

González, Juan Ignacio

“Cloruro de sodio como agente de extracción de proteínas de capa-S de *Lentilactobacillus kefir* (SLP-Lk) : Puesta a punto del proceso y evaluación de propiedades funcionales de las SLP-Lk obtenida”

2023

*Instituto: Ciencias de la Salud*

*Carrera: Bioquímica*



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.  
Atribución – no comercial – sin obra derivada 4.0  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

González J. I. (2023). *Cloruro de sodio como agente de extracción de proteínas de capa-S de *Lentilactobacillus kefir* (SLP-Lk) : Puesta a punto del proceso y evaluación de propiedades funcionales de las SLP-Lk obtenida* [tesis de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]

Disponible en RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital UNAJ

<https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj>



**Trabajo final de la carrera de Bioquímica  
Instituto de Ciencias de la Salud  
Universidad Nacional Arturo Jauretche**

**“Cloruro de sodio como agente de extracción de proteínas de capa-S de *Lentilactobacillus kefiri* (SLP-Lk). Puesta a punto del proceso y evaluación de propiedades funcionales de las SLP-Lk obtenidas.”**

**Alumno: Juan Ignacio González  
Directora: Dra. María de los Ángeles Serradell  
Codirector: Lic. Matías H. Assandri**

**Abril 2023**

El presente trabajo ha sido realizado en la Cátedra de Microbiología del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. María de los Ángeles Serradell, Profesor Asociado SD, Inmunología para la Carrera de Bioquímica, ICS, UNAJ; Investigador Independiente CONICET, y codirección del Lic. Matías H. Assandri, Becario Doctoral CONICET, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

## Agradecimientos

Sería difícil mencionar a todas las personas que me ayudaron a concretar lo que alguna vez empezó como solamente un sueño. El tiempo pasó, algunas de esas personas ya no están y algunas otras siguen conmigo, llegó gente nueva para quedarse, y mientras tanto, lo que empezó como un sueño hoy ya es casi una realidad. Todo esto no hubiera sido posible sin ustedes, o tal vez sí, pero de lo que estoy seguro, es que no hubiera sido tan feliz como lo fue. No me queda más que agradecer antes de cerrar esta etapa.

Gracias a mi familia. A mis viejos, Karina y Alberto, por tanta paciencia y tanto amor. Es verdad que “un lápiz pesa menos que una pala”. Gracias por darme la posibilidad de comprobarlo. A mi hermano y mejor amigo, Joaquín, por darme la alegría y mostrarme de que se trata la pasión.

Gracias a Dani, mi novia. Gracias por el aguante y por compartir esta locura conmigo. Como si fuera poco con todo lo que me dejó este camino, me llevo también a quien me llena el corazón.

Gracias a mis abuelos, que desde acá abajo o desde allá arriba, nunca dejaron de empujar.

Gracias a mis profesores, que día a día con tanta vocación, hicieron que descubra lo que me apasiona. No puedo dejar de mencionar a algunos: Alejandro, Marcelo A., Laura V., María, Pato, JPG... ¡Gracias!

Gracias a María y Matías por brindarme su lugar de trabajo como a uno más de su equipo. Aprendí mucho, no solo del mundillo de la investigación sino de cómo ponerle el corazón a enseñar y aprender, siempre con humildad. Más allá de este trabajo, hicieron del último tramo una gran experiencia.

Gracias a mis amigos, a los que siguen cerca y a los que la vida los llevó por otros rumbos, todos fueron especiales a su manera.

Gracias a mis compañeros, por hacer de las dificultades un desafío en equipo y por tantos lindos momentos compartidos.

Gracias a la gente del Hospital de Wilde, por confiar en mí y acompañarme en mis primeros pasos.

Me hicieron muy feliz. Gracias, de corazón.

Juani

# Índice

1. Introducción .....	7
1.1 Estructura de la capa S .....	7
1.2 Capa S en lactobacilos.....	11
1.3 <i>Lentilactobacillus kefir</i> : capa S, antecedentes del grupo de trabajo y potenciales aplicaciones .....	12
1.4 Extracción y evaluación de propiedades funcionales de proteínas de capa S de <i>L. kefir</i> .....	14
2. Objetivos .....	18
3. Materiales y métodos.....	19
3.1 Material biológico .....	19
3.1.1. Microorganismos y condiciones de cultivo.....	19
3.1.2 Células eucariotas y condiciones de cultivo.....	21
3.2 Extracción de proteínas de capa S de <i>L. kefir</i> .....	21
3.2.1 Extracción de proteínas capa S de <i>L. kefir</i> utilizando LiCl 5M.....	22
3.2.2 Extracción de proteínas capa S de <i>L. kefir</i> utilizando NaCl 5M.....	22
3.3 Separación electroforética de proteínas .....	22
3.3.1 Separación mediante SDS-PAGE.....	22
3.3.2 Revelado con Coomassie blue coloidal .....	23
3.4 Cuantificación de proteínas totales extraídas .....	24
3.5 Ensayos de activación celular.....	24
3.5.1. Cultivo de células RAW 264.7, recuento y preparación de placas.....	24
3.5.2. Ensayo de activación celular .....	24
3.5.3 Cuantificación de IL-6.....	25
3.5.4 Análisis de moléculas co-estimuladoras por citometría de flujo.....	26
3.6 Ensayos de citotoxicidad .....	27
3.6.1 Cultivo de células Vero, recuento y preparación de placas .....	27
3.6.2 Determinación del título del SCS .....	27

3.6.3 Ensayo de citotoxicidad en presencia de SLP de <i>L. kefir</i> .....	27
3.7 Análisis estadístico .....	28
4. Resultados y Discusión.....	29
4.1 Extracción de proteínas de capa S de <i>L. kefir</i> y análisis de los extractos obtenidos .....	29
4.2 Ensayos de activación celular, cuantificación de IL-6 y análisis de moléculas co-estimuladoras por citometría de flujo .....	35
4.3 Ensayos de citotoxicidad sobre células Vero .....	48
6. Bibliografía .....	53

## 1. Introducción

La diversidad de la arquitectura molecular de la superficie bacteriana, particularmente la estructura de las capas más externas, refleja la adaptación evolutiva del microorganismo a condiciones ecológicas y ambientales específicas. Una envoltura proteica rígida monomolecular autoensamblada, conocida como **capa S**, es considerada la membrana biológica más ancestral, y se ha mantenido a lo largo de la evolución tanto en bacterias como en *Archaea* (Claus *et al.* 2005). La presencia de capa S ha sido descrita en numerosas especies bacterianas, entre las que se encuentran algunos lactobacilos (Malamud *et al.* 2019a). Los lactobacilos han sido aislados de diversos entornos naturales, incluyendo plantas, productos alimenticios, ensilados, aguas residuales, y el tracto gastrointestinal y vías genitales de los seres humanos y los animales, donde forman parte de la microbiota comensal. Asimismo, estas bacterias ácido-lácticas han despertado gran interés debido a los efectos benéficos sobre la salud (probióticos) que han sido demostrados para muchas cepas del género (Fijan 2014). También han demostrado ser prometedoras para ser empleadas como vehículos de drogas terapéuticas y antígenos vacunales en los seres humanos (Ucisik *et al.* 2015).

Los microorganismos se han venido utilizando como fuente de biomoléculas con diferente funcionalidad, durante décadas. En particular, es importante destacar que las proteínas de capa S (SLP) han demostrado poseer propiedades fisicoquímicas excepcionales, como su capacidad de autoensamblarse en solución o sobre diferentes tipos de soportes, que las convierten en una estructura orgánica única con altísimo potencial de aplicación en diferentes áreas de la nanobiotecnología. Entre ellas se pueden mencionar la generación de vehículos GRAS (“*generally regarded as safe*”) para la administración de antígenos y otras moléculas de importancia biomédica, el desarrollo de reactivos en fase sólida como biocatalizadores, dispositivos diagnósticos, biosensores, etc. (Ilk *et al.* 2011, Wang *et al.* 2015, Ücisik *et al.* 2013).

### 1.1 Estructura de la capa S

La capa S está formada por subunidades proteicas o glicoproteicas, de entre 40 y 200 kDa, unidas entre sí mediante uniones no covalentes y por tal motivo éstas pueden ser

fácilmente liberadas y solubilizadas mediante tratamientos con agentes que rompen uniones de hidrógeno (cloruro de guanidinio, urea), detergentes (SDS) y agentes quelantes, o por sustitución de cationes (LiCl) (Sleytr *et al.* 2014). En algunas bacterias se ha descrito la presencia de proteínas asociadas llamadas SLAP, que se extraen junto con las SLP y que pueden mediar diferentes tipos de interacciones con el entorno (Johnson *et al.* 2013).

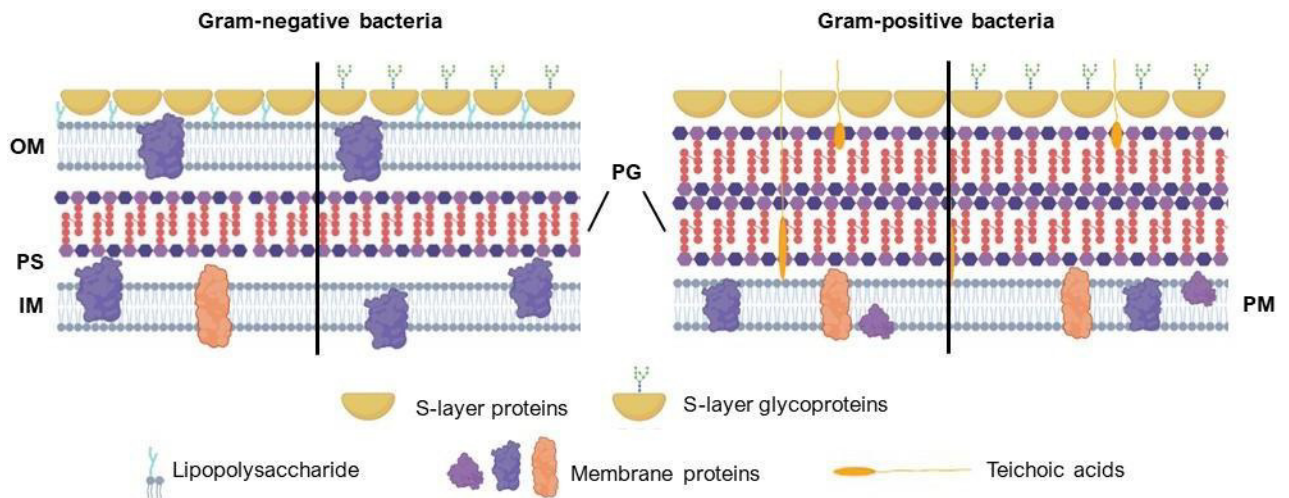
Las capas S generalmente consisten en un solo tipo de proteína que tiene la característica intrínseca de poder ensamblarse en estructuras cristalinas bidimensionales altamente ordenadas. La simetría espacial bidimensional que adquiere la capa S luego de su montaje, ha sido dilucidada principalmente mediante cristalografía electrónica, microscopia de fuerza atómica y técnicas de dispersión de rayos X y neutrones (Malamud *et al.* 2019a). Las redes de capa S generalmente exhiben simetría oblicua, cuadrada o hexagonal con espacio de centro a centro de las subunidades de entre 4 y 35 nm. En *Archaea* la simetría hexagonal es predominante y el grosor de la capa S es notoriamente superior a las formas bacterianas. En bacterias, se encuentran con más frecuencia las simetrías oblicuas y tetragonales. Dichas estructuras se conforman por redes de proteínas altamente porosas (30-70% de porosidad) con poros de tamaño y morfología uniforme en el rango de 2-8 nm. (Sleytr *et al.* 2014). Al ser generalmente la membrana más externa de la célula, esta propiedad le otorga funcionalidad como tamiz molecular, regulando el intercambio de diferentes macromoléculas con el medio externo, en el rango de 30 a 40 kDa (Brietweiser *et al.* 1982, Sara *et al.* 1992).

Las subunidades proteicas que conforman la capa S suelen ser ricas en aminoácidos hidrófobos y poseen pocos o ningún aminoácido que contenga azufre (Hynönen & Palva, 2013). La formación de matrices autoensambladas solo está determinada por la secuencia de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas y, en consecuencia, de la estructura terciaria de las proteínas que las conforman. Como dichas proteínas tienen una alta proporción de aminoácidos no polares, lo más probable es que las interacciones hidrofóbicas estén involucradas en la etapa inicial del proceso de ensamblaje, siendo el montaje de la capa S un proceso impulsado por la entropía. (Sleytr *et al.* 1975). Los valores de pI de dichas proteínas oscilan entre 4 y 6, exceptuando a algunas arqueas y lactobacilos, cuyo pI suele estar comprendido entre 8 y 10 (Malamud *et al.* 2019a).



Aunque las proteínas de capa S muestran una baja homología a nivel de secuencia, se han identificado principios comunes de organización estructural. Se ha observado que dichas proteínas exhiben principalmente dos regiones morfológicas separadas: una responsable de la unión a la pared celular y la otra necesaria para el autoensamblaje (Sleytr *et al.* 2014, Malamud *et. al.* 2019a). La posición de la región de anclaje a la pared celular puede variar entre especies bacterianas. En algunas especies Gram positivas, puede reconocerse un motivo estructural recurrente de aproximadamente 55 aminoácidos, que se encuentra por triplicado en el extremo amino-terminal. Se lo denomina motivo de homología de capa S (SLH) y se encuentra directamente involucrado en el anclaje de la capa S a la pared celular (Hynönen *et. al.* 2013).

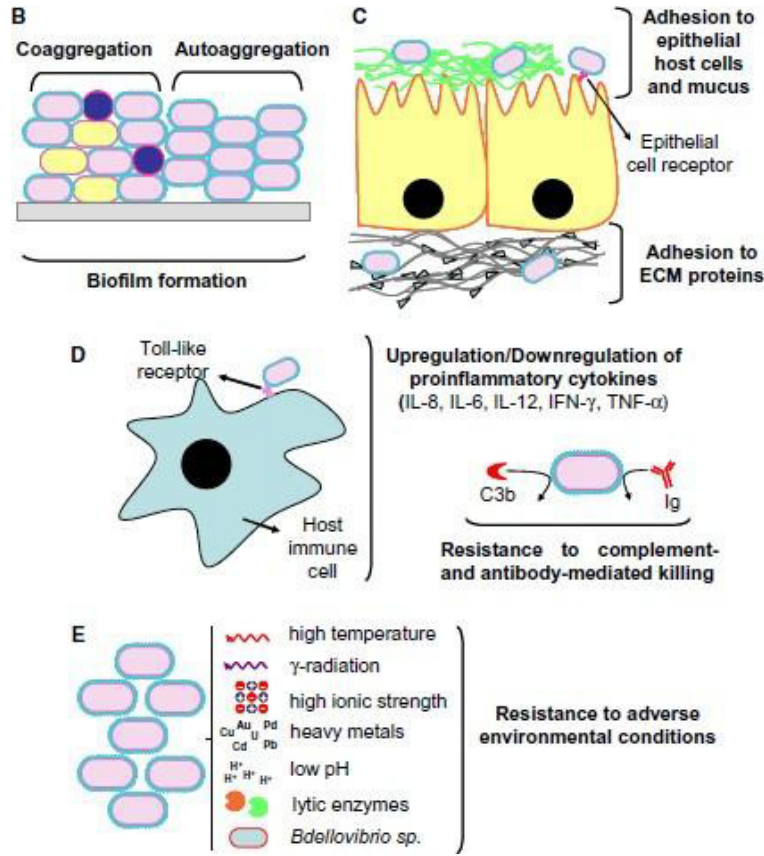
En bacterias Gram negativas, la capa S se adhiere al lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa a través de interacciones iónicas, carbohidrato-carbohidrato, proteína-carbohidrato y/o interacciones proteína-proteína. Por otro lado, en bacterias Gram positivas la unión se establece con la capa de peptidoglicano o con un polímero secundario de la pared celular (SCWP), que según su naturaleza química puede tratarse de un ácido teicoico, lipoteicoico o polisacárido neutro. (Sleytr *et al.* 2014) (Figura 1).



**Figura 1:** Disposición de la capa S en bacterias. IM: membrana interna, OM: membrana externa, PG: peptidoglicano, PS: espacio periplásmico. Extraída de: “S-layer proteins as immune players: Tales from pathogenic and non-pathogenic bacteria”. (Assandri *et. al.* 2023)

Un aspecto importante de las proteínas de capa S, que las convirtió en un objeto de estudio de gran interés para la comunidad científica fue su metabolismo, más puntualmente, sus modificaciones post-traduccionales. Las SLP fueron las primeras glicoproteínas detectadas en procariotas y todavía se encuentran entre las mejor estudiadas como ejemplar de glicosilación proteica en este taxón (Sleytr *et al.* 2014). De hecho, la glicosilación es la modificación post-traducciona l más frecuente que sufren estas proteínas. En las bacterias, la N-glicosilación es un evento raro, por lo que las SLP bacterianas se caracterizaron inicialmente como O-glicosiladas y el grado de glicosilación varía generalmente entre el 2 y el 10 % p/p (Messner *et al.* 2008). Otras de las modificaciones post-traduccionales que fueron documentadas para estas proteínas son la escisión proteolítica de fragmentos carboxi o amino terminales, la sulfatación y la transferencia de lípidos. (Eichler y Adams, 2005).

Con respecto al rol biológico de la capa S en microorganismos y su interacción con el ambiente, se han publicado numerosos trabajos que postulan muy variadas hipótesis. Se ha demostrado que las SLP son esenciales en la determinación o mantenimiento de la forma y en funciones celulares muy diversas: actúan como tamices moleculares, tienen actividad enzimática degradante, funcionan como sitios de unión para grandes moléculas, iones o bacteriófagos y median la adhesión bacteriana a diferentes superficies (Fijan 2014, Gerbino *et al.* 2015). En el caso de microorganismos patógenos, la capa S actúa como un factor de virulencia ya que permite la adhesión a las células del huésped o componentes de la matriz extracelular, induce la coagregación con otros microorganismos y la formación de biopelículas, colabora en la evasión de la respuesta inmunitaria del huésped (modulando la respuesta de las células T, generando variación antigénica y protegiendo a la bacteria de la muerte mediada por complemento y fagocitosis) y protege al microorganismo de factores ambientales dañinos (incluidos cambios en el pH ambiental, estrés mecánico u osmótico y péptidos antimicrobianos). (Gerbino *et al.* 2015) (Figura 2).



**Figura 2:** Funciones atribuidas a la capa S en diversas especies bacterianas. Extraída de: “Role of S-layer proteins in the biosorption capacity of lead by *Lactobacillus kefir*”. (Gerbino *et. al.* 2015.)

## 1.2 Capa S en lactobacilos

Las bacterias ácido-lácticas son microorganismos Gram positivos, no patógenos, caracterizados por la producción de ácido láctico como producto final del metabolismo de los carbohidratos. Dentro de las bacterias del ácido láctico, el género *Lactobacillus* forma un grupo grande y heterogéneo de microorganismos fermentadores no esporulantes, anaeróbicos o microaerófilos con necesidades nutricionales complejas. Pueden encontrarse en numerosos ambientes y forman parte de la flora normal de humanos y animales. Como se mencionó anteriormente, este género despierta gran interés no solo debido al poder probiótico de algunas especies sino por su potencialidad en el ámbito de la biotecnología, debida en gran parte a las propiedades funcionales de su capa S, la cual se ha

implementado en el desarrollo de vacunas, vehiculización de fármacos y diseño de biocatalizadores.

Las SLP de los lactobacilos difirieren de las proteínas de capa S en general en su tamaño más pequeño (25 a 71 kDa) y en su alto valor de pI previsto (9,4 a 10,4) por tener una mayor cantidad de residuos cargados positivamente que negativamente. La simetría de la capa S en este género, cuando se conoce, es de tipo oblicua o hexagonal (Palva *et al.* 2005, Huggias 2022). Es importante destacar que la estructura primaria de estas proteínas dentro del género suele estar mal conservada y difiere entre cepas de una misma especie. (Malamud *et al.* 2017).

Respecto a sus dominios, para las SLP de lactobacilos se han propuesto diferentes regiones de anclaje a la pared celular, en extremos amino o carboxi-terminal, que interactúan con ácidos lipoteicoicos o polisacáridos de la pared celular por medio de interacciones electrostáticas. No se han documentado dominios SLH en SLP de lactobacilos como si ha ocurrido para una gran variedad de géneros Gram positivos. Por otro lado, los dominios de autoensamblaje se encuentran en las regiones más variables de la proteína y su ubicación depende de la especie en cuestión. (Chen *et al.* 2009).

Las modificaciones post-traduccionales en estas proteínas parecen ser un evento raro en lactobacilos y la glicosilación es la única modificación que se ha documentado hasta el día de la fecha. Entre las pocas estructuras de glicanos que se han determinado hasta el momento, se han encontrado solo estructuras O-glicosídicas (Anzengruber *et al.* 2014, Malamud *et al.* 2020), siendo la N-glicosilación un evento que fue descrito únicamente para *L. kefir* JMC 5818 y CIDCA 83111 (Cavallero *et al.* 2017).

### **1.3 *Lentilactobacillus kefir*: capa S, antecedentes del grupo de trabajo y potenciales aplicaciones**

En los últimos años, el grupo de trabajo que dio sustento a la realización de este Trabajo Final se ha abocado al estudio de las propiedades probióticas de cepas de *Lentilactobacillus kefir* (antes llamado *Lactobacillus kefir*) (Zheng *et al.* 2020) aisladas de un fermento natural conocido como “kefir” (Carasi 2014, Carasi *et al.* 2014a, 2015). Se sabe que, en varios casos, las propiedades probióticas e inmunorreguladoras dependen de la interacción de la capa S con la microbiota y células del huésped, por lo que, luego de

que se demostrara la presencia de estas proteínas superficiales en las cepas de *L. kefir* (Garrote *et. al.* 2004), se inició una nueva línea de trabajo con el objetivo de estudiar las características estructurales y funcionales de las SLP en esta especie.

Las SLP de *L. kefir* (SLP-Lk) comparten las características específicas que presentan las SLP de lactobacilos en general, como su peso molecular, la ausencia de cisteínas y la mayor proporción de residuos con carga positiva respecto a los cargados negativamente, lo que resulta en la ausencia de puentes disulfuro y un punto isoeléctrico elevado, característico de las proteínas de capa S dentro de este género. (Malamud *et al.* 2017, Hynönen *et al.* 2013). La gran diferencia que presenta esta especie respecto al resto de los lactobacilos en su capa S, es la frecuencia de la glicosilación como modificación post-traducciona, lo que resulta un evento excepcional dentro del género. Dicho evento fue informado en primera instancia para doce cepas de *L. kefir* (Mobili *et. al.* 2009) y posteriormente para once nuevas cepas (Malamud *et al.* 2017). La composición y estructura de los restos glicosídicos se estudió solo en 4 cepas (*L. kefir* CIDCA 8321, 8348, 83111 y JCM 5818). Todas estas cepas presentan SLP O-glicosiladas, con excepción de *L. kefir* CIDCA 83111 (Cavallero *et. al.* 2017) y *L. kefir* JMC 5818 (Malamud *et. al.* 2020) donde coexiste la N- y la O-glicosilación como modificación post-traducciona. Diferentes estudios genómicos y proteómicos realizados hasta el día de la fecha permitieron el conocimiento de la estructura aminoacídica de numerosas cepas de *L. kefir*. De toda la información obtenida, cabe destacar que las diferencias estructurales de SLP entre cepas se deben principalmente a una gran variabilidad en la región carboxi-terminal lo que se contrapone a una región amino-terminal relativamente conservada entre cepas. (Malamud *et al.* 2017, Mobili *et. al.* 2009). Por último, también es importante mencionar que dentro de esta especie existen cepas con capacidad autoagregante (Golowczyc *et al.* 2007), lo que puede observarse en cultivo y se debe a aspectos estructurales de su capa S. Esta afirmación se respalda en que luego de la extracción de SLP con LiCl, las cepas clasificadas como autoagregantes pierden esta capacidad, mientras que el mismo tratamiento no afecta el comportamiento en cultivo de las cepas no agregantes (Mobili *et. al.* 2009). En este trabajo, estudiaremos las propiedades de las proteínas de capa S de una cepa agregante (CIDCA 8348) y de otra cepa clasificada como no agregante (CIDCA 83111).

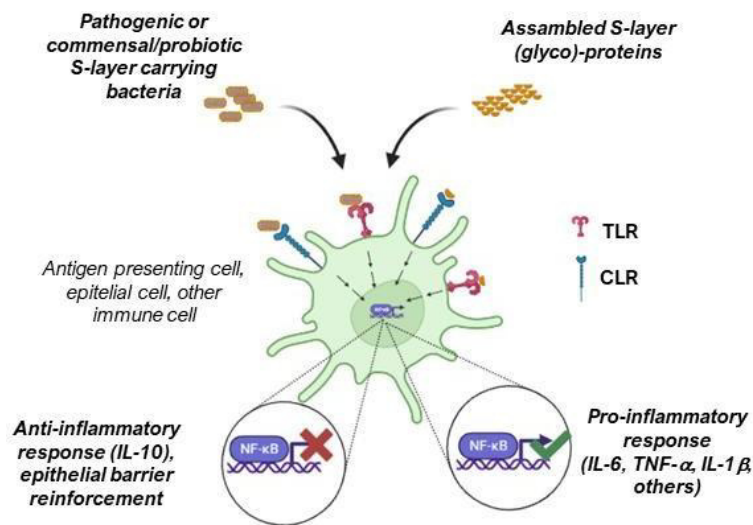
Respecto a su contribución a las propiedades probióticas y su potencialidad biotecnológica, estas SLP median procesos de inhibición de patógenos como *Salmonella* (Golowczyc *et al.* 2007) y *Clostridium difficile* (Carasi *et al.* 2012), y de coagregación con levaduras (Golowczyc *et al.* 2009), aumentan la adhesión de *L. kefir* al mucus gastrointestinal (Carasi *et al.* 2014b) y protegen a las bacterias contra el efecto dañino de los iones  $Pb^{+2}$  (Germino *et al.* 2015). Por otro lado, el grupo de trabajo ha logrado obtener arreglos regulares de nanopartículas de Pt y Ag soportadas sobre SLP de *L. kefir* CIDCA 8348 y CIDCA 83111 en solución (Bolla *et al.* 2020a,b) y sobre sistemas poliméricos recubiertos con estas SLP de *L. kefir* (Huggias 2022) que presentan alta actividad catalítica en la reacción de reducción del *p*-nitrofenol.

#### **1.4 Extracción y evaluación de propiedades funcionales de proteínas de capa S de *L. kefir*.**

El desarrollo de nuevas vacunas de subunidades ha promovido el diseño racional de adyuvantes capaces de inducir una fuerte activación de células T dirigiéndose a receptores inmunitarios específicos. La capa S de lactobacilos, por su capacidad de autoensamblarse en solución y por sus propiedades inmunogénicas, resultó ser una herramienta atractiva para utilizarse como portadores de antígenos o adyuvantes (Sleytr *et al.* 2014, Smith *et al.* 1993).

Se ha observado que las SLP de algunas cepas de *L. kefir* potencian la respuesta de los macrófagos a la estimulación con LPS (Malamud *et al.* 2018) y, particularmente la SLP de la cepa *L. kefir* CIDCA 8348 (SLP-8348) muestra capacidad adyuvante sobre la respuesta inmune celular al ser inoculada por vía subcutánea junto con el antígeno (Malamud *et al.* 2019b). En estos trabajos, se ha evidenciado que al administrar LPS junto con SLP-8348 a cultivos celulares de macrófagos murinos (RAW 264.7) se incrementa la expresión de ligandos de superficie activadores, como MHC-II, CD-86 y CD-40, y la secreción de citoquinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF- $\alpha$ , respecto a los cultivos a los que únicamente se les administraba LPS. Además, la actividad inmunoestimuladora de estas proteínas de superficie es dependiente de la interacción de sus glicanos con diferentes receptores de lectina tipo C (CLRs), entre los que se han identificado a Mincle (Malamud *et al.* 2019b) y DC-SIGN (Malamud *et al.* 2020). El mismo grupo de trabajo, también ha

demostrado que la interacción entre SLP-8348 y los CLR expresados en la superficie de células presentadoras de antígenos es dependiente de  $Ca^{+2}$ . Los CLR son receptores pertenecientes a la familia de receptores de reconocimiento de patrones, reconocen determinados carbohidratos y son expresados por macrófagos y células dendríticas. Su activación resulta en un proceso de transducción de señales que induce la maduración celular, aumentando la capacidad de presentación antigénica y modificando el perfil de expresión de ligandos de superficie, citoquinas y quimioquinas, hacia uno proinflamatorio que permite la activación clonal de células T. Los CLR tienen la capacidad de actuar de forma sinérgica con otros receptores de reconocimiento de patrones, tal como los receptores de la familia Toll (TLR), incrementando de esta forma la respuesta a sus ligandos, entre los cuales se destaca el LPS (Goldsby *et. al.* 2004). (Figura 3)



**Figura 3:** Mecanismos de activación celular inducidos por SLP. Extraída de: “S-layer proteins as immune players: Tales from pathogenic and non-pathogenic bacteria”. (Assandri *et. al.* 2023)

Con respecto a las SLP de *L. kefir* CIDCA 83111 (SLP-83111), aún no se ha podido dilucidar la vía de transducción de señales, pero sí se ha corroborado un efecto inmunoestimulador dependiente de sus restos glicosídicos, con una clara influencia de sus residuos N-glicosilados en dicho efecto. (Malamud 2019).

Según los estudios realizados hasta el momento, las SLP de *L. kefir* poseen un alto potencial para el desarrollo de adyuvantes vacunales y de plataformas de inmovilización de

nanopartículas metálicas. En este sentido, y teniendo como uno de los objetivos a largo plazo la administración de SLP de *L. kefir* en humanos, es necesario considerar la posibilidad de adaptar los métodos de obtención de manera que sean adecuados para la realización de ensayos clínicos. Al respecto, Sahay y colaboradores emplearon NaCl 5M en lugar de LiCl 5M para la extracción de la SLP de *L. acidophilus* NCK2187, obteniendo excelentes resultados tanto desde el punto de vista del rendimiento como de la no toxicidad de la proteína extraída (Sahay *et al.* 2015).

Recientemente, en el marco del Trabajo Final de Carrera de la Bqca. Carla Capostagno, se pudieron realizar los primeros ensayos de extracción, reemplazando el LiCl por NaCl 5M, para la obtención de proteínas de capa S de diferentes cepas de *L. kefir*, junto con una primera caracterización de los extractos obtenidos. Con respecto a la evaluación comparativa de las propiedades funcionales de las SLP obtenidas con ambos agentes de extracción, se observaron dos hallazgos interesantes. En primera instancia, a diferencia de las SLP-8348 extraídas con LiCl, los extractos obtenidos con NaCl indujeron activación celular, lo que se determinó al detectar un incremento en la secreción de IL-6 en ausencia de LPS en sobrenadantes de cultivo de células RAW 264.7. Como segundo hallazgo, se observó que la coincubación de SLP-83111 con LPS redujo la activación celular, medida en términos de secreción de IL-6, respecto a la incubación con LPS únicamente, al utilizar NaCl como agente de extracción. Ambos hallazgos podrían indicar diferencias cualitativas en los extractos o diferencias conformacionales entre las SLP obtenidas con NaCl o LiCl como agente de extracción, que resultarían en diferentes respuestas *in vitro* por parte de las células inmunes. (Capostagno C., 2022)

En base a los resultados obtenidos, en el presente de Trabajo Final proponemos avanzar en la optimización de la extracción con NaCl 5M de las SLP-Lk de dos de las cepas de mayor interés para el grupo de trabajo (CIDCA 8348 y CIDCA 83111), y evaluar algunas propiedades funcionales de los extractos así obtenidos. En primera instancia se propone evaluar el efecto inmunoestimulador de las SLP extraídas a través de ensayos de activación celular sobre células RAW 264.7. Por otro lado, con la intención de seguir estudiando cualitativamente los extractos de SLP obtenidos con NaCl, se propone también analizar la capacidad de estas proteínas de antagonizar los factores extracelulares citotóxicos *in vitro* de *Clostridium difficile*. Como se demostró en investigaciones



anteriores, los extractos de SLP de las cepas CIDCA 8348 y 83111 poseen la capacidad de reducir el efecto citotóxico de las toxinas secretadas por *C. difficile* (TcdA y TcdB) sobre células Vero en cultivo. Como hipótesis principal, se cree que dicho antagonismo se produce por una interacción directa de tipo proteína-proteína entre dichas toxinas y las SLP en solución. (Carasi *et. al* 2012). De ser así, evaluar comparativamente el efecto protector de las SLP extraídas con LiCl y NaCl, nos permitiría conocer si existen diferencias cualitativas o conformacionales entre las SLP obtenidas, a partir de las diferencias en el efecto protector de cada uno de los extractos.

En conclusión, el marco experimental de este trabajo tiene como objetivo seguir avanzando en el estudio de los extractos de SLP-Lk obtenidos bajo diferentes condiciones de extracción con NaCl 5M y evaluar comparativamente con aquellos obtenidos con LiCl 5M, en cuanto a sus diferencias respecto al rendimiento, composición y respuesta generada por el extracto sobre células en cultivo.

## **2. Objetivos**

A.- Optimizar la extracción de SLP-Lk de las cepas CIDCA 8348 y CIDCA 83111 con NaCl 5M.

B.- Evaluar la actividad inmunomoduladora de los extractos de SLP-Lk obtenidos sobre la activación de macrófagos murinos.

C.- Evaluar la capacidad antagónica de los extractos de SLP-Lk obtenidos sobre las toxinas de *Clostridium difficile* en ensayos in vitro sobre células Vero.

### 3. Materiales y métodos

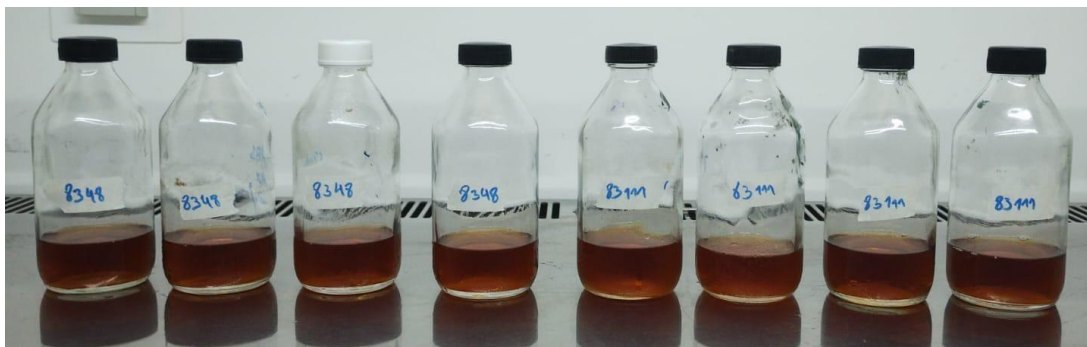
#### 3.1 Material biológico

##### 3.1.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

*L. kefir*: Se utilizaron dos cepas conservadas en el laboratorio a  $-80^{\circ}$  en leche descremada estéril: CIDCA 8348 y CIDCA 83111. La cepa 8348 presenta capacidad autoagregante y su SLP presenta un peso molecular aparente de 66 kDa y O-glicosilaciones en su estructura. La cepa 83111 no posee capacidad autoagregante, su SLP posee un peso molecular aparente de 71 kDa y en su estructura coexisten residuos O- y N-glicosilados\*.

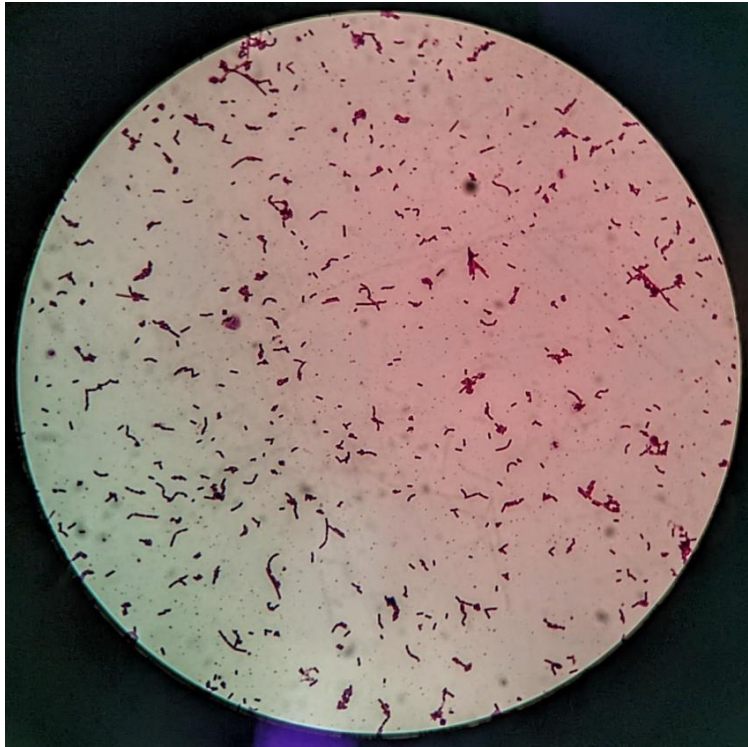
\* El comportamiento agregante de las cepas ha sido documentado previamente (Garrote *et al.* 2004) mientras que el peso molecular aparente (obtenido por migración en SDS-PAGE) y la estructura de sus glicanos, fue descrito para diferentes cepas en este grupo de trabajo (Mobili *et al.* 2009, Malamud *et al.* 2017, Cavallero *et al.* 2017)

Los lactobacilos se cultivaron en caldo MRS (Difco, BD Bioscience, USA) en condiciones aeróbicas, durante 48 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Para realizar dicho cultivo se partió de un volumen de 100  $\mu\text{l}$  de suspensión bacteriana, conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  y previamente descongelada en baño termostático, el cual se sembró en 10 mL de caldo MRS. Luego de 48 horas, se realizó un repique tomando 500  $\mu\text{L}$  para inocular 50 mL de caldo MRS (Figura 4). La cantidad de cultivos de 50 mL realizados para cada cepa fue igual a la cantidad de condiciones de extracción realizadas en el trabajo, las cuales serán posteriormente descritas. El medio de cultivo utilizado fue preparado según las indicaciones del fabricante y esterilizado por calor húmedo en autoclave a 1 atm. de sobrepresión durante 15 minutos.



**Figura 4:** Cultivos asignados a cada condición de extracción.

La pureza de los cultivos se verificó por observación microscópica de extendidos, fijados y teñidos según la técnica de Gram (Gram 1884).



**Figura 5:** Tinción de Gram del cultivo. Se adjunta únicamente la foto de uno de los cultivos de la cepa CIDCA 8348. Se observan bacilos Gram positivos en diferentes estadios del ciclo celular. La morfología es la esperada y no se observan microorganismos contaminantes.

*Clostridium difficile*: Se trabajó con la cepa ATCC 43255. Esta cepa es positiva para la producción de toxinas A (TcdA) y B (TcdB). Se cultivó en anaerobiosis, durante 24 horas, a 37°C en caldo BHI (Brain-Heart infusión - BIODIA Diagnostics, Beauvais, Francia) suplementado con cisteína (concentración final 0,05 % p/v). Para crear una atmósfera anaeróbica, se colocaron los tubos inoculados en una jarra contenedora cerrada junto con un recipiente abierto que contenía una mezcla de ácido sulfúrico, sulfato de cobre, Tween 80 y lana de acero, y por otro lado un tubo abierto con ácido cítrico, bicarbonato de sodio y agua que permite la generación de CO<sub>2</sub> *in situ*. El caldo BHI fue preparado según las

indicaciones del fabricante, fraccionado en tubos de 10 mL y esterilizado en autoclave a 1 atm de sobrepresión durante 15 minutos.

Los sobrenadantes de cultivo (SCS), utilizados en los ensayos de citotoxicidad, fueron obtenidos centrifugando el cultivo en fase estacionaria a 3500 rpm durante 15 minutos. Se descartó el pellet y se recuperó el sobrenadante que contenía las toxinas de *C. difficile*. El SCS fue esterilizado utilizando filtros de 0.22 µm de diámetro de poro (Jetbiofil, China).

### **3.1.2 Células eucariotas y condiciones de cultivo**

Línea celular RAW 264.7: Es una línea celular de tipo monocito-macrófago, generada a partir de ratones BALB/c por transformación con el virus de la leucemia murina de Abelson. Fueron adquiridas del banco de células del IMBICE (Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, La Plata).

El cultivo de esta línea celular se realizó en medio DMEM (Thermo Fisher Scientific, USA) suplementado con suero fetal bovino al 10 %, aminoácidos no esenciales y antibióticos (penicilina-estreptomicina). Fue esterilizado por filtración utilizando filtros de 0.22 µm (Steritop, Milipore). Las células se mantuvieron en cultivo en el laboratorio, en estufa con atmósfera controlada (95% v/v de aire – 5% v/v de CO<sub>2</sub>) a 37°C.

Línea celular Vero: Es una línea celular derivada de fibroblastos de riñón de mono verde africano. Las células Vero se cultivaron en medio DMEM, suplementado y esterilizado en las mismas condiciones que se describen para las células RAW 264.7 y en iguales condiciones de atmosfera y temperatura.

### **3.2 Extracción de proteínas de capa S de *L. kefir***

Con el objetivo de optimizar las condiciones de extracción, en este trabajo se propone ensayar distintos tiempos de extracción utilizando NaCl 5M para comparar los extractos obtenidos con otros realizados utilizando LiCl 5M. En ambos casos, se partió de un cultivo de 50 mL en fase estacionaria para cada cepa y para cada condición de extracción. Este volumen se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 30 mL de PBS (NaCl 9,0 g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,144

g;  $K_2HPO_4$  0,795 g; pH 7.2). El pellet resultante del segundo lavado se resuspendió en el agente de extracción utilizado, siempre respetando una proporción de 10% v/v entre el agente de extracción y el volumen de cultivo del que proviene dicho pellet.

### **3.2.1 Extracción de proteínas capa S de *L. kefir* utilizando LiCl 5M**

Se resuspendió el pellet proveniente del segundo lavado en 5mL de LiCl 5M (Biopack o Anedra, Argentina) y se agitó en vortex durante 10 minutos. Luego se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido se dializó usando una membrana de celulosa (SpectraPor membrane tube, MWCO 10000-14000, Spectrum Medical Industries, California, USA) durante 24 horas contra 2 litros de PBS, en agitación suave y continua, a temperatura ambiente.

### **3.2.2 Extracción de proteínas capa S de *L. kefir* utilizando NaCl 5M.**

Teniendo en cuenta el protocolo descrito por Sahay y colaboradores para la extracción de SLP de *L. acidophilus* (Sahay *et. al.* 2015) y los resultados obtenidos previamente por la Bqca. Capostagno, se ensayaron múltiples condiciones de extracción con NaCl 5M para las cepas de *L. kefir* estudiadas.

El procedimiento aplicado fue idéntico al descrito para la extracción con LiCl 5M, salvo por la realización de diferentes extracciones, donde las variables fueron el tiempo de exposición de la suspensión bacteriana al agente de extracción y la forma de agitación (vórtex o agitador orbital). El pellet obtenido luego del segundo lavado con PBS fue resuspendido en NaCl (Anedra, Argentina) 5M y agitado durante 5, 10, 15 o 30 minutos. La obtención del sobrenadante y la diálisis se realizaron tal como se especifica en el punto 3.2.1.

## **3.3 Separación electroforética de proteínas**

### **3.3.1 Separación mediante SDS-PAGE**

Se utilizó la técnica desarrollada por Laemmli (1970). Los geles se prepararon con una concentración de acrilamida 12% p/v en el gel separador y 4% p/v en el gel apilador. Las

corridas electroforéticas se realizaron a un voltaje constante de 120 V, hasta que el frente de corrida alcanzó el extremo inferior del gel, en un sistema vertical Bio-Rad Mini Protean III (BioRad Lab, C.A). Antes de su siembra, se tomaron 300 µl de extracto y se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 minutos. El pellet obtenido fue resuspendido en 10 µl de buffer de siembra (azul de bromofenol, glicerol, SDS) con una posterior incubación a 85°C durante 10 minutos. El objetivo de este paso adicional es la recuperación de proteínas de capa S agregadas. Finalmente se sembraron 10 µl de muestra en cada calle y 5 µl de marcador de peso molecular (Marker de proteínas, Productos Bio-Lógicos, Argentina).

### 3.3.2 Revelado con Coomassie blue coloidal

- 1) Se colocó el gel en agitación durante 30 minutos en la solución de fijación 1.
- 2) Se colocó el gel en agitación durante 20 minutos con 100 mL de solución de fijación 2. Se descartó y se repitió el procedimiento.
- 3) Se colocó el gel en solución de coloración durante 30 minutos en agitación. Luego se agregó 1 mL de Coomassie G250 2% p/v. Se mantuvo en agitación toda la noche.
- 4) Al día siguiente, luego de un lavado con agua destilada, ya fue posible visualizar las bandas.

Tabla 1: Soluciones para el revelado de SDS-PAGE con Coomassie coloidal.

<b>Denominación</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>Volumen final</b>
<b>Solución de fijación 1</b>	30 mL de etanol absoluto 2 mL de ácido fosfórico 85% p/p	100 mL
<b>Solución de fijación 2</b>	4 mL de ácido fosfórico 85% p/p	200 mL
<b>Solución de coloración</b>	18 mL de etanol absoluto 7mL de ácido fosfórico 85% p/p 15g de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 mL
<b>Solución de Coomassie G250</b>	1g de Coomassie G250	50 mL

### **3.4 Cuantificación de proteínas totales extraídas**

La cuantificación de proteínas totales, realizada sobre cada uno de los extractos obtenidos, se llevó a cabo según el método de Bradford (Bradford 1976), empleando microplacas de 96 pocillos. La curva patrón se realizó utilizando un stock comercial de albúmina bovina de 2 mg/mL (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit). La lectura de absorbancia se ejecutó a 620 nm en un lector de microplacas Tecan Infinite F50.

### **3.5 Ensayos de activación celular**

#### **3.5.1. Cultivo de células RAW 264.7, recuento y preparación de placas**

Las células RAW 264.7 cultivadas durante 72 horas en las condiciones mencionadas en el punto 3.1.2, fueron cosechadas raspando la base de la botella de cultivo para obtener una suspensión celular en medio DMEM. Se realizó una tinción vital con azul de tripán para realizar un recuento de células viables en cámara de Neubauer. Una vez obtenido el recuento, se llevó a cabo una dilución con medio de cultivo fresco para lograr un recuento final de  $4 \cdot 10^4$  células por mililitro. De esta última suspensión se dispensó un volumen de 250  $\mu$ l por fosa, en dos placas de 24 fosas, las cuales se incubaron por 48 horas en estufa con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Pasado este lapso, antes de realizar el ensayo de activación celular, se observaron las fosas en microscopio invertido para corroborar la ausencia de microorganismos contaminantes, una baja proporción de células no viables y de células activadas (aspecto ahusado o estrellado). Todo este proceso, junto con el ensayo de activación propiamente dicho, fue realizado en una cabina de seguridad biológica tipo II (Jouan MSC 12).

#### **3.5.2. Ensayo de activación celular**

Se utilizaron dos placas de 24 fosas con células RAW 264.7 preparadas tal como se especifica en el punto 3.5.1, con el objetivo de evaluar la respuesta celular de estas células presentadoras de antígenos al incubarlas con las SLP extraídas con NaCl 5M y LiCl 5M, con LPS (LPS de *Escherichia Coli* O111:B4, Sigma, EEUU) o con LPS en presencia de las SLP obtenidas por ambos métodos de extracción. Para realizar este ensayo, se seleccionó



un extracto realizado con NaCl 5M para cada cepa, a partir de los resultados de la caracterización cuali y cuantitativa de las SLP obtenidas ante diferentes condiciones de extracción. Por lo tanto, se ensayaron ocho condiciones diferentes: SLP-8348 y SLP-83111, obtenidas por extracción con LiCl 5M y por extracción con NaCl 5M a un tiempo seleccionado, en presencia o ausencia de LPS. Se incluyeron también dos controles, un control negativo con DMEM y otro control donde únicamente se administró LPS. Todas las condiciones fueron realizadas por triplicado y en aquellas en que corresponde, la concentración final de SLP fue de 10 µg/mL y la de LPS de 0,01 µg/mL. Las SLP dializadas fueron previamente esterilizadas por filtración utilizando filtros de 0.22 µm de diámetro de poro (Jetbiofil, China). Teniendo en cuenta que el volumen final admitido en cada fosa es de 500 µL, se calcularon los volúmenes de cada extracto que deberían dispensarse, según la cuantificación proteica previamente realizada, el volumen necesario de LPS partiendo de una solución stock de 1 mg/mL (previamente diluida por un factor de 1/200 en DMEM) y de medio DMEM. Las placas de cultivo luego fueron incubadas durante 24 horas en estufa con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Al día siguiente, se recolectó el sobrenadante de cada fosa para realizar la cuantificación de IL-6, como se especifica en el punto 3.5.3, y las células fueron cosechadas para estudiar la expresión de marcadores de superficie por citometría de flujo, tal como se describe en el punto 3.5.4.

### **3.5.3 Cuantificación de IL-6**

La cuantificación de IL-6 en los sobrenadantes de cultivo se realizó utilizando un kit comercial de ELISA de captura no competitivo (Mouse IL-6 ELISA Set, BD OptEIA, San Diego, EEUU), placas de 96 pocillos Microlon 600 (GBO, Alemania) y un lector de absorbancia para microplacas Tecan Infinite F50. El protocolo utilizado se detalla a continuación:

1. Sensibilización de la placa con anticuerpos de captura. Los mismos se diluyeron a razón de 1/250 en buffer carbonato/bicarbonato pH 9,5 para luego dispensar 50 µl por pocillo. La placa fue sensibilizada durante toda la noche, refrigerada en heladera.
2. Se realizaron 3 lavados con Tween 20 al 0.05% en PBS.

3. Se realizó el bloqueo de los pocillos sensibilizados, incubando con suero fetal bovino (SFB) al 10% en PBS con un volumen de 100  $\mu$ l durante 1 hora a temperatura ambiente.
4. Se realizaron 3 lavados tal como se especifica en 2.
5. Se colocaron 50  $\mu$ l de muestra o patrón por fosa y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.
6. Se realizaron 3 lavados tal como se especifica en 2.
7. Se dispersaron 50  $\mu$ l por fosa de anticuerpo de detección biotinilado (1/250) más conjugado de estreptavidina con peroxidasa de rábano picante (HRP) (1/500) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.
8. Se realizaron 5 lavados tal como se especifica en 2.
9. Se dispersaron 50  $\mu$ l de sustrato por fosa (OPD Sigma 2 mg/mL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> volumen 1 1  $\mu$ l/mL, buffer citrato pH 5). La reacción procedió durante 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Se dispensaron 50  $\mu$ l por fosa de ácido sulfúrico 2N como solución stop.
11. Lectura de absorbancia a 490 nm.

#### **3.5.4 Análisis de moléculas co-estimuladoras por citometría de flujo.**

La respuesta celular, en cuanto a la expresión de moléculas co-estimuladoras de superficie, de las células RAW 264.7 cosechadas luego del ensayo de activación celular, fue estudiada por citometría de flujo en un equipo BD FACSCalibur. Las células cosechadas fueron lavadas con SFB 2% en PBS y posteriormente incubadas con una dilución 1/600 en SFB 10% en PBS del anticuerpo anti-CD86 conjugado con ficoeritrina (PE) (Anti mouse-CD86, clon PO3.1, eBioscience). La marcación se realizó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 minutos. Luego, las células fueron lavadas nuevamente, centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos, y finalmente resuspendidas en un volumen final de 300  $\mu$ L de SFB al 2% en PBS. Se incluyeron los correspondientes controles de células sin marcar, los cuales fueron utilizados para establecer los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad interna (SSC) de las células en estudio. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el software Tree Star FlowJo X.

### **3.6 Ensayos de citotoxicidad**

#### **3.6.1 Cultivo de células Vero, recuento y preparación de placas**

Las células Vero en cultivo fueron cosechadas mediante tripsinización. Los cultivos en botellas de 25 cm<sup>2</sup> se lavaron 3 veces con 5 mL de PBS y luego se incubaron con 1 mL de una solución de tripsina (2.5 % en DMEM-EDTA) durante 2 minutos a 37°C en estufa gaseada. Transcurrido ese tiempo, se agregaron 5 mL de DMEM suplementado con SFB al 10% y penicilina/estreptomicina. La suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos y luego de retirar el sobrenadante, las células se resuspendieron nuevamente en 5 mL de medio de cultivo (DMEM). Finalmente se realizó un recuento de células viables en cámara de Neubauer con previa tinción de azul de tripán. Se utilizaron placas de 96 fosas (Greiner Bio One, Alemania) con un recuento final de 6. 10<sup>4</sup> células por fosa, alcanzado al realizar una dilución de la suspensión con DMEM fresco. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C en estufa con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.6.2 Determinación del título del SCS**

Previo al ensayo de citotoxicidad en presencia de las SLP, se requiere conocer el título del sobrenadante de cultivo de *C. difficile* en cuanto a su toxicidad sobre las células Vero, para determinar que diluciones del SCS serán probadas en dicho ensayo. El mismo, será expresado como la dilución del SCS puro que genera un redondeo del 50% de las células Vero en cultivo, al incubarlas durante 16 horas a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en presencia del SCS (DL<sub>50</sub>). Se utilizó una placa de 96 fosas de células Vero en cultivo, preparadas tal como se especifica en los puntos 3.1.2 y 3.6.1, y se realizaron diluciones seriadas al ½ del SCS en DMEM *in situ*. Luego de 16 horas de incubación a 37°C con atmósfera de 5% v/v de CO<sub>2</sub>, se observaron las fosas en microscopio invertido para conocer el grado de citotoxicidad, estimado en base a la proporción de células redondeadas por fosa.

#### **3.6.3 Ensayo de citotoxicidad en presencia de SLP de *L. kefir***

Se realizaron diluciones del SCS en un rango que contenía la DL<sub>50</sub> obtenida según el punto 3.6.2. Se realizaron cinco tratamientos diferentes: SCS, SCS preincubado con SLP-83111 o SLP-8348 extraída con LiCl 5M y con NaCl 5M en una cierta condición predeterminada.

Las diluciones seriadas al  $\frac{1}{2}$  del SCS se realizaron en DMEM sin SFB, y se agregó en cada caso que correspondiese, una concentración de SLP constante de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para esto, se fijó un cierto volumen de extracto de SLP (dependiendo de su concentración) en todas las diluciones y se añadió un volumen variable de SCS, llevando a un volumen final de 500  $\mu\text{L}$  con DMEM en todos los casos. Posteriormente, se preincubaron dichas diluciones durante una hora a 37°C. Finalmente, se incubaron las células Vero en placas de 96 fosas, preparadas según los puntos 3.1.2 y 3.6.1, con las diferentes diluciones de cada tipo de tratamiento durante 16 horas a 37°C con atmosfera de 5% v/v de CO<sub>2</sub>. Se reservaron cuatro pocillos con células sin tratar como controles. La actividad biológica del SCS o SCS en presencia de los diferentes extractos, fue evaluada mediante la observación del redondeo celular (determinación de la DL<sub>50</sub>).

### **3.7 Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. La evaluación estadística se realizó aplicando un análisis de varianza (ANOVA) con un post-test de Turkey de comparaciones múltiples ( $\alpha=0,005$ ). Todos los análisis y gráficos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism.

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Extracción de proteínas de capa S de *L. kefir* y análisis de los extractos obtenidos

#### Primera extracción

En un primer ensayo, se llevó a cabo la extracción de proteínas de capa S de *L. kefir* tal como se describe en MyM 2.1 y 2.2. El tiempo de exposición al agente de extracción fue de 10 minutos en la condición de LiCl 5M y de 5, 10, 15 y 30 minutos para la condición de NaCl 5M. En todos los casos la agitación se realizó con vórtex.

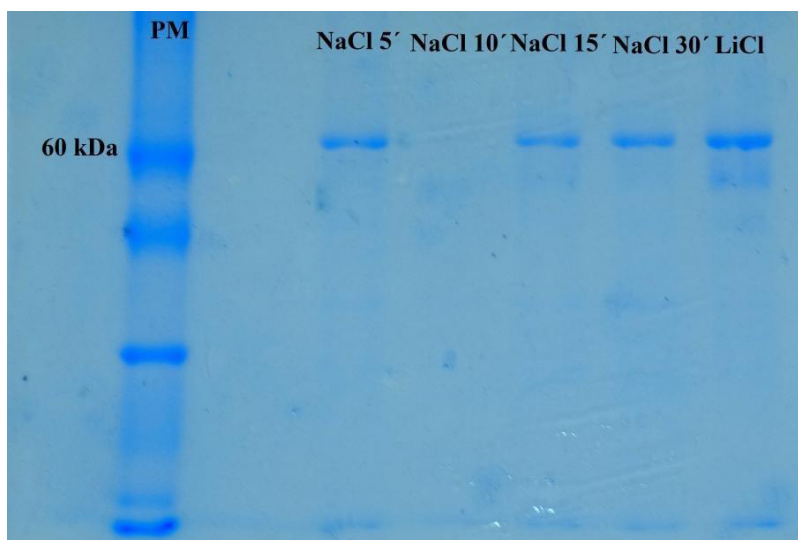
La cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford reveló los siguientes resultados:

**Tabla 2:** Concentración de las proteínas obtenidas para las cepas CIDCA 8348 (A) y CIDCA 83111 (B) en el primer ensayo de extracción. ND: no detectable.

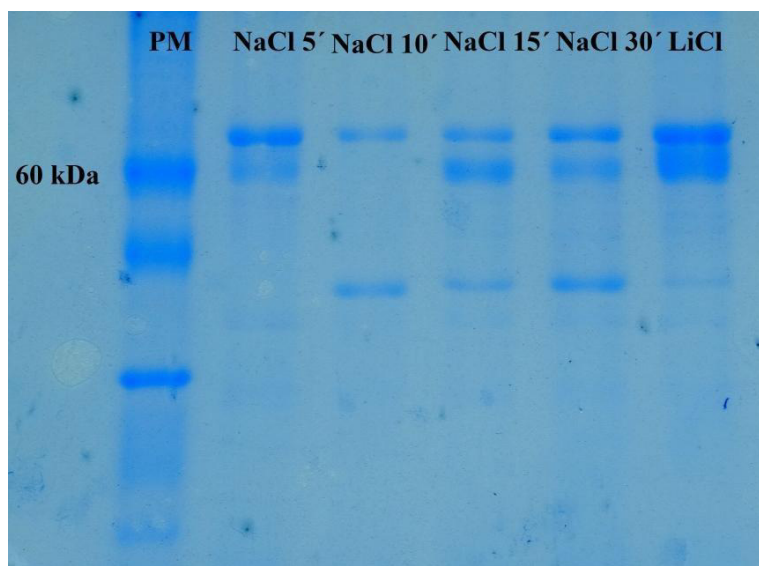
<i>L. kefir</i> CIDCA 8348 (A)		<i>L. kefir</i> CIDCA 83111 (B)	
Condición	Concentración (µg/mL)	Condición	Concentración (µg/mL)
NaCl 5'	12	NaCl 5'	88
NaCl 10'	ND	NaCl 10'	7
NaCl 15'	18	NaCl 15'	70
NaCl 30'	29	NaCl 30'	52
LiCl	58	LiCl	225

Como primera observación, en este ensayo no parece haber una correlación clara entre el tiempo de exposición al agente de extracción y el rendimiento obtenido en cada una de las condiciones. Sería esperable que el rendimiento se incremente al aumentar el tiempo de contacto entre la suspensión bacteriana y la solución de NaCl 5M, pero esto no fue lo que se detectó en esta instancia. Otro hallazgo interesante fue la ausencia de proteínas detectables para la cepa CIDCA 8348 y una concentración prácticamente despreciable para la cepa 83111 para las condiciones de 10 minutos, aún con concentraciones detectables a tiempos de 5 y 10 minutos. Los extractos obtenidos con LiCl 5M arrojaron una concentración congruente con los resultados observados anteriormente por el grupo de trabajo (Carasi *et. al.* 2012, Malamud *et. al.* 2018).

Se muestran a continuación los resultados de la caracterización de los extractos obtenidos por SDS-PAGE:



**Figura 6:** Caracterización por SDS-PAGE de los extractos obtenidos de la cepa CIDCA 8348 durante el primer ensayo de extracción.



**Figura 7:** Caracterización por SDS-PAGE de los extractos obtenidos de la cepa CIDCA 83111 durante el primer ensayo de extracción.

El análisis de los extractos por SDS-PAGE reveló la presencia de bandas principales con un peso molecular aparente que coincide con estudios de caracterización de SLP realizados anteriormente: la cepa CIDCA 8348 presenta un peso molecular de 66 kDa y la cepa 83111

un peso molecular de 71 kDa. (Mobili *et al.* 2009, Malamud *et al.* 2017). Como podemos observar, las SLP-8348 mostraron una migración electroforética casi idéntica a la banda de 60 kDa del patrón de peso molecular y las SLP-83111 una migración considerablemente inferior.

Respecto a las bandas accesorias, podemos distinguir dos tipos para la cepa CIDCA 83111, por un lado, una banda de peso molecular ligeramente inferior a 60 kDa que podría atribuirse a fragmentos de SLP producidos durante la extracción y por otro, una banda de peso molecular aparente de entre 40 y 50 kDa que podría atribuirse a proteínas asociadas a la capa S (SLAP). Si bien las SLAP de *L. kefir* no fueron caracterizadas hasta el día de la fecha, estudios de caracterización para este tipo de proteínas para la especie relacionada *L. acidophilus*, postulan que presentan un peso molecular de entre 45 y 50 kDa. (Johnson *et al.* 2013). Ambos tipos de bandas accesorias se observaron en todas las condiciones realizadas sobre esta cepa con excepción de la condición de 5 minutos. Esto podría indicar que un menor tiempo de exposición al agente de extracción genera no solo una mayor pureza en los extractos de SLP-83111 sino también una menor fragmentación de la proteína. Para la cepa CIDCA 8348 no se observaron bandas atribuibles a SLAP y solo se observaron bandas de fragmentación en la condición de LiCl 5M.

También es posible observar la coincidencia entre la cuantificación por Bradford y la intensidad observada en las bandas correspondientes a cada uno de los extractos. En este sentido, no pudo detectarse banda alguna en el extracto correspondiente a la condición de 10 minutos para la cepa CIDCA 8348 y solo se observa una banda muy tenue para la cepa CIDCA 83111 bajo la misma condición de extracción.

### Segunda extracción

Por cuestiones de practicidad, en esta instancia se optó por eliminar una de las condiciones de extracción utilizando NaCl 5M, llevando a cabo tres extracciones de 5, 10 y 30 minutos con el objetivo de seguir estudiando el comportamiento del rendimiento al aumentar el tiempo de exposición al agente de extracción. Se mantuvo la condición de LiCl 5M y el resto de los aspectos experimentales mencionados en MyM 2.1 y 2.2, así como la agitación en vórtex.

Los resultados obtenidos de la cuantificación proteica por el método de Bradford fueron totalmente discrepantes con aquellos obtenidos durante el primer ensayo. Los mismos se presentan a continuación:

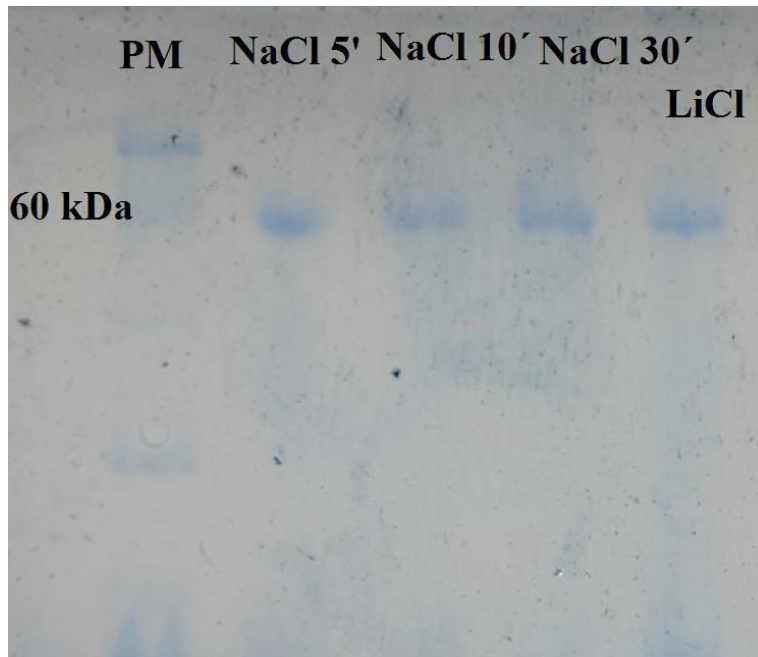
**Tabla 3:** Concentración de las proteínas obtenidas para las cepas CIDCA 8348 (A) y CIDCA 83111 (B) en el segundo ensayo de extracción.

<i>L. kefir</i> CIDCA 8348 (A)		<i>L. kefir</i> CIDCA 83111 (B)	
Condición	Concentración (µg/mL)	Condición	Concentración (µg/mL)
NaCl 5'	102	NaCl 5'	23
NaCl 10'	135	NaCl 10'	39
NaCl 30'	138	NaCl 30'	125
LiCl	34	LiCl	46

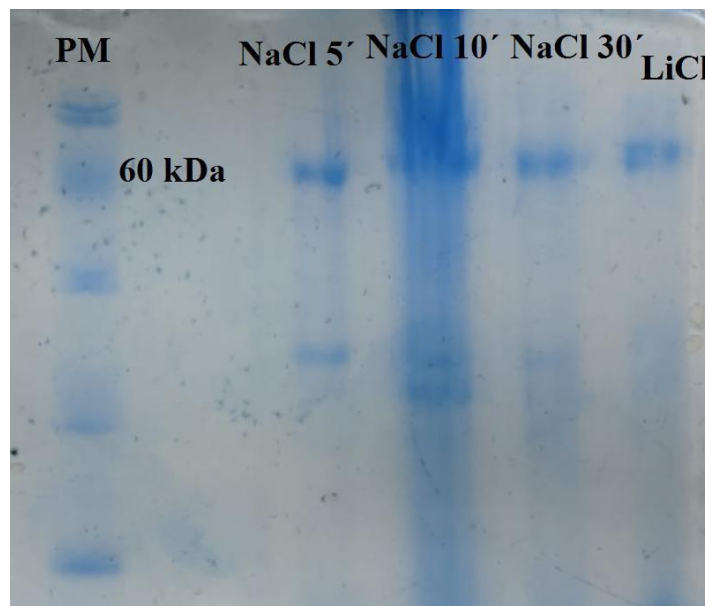
Los resultados fueron controversiales para ambas cepas por diferentes motivos. En el caso de la cepa CIDCA 8348, se observa un muy buen rendimiento de extracción para todas las condiciones de NaCl 5M y el mismo no parece incrementarse considerablemente al duplicar o triplicar el tiempo de exposición de la suspensión bacteriana a la solución. Esto no fue así para la extracción de SLP-83111, ya que es posible observar una correlación entre el tiempo de exposición y la concentración proteica obtenida. Para ambas cepas, el rendimiento de extracción con LiCl 5M fue muy inferior al esperado, lo que podría adjudicarse, en principio, al cambio de marca del reactivo utilizado para preparar la solución de extracción (de Biopack a Anedra).

Desde el punto de vista cualitativo, los resultados obtenidos en la caracterización por SDS-PAGE de los extractos de este ensayo fueron similares a los obtenidos en el primer ensayo. Se mantuvieron las bandas principales al peso molecular relativo esperado y se observaron bandas correspondientes a SLAP para la cepa CIDCA 83111. Se exponen a continuación los resultados adquiridos por dicha técnica:





**Figura 8:** Caracterización por SDS-PAGE de los extractos obtenidos de la cepa CIDCA 8348 durante el segundo ensayo de extracción.



**Figura 9:** Caracterización por SDS-PAGE de los extractos obtenidos de la cepa CIDCA 83111 durante el segundo ensayo de extracción.

### Tercera extracción:

Debido el comportamiento errático que presentó el tiempo de exposición al agente como variable, decidimos fijar un único tiempo de extracción de 5 minutos para la condición de NaCl 5M y ensayar dos condiciones de agitación diferente: en una primera condición se agitó la suspensión en vórtex y por otro lado se utilizó un agitador orbital. Se mantuvo la condición de LiCl 5M y el resto de los aspectos experimentales mencionados en MyM 2.1 y 2.2.

Al utilizar un vórtex, la agitación resulta ser más vigorosa que con un agitador orbital y esto podría facilitar el contacto entre los microorganismos y la solución de extracción NaCl 5M. Se planteó en principio la hipótesis de que una agitación en vórtex podría incrementar el rendimiento, pero que a la vez, podría también tener la desventaja de facilitar la fragmentación de las SLP, produciendo las bandas accesorias observadas en ensayos anteriores.

Las concentraciones obtenidas para estos extractos por el método de Bradford se exponen a continuación:

**Tabla 4:** Concentración de las proteínas obtenidas para las cepas CIDCA 8348 (A) y CIDCA 83111 (B) en el tercer ensayo de extracción.

<i>L. kefir</i> CIDCA 8348 (A)		<i>L. kefir</i> CIDCA 83111 (B)	
Condición	Concentración (µg/mL)	Condición	Concentración (µg/mL)
NaCl en vortex	128	NaCl en vortex	291
NaCl en agitador orbital	210	NaCl en agitador orbital	206
LiCl en vortex	91	LiCl en vortex	267

Respecto a la extracción con NaCl 5M, es posible observar que para la cepa CIDCA 8348 el rendimiento obtenido fue superior al utilizar un agitador orbital, en caso contrario, para la cepa CIDCA 83111 el rendimiento fue mayor al utilizar un vórtex. El método de agitación no impactó de igual forma en el rendimiento de extracción en ambas cepas, por lo que podría no afectar considerablemente dicho aspecto. Los extractos obtenidos con LiCl 5M

arrojaron la concentración esperada para ambas cepas según trabajos anteriores (Carasi *et. al.* 2012, Malamud *et. al.* 2018). Por otro lado, la agitación orbital también produjo extractos de la cepa CIDCA 83111 que mostraron bandas de fragmentación, por lo que este fenómeno proteolítico tampoco parece estar relacionado con la forma de agitación (no mostrado).

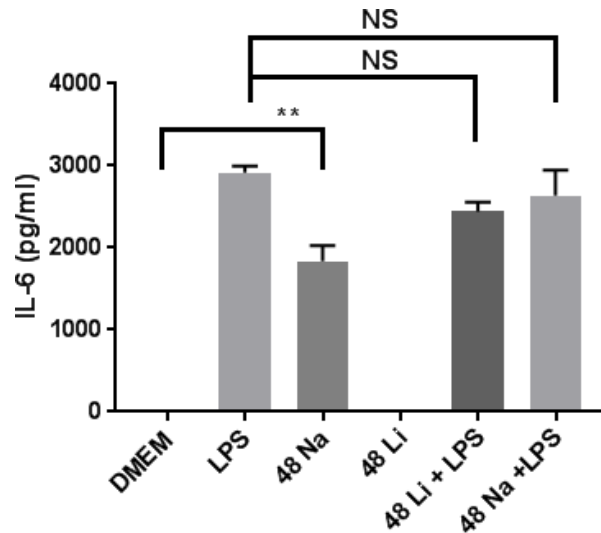
Por el hecho de tener un rendimiento similar y no presentar bandas extrañas, se eligieron los extractos obtenidos por NaCl 5M con tiempo de exposición de 5 minutos y agitación en vórtex para evaluar sus propiedades funcionales en los posteriores ensayos con células eucariotas.

#### **4.2 Ensayos de activación celular, cuantificación de IL-6 y análisis de moléculas co-estimuladoras por citometría de flujo**

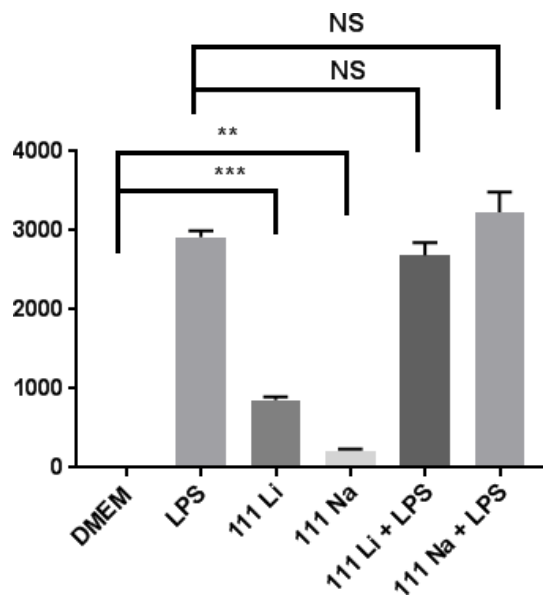
Con la intención de estudiar las propiedades funcionales de las SLP obtenidas por el método de extracción con NaCl 5M seleccionado y comparando las respuestas celulares generadas *in vitro* sobre células RAW 264.7, con aquellas producidas por extractos obtenidos con LiCl 5M, se realizaron dos ensayos de activación celular tal como se especifica en MyM 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4. La cuantificación de IL-6 y análisis de moléculas co-estimuladoras por citometría de flujo permitieron la evaluación de dichas respuestas y la interpretación de los datos obtenidos tuvo dos ejes principales. Por un lado, se propuso evaluar la activación generada por las SLP-8348 y SLP-83111 por sí mismas, obtenidas por ambos métodos de extracción. Por otro, se estudió si existía sinergismo o atenuación de la respuesta al incubar las células RAW 264.7 con LPS en presencia de los extractos obtenidos, en comparación con la respuesta generada por las células a las que únicamente se les administró LPS. De esta manera, buscamos determinar de qué manera las propiedades cualitativas de cada uno de los extractos obtenidos afectan la forma de interacción de las SLP con receptores de superficie de células presentadoras de antígenos a partir de cambios en su patrón de expresión de ligandos y citoquinas.

### Primer ensayo de activación celular

Se presentan a continuación los resultados obtenidos de la cuantificación de IL-6 sobre los sobrenadantes de cultivo del primer ensayo de activación celular:



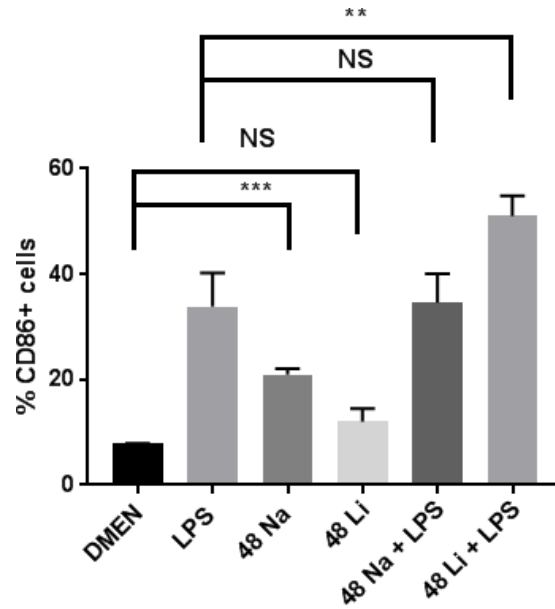
**Figura 10:** Concentración de IL-6 en pg/mL en sobrenadantes de cultivo de células RAW 264.7 al incubarlas con SLP-8348 únicamente o en conjunto con LPS. NS: no significativo, \*\*: P <0,01. 48 Na: SLP-8348 extraída con NaCl 5M, con exposición de 5 minutos y agitación en vórtex. 48 Li: SLP-8348 extraída con LiCl 5M según MyM 2.1.



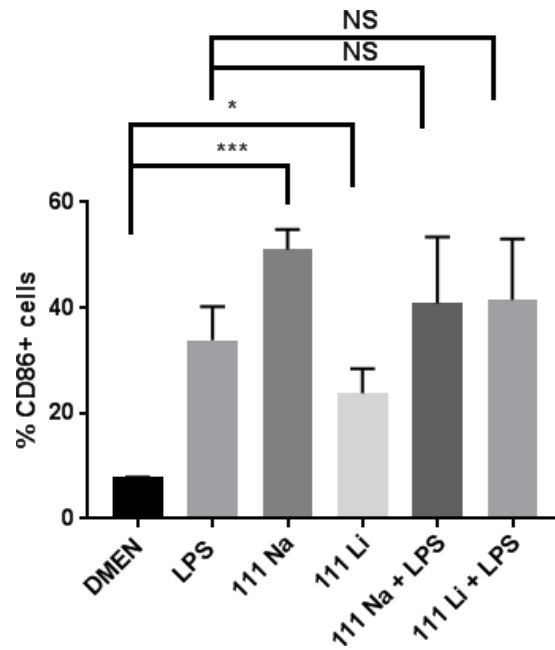
**Figura 11:** Concentración de IL-6 en pg/mL en sobrenadantes de cultivo de células RAW 264.7 al incubarlas con SLP-83111 únicamente o en conjunto con LPS. NS: no significativo, \*\*: P<0,01, \*\*\*: P<0,005. 111 Na: SLP-83111 extraída con NaCl 5M, con exposición de 5 minutos y agitación en vórtex. 111 Li: SLP-83111 extraída con LiCl 5M según MyM 2.1.

En este primer ensayo, el estudio de la secreción de esta citoquina pro-inflamatoria, mostró como resultado una activación celular considerable al administrar SLP-8348 extraída con NaCl 5M, en contraste con una activación nula al administrar la misma proteína, extraída con LiCl 5M. Este tipo de respuesta coincide con el comportamiento reportado previamente por este grupo de trabajo (Capostagno C., 2022). En el caso de SLP-83111, ambos extractos generaron un incremento de la secreción de IL-6 por sí mismas, pero con una intensidad superior al administrar las SLP obtenidas con LiCl 5M como agente de extracción (P<0,05). Tal como se esperaba, las células en cultivo respondieron al tratamiento con LPS incrementando la secreción de IL-6, ya que este compuesto de origen bacteriano es reconocido por el receptor tipo Toll4 (TLR-4), activando diferentes vías de transducción de señales, como NF- $\kappa$ B, que culminan en la secreción de mediadores pro-inflamatorios entre los que se destaca esta citoquina (Goldsby *et. al.* 2004). Por otro lado, no fue posible observar alteraciones en la respuesta al LPS al coincubar las células con SLP-8348 o SLP-83111 obtenidas por ambos métodos de extracción.

A continuación se presenta el análisis de positividad obtenido por citometría de flujo de las células RAW 264.7, cosechadas luego del ensayo, para el marcador de superficie CD86:



**Figura 12:** Porcentaje de células CD86 positivas obtenido al estudiar las células RAW 264.7 por citometría de flujo, luego de incubarlas con SLP-8348 únicamente o en conjunto con LPS. NS: no significativo, \*\*:  $P < 0,01$ , \*\*\*:  $P < 0,005$ . 48 Na: SLP-8348 extraída con NaCl 5M, con exposición de 5 minutos y agitación en vórtex. 48 Li: SLP-8348 extraída con LiCl 5M según MyM 2.1.



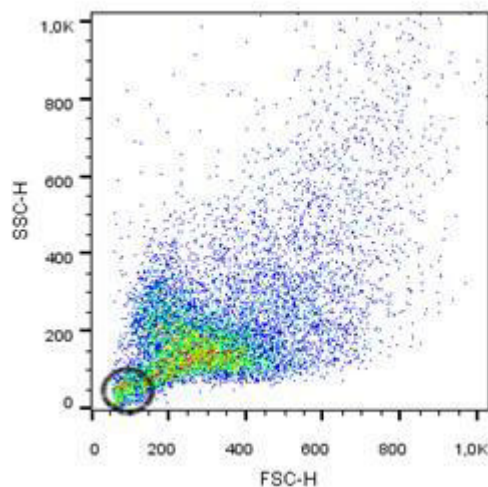
**Figura 13:** Porcentaje de células CD86 positivas obtenido al estudiar las células RAW 264.7 por citometría de flujo, luego de incubarlas con SLP-83111 únicamente o en conjunto

con LPS. NS: no significativo, \*:  $P < 0,05$ , \*\*\*:  $P < 0,005$ . 111 Na: SLP-83111 extraída con NaCl 5M, con exposición de 5 minutos y agitación en vórtex. 111 Li: SLP-83111 extraída con LiCl 5M según MyM 2.1.

Al analizar la expresión superficial de CD86 en las células RAW 264.7, en el caso de SLP-8348 es posible observar un grado superior de positividad en aquellas células que fueron incubadas con las proteínas extraídas con NaCl 5M, mientras que las que fueron extraídas con LiCl 5M no lograron incrementar significativamente el nivel basal de expresión de CD86. Este hallazgo coincide con el comportamiento observado en la cuantificación de IL-6 en sus sobrenadantes al recibir el mismo tratamiento. Con respecto a SLP-83111 es posible observar una respuesta de mayor intensidad en los extractos obtenidos con NaCl 5M ( $P < 0,05$ ), lo que resulta opuesto a la respuesta en cuanto a la secreción de IL-6. Con respecto a la co-incubación de las SLP con LPS, únicamente fue posible detectar cambios en la respuesta a dicho ligando al administrarlo en conjunto con SLP-8348 extraída con LiCl 5M. Se puede notar un incremento leve pero significativo de la población de células CD86 positivas en dicho tratamiento, respecto a las células a las que únicamente se les administró LPS. Dicho efecto adyuvante ha sido previamente documentado e incluso se conoce la vía de transducción de señales de este fenómeno (Malamud *et. al* 2019b).

Si bien en este primer ensayo pudieron observarse diferencias en la respuesta celular entre ambos extractos de una misma proteína, es posible que tanto en la cuantificación de IL-6 como en el estudio de positividad para CD86, algunas respuestas de sinergia o atenuación de la respuesta al LPS reportadas previamente, no hayan podido ser replicadas por motivos relacionados a un recuento celular elevado previo a la realización del ensayo. Una excesiva cantidad de células por fosa podría resultar en una elevada tasa de mortalidad, lo que produciría un ambiente pro-inflamatorio ajeno al tratamiento experimental. Este ambiente tendría como consecuencia, niveles basales más elevados de expresión de CD86, saturando la respuesta y disminuyendo la sensibilidad del estudio por citometría de flujo. Se muestra a continuación un gráfico de eventos obtenidos por citometría de flujo a partir de una de las fosas que no habían recibido tratamiento (DMEM) (Figura 14). El eje de abscisas corresponde al grado de dispersión lumínica hacia adelante detectada por FSC y su magnitud es proporcional al tamaño celular. En cambio, el eje de ordenadas indica el grado

de dispersión lumínica en sentido perpendicular al haz de luz, detectada por SSC y se correlaciona con el grado de complejidad interna de cada una de las células. En la imagen se señala un conjunto de eventos de bajo tamaño y complejidad que podría deberse a células muertas y detritos celulares. Esta distribución pudo observarse en todas las fosas que contenían células sin tratar y respalda la observación mencionada.



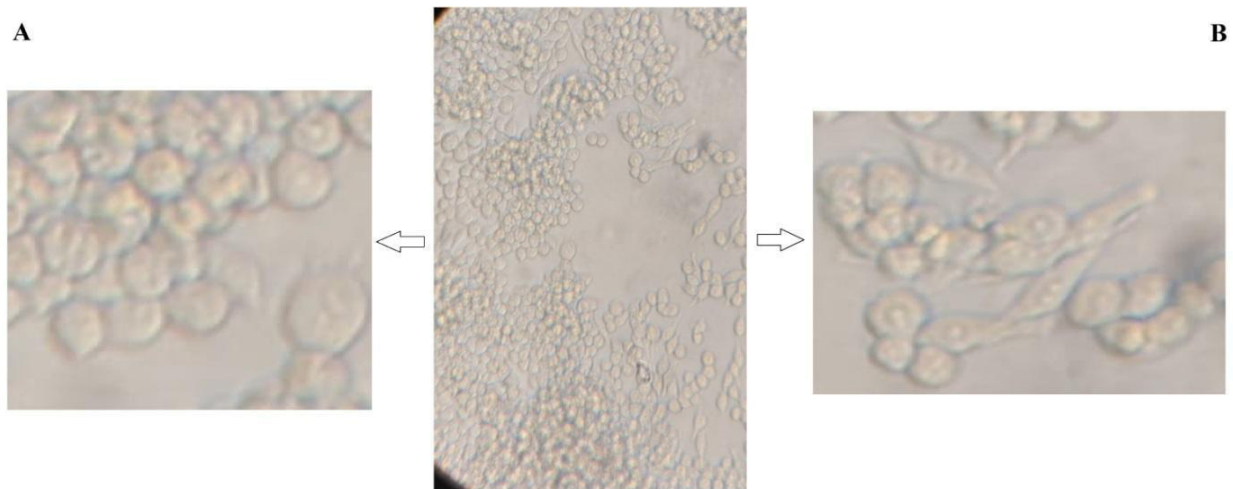
**Figura 14:** Dot-plot FSC vs SSC representativo de células blanco (DMEM) obtenido a partir del análisis por citometría de flujo.

Por otro lado, un sobrecrecimiento del cultivo podría generar una deficiencia en la concentración del anticuerpo anti-CD86, disminuyendo aún más la sensibilidad para detectar las poblaciones celulares positivas para este marcador. Por último, también pudimos observar una elevada dispersión de los datos obtenidos por cuantificación de IL-6 y citometría de flujo, entre las tres fosas que habían recibido el mismo tratamiento. Esto dificultó el análisis estadístico de ciertas tendencias que no pudieron ser consideradas como significativas, siendo este otro aspecto que podría ser atribuido al elevado recuento celular. Estas conclusiones impulsaron la introducción de algunos cambios en la repetición del ensayo, como la disminución del recuento inicial de células sembradas en las placas de cultivo, con la intención de poder lograr un mejor dominio de las condiciones experimentales.



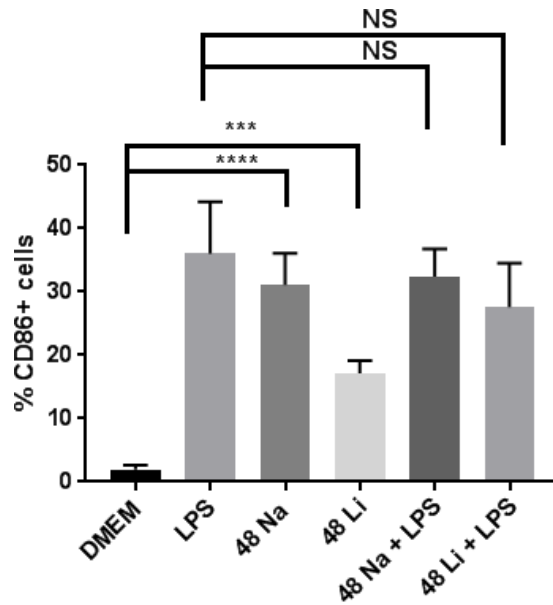
## Segundo ensayo de activación celular

Teniendo en cuenta las hipótesis anteriormente mencionadas, se repitió el ensayo de activación celular y el estudio de marcadores pro-inflamatorios tal como se especifica en MyM 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4, poniendo énfasis en lograr un recuento celular adecuado previo al ensayo. Se adjunta a continuación una imagen obtenida por microscopía antes de la repetición de dicho ensayo, que muestra una morfología y densidad celular acorde a lo esperado: gran cantidad células redondeadas distribuidas en cúmulos y una baja proporción de células activadas (ahusadas o alargadas).

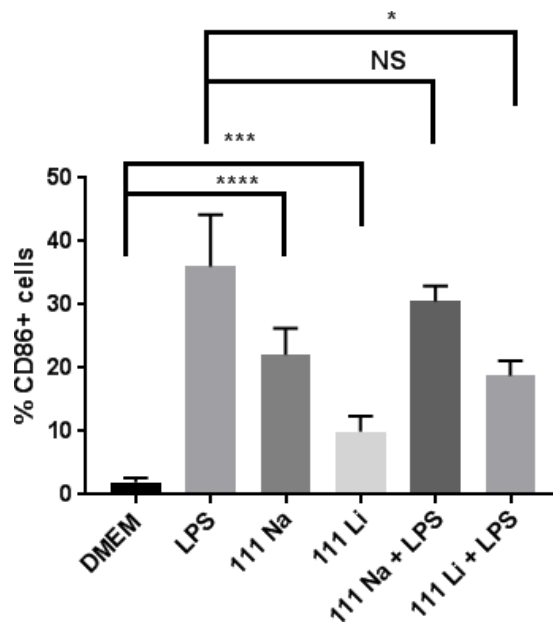


**Figura 15:** Observación microscópica de células RAW 264.7 en cultivo sin tratamiento (400X). Se observa una gran proporción de células en cúmulos (A) y baja proporción de células activadas de aspecto ahusado (B).

Se muestran a continuación los resultados obtenidos por citometría de flujo luego de realizar este segundo ensayo:



**Figura 16:** Porcentaje de células CD86 positivas obtenido al estudiar las células RAW 264.7 por citometría de flujo, luego de incubarlas con SLP-8348 únicamente o en conjunto con LPS en un segundo ensayo de activación celular. NS: no significativo, \*\*\*:  $P < 0,005$ , \*\*\*\*:  $P < 0,0001$ . 48 Na: SLP-8348 extraída con NaCl 5M, con exposición de 5 minutos y agitación en vórtex. 48 Li: SLP-8348 extraída con LiCl 5M según MyM 2.1.

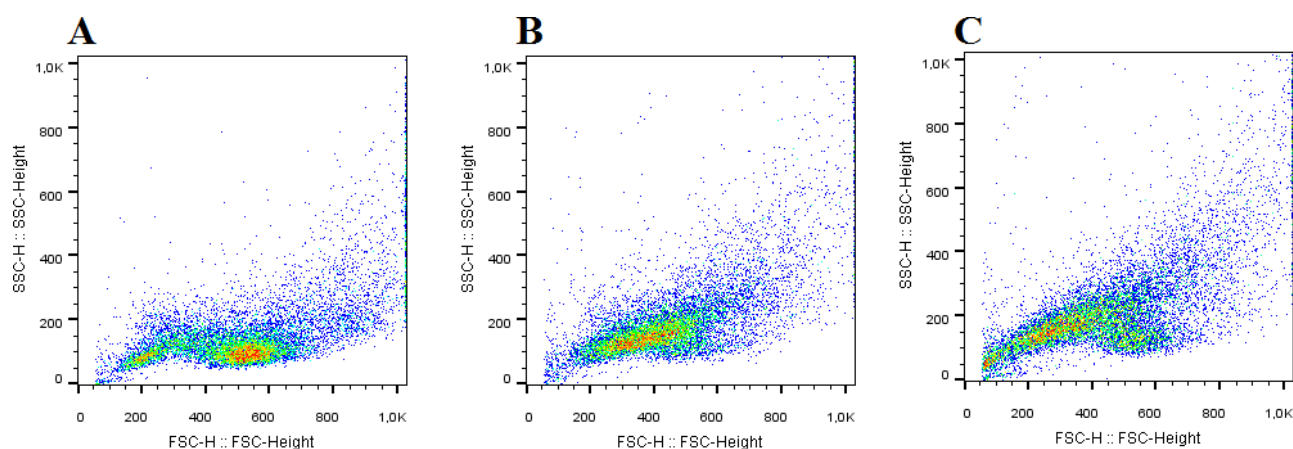


**Figura 17:** Porcentaje de células CD86 positivas obtenido al estudiar las células RAW 264.7 por citometría de flujo, luego de incubarlas con SLP-83111 únicamente o en conjunto con LPS en un segundo ensayo de activación celular. NS: no significativo, \*\*\*:  $P < 0,005$ , \*\*\*\*:  $P < 0,0001$ . 111 Na: SLP-83111 extraída con NaCl 5M, con exposición de 5 minutos y agitación en vórtex. 111 Li: SLP-83111 extraída con LiCl según MyM 2.1.

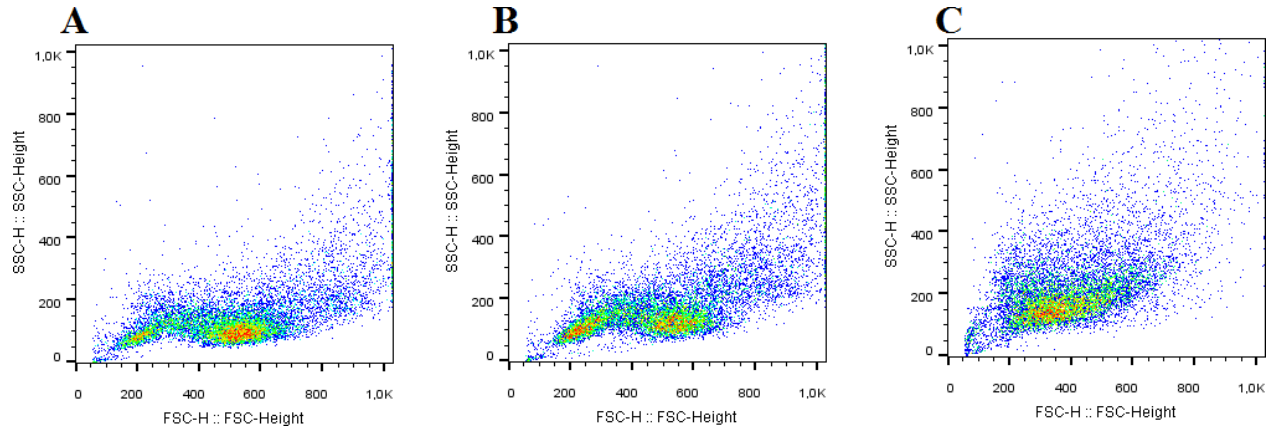
En este segundo análisis del porcentaje de células positivas para el marcador CD86 es posible observar que los resultados coinciden parcialmente con los obtenidos en primera instancia. Respecto a SLP-8348, no fue posible observar efecto sinérgico al coincubar el extracto obtenido por LiCl 5M con LPS, un comportamiento que si pudimos detectar en el primer ensayo. La activación producida por estas proteínas en ausencia de LPS, al ser obtenidas con NaCl 5M como método de extracción, continuó siendo superior que la generada por extractos de LiCl 5M tanto para SLP-8348 como para SLP-83111.

Como hallazgo a destacar en este ensayo, fue posible detectar que las SLP-83111 extraídas con LiCl 5M redujeron de una forma leve pero significativa la activación producida por LPS, lo que resultó ser un comportamiento opuesto al documentado hasta la fecha.

A partir los Dot-plot FSC vs SSC obtenidos, podemos observar diferencias morfológicas que probablemente se encuentren asociadas al tratamiento recibido. Los gráficos que se presentan a continuación son representativos de cada tratamiento, debido a que la distribución de los eventos se repitió entre los triplicados:



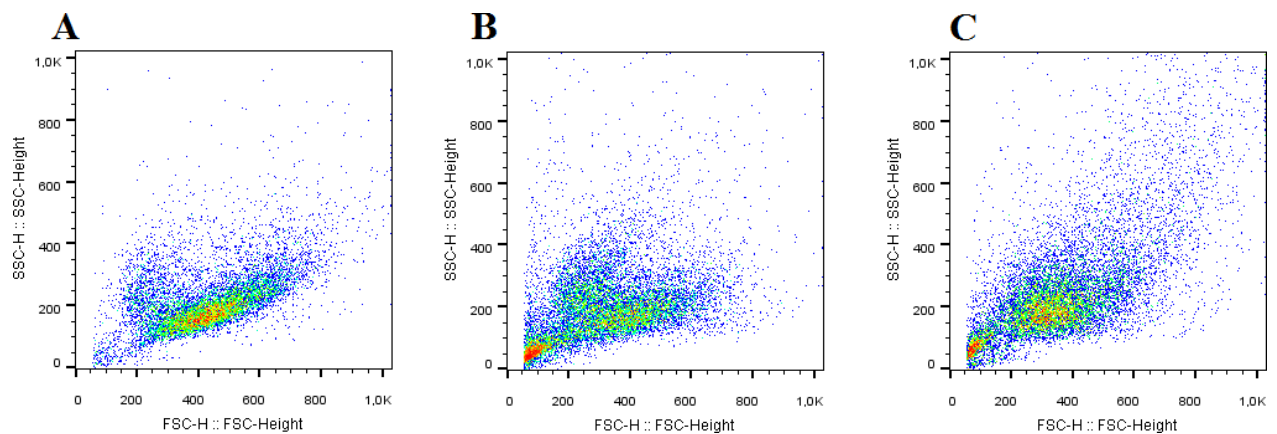
**Figura 18:** Dot-plot FSC vs SSC obtenido a partir del análisis por citometría de flujo de células sin tratar (A), tratadas con SLP-8348 extraída con LiCl 5M (B) o con NaCl 5M (C).



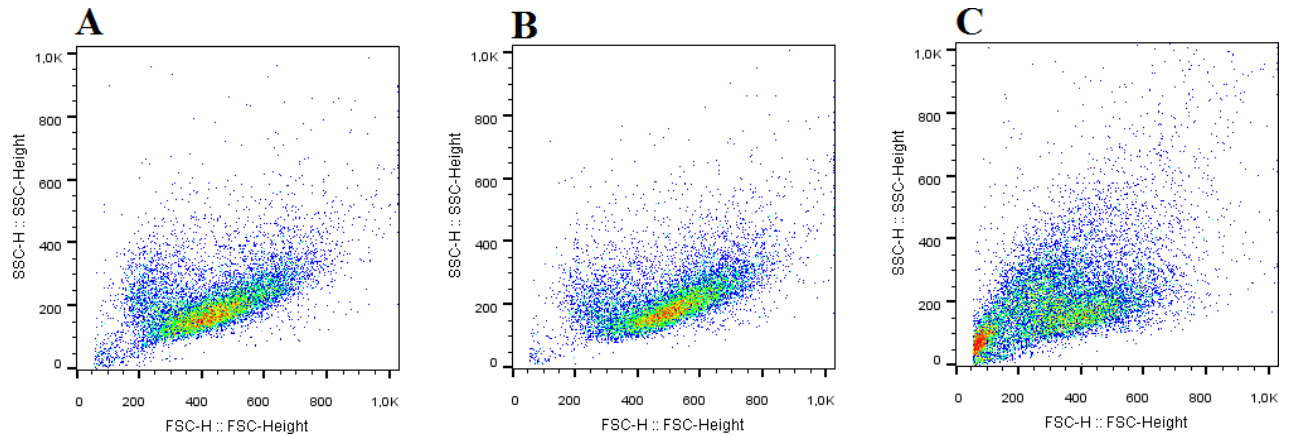
**Figura 19:** Dot-plot FSC vs SSC obtenido a partir del análisis por citometría de flujo de células sin tratar (A), tratadas con SLP-83111 extraída con LiCl 5M (B) o con NaCl 5M (C).

Como primera observación, podemos afirmar que los diferentes tratamientos causan variaciones principalmente en el eje correspondiente al FSC, por lo que los mismos impactan principalmente sobre el tamaño celular, lo que podría deberse a la activación celular inducida sobre las células RAW 264.7. Este hallazgo aporta a la idea de que estas proteínas causan un cierto grado de activación celular por sí mismas sobre células inmunes y que dicha activación depende tanto del origen de las SLP como de su forma de extracción.

A continuación, se muestran los gráficos de FSC vs SSC de las células incubadas con LPS, en presencia o no de los extractos de SLP:



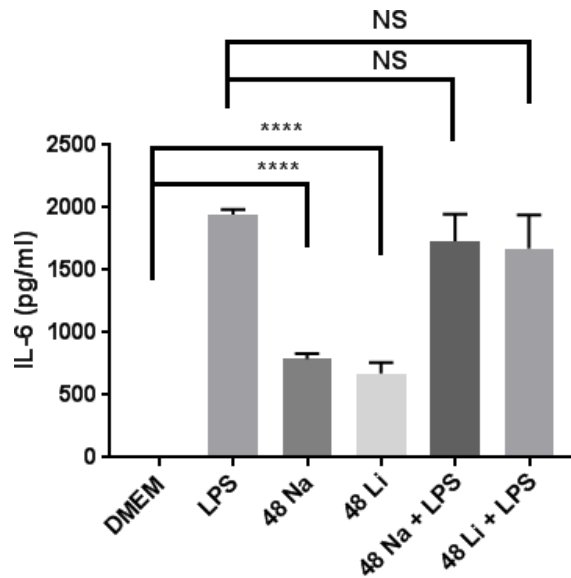
**Figura 20:** Dot-plot FSC vs SSC obtenido a partir del análisis por citometría de flujo de células sometidas a tratamiento con LPS (A), LPS junto con SLP-8348 extraída con LiCl 5M (B) o con NaCl 5M (C).



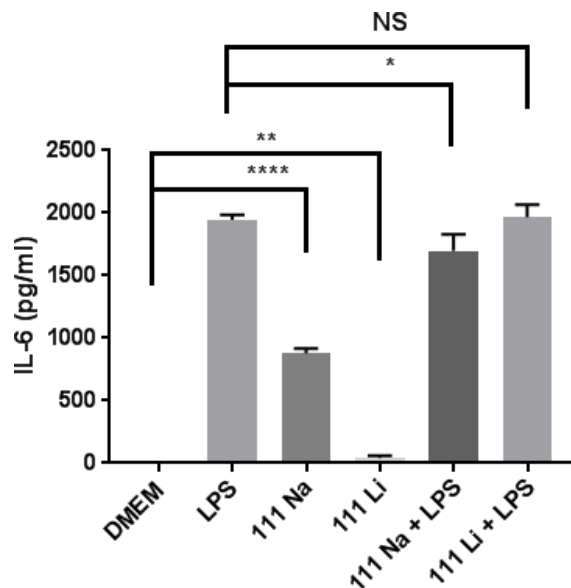
**Figura 21:** Dot-plot FSC vs SSC obtenido a partir del análisis por citometría de flujo de células sometidas a tratamiento con LPS (A), LPS junto con SLP-83111 extraída con LiCl 5M (B) o con NaCl 5M (C).

Si siguiendo con la lógica de que aquellos eventos de muy baja dispersión de la luz tanto en FSC como en SSC pueden atribuirse a células muertas y restos celulares, estos gráficos nos indican que la mortalidad fue muy superior en los casos en que el LPS se administró en conjunto con SLP-8348 extraída por cualquiera de los dos métodos o con SLP-83111 extraída con NaCl 5M. Además, estos tratamientos generaron una muy alta dispersión en la morfología celular. Estas observaciones podrían estar indicando que la combinación de ambos estímulos tiene un muy alto impacto sobre el metabolismo celular e incluso podría ser causante de la inducción de apoptosis en células en cultivo.

Finalmente, se detallan a continuación los resultados obtenidos para la cuantificación de IL-6 secretada en este segundo ensayo:



**Figura 22:** Concentración de IL-6 en pg/mL en sobrenadantes de cultivo de células RAW 264.7 al incubarlas con SLP-8348 únicamente o en conjunto con LPS en un segundo ensayo de activación celular. NS: no significativo, \*\*\*\*:  $P < 0,0001$ . 48 Na: SLP-8348 extraída con NaCl 5M, con exposición de 5 minutos y agitación en vórtex. 48 Li: SLP-8348 extraída con LiCl 5M según MyM 2.1.



**Figura 23:** Concentración de IL-6 en pg/mL en sobrenadantes de cultivo de células RAW 264.7 al incubarlas con SLP-8311 únicamente (A) o en conjunto con LPS (B) en un segundo ensayo de activación celular. NS: no significativo, \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,01$ , \*\*\*\*:  $P < 0,0001$ .

$P < 0,0001$ . 111 Na: SLP-83111 extraída con NaCl 5M, con exposición de 5 minutos y agitación en vortex. 111 Li: SLP-83111 extraída con LiCl 5M según MyM 2.1.

La activación producida por SLP-8348 en ausencia de LPS también fue superior para los extractos obtenidos con NaCl 5M, pero a diferencia del primer ensayo, aquellos obtenidos con LiCl 5M si lograron incrementar considerablemente la secreción de IL-6. Al coincubar con LPS, no pudieron observarse alteraciones significativas de la respuesta a dicho ligando, aunque si se observa una tendencia a la disminución de la concentración de esta citoquina en los extractos obtenidos por ambos métodos. A diferencia del primer ensayo, la secreción de IL-6 producida por SLP-83111 fue considerablemente superior en los extractos obtenidos con NaCl 5M ( $P < 0,01$ ). Además, se detectó una disminución de la concentración de esta citoquina en los sobrenadantes provenientes de las fosas que fueron coincubadas con LPS y SLP-83111 extraída con NaCl 5M respecto a las fosas que recibieron únicamente LPS.

Se postulan dos posibles alternativas para explicar la disminución en la concentración de IL-6 en los sobrenadantes de cultivo, observada al coincubar LPS con SLP, respecto a las fosas a las cuales únicamente se les administró LPS. Como primera hipótesis, es posible que las SLP interactúen con un receptor de superficie que genere una respuesta negativa sobre el nivel de secreción de esta citoquina, como un mecanismo real de atenuación de la respuesta generada por el LPS. Otra posibilidad es que la disminución de la concentración de IL-6 no se deba a una disminución de la secreción sino a una mayor mortalidad celular. La combinación de ambos estímulos podría ser causante de muerte celular, disminuyendo el número de células viables con capacidad de liberar esta citoquina al medio de cultivo, generando como consecuencia una disminución en su concentración. Esta última hipótesis tiene un cierto grado de respaldo en la correlación que se observa entre algunos dot-plot FSC vs SSC y la cuantificación de IL-6. En este segundo ensayo, la coincubación de SLP-8348 con LPS generó una tendencia a la disminución de la concentración de IL-6 respecto al LPS, mientras que la coincubación con SLP-83111 extraída con NaCl 5M produjo una disminución estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ). En los dot-plot FSC vs SSC de todos estos tratamientos, podemos observar un muy alto recuento de eventos correspondientes a células muertas y/o detritos celulares, lo que significa que el tratamiento ocasionó una alta tasa de mortalidad.

### 4.3 Ensayos de citotoxicidad sobre células Vero

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron tal como se especifica en los puntos 3.6.1, 3.6.2 y 3.6.4. La determinación del título del SCS dio como resultado un 50% de redondeo en la dilución 1/3200 (DL<sub>50</sub>) del sobrenadante de cultivo de *Clostridium difficile*, obtenido tal como se especifica en el punto 3.1.1. La Figura 24 muestra el aspecto de una fosa representativa del tratamiento con una dilución 1/200 del SCS, en presencia o ausencia de SLP.

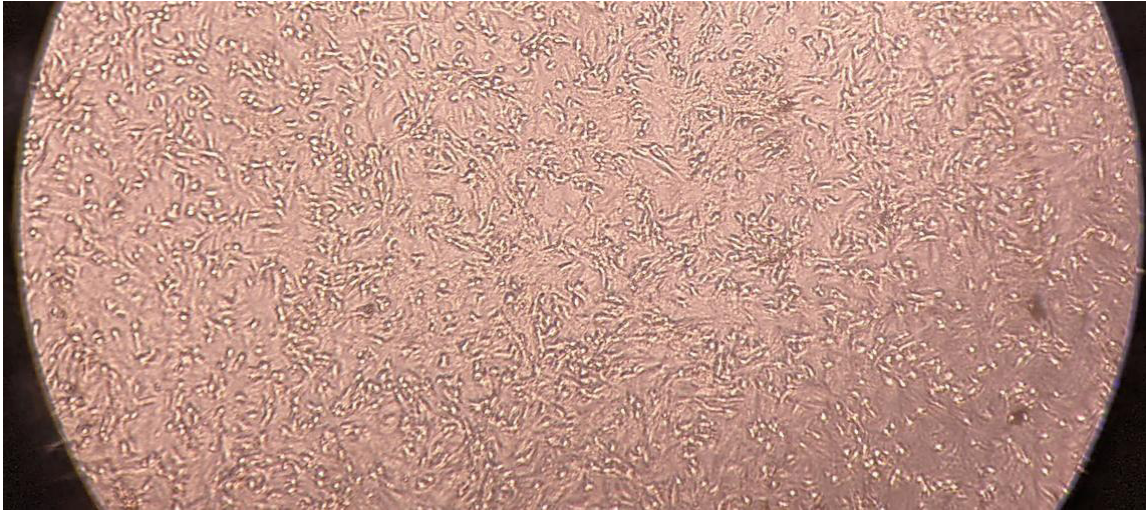


**Figura 24:** Células Vero en cultivo luego de 16 horas de incubación SCS diluido en un factor de 1/200, tratamiento que produjo un 100% de redondeo. (100X)

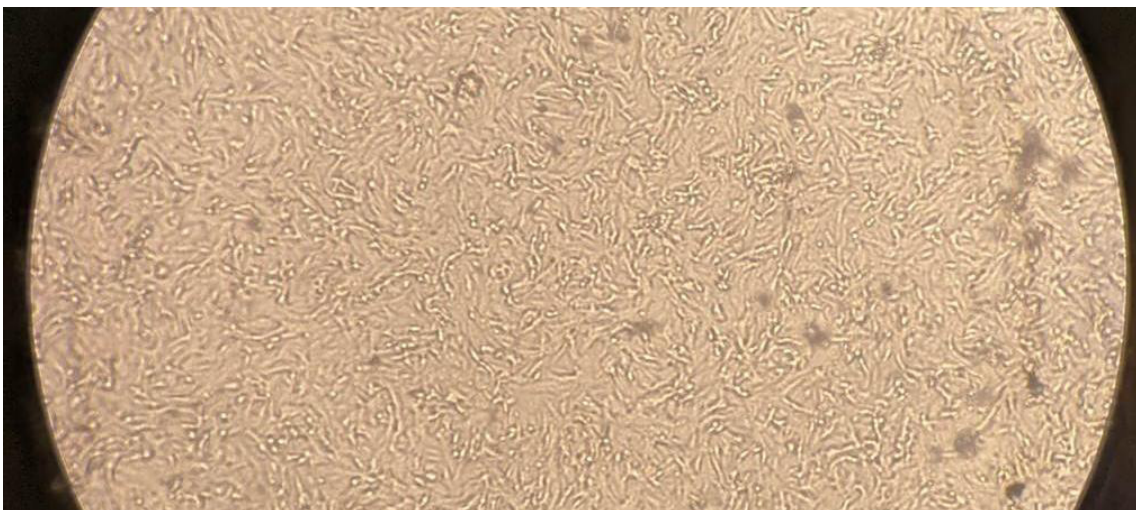
Con respecto a los resultados obtenidos, es importante destacar que no se observó redondeo en ninguna de las fosas a las que se le administró SLP-8348 o SLP-83111 en ausencia de SCS, sin observar diferencias respecto a las células sin tratamiento (DMEM). Esto nos permite afirmar que las SLP no resultan tóxicas para las células Vero en cultivo, sin importar el método de extracción. Por otro lado, la respuesta citotóxica al SCS fue diferente al preincubarlo con SLP-8348 o SLP-83111. Las SLP-83111, sin importar su forma de obtención, no mostraron efecto protector sobre las células Vero en cultivo, ya que el 50% de redondeo se observó en la dilución 1/3200, al igual que en las fosas tratadas con SCS. Para SLP-8348, se observó un efecto protector considerable únicamente en los extractos obtenidos con NaCl 5M, donde el 50% de redondeo se podía apreciar en la



dilución 1/800 (Figura 25). Además, en la dilución 1/3200, este tratamiento no generó una diferencia detectable en la proporción de células redondeadas con respecto a las células sin tratar (Figura 26). Estos resultados indican que al preincubar el SCS con este extracto, se requiere de una concentración mayor de toxina para lograr el mismo grado de toxicidad que el generado por el tratamiento con SCS en ausencia de SLP-8348.



**Figura 25:** Células Vero en cultivo luego de 16 horas de incubación con SCS diluido en un factor de 1/800 y preincubado con SLP-8348 extraídas con NaCl 5M, tratamiento que produjo un 50% de redondeo.



**Figura 26:** Células Vero en cultivo luego de 16 horas de incubación con SCS diluido en un factor de 1/3200 y preincubado con SLP-8348 extraídas con NaCl 5M.

Como se mencionó anteriormente, estudios realizados previamente sugirieron que el efecto protector observado en estos ensayos se debe a una interacción directa de tipo proteína-proteína entre las toxinas provenientes del sobrenadante de cultivo de *C. difficile* y las SLP-Lk en solución (Carasi *et. al* 2012). Si bien en estos ensayos no se reprodujeron los resultados obtenidos oportunamente con las SLP-Lk extraídas con LiCl 5M, las diferencias observadas en la actividad protectora de cada uno de los extractos de SLP-8348, podrían estar relacionadas con cambios conformacionales de las SLP en solución que resulten en alteraciones en su afinidad hacia las toxinas TcdA y TcdB, aunque sería necesario continuar con otros estudios para poder corroborar esta hipótesis.

## 5. Conclusiones

Con respecto al análisis cuali y cuantitativo de los extractos obtenidos, y pese a que los resultados no fueron totalmente congruentes entre las tres extracciones realizadas, es posible formular algunas observaciones. Al utilizar NaCl 5M como agente de extracción de SLP de *L. kefiri* CIDCA 8348 y CIDCA 83111, el tiempo de exposición de la suspensión bacteriana al agente de extracción no parece estar directamente relacionado con el rendimiento obtenido. Sin embargo, se requieren más estudios sobre la cinética de la extracción proteica para determinar si existen más factores involucrados en el comportamiento observado. Por otro lado, los resultados del análisis cualitativo de los extractos por SDS-PAGE, mostraron que tiempos de exposición más reducidos a la solución de NaCl 5M permiten obtener extractos de SLP con mayor pureza, al observarse pocas o ninguna banda accesoria adjudicada a SLAP o procesos proteolíticos. Finalmente, la forma de agitación no parece tener una incidencia importante sobre el rendimiento y la calidad de los extractos obtenidos. Tomando en cuenta estas observaciones, podemos concluir en que la condición de extracción de SLP-8348 y 83111 de NaCl 5M a un tiempo de 5 minutos parece ser adecuada para ser utilizada en investigaciones futuras.

Los estudios funcionales basados en la respuesta generada por los extractos sobre células RAW 264.7 en cultivo, mostraron que los estímulos inducidos por los extractos de NaCl 5M son muy diferentes a los generados por los obtenidos con LiCl 5M, por lo que las interacciones involucradas en dicha respuesta no parecen ser coincidentes. Por otro lado, el estudio de la actividad protectora de los extractos de SLP-8348 sobre células Vero en cultivo, mostró claras diferencias entre los extractos obtenidos con NaCl 5M y LiCl 5M, lo que probablemente se adjudique a diferencias conformacionales de las SLP obtenidas, que alteran de forma significativa la interacción con las toxinas TcdA y TcdB presentes en solución. Una de las hipótesis que podría plantearse en trabajos posteriores, es si las SLP obtenidas con NaCl 5M y LiCl 5M difieren en cuanto a su estructura y conformación proteica. De ser así, las proteínas obtenidas podrían establecer diferentes interacciones con receptores o proteínas solubles, generando distintas respuestas *in vitro* o *in vivo*. En dichos trabajos, sería interesante estudiar comparativamente la estructura secundaria de ambos extractos por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), o bien su estructura terciaria por métodos de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS).

Los resultados obtenidos de los ensayos de citometría de flujo indican que la muerte celular inducida por SLP-8348 o SLP-83111 en combinación con LPS juega un rol muy importante en la interpretación de la respuesta celular generada. Esto alienta a continuar con dichos estudios, ampliando la perspectiva más allá de los procesos de activación celular e incluyendo también la inducción de apoptosis como parte de la respuesta a la combinación de ambos estímulos.

## 6. Bibliografía

- Anzengruber J, Pabst M, Neumann L, Sekot G, Heintl, S, Grabherr R Altmann F, Messner P, Schäffer C **2014**. Protein O-glycosylation in *Lactobacillus buchneri*. *Glycoconjugate Journal*, **31**(2), 117–131.
- Assandri MH, Malamud M, Trejo FM, Serradell MA **2023**. Proteínas de la capa S como jugadores inmunes: historias de bacterias patógenas y no patógenas. *Current Research in Microbial Sciences*
- Bolla PA, Sanz A, Huggias S, Ruggera JF, Serradell MA, Casella ML **2020a**. Regular arrangement of Pt nanoparticles on S-layer proteins isolated from *Lactobacillus kefir*: synthesis and catalytic application. *Molecular Catalysis* **481** 110262.
- Bolla PA, Huggias S, Serradell MA, Ruggero JF, Casella ML **2020b**. Synthesis and catalytic application of silver nanoparticles supported on *Lactobacillus kefir* S-layers proteins. *Nanomaterials* **10**-2232
- Bradford MM **1976**. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Analytical Biochemistry* **72** 248-254.
- Breitwieser, A., Gruber, K., and Sleytr, U.B. **1992**. Evidence for an S-layer protein pool in the peptidoglycan of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* **174** 8008–8015.
- Capostagno C **2022**. Extracción de proteínas de capa S de *Lentilactobacillus kefir* con NaCl 5M: optimización de las condiciones y caracterización de los extractos obtenidos. Trabajo Final de la Carrera de Bioquímica; Universidad Nacional Arturo Jauretche.
- Carasi P **2014**. Potencialidad probiótica de lactobacilos con capa S. Estudios sobre la inocuidad, efecto antimicrobiano y capacidad inmunomodulatoria de *Lactobacillus kefir* Tesis Doctoral, UNLP.
- Carasi P, Ambrosio NM, De Antoni GL, Bressollier P, Urdaci MC, Serradell Mde L **2014b**. Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus *J Dairy Res* **81** 16-23.
- Carasi P, Díaz M, Racedo SM, De Antoni G, Urdaci MC, Serradell MA **2014a**. Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated *Lactobacillus kefir* *Biomed Res Int* 2014:208974.
- Carasi P, Racedo SM, Jacquot C, Romanin DE, Serradell MA, Urdaci MC **2015**. Impact of kefir derived *Lactobacillus kefir* on the mucosal immune response and gut microbiota *J Immunol Res* 2015:361604.
- Carasi P, Trejo FM, Pérez PF., De Antoni GL, Serradell MA **2012**. Surface proteins of *Lactobacillus kefir* antagonize *in vitro* cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxins *Anaerobe* **18** 135-142.
- Cavallero G, Malamud M, Casabuono AC, Serradell MA, Couto AS **2017**. A glycoproteomic approach reveals that a S-layer glycoprotein of *Lactobacillus kefir* CIDCA 83111 is O- and N-glycosylated *Journal of Proteomics* **162** 20-29.

Chen X, Chen Y, Li X, Chen N, Fang W **2009**. Characterization of surface layer proteins in *Lactobacillus crispatus* isolate ZJ001. *J Microbiol Biotechnol* **19** 1176–1183

Claus H, Akça E, Debaerdemaeker T, Evrard C, Declercq JP, Robin Harris J, Schlott B, König H **2005**. Molecular organization of selected prokaryotic S-layer proteins *Can J Microbiol* **51** 731-743.  
Eichler J, Adams MW (2005) Posttranslational protein modification in Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **69** 393–425.

Fijan S **2014**. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature *Int J Environ Res Public Health* **11** 4745-4767.

Gerbino, E, Carasi P, Araujo-Andrade C, Tymczyszyn EE, Gómez-Zavaglia A **2015**. Role of S-layer proteins in the biosorption capacity of lead by *Lactobacillus kefir* *World J Microbiol Biotechnol* **31** 583-592.

Goldsby Richard A., Kindt Thomas, Osborne Barbara, Kuby Janis, **2004**. *Inmunología*, 5ta ed., McWraw Hill, Interamericana, 146-164, México D.F.

Golowczyc MA, Mobili P, Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL **2007**. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis *Int J Food Microbiol* **118** 264–273.

Golowczyc MA, Mobili P, Garrote GL, Serradell MA, Abraham AG, De Antoni GL **2009**. Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins *J Dairy Res* **76** 1–6.

Huggias S **2022**. Obtención de arreglos regulares metálicos sobre superficies de sistemas nanopartícula-proteína y su aplicación en catálisis. Tesis de Doctorado; Universidad Nacional de la Plata.

Huggias S, Bolla PA, Serradell MA, Casella ML, Peruzzo PJ **2020**. Platinum nanoparticles obtained at mild conditions on S-layer protein/polymer particle supports *Langmuir* **36** 1201-1211.

Hynönen U, Palva, A **2013**. *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications *Appl Microbiol Biotechnol* **97** 5225–5243.

Ilk N, Egelseer EM, Sleytr UB **2011**. S-layer fusion proteins--construction principles and applications *Curr Opin Biotechnol* **22** 824-831.

Johnson B, Selle K, O'Flaherty SO, Goh YJ, Klaenhammer T **2013**. Identification of extracellular surface-layer associated proteins in *Lactobacillus acipophilus* NCFM *Microbiology* **159** 2269-2282.

Laemmli UK **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* **227** 680-685.

Malamud M, Carasi P, Bronsoms S, Trejo SA, Serradell MA **2017**. *Lactobacillus kefiri* shows inter-strain variations in the amino acid sequences of the S-layer proteins *Antonie van Leeuwenhoek* **110** 515-530.

Malamud M, Carasi P, Freire T, Serradell MA **2018**. S-layer glycoprotein from *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 enhances macrophages response to LPS in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner *Biochemical and Biophysical Research Communications* **495** 1227-1232.

Malamud M. **2019**. Proteínas superficiales de bacterias lácticas con potencialidad biotecnológica: estudios estructurales y funcionales de las proteínas de capa S de *Lactobacillus kefir*. Tesis de Doctorado; Universidad Nacional de La Plata.

Malamud M, Bolla PA, Carasi P, Gerbino E, Gómez-Zavaglia A, Mobili P y Serradell MA **2019a**. S-Layer Proteins from Lactobacilli: Biogenesis, Structure, Functionality and Biotechnological Applications. *Lactobacillus Genomics and Metabolic Engineering*. Ruzal (Ed.) (pp. 105-129). La Plata, Buenos Aires, Argentina. Caister Academic Press.

Malamud M, Carasi P, Assandri MH, Freire T, Lepenies B, Serradell MA **2019b**. S-layer glycoprotein from *Lactobacillus kefir* exerts its immunostimulatory through glycan recognition by Mincle *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2019.01422

Malamud M, Cavallero GJ, Casabuono AC, Lepenies B, Serradell MLÁ, Couto AS **2020**. Immunostimulation by *Lactobacillus kefir* S-layer proteins with distinct glycosylation patterns requires different lectin partners. *J Biol Chem* **295** 14430-14444.

Messner, P., Steiner, K., Zarschler, K., and Schäffer, C. **2008**. S-layer nanoglycobiology of bacteria. *Carbohydr. Res.* **343**, 1934–1951. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.12.025>

Mobili P, Serradell MA, Trejo S, Avilés Puigvert FX, Abraham AG, De Antoni GL **2009**. Heterogeneity of S-layer proteins from aggregating and non-aggregating *Lactobacillus kefir* strains *Antonie van Leeuwenhoek* **95** 363-372.

Sahay B, Ge Y, Colliou N, Zadeh M, Weiner C, Mila a, Owen J, Mohamadzadeh M **2015**. Advancing the use of *Lactobacillus acidophilus* surface layer protein A for the treatment of intestinal disorders in human *Gut Microbes* **6** 392-397.

Sára, M., Pum, D., Sleytr, U.B. **1992**. Permeability and chargedependent adsorption properties of the S-layer lattice from *Bacillus coagulans* E38-66. *J. Bacteriol.* **174** 3487–3493

Sleytr UB & Glauert AM **1975**. Analysis of regular arrays of subunits on bacterial surfaces: evidence for a dynamic process of assembly. *J Ultrastruct Res* **50** 103–116.

Sleytr UB, Schuster B, Egelseer EM, Pum D **2014**. S-layers: principles and applications *FEMS Microbiology Reviews* **38** 823–864

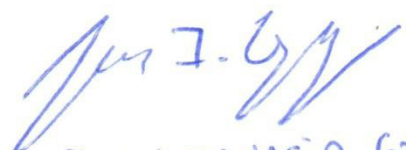
Smith RH, Messner P, Lamontagne LR, Sleytr UB & Unger FM **1993**. Induction of T-cell immunity to oligosaccharide antigens immobilized on crystalline bacterial surface layers (S-layers). *Vaccine* **11** 919–924.

Ücisik MH, Kupcu S, Debreczeny M, Schuster B & Sleytr UB **2013**. S-layer coated emulsomes as potential nanocarriers. *Small* **9** 2895–2904

Ucisik MH, Küpcü S, Breitwieser A, Gelbmann N, Schuster B, Sleytr UB **2015**. S-layer fusion protein as a tool functionalizing emulsomes and CurcuEmulsomes for antibody binding and targeting *Colloids Surf B Biointerfaces* **128** 132-139.

Wang X-Y, Wang D-B, Zhang Z-P, Bi L-J, Zhang J-B, Ding W, Zhang X-E **2015**. A S-layer protein of *Bacillus anthracis* as a building block for functional protein arrays by in vitro self-assembly *Small* **11** 5826-5832.

Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, O'Toole PW, Pot B, Vandamme P, Walter J, Watanabe K, Wuyts S, Felis GE, Gänzle MG, Lebeer S **2020**. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **70** 2782-2858.

  
JUAN IGNACIO GONZALEZ  
DNI: 41.164.277