

ÍNDICE GENERAL

Página

INTRODUCCIÓN.

1. AZÚCARES ALCOHOL.	1
1.1. Generalidades.	1
1.2. El sorbitol.	2
2. ALIMENTOS FUNCIONALES.	4
2.1. Los probióticos.	6
2.2. Los prebióticos.	7
2.3. Administración conjunta de pro y prebióticos: los “simbióticos”.	10
3. INVESTIGACIÓN DE PREBIÓTICOS <i>IN VIVO</i> .	11
3.1. La rata como modelo animal de investigación.	11
3.2. Estudio de la microbiota intestinal y la producción de ácidos orgánicos.	12
3.3. Aumento en la producción de inmunoglobulina A intestinal.	14
4. PRODUCCIÓN DE HIDROLASAS DE SALES BILIARES (HSB) POR BACTERIAS INTESTINALES.	15
5. TAXONOMÍA E IDENTIFICACIÓN DE LACTOBACILOS.	17
5.1. El género <i>Lactobacillus</i> .	18
5.2. El grupo de <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	20
5.3. Métodos para la clasificación taxonómica de bacterias.	22
5.3.1. Técnicas moleculares en la clasificación taxonómica de bacterias.	22
5.3.1.1. Hibridación DNA-DNA.	22
5.3.1.2. Secuenciación de los genes que codifican el 16S rRNA y análisis filogenético.	25
5.3.1.3. Otros genes utilizados en estudios filogenéticos.	28
5.3.1.4. Hibridación en “ <i>microarrays</i> ”.	29
5.4. Tipado de cepas de <i>Lactobacillus</i> .	32
5.4.1. Tipificación genética.	32
5.4.2. Tipado de cepas mediante electroforesis de proteína.	33

OBJETIVOS.

1. Objetivo general.	37
2. Objetivos específicos.	37

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. ENSAYOS <i>IN VIVO</i> CON PREBIÓTICOS.	41
1.1. Animales y diseño experimental.	41
1.2. Recogida de muestras, medida de peso corporal, pH y lípidos en sangre.	41
1.3. Recuentos bacterianos utilizando cultivo en placa.	43
1.4. Estudio de la microbiota por métodos moleculares.	44
1.4.1. Extracción de DNA y amplificación de los genes que codifican para el 16S rRNA por PCR.	44
1.4.2. Análisis de los productos de PCR por Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).	45
1.4.3. Aislamiento y secuenciación de DNA de bandas del gel de DGGE.	46
1.5. Aislamiento y caracterización de <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> de intestino de rata.	47
1.5.1. Obtención de cultivos puros de <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> y comprobación por PCR-DGGE.	47
1.5.2. Extracción de DNA e identificación de <i>Lactobacillus</i> .	48
1.5.3. Análisis filogenético de las secuencias de DNA.	49
1.6. Enumeración de dos especies de <i>Lactobacillus</i> por PCR cuantitativa.	49
1.6.1. Elaboración de patrones para la curva de calibración.	49
1.6.2. Cuantificación de <i>Lactobacillus reuteri</i> AD23 y <i>Lactobacillus</i> sp. AD102.	50
1.7. Determinación de ácidos orgánicos en las Heces-Inicial, Heces-Final y contenido del colon y del ciego de ratas.	51
1.8. Determinación de inmunoglobulina A secretora (IgAs) en heces de rata.	52
1.9. Actividad HSB en las cepas de <i>Lactobacillus</i> aislados de intestino de rata.	52
1.9.1. Ensayo en placa de la actividad HSB.	52
1.9.2. Análisis cuantitativo por HPLC de la actividad HSB.	53
1.10. Análisis estadísticos.	54

2. MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA TAXONOMÍA DE LACTOBACILOS.	54
2.1. Obtención de nuevos aislamientos de <i>Lactobacillus</i> sp. AD102.	54
2.2. Cepas utilizadas y medios de cultivo.	55
2.3. Análisis fenotípicos.	55
2.4. Análisis filogenéticos mediante secuencias de DNA.	57
2.4.1. Amplificación y secuenciación de los genes que codifican el 16S rRNA y gen <i>recA</i> .	57
2.4.2. Análisis filogenéticos.	58
2.5. Hibridación DNA-DNA.	59
2.5.1. Preparación del DNA.	59
2.5.2. Marcaje de sondas.	60
2.5.3. Preparación de las membranas.	60
2.5.4. Prehibridación, hibridación y detección inmunológica.	60
2.5.5. Cuantificación.	61
2.6. Electroforesis de proteína total.	62
2.6.1. Preparación de la muestra.	62
2.6.2. Preparación del gel, electroforesis de proteína y análisis de resultados.	62
2.7. Genotipado mediante ERIC-PCR.	63
2.8. Comparación de cepas del grupo de <i>L. acidophilus</i> mediante "microarrays".	64

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

CAPÍTULO I. Estudio del efecto prebiótico del sorbitol en rata.	67
1. RESULTADOS.	67
1.1. Efecto sobre el peso corporal, peso del tejido intestinal y pH del contenido intestinal y heces.	67
1.2. Efecto sobre la concentración de lípidos en sangre.	68
1.3. Concentración de lactato y ácidos grasos de cadena corta en heces y contenido intestinal de rata.	70
1.4. Determinación de inmunoglobulina A en heces de rata.	71
1.5. Análisis bacteriológico en las muestras de heces y contenido del colon y del ciego por métodos culturales.	73
1.6. Análisis de las muestras de Heces-Final y contenido del colon y	76

del ciego por PCR-DGGE.	
1.6.1. Microbiota total.	76
1.6.2. Especies de <i>Lactobacillus</i> .	77
1.6.3. Especies de <i>Bifidobacterium</i> .	81
1.7. Aislamiento e identificación de especies de <i>Lactobacillus</i> .	81
1.8. PCR cuantitativa de <i>Lactobacillus</i> sp. AD102 y <i>L. reuteri</i> AD23 en heces, y contenido del colon y del ciego de rata.	83
1.9. Producción de HSB en las cepas de <i>Lactobacillus</i> aislados de intestino de rata.	88
1.9.1. Ensayo en placa de HSB.	88
1.9.2. Análisis cuantitativo por HPLC.	88
2. DISCUSIÓN.	92
CAPITULO II. Clasificación taxonómica de <i>Lactobacillus</i> sp. AD102 aislado de intestino de rata.	101
1. RESULTADOS.	101
1.1. Obtención de nuevos aislamientos de <i>Lactobacillus</i> sp. AD102.	101
1.2. Características fenotípicas de las 26 cepas de <i>Lactobacillus</i> estudiados.	102
1.3. Análisis filogenético de cepas de <i>Lactobacillus</i> .	106
1.3.1. Análisis filogenético de las secuencias del gen que codifica para el 16S rRNA	106
1.3.2. Análisis de secuencias del gen <i>recA</i> .	112
1.4. Hibridación DNA-DNA.	112
1.5. Análisis comparativo de perfiles de proteína de cepas de <i>Lactobacillus</i> del grupo de <i>L. acidophilus</i> .	120
1.6. Genotipado de cepas del grupo de <i>L. acidophilus</i> mediante ERIC-PCR.	122
1.7. Comparación del genoma de la cepa <i>L. johnsonii</i> NCC533 (BL298) con otros <i>Lactobacillus</i> mediante "microarrays".	122
1.8. Características fenotípicas de las especies del grupo de <i>L. acidophilus</i> .	124
2. DISCUSIÓN.	125

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.

- | | |
|----------------------------|-----|
| 1. Discusión general. | 135 |
| 2. Conclusiones generales. | 136 |

BIBLIOGRAFIA.

141

ANEXO 1. Comparación del genoma de la cepa *L. johnsonii* NCC533 (BL298) con otros *Lactobacillus* mediante "microarrays". 163

ANEXO 2. Secuencias realizadas durante este trabajo que aun no han sido publicadas total o parcialmente y están incluidas en los resultados finales. 167

