

PRODUCCION DE ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA PROTEINAS DE
ORIGEN PROBIOTICO

MOISES DAVID LEON FALLA

TRABAJO DE GRADO
BACTERIOLOGIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGIA
2012

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23, Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Resumen

Introducción: Dentro de las distintas enfermedades infecciosas que afectan a los seres humanos de las más crecientes en los últimos años han sido las de origen viral. La estimación es que de las infecciones en los seres humanos, 60% son causadas por virus especialmente por virus entéricos y respiratorios (13). Una de las dificultades al tratar este tipo de infecciones es la mutabilidad y la diversidad antigénica que presentan los virus, haciendo difícil el desarrollo de vacunas u otros tratamientos. Dentro de los tratamientos alternativos desarrollados hasta ahora se encuentran el uso de los probióticos, los cuales se definen como microorganismos vivos que exhiben un efecto benéfico en la salud del hospedero mediante la mejora del balance microbiano intestinal

De acuerdo a varios estudios realizados, los probióticos utilizados como suplemento dietético han demostrado que pueden prevenir y servir como un tratamiento para problemas infecciosos gastrointestinales. Ya que no se conocen los mecanismos exactos ni se han caracterizado los compuestos por los cuales los probióticos ejercen sus efecto inhibitorio útil como prevención o como tratamiento contra microorganismos productores de gastroenteritis y diarreas, principalmente virales, para este trabajo se ha pensado en la producción de anticuerpos dirigidos contra diferentes componentes de estas bacterias probióticas que logren neutralizar su capacidad inhibitoria y así contribuir con el conocimiento de los mecanismos que pueden llevar a generar efecto preventivo o curativo ante infecciones virales. **Objetivo:** Producir anticuerpos policlonales que reaccionen contra antígenos proteicos obtenidos de bacterias probióticas. **Materiales y métodos:** A partir de 4 bacterias del género lactobacillus y 4 bacterias del género Bifidobacteria, extrajeron e inocularon en conejos, proteínas de membrana y metabolitos, buscando producir anticuerpos policlonales. La producción de estos anticuerpos se evidenció a través de una prueba de ELISA directa. **Resultados:** Se realizó la prueba de ELISA y se obtuvo una reactividad en 6 de los antiseros. Los resultados del título de anticuerpos se graficaron, evidenciando el comportamiento de cada uno de los antiseros a través del proceso de sensibilización de los animales. **Conclusiones:** Se identificó la producción de

estos anticuerpos dirigidos contra proteínas de origen probiótico, gracias a la utilización de una prueba inmunoenzimática como es un ELISA directo y pudiendo evidenciar esta producción en mayor concentración en la proteína A, continuando con el metabolito A y en menor concentración el metabolito C.

Tabla de contenido

1. Introducción	7
2. Justificación	9
3. Marco teórico.....	10
4. Objetivos.....	13
4.1 Objetivo general	13
4.2 Objetivos específicos	13
5. Metodología	14
5.1 Selección del modelo experimental.....	14
5.2 Proteínas de origen Probiótico utilizadas como inmunógenos ...	14
5.3 Obtención de anticuerpos policlonales.....	14
5.4 Obtención de suero preinmune.....	15
5.5 Prueba inmunoenzimática (ELISA).....	15
6. Resultados.....	16
7. Discusión.....	21
8. Conclusiones.....	25
9. Recomendaciones.....	26
10. Bibliografía.....	27

1. Introducción

Dentro de las distintas enfermedades infecciosas que afectan a los seres humanos de las más crecientes en los últimos años han sido las de origen viral. La estimación es que de las infecciones en los seres humanos, 60% son causadas por virus especialmente por virus entéricos y respiratorios (13). Una de las dificultades al tratar este tipo de infecciones es la mutabilidad y la diversidad antigénica que presentan los virus, haciendo difícil el desarrollo de vacunas u otros tratamientos. Dentro de los tratamientos alternativos desarrollados hasta ahora se encuentran el uso de los probióticos, los cuales se definen como microorganismos vivos (principalmente bacterias como *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri* y *Bifidobacterium lactis* ente otros) que exhiben un efecto benéfico en la salud del hospedero mediante la mejora del balance microbiano intestinal (14).

Según estudios clínicos se conoce que ciertas cepas probióticas específicas, son capaces de disminuir la duración o acortar el riesgo de algunas infecciones virales, siendo uno de los mejores beneficios para la salud humana, la disminución de la duración de la diarrea viral y reducir el riesgo de este tipo de diarreas en niños y también muestran beneficios en algunas infecciones respiratorias de origen viral (13). A pesar de conocerse que los probióticos presentan un efecto “antiviral” nos se conoce con exactitud cual es el mecanismo para que esto suceda, se presume que esto puede deberse a la habilidad de los probióticos de “excluir” cierto virus, fortalecer las uniones entre los enterocitos, potenciar la producción de sustancias antibióticas y antivirales y estimular las células del sistema inmune del hospedero (13). Así mismo no se conocen con exactitud las moléculas de los probióticos que interviene en este proceso y es lo que se pretende encontrar a través de la producción de anticuerpos dirigidos contra varias de estas moléculas probióticas con efectos antivirales.

2. Justificación

Dentro de las estrategias para el tratamiento de enfermedades infecciosas, se conocen diferentes medicamentos que pueden ser utilizados para contrarrestar este tipo de patologías, siendo los más conocidos los antibióticos. Estos, por su gran utilidad y eficacia, han sido utilizados de manera indiscriminada al observarse cualquier tipo de síntoma de infección, causando efectos adversos como: cepas bacterianas con resistencia a los antibióticos, alteración de la flora normal del intestino, y hasta condiciones desfavorables para el paciente.

Adicional a esto existen patologías infecciosas de etiología viral, que no pueden ser tratadas con antibióticos, es por estas razones que se han buscado alternativas para el tratamiento de este tipo de enfermedades, que otorguen beneficios al paciente y se disminuya el abuso de los antibióticos. Una de estas alternativas es el uso de probióticos, los cuales ofrecen grandes beneficios a los pacientes; estos pueden ser usados como terapia contra infecciones bacterianas y virales, siendo estas últimas el objeto de interés de este trabajo, ya que a pesar de saber que poseen efecto antiviral, no se conoce con exactitud el mecanismo de acción que presentan los probióticos frente a los virus.

Dentro de las infecciones virales más importantes, se encuentran las asociadas a rotavirus, siendo este patógeno el más común en enfermedades gastrointestinales como diarreas y gastroenteritis. Como alternativa para el tratamiento de estas patologías se han utilizado los probióticos, siendo los más utilizados los géneros *Lactobacillus* sp. y *Bifidobacterium* sp., los cuales según se ha reportado, promueven las defensas del hospedero y modulan el sistema inmune. Se ha mostrado que estimulan la inmunidad sistémica mediada por células Th1 y dentro de sus beneficios se incluye el potencial de acelerar la actividad antiviral. (11). También los probióticos, pueden producir sustancias antibióticas, siendo un ejemplo típico la reuterina (3-hidroxi propionaldehído), un antibiótico de amplio espectro producido por *Lactobacillus reuteri* y que es activo en contra de bacterias Gram positivas y Gram negativas, pero también contra levaduras, hongos, protozoos y virus (12).

A pesar de conocerse estas características, aun no se ha hecho un estudio en detalle sobre las interacciones existentes entre probióticos, virus y hospedero (11). Es por esto que dentro del grupo de Enfermedades Infecciosas, existe el interés de estudiar estas interacciones, y conocer que componentes derivados de los probióticos están relacionados con una actividad antiviral, principalmente en infecciones por virus entéricos. El desarrollo de este trabajo experimental, se espera podrá contribuir a conocer que características o componentes en estas bacterias probióticas poseen un papel frente a una infección viral. Para esto, se indujo a la producción de anticuerpos policlonales dirigidos contra diferentes proteínas de origen probiótico para que mas adelante con la utilización de los mismos, se puedan llevar a cabo pruebas in vitro que revelen realmente los mecanismos que les confieran capacidad antiviral.

3. Marco Teórico

En Colombia, la diarrea es una de las 5 primeras causas de consulta y hospitalización en menores de 5 años, al igual que en otros países. Siendo el rotavirus uno de los principales agentes etiológicos.

Entre 1979 y 2003, se han realizado en Colombia 14 estudios sobre rotavirus y se encontró que más del 70% de las infecciones se presentaron en niños menores de 2 años, mientras que el porcentaje de infecciones disminuye a medida que la edad aumenta. Según lo reportado por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), en el 2002, la mortalidad por diarrea fue mayor en niños menores de 1 año de edad: 79,5 por 100.000 menores de 1 año y 6,9 por 100.000 niños de 1 a 4 años de edad. De acuerdo con la información disponible en el país, se estima que aproximadamente 50% de estas muertes serían ocasionadas por rotavirus (1).

El rotavirus, perteneciente a la familia *reoviridae*, género *rotavirus*, es un virus RNA de doble cadena, sin envoltura característica que le concede una mayor supervivencia en fómites volviéndolo más contagioso (2). Presentan un tropismo por el intestino delgado en el cual se adhiere, siendo su principal sitio de replicación los enterocitos maduros de las vellosidades, donde causa una destrucción de estas, generando alteraciones en la actividad de las disacaridasas y otras proteínas de membrana del enterocito, produciendo diarreas osmóticas y fenómeno de mala absorción, con disminución significativa de sales, agua y carbohidratos (3).

Este virus se transmite por vía fecal-oral de persona a persona, presentándose en países industrializados como en países en vía de desarrollo. Siendo la causa líder de gastroenteritis grave entre niños en el mundo, estudios publicados entre el 2000 y el 2004, indicaban que el rotavirus causaba el 39% de hospitalizaciones por diarrea en niños con una estimación por la OMS de 400.000 a 600.000 muertes por rotavirus (1).

Se conoce la importancia como agentes de diarrea aguda en la infancia a los rotavirus del grupo A, Adenovirus, Astrovirus y Norovirus. En el caso de los tres primeros agentes el cultivo celular ha permitido un mejor conocimiento de la

inmunidad y ciclo vital de estos virus, así como la producción de reactivos para el diagnóstico (2 - 4).

En cuanto al manejo y tratamiento de esta enfermedad, el éxito comienza con la evaluación del grado de deshidratación para lo que se debe tener en cuenta pérdidas de peso, gasto urinario, electrolitos séricos, y hallazgos en el examen físico. Las drogas antivirales no juegan ningún papel en el manejo de la gastroenteritis viral, varios estudios no han mostrado ningún beneficio de medicamentos antieméticos presentado riesgo de efectos adversos (5). El tratamiento se centra en la prevención y/o corrección de la deshidratación, uso de sueros orales, aporte adecuado nutricional y una adecuada higiene. Ya que no existe una terapia antiviral específica en la actualidad (6).

Para el rotavirus se empezó a buscar una vacuna en la década de los 70's, enfocándose en el desarrollo de una vacuna viva atenuada que pudiera ser administrada por vía oral. Siendo los primeros intentos con virus vivos atenuados antigénicamente relacionados de un huésped no humano (abordaje Jenneriano). En 1998 se da a conocer la primera vacuna contra rotavirus conocida como la RRV-TV (rotashield) siendo una vacuna tetravalente con 3 dosis a edades de 2,4 y 6 meses, sin embargo fue retirada del mercado al demostrarse su asociación con intususcepción o invaginación del intestino, luego en entre 2006 y 2008 se desarrollan dos nuevas vacunas contra rotavirus conocidas como "Rotateq", la cual es una vacuna viva de administración oral, pentavalente. La eficacia contra cualquier gastroenteritis por rotavirus fue del 74% y la eficacia contra gastroenteritis severa fue del 98%. La vacuna redujo las consultas por gastroenteritis causada por rotavirus en un 86%, sin embargo un año después de la primera dosis de esta vacuna en los niños que la recibieron se presentó el fenómeno de invaginación intestinal, caso similar que se dio con la segunda vacuna generada en el año 2008 conocida como "Rotarix" que es nuevamente una vacuna viva atenuada, de administración oral que contiene una cepa de rotavirus humano, que fue clonado y renombrado como RIX 4414, la cual eventualmente también presentó efectos secundarios adversos como la intususcepción(1 -7).

Al observarse que hay pocos tratamientos antivirales que puedan utilizarse en este tipo de patologías y que las vacunas existentes contra el principal agente etiológico presentan una buena respuesta pero con alto costo para el paciente, se han buscado tratamientos alternativos para este tipo de patologías.

Dentro de estos se ha retomado la idea de utilizar el restablecimiento del ecosistema intestinal como parte del tratamiento de las diarreas, sobre todo en la etiología viral, múltiples trabajos se orientan a la administración de probióticos ya que en los episodios de diarrea se presenta una disminución de la flora protectora (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) (8). Definiéndose los probióticos entonces como microorganismos viables que, al ser ingeridos, tienen efectos beneficiosos en la prevención y tratamiento de determinadas condiciones patológicas (9).

Los probióticos de acuerdo a varios estudios realizados han demostrado que su ingesta como suplemento dietético, pueden prevenir y servir con un tratamiento para problemas gastrointestinales infecciosos (10). La respuesta local de citoquinas en el intestino, inducidas por bacterias probióticas, como los Lactobacilos, puede producir inhibición de los patógenos intestinales, ya que en pacientes hospitalizados con gastroenteritis aguda por infección con rotavirus el uso de este tipo de bacterias reduce significativamente los días de duración de la diarrea, sin embargo, es necesario, que se realicen más estudios para determinar los efectos de los lactobacilos en los sitios efectoros, la posibilidad de utilizarlos como vacunas orales etc. (8).

Ya que no se conocen los mecanismos exactos ni se han caracterizado los compuestos por los cuales los probióticos ejercen sus características como tratamiento contra microorganismos productores de gastroenteritis y diarreas principalmente virus, se ha pensado en la producción de anticuerpos dirigidos contra diferentes componentes de estos probióticos para más adelante generar pruebas para conocer los diferentes mecanismos que pueden llevar a reconocerlos como tratamientos antivirales.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Producir anticuerpos policlonales que reaccionen contra antígenos proteicos obtenidos de bacterias probióticas.

4.2. Objetivos Específicos

- Sensibilizar conejos con proteínas obtenidas a partir de bacterias probióticas.
- Evidenciar la reactividad de los anticuerpos policlonales contra las proteínas extraídas de bacterias probióticas.

5. Metodología

5.1. Selección del Modelo Experimental

Para la producción de los anticuerpos policlonales, se seleccionaron 8 conejos de raza Nueva Zelanda, con edades entre los 72 a 75 días y un peso promedio de 1500 gramos.

5.2. Proteínas de origen Probiótico utilizadas como inmunógenos

Las proteínas inoculadas en cada uno de los conejos, provenían de 4 cepas distintas de bacterias probióticas. Las proteínas, que fueron de dos tipos. los metabolitos y las proteínas de membrana, se nombraron con letras mayúsculas, siendo las proteínas A y C provenientes de Lactobacilos (*L. casei* y *L. fermentum*) y H e I provenientes de Bifidobacterias (*B. adolescentes* y *B. bifidobacterium*). Todas estas proteínas extraídas y purificadas fueron suministradas por el laboratorio de Virología de la Pontificia Universidad Javeriana.

5.3. Obtención de Anticuerpos Policlonales

Para la producción de los anticuerpos, se diseñó un esquema de inmunización para los conejos. Se sensibilizó a cada conejo con una de las 8 proteínas (metabolitos y proteínas de membrana A, C, H, I), utilizando inicialmente adyuvante completo y luego adyuvante incompleto de Freund, por vía subcutánea. En total se realizaron 22 inoculaciones (3 inoculaciones por conejo) con 350 µg de proteína en un lapso total de 30 días, con intervalos de 15 días entre cada inoculación. Al día 45 del esquema de inmunización, se procedió a sangrar a los conejos obteniendo 50 mL de sangre para luego centrifugar las muestras a 5000 RPM durante 5 minutos y obtener los sueros postinmunes. Estos se alicuotaron y

se preservaron en nevera con una solución de glicerina y azida de sodio al 0.02% como preservante del suero.

5.4. Obtención de Suero Preinmune

Previo al esquema de inmunización se obtuvo de cada uno de los conejos muestras de sangre, estas se recolectaron por venopunción en la vena de la oreja, en tubos sin anticoagulante y se centrifugaron a 10.000 RPM durante 10 minutos para lograr la obtención de los sueros preinmunes o sueros control, se alicuotaron en volúmenes de 300 μ L y se mantuvieron refrigerados.

5.5. Prueba Inmunoenzimática (ELISA)

Para la detección de los anticuerpos policlonales producidos en los sueros de los conejos, se realizó una ELISA directa en placas de 96 pocillos, las cuales fueron sensibilizadas con cada una de las proteínas (15 μ g/mL) previamente inoculadas en cada uno de los conejos, luego las placas se incubaron por 2 horas a 37°C y posteriormente se llevaron a 4°C durante 16 horas en cámara húmeda. Se procedió luego a adicionar una solución de bloqueo con PBS, Tween al 0.05% y leche descremada al 5% y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora, inmediatamente después se agregó cada uno de los sueros (preinmunes y postinmunes) en sus respectivos pozos (anticuerpo primario) en diluciones 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000 con PBS y Tween 0,05% en volúmenes de 100 μ L/pozo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se adicionaron entonces 100 μ L de Proteína A por pozo y se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente, para finalmente adicionar 100 μ L de OPD (o-fenilendiamina) como cromógeno con un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en obscuridad. Luego se procedió a leer las placas en el lector de ELISA a una longitud de onda (λ) de 450 nm.

6. Resultados

Los anticuerpos que se buscaban producir tenían como antígenos diferentes proteínas de origen probiótico, extraídas de 4 tipos de bacterias pertenecientes a dos géneros distintos siendo estos, *Lactobacillus* especies *casei* y *fermentum* y *Bifidobacterium* especies *adolescentis* y *bifidum*. Las proteínas obtenidas de estas bacterias eran de dos tipos, proteínas de membrana y metabolitos, teniendo 8 proteínas en total. Las bacterias se identificaron con letras mayúsculas A, C, H e I para así identificarlas de una manera ordenada (Tabla 1)

Tabla 1. Identificación bacterias probióticas por letra

Probiótico	Letra
<i>L. casei</i>	A
<i>L. fermentum</i>	C
<i>B. adolescentis</i>	H
<i>B. bifidum</i>	I

Al realizar las inoculaciones en los 8 conejos que se tenían para la producción de anticuerpos, a cada uno le fue asignada una proteína, así mismo cada conejo fue asignado con un número para tener registro de cada una de las inoculaciones (Tabla 2).

Tabla2. Antígenos probióticos inoculados a cada uno de los conejos

Conejos	Antígeno
3	Metabolito A
4	Metabolito C
5	Metabolito H
6	Metabolito I
7	Proteína de membrana A
8	Proteína de membrana C
9	Proteína de membrana H
10	Proteína de Membrana I

Al llevar a cabo el esquema de inmunización, el día 0 (25/09/2012) se inoculó la totalidad de los conejos, sin embargo el día anterior a la segunda inmunización o refuerzo, se presentó la muerte del conejo número 5, inoculado con el metabolito H, interrumpiendo la producción del anticuerpo contra esta proteína. El día 15 (11/10/2012 – segunda inmunización) se realizaron observaciones a los conejos para ver su estado general de salud y si se habían presentado alteraciones, presentándose en los conejos 8 y 10 induraciones cercanas a las zonas donde se habían realizado las primeras inoculaciones.

Se continuó con el esquema de vacunación, ahora con 7 conejos, teniendo como día 30 (26/10/2012 – tercera inmunización) en el cual nuevamente se realizaron observaciones generales a los conejos observando que ahora el conejo número 7 presentaba induración en la zona de inoculación.

Finalmente el día 45 (09/11/2012) se realizó el sangrado de los conejos obteniendo 50 mL de sangre para obtener el suero con los anticuerpos. En total se recolectaron 7 sueros.

Luego de obtener los sueros se procedió con el montaje de la prueba de ELISA para observar la producción y reactividad de los anticuerpos dirigidos contra las proteínas probióticas. La ELISA que se realizó fue de tipo directo, y se utilizaron 2 placas de 96 pocillos cada una, montando en cada placa 3 sueros o sus correspondientes diluciones por triplicado. Desafortunadamente, al momento de fijar las proteínas probióticas en las placas, no se tenía una cantidad suficiente de la Proteína de membrana I, motivo por el cual se excluyó del estudio. La lectura de las absorbancias de cada una de las muestras o sueros se realizó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm, para luego realizar gráficas y verificar o no la producción de anticuerpos contra cada una de las proteínas (Figura 1, 2, 3, 4, 5,6).

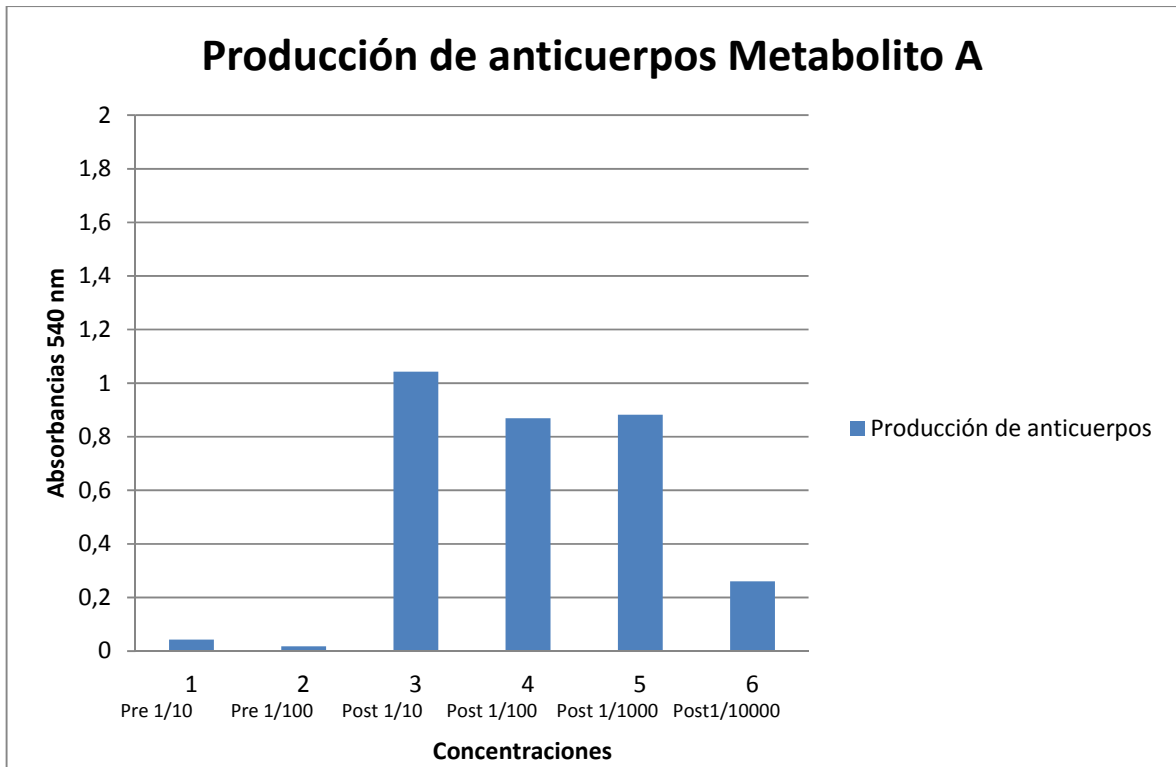


Fig.1 Grafica de producción de anticuerpos contra Metabolito A

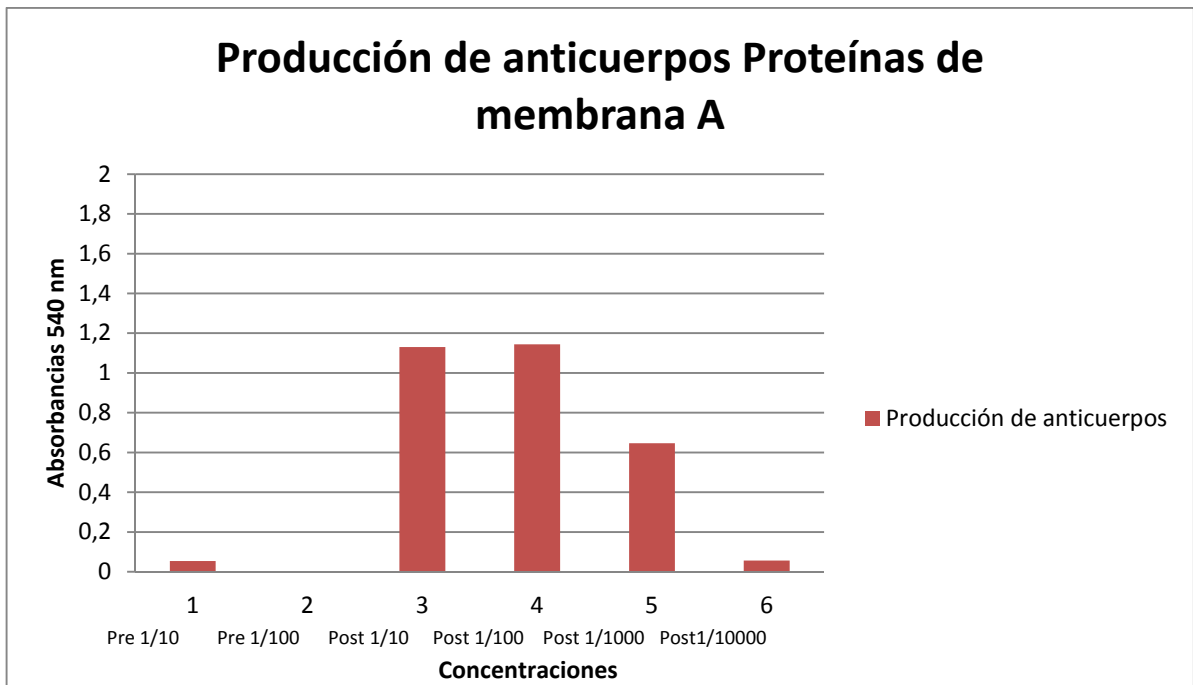


Fig.2 Grafica de producción de anticuerpos contra Proteína de membrana A

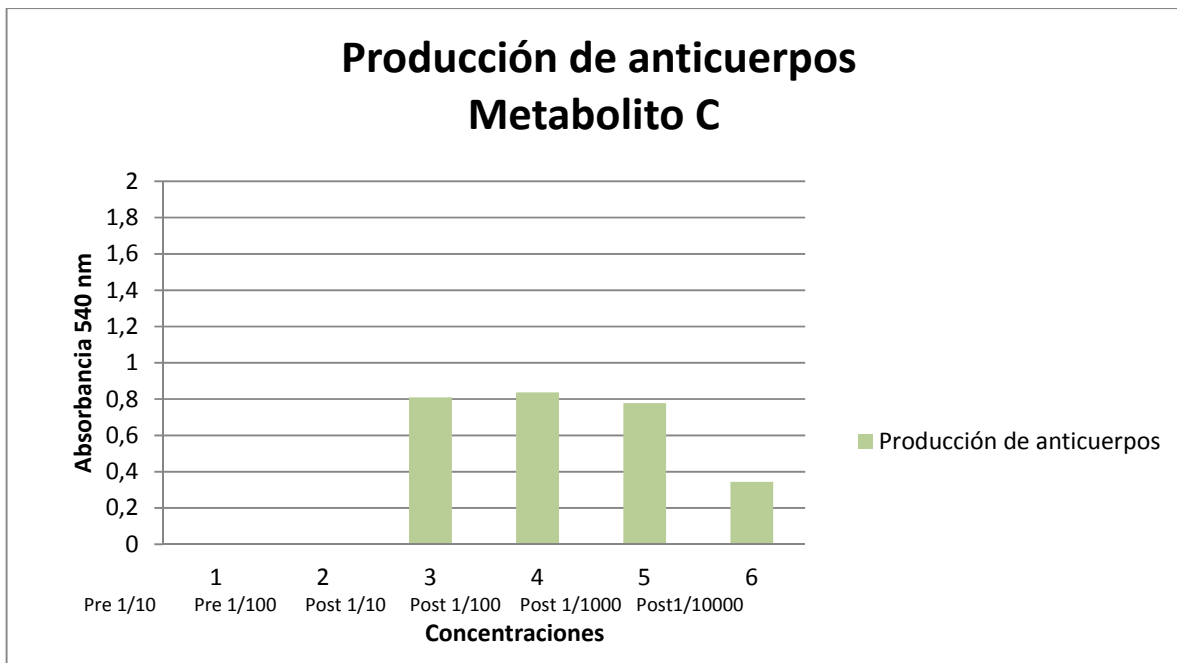


Fig.3 Grafica de producción de anticuerpos contra Metabolito C

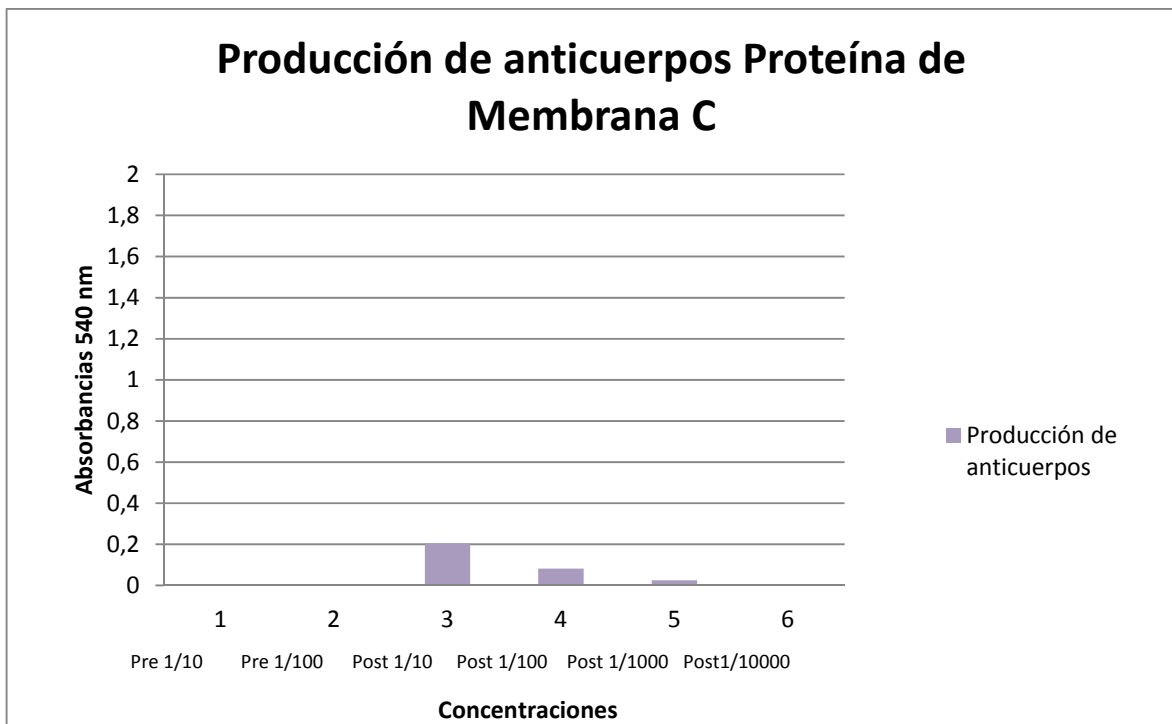


Fig.4 Grafica de producción de anticuerpos contra Proteína de membrana C

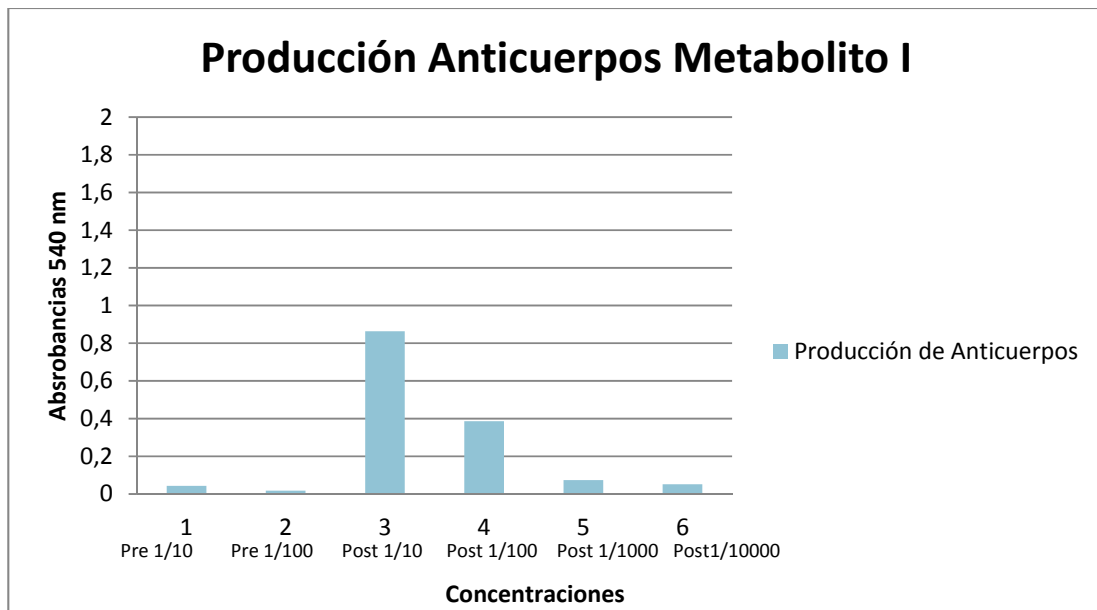


Fig. 7 Grafica de producción de anticuerpos contra Metabolito I

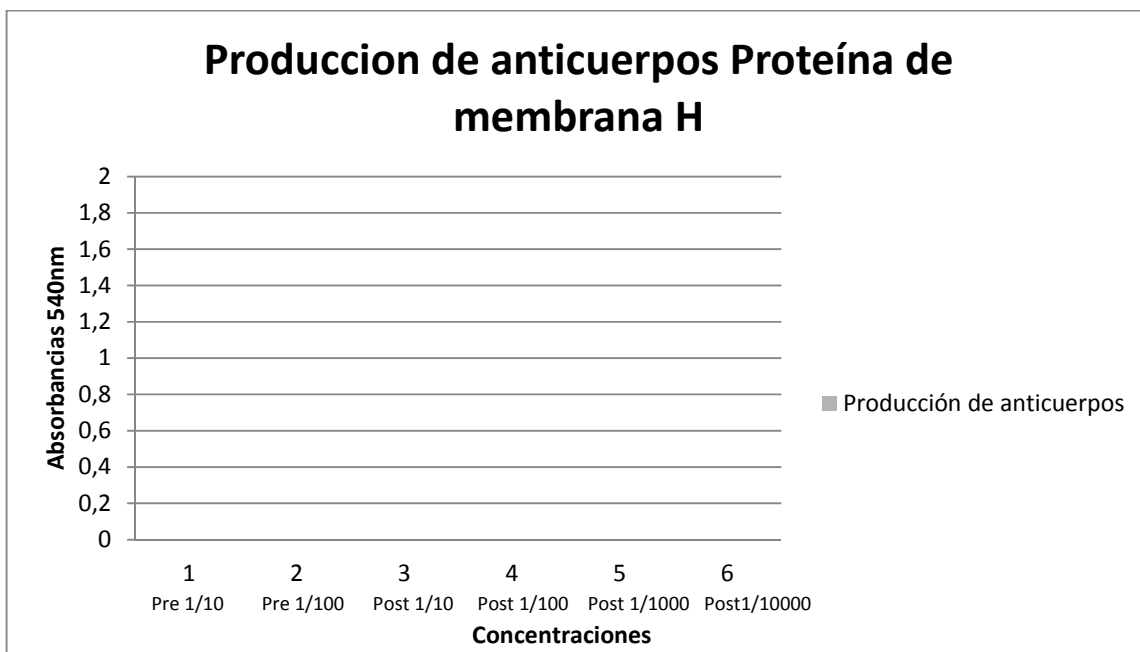


Fig.8 Grafica de producción de anticuerpos contra Metabolito H

Los valores para la construcción de las graficas se obtuvieron a partir de los promedios de las absorbancias, ya que estas muestras se montaron por triplicado

y a este valor se le resta el promedio de los valores de los blancos obteniendo como resultado el valor real.

7. Discusión

Lactobacilos y Bifidobacterias, importantes bacterias probióticas, son componentes normales de la microflora saludable del intestino humano, y son comúnmente usadas en la fermentación de productos alimenticios. Se ha demostrado que el consumo de algunos Lactobacilos y/o Bifidobacterias, confiere un rango de beneficios para la salud, incluyendo incremento de la inmunidad y mejoran la resistencia a enfermedades infecciosas y cáncer (15).

En la gastroenteritis viral, se ha reportado que *Lactobacillus* GG puede contribuir a la disminución de la tasa de diarrea asociada a rotavirus y la excreción del virus. Así mismo un estudio realizado en 55 infantes, describió como la diarrea infecciosa, fue exitosamente tratada al combinar *Bifidobacterium bifidum* y *Streptococcus thermophilus* reduciendo también la tasa de diarrea asociada a rotavirus y su excreción (6).

La habilidad de las cepas de *Lactobacillus* de adherirse a la superficie mucosa del intestino y la colonización extendida o corta, han sido uno de los criterios más comúnmente encontrados para la selección de cepas probióticas. Lactobacilos con capacidad de adhesión, han sido reportados por tener efectos benéficos para la salud, principalmente cuando esta adhesión produce la inhibición de la adhesión de patógenos a las células del intestino, aunque estos tipos de mecanismos aun no han sido dilucidados del todo (16).

En cuanto a las Bifidobacterias son uno de los mayores constituyentes encontrados en la microbiota del intestino de humanos y animales, este grupo bacteriano puede tener un rol importante en mantener la salud del sistema gástrico, controlando el balance microbiológico intestinal, así como la inmunología y fisiología del hospedero. Las características clínicas de las Bifidobacterias

incluyen prevención y/o mejoramiento de diarreas infecciosas, protección de actividad carcinogénica y mejoramiento de las condiciones inflamatorias (17).

Los criterios de selección de las cepas probióticas, tienen que ver con sus características o propiedades, dentro de las cuales están: adhesión, producción de metabolitos, producción de citoquinas, unión a toxinas, caracterización de “quorum sensing”, expresión de genes, propiedades que no afecten al huésped, e información genómica (18).

Uno de los principales mecanismos protectores de los probióticos como se ha mencionado es su capacidad de adhesión, esta adherencia se logra a través de proteínas de unión de la capa superficial (capa-S), inhibiendo la adhesión de otros microorganismos al epitelio intestinal. Se ha visto que estas mismas proteínas tienen una interacción con células dendríticas en el tracto gastrointestinal, siendo un ejemplo de esto, *Lactobacillus acidophilus*, ya que sus proteínas de capa S puede interactuar con proteínas ICAM-3 específicas de las células dendríticas, siendo estas receptores de superficie de la célula, y que reconocen glicanos presentes en superficies microbianas y virales. Estos receptores pueden actuar incrementando la entrada de diferentes virus y cuando interactúan con las proteínas de la capa S, regulan la inducción de un número de citoquinas involucradas en la regulación de la inmunidad celular. En pruebas con virus JUNV, se mostró que al tratar células que expresaban ICAM-3, con proteínas de la capa S de *L. acidophilus* se presentaba una inhibición de la infección por el virus, presentando una acción antiviral no por la eliminación del virus si no por una inhibición de la entrada de este a la célula(19).

Otro ejemplo de uso de probióticos contra infecciones virales fue dado por Kaila et al. (20) quienes estudiaron la estimulación del sistema inmune en respuesta a una infección por rotavirus, donde 39 niños con diarrea aguda por rotavirus, fueron asignados de forma aleatoria a recibir *Lactobacillus GG* o un producto láctico como placebo, encontrándose un incremento en la respuesta celular secretora del anticuerpo específico IgA contra rotavirus en el grupo que recibió el probiótico asociándose a la reducción de la diarrea. Aunque el tratamiento estándar de la diarrea aguda sigue siendo solución de rehidratación oral (ORS), los probióticos

han ganado un importante papel como una terapia adyuvante. Como se ha mencionado, una gran cantidad de pruebas controladas y aleatorizadas han mostrado que los probióticos tienen un efecto frente a las diarreas sobre todo en niños y se ha documentado que ciertas como *L. rhamnosus* GG, *L. casei* Shirota, *L. reuteri*, *B. lactis* Bb-12 entre otros probióticos, son efectivos contra rotavirus acortando el tiempo de recuperación tras episodios de diarrea de 1 a 1,5 días reduciendo la excreción del virus e incrementando la producción de anticuerpos específicos contra rotavirus, así mismo se han encontrado similares resultados contra enfermedades respiratorias virales, siendo las enfermedades respiratorias causantes de una amplia morbimortalidad en el mundo sobre todo en población de más edad, en un estudio por Leyer et al. (13) los efectos del consumo de probióticos en la duración e incidencia de resfriados y sintomatología asociada a influenza fueron evaluados en una población de 326 niños sanos durante la temporada de invierno. En este estudio los niños recibieron *Lactobacillus acidophilus*, *lactobacillus acodopihilus* en combinación con *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis* Bi-07 o un placebo dos veces al día durante 6 meses. Solos o en combinación los probióticos demostraron reducir la incidencia y duración de fiebre, rinorrea y tos así como el número de ausencia al colegio por causa de la enfermedad.

Al observar todos los aportes y beneficios que presentan los probióticos para muchas patologías, siendo el centro de atención para este trabajo, las de origen viral, aun faltan resolver los mecanismos por los cuales los probióticos logran incrementar o asociarse con otras células y procesos para generar el efecto preventivo y antiviral que ha demostrado tener.

Dentro de la propuesta para dilucidar estos mecanismos es útil generar pruebas *in vitro* o *in vivo*, utilizando los anticuerpos producidos para las diferentes proteínas de la cepas probióticas inoculadas en los conejos. Los resultados obtenidos muestran reacción antígeno - anticuerpo en los pozos de las placas de ELISA, reacción evidenciada por la producción de color respaldado por las absorbancias que utilizadas como datos en una grafica mostraron la producción de los

anticuerpos para los antígenos inoculados. Al observar las graficas de producción de anticuerpos, se tiene que los que mas absorbancia presentaron fueron los pozos que contenían anticuerpos dirigidos contra Proteína de membrana y Metabolito A (*Lactobacillus casei*) en contraste con la grafica de producción de anticuerpos contra Proteína de membrana H (*Bifidobacterium adolescentis*), lo cual puede asumirse como una no reacción frente a este antígeno por parte del sistema inmune del conejo pues la cantidad de anticuerpos fue muy baja o no hubo producción de anticuerpos contra este antígeno.

8. Conclusiones

Se identificó la producción de estos anticuerpos dirigidos contra proteínas de origen probiótico, gracias a la utilización de una prueba inmunoenzimática como es un ELISA directo y pudiendo evidenciar esta producción en mayor concentración en la proteína A, continuando con el metabolito A y en menor concentración el metabolito C.

9. Recomendaciones

Utilizar los anticuerpos policlonales producidos contra proteínas y metabolitos de origen probiótico, en pruebas *in vivo* o *in vitro*, para observar el comportamiento de estas proteínas en interacciones que puedan prevenir o eliminar los diferentes agentes etiológicos en infecciones de origen viral y poder entender la importancia, la utilidad y los mecanismos de estas bacterias probióticas como terapias alternativas frente a virus.

10. Bibliografía

1. López P, Cáceres D, Medina E. Enfermedad por rotavirus, Características epidemiológicas, clínicas, prevención y manejo. *CCAP* 6 (2). P 45-55.
2. Manrique F, Billon D, Bello S, Ospina J. Agentes causantes de Diarrea en Niños Menores de 5 Años en Tunja, Colombia. *Revista de salud pública* 2006; 8 (1). P 88-97
3. Wilhelmi I, Mohedano R, Fauquier A. Rotavirus y otros virus productores de gastroenteritis aguda en la infancia. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica* 2008;26. P 61-65
4. Sagaró E. Diarrea persistente. *Colombia médica* 2007. 38. P 66-70
Briceño G, Vera J, Vélez S, Villegas S, Tovar M, López C, Céspedes J. Manejo de diarrea aguda de origen bacteriano: Estudio de casos y controles. *Revista médica sanitas* 2010; 13 (3). P 40-50.
5. Riechmann E, Wilhelmi I. Virus productores de gastroenteritis. Vacunación frente a rotavirus. *Revista gastrohnut* 2006; 8 (1). P 54-64.
6. Lannitti T, Palmieri B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clinical Nutrition* 2010. 29; P 701-725.
7. Cortese M, Parashar U. Prevention of Rotavirus Gastroenteritis Among Infants and Children Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *CDC* 2009. 58; P 1-25
8. Rolfe R. The Role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal Health. *Journal of nutrition* 2000. 130; P396 -402
9. Pennacchia C, Vaughan E, Villani F. Potential probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausages: Further investigations on their probiotic properties. *Meat science* 2006. 73; 90-101
10. Gill H, Rutherford J, Prasad J, Gopal K. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *British Journal of Nutrition* 2000. 83; 167 -176.

11. BOTIC T. KLINGBERG T. WEINGARTL H. CENCIC A. A novel eukaryotic cell culture model to study antiviral activity of potential probiotic bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **115** (2007) 227–234.
12. KOTZAMPASSI k. GIAMARELLOS-BOURBOULIS E. Probiotics for infectious diseases: more drugs, less dietary supplementation. *International Journal of Antimicrobial Agents* xxx (2012) xxx– xxx.
13. SALMINEN S. NYBOM S. MERILUOTO J. COLLADO M. VESTERLUND S. EI-NEZAMIH. Interaction of probiotics and pathogens—benefits to human health? *Current Opinion in Biotechnology* 2010, **21**:157–167.
14. KAUR I. CHOPRA K. SAINI A. Probiotics: potential pharmaceutical applications, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **15** (2002) 1–9.
15. Maragkoudakis P, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* 2006. **16**; P 189 – 199.
16. Sanz Y. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal* 2007. **17**; P 1284–1289.
17. Gueimonde M, Salminen, S. New methods for selecting and evaluating probiotics *Digestive and Liver Disease* 38 Suppl. **2** (2006) S242–S247.
18. Martínez, M. Acosta, M. Candurra, N. Ruzal, S. S-layer proteins of *Lactobacillus acidophilus* inhibits JUNV infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **422** (2012) 590–595.
19. McNaught, C. MacFie, J. Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence. *Nutrition Research* **21** (2001) 343–353.