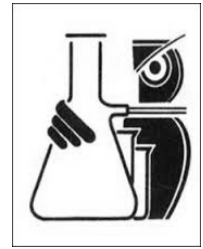


Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



Facultad de Ciencias Químicas
Facultad de Estomatología



**Perfil proteico de *Lactobacillus rhamnosus*
provenientes de niños con caries**

Tesis

Que para obtener el título de:

Licenciado en Químico Farmacobiólogo

Presenta:

Asael Almaraz Arrazola

Director: Dr. Cristian Dionicio Román Méndez

Asesor: QFB. Oscar Pérez Toriz

Puebla, Pue.

Agosto de 2017



BUAP

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
P R E S E N T E

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de la Tesis del alumno de la carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO
ALMARAZ ARRAZOLA ASAEL

realizada en el area de Microbiología, comunican a Ud. la aprobación de la misma con la siguiente redacción:

PERFIL PROTEICO DE Lactobacillus rhamnosus PROVENIENTES DE NIÑOS CON CARIES

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan, a los 8 dias del mes de Agosto de 2017

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

MC. GLORIA LEON TELLO

MSP. MARIA DE LA CRUZ MENESES SANCHEZ

MSP. CARLOS CABRERA MALDONADO

C.c.p. Archivo

Vo. Bo.



Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06



BUAP
MTRO. OMAR GERARDO AGUIRRE IBARRA
DIRECCION DE ADMINISTRACION ESCOLAR
P R E S E N T E

En relacion al oficio de fecha 15 de Agosto de 2017, signado por el Coordinador del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Quimicas, me permito comunicar a Ud. el nombre de los Catedráticos que integran el Jurado de Examen Profesional de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO que sustentará:

ALMARAZ ARRAZOLA ASael

JURADO

MC. GLORIA LEON TELLO
MSP. MARIA DE LA CRUZ MENESES SANCHEZ
MSP. CARLOS CABRERA MALDONADO


Examen que se realizará el dia 23 de Agosto de 2017, a las 16:00 horas en el SALON DE USOS MULTIPLES.

Esperando una respuesta favorable al presente, le reitero mi atenta y distinguida consideracion

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

H. Puebla de Z. a 16 de Agosto de dos mil diecisiete


DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
DIRECTOR



C.c.p. Archivo

No es el agradecimiento más grande que les pueda dar, pero es una manera de mostrarles de que muchas de las cosas que hoy puedo hacer, se los debo gracias a sus grandes esfuerzos.

Todo este tiempo me han ayudado, y eso es algo que debo valorar de una manera impresionante, puesto que son una bendición que Dios me ha enviado, gracias familia.

Mamá

Gracias por todo el apoyo que me has brindado, tus consejos tu fortaleza y tu ánimo de seguir adelante que me han permitido cerrar un ciclo más y que detrás de todos mis errores y tristezas siempre estás y estarás con los brazos abiertos, te quiero mucho.

A mis hermanos.

Gracias por acompañarme en este camino y formar parte de mi vida.

A mi esposa e hijos

Solo puedo decirles “Querer es poder”

A LA MEMORIA

De mí querido padre Sergio Almaraz y Sánchez.

INDICE

Índice de figuras y tabla.	i
Resumen.	ii
1. Introducción.	1
2.1 Caries y su entorno biótico –abiótico.	3
2.2 Lactobacilos.	5
2.3 Perfil proteico.	6
3. Marco de referencia.	7
4. Planteamiento del problema.	9
5. Justificación.	10
6. Objetivos.	11
6.1 Objetivo general.	11
6.2 Objetivos particulares.	11
7. Diseño del estudio.	12
8. Material y metodología.	13
8.1 Choque térmico.	13
8.2 Buffer TENS.	13
8.3 Sonicación.	13
8.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).	14
8.5 Electroforesis desnaturalizante.	14
8.6 Análisis del perfil proteico.	15
9. Resultados y discusión.	16
10. Conclusiones.	22
11. Bibliografía.	23

INDICE DE FIGURAS Y TABLA

Figura 1. PCR especie-específico de <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	16
Figura 2. Cultivos de lactobacilos en agar MRS y tinción de Gram.	17
Figura 3. SDS-PAGE de proteínas de asilados de niños con caries y control.	17
Figura 4. SDS-PAGE de proteínas de aislados de niños con caries y control.	18
Figura 5. SDS-PAGE de proteínas de aislados de niños con caries y control.	18
Tabla 1. Comparativo de perfil proteico de los aislamientos.	19

RESUMEN

El origen de caries dental se relaciona con la interacción simultánea de los factores microorganismo, sustrato y diente, si estos condicionantes confluyeran sólo durante un período muy breve la enfermedad cariosa no se produciría. Se ha reportado que algunos microorganismos se unen a las superficies del diente por proteínas adhesivas en la placa dental formando un nicho, donde se protegen contra los componentes inmunológicos de la saliva. Así la placa se forma, se fijan los microorganismos y metabolizan los residuos de alimento para producir los ácidos que causan la descalcificación del diente. En la flora de la dentina cariosa se han encontrado especies de *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella* y *Lactobacillus*. Los métodos de tipificación convencionales, basados en las pruebas bioquímicas, resistencia a varios agentes y tolerancia a diferentes temperaturas, son pruebas que se utilizan para caracterizar cepas aisladas. No obstante, los diferentes métodos empleados en cada laboratorio pueden conducir a resultados discrepantes. El objetivo del presente trabajo fue determinar el perfil proteico de *Lactobacillus rhamnosus* aislados de niños con caries. Se analizaron 33 aislamientos previamente identificados, por PCR y pruebas API 50CH, como lactobacilos. Las muestras fueron cultivadas y se corroboró la viabilidad y se les realizó extracción de proteínas con la finalidad de realizar perfiles proteicos. Con el método de Buffer TENS se obtuvo una mejor cantidad y calidad del producto proteico, a partir del cual se realizó la electroforesis (SDS-PAGE). Se identificaron 21 proteínas en las cepas de referencia y se contrastaron con las cepas aisladas de los niños con caries observándose mínimas variaciones en el número de proteínas, destacando las proteínas entre 15 y 50 kDa, el análisis de homología con respecto a las cepas de referencia mostró como mínimo el 80.9% y en algunos casos se obtuvo el 100% de homología.

1. INTRODUCCION

La caries dental es una enfermedad infecto-contagiosa causada por las bacterias generadoras de ácido que implica la destrucción lenta y progresiva de los tejidos duros del diente, afectando principalmente las fosetas y fisuras de molares y premolares por los metabolitos de bacterias existentes en la placa bacteriana adherida a su superficie. La caries se asocia también a errores en las técnicas de higiene, falta de cepillado dental, o no saber usar bien los movimientos del lavado bucal, ausencia de hilo dental, así como también, y en mucho menor medida, con una etiología genética. Se ha comprobado así mismo la influencia del pH de la saliva en relación a la caries. Tras la destrucción del esmalte ataca a la dentina y alcanza la pulpa dentaria produciendo su inflamación, pulpitis, y posterior necrosis (muerte pulpar). De acuerdo a los análisis de cráneos infantiles prehistóricos, que datan de alrededor de los años 12,000 o 14,000 A.C., se observó la presencia de lesiones cariosas, siendo los primeros datos reportados de humanos con caries. La caries dental ha estado presente en el ser humano sin importar la localización geográfica, el sexo, nivel socioeconómico o la edad, siendo así, una enfermedad que ha afectado al ser humano a lo largo de su historia. El inicio de la caries dental frecuentemente comienza con el brote de los primeros dientes, cerca del 90% de los jóvenes con problemas de caries son de 12 a 15 años de edad. En infantes de nivel socioeconómico bajo, con padres de nivel bajo de educación y que consumen alimentos ricos en carbohidratos demostraron ser 32 veces más susceptibles de tener caries en la edad de 3 años, en comparación con los niños en quienes esos factores de riesgo no están presentes.

La caries dental constituye un grave problema de salud a nivel mundial y más aún en los países subdesarrollados, debido a que tiene una alta prevalencia en la población, las consecuencias que producen su aparición es un dolor agudo en donde puede aumentar y provocar la pérdida del diente, provocando a su vez problemas estéticos, alterando el bienestar de la persona.

La caries dental resulta de un crecimiento excesivo de microorganismos específicos que son parte de la flora dental humana, y el desarrollo de la enfermedad depende de las bacterias orales que metabolizan los carbohidratos dietéticos para producir el ácido. Aunque una amplia gama de la flora acidogénica puede estar implicada, las especies que se consideran como las principales bacterias responsables de la caries son *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarium*, *Streptococcus oralis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces naeslundii* y *Actinomyces viscosus*.

El análisis de perfiles proteicos se considera un método para relacionar epidemiológicamente cepas aisladas de casos con caries. Y la finalidad del estudio donde se compara el perfil proteico de cepas de *Lactobacillus* de origen humano permitirá establecer relaciones de identidad entre las muestras aisladas, de tal forma la identificación de variaciones en el perfil proteico podrá representar una herramienta de utilidad en el estudio de los casos con caries.

2. MARCO TEORICO

2.1 Caries y su entorno biótico - abiótico

La cavidad bucal de los seres humanos representa un ambiente húmedo, el cual tiene una temperatura relativamente constante (34 a 36°C), con un pH que tiende hacia la neutralidad en la mayoría de sus superficies, soportando el crecimiento de una gran variedad de especies, se expone constantemente a factores exógenos, especialmente durante el producto del alimento y de la respiración, la composición y la densidad de la población microbiana en boca es determinada principalmente por tres factores ecológicos: nutrición, el potencial redox y la adherencia. Además varios factores no específicos del hospedero como son la saliva (pH, sales, enzimas), la dieta (composición, frecuencias de comida), las interacciones microbianas, higiene de la boca y factores inmunológicos como es el caso de la fagocitosis (1).

Al nacer el neonato entra en contacto con la madre, 8 horas después presenta una gran cantidad de microorganismos en boca, que se incrementan con rapidez (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Neisseria*, etc.). En la niñez, las especies anaerobias facultativas son dominantes en la cavidad oral, varios anaerobios se adjuntan con la erupción dental, apareciendo nuevas condiciones microbianas favorables y localizables (1).

Los lactobacilos representan un grupo característico de las bacterias orales, abarcan generalmente menos del 1% de la microflora oral normal de seres humanos y se aíslan comúnmente de la saliva y con frecuencia de una lesión activa de caries, la relación con las formas cocoides es aproximadamente de un lactobacilo por 100,000 cocos; sin embargo, sus proporciones y predominio pueden aumentar en las lesiones avanzadas de la caries del esmalte, es por ello que no se consideran como iniciadores de la enfermedad, pero sí como los invasores secundarios. Aunque los lactobacilos alcanzan el papel de un agente causante de caries dental humana, siendo acidogénico y acidúrico, los lactobacilos presentan poca afinidad por las superficies dentarias, no obstante, se encuentran con frecuencia en las lesiones provocadas por los *Streptococcus mutans* en la placa que cubre la superficie de las piezas dentarias con una lesión incipiente de caries, estando presente en todas las etapas de la enfermedad. Algunos datos sugieren que ellos son favorecidos en su capacidad de colonizar, gracias a la presencia *Streptococcus sobrinus* (2,3).

Se ha establecido que la etiopatogenia de la caries obedece a la interacción simultánea de tres factores principales: un factor “microorganismo” que en presencia de un factor “sustrato” (dieta) logra afectar a un factor “diente” (también denominado hospedero). Si

estos condicionantes confluyeran sólo durante un período muy breve la enfermedad cariosa no se produciría, por lo tanto, se ha agregado el tiempo de interacción de los mismos como un cuarto factor, así como diversas variables e interrelaciones que inciden como modificadores de este proceso (4,5).

Se ha reportado que algunos microorganismos se unen a las superficies del diente por proteínas adhesivas en la placa dental formando un nicho, donde se protegen contra los componentes inmunológicos de la saliva. Así la placa se forma, se fijan los microorganismos y metabolizan los residuos de alimento para producir los ácidos que causan la descalcificación del diente (3).

Se sabe que las poblaciones microbianas implicadas en caries dental son altamente complejas y variables, aunque los organismos dominantes se reconocen generalmente al ser asociados a la progresión de la enfermedad. En la flora de la dentina cariosa se han encontrado especies de *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* y *Veillonella* (6).

Una característica dominante de la microflora de la placa es su heterogeneidad, cada micro ambiente dentro de la boca y en superficies dentarias bien definidas alberga su propia flora única. Es impresionante la evidencia en cuanto a que la naturaleza cualitativa de la flora en la placa determina el metabolismo y el potencial para la producción de caries (2).

Los lactobacilos no son considerados patógenos primarios para el hombre, aunque se les considerada como participantes en la producción de la caries dental, encontrándoseles presentes en una gran variedad de infecciones odontogénicas, pero es incierto si se encuentran como simples contaminantes o participan en forma activa como oportunistas en el proceso patológico de la caries dental (7).

La capacidad colonizadora de los lactobacilos en superficies duras es muy escasa, quedando fijos a las mismas mediante unión física por atrapamiento en la malla que constituye la placa dentaria a estos niveles. Por el contrario, dicha colonización es más fácil en zonas de retención, como fosas y fisuras del diente, alrededor de las restauraciones, en defectos del esmalte o caries preexistentes. Los mecanismos de la adherencia de las bacterias del género *Lactobacillus* en la cavidad bucal no se han estudiado extensamente a excepción de sus capacidades de la congregación (7).

Los estreptococos representan la parte principal de la población microbiana en todos los sitios de la boca; sin embargo, los factores previamente mencionados determinaran la presencia y la proporción relativa a otros grupos bacterianos (6).

Estudios detallados de la placa dental demuestran que la caries es iniciada en gran parte por los microorganismos capaces de adherir a las superficies del diente, principalmente

Streptococcus mutans y consiste en parte a los polímeros extracelulares de glucosa producidos por esta bacteria. Su falta de poder adhesivo de los lactobacilos les resta interés como iniciadores del proceso carioso de superficies lisas, de forma que su papel sería más de invasor secundario que contribuye al avance de las lesiones (8).

2.2 Lactobacilos

El género *Lactobacillus* está conformado por bacterias ácido lácticas son un grupo filogenéticamente muy diverso, constituyendo un grupo heterogéneo formado por cocos o bacilos no esporulados, son grampositivos, catalasa negativas, no esporulados, no móviles, con bajo contenido G+C (menor a 54%), carentes de citocromos, exigentes nutricionalmente, ácido-tolerantes y productores de ácido láctico como producto final mayoritario de la fermentación de carbohidratos. Estas bacterias se distribuyen en hábitats donde hay presencia de carbohidratos y los substratos están disponibles, esencialmente como en los alimentos. Además, varias especies de lactobacilos se encuentran en membranas mucoides como es el caso de la vagina, intestino y cavidad bucal (4).

La mayoría de los lactobacilos orales crecen mejor en un medio reductor provisto adecuadamente de carbohidratos y un amplio rango de temperatura (4 - 45°C), siendo el óptimo de 30 a 40°C. Se denominan acidúricos porque toleran concentraciones altas de ácido, tienen un pH óptimo de crecimiento entre 5.5 a 5.8, concentraciones que comúnmente eliminan a otras bacterias no esporuladas. El medio idóneo para el cultivo de estos microorganismos es el agar y caldo MRS (Man Rogosa y Sharpe). En el caldo el crecimiento es homogéneo con depósitos en el fondo, en el medio sólido, tras incubación en atmósfera de CO₂ a 37°C durante 48 horas, las colonias son blancas, convexas, lisas, circulares, de bordes regulares, con 2-5 mm de diámetro (9).

El género *Lactobacillus* abarca cerca de 80 especies reconocidas y con la ayuda de los nuevos métodos taxonómicos se podrá tener una identificación más precisa de las cepas aisladas, siendo las especies que con mayor frecuencia se encuentran en la cavidad oral *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* (10,11).

Se ha reportado que *Lactobacillus rhamnosus* actúa como inhibidor de caries en niños, actuando contra *Streptococcus mutans* y otros patógenos involucrados, de tal forma su administración como probiótico puede ser útil como auxiliar en la prevención y profilaxis de la enfermedad en pacientes pediátricos, en forma adicional a otros medios de prevención como el uso de fluoruros, promoción de higiene oral o cambios en el consumo de carbohidratos, proporcionando efectos favorables para la salud, ya que son de fácil consumo

y de un bajo costo. Además, que se ha demostrado su capacidad de inhibir el crecimiento y la expresión de factores de virulencia de *Candida albicans*, mejora el tiempo de recuperación nutricional y la respuesta a mediación celular, incrementa la viabilidad de macrófagos, modula señales en procesos inflamatorios y tiene efecto positivo en el tratamiento de la periodontitis crónica (12,13,14). Sin dejar de considerar que el consumo a largo plazo reduce significativamente el riesgo de caries, ya que estos lactobacilos podrían colonizar temporalmente la cavidad oral (8,15).

2.3 Perfil proteico

Los métodos de tipificación convencionales, basados en las pruebas bioquímicas, resistencia a varios agentes y tolerancia a diferentes temperaturas, son pruebas que se utilizan para caracterizar cepas aisladas. No obstante, los diferentes métodos empleados en cada laboratorio pueden conducir a resultados discrepantes. La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) es un método sensible y práctico que permite complementar la identificación y clasificación de los microorganismos (16).

Los perfiles proteicos son útiles para distinguir especies de microorganismos recuperados de muestras clínicas, permitiendo agrupar aislamientos microbianos dentro de la especie en la que habían sido ubicados por el esquema convencional de pruebas bioquímicas. Y debido a que es una prueba económica y rápida la comparación de perfiles proteicos en SDS-PAGE se puede considerar una herramienta confirmatoria útil en la identificación de especies bacterianas (17). Siendo relevante destacar que las características metabólicas de las cepas aisladas a partir de diferentes ambientes sufren una importante influencia del nicho ecológico del cual proceden, condicionando desventajas para su clasificación taxonómica dada la amplia biodiversidad existente. De tal forma, el perfil proteico de una célula se puede utilizar para su clasificación, basándose en la premisa de que organismos estrechamente relacionados deben tener similar o idéntica composición proteica. Además, de los estudios de perfiles proteicos que han permitido detectar la expresión de la proteína MAM-7 en *Lactobacillus rhamnosus*, la cual tiene capacidad de inhibir la colonización *in vitro* del patógeno *Vibrio parahaemolyticus* (18,19).

3. MARCO DE REFERENCIA

Diversos estudios referentes a la flora oral indican su naturaleza compleja, el que la flora oral se pueda dividir de acuerdo a su función: a) en productora de ácidos, siendo los estreptococos y los lactobacilos los más abundantes de las especies acidogénicas residentes, y b) los lactobacilos los más acidúricos. Otros trabajos han postulado que los lactobacilos pudieran intervenir en la fase descalcificante del diente en la caries dental, además de haber reportado lactobacilos en lesiones cariosas y determinado su alto potencial de producción ácida y su capacidad de sobrevivir en el medio ácido, por lo que plantean que los lactobacilos son los agentes causales de la caries dental, siendo la caries dental un proceso infeccioso (20,21).

Aunque las bacterias responsables de la iniciación de la caries y su progresión se han estudiado extensivamente, la microbiología de la caries dental ha mostrado diversidad considerable y todavía no se ha caracterizado completamente, siendo el género *Lactobacillus* implicado en dicho procesos. Los lactobacilos que se han encontrado en la superficie del diente de infantes y de niños jóvenes con caries son *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus* (22,23).

Durante los últimos 20 años los principales factores biológicos que han sido utilizados como indicadores de actividad de caries dental, son *Streptococcus mutans* y lactobacilos. Para la identificación y enumeración de dichas bacterias en saliva y en material de la placa, se han desarrollado métodos que son tanto factibles como fiables (24,25). Para la identificación se usan métodos que permiten un análisis fenotípico y genotípico. Los análisis de perfiles proteicos han servido para investigar diferentes microorganismos, desde 1953 un incremento en el número de estudios, han servido para demostrar la presencia de proteínas superficiales en bacterias, siendo un análisis confiable para comparar y agrupar un número grande de bacterias, y en particular Gatti *et al* (1997) ha reportado el análisis de proteínas de pared celular de lactobacilos usando el regulados TENS y el método de SDS-PAGE demostrando que es una técnica sensible y rápida para caracterizar diferentes proteínas de pared celular, obteniendo información valiosa sobre la semejanza o disparidad entre las mismas cepas de lactobacilos utilizadas en la producción de quesos en el norte de Italia, para ello realizan el análisis de proteínas de pared celular de bacterias ácido lácticas aisladas de diferentes quesos madurados, ellos encuentran que una banda de 50 kDa es característica de las cepas de *L. helveticus* el 13% de las cepas presentan una bande de 30kDa y un menor porcentaje una de 60 kDa, para *L. delbnruekii spp bulgaricus* y *L. delbruekii spp lactis* se encontraron

diferentes bandas que van desde los 100 kDa hasta los 10 kDa, encontrando principalmente las de 13, 15, 31, 45 y 66 kDa en diferentes proporciones para las distintos aislados de estas cepas de lactobacilos. Ellos concluyen que las diferencias entre los diferentes perfiles de las proteínas de pared celular puede estar relacionado con la adaptación de la bacteria a diferencias en los ecosistemas que se generan durante la producción y maduración de quesos (26, 27), por otro lado también proponen a esta técnica de análisis de proteínas de pared celular para diferenciar a *L. delbruekii* spp *lactis* de *L. helveticus* en la elaboración de quesos.

Las características morfológicas y bioquímicas de los hospederos pueden causar alteraciones en el metabolismo de las bacterias y traducirse en cambios en la composición de sus proteínas, de tal forma que el estudio y análisis de estas variaciones ha sido importante ya que se han podido revelar compuestos químicos que sirven para diversos estudios, donde por medio del análisis de perfiles proteicos se logró evidenciar la expresión de MAM-7 en *Lactobacillus rhamnosus* que reduce la adhesión intrínseca de *Vibrio parahaemolyticus* (18). También por medio de la caracterización de perfiles proteicos se ha estudiado en *Lactobacillus rhamnosus* los efectos de sus componentes de superficie celular con capacidad de adhesión y su aplicación como probióticos (28), y los estudios referentes a recombinación de bacterias ácido lácticas ha permitido obtener y caracterizar sus perfiles proteicos para su aplicación en el diseño de vacunas (29), además de los reportes que han permitido evaluar patrones proteicos característicos del fluido crevicular gingival de pacientes con periodontitis crónica y sanos (16).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Varios estudios han demostrado que los microorganismos son capaces de adquirir genes por diversos mecanismos, esta transferencia de genes les puede proporcionar nuevas características a las bacterias entre ellas nuevos factores de patogenicidad y virulencia como puede ser la presencia de nuevas adhesinas, resistencia a antibióticos, generación de nuevos metabolitos, enzimas, etc. Estos intercambios genéticos pueden favorecer que bacterias que no son patógenas a transformarse en una que si lo es. La presencia de las proteínas superficiales se ha utilizado para estudiar y para comparar varias bacterias entre ellas cepas de lactobacilos y como se sabe los lactobacilos están presentes en diversas microfloras e incluso son usados para realizar productos lácteos por pertenecer al grupo de bacterias acidolácticas.

Se calculó que la cavidad oral puede estar colonizada por más de 700 especies microbianas distintas siendo los lactobacilos aproximadamente el 1% de la flora cultivable, esta gran diversidad microbiana aumenta la probabilidad de transferencia genética entre micropoorganismos. Estudios previos por nuestro grupo de investigación encontró que *L. rhamnosus* se aisló en el 100% de niños con procesos cariogénicos y no en niños sin caries. Por lo que surge la siguiente pregunta: ¿Hay diferencia entre los perfiles proteicos de *Lactobacillus rhamnosus* aislados de saliva de niños con caries en comparación con la cepa tipo *L. rhamnosus* ATCC 9595?

5. JUSTIFICACION

Las enfermedades ocurren cuando un microorganismo específico alcanza un sitio blanco en donde los tejidos y las condiciones permitan al microorganismo prosperar y alcanzar un número elevado para causar daño al hospedero, tal es el caso del género *Lactobacillus* que está implicado en la progresión de lesiones cariadas. Numerosos estudios han demostrado la presencia de lactobacilos en una cantidad significativa dentro de la cavidad bucal especialmente en saliva, los efectos causados por estas bacterias son debido a su capacidad acidogénica y acidúrica causando la desmineralización del esmalte de los dientes.

El análisis de proteínas ha sido usado para investigar estatus taxonómicos en diferentes microorganismos, recientemente el estudio de proteínas totales y superficiales es usado para comparar algunas cepas de lactobacilos.

El propósito de este estudio fue caracterizar por perfil proteico a través de SDS-PAGE las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* aisladas de niños con caries.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar el perfil proteico de *Lactobacillus rhamnosus* aislados de niños con caries.

6.2 Objetivos particulares

1. Comprobar la pureza de las cepas congeladas en el medio selectivo MRS.
2. Estandarizar la técnica para la lisis celular de lactobacilos.
3. Analizar, por geles de poliacrilamida, los perfiles proteicos de la lisis celular.

7. DISEÑO DEL ESTUDIO

Tipo de estudio

Descriptivo, prospectivo, transversal y observacional.

Tamaño de la muestra

Se incluyeron en el estudio 33 cepas silvestres provenientes de niños con caries, aisladas de un estudio realizado con anterioridad.

Sede del estudio

Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

Criterios de selección

Criterios de inclusión: Cepas de *Lactobacillus rhamnosus* provenientes de niños con caries.

Criterios de exclusión: Cepas de lactobacilos diferentes a *Lactobacillus rhamnosus* provenientes de niños con caries.

Recursos financieros

Este estudio fue financiado por el laboratorio de Microbiología oral de la Facultad de Estomatología de la BUAP.

Recursos humanos

Director: DC. Cristian Dionisio Román Méndez.

Asesor: QFB Oscar Pérez Toriz.

pQFB: Asael Almaraz Arrazola.

Diseño estadístico

Estadística descriptiva la cual se realizara a través de imágenes y una tabla.

8. MATERIAL Y METODOLOGIA

Se incluyeron en el estudio 33 cepas silvestres provenientes de niños con caries y las cepas de referencia *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4556, las cuales fueron proporcionadas por el cepario del Laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Las muestras silvestres fueron previamente identificadas con la prueba bioquímica API 50CH y complementándose la identificación con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específico utilizando los primers Prl (sense) 5'-CAGACTGAAGTCTGACGG-3' y Rhall (antisense) 5'-GCGATGCGAATTTCTATTATT-3'.

Se tomaron alícuotas (100 ml) de cada una de las 33 cepas silvestres y se inocularon en caldo MRS, incubándolas a 5% CO₂ y a 37 °C por 24 horas. Después se sembraron en agar MRS dejándolas incubando bajo las mismas condiciones, para verificar que las cepas estuviesen puras, se les realizó identificación por su morfología y tinción de Gram incluyendo a las cepas de referencia *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4656, para posteriormente realizar la extracción de proteínas, por medio de los siguientes métodos:

8.1 Choque térmico

Las muestras fueron incubadas en caldo MRS, centrifugándose a 10000 x g durante 7 minutos, enseguida se lavaron dos veces con NaCl (0.9%) y el paquete fue resuspendido en 2 ml de NaCl (0.9%) para posteriormente colocarlos en agua caliente durante 10 minutos y posteriormente se colocaron en hielo durante 5 minutos, realizando este paso cinco veces más. Se centrifugo a 10000 x g durante 7 minutos, separando el sobrenadante para posteriormente analizarlo por electroforesis en gel de poliacrilamida.

8.2 Buffer TENS

Las muestras se lavaron dos veces con NaCl (0.9%) estéril y se centrifugaron a 5000 x g durante 10 minutos, resuspendiendo el paquete en 1.5 ml de NaCl (0.9%). Después de ser lavada la muestra el paquete final fue resuspendido en 0.5 ml de 0.01 mol l⁻¹ Tris-HCl, 0.01 mol l⁻¹ EDTA, 0.01 mol l⁻¹ NaCl, 2 % SDS, colocándose a 100 °C por 5 minutos.

Después del tratamiento, la suspensión fue centrifugada (11, 600 x g durante 10 minutos) y el sobrenadante se examinó en SDS-PAGE.

8.3 Sonicación

Las muestras se recolectaron directamente de agar MRS y se colocaron en microtubos con 1 ml de NaCl (0.9%) estéril, durante la sonicación las cepas se mantuvieron en hielo, la lisis

se realizó con una frecuencia de 60 KHz dando pulsos de 30 segundos por seis ciclos, dejando reposar entre cada pulso 30 segundos para que la muestra se mantuviera en frío.

8.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada eléctricamente cuando ésta se somete a un campo eléctrico. Los geles de poliacrilamida son ampliamente utilizados para la separación de proteínas y fragmentos pequeños de ADN y ARN, estas moléculas poseen cargas eléctricas y por ende pueden moverse cuando se someten a un campo eléctrico. Las proteínas poseen carga eléctrica como resultado de los residuos de aminoácidos como el glutámico y el aspártico y básicos como la lisina y la arginina.

El gel se obtiene mediante la polimerización de los monómeros de acrilamida, la cual es iniciada con persulfato de amonio, este se disocia en radicales libres. Cuando estos radicales se ponen en contacto con monómeros de acrilamida, ésta es activada y puede reaccionar sucesivamente con otras moléculas para producir un polímero de cadena larga.

Una solución de este polímero de cadena larga, aunque es viscosa no gelifica debido a que las cadenas no se unen una a otra. Para que se forme el gel se requiere que esos polímeros de cadena larga se unan por entrecruzamiento de estas por presencia de la N,N'-metilen-bis-acrilamida que reacciona con los grupos funcionales libres en los extremos de las cadenas.

Durante la formación del gel, la N, N, N', N'-tetrametilen-diamina (TEMED) únicamente participa como catalizador en la reacción de polimerización.

8.5 Electroforesis desnaturizante

Las proteínas pueden ser desnaturizadas por una variedad de agentes tales como urea e hidrocloreuro de guanidina así como detergentes iónicos fuertemente positivos o negativos. Dentro de estos, el detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS del inglés, Sodium Dodecyl Sulfate), ha sido extremadamente útil combinado con separación electroforética en geles de poliacrilamida.

El SDS al unirse a las proteínas mediante interacciones hidrofóbicas, separándolas a la mayoría de ellas en sus subunidades que se encuentra unidas por enlaces no covalentes, es decir las desnaturiza (elimina sus estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria).

Habrán un número definido de cargas negativas del SDS por residuo de aminoácido y por lo tanto la carga aportada por este detergente será proporcional al peso molecular (PM) de la proteína, lo cual enmascara la carga normalmente presente en la molécula cuando se encuentra en ausencia de SDS.

Generalmente, para lograr la desnaturalización completa de la muestra se debe incluir un agente reductor como el 2-mercaptoetanol y un tratamiento térmico a ebullición durante unos minutos. Estos agentes reducen los puentes disulfuro de las proteínas convirtiéndolos en grupos sulfhidrilos. Se ha comprobado que todos los complejos SDS-proteína adoptan una conformación extendida o de bastón, eliminándose la influencia de la forma en la movilidad electroforética. Cuando la electroforesis se realiza en geles de poliacrilamida, con la porosidad adecuada para generar el efecto de tamiz molecular, la separación ocurre exclusivamente en función del peso molecular. Los complejos con mayor tamaño molecular presentaran más resistencia al pasar por los poros del gel y migraran con menor velocidad que los de menor tamaño.

8.6 Análisis del perfil proteico

Los extractos proteicos libres de células fueron analizados como se describió anteriormente por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) usando el sistema discontinuo, sobre geles verticales (18 x 13 x 0,75cm). Los geles de resolución y concentración se prepararon a partir de 12 y 4% de acrilamida-bisacrilamida, respectivamente (Bio-Rad), usando el sistema persulfato de amonio y TEMED como catalizador de la polimerización y las proteínas fueron visualizadas por tinción con colorante

9. RESULTADOS Y DISCUSION

A partir de las 33 cepas que fueron aisladas e identificadas, en el Laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por medio de galerías API 50CH y PCR (Figura 1), se realizaron cultivos en el caldo y agar MRS, resultando viables entre las 24 y 48 horas de incubación, además de su verificación por morfología y tinción de Gram (Figura 2).

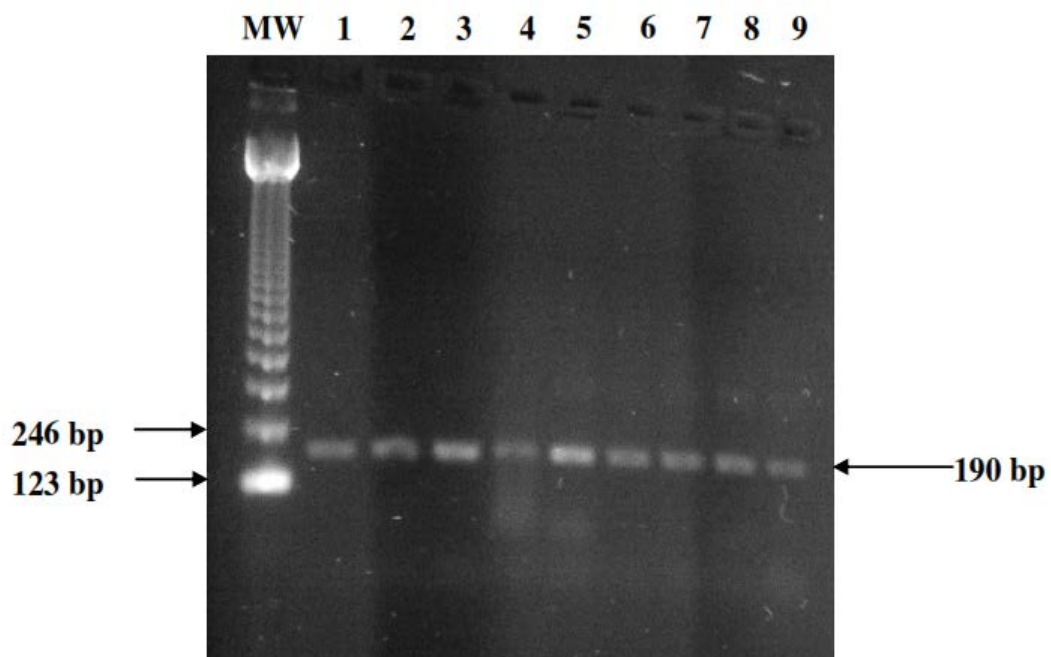


Figura 1. PCR especie-específico de *Lactobacillus rhamnosus*, líneas 2 a 9 asilamientos de niños con caries, línea 1 *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, línea MW marcador de peso molecular 123 pares de bases. Fuente: Román-Méndez, *et al.*, 2009 (30).



A



B

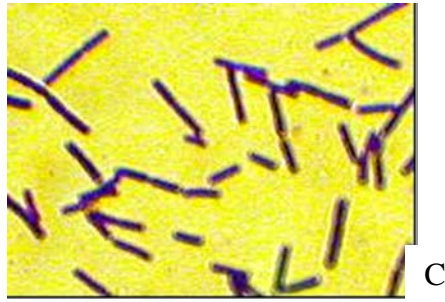


Figura 2. Cultivo por estria cruzada de lactobacilos en agar MRS (A y B), tinción mostrando bacilos grampositivos (C).

Al evaluar diferentes métodos de extracción de proteínas se obtuvo mayor cantidad y calidad del producto con el método Buffer TENS, a partir del cual se realizó la prueba de electroforesis (SDS-PAGE). Se evidenciaron un promedio de 20 proteínas en las cepas de referencia (*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4556), y al contrastar con las cepas aisladas de los niños con caries se observaron mínimas variaciones en el número de proteínas, destacando las proteínas con 15, 16, 22, 40, 63, 90, 110, 160 y 220 kDa (Figuras 3, 4y 5), y al realizar el comparativo de las proteínas que se presentan entre las cepas de referencia y los aislamientos se obtuvo un 80% como mínimo de homología y en algunos casos se presentó el 100% de homología (Tabla 1).

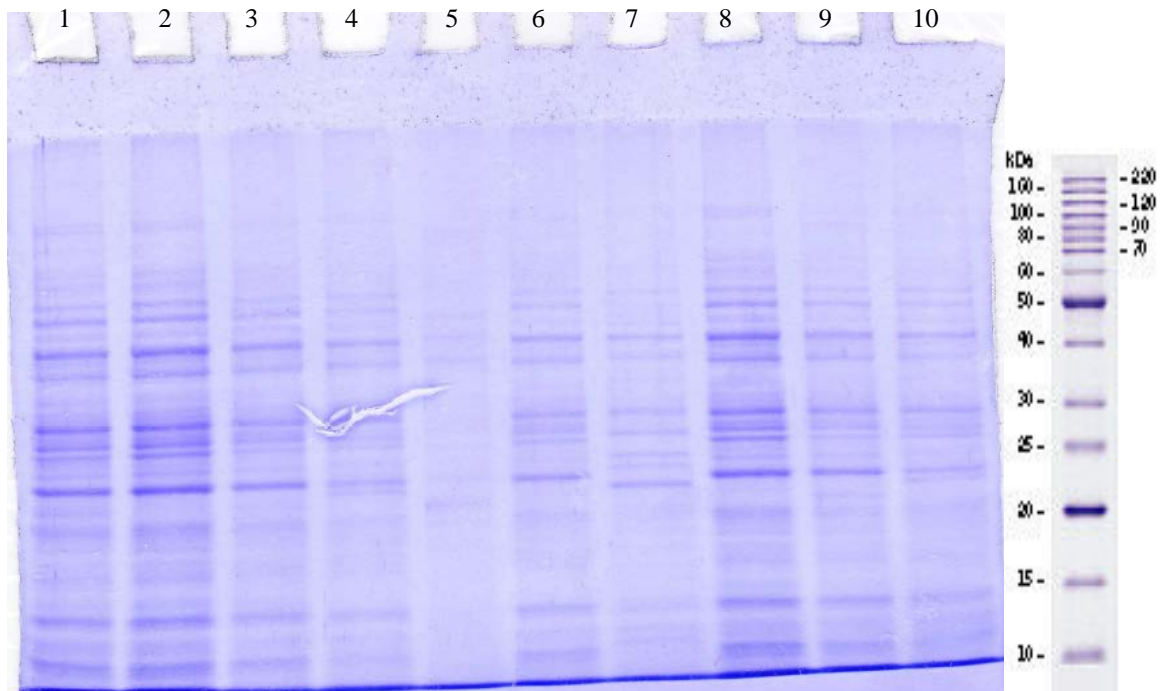


Figura 3. SDS-PAGE de proteínas, línea 5 cepa control de *Lactobacillus rhamnosus*, líneas 1 a 4 y 6 a 10 muestras de las cepas aisladas de lactobacilos de niños con caries.

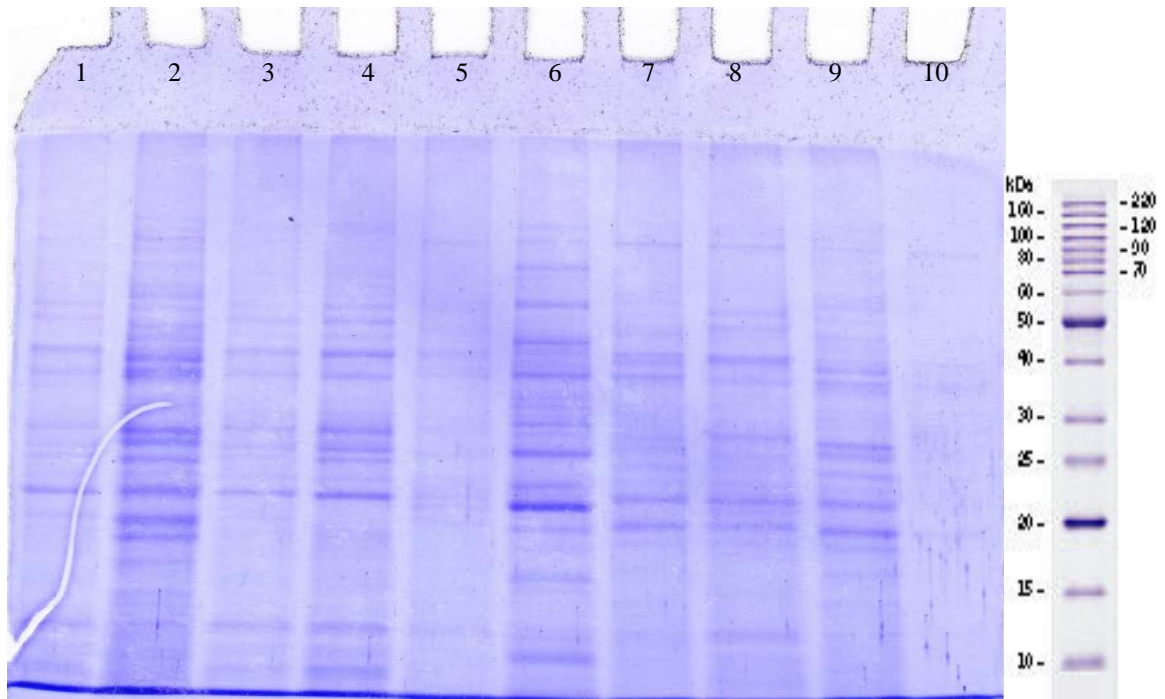


Figura 4. SDS-PAGE de proteínas, línea 10 cepa control de *Lactobacillus acidophilus*, líneas 2 a 9 muestras de las cepas asiladas de lactobacilos de niños con caries.

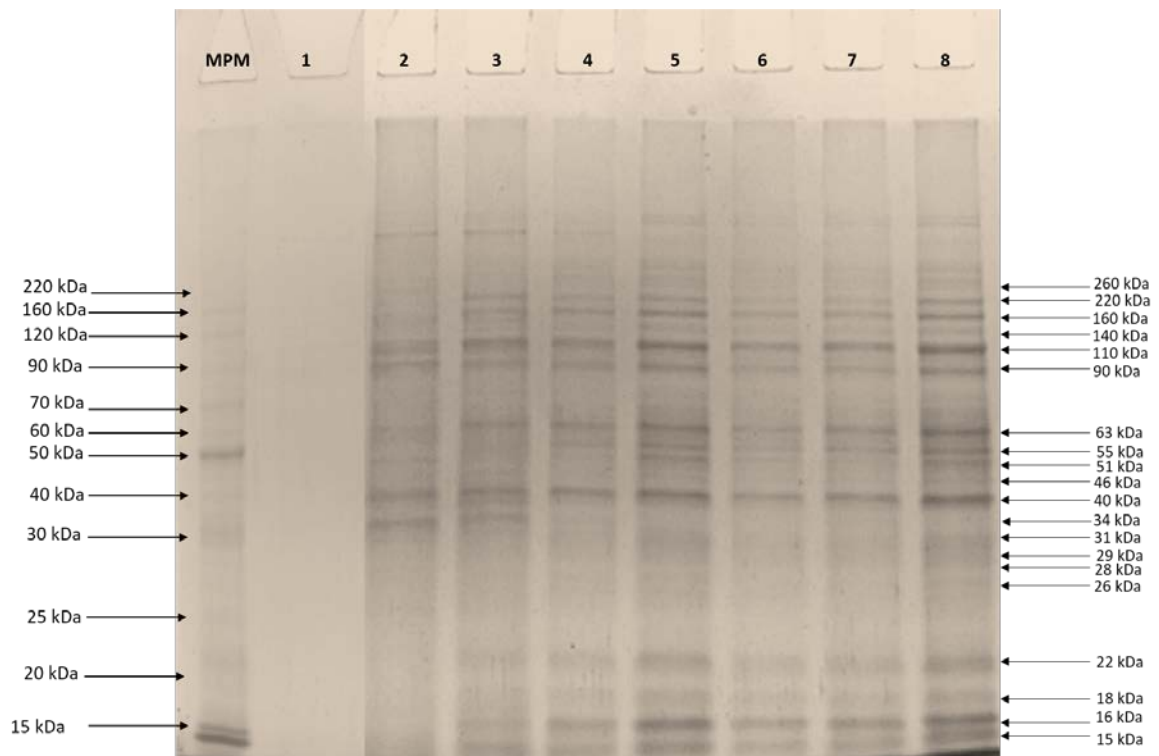


Figura 5. SDS-PAGE de proteínas, línea MPM (Marcador de peso molecular), línea 1 sin muestra, línea 5 *L. rhamnosus* ATCC 9595, líneas 2, 3, 4, 6, 7 y 8 muestras de las cepas asiladas de lactobacilos de niños con caries

Tabla 1. Comparativo de perfil proteico entre cepas de referencia y los aislamientos

Aislamiento	No. bandas en los aislamientos (% homología)	No. bandas homologas en cepas de referencia	Gel (figura) y posición
2C	20 (100)	20	3, 1
2D	20 (100)	20	3, 2
2B	17 (85)	20	3, 3
6	18 (90)	20	3, 4
7B	18 (90)	20	3, 6
7C	19 (95)	20	3, 7
8	20 (100)	20	3, 8
12	20 (100)	20	3, 9
17	20 (100)	20	3, 10
34B	20 (100)	20	4, 1
34C	18 (95)	20	4, 2
35	18 (95)	20	4, 3
36	16 (80)	20	4, 4
42	20 (100)	20	4, 5
46	17 (85)	20	4, 6
47	17 (85)	20	4, 7
102	19 (95)	20	4, 8
101	16 (80)	20	4, 9

Las especies del género *Lactobacillus* son una de las taxos más importantes implicadas en microbiología de alimentos y nutrición humana. Esto se debe al papel que tienen en la producción y preservación de alimentos y también a las características probióticas exhibidas por algunas cepas. Estos rasgos son de importancia cada vez mayor y reciben la atención de los consumidores, industriales y recientemente de la comunidad científica por la asociación que se ha evidenciado de *Lactobacillus rhamnosus* con casos de caries (30,31).

Los resultados aquí presentados mostraron proteínas en la zona comprendida entre los 15 y 50 kDa, sugiriéndose que esta variedad de proteínas está relacionada con el tipo de sustrato que degradan los lactobacilos, siendo susceptibles a los cambios en sus fuentes nutricionales, modificando en mayor grado su composición proteica por este factor abiótico. La ausencia o presencia de algunas proteínas, como en el caso de las muestras en las líneas 4 y 7 en la figura 3 es también un indicador de los cambios bioquímicos en los lactobacilos a causa de las variaciones en la composición de sus sustratos. De tal forma, se debe considerar que los genes permanecen básicamente sin cambios por periodos más prolongados, pero las

proteínas varían de acuerdo a las condiciones que rodean a las bacterias. Los resultados de las electroforesis de proteínas son caracteres fenotípicos que reflejan mucho mejor las diferencias genéticas entre especies o poblaciones que cuando se estudian los caracteres morfológicos. Por ello los perfiles proteicos representan una buena herramienta para el diagnóstico microbiológico (32).

La mayor discrepancia en la taxonomía del género *Lactobacillus* es la baja correlación existente entre las propiedades metabólicas y la filogenética. La subdivisión histórica del género *Lactobacillus* basada en el tipo de fermentación ha sido revisada y se ha subrayado el hecho de que a términos como homofermentativo y heterofermentativo y ambos términos acompañados de obligado y/o facultativo se le han asignado significados, lo cual puede llevar a error. De tal manera se han desarrollado diferentes técnicas para la identificación y caracterización de proteínas de interés, proporcionando información referente al espectro de huéspedes y de conocer casos de expresión de proteínas. Las proteínas de los diferentes aislamientos se analizaron en SDS-PAGE, definiéndose el perfil proteico característico de cada una de ellos. Este tipo de estudios al compararlo con el caso de *Bacillus thuringiensis* donde se demostró que dichas cepas no contienen ninguno de los genes *cry1*, *cry2* o *cry9*, con conocida actividad insecticida, lo cual sugiere que dichas cepas producen nuevas proteínas Cry (33), situación que no puede ser ajena a otros tipos de bacterias como es el caso de los *Lactobacillus sp.*, en el caso particular de *L. rhamnosus* en la producción de queso Parmigiano Reggiano se observó que son la microflora dominante presente durante sus distintas etapas de maduración, utilizando una combinación de técnicas moleculares (RAPD-PCR y REP-PCR) se evidenció el polimorfismo genético de 66 cepas aisladas en diferentes etapas de maduración del queso, lo cual se correlaciona con sus habilidades para adaptarse a diferentes ambientes y procesos tecnológicos, la detección de biotipos que se correlacionan con momentos específicos, en la maduración del queso o el desarrollo diferencial a lo largo de este proceso (38). Esto puede estar pasando en boca en virtud de la presencia de las diferentes condiciones que se presentan en este ecosistema, además de la sucesión microbiana que pueda favorecer a que aumente su habilidad cariogénica.

Tradicionalmente la identificación bacteriana se ha basado en la utilización de métodos fenotípicos que incluyen las características morfológicas y tintoriales que presentan los microorganismos en distintos medios de cultivos, así como las reacciones bioquímicas propias de cada especie. Sin embargo, esto implica una carga laboral y consumo de tiempo importante para el personal del laboratorio, puesto que la identificación bacteriana puede

tomar desde horas e incluso hasta días, sobre todo para aquellos microorganismos fastidiosos, lo cual sin duda, impacta directamente en el pronóstico (34).

Bajo esta inquietud, se han buscado métodos que aumenten la exactitud y disminuyan los tiempos de respuesta en la identificación bacteriana. Entre las técnicas más utilizadas en la microbiología moderna destacan los sistemas en miniatura de pruebas analíticas bioquímicas, cuyo inconveniente es que en algunos casos pueden ser lentos e imprecisos. En esta misma línea están los sistemas automatizados que realizan identificación bacteriana en tiempos más cortos; sin embargo, el costo de implementación es alto. Probablemente lo que ha ganado mayor terreno en la actualidad, es la biología molecular, que si bien es bastante precisa, aún tiene tiempos prolongados de respuesta debido a la falta de automatización universal de sus procesos, lo que la hace susceptible de errores y contaminación; además sus altos costos de implementación la limita a algunos centros (35).

A lo anterior se debe considerar la implementación del uso de la espectrometría de masas como estándar de oro en las distintas áreas del laboratorio clínico y la posibilidad de uso de MALDI-TOF MS en aplicaciones clínicas de proteómica y metabolómica. Desde su introducción en los laboratorios de microbiología clínica en el año 2008, se han escrito numerosas publicaciones sobre su utilidad en la identificación de microorganismos desde colonias, así como directamente desde hemocultivos positivos y de muestras de orina (36).

10. CONCLUSIONES

1. Se verifico la pureza y viabilidad de las cepas estudiadas en el medio MRS.
2. La técnica Buffer TENS resultó ser la más adecuada para la lisis celular de los lactobacilos.
3. Las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* aislados de niños con caries presentan perfiles proteicos similares a los de la cepa tipo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595

.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Baños, R.F., Aranda, J.R. (2003). Placa dentobacteriana. *Revista ADM*. 60: 34-36.
2. Michalek, M.S., Masatoma, H., Hiroshi, K., Kuniyasu, O., McGhee JR. (1981). Oral ecology and virulence of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans* in gnotobiotic rats. *Infec. Immun.* 33: 690-696.
3. William, H., Crawford, M.S. (2004). Teeth: dental caries and pulp diseases. *Oral Pathol.* 8: 101-112.
4. Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica, fundamentos y guía práctica*. Segunda Edición, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. Pp. 489-497.
5. Sampaio-Maia, B., Caldas, I.M., Pereira, M.L., Pérez-Mongiovi, D., Araujo, R. (2016). The oral microbiome in health and its implication in oral and systemic diseases. *Adv. Appl. Microbiol.* 97: 171-210.
6. Martin, F.E., Mangala, A.N., Jacques, A.N., Hunter, N. (2002). Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1698–1704.
7. Ahumada, M.C., Bru, E., Colloca, M.E., López, E., Nader-Macías, M. (2003). Evaluation and comparison of lactobacilli characteristics in the mouths of patients with or without cavities. *J. Oral Sci.* 45: 1-9.
8. Rebolledo, M., Rojas, E., Salgado, F. (2013). Efecto de dos probióticos que contienen cepas de *Lactobacillus casei* variedad rhamnosus y *Lactobacillus johnsonii* sobre el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans*. *Int. J. Odontostomat.* 7: 415-419.
9. Takahashi, N. (2015). Oral microbiome metabolism: from “Who are they” to “What are they doing?”. *J. Den. Res.* 94: 1628-1637.
10. De Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M.R., Gobbetti, M. (2001). Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic and cell wall protein analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2011-2020.
11. Munson, M.A., Banerjee, A., Watson, T.F., Wade, W.G. (2004). Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3023-3029.
12. Morales, A., Galaz, C., González, J., Silva, J., Hernández, M., Godoy, C., García-Sesnich, J., Díaz, P., Carvajal, P. (2016). Efecto clínico del uso de probióticos en el tratamiento de la periodontitis crónica: ensayo clínico. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral.* 9: 146-152.

13. Mendi, A., Kose, S., Uckan, D., Akca, G., Yilmaz, D., Aral, L., Gultekin, S.E., Eroglu, T., Kilic, E., Uckan, S. (2016). *Lactobacillus rhamnosus* could inhibit *Porphyromonas gingivalis* derived CXCL8 attenuation. J. Appl. Oral Sci. 24: 67-75.
14. Leao, M.V., Silva, C.R., Dos Santos, S.S., Leite, P.G. (2015). *Lactobacillus rhamnosus* pode alterar a virulencia de *Candida albicans*. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 37: 417-420.
15. Caglar, E., Kargul, B., Tanboga, I. (2005). Bacteriotherapy and probiotics role on oral health. Oral Dis. 1: 131-137.
16. Hernández, M., Obregón, F., Pozo, P., Barriga, A., Valenzuela, M.A. (2008). Caracterización de perfiles proteicos y peptídicos en periodontitis crónica. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral. 1: 53-56.
17. Massa, R., Bantar, C., Lopardo, H., Vay, C., Gutkind, G. (2007). Whole-cell protein profiles are useful for distinguishing enterococcal species recovered from clinical specimens. Rev. Argentina Microbiol. 39: 199-203.
18. Beltran, S., Munoz-Bergmann, A., Elola-Lopez, A., Quintana, J., Segovia, C., Trombert, A.N. (2016). The expression of heterologous MAM-7 in *Lactobacillus rhamnosus* reduces its intrinsic capacity inhibit colonization of pathogen *Vibrio parahaemolyticus in vitro* Biol. Res. 49: 2-10.
19. Gómez, S., Milena, G.S., de Bedout, C., García, A.M. (2011). Analisis del perfil proteico de aislamientos clínicos de *Candida guilliermondii* sensibles y resistentes al fluconazol. Infectio. 15: 20-24.
20. Duran-Pinedo, A.E., Frias-Lopez, J. (2015). Beyond microbial composition: functional activities of the oral microbiome in health and disease. Microbes Infect. 17: 505-516.
21. Tannock, W.G. (2004). A special fondness for lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol. 70: 3189-3194.
22. Paciello, M.R., Osorio, Z.M., Cavazonni, Z.J. (2001). Flora microbiana prevalente en lesiones cariosas de individuos residentes en asunción y área metropolitana. Rev. Ciencias y Tecnología, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. 1: 1-10.
23. Mattos, M.A., Melgar, R.A. (2004). Riesgo de caries dental. Rev. Estomatol. Herediana. 14: 101-106.
24. Kleinberg, I. (2002). A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 13: 108-125.

25. Ehlers, M.M., Cloete, T.E. (1999). Direct extractions of proteins to monitor an activated sludge system on a weekly basis for 34 weeks using SDS-PAGE. Department of Microbiology and Plant Patholog. Water. 25: 57-62.
26. Gatti, M., Fornasari, E., Neviani, E. (1997). Cell-wall protein profiles of dairy thermophilic lactobacilli. Lett. Appl. Microbiol. 25: 345-348.
27. Pérez, G., Evaristo, C., Victoria, Z. (2000). Protein fingerprinting as a complementary analysis to classical phenotyping for the identification of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. EDP Sciences. 80: 589-600.
28. Polak-Berecka, M., Paduch, R., Skrzypek, T., Sroka-Bartnicka, A. 2014. The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. Antonie Van Leeuwenhoek. 106: 751-762.
29. Trombert, A. 2015. Recombination lactic acid bacteria as delivery vectors of heterologous antigens: the future of vaccination?. Beneficial Microbes. 6: 1-12.
30. Román-Méndez, C., Badet, C., Yañez, A., Dominguez, M.L., Giono, S., Richard, B., Nancy, J., Dorignac, G. (2009). Identification of oral strains of *Lactobacillus* species isolated from Mexican and French children. J. Dent. Oral Hyg. 1: 9-16.
31. Botha, S.J., Botha, F.S., Senekal, R. (1998). *Lactobacillus* species associated with active caries lesions. J. Den. Assoc. South Africa. 53: 3-6.
32. Ezzell, C. (2002). Proteins rule. Scientific American. 286: 26-33.
33. De Escudero, R.I., Ibañez, I., Padilla, M.A., Carnero, A., Caballero, P. (2004). Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* procedentes de muestras de tierra de Canarias. Bol. San. Veg. Plagas. 30: 703-712.
34. García, P., Allende, F., Legarraga, P., Huicaman, M., Solari, S. (2012). Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. Rev. Chilena Infectol. 29: 263-272.
35. Welker, M., Moore, E.R. (2011). Applications of whole cell matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry in systematic microbiology. Syst. Appl. Microbiol. 34: 2-11.
36. Sauer, S., Kliem, M. (2010). Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 8: 74-82.
37. Héber, E. M., Raya, R.R., de Gori. S:S: (2000). Use of SDS-PAGE of cell Wall proteins for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* and *Lactobacillus helveticus*. Biotechnology Lett. 22: 1003-1006.

38. Bove, C.G., Lindner, J., Lazzi, L., Gatti, M., Neviani, E. (2011). Evaluation of genetic polymorphism among *Lactobacillus rhamnosus* non-starter Parmigiano Reggiano cheese strains. *Int. J. Food Microbiol.* 144: 569-572.