 TCCCTTCGGGGACAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTC
 CCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGATTAAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACA
 AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG
 GACGGTACAACGAGTCGCAAGACCGCGAGGTTTAGCAAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGG
 CTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
 GGCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCTTTTGAG
 CCAGCCGTCTAAGGGGACAGAGTAG