

Capostagno, Carla Carolina Leonor

Extracción de proteínas de capa-S de *Lentilactobacillus kefiricon* NaCl 5M: optimización de las condiciones y caracterización de los extractos obtenidos

2022

Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
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:

Capostagno, C. C. L. (2022) *Extracción de proteínas de capa-S de Lentilactobacillus kefiricon NaCl 5M: optimización de las condiciones y caracterización de los extractos obtenidos* [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.

Extracción de proteínas de capa-S de *Lentilactobacillus kefiri* con NaCl 5M: optimización de las condiciones y caracterización de los extractos obtenidos.

Alumna: Carla Carolina Leonor Capostagno

Directora: Dra. María de los Ángeles Serradell

Codirector: Lic. Matías H. Assandri

Marzo 2022

El siguiente trabajo ha sido desarrollado 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

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, sobre todo a mis hijas, gracias por llenar de alegría mis días, y a mi compañero, quien se llevó la peor parte de mis estados anímicos, y aun así siempre estuvo para apoyarme y alentarme a seguir. También a mis hermanas y a mi madre que son incondicionales. Los amo... gracias por creer en mí.

A mis directores María y Matías, gracias por brindarme su espacio y conocimientos para hacer posible este trabajo; por la paciencia y sobre todo por hacerme sentir tan cómoda cada jornada de trabajo. Lo disfruté mucho...

A mis compañeras, y hoy amigas, Carla y Yani, excelentes personas que me dejó esta carrera con las cuales compartimos momentos lindos y difíciles, que con buenos mates pudimos sobrellevar. Las quiero...

A la Universidad Nacional Arturo Jauretche, y a quienes hicieron que su existencia sea posible. Gracias por hacer que tantas personas como yo, que no teníamos pensado empezar una carrera universitaria a esta altura de la vida, lo hiciéramos por el hecho de tener una universidad cercana que nos permita trabajar y estudiar al mismo tiempo.

A todos los profesores por brindar sus conocimientos y hacer que lleguemos a la meta. Me llevo lindos recuerdos de la mayoría...

A esas personas que no están físicamente, pero que, si llevo en mi corazón para siempre, papi y abuela Yoyi, sé que estarían contentos por mi...

¡Simplemente, GRACIAS a todos!

Índice

1.	Introducción.....	7
1.1.	Proteínas de capa-S en <i>Lentilactobacillus kefir</i>	11
2.	Objetivos	14
3.	Materiales y métodos	15
3.1.	Material biológico	15
3.2.	Condiciones de cultivo	16
3.3.	Extracción de SLPs de las diferentes cepas de <i>L. kefir</i> utilizadas.....	17
3.3.1.	Extracción con LiCl 5M	17
3.3.2.	Extracción con NaCl 5M	18
3.4.	Caracterización de los extractos obtenidos	18
3.4.1.	Cuantificación de proteínas totales extraídas	18
3.4.2.	Separación electroforética de proteínas mediante SDS-PAGE	19
3.4.3.	Western blot	20
3.5.	Evaluación de la capacidad inmunoestimuladora	21
3.5.1.	Cultivo de células eucariotas	22
3.5.2.	Ensayo de activación celular	22
3.5.3.	Cuantificación de IL-6	24
3.6.	Análisis estadístico.....	24
4.	Resultados y discusión	25
4.1.	Extracción de proteínas de capa-S de <i>L. kefir</i>	25
4.2.	Caracterización de los extractos	28
4.2.1	SDS-PAGE	28
4.2.2	Western blot	31
4.2.3	Activación de macrófagos murinos	32
5.0	Conclusiones	35
6.0	Bibliografía	37

1. Introducción

La evolución biológica es el proceso por el cual los organismos, mediante cambios genéticos y fenotípicos, logran adaptarse y superar las adversidades de los distintos hábitats. Se sabe que las bacterias presentan una gran diversidad de la arquitectura molecular de la superficie celular más externa que refleja este proceso de adaptación evolutiva del microorganismo a condiciones ecológicas y ambientales específicas.

La capa S, una envoltura proteica rígida monomolecular autoensamblada, 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). Esta red proteica fue descubierta por Houwink en 1953 en *Spirillum serpens* (Houwink, 1953), pero recién para los años 70 comenzó a cobrar interés en la comunidad científica dadas sus propiedades fisicoquímicas excepcionales, como la capacidad de autoensamblarse en solución o sobre diferentes tipos de soporte, que la convierten en una estructura orgánica única con un alto potencial en el campo de la nanobiotecnología. Algunas de las aplicaciones que podemos mencionar en este campo son 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 de diagnósticos, biosensores, etc. (Ilk et al. 2011, Wang et al. 2015).

La presencia de capa S ha sido descrita en varias especies bacterianas, entre las que se encuentran algunas del género *Lactobacillus* (Hynönen & Palva, 2013), el cual fue recientemente reclasificado en 25 géneros diferentes (Zheng et al. 2020). Los lactobacilos se encuentran en diversos entornos naturales como plantas, productos alimenticios, aguas residuales, y el tracto gastrointestinal y vías genitales de los seres humanos y los animales, donde forman parte de la microbiota comensal. Estas bacterias ácido-lácticas despertaron interés dados los efectos benéficos sobre la salud (probióticos) que se pudieron demostrar en muchas cepas del género (Fijan 2014). También han demostrado ser prometedoras para ser usadas como vehículos de drogas terapéuticas y antígenos vacunales en los seres humanos (Ucisik et al. 2015).

Las proteínas que componen la capa S representan aproximadamente el 10-15% del total de proteínas de la bacteria, y puede considerarse como uno de los biopolímeros más abundantes del planeta (Sleytr et al. 2014). Dado que la capa S se encuentra distribuida en

diferentes familias de microorganismos, se puede pensar que estas estructuras reflejan las adaptaciones evolutivas de los microorganismos a las adversidades de los distintos hábitats naturales, y que algún tipo de ventajas les ha proporcionado (Zhu et al. 2017).

Como componente de la superficie bacteriana, a la capa S se le han atribuido diversas funciones como mantenimiento de la forma celular, unión de iones, moléculas o fagos, mediación en la adhesión bacteriana (Gerbino et al. 2015). Por otro lado, protege a los microorganismos de las condiciones adversas del medio, contra la presencia de péptidos antimicrobianos (de la Fuente-Nuñez et al. 2012), de la exposición a la radiación (Kotiranta et al. 1999), cambios en el pH ambiental (Gilmour et al. 2000), bacteriófagos (Howard y Tipper 1973), depredadores microbianos bacterianos o eucariotas (Koval y Hynes 1991; Tarao et al. 2009) o enzimas bacteriolíticas (Lortal et al. 1992). Además, participan en la interacción de los microorganismos con el sistema inmune y en la modulación de la respuesta (Konstantinov et al. 2008, Sekot et al. 2011, Taverniti et al. 2013, Collins et al. 2014).

En las bacterias patógenas, todas las funciones atribuidas a la capa S podrían contribuir a la virulencia del patógeno, a través de distintos mecanismos como la adhesión, la coagregación (Shimotahira et al. 2013), la variación antigénica (Spigaglia et al. 2011), la protección contra la lisis por el sistema del complemento o fagocitosis (Thompson 2002) o inmunomodulación (Ryan et al. 2011, Sekot et al. 2011, Settem et al. 2013). Por otro lado, algunas proteínas de capa S han demostrado el potencial de actuar como enzimas (Calabi et al. 2001, Ahn et al. 2006, Prado Acosta et al. 2008), o incluso estar involucradas en la motilidad del microorganismo (McCarren et al. 2005).

La capa S está compuesta de varias subunidades de proteínas o glicoproteínas idénticas, cuyo peso molecular oscila entre 40 y 200 kDa, forman una matriz bidimensional, regular y altamente porosa. Las subunidades se mantienen unidas entre sí y a la superficie celular mediante interacciones no covalentes (Hynönen y Palva 2013, Pum et al. 2013). En bacterias Gram-positivas la interacción puede ocurrir con la capa de peptidoglicano o con un polímero secundario de la pared celular, mientras que en las bacterias Gram-negativas habrá unión al LPS de la membrana externa mediante interacción iónica, interacciones carbohidrato-carbohidrato, proteína-carbohidrato y/o proteína-proteína (figura 1) (Sleytr et al. 2014). En algunas bacterias se ha evidenciado la presencia de proteínas asociadas llamadas SLAP, que

se extraen junto con las proteínas de capa S (SLP) y que pueden mediar diferentes tipos de interacciones con el entorno (Johnson et al. 2013).

El método de elección para la detección de la capa S en la superficie celular es la microscopía electrónica (figura 2) (Pavkov-Keller et al. 2011). Con respecto a la estructura atómica de las proteínas de capa S, la disposición espacial de los dominios y los elementos de la estructura secundaria dentro de la capa S, hay muy poca información debido a la dificultad para cristalizar la capa S y poder analizarla por los métodos convencionales como cristalografía de rayos X (Pavkov-Keller et al. 2011).

Las SLP de procariotas sufren glicosilación como modificación postraduccional más frecuente (Ristl et al. 2011). La N-glicosilación es rara, se caracterizan por lo general por estar O-glicosiladas, y el grado de glicosilación varía entre el 2% y 10% (p/p) (Messner et al. 2013).

Debido a que las interacciones que mantienen unidas a las SLP entre sí y con la célula son no covalentes, estas pueden ser fácilmente liberadas y la mayoría de las técnicas para el aislamiento y la purificación de las mismas implican el uso de detergentes (Tritón X100 o dodecilsulfato de sodio) o agentes caotrópicos (como urea, clorhidrato de guanidina o cloruro de litio) (Pum et al. 2013, Schuster y Sleytr 2014). Luego de extraídas de la superficie bacteriana, las SLP tienen la capacidad de formar distintos arreglos como resultado de autoensamblarse en solución, por ejemplo, láminas planas, tubos, vesículas, de reensamblarse en capas simples y dobles en soportes sólidos, en la interfaz aire-agua, en películas lipídicas, y de cubrir liposomas, nanocápsulas y nanopartículas por completo (figura 3) (Bolla et al. 2022).

Referido al género *Lactobacillus*, los tamaños de las proteínas de capa S informados varían entre 25 y 71 kDa, y los valores de pI predichos son altos (9.4-10.4) comparados con otras SLP de otras bacterias. También se describió sólo la simetría de red de tipo oblicua o hexagonal para el género (Lortal et al. 1992, Smit et al. 2001, Avall-Jääskeläinen y Palva 2005, Anzergruber et al. 2014, Bolla et al. 2020), y la glicosilación es una modificación postraduccional encontrada y caracterizada en solo unas pocas especies (Malamud et al. 2019).

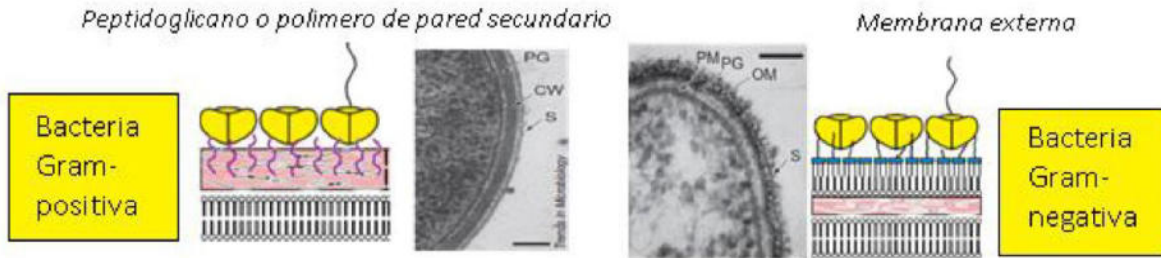


Figura 1: Bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y su zona de anclaje de la proteína de capa S.

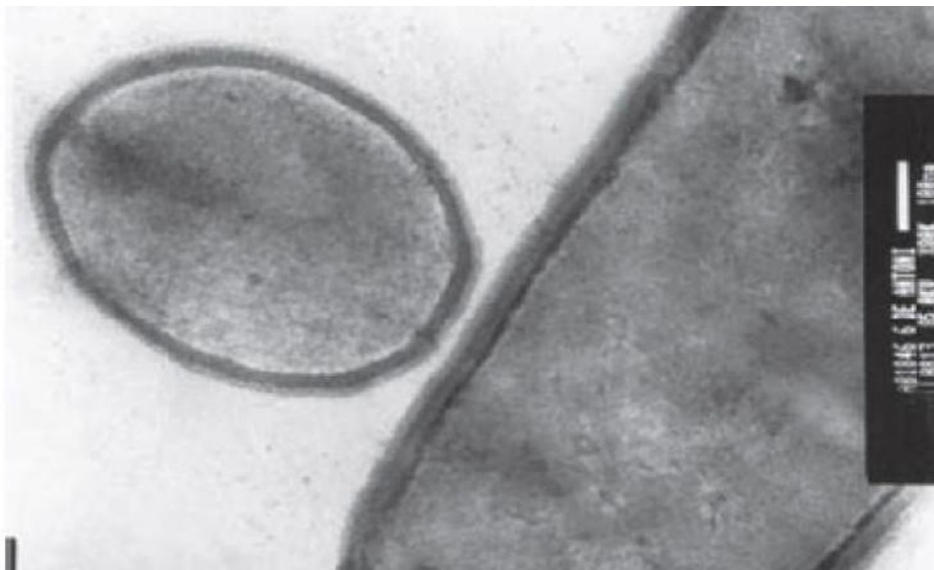


Figura 2: Micrografía obtenida por transmisión electrónica de una sección delgada de *Lentilactobacillus kefirii* CIDCA 8321. Adaptada de Garrote y col. (2004).

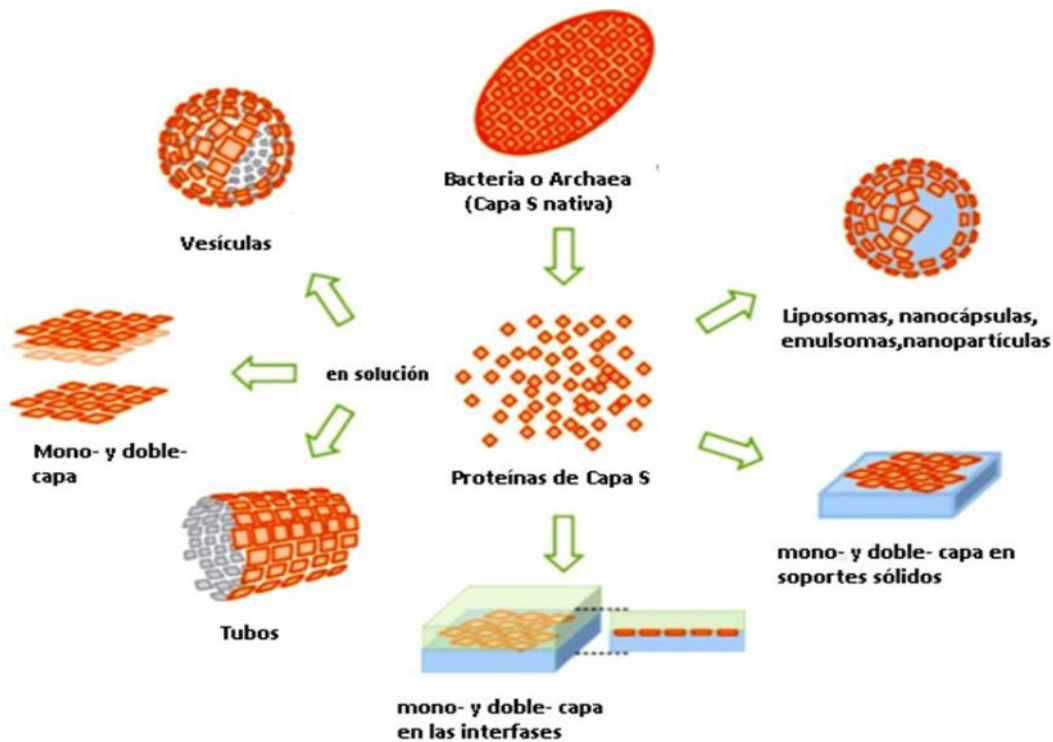


Figura 3: Esquema de autoensamblado de proteínas de capa S. Adaptada de Bolla y col. (2022).

1.1. Proteínas de capa S en *Lentilactobacillus kefir*

En los últimos años, el grupo de trabajo se ha enfocado en el estudio de las propiedades probióticas de bacterias ácido lácticas, entre ellas, *Lentilactobacillus kefir* (antes llamado *Lactobacillus kefir*) aisladas de un fermento natural conocido como “kefir” (Carasi 2014, Carasi et al. 2014, 2015). En estas bacterias se ha demostrado la presencia de SLP, positivas para la tinción de PAS, lo que indica que presentan restos glicosídicos (Mobili et al. 2009, Malamud et al. 2017). También se demostró que cada cepa de *L. kefir* expresa una única SLP. Estas proteínas tienen pesos moleculares aparentes por SDS-PAGE de 66 a 71 kDa. Los primeros estudios MALDI-TOF y reactividad frente a un panel de anticuerpos monoclonales específicos demostró que, a pesar de tratarse de cepas de la misma especie, las SLP de *L. kefir* presentan una gran heterogeneidad entre ellas (Mobili et al. 2009). El grupo de trabajo, a la fecha, ha logrado secuenciar los aminoácidos de 16 de las 25 cepas disponibles en el laboratorio, observando diferencias en las mismas sobre todo a nivel de la región C-terminal (Malamud et al. 2017). En base a la secuencia aminoacídica, estas SLP se clasificaron en 5

grupos: uno en el que se agrupan las SLP de todas las cepas con capacidad autoagregante, y otros 4 en los que se encuentran cepas sin esta capacidad (Malamud et al. 2017).

Del análisis de la composición y estructura de los residuos glicosídicos, se ha demostrado que hay 2 cepas, *L. kefir* CIDCA 83111 y JMC 5818, con coexistencia de O- y N-glicanos (Cavallero et al. 2017, Malamud 2019), mientras que las cepas *L. kefir* CIDCA 8321 y 8348 (ambas autoagregantes) solo presentan O-glicanos (Malamud et al. 2020).

En relación a las funciones que podrían llevar a cabo las SLP de *L. kefir*, se ha demostrado que median la inhibición de la invasión de *Salmonella Enteritidis* a células Caco-2 (Golowczyc et al. 2007), el antagonismo de las toxinas de *Clostridium difficile* sobre células Vero (Carasi et al. 2012), y la interacción de *L. kefir* con levaduras (Golowczyc et al. 2009). También, se ha demostrado que las SLP participan en la adhesión de *L. kefir* al mucus gastrointestinal (Carasi et al. 2014), y protegen a las bacterias contra el efecto dañino del ión Pb^{+2} (Gerbino et al. 2015).

En los últimos años, el grupo de trabajo ha demostrado 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, las SLP de la cepa CIDCA 8348 muestran capacidad adyuvante sobre la respuesta inmune celular, al ser inoculadas por vía subcutánea junto con el antígeno (Malamud et al. 2019). La SLP de *L. kefir* CIDCA 8348 es internalizada por macrófagos murinos (RAW 264.7), y potencia la respuesta celular al LPS, observándose un incremento en la expresión de MHC-II, CD86 y CD40 en comparación con células estimuladas con LPS solo. Asimismo, se observaron efectos similares en la expresión y secreción de IL-6, IL-10 y TNF- α . Esta actividad inmunoestimuladora sobre células RAW 264.7, también fue corroborada en otras SLP de *L. kefir* (SLP-8321, SLP-83111 y SLP-5818) y, además, esta actividad es dependiente de la interacción de sus glicanos con distintos receptores de lectina tipo C (CLRs), entre los que se ha identificado a Mincle (Malamud et al. 2019) y DC-SIGN (Malamud et al. 2020).

Recientemente, se ha logrado obtener arreglos regulares de nanopartículas de Pt y Ag soportados sobre SLP de *L. kefir* en solución (Bolla et al. 2020a,b) y sobre sistemas poliméricos recubiertos con SLP de *L. kefir* (Huggias et al. 2020), que presentan alta actividad catalítica en la reacción de reducción del p-nitrofenol.

Considerando todo lo mencionado anteriormente, conjeturamos que las SLP de *L. kefir* tienen un alto potencial para el desarrollo de adyuvantes vacunales y de plataformas de inmovilización de partículas metálicas. En este sentido, y teniendo como objetivo a largo plazo la administración de SLP de *L. kefir* en humanos, consideramos que es necesario primero lograr la adaptación de los métodos de extracción para la obtención de SLP para que la misma sea apta en la realización de futuros ensayos clínicos. Al respecto, Sahay y colaboradores emplearon NaCl 5M en lugar de LiCl 5M para la extracción de la SlpA 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).

Por lo tanto, en el marco de este trabajo final de la carrera de Bioquímica, se propuso como objetivo lograr la optimización de un método de extracción alternativo, reemplazando el LiCl 5M por NaCl 5M, para la obtención de SLP de distintas cepas de *L. kefir* y la caracterización de los extractos obtenidos.

2.Objetivos

Los objetivos específicos de este trabajo fueron los siguientes:

- A- Optimizar el método de extracción de SLP de diferentes cepas de *L. kefir* con NaCl 5M.
- B- Comparar el rendimiento del proceso de extracción con NaCl 5M con el método utilizado en el laboratorio (LiCl 5M).
- C- Caracterizar el perfil de proteínas presentes en los extractos obtenidos y evaluar su actividad inmunomoduladora sobre la activación de macrófagos murinos.

3. Materiales y métodos

3.1 Material biológico

En el proceso de este trabajo se emplearon los siguientes materiales biológicos para los distintos ensayos llevados a cabo:

- Cepas de *L. kefir*: disponibles en el laboratorio (CIDCA 8343, 8348, 83111 y 83113 aisladas de gránulos de kefir; JCM 5818 de colección).

Tabla 1, características de las SLP de las cepas de *L. kefir* utilizadas en este trabajo.

Grupo	Cepa	PM aparente** (kDa)	pI	PM calculado (kDa)	Longitud (total de aminoácidos)	% aminoácidos hidrofóbicos	% aminoácidos con grupos hidroxilos
I	8348*	66	9,60	57,039	542	38,4	27,9
II	83111	71	9,52	59,939	568	34,9	29,2
III	8343	71	9,53	59,958	564	36,5	26,9
IV	83113	66	9,57	51,490	492	37,1	26,4
V	5818	69	9,37	57,665	547	36,5	24,6

*cepa con capacidad autoagregante (Garrote et al. 2004).

**peso molecular aparente obtenido de la migración en SDS-PAGE (Garrote et al. 2004, Mobili et al. 2009).

Todas las cepas presentan glicosilación en las SLP (Mobili et al. 2009, Malamud 2019).

- Células eucariotas: RAW 264.7. Línea celular monocito-macrófago de origen murino (cepa BALB/c), como modelo de célula presentadora de antígenos. Adquiridas del banco de células IMBICE (Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, La Plata) y actualmente disponible en el laboratorio.

- LPS (0.1 µg/ml) de *Escherichia coli* O111:B4, Sigma, EEUU.
- Antisuero de conejo anti-SLP 21, obtenido mediante la inmunización con SLP de la cepa 8321. En estudios previos se demostró que dicho antisuero reconoce las SLP de las cepas utilizadas en este trabajo en ensayos previos.

3.2 Condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo de las células utilizadas para los ensayos fueron las siguientes:

- Cepas de *L. kefir* para la obtención de las SLPs: se incubaron durante 48hs a 37°C en condición aeróbica, en caldo MRS (Difco, USA). El medio de cultivo utilizado fue esterilizado por calor húmedo, en autoclave, a 1 atmósfera de sobrepresión por 15 minutos. Se tomaron 50 µl de suspensión bacteriana, conservada en leche descremada estéril a -80°C, y se sembraron en 5 ml de caldo MRS, en las condiciones pre mencionadas. De dicho cultivo se tomaron 500 µl y se incubaron nuevamente en 50 ml de caldo MRS en iguales condiciones.
- Células eucariotas: Las células RAW 264.7 se cultivaron en medio DMEM (tabla 2) suplementado con suero fetal bovino al 10%, aminoácidos no esenciales y antibióticos (penicilina-estreptomicina), esterilizado por filtración (0.22 µm, Steritop™, Millipore), en estufa (Thermo Forman 3310 SteriCult CO₂ incubator) gaseada (CO₂ 5%) a 37°C, durante 72 hs.

Tabla 2, composición del medio DMEM utilizado

Ingredientes	DMEM suplementado
DMEM^a	1 sobre
Penicilina/estreptomicina^b (1000 UI, 1000µg/mL)	13 ml
Aminoácidos no esenciales^c	13 ml
NaHCO₃	2.0 g
Suero fetal bovino inactivado^d	120 ml
Agua miliQ	100 ml
pH	7,5±0,1

^aDulbecco Modified Eagle's Medium, GIBCO, Grand Island N.Y., USA; ^bGIBCO; ^cNon-essential amino acids solution (100X), GIBCO; ^dGIBCO, El suero fue inactivado térmicamente, incubándolo 30 minutos a 65 °C.

3.3 Extracción de SLPs de las distintas cepas de *L. kefir* utilizadas.

La extracción de las SLPs de las cepas de *L. kefir* seleccionadas se llevó a cabo mediante dos protocolos diferentes, partiendo para ambos casos de 50 ml de cultivo, de cada cepa, en las condiciones mencionadas en el punto 3.2. El cultivo en fase estacionaria se fraccionó en dos alícuotas de 25 ml cada una y se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 25 ml de PBS. Finalmente, se resuspendieron los pellets del segundo lavado en los distintos agentes de extracción utilizados.

3.3.1 Extracción con LiCl 5M

Se utilizó como método de referencia de acuerdo al protocolo puesto a punto en el laboratorio por Malamud (Malamud et al 2017) para la extracción de las SLP de *L. kefir*.

Se resuspendieron los pellets bacterianos obtenidos a razón de DO=25, en 5 ml de LiCl (JT Baker) 5M y se agitó en vortex durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente, finalmente el sobrenadante

se dializó usando una membrana de celulosa (SpectraPor membrane tube, MWCO 10000-14000, Spectrum Medical Industries, California, USA) con agitación suave durante 24 horas contra 2 litros de PBS (2 cambios de 1 litro cada uno) a temperatura ambiente.

3.3.2 Extracción con NaCl 5M

Se planteó, como objetivo de este trabajo, poner a punto este método de extracción de las SLP de *L. kefir*, tomando como referencia las condiciones experimentales previamente descritas por Sahay y colaboradores (2015) para *L. acidophilus*.

Se realizó la extracción con 5 ml de NaCl 5M, siguiendo los mismos pasos que se mencionaron en el punto anterior para el LiCl 5M, la única variante en este caso es el agente de extracción utilizado. También se realizó una segunda extracción con NaCl 5M modificando el tiempo de agitación a 30 minutos.

3.4 Caracterización de los extractos obtenidos

Los extractos obtenidos con los distintos agentes y los distintos protocolos llevados a cabo, se analizaron por SDS-PAGE (Laemmli 1970) y por Western blot, y la concentración de proteínas totales obtenidas se determinó por el método de Bradford (1976). También se analizó la capacidad inmunoestimuladora de las SLP obtenidas mediante la cuantificación de IL-6 en el sobrenadante de cultivo de células RAW264.7 (en ausencia y presencia de LPS) por ensayo de ELISA de captura no competitivo.

3.4.1 Cuantificación de proteínas totales extraídas

Para determinar la concentración de proteínas totales de los extractos obtenidos de cada cepa, tanto con LiCl 5M como con NaCl 5M, se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). Se realizó una curva de patrón utilizando un stock comercial de albumina bovina de 2 mg/ml (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit), y reactivo de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250 en etanol al 95% (v/v), ácido fosfórico 85% (v/v) y agua

destilada). Se leyó la absorbancia a 620 nm en un lector de absorbancia (TECAN INFINITE® F50, Austria).

3.4.2 Separación electroforética de proteínas mediante SDS-PAGE

Para caracterizar cada extracto dializado, se utilizó la técnica SDS-PAGE desarrollada por Laemmli (1970). Los geles se prepararon con una concentración de acrilamida de 12% p/v para el gel separador y 4% p/v para el gel apilador (Manns 2011). Se utilizaron 20 µl de muestra en 10 µl de buffer muestra (azul de bromofenol, glicerol, SDS) y se sembraron de esta 20 µl en cada calle. Las corridas electroforéticas se realizaron a voltaje constante (120 V) hasta la llegada del frente de corrida al extremo opuesto del gel, en un sistema vertical Bio-Rad Mini Protean III (BioRad Lab, C.A.). Simultáneamente se sembraron 4 µl de marcadores de peso molecular (*Blue Plus*® IV Protein Marker, 10-80 kDa, Trans, China).

Revelado

Se utilizó la técnica de tinción con Coomassie coloidal. Una vez finalizada la corrida se siguieron los pasos citados a continuación:

- 1- Se colocó el gel en agitación por 30 minutos en la solución de fijación 1.
- 2- Se colocó el gel en agitación por 20 minutos con 100 ml de solución de fijación 2. Se descartó y se repitió el paso.
- 3- Se colocó el gel en la solución de coloración durante 30 minutos, en agitación, y luego se agregó 1 ml de Coomassie G250 2% p/v. Se mantuvo en agitación toda la noche.
- 4- Al día siguiente, se lavó con agua destilada y se visualizaron las bandas.

Tabla 3, Composición de las soluciones utilizadas para el revelado del gel de SDS-PAGE

Solución	Ingredientes	Volumen final
Fijación 1	30 ml de etanol absoluto 2 ml de ácido fosfórico 85 % p/p	100 ml
Fijación 2	4 ml de ácido fosfórico 85 % p/p	200 ml
Coloración	18 ml de etanol absoluto 7 ml de ácido fosfórico 85 % p/p 15 g de (NH ₄) ₂ SO ₄	100 ml
Coomasie G250	1 g de Coomasie G250	50 ml

3.4.3 Western blot

Para confirmar la presencia de SLP en el extracto obtenido se llevó a cabo un ensayo de inmunoblotting con el antisuero de conejo anti-SLP 21 obtenido mediante inmunización años atrás. Estos anticuerpos han demostrado, en ensayos previos, reconocer las SLP de todas las cepas utilizadas en este trabajo (Serradell et al. 2005). Se realizó la separación electroforética de las proteínas en iguales condiciones que las ya mencionadas (punto 3.4.2). Una vez finalizada la corrida electroforética se hizo una electrotransferencia de las bandas proteicas del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa utilizando el equipo Mini Trans-Blot System (Bio-Rad), a corriente constante de 250 mA, durante 90 minutos. Finalizada la electrotransferencia, las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con Rojo Ponceau para verificar que las proteínas fueron transferidas. Este colorante tiñe reversiblemente las proteínas, por lo que luego se removió con lavados con agua destilada. Una vez removido el colorante, se bloqueó la membrana con leche descremada 3% en PBS por 16 horas a 4°C. Finalmente se llevó a cabo la reacción inmunoquímica de revelado siguiendo los pasos detallados a continuación:

- Anticuerpo primario: antisuero de conejo anti-SLP 8321 diluido 1/100 en leche descremada 1% en PBS; 1 hora a 37°C.

- Lavados con PBS más Tween 20 0.05%.
- Anticuerpo secundario: anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotech, USA) diluido 1/2000 en leche descremada 1% en PBS; 1 hora a 37°C.
- Lavados con PBS más Tween 20 0.05%.
- Revelado: NTB/BCIP (Sigma, USA), 1 comprimido disuelto en 10 ml de agua destilada.

Tabla 4, Soluciones utilizadas para realizar la electrotransferencia

Denominación	Ingredientes	Volumen final
Buffer de transferencia 5X (sin metanol)	15,03 g de TRIS 73,05 g de glicina pH= 8,3	1000 mL
Buffer de transferencia 1X Tris 0,025M, glicina 0,195M, metanol 20% v/v	200 mL Buffer de transferencia 5X 200 mL de methanol completar con agua MilliQ hasta volumen final	1000 mL
Rojo Ponceau 0,5% p/v	0,5 g de rojo ponceau 5,0 mL de ácido acético glacial completar con agua MilliQ hasta volumen final	100 mL

3.5 Evaluación de la capacidad inmunoestimuladora

Se realizó un ensayo de ELISA para la cuantificación de IL-6 en el sobrenadante de cultivo de células RAW 264.7 que fueron estimuladas con LPS de *Escherichia coli* y SLP obtenidas

de las distintas cepas de *L. kefir*. Para ello se llevaron a cabo los ensayos detallados en los puntos a continuación.

3.5.1 Cultivo de células eucariotas

Las células RAW 264.7, cultivadas durante 72 horas en las condiciones mencionadas en el punto 3.2, se cosecharon con pipeta de 10 ml raspando la base de la botella de cultivo para despegar las células y obtener una suspensión en el medio líquido utilizado. Este proceso fue realizado en cabina de seguridad biológica tipo II (Jouan MSC 12). De los 5 ml de cultivo cosechado, se tomaron 20 μ l y se diluyeron al medio con colorante vital azul de tripán, el cual colorea aquellas células que tienen su membrana celular dañada, y nos permite contar en cámara de Neubauer células vivas que no se tiñeron. Una vez obtenido el recuento de células por ml de cultivo, se realizó una dilución 1/20 para lograr una concentración de 4×10^4 células/ml. De esta dilución se sembraron 3 gotas (0.25 ml) por fosa en placa de cultivo de 48 fosas (Nest Biotechnology Co., Ltd. China) y se incubaron por 48 horas a 37°C, en estufa gaseada (CO₂ 5%). Pasado este tiempo se observaron las células con microscopio invertido (Iriscope Si-PH) para verificar que las características celulares sean las deseadas (baja proporción de células con aspecto morfológico de activación) y se realizó el ensayo de activación celular.

3.5.2 Ensayo de activación celular

Se realizaron todos los pasos en condición de esterilidad en cabina de seguridad con flujo laminar (Jouan MSC 12), y los extractos de SLP dializados se esterilizaron previamente por filtración con filtro de 0.22 μ m de diámetro de poro (Steritop, Millipore).

Como primer paso, se eliminó por extracción con pipeta todo el medio de cultivo de cada fosa. Luego se agregó en cada fosa el volumen de medio DMEM calculado para obtener un volumen final de 250 μ l en cada una, y una concentración final de SLP de 10 μ g/ml. Se utilizaron 4 fosas por extracto de SLP, 2 para estímulo con las SLP solas y 2 con SLP más LPS (0.1 μ g/ml). Además, se incubaron 2 fosas control negativo con medio DMEM, y 2 fosas

control positivo con medio más LPS. Se incubaron 24 horas en estufa gaseada (CO₂ 5%) a 37°C.

Tabla 5, volumen de cada componente por fosa

Fosa^a	DMEM μl	LPS^b μl	SLP μl
5818 NaCl	200		50
5818 NaCl	200	2.5	50
8343 NaCl	200		50
8343 NaCl	200	2.5	50
8348 NaCl	200		50
8348 NaCl	200	2.5	50
83111 NaCl	215		35
83111 NaCl	215	2.5	35
83113 NaCl	200		50
83113 NaCl	200	2.5	50
5818 LiCl	200		50
5818 LiCl	200	2.5	50
8343 LiCl	225		25
8343 LiCl	225	2.5	25
8348 LiCl	225		25
8348 LiCl	225	2.5	25
83111 LiCl	242		8
83111 LiCl	242	2.5	8
83113 LiCl	230		20
83113 LiCl	230	2.5	20
Control +	250	2.5	
Control -	250		

^a cada una por duplicado.

^b no considerado en el volumen final.

3.5.3 Cuantificación de IL-6

Se realizó un ELISA de captura no competitivo para la cuantificación de IL-6 de los sobrenadantes de cada fosa de la placa de activación celular. Para ello se utilizó un kit comercial para detección de IL-6 de ratón (Mouse IL-6 ELISA Set, BD OptEIA, San Diego, EEUU), lector de absorbancia (TECAN INFINITE® F50, Austria), y placas Microlon 600 (GBO, Alemania) de 96 pocillos. Se siguieron los siguientes pasos:

- 1- Sensibilización de la placa con anticuerpos de captura 1/250 en buffer carbonato/bicarbonato, se colocaron 50 µl por pocillo, y se dejaron toda la noche en heladera.
- 2- Se realizaron 3 lavados con PBS y tween 20 al 0.05%.
- 3- Bloqueo con suero fetal bovino al 10% en PBS, 100 µl por pocillo, 1 hora a temperatura ambiente.
- 4- 3 lavados.
- 5- Muestra, 50 µl de sobrenadante, 2 horas a temperatura ambiente. También se realizó curva de calibración con distintas concentraciones del estándar provisto por el kit, en iguales condiciones que la muestra incógnita.
- 6- 3 lavados.
- 7- Anticuerpo de detección biotinilado (1/250) más conjugado de estreptavidina con HRP (1/500), 50 µl por fosa, 1 hora temperatura ambiente.
- 8- 5 lavados.
- 9- Sustrato 50µL (OPD Sigma 2 mg/ml, H₂O₂ 100 vol 1 µl/ml, buffer citrato pH 5). 30 minutos a temperatura ambiente.
- 10- Solución stop, 50 µl ácido sulfúrico 2N.
- 11- Lectura en lector de placa a 490 nm.

3.6 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar, y para la evaluación estadística se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un post-test de Tukey de comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$). Todos los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism, versión 7.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego USA).

4.0 Resultados y discusión

4.1 Extracción de proteínas de capa S de *L. kefir*

Considerando el objetivo del trabajo, y tal como se mencionó anteriormente (sección 3.3), las SLP de las diferentes cepas de *L. kefir* fueron extraídas con NaCl 5M y con LiCl 5M. La primera extracción se realizó incubando las bacterias enteras durante 10 minutos, en agitación. El rendimiento en cantidad de proteína total extraída fue cuantificado empleando el método de Bradford (sección 3.4.1) y una curva de calibración con seroalbúmina bovina (Figura 4).

Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 6 y 7. Allí puede observarse que, habiendo incubado 10 minutos en agitación a temperatura ambiente, el rendimiento de la extracción con NaCl 5M es menor que el de la extracción con LiCl 5M para todas las cepas estudiadas. Incluso, para la cepa *L. kefir* CIDCA 83113, el nivel de proteína extraída no fue detectable.

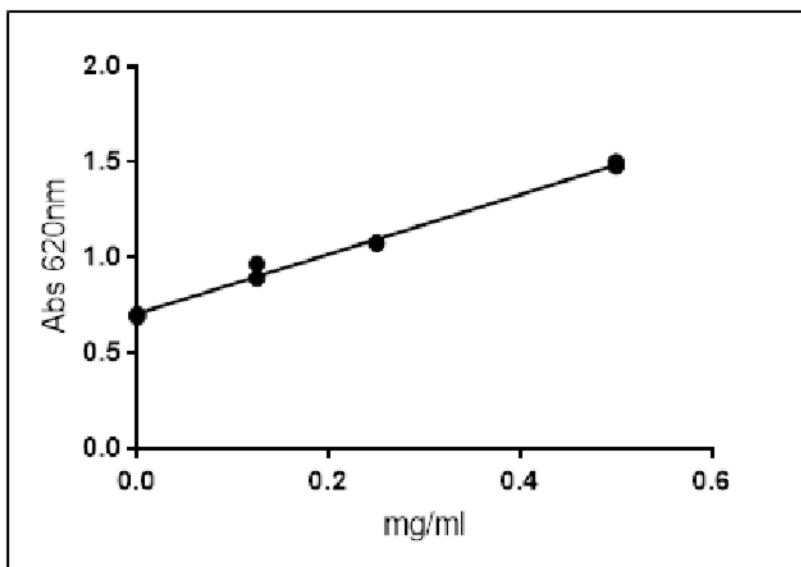


Figura 4. Gráfico de la curva estándar de proteínas stock comercial de albumina bovina de 2 mg/ml.

Tabla 6, concentración de proteínas obtenidas de la extracción con NaCl 5M, con agitación por 10 minutos para las cepas de *L. kefir* estudiadas.

NaCl 5M	Abs 620 nm		µg/ml		Promedio µg/ml
5818	0,716	0,711	6,9	3,7	5,3
8343	0,716	0,714	6,9	5,6	6,2
8348	0,722	0,723	10,7	11,3	11,0
83111	0,839	0,837	85,7	84,4	85,0
83113	0,683	0,688	ND*	ND*	ND*

Tabla 7, concentración de proteínas obtenidas de la extracción con LiCl 5M, con agitación por 10 minutos para las cepas de *L. kefir* estudiadas.

LiCl 5M	Abs 620 nm		µg/ml		Promedio µg/ml
5818	0,822	0,756	74,9	32,5	53,7
8343	0,869	0,859	105,0	98,6	101,8
8348	0,869	0,886	105,0	115,9	110,5
83111	1,219	1,224	329,5	332,7	331,1
83113	0,944	0,924	153,1	140,3	146,7

*No detectable.

Teniendo en cuenta este resultado, decidimos realizar una segunda extracción con NaCl 5M, pero aumentando el tiempo de contacto con el agente caotrópico a 30 minutos y manteniendo la agitación. Los resultados obtenidos para la curva de calibración se muestran en la Figura 5. Esta segunda extracción con mayor tiempo de agitación nos muestra un importante aumento en la concentración de proteínas obtenidas (Tabla 8), salvo en el caso de la cepa 83111 para la cual se obtuvieron resultados similares con ambos protocolos. También se puede observar que en este caso se pudieron cuantificar proteínas en el extracto de la cepa 83113, a diferencia de lo ocurrido en el extracto de 10 minutos de agitación.

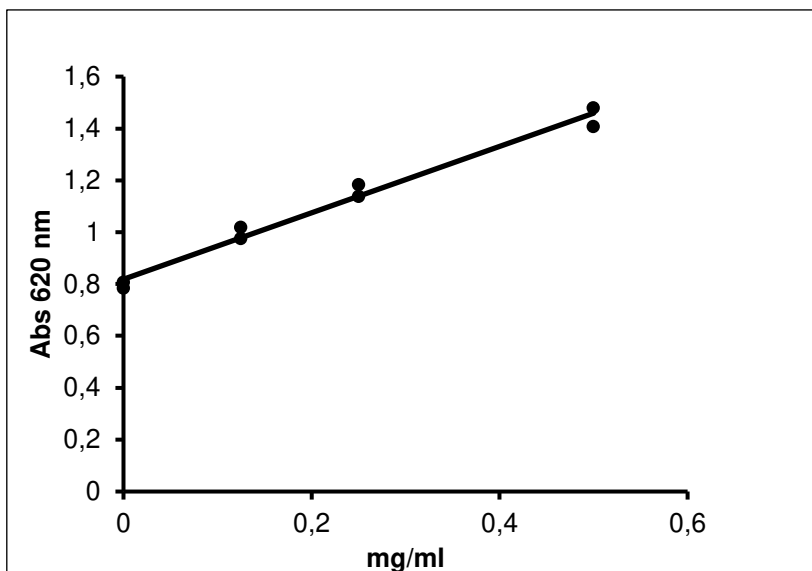


Figura 5, Gráfico de la curva estándar de proteínas stock comercial de albumina bovina de 2 mg/ml.

Tabla 8, concentración de proteínas obtenidas de la extracción con NaCl 5M, con agitación por 30 minutos.

NaCl 5M	Abs 620 nm		ug/ml		Promedio µg/ml
5818	0,8907	0,8734	55,5	42,2	48,9
8343	0,8886	0,8073	53,9	ND	53,9
8348	0,9092	0,9219	69,8	79,5	74,7
83111	0,9123	0,9483	72,2	99,8	86,0
83113	0,9085	0,931	69,2	86,5	77,9

Basados en los datos obtenidos en esta primera etapa del análisis de los extractos (figura 6), vimos que utilizando NaCl 5M por 10 minutos se consigue extraer proteínas en la mayoría de las cepas, y que aumentando el tiempo de extracción el rendimiento mejora. Aun así, en la mayoría de los casos no se alcanza la concentración de proteínas obtenidas con LiCl 5M, salvo el caso de la cepa 5818 para la cual se obtuvieron concentraciones similares con el tratamiento de NaCl 5M por 30 minutos. Por otro lado, la cepa 83111 fue la que mostró

mayor rendimiento de extracción respecto de las otras cepas, independientemente del protocolo utilizado.

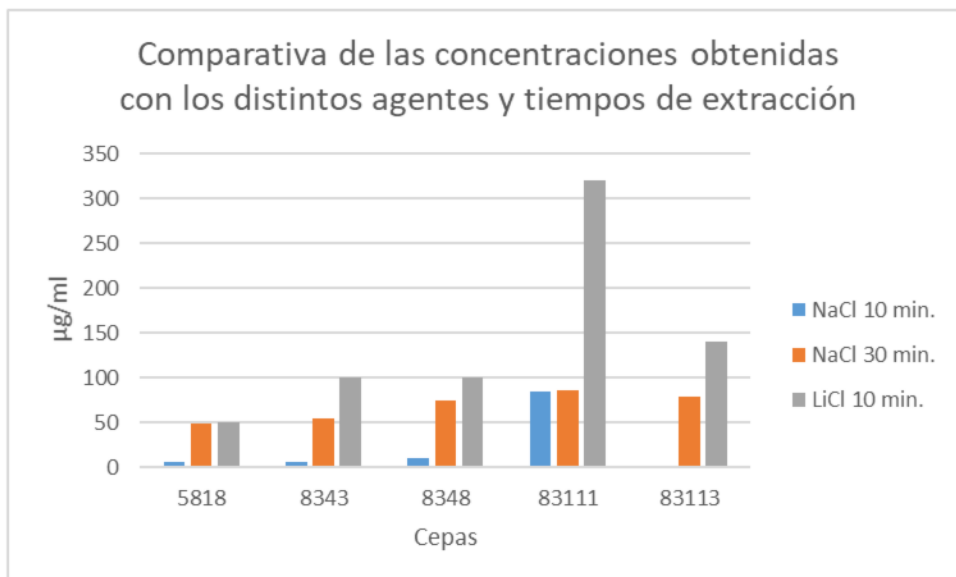


Figura 6, gráfico comparativo entre las distintas concentraciones de proteínas obtenidas con el método de Bradford, según el agente de extracción y tiempo de agitación.

4.2 Caracterización de los extractos

4.2.1 SDS-PAGE

Se realizaron 2 corridas electroforéticas, la primera para los extractos de 10 minutos con NaCl y LiCl 5M (figuras 7 y 8), y la segunda para los extractos de 30 minutos (figura 9).

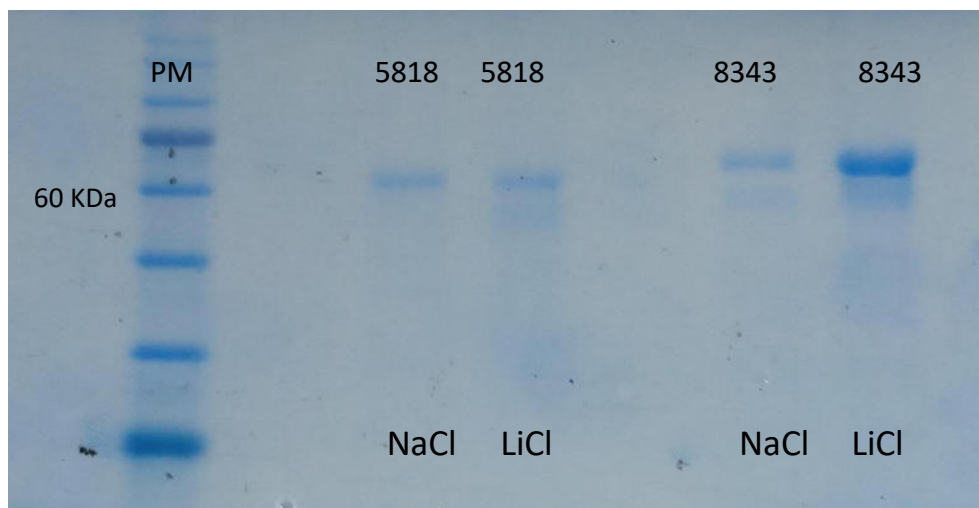


Figura 7, SDS-PAGE de extractos obtenidos con NaCl y LiCl 5M con 10 minutos de agitación de las cepas 5818 y 8343. PM: marcadores de peso molecular.

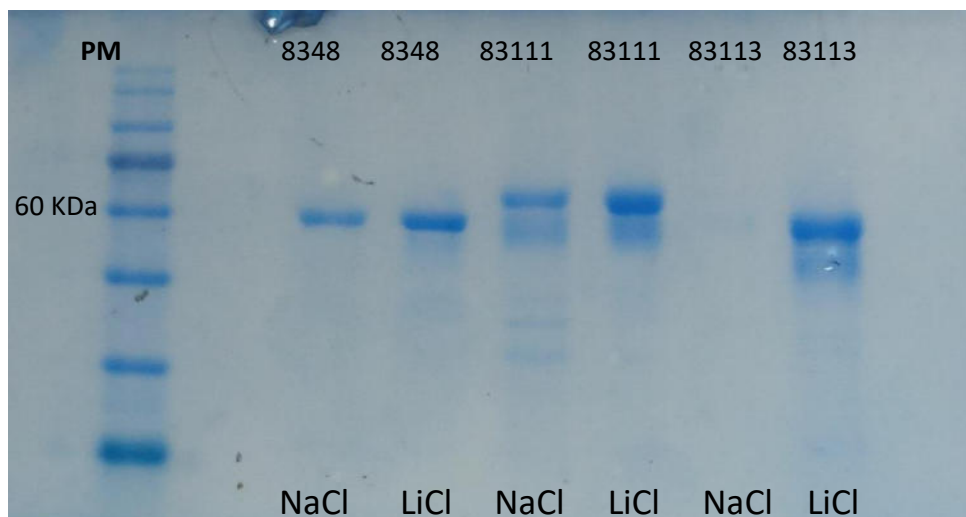


Figura 8, SDS-PAGE de extractos obtenidos con NaCl y LiCl 5M con 10 minutos de agitación de las cepas 8348, 83111 y 83113. PM: marcadores de peso molecular.

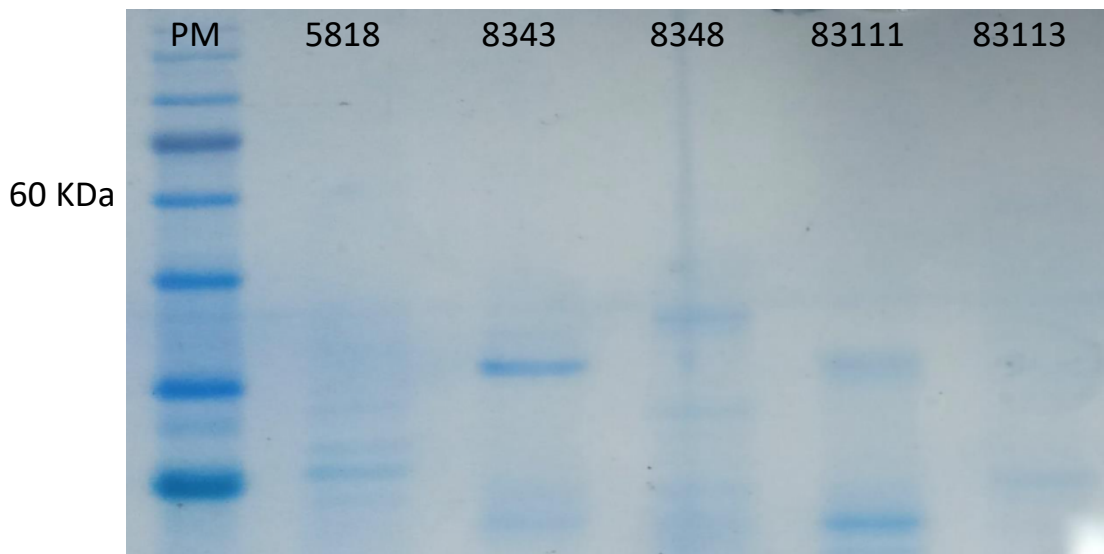


Figura 9, SDS-PAGE de extractos obtenidos con NaCl 5M con agitación por 30 minutos de las cepas 5818, 8343, 8348, 83111 y 83113. PM: marcadores de peso molecular.

La electroforesis de los extractos de 10 minutos (figura 7 y 8) revelaron, en cada caso, una banda con un peso molecular aparente entre 60 y 70 KDa. En algunos casos, y particularmente en las cepas 8343, 83111 y 83113, se revelaron algunas otras bandas de menor intensidad y de menor peso molecular. Estos resultados son congruentes con los obtenidos previamente por el grupo de trabajo (Mobili et al. 2009, Malamud et al. 2017), y podrían atribuirse a productos de degradación de las SLP. También se pudo apreciar una sutil banda en la calle correspondiente al extracto de la cepa 83113 con NaCl 5M, para la cual el método de Bradford no detectó proteína.

Sin embargo, los resultados arrojados por la electroforesis de los extractos de 30 minutos (figura 9) no reflejaron la misma congruencia; en este caso vimos múltiples bandas poco definidas con pesos moleculares menores a 60 KDa para todas las cepas. Es posible que el tratamiento con NaCl 5M con 30 minutos de agitación resulte ser muy agresivo para las células bacterianas causando la lisis y liberación del contenido interno. De todas formas, si hubiese habido liberación del contenido celular, deberíamos ver además a las bandas correspondientes a las proteínas de capa S, pero no es lo que sucedió tampoco en un segundo ensayo (no mostrado). Por lo tanto, podríamos sospechar de algún tipo de actividad

proteolítica que podría explicar, al menos en parte, la no detección de las bandas correspondientes a las proteínas de capa S.

4.2.2 Western blot

Para evidenciar la presencia de SLP en los extractos de 10 minutos de tratamiento, se llevó a cabo un ensayo de Western blot con antisuero de conejo anti SLP de *L. kefir* cepa 8321, el cual demostró en trabajos previos reconocer las SLP de todas las cepas disponibles en el laboratorio.

Los resultados obtenidos revelaron la presencia de SLP en todos los extractos (figura 10), incluso en la cepa 83113 con NaCl 5M, para la cual no habíamos detectado proteínas por el método de Bradford y solo observamos una sutil banda en la electroforesis. Esta aparente discrepancia se debe a la mayor sensibilidad de la prueba inmunoquímica respecto de los métodos de detección de proteínas utilizados.

Además de las bandas correspondientes a las SLP se observó un chorreado en la mayoría de las calles. Esto podría atribuirse a:

- a la utilización de una dilución baja del antisuero, lo que podría favorecer la visualización de reacciones cruzadas con otros componentes presentes en los extractos;
- a la existencia de productos de degradación de las SLP en los diferentes extractos que son reconocidos por los anticuerpos específicos presentes en el suero de conejo.

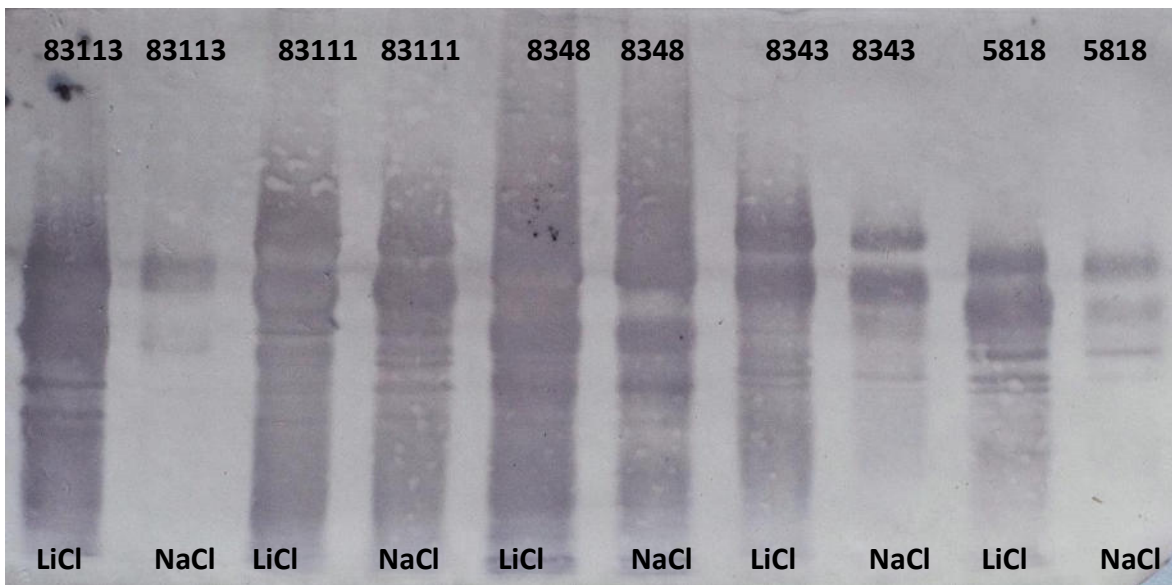


Figura 10, Western blot de los extractos tratados por 10 minutos con NaCl y LiCl 5M.

4.2.4 Activación de macrófagos murinos

Como se mencionó anteriormente, en trabajos previos realizados en el laboratorio se observó que las SLP de las cepas de *L. kefir* CIDCA 8321, 8348, 83111 y JCM 5818 extraídas con LiCl 5M potenciaron la activación de células RAW 264.7 inducida por LPS. Además, se demostró que esta actividad es dependiente de la interacción de los glicanos presentes en las SLP con diferentes CLR, entre los que se identificó a Mincle (para las SLP-8321 y SLP-8348), y DC-SIGN (para la SLP-5818) (Malamud et al. 2018, 2019, 2020). El efecto sinérgico observado se debe a la estimulación simultánea de la célula a través de un ligando TLR (como el LPS) y un ligando CLR (como las SLP de *L. kefir*).

Por lo tanto, nos propusimos evaluar si esta actividad se mantiene cuando el agente de extracción es el NaCl 5M. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de activación celular de células RAW 264.7 que fueron analizados por la cuantificación de IL-6 con el método de ELISA. Se evaluó la producción de IL-6 en sobrenadante de células estimuladas solo con SLP y células estimuladas con LPS de *E. coli* más SLP, incluyendo los controles sin estímulo (DMEM) y solo con LPS.

Los resultados obtenidos para ambos agentes de extracción se muestran en la figura 11 A y B.

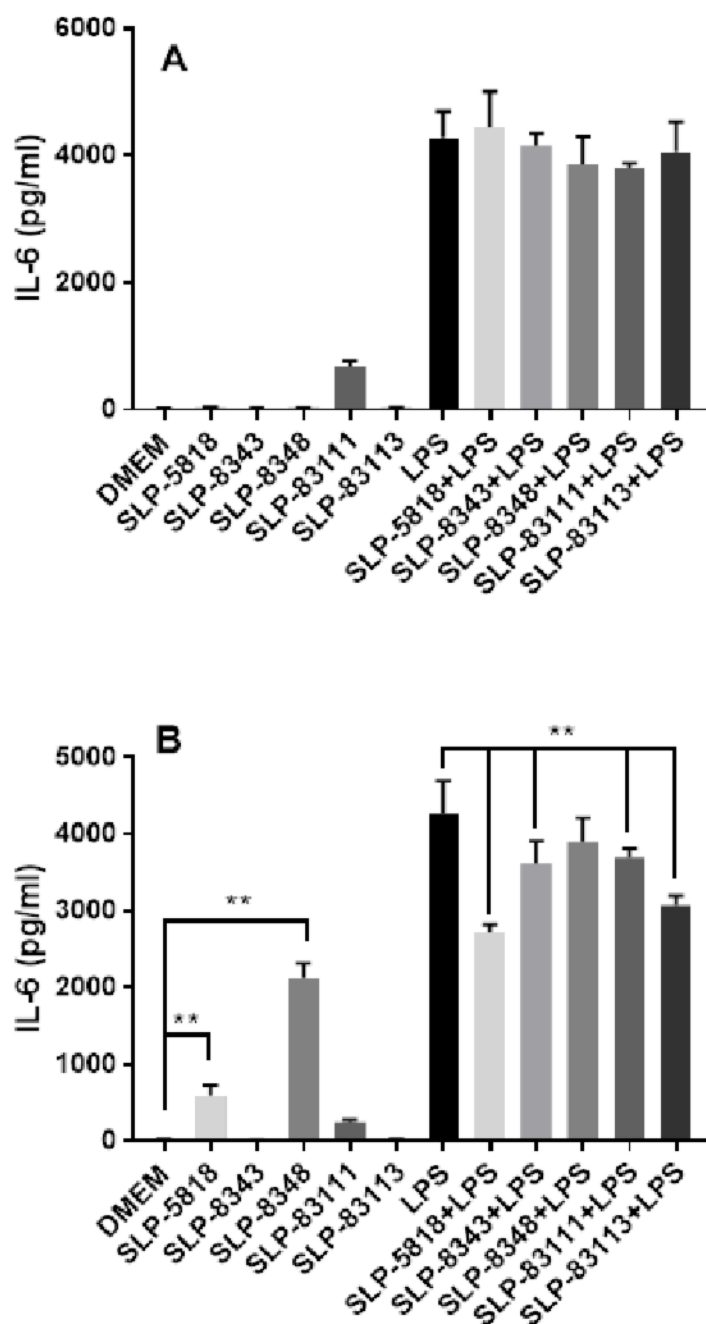


Figura 11. Concentración de IL-6 en el sobrenadante de células Raw264.7 luego de 24 hs de incubación con extractos de SLP obtenidos con LiCl 5M (A) o NaCl (B) (10 µg/ml), en ausencia o presencia de LPS (0,1 µg/ml). Resultados representativos de al menos 3 experimentos independientes. **P<0,01

Los resultados obtenidos con los extractos de LiCl 5M, coinciden parcialmente con los reportados previamente por el grupo de trabajo, ya que, si bien no se observó un aumento significativo de la secreción de IL-6 al estimular con las SLPs solas (solo una tendencia, estadísticamente no significativa con la SLP-83111), el estímulo con el LPS indujo una respuesta muy potente y no fue posible observar el efecto sinérgico (figura 11A). Esto podría deberse a un error cometido en la preparación de la solución stock de LPS a partir de la cual se obtuvieron las diluciones de trabajo, lo cual condujo a una saturación de la respuesta celular.

Por otro lado, los resultados obtenidos con los extractos de NaCl fueron diferentes. En este caso, se observó un aumento significativo de la secreción de IL-6 ($P < 0,01$) para las SLP-5818 y SLP-8348, mientras que los extractos de SLP-8343, SLP-83111 y SLP-83113 no indujeron activación de las células RAW264.7. Asimismo, se observó una disminución del nivel de IL-6 secretada al co-incubar las células con LPS y las SLP de *L. kefir* extraídas con NaCl 5M ($P < 0,01$), con excepción de la SLP-8348 (figura 11B). Si bien este efecto no había sido observado en ninguno de los ensayos realizados con anterioridad en el laboratorio, ha sido descrito para otras SLP. En particular, se ha reportado que una SLP de 46 kDa de *Lactobacillus acidophilus* NCFM atenuó la producción de IL-1 y TNF- α en células RAW264.7 estimuladas con LPS (Wang et al. 2018), y un efecto similar fue también demostrado para la proteína de capa S (SlpA) de *Lactobacillus helveticus* MIMLh5 sobre la respuesta proinflamatoria generada por el LPS en macrófagos humanos U937 (Taverniti et al. 2013).

Las diferencias en los resultados obtenidos con ambos agentes de extracción podrían deberse a diferencias en la composición del extracto de NaCl 5M respecto del obtenido con LiCl 5M o bien a cambios conformacionales de las SLP extraídas con las diferentes sales, lo cual podría llevarlas a interactuar de distinta manera con los receptores celulares, o incluso a ser reconocida por diferentes CLR. Por lo tanto, se deberán realizar estudios para caracterizar más profundamente los extractos de NaCl 5M y contrastar estas hipótesis.

Conclusiones

Recolectando y analizando los resultados de los distintos ensayos realizados para cuantificar y caracterizar los extractos proteicos, llegamos a las siguientes conclusiones:

Referido al agente caotrópico, el NaCl 5M resultó ser un efectivo agente de extracción de SLP de *L. kefir*. Obtuvimos resultados positivos en cuanto a la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford para todas de las cepas, salvo para la cepa CIDCA 83113 para la cual no se pudo detectar proteínas por este método cuando el tiempo de contacto con el NaCl 5M fue de 10 minutos. Cuando aumentamos el tiempo de incubación con el agente a 30 minutos obtuvimos un rendimiento en cantidad de proteína total mucho mayor que con 10 minutos para todas las cepas, incluso para la cepa 83113. Aun así, no se llegó a la cantidad de proteína extraída con LiCl 5M. También se pudo observar que, independientemente del protocolo utilizado para la extracción, hay cepas de las cuales se pudo extraer mayor cantidad de SLP que otras, como es el caso de la cepa 83111 para la cual se obtuvo mayor rendimiento de extracción en todos los protocolos llevados a cabo.

En cuanto a la caracterización, en la SDS-PAGE de los extractos proteicos obtenidos con 10 minutos de tratamiento con NaCl 5M y LiCl 5M, se revelaron bandas bien definidas de peso molecular aparente entre 60 y 70 kDa que se relacionan con los pesos moleculares obtenidos previamente en el laboratorio (Mobili et al. 2009, Malamud et al. 2017), y que fueron reconocidas por anticuerpos específicos en el ensayo de Western blot. Algunas cepas revelaron una única banda y otras, en particular las cepas 8343, 83111 y 83113 revelaron además otras bandas de menor intensidad y peso molecular. Además, se pudo apreciar una sutil banda en la calle correspondiente a la cepa 83113 con NaCl 5M, para la cual no se detectó proteína por el método de Bradford. En el caso de la SDS-PAGE de los extractos de 30 minutos de tratamiento con NaCl 5M los resultados no fueron los esperados; se pudo observar un bandeo poco definido de menor peso molecular en todas las calles, y ausencia de la banda que representaría a las SLP.

Hasta aquí, concluimos en que el tratamiento con NaCl 5M durante 30 minutos con agitación resultaría muy dañino para la célula bacteriana, y que lo que posiblemente reflejan los resultados sea consecuencia de la lisis celular y liberación del contenido interno,

causando, además, la pérdida de las SLP por algún tipo de evento proteolítico. También consideramos que el tratamiento durante 10 minutos finalmente extrae proteínas de todas las cepas, y que la no detección en la cepa 83113 por el método de Bradford se debe a la menor sensibilidad del método respecto de la SDS-PAGE y el ensayo de Western blot.

Con respecto a los ensayos de activación realizados con la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7, los resultados obtenidos fueron diferentes al incubar las células con los extractos de SLP obtenidos con LiCl y NaCl, respectivamente. Considerando que es la primera vez que se utiliza el NaCl 5M como agente de extracción para las SLP de *L. kefir*, los resultados de activación en ausencia y presencia de LPS alientan a continuar con estos estudios y a profundizar la caracterización de los extractos obtenidos y de las SLP extraídas en dichas condiciones a partir de las diferentes cepas de *L. kefir*.

Bibliografía

Ahn JS, Chandramohan L, Liou LE, Bayles KW. Characterization of CidR-mediated regulation in *Bacillus anthracis* reveals a previously undetected role of S-layer proteins as murein hydrolases. (2006) *Mol Microbiol* 62: 1158-1169.

Anzengruber J, Pabst M, Neumann L, Sekot G, Heinel S, Grabherr R, Altmann F, Messner P, Schäffer C. Protein O-glycosylation in *Lactobacillus buchneri*. (2014) *Glycoconj J* 31: 117-131. doi: 10.1007/s10719-013-9505-7.

Avall-Jääskeläinen S, Palva A. *Lactobacillus* surface layers and their applications. (2005) *FEMS Microbiol Rev* 29: 511-529.

Bolla PA, Sanz A, Huggias S, Ruggera JF, Serradell MA, Casella ML **2020** Regular arrangement of Pt nanoparticles on S-layer proteins isolated from *Lactobacillus kefir*: synthesis and catalytic application. *Molecular Catalysis* 481 110262.

Bolla, P.A.; Serradell, M.A.; Casella, M.L.; Peruzzo, P.J. *Nanoarchitectonics Based on S-layer Proteins: Design of Noble Metal Nanoparticle. Arrangements and Nanostructured Materials*. Cap. 4 en: "Concepts and Design of Materials Nanoarchitectonics"; Omar Azzaroni and Katsuhiko Ariga, Eds The Royal Society of Chemistry 2022

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.

Calabi E, Ward S, Wren B, Paxton T, Panico M, Morris H, Dell A, Dougan G, Fairweather N. Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. (2001) *Mol Microbiol* 40, 5: 1187-1199.

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 Mde L **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.

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.

De la Fuente-Núñez C, Mertens J, Smit J, Hancock RE. The bacterial surface layer provides protection against antimicrobial peptides. (2012) *Appl Environ Microbiol* 78, 15: 5452-5456.

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

Garrote GL, Delfederico L, Bibiloni R, Abraham AG, Pérez PF, Semorile L, De Antoni GL. Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins. (2004) *J Dairy Res* 71: 222-230.

Gerbino, E, Carasi P, Araujo-Andrade C, Tymczynsyn 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.

Gilmour R, Messner P, Guffanti AA, Kent R, Scheberl A, Kendrick N, Krulwich TA. Two-dimensional gel electrophoresis analyses of pH-dependent protein expression in facultatively alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 lead to characterization of an S-layer protein with a role in alkaliphily. (2000) *J Bacteriol* 182, 21: 5969-5981.

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.

Houwink AL. A macromolecular mono-layer in the cell wall of *Spirillum spec.* (1953) *Biochim Biophys Acta* 10: 360-366. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(53\)90266-2](https://doi.org/10.1016/0006-3002(53)90266-2)

Howard L, Tipper DJ. A polypeptide bacteriophage receptor: modified cell wall protein subunits in bacteriophage-resistant mutants of *Bacillus sphaericus* strain P-1. (1973) *J Bacteriol* 113, 3: 1491-1504.

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 acidophilus* NCFM *Microbiology* **159** 2269-2282.

Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM, Bruijns SC, Singh SK, Valence F, Molle D, Lortal S, Altermann E, Klaenhammer TR, et al. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus*

NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105: 19474–19479. doi: 10.1073 / pnas.0810305105.

Kotiranta AK, Ito H, Haapasalo MP, Lounatmaa K. Radiation sensitivity of *Bacillus cereus* with and without a crystalline surface protein layer. (1999) FEMS Microbiol Lett 179, 2: 275-280.

Koval SF, Hynes SH. Effect of paracrystalline protein surface layers on predation by *Bdellovibrio bacteriovorus*. (1991) J Bacteriol 173,7: 2244-2249.

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

Lortal S, Vanheijenoort J, Gruber K, Sleytr UB. S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: isolation, chemical characterization, and re-formation after extraction with lithium chloride. (1992) J Gen Microbiol 138: 611–618.

Malamud M, Carasi P, Bronsoms S, Trejo SA, Serradell MA **2017** *Lactobacillus kefir* 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 Ca²⁺-dependent manner *Biochemical and Biophysical Research Communications* **495** 1227-1232.

Malamud M, Carasi P, Assandri MH, Freire T, Lepenies B, Serradell MA **2019** 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.

Manns J. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of Proteins. (2011) Curr Prot Microbiol, Appendix 3, 1–13. doi:10.1002 / 9780471729259.mca03ms22

McCarren J, Heuser J, Roth R, Yamada N, Martone M, Brahamsha B. Inactivation of *swmA* results in the loss of an outer cell layer in a swimming *Synechococcus* strain. (2005) *J Bacteriol* 187, 1: 224-230.

Messner P, Schäffer C, Kosma P. Bacterial cell-envelope glycoconjugates. (2013) *Adv Carbohydr Chem Biochem* 69: 209–272. doi: 10.1016/B978-0-12-408093-5.00006-X.

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.

Pavkov-Keller T, Howorka S, Keller W. The structure of bacterial S-layer proteins. (2011). *Prog Mol Biol Transl Sci* 103: 73-130.

Prado Acosta M, Mercedes Palomino M, Allievi MC, Sanchez Rivas C, Ruzal SM. Murein hydrolase activity in the surface layer of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. (2008) *Appl Environ Microbiol* 74: 7824-7827.

Pum D, Toca-Herrera JL, Sleytr UB. S-layer protein self-assembly. (2013) *Int J Mol Sci* 14, 2: 2484-2501.

Ristl R, Steiner K, Zarschler K, Zayni S, Messner P, Schäffer C. The S-layer glycome-adding to the sugar coat of bacteria. (2011) *Int J Microbiol* 127870. doi: 10.1155/2011/127870

Ryan A, Lynch M, Smith SM, Amu S, Nel HJ, McCoy CE, Dowling JK, Draper E, O'Reilly VO, McCarthy C, O'Brien J et al. A role for TLR4 in *Clostridium difficile* infection and the recognition of surface layer proteins. (2011) *PloS Pathog* 7, 6: e1002076.

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.

Schuster B, Sleytr UB. Nanotechnology with S-layer proteins. (2013) *Methods Mol Biol* 2073: 195-218.

Sekot G, Posch G, Messner P, Matejka M, Rausch-Fan X, Andrukhov O, Schäffer C. Potential of the *Tannerella forsythia* S-layer to delay the immune response. (2011) J Dent Res 90: 109-114.

Serradell MA, Mobili P, Garrote GL, Abraham AG, Fossati CA, De Antoni GL. “Tercer Congreso Argentino de Microbiología General – Sociedad Argentina de Microbiología General”, 2006, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina. Caracterización inmunoquímica de las proteínas de superficie de *Lactobacillus kefir*. Diferencias con *L brevis* y *L parakefir*.

Settem RP, Honma K, Nakajima T, Phansopa C, Roy S, Stafford GP, Sharma A. A bacterial glycan core linked to surface (S)-layer proteins modulates host immunity through Th17 suppression. (2013) Mucosal Immunol 6, 2: 415-426.

Shimotahira N, Oogai Y, Kawada-Matsuo M, Yamada S, Fukutsuji K, Nagano K, Yoshimura F, Noguchi K, Komatsuzawa H. The S-layer of *Tannerella forsythia* contributes to serum resistance and oral bacterial co-aggregation. (2013) Infect Immun 81: 1198-1206.

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

Smit E, Oling F, Demel R, Martinez B, Pouwels PH. The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: identification and characterization of domains responsible for S protein assembly and cell wall binding. (2001) J Mol Biol 305: 245-257.

Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P. Surface layer protein A variant of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027. (2011) Emerg Infect Dis 17, 2: 317-319. doi: 10.3201/eid1702.100355.

Tarao M, Jezbera J, Hahn MW. Involvement of cell surface structures in size-independent grazing resistance of freshwater Actinobacteria. (2009) Appl Environ Microbiol 75, 14: 4720-4726.

Taverniti V, Stuknyte M, Minuzzo M, Arioli S, De Noni I, Scabiosi C, Cordova ZM, Junttila I, Hamalainen S, Turpeinen H, et al. S-layer protein mediates the stimulatory effect

of *Lactobacillus helveticus* MIMLh5 on innate immunity. (2013) *Appl Environ Microbiol* 79: 1221–1231.

Thompson KM. Human monoclonal antibodies. (1988) *Immunol Today* 9, 4: 113-117.


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.

Zhu C, Guo G, Ma Q, Zhang F, Ma F, Xiao D, Yang X, Sun M. Diversity in S-layers. (2017) *Prog Biophys Mol Biol* 123: 1-15. doi: 10.1016/j.pbiomolbio. 2016. 08.002.

18 de marzo de 2022
Cloy pole, Alk. Brown.


32769947
CROSTAGNA CARLA.