



Tesis doctoral

**ALIMENTOS PROBIÓTICOS: INFLUENCIA DE
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN LA INTERACCIÓN
CON EL HOSPEDADOR**

Felipe Szymanowski



Director: Dr. Pablo F. Pérez
Codirectora: Dra. Ayelén A. Hugo
Año 2020

Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias
Biológicas



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**ALIMENTOS PROBIÓTICOS: INFLUENCIA DE
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN LA INTERACCIÓN CON EL
HOSPEDADOR**

Tesista: Lic. Felipe Szymanowski

Director: Dr. Pablo F. Pérez

Codirectora: Dra. Ayelén A. Hugo

Año: 2020

El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA, UNLP-CONICET-CIC) bajo la dirección del Dr. Pablo F. Pérez y la codirección de la Dra. Ayelén A. Hugo.



Agradecimientos

A mis directores, Pablo y Ayelén, por haberme recibido en su grupo y por la paciencia y dedicación con la que me han guiado todos estos años.

A la Universidad Nacional de La Plata, UNLP, por su contribución en mi educación y formación profesional.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET, por otorgarme la beca que me permitió llevar a cabo este trabajo.

A las autoridades del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, CIDCA.

A Galo Balatti, Florencia Martini y Mónica Pickholz, a Ernesto Ambroggio y Gerardo Fidelio, a Patricia Alves, Mónica Simões y Pedro Simões, a Elizabeth Tymczyszyn y a Andrea Gómez-Zavaglia.

A Jessica Minnaard, David Romanin, Fabricio Lareu, Pablo Mobili y todos los que contribuyeron de una manera u otra en la realización de esta tesis.

A los compañeros del CIDCA, en especial a los compañeros del box.

A mis padres, mi familia y mis amigos, por su apoyo.

Resumen

Los péptidos antimicrobianos son un componente de la inmunidad innata muy conservado a lo largo de la evolución que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son pequeños péptidos catiónicos con diferentes tipos de estructura y múltiples funciones biológicas dentro de un organismo. En el ambiente intestinal los péptidos antimicrobianos cumplen un rol principal en el control de la microbiota, modificando su composición y limitando el desarrollo de microorganismos patógenos, actuando al mismo tiempo como microbicidas y como reguladores la respuesta inmune del hospedador.

En este trabajo se estudió la influencia de la sensibilidad a péptidos antimicrobianos en la interacción entre lactobacilos potencialmente probióticos y el hospedador en el ámbito intestinal. Para ello se realizó un recorrido por distintos modelos biológicos y fisicoquímicos estudiando diferentes aspectos de la interacción bacteria/péptido antimicrobiano y bacteria/hospedador, buscando profundizar en el conocimiento de los mecanismos presentes detrás del efecto probiótico.

Los estudios realizados evidencian la importancia de la composición lipídica de la membrana bacteriana sobre la sensibilidad de lactobacilos frente a péptidos antimicrobianos, y asimismo como esta composición influye en los mecanismos de acción de los diferentes péptidos. Además, se comprobó que los lactobacilos estudiados tuvieron la capacidad de modular distintos aspectos de la respuesta inmune al tanto in vitro como in vivo. En efecto se observó que estimularon la expresión de β defensinas utilizando una vía de señalización independiente de NF- κ B; fueron activamente fagocitados por macrófagos e indujeron un perfil de diferenciación de tipo proinflamatorio en ellos. Un perfil proinflamatorio moderado transitorio se registró también in vivo a nivel intestinal en los ratones que ingirieron los lactobacilos. La

ingesta de lactobacilos modificó a su vez la composición de la microbiota intestinal de los ratones. En conjunto estos hallazgos demuestran que la interacción de los lactobacilos con los péptidos antimicrobianos van más allá de la susceptibilidad bacteriana y que el efecto global de los probióticos se contextualiza en la suma de respuestas complejas con el hospedador.

Los resultados presentados en el siguiente trabajo de tesis doctoral han sido publicados parcialmente en los siguientes artículos:

Alves, P., Hugo, A. A., Szymanowski, F., Tymczyszyn, E. E., Pérez, P. F., Coelho, J. F. J., ... Gómez-Zavaglia, A. (2014). Stabilization of polymer lipid complexes prepared with lipids of lactic acid bacteria upon preservation and internalization into eukaryotic cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *123*, 446–451. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.043>

Szymanowski, F., Hugo, A. A., Alves, P., Simões, P. N., Gómez-Zavaglia, A., & Pérez, P. F. (2017). Endocytosis and intracellular traffic of cholesterol-PDMAEMA liposome complexes in human epithelial-like cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *156*, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.058>

Szymanowski, F., Balatti, G. E., Ambroggio, E., Hugo, A. A., Martini, M. F., Fidelio, G. D., ... Pérez, P. F. (2019). Differential activity of lytic α -helical peptides on lactobacilli and lactobacilli-derived liposomes. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, *1861*(6), 1069–1077. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.03.004>

Índice

Agradecimientos	iii
Resumen	iv
Índice	vii
Siglas y abreviaturas.....	1
Introducción General	3
Bibliografía	10
Hipótesis y objetivos.....	15
Capítulo 1 :.....	17
1.1 Introducción	19
1.2 Materiales y métodos	24
1.2.1 Péptidos antimicrobianos	24
1.2.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	25
1.2.3 Concentración inhibitoria mínima (CIM).....	25
1.2.4 Efecto de los AMPs sobre la cinética de crecimiento de las bacterias	26
1.2.5 Ensayos de viabilidad por citometría de flujo.....	26
1.2.6 Extracción de lípidos de lactobacilos	27
1.2.7 Liberación de carboxifluoresceína de vesículas unilamelares grandes (LUVs).....	28
1.2.8 Preparación de las vesículas unilamelares gigantes (GUVs)	29
1.2.9 Penetración de péptidos antimicrobianos en monocapas lipídicas	30
1.3 Resultados	31
1.3.1 Efecto de los péptidos antimicrobianos sobre las bacterias	31
1.3.2 Efecto de los péptidos antimicrobianos sobre liposomas y monocapas lipídicas formados con lípidos bacterianos.....	38
1.4 Discusión.....	45
1.5 Bibliografía	49
Capítulo 2 :.....	53
2.1 Introducción	55
2.2 Materiales y métodos	60

2.2.1 Extracción de lípidos de lactobacilos	60
2.2.2 Formulación de liposomas multilamelares fluorescentes.....	60
2.2.3 Ensayos de liberación de calceína.....	62
2.2.4 Ensayo de estabilidad en suero.....	63
2.2.5 Ensayos de incorporación de liposomas en células eucariotas.....	63
2.2.6 Ensayos de inhibición de endocitosis por células eucariotas	64
2.2.7 Localización intracelular de liposomas.....	65
2.2.8 Ensayos de estabilidad.....	66
2.2.9 Analisis estadístico	67
2.3 Resultados.....	67
2.3.1 Estabilidad de liposomas.....	67
2.3.2 Estabilidad en suero.....	70
2.3.3 Endocitosis de liposomas.....	71
2.3.4 Localización intracelular.....	77
2.3.5 Ensayos de conservación	80
2.4 Discusión.....	84
2.5 Bibliografía	88
Capítulo 3 :.....	93
3.1 Introducción	95
3.2 Materiales y métodos	100
3.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	100
3.2.2 Ensayo de expresión de beta defensina 2.....	100
3.2.3 Evaluación de la vía del factor de transcripción NF- κ B en la línea reportera HT-29- NF- κ B-GFP	103
3.2.4 Evaluación de la activación del promotor de ccl20 en Caco-2 ccl20: luc.....	104
3.2.5 Analisis estadístico	106
3.3 Resultados.....	106
3.3.1 Expresión de beta defensina 2 (hBD2).....	106
3.3.2 Modulación del factor de transcripción NF- κ B en la línea reportera HT-29-NF- κ B- GFP.....	109
3.3.3 Evaluación de la activación de ccl20 en Caco-2 ccl20: luc	111
3.4 Discusión.....	113
3.5 Bibliografía	117

Capítulo 4 :.....	121
4.1 Introducción	123
4.2 Materiales y métodos	126
4.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	126
4.2.2 Marcación de bacterias con isotiocianato de fluoresceína (FITC).....	126
4.2.3 Mantenimiento de la línea THP-1.....	126
4.2.4 Evaluación de la fagocitosis por citometría de flujo.....	127
4.2.5 Determinación del destino intracelular por microscopía confocal.....	128
4.2.6 Ensayo de supervivencia intracelular	129
4.2.7 Ensayo de polarización de células THP-1	129
4.2.8 Análisis estadístico	131
4.3 Resultados.....	131
4.3.1 Ensayos de fagocitosis por citometría de flujo.....	131
4.3.2 Determinación del destino intracelular por microscopía confocal.....	133
4.3.3 Ensayo de supervivencia intracelular	135
4.3.4 Polarización de macrófagos.....	136
4.4 Discusión.....	138
4.5 Bibliografía	141
Capítulo 5 :.....	145
5.1 Introducción	147
5.2 Materiales y métodos	148
5.2.1 Cepas bacterianas.....	148
5.2.2 Animales utilizados y condiciones de mantenimiento	149
5.2.3 Diseño experimental.....	149
5.2.4 Análisis histológicos.....	150
5.2.5 Estudio de la microbiota intestinal por electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE).....	151
5.2.6 Expresión de citoquinas y defensinas	152
5.2.7 Análisis estadístico	153
5.3 Resultados.....	154
5.3.1 Histología.....	154
5.3.2 Analisis de la microbiota intestinal por DGGE	158
5.3.3 Expresión de defensinas en intestino de ratón	160

5.3.4 Expresión de citoquinas en placas de Peyer.....	161
5.4 Discusión.....	162
5.5 Bibliografía.....	166
Discusión General	169
Perspectivas.....	173
Apéndice	175

Siglas y abreviaturas

AMPs	Péptidos antimicrobianos
CCL20	Quimoquina proinflamatoria CCL20
CF	Carboxifluoresceína
CHO-PDMAEMA	Colesterol- poli (2-dimetilaminoetil metacrilato)
CIDCA 133	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> (CIDCA 133)
CIDCA 331	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (CIDCA 331)
CIM	Concentración inhibitoria mínima
DGGE	Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FliC	Flagelina
GUVs	Vesículas unilamelares gigantes
hBD2	β defensina 2 humana
IP	Ioduro de propidio
LUVs	Vesículas unilamelares pequeñas
MAPK	Proteínquinas activadas por mitógenos
mBD3	β defensina 3 murina
MLN	Nódulos linfáticos mesentéricos
MOI	Multiplicidad de infección
MRS	Medio deMan Rogosa Sharp
MVs	Vesículas extracelulares bacterianas
NF-κB	Factor nuclear κ B
NLR	Receptor tipo NOD (NOD-1, NOD-2)
PMA	Acetato de forbol miristato
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TLR	Receptor tipo TOLL (TLR1, TLR2...)



Introducción General

Los alimentos probióticos son aquellos que contienen microorganismos vivos y que administrados en cantidades apropiadas confieren un beneficio para la salud del consumidor (FAO/ WHO, 2001).

Los microorganismos probióticos se pueden encontrar en diferentes tipos de alimentos fermentados: en verduras fermentadas (chucrut, pickles o kimchi); en lácteos (yogurt, kéfir, quesos); o productos fermentados de la soja como el tempeh, el miso o la salsa de soja. Este tipo de alimentos se ha producido desde tiempos inmemoriales, utilizando la fermentación como forma de conservar los alimentos.

El concepto moderno de los alimentos probióticos comienza a principios del siglo XX con los trabajos científicos de Eli Metchnikoff y Henry Tissier, siendo los primeros en proponer el uso de bacterias fermentadoras con el fin de mejorar la salud de los consumidores y no sólo como productoras de un alimento.

Metchnikoff observó que en poblaciones rurales de Bulgaria existía una mayor proporción de personas centenarias o de edad avanzada, lo cual podría relacionarse con el estilo de vida que llevaban y especialmente con el consumo de productos lácteos fermentados. En este punto propuso que los microorganismos que se encuentran en los alimentos podrían modificar la microbiota intestinal reemplazando microorganismos dañinos por otros beneficiosos mejorando así la salud y retrasando el envejecimiento (Metchnikoff, 1906).

Tissier por su parte, observó que la materia fecal de niños con diarrea tenía un número bajo de un tipo de bacterias con una particular forma de "Y", este hallazgo se contraponía al alto número de estas bacterias "bífidas" en muestras de niños saludables. Tissier propuso a partir de estas observaciones que el consumo de estas

bacterias podría revertir el cuadro de diarrea al restaurar la microbiota intestinal (Tissier, 1900).

La falta de estudios que dieran resultados concluyentes sobre el efecto beneficioso del uso de microorganismos para promover la salud, sumado al descubrimiento y auge de la investigación en antibióticos, hizo que las investigaciones formales sobre el efecto probiótico se retrasen varias décadas.

La palabra probiótico se acuñó en un principio para describir a las sustancias producidas por microorganismos que favorecían el crecimiento de otros microorganismos. Posteriormente, Fuller en 1989, definió a los probióticos como “un suplemento alimentario microbiano vivo que afecta de forma beneficiosa al animal hospedador al mejorar el balance intestinal”, remarcando la importancia de la viabilidad de los microorganismos para el efecto probiótico (Fuller, 1989). Para 1992 ya se incluye a los humanos en la definición, Havenaar y Huis in 't Veld propusieron como definición de probióticos la de “cultivos bacterianos puros o mixtos, que al ser administrados a animales o humanos, afectan de forma beneficiosa al hospedador, mejorando las propiedades de su biota indígena” (Havenaar y Huis In't Veld, 1992). Hacia fines de los 90 se comienzan a utilizar los modelos de células eucarióticas en cultivo y co-cultivos que enriquecieron las posibilidades de estudio del efecto de los probióticos en el hospedador (Bernet *et al.*, 1994; Brassart y Schiffrin, 1997; Coconnier *et al.*, 1998; Holzapfel *et al.*, 1998).

La mayoría de los microorganismos probióticos estudiados pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, pero no se limitan sólo a éstos y también se pueden encontrar bacterias con efecto probiótico en los géneros *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Enterococcus* y *Escherichia* como así también en el género de levaduras *Saccharomyces* (Lescheid, 2014).

Los efectos beneficiosos de los probióticos se pueden separar entre los que se producen directamente sobre el hospedador, los efectos producidos sobre otros microorganismos sean patógenos o comensales y los efectos producidos sobre sustancias presentes en el tracto gastrointestinal.

Entre los efectos que se producen directamente sobre el hospedador se encuentra la modulación de la respuesta inmune. Dependiendo de los contextos fisiológicos, la acción de los probióticos sobre las células del sistema inmune puede ser tanto inmunoestimulante como inmunomoduladora, modificando la expresión de diferentes citoquinas inflamatorias o antiinflamatorias. Por ejemplo se sabe que la interacción de ciertos probióticos con el epitelio intestinal tiene un efecto protector de la barrera epitelial, favoreciendo la integridad de las uniones estrechas (Qin *et al.*, 2005). A su vez se ha demostrado que los probióticos a nivel intestinal, estimulan la síntesis de péptidos antimicrobianos (Schlee *et al.*, 2008; Möndel *et al.*, 2009), inmunoglobulinas (Carasi *et al.*, 2017) y la producción de mucus (Ohland y MacNaughton, 2010)

Los probióticos también ejercen efectos sobre otros microorganismos siendo los más relevantes la inhibición de su crecimiento por producción de ácidos orgánicos (ácido láctico, acético), de bacteriocinas (péptidos antimicrobianos sintetizados por bacterias) o la desconjugación de ácidos biliares, produciendo derivados de las sales biliares con actividad microbicida (Oelschlaeger, 2010). Esta actividad inhibitoria junto con la competencia por los nutrientes del medio tiene impacto en la regulación de la composición de la microbiota intestinal. Asimismo, los probióticos pueden modular la expresión de genes en otros microorganismos, interfiriendo mecanismos de *quorum sensing* (Medellin-Peña *et al.*, 2007).

El antagonismo con microorganismos enteropatógenos ha sido uno de los efectos probióticos más estudiados. Los probióticos, al adherirse a la superficie de los enterocitos compiten con los microorganismos patógenos excluyéndolos de los sitios de unión al epitelio, interfiriendo en uno de los pasos claves en la infección (Collado, Grześkowiak y Salminen, 2007). La acidificación de microambientes intestinales también constituye un mecanismo importante en la inhibición de patógenos (Parvez *et al.*, 2006). En lo que respecta a la modulación de la expresión de genes, se ha observado que *L. acidophilus* interfiere el *quorum sensing* y la expresión de factores de virulencia en *E. coli* O157:H7 (Medellin-Peña *et al.*, 2007). Otro estudio mostró que la coinubación *L. rhamnosus* GG con *E. coli* O157:H7 disminuía la expresión de toxina shiga por el patógeno (Carey *et al.*, 2008).

Por último, los probióticos pueden ejercer su efecto sobre sustancias presentes en el intestino, mejorando la calidad, digestibilidad y disponibilidad de nutrientes dietarios. Los probióticos pueden aportar vitaminas (ácido fólico, niacina, riboflavina) y enzimas como proteasas, lipasas y lactasa, que aumentan la biodisponibilidad de ácidos grasos, aminoácidos libres y favorecen el metabolismo de la lactosa (Parvez *et al.*, 2006).

Para considerar una cepa microbiana como probiótica pasible de ser incorporada a un alimento no sólo tiene que poseer alguna de las propiedades benéficas ya descritas, sino que además se deben tener en cuenta características biotecnológicas que le permitan soportar el pasaje gastrointestinal y dar lugar a un producto aceptable. Los probióticos, para permanecer viables en el intestino, deben poseer resistencia a sales biliares, enzimas proteolíticas y péptidos antimicrobianos. Además, deben poseer la capacidad de interaccionar con células relevantes de las mucosas tales como los enterocitos.

Por otra parte, ciertas características tecnológicas deben ser tenidas en consideración en la elección de una cepa probiótica. En este sentido los productos fermentados obtenidos deben tener buenas propiedades sensoriales y los microorganismos deben mantener la viabilidad durante el proceso de producción y almacenamiento del alimento (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002).

Como se mencionó anteriormente el género *Lactobacillus* es uno de los más importantes dentro del conjunto de las bacterias probióticas. Los lactobacilos son bacterias grampositivas, de forma bacilar o cocobacilar, no formadoras de esporos con contenido de G+C en el rango de 33- 35% (Coenye y Vandamme, 2003). Son fermentadoras estrictas, aerotolerantes o anaerobias, tolerantes al ácido o acidófilas y tienen requerimientos nutricionales complejos (carbohidratos, aminoácidos, péptidos, ésteres de ácidos grasos, sales, derivados de ácidos nucleicos y vitaminas). Pueden ser homofermentativas (>85% ácido láctico) o heterofermentativas (produciendo ácido láctico, etanol, dióxido de carbono y/o ácido acético) (Bernardeau, Guguen y Vernoux, 2006).

Los lactobacilos son bacterias ubicuas que se pueden encontrar en toda sustancia rica en carbohidratos y se hallan asociados estrechamente con animales, plantas y el ambiente. Colonizan varios hábitats en humanos y animales formando parte de la microbiota normal de éstos. En humanos saludables se pueden encontrar en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal, en la piel y formando parte de la microbiota vaginal.

En este trabajo se utilizaron las cepas de lactobacilos CIDCA 133 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*) y CIDCA 331 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), ambas cepas pertenecientes al cepario del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA). La cepa CIDCA 133 fue aislada a partir de leche cruda (de Urraza, 1997) mientras que la cepa CIDCA 331 (antes LBB) fue aislada a partir de un fermento líquido para la producción de yogurt (Abraham, 1992). En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio estas cepas han demostrado tener propiedades que permiten considerar su uso como microorganismos probióticos.

La cepa CIDCA 133 demostró tener la capacidad de inhibir la adhesión y el efecto biológico de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) en células en cultivo y también ejerció un efecto protector frente a la infección de EHEC en un modelo murino (Hugo, 2007; Hugo *et al.*, 2008). En estudios posteriores se observó que la cepa CIDCA 133 tiene un efecto de activación de macrófagos murinos, en presencia de *Citrobacter rodentium* aumentando su actividad fagocítica así como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hugo *et al.*, 2017). Utilizando modelos de cocultivos se observó que dicho lactobacilo podía modular la respuesta de enterocitos y células dendríticas humanas frente a la infección con *Bacillus cereus* modificando la activación de la vía de NF- κ B (Rolny *et al.*, 2016). Por otra parte, la cepa CIDCA 133 ha mostrado tener un efecto protector de daño en el epitelio intestinal causado por la droga quimioterapéutica 5-fluorouracilo en un modelo de mucositis con ratones BALB/c (De Jesus *et al.*, 2019).

Por otra parte, la cepa CIDCA 331 mostró tener características adecuadas para la formulación de yogures con un buena capacidad proteolítica y de acidificación de la leche (Abraham, 1992; Moreira *et al.*, 2000). Al igual que la cepa CIDCA 133, la cepa

CIDCA 331 mostró tener la capacidad de estimular la producción de ROS en células epiteliales en modelos *in vitro* (Romanin, 2007).

En cuanto a sus propiedades de resistencia a procesos tecnológicos y al pasaje gastrointestinal, la cepa CIDCA 133, presenta una elevada supervivencia a los ciclos de congelación/descongelación, así también como una gran resistencia a la bilis pudiendo crecer en agar con 0,5 % de bilis de buey (Hugo, 2007; Kociubinski et al., 1999). En contraste, la cepa CIDCA 331 presenta una marcada disminución de viabilidad durante los procesos de congelación y asimismo mostró ser sensible a la bilis (De Urza y De Antoni, 1997; Kociubinski, Pérez y De Antoni, 1999).

Más allá de las propiedades probióticas tradicionales evaluadas para estas cepas, se ha encontrado que presentan una sensibilidad diferencial frente a péptidos catiónicos intestinales con actividad antimicrobiana (AMPs, *antimicrobial peptides* en inglés). En efecto, la cepa CIDCA 133 es más resistente al efecto de defensinas humanas, así como también a extractos catiónicos de enterocitos humanos en cultivo que la cepa CIDCA 331 (Hugo, De Antoni, & Pérez, 2010).

Las defensinas, como parte de la inmunidad innata, juegan un rol muy importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, regulando la microbiota y también cumpliendo funciones inmunomoduladoras (Meade y O'Farrelly, 2019). Las defensinas son péptidos catiónicos ricos en cisteína con tres puentes disulfuro y una estructura secundaria en lámina beta que se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos (Ganz, 2003). La interacción de los probióticos con estos péptidos podría resultar importante para determinar su permanencia a nivel intestinal; a la vez que podrían modificar las propiedades probióticas de las cepas

Las defensinas y en general los AMPs se presentan como nuevos actores en la interacción probiótico-hospedador planteando nuevos interrogantes en el ámbito de estudio de los probióticos. ¿Qué consecuencias tendrá para el hospedador la interacción con cepas de lactobacilos con diferente susceptibilidad a defensinas? ¿Qué mecanismos están implicados en la resistencia diferencial de estas cepas? ¿Es posible que la resistencia diferencial de las cepas se correlacione con otras propiedades de los lactobacilos? En este trabajo de tesis se buscará profundizar sobre estos interrogantes utilizando diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. Se evaluarán las interacciones

de los lactobacilos con péptidos antimicrobianos con diferentes técnicas microbiológicas y fisicoquímicas para pasar posteriormente a estudiar la interacción de las bacterias con distintos tipos celulares presentes en tracto intestinal. Por último, se evaluarán estas interacciones de manera integral utilizando un modelo murino.

Bibliografía

- Abraham, A. (1992). *Lactobacillus bulgaricus* en fermentos para yogur. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Bernardeau, M., Guguen, M., & Vernoux, J. P. (2006). Beneficial lactobacilli in food and feed: Long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(4), 487–513. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00020.x>
- Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R., & Servin, A. L. (1994). *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*, 35(4), 483–489. <https://doi.org/10.1136/gut.35.4.483>
- Brassart, D., & Schiffrin, E. J. (1997). The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. *Trends in Food Science and Technology*, 8(10), 321–326. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01071-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01071-6)
- Carasi, P., Racedo, S. M., Jacquot, C., Elie, A. M., Serradell, M. de los ángeles, & Urdaci, M. C. (2017). *Enterococcus durans* EP1 a promising anti-inflammatory probiotic able to stimulate sIgA and to increase *Faecalibacterium prausnitzii* abundance. *Frontiers in Immunology*, 8(FEB). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00088>
- Carey, C. M., Kostrzynska, M., Ojha, S., & Thompson, S. (2008). The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Microbiological Methods*, 73(2), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.01.014>
- Coconnier, M. H., Lievin, V., Hemery, E., & Servin, A. L. (1998). Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4573–4580. <https://doi.org/10.1128/aem.64.11.4573-4580.1998>
- Coenye, T., & Vandamme, P. (2003). Extracting phylogenetic information from whole-genome sequencing projects: The lactic acid bacteria as a test case. *Microbiology*, 149(12), 3507–3517. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26515-0>
- Collado, M. C., Grześkowiak, Ł., & Salminen, S. (2007). Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Current Microbiology*, 55(3), 260–265. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-0144-8>
- De Jesus, L. C. L., Drumond, M. M., de Carvalho, A., Santos, S. S., Martins, F. S., Ferreira, Ê., ... Mancha-Agresti, P. (2019). Protective effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* CIDCA 133 in a model of 5-Fluorouracil-Induced intestinal mucositis. *Journal of Functional Foods*, 53(October 2018), 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.027>

-
- de Urraza, P. (1997). Obtención de bacterias lácticas para cultivos starters: aislamiento, caracterización y conservación. Ph. D. Thesis. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La
- De Urraza, P., & De Antoni, G. (1997). Induced cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBB by preincubation at suboptimal temperatures with fermentable sugar. *Cryobiology*, 35, 159–164.
- FAO/ WHO. (2001). Probiotics in food FOOD AND NUTRITION. Food and Nutrition Paper, 85, 71.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365–378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>
- Ganz, T. (2003). DEFENSINS : ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF INNATE IMMUNITY. 3(September), 710–720. <https://doi.org/10.1038/nri1180>
- Havenaar, R., & Huis In't Veld, J. H. J. (1992). Probiotics: A General View. *The Lactic Acid Bacteria Volume 1*, 1, 151–170. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3522-5_6
- Holzapel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., & Huis In'T Veld, J. H. J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), 85–101. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00044-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00044-0)
- Hugo, A. A., Kakisu, E., De Antoni, G. L., & Pérez, P. F. (2008). Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in vitro. *Letters in Applied Microbiology*, 46(6), 613–619. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02363.x>
- Hugo, A A, De Antoni, G. L., & Pérez, P. F. (2010). *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* (strain CIDCA 133) resists the antimicrobial activity triggered by molecules derived from enterocyte-like Caco-2 cells. *Letters in Applied Microbiology*, 50(4), 335–340. Recuperado de <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77949377746&partnerID=40&md5=b9be5471bd119cca2b6077e107956169>
- Hugo, Ayelén A. (2007). Capacidad probiótica de la cepa CIDCA 133 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis*): un recorrido desde modelos in vitro a in vivo (Universidad Nacional de La Plata). <https://doi.org/10.35537/10915/2360>
- Hugo, Ayelén A., Rolny, I. S., Romanin, D., & Pérez, P. F. (2017). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (strain CIDCA 133) stimulates murine macrophages infected with *Citrobacter rodentium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 0. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2219-4>
- Kociubinski, G., Pérez, P., & De Antoni, G. (1999). Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Food Protection*, 62(8), 905–912. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.8.905>

-
- Lescheid, D. W. (2014). Probiotics as regulators of inflammation: A review. *Functional Foods in Health and Disease*, 4(7), 299. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v4i7.2>
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future Probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12(2–3), 173–182. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00099-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00099-1)
- Meade, K. G., & O’Farrelly, C. (2019). B-Defensins: Farming the microbiome for homeostasis and health. *Frontiers in Immunology*, 10(JAN), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03072>
- Medellin-Peña, M. J., Wang, H., Johnson, R., Anand, S., & Griffiths, M. W. (2007). Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13), 4259–4267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00159-07>
- Metchnikoff, I. I. (1906). *The prolongation of life: optimistic studies*. Springer Publishing Company.
- Möndel, M., Schroeder, B. O., Zimmermann, K., Huber, H., Nuding, S., Beisner, J., ... Wehkamp, J. (2009). Probiotic *E. coli* treatment mediates antimicrobial human β -defensin synthesis and fecal excretion in humans. *Mucosal Immunology*, 2(2), 166–172. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.77>
- Moreira, M., Abraham, A., & De Antoni, G. (2000). Technological Properties of Milks Fermented with Thermophilic Lactic Acid Bacteria at Suboptimal Temperature. *Journal of Dairy Science*, 83(3), 395–400. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74894-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74894-6)
- Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions - A review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.005>
- Ohland, C. L., & MacNaughton, W. K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(6). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00243.2009>
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1171–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x>
- Qin, H. L., Shen, T. Y., Gao, Z. G., Fan, X. B., Hang, X. M., Jiang, Y. Q., & Zhang, H. Z. (2005). Effect of lactobacillus on the gut microflora and barrier function of the rats with abdominal infection. *World Journal of Gastroenterology*, 11(17), 2591–2596. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i17.2591>
- Rolny, I. S., Tiscornia, I., Racedo, S. M., Pérez, P. F., & Bollati-Fogolín, M. (2016). *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133 modulates response of human epithelial and dendritic cells infected with *Bacillus cereus*. *Beneficial Microbes*, 7(5), 749–760. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0191>
- Romanin, D. E. (2007). Estudio de la Capacidad Moduladora de la Respuesta Inmune Innata de

Microorganismos Potencialmente Probióticos Aislados de Kefir Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biotecnología y Biología Molecular.

Schlee, M., Harder, J., Köten, B., Stange, E. F., Wehkamp, J., & Fellermann, K. (2008). Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte β -defensin 2. *Clinical and Experimental Immunology*, 151(3), 528–535. Recuperado de <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-38549171792&partnerID=40&md5=c451fe55b70fac5175576786157914fe>

Tissier, H. (1900). *Recherches sur la flora intestinale normale et pathologique du nourisson*. Université de Paris, Paris.



Hipótesis y objetivos

En este trabajo se busca determinar causas y consecuencias de la interacción diferencial de microorganismos potencialmente probióticos con péptidos antimicrobianos y los efectos sobre el hospedador. Se plantean las siguientes hipótesis de trabajo:

- Bacterias potencialmente probióticas poseerían diferente resistencia frente a los péptidos antimicrobianos producidos por las células eucarióticas.
- Las interacciones involucradas podrían ser modeladas utilizando liposomas formulados con lípidos de bacterias con diferentes susceptibilidades a defensinas.
- La distinta susceptibilidad de las bacterias frente a los péptidos antimicrobianos determinaría un diferente destino intracelular, así como variadas respuestas por parte de las células eucarióticas.
- La susceptibilidad diferencial de bacterias potencialmente probióticas determinaría cambios en los efectos sobre el hospedador en modelos animales.

Los siguientes objetivos específicos se plantean para cumplir con el objetivo general:

1. Determinar la susceptibilidad de microorganismos potencialmente probióticos a péptidos antimicrobianos.
2. Modelar las interacciones involucradas mediante la utilización de liposomas formulados con lípidos de bacterias.
3. Evaluar la respuesta de la célula eucariótica (fagocitos y enterocitos) en interacción con bacterias probióticas con diferente susceptibilidad a las defensinas.
4. Determinar la respuesta del hospedador frente a microorganismos probióticos sensibles o resistentes a las defensinas en un modelo murino *in vivo*



Capítulo 1:

Interacción de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 con péptidos antimicrobianos.



1.1 Introducción

El tracto digestivo constituye un ambiente crucial para la interacción entre microorganismos y el hospedador. Cientos de especies de microorganismos conviven en el intestino: los pertenecientes a la microbiota habitual, establecida en los primeros años de vida del hospedador y los que ingresan continuamente al organismo a través de la dieta. En este contexto, las barreras naturales de la mucosa intestinal juegan un papel muy importante a la hora de mantener la homeostasis del intestino, modulando las respuestas inmunes hacia los microorganismos comensales y protegiendo al organismo de los microorganismos patógenos que puedan ingresar. Estas barreras naturales pueden ser físicas (mucus, epitelio intestinal) o químicas (péptidos antimicrobianos, inmunoglobulinas, proteasas) (Okumura y Takeda, 2018).

Dentro de las barreras químicas de la mucosa intestinal se encuentran los péptidos antimicrobianos (AMPs) que cumplen un rol muy importante al controlar la composición y la distribución espacial de la microbiota. La sensibilidad diferencial de los microorganismos y los gradientes de concentración de los péptidos van a determinar en parte la composición y la abundancia relativa de las especies microbianas (Mergaert, 2018).

Los péptidos antimicrobianos son pequeños péptidos catiónicos anfífilos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, hallándose ejemplos de los mismos en hongos, bacterias, insectos, plantas, anfibios, peces y mamíferos (Zhang y Gallo, 2016). La actividad antimicrobiana de los AMPs depende usualmente de su capacidad para unirse a las membranas o pared celular de las bacterias. Generalmente los péptidos antimicrobianos tienen una carga neta positiva y un porcentaje alto de aminoácidos hidrofóbicos que les permite unirse a las membranas bacteria-

nas cargadas negativamente, produciendo una disrupción de las mismas por diferentes mecanismos. Los mecanismos más reconocidos son : la formación de poros en empalizada, poros toroidales o el mecanismo de tipo alfombra (Moal y Servin, 2006). (Figura 1.1). Los poros son discontinuidades de la bicapa formadas por la introducción perpendicular de los péptidos constituyendo un pasaje hidrofílico; mientras que en el mecanismo de alfombra los péptidos se unen de manera paralela a la membrana produciendo alteraciones transitorias en la misma. En este último caso, si su concentración es lo suficientemente alta pueden actuar a modo de detergente desintegrando la bicapa lipídica. (Meng, Xu y Wang, 2010; Wimley, 2010)

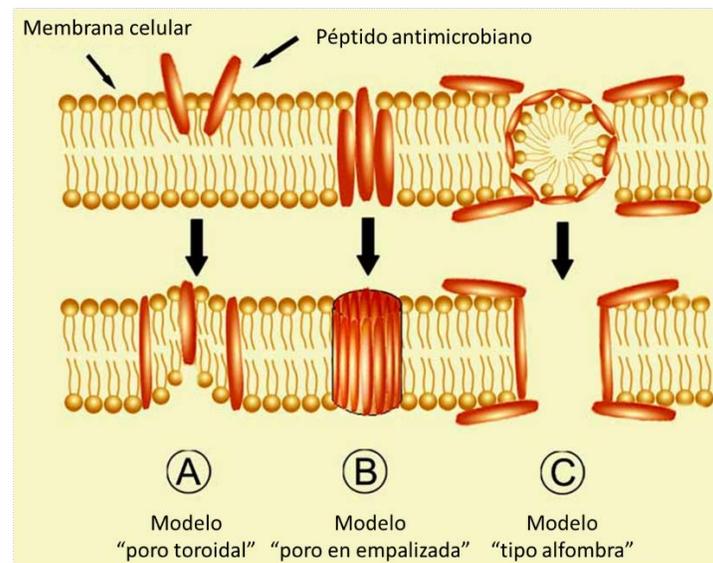


Figura 1.1. Diferentes mecanismos de formación de poros de péptidos antimicrobianos. (A) poro toroidal formado por moléculas de lípidos y péptidos; (B) poro en empalizada o barril formado por los péptidos que se insertan de manera perpendicular a la membrana, las moléculas peptídicas se ubican en clusters posicionándose como las duelas de un barril, con su parte hidrofílica hacia el lumen del poro. (C) modelo tipo alfombra, los péptidos se adhieren de forma paralela a la membrana, los péptidos actúan como un detergente produciendo alteraciones en la membrana y poros transitorios. Figura modificada de Meng, Xu, & Wang, 2010.

El mecanismo empleado por los péptidos dependerá del largo y de la composición de los mismos: la longitud de los péptidos influirá en la capacidad de atravesar completamente la membrana bacteriana. Por otra parte, la composición aminoacídica de los AMPs determinara la carga e hidrofobicidad de la molécula, influyendo en la

forma que interactúan con los lípidos de las membranas y las otras moléculas de AMPs para formar los distintos tipos de poros.

Si bien, el aumento de la permeabilidad de las membranas blanco es el mecanismo más reconocido de los AMPs, no es el único. Los AMPs pueden actuar también inhibiendo procesos biológicos de las células diana como por ejemplo la síntesis de lípido II (precursor de la síntesis del peptidoglicano), interrumpiendo por consiguiente la síntesis de la pared celular. Asimismo se han descrito efectos inhibitorios de los AMPs sobre la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, ya sea por una despolarización de la membrana como es el caso de las bacterenecinas bovinas o por inhibición directa de una aminoacil-tRNA sintetasa en las microcinas producidas por ciertas enterobacterias (Guilhelmelli *et al.*, 2013).

Los AMPs son alternativas atractivas a los antimicrobianos tradicionales por su amplio espectro de acción y por no generar resistencia con su uso. Su mecanismo de acción membranolítico, por unión a los lípidos que forman la bicapa, implica una interacción muy rápida con pérdida de la viabilidad bacteriana en el orden de los minutos (Boto, De La Lastra y González, 2018).

Los AMPs por su estructura tridimensional secundaria pueden clasificarse en péptidos alfa hélice (como la melitina de la abeja o los péptidos citolíticos de la piel de anuros), péptidos hoja beta (como las protegrinas de cerdos y defensinas de mamíferos) o en péptidos extendidos/flexibles (como la PR-39 de cerdos y las histatinas de humanos) (Kumar, Kizhakkedathu y Straus, 2018).

Las defensinas son una de las familias de péptidos antimicrobianos de hoja beta presentes en humanos así como en otros mamíferos y también en peces, aves, hongos filamentosos y plantas (Suarez-Carmona *et al.*, 2015). Tienen entre 16 y 50 aminoácidos, conteniendo 6 cisteínas que forman tres puentes disulfuro. Se encuentran divididas en tres subfamilias: α defensinas, β defensinas y θ defensinas. Las α defensinas y β defensinas se diferencian entre sí por la distribución de sus enlaces disulfuros, mientras que las θ defensinas, son estructuralmente diferentes ya que son cíclicas. Las α defensinas se secretan principalmente en neutrófilos y en las células de Paneth del intestino delgado, se secretan también en los epitelios del tracto respira-

torio y reproductor femenino. Las β defensinas por su parte, son secretadas por células epiteliales y se pueden encontrar en la piel y gran variedad de mucosas como la gastrointestinal, urogenital y respiratoria (Suarez-Carmona *et al.*, 2015). Las θ defensinas se expresan sólo en los neutrófilos y macrófagos de los monos Rhesus. Los humanos y otros primates no expresan las θ defensinas debido a una mutación que genera un codón de terminación en su secuencia (Jarczak *et al.*, 2013).

Las defensinas cumplen un rol importante en los estadios tempranos de la defensa del hospedador frente a la infección por bacterias patógenas, micobacterias, hongos y virus (Jarczak *et al.*, 2013). Las defensinas también cumplen otras funciones más allá de la actividad antimicrobiana. Es sabido que, poseen actividad quimioatrayente de células del sistema inmune, participan en la diferenciación y reorganización de tejidos epiteliales y en la reparación de heridas estimulando la proliferación de células epiteliales (Winter y Wenghoefer, 2012).

Los anfibios anuros producen en su piel una amplia variedad de péptidos con capacidad neuroactiva, antimicrobiana y citolítica que les permitieron adaptarse a lo largo de su evolución al pasaje de un ambiente acuático a uno terrestre. Estas secreciones exócrinas de la piel de los anuros cumplen un importante rol en la protección frente a depredadores y el establecimiento de la microbiota de su piel (König, Bininda-Emonds y Shaw, 2015). Estos péptidos se caracterizan por tener una estructura alfa hélice que no es común en el tracto gastrointestinal de los mamíferos. En efecto, en humanos, por ejemplo, sólo existe un alfa péptido, la catelicidina LL-37, a nivel intestinal (Apponyi *et al.*, 2004).

En la actualidad muchos de estos péptidos de anuros están siendo investigados para ser usados con fines terapéuticos. Los AMPs de anuros poseen un amplio espectro de acción contra bacterias hongos y virus. Además, algunos de ellos han demostrado tener efectos anticancerígenos, antiinflamatorios, inmunosupresores y antidiabéticos (Landram, 2016). En particular los péptidos aureína 1.2, citropina 1.1 y maculatina 1.1 pertenecientes a la rana de árbol australiana del género *Litoria* han demostrado tener variadas propiedades. Presentan actividad antimicrobiana, efectos anticancerígenos y capacidad de inhibir la enzima óxido nítrico sintasa inducible

(iNOs) involucrada en la formación de especies reactivas del nitrógeno (Rozek *et al.*, 2000; Doyle *et al.*, 2003; Apponyi *et al.*, 2004).

Las cepas de lactobacilos *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133 y *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 331 pertenecientes a nuestro cepario fueron ampliamente estudiadas como potenciales bacterias probióticas.

Una bacteria probiótica debe ser capaz de sobrevivir al pasaje gastrointestinal y permanecer viable en el intestino donde ejercerá su efecto benéfico. Por ello; además de los ensayos tradicionales de resistencia al pasaje gastrointestinal (supervivencia al medio ácido y bilis), se evaluó sobre estas cepas su sensibilidad a otros factores luminales presentes en el intestino como las β defensinas humanas 1 y 2. En este sentido, la cepa CIDCA 331 resultó ser muy sensible a la acción de las β defensinas mientras que la cepa CIDCA 133 demostró ser más tolerante (Hugo, De Antoni, y Pérez 2010). Esta susceptibilidad diferencial podría modificar la supervivencia de los lactobacilos en el tracto gastrointestinal y podría conllevar a distintos tipos de interacciones entre los lactobacilos y células relevantes para la respuesta inmune del hospedador.

La diferente sensibilidad de las cepas a las β defensinas puede explicarse en parte por la composición de sus membranas o paredes celulares. La extracción de lípidos de los lactobacilos y los análisis por TLC revelaron que sus membranas están compuestas por los mismos tipos de lípidos: cardiolipina, fosfatidilglicerol, tres clases de glicolípidos y lípidos neutros; sin embargo estos lípidos se encuentran en diferentes proporciones (Gómez Zavaglia, Disalvo y De Antoni, 2000). En efecto, la relación glicolípidos/fosfolípidos (GLY/PL) varía entre los lactobacilos siendo menor para la cepa CIDCA 331 respecto a la cepa CIDCA 133. La presencia en la cepa CIDCA 331, de una menor concentración relativa de glicolípidos con respecto a fosfolípidos, que son los que aportan carga negativa a la membrana, podría aumentar globalmente su negatividad, favoreciendo de esa manera la interacción con los AMPs de carácter catiónico.

Hasta el momento en los estudios de sensibilidad realizados con las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 fueron utilizados péptidos antimicrobianos de estructura secundaria hoja β como las β defensinas 1 y 2 (hBD1 y hBD2). En este punto nos

interesó conocer si las diferencias encontradas entre las cepas podrían extrapolarse a péptidos con otro tipo de estructura secundaria como son los péptidos de anuros de estructura α hélice. Estos péptidos, aunque evolutivamente lejanos de los de mamíferos, podrían encontrarse en el ámbito de tracto gastrointestinal humano en caso de una utilización terapéutica de los mismos. Además, desde otro punto de vista, las bacterias ácido lácticas forman parte de la microbiota de la piel de anuros, cumpliendo un rol benéfico para el hospedador. Determinar la resistencia de lactobacilos a los péptidos antimicrobianos de la piel de anuros puede ser de importancia para su uso probiótico en ranicultura, como muestran Niederle y col (Niederle *et al.*, 2019) Por otra parte el estudio de susceptibilidad de los probióticos a distintos AMPs podría brindar información sobre la evolución de los microorganismos en diferentes hospedadores.

Teniendo en cuenta lo expuesto, este capítulo se centró en la interacción de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 con péptidos antimicrobianos de estructura α hélice proveniente de la piel de anuros (rana australiana *Litoria*) a saber: aureína 1.2, citropina 1.1 y maculatina 1.1; comparándolos con β defensina 2 humana (hBD2) (péptido de estructura β) estudiada anteriormente. Con la finalidad de cumplir este objetivo se realizaron experimentos sobre bacterias enteras y también se utilizaron diferentes modelos de membrana plasmática bacteriana empleando monocapas y liposomas. A fin de obtener una aproximación de la membrana plasmática de los lactobacilos se realizó una extracción de los lípidos bacterianos para la formación de liposomas y monocapas lipídicas; lo cual constituye un modelo más cercano al sistema real con respecto a los modelos con lípidos puros ampliamente utilizados en estudios de este tipo.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos de anuro utilizados fueron maculatina 1.1, citropina 1.1, y aureína 1.2, sintetizados por Mimotopes Pty (Melbourne, Australia) utilizando métodos N-Fmoc a partir de L-aminoácidos. La pureza de los mismos fue del 90%, establecida

mediante HPLC y espectroscopía de masa. Los péptidos de anuros fueron provistos por E. E. Ambroggio del Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIMBIC-CONICET-UNC).

Para los ensayos con β defensina 2 humana (hBD2) se usó un péptido recombinante expresado en *E. coli* (Peptides International Inc. EEUU), con una pureza >98% medida por HPLC. En la Tabla 1.1 se detallan las secuencias.

Tabla 1.1: Secuencia de péptidos antimicrobianos

Péptido	Secuencia
aureína 1.2	GLFDIKKVAS VIGGL-NH ₂
citropina 1.1	GLFDVIKKVA SVIGGL-NH ₂
maculatina 1.1	GLFGVLAKVA AHVVPAIAEH F-NH ₂
hBD2	GIGDPVTCLK SGAICHPVFC PRRYKQIGTC GLPGTKCCKK P – NH ₂

1.2.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Durante los ensayos se utilizaron las cepas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (CIDCA 331) y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (CIDCA133) que forman parte del cepario del CIDCA. Los stocks de trabajo se conservaron congelados a -80°C. Las cepas fueron reactivadas dos veces, antes de los experimentos incubándolas en caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe, 1960) (Biokar Diagnostics, Francia) a 37°C en aerobiosis por 16 h. Luego de la incubación, las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 10000 g por 5 min y a continuación lavadas dos veces con buffer fosfato salino (PBS) [K₂HPO₄ 0,144 g/l; NaCl 9.00 g/l; Na₂HPO₄ g/l]. Los pellets obtenidos fueron suspendidos en diferentes medios y llevados a la concentración adecuada para los diferentes ensayos utilizando la correlación establecida para cada cepa entre densidad óptica ($\lambda = 600$ nm) y el valor de UFC/ml.

1.2.3 Concentración inhibitoria mínima (CIM)

Las concentraciones inhibitorias mínimas de los péptidos antimicrobianos (CIM) fueron determinadas por un método de microdilución en placa de 96 fosas.

Se realizaron diluciones seriadas en un factor de 2 a partir de una concentración de 100 μM de aureína 1.2, citropina 1.1 y maculatina 1.1 en caldo MRS. Se agregaron 100 μl de cada dilución por duplicado en una placa de cultivo de 96 fosas y luego se agregaron 100 μl de cultivo bacteriano con una concentración de 2×10^6 UFC/ml en medio MRS. Las suspensiones obtenidas tuvieron una concentración inicial de bacterias de 1×10^6 UFC /ml y un rango de concentraciones de péptidos entre 50 y 0,024 μM .

La CIM se definió como la menor concentración de péptido capaz de inhibir el crecimiento visible de las cepas luego de incubar las placas a 37°C durante 16 h.

1.2.4 Efecto de los AMPs sobre la cinética de crecimiento de las bacterias

Se realizaron cinéticas de crecimiento en caldo MRS incubando las cepas de lactobacilos con concentraciones inferiores a la CIM de los péptidos antimicrobianos de anuros.

Los ensayos se realizaron midiendo la absorbancia a 600 nm en placas de cultivo de 96 fosas. Las medidas se realizaron a intervalos regulares utilizando un lector de microplacas (Synergy HT Bio-Tek Instruments, Winoski, Vermont, USA). Como medio de crecimiento se utilizó caldo MRS (Biokar Diagnostics, Francia) con y sin agregado de los péptidos antimicrobianos. Se utilizaron concentraciones de los péptidos estudiados por debajo de los valores determinadas previamente en el ensayo de CIM. A saber: aureína 12 μM , citropina 0,8 μM y maculatina 0,8 μM . El inóculo inicial de bacterias fue de 1×10^6 UFC/ml.

1.2.5 Ensayos de viabilidad por citometría de flujo

La viabilidad de los lactobacilos luego de la incubación con los péptidos antimicrobianos se determinó por citometría de flujo utilizando el kit LIVE/DEAD BacLight (Thermofisher Scientific). Este kit permite diferenciar bacterias viables de aquellas que tienen alterada la permeabilidad de su membrana utilizando una combinación de dos fluoróforos: Syto 9 e yoduro de propidio (IP). El SYTO 9 marca los ácidos nucleicos de todas las poblaciones bacterianas tanto vivas como muertas con

fluorescencia verde. El IP sólo penetra en células que tienen aumentada la permeabilidad de sus envolturas celulares marcando sus ácidos nucleicos con fluorescencia roja. Cuando se encuentran ambas sondas, como en las bacterias muertas, el yoduro de propidio produce una disminución de la fluorescencia del SYTO 9 permitiendo separar las poblaciones de bacterias dañadas y de bacterias intactas.

Durante el ensayo, las bacterias, previamente lavadas, fueron resuspendidas en agua, llevadas a una concentración de 1×10^6 UFC/ml y luego incubadas durante 60 min a temperatura ambiente con los péptidos antimicrobianos. Los péptidos se utilizaron en su concentración igual a la CIM para cada bacteria. Posteriormente se agregó a cada muestra en una proporción 1:20 la mezcla de los fluoróforos conteniendo: 3,34 μ M Syto9 y 20 μ M IP. Las muestras se analizaron en un citómetro FACS-Calibur con el programa Cell Quest (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). En cada muestra se evaluó la fluorescencia verde (FL1) y roja (FL2) de al menos 10000 eventos y se identificaron las poblaciones de bacterias viables y dañadas.

1.2.6 Extracción de lípidos de lactobacilos

Para modelar las interacciones de los AMPs con las membranas bacterianas se utilizaron extractos lipídicos obtenidos de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331.

Los lípidos se extrajeron por el método de Blight y Dyer modificado (Hugo *et al.*, 2012). Para ello se cultivaron las distintas cepas bacterianas en botellas conteniendo 600 ml de caldo MRS Biokar durante 16 h en estufa a 37 °C y los cultivos se conservaron durante 24 h a 0 °C. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados dos veces a 10000 g por 10 min y los pellets obtenidos fueron lavados con agua destilada. Los pellets se resuspendieron en agua con una relación 2,5:1 agua-sólido. Una vez resuspendidos se les agregó una mezcla de metanol:cloroformo (2:1); obteniéndose una sola fase. La mezcla se colocó a 0 °C durante 16 h. Al día siguiente se realizó una segunda extracción semejante a la primera sobre el pellet centrifugado. Los sobrenadantes de las dos extracciones se juntaron y se añadió una mezcla de cloroformo:agua (1:1) centrifugando durante 20 min a 10000 g para lograr una buena separación de las fases. Posteriormente se conservó la fase clorofórmica que contiene los lípidos. Por último, se evaporó el cloroformo utilizando un Rotavapor® RE

120 (Büchi, Flawil, Switzerland): a una presión de 230 mmHg, baño a 50 °C, y refrigeración a -10 °C.

El extracto lipídico obtenido se conservó a -20 °C con atmósfera de N₂. La cantidad de lípido extraído se cuantificó por diferencia de masa.

1.2.7 Liberación de carboxifluoresceína de vesículas unilamelares grandes (LUVs)

Los LUVs son liposomas unilamelares de un tamaño igual o mayor a 100 nm. Se prepararon liposomas cargados en su interior con carboxifluoresceína (CF). La liberación de CF de los liposomas permite cuantificar en forma global su sensibilidad a los péptidos antimicrobianos. La fluorescencia de la CF en el interior del liposoma se encuentra parcialmente apantallada debido a la alta concentración de la misma, a medida que se permeabiliza la bicapa lipídica este efecto de auto apantallamiento se pierde y la fluorescencia en el medio aumenta debido a la CF liberada.

La preparación de estos liposomas se realizó secando por vacío películas de lípidos bacterianos desde soluciones 2 mM de lípidos en cloroformo:metanol (2:1). Las películas secas luego fueron rehidratadas con una solución 70 mM de carboxifluoresceína (Sigma Aldrich, St. Louis, MO. USA) en buffer HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico) (Amresco®, OH, USA), NaCl 110 mM. A las suspensiones de liposomas obtenidas se le realizaron luego 5 ciclos de congelación-descongelación y fueron pasadas 10 veces a través de una membrana de polycarbonato con un poro de 100 nm para obtener LUVs. La CF libre se retiró usando una columna de desalado PD-10 (GE Healthcare, Chicago, Illinois. EEUU). Los liposomas fueron incubados a temperatura ambiente con diferentes concentraciones de péptidos antimicrobianos (0,4 µM; 0,8 µM; 2 µM; 4 µM; 20 µM). La liberación de carboxifluoresceína fue monitoreada durante 20 min con un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Agilent Technology, Santa Clara, EEUU) utilizando una longitud de onda de excitación y emisión de 485/20 nm y 528/20 nm respectivamente. Concluido el experimento se lisó la totalidad de los liposomas con Triton X-100 (1µl, 10% p/v) para obtener la fluorescencia máxima.

La liberación de carboxifluoresceína se expresó como porcentaje según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ liberación} = \frac{[F - F_i]}{[F_t - F_i]} \times 100$$

Siendo F la fluorescencia medida en cada punto, F_i la fluorescencia inicial sin el agregado de péptido y F_t la fluorescencia máxima luego de agregado de Triton X-100.

1.2.8 Preparación de las vesículas unilamelares gigantes (GUVs)

Los GUVs son liposomas de escala celular con un diámetro entre 1 y 100 μm , que por su tamaño curvatura y presión lateral de los lípidos, permiten modelar interacciones de membrana en un contexto biofísicoquímico similar al de las células (Bhatia *et al.*, 2015). Los ensayos con GUVs permiten estudiar el efecto de los péptidos sobre vesículas individuales mediante el seguimiento por microscopía confocal, obteniéndose de esta manera más información sobre el mecanismo de acción de los péptidos estudiados.

Las GUVs fueron preparadas siguiendo el método desarrollado por Angelova y Dimitrov (Dimitrov, 1986; Angelova *et al.*, 2007). Un volumen de 10 μl de las soluciones de trabajo de lípidos bacterianos se depositó sobre dos placas cubiertas de óxido de indio y estaño (electrodos) y se colocaron en una cámara de vacío durante 16 h para evaporar totalmente el solvente. Se agregó luego una solución de sacarosa 310 mM entre los electrodos que fueron conectados inmediatamente a un controlador de campo eléctrico, interconectado a su vez a un generador de funciones de onda (Uni-Trend Technology, China). Se aplicó un campo eléctrico alternante que permite la formación de los GUVs. El campo, de baja frecuencia (onda sinusoidal de 10 Hz y una amplitud máxima de 1 V fue aumentando su amplitud en forma escalonada cada 3 min en 0,1 V) durante 2 h. Los liposomas formados por este procedimiento están cargados con sacarosa, son incoloros y presentaron un diámetro de entre 10 y 50 μm . Los GUVs obtenidos fueron retirados de la cámara y resuspendidos

en buffer HEPES (20 mM, NaCl 145 mM) con 5,6 carboxifluoresceína (2 μ M) en una placa plástica de 8 fosas (Lab-tek Brand Products, Naperville, IL, EEUU).

Debido a la diferencia de densidad entre la solución del interior de los liposomas y el buffer del exterior, los liposomas se ubican en el fondo de la cámara, facilitando así su observación. Las cámaras se colocaron en un microscopio confocal invertido (Zeiss LSM Pascal, Jena, Germany) y se inyectaron soluciones isoosmolares de los péptidos aureína, citropina o maculatina hasta obtener una concentración final de 200 μ M. La interacción de los péptidos y los liposomas se estudió por el seguimiento de las vesículas en función del tiempo. En este ensayo, los liposomas son incoloros y se encuentran inmersos en un buffer con carboxifluoresceína. Cambios en la permeabilidad de los GUVs se reflejarán en el ingreso de la CF en su interior. A través del análisis de imágenes con el software Fiji – ImageJ (NIH, USA) se midió la diferencia de intensidad de fluorescencia entre el interior y exterior de los liposomas. Los experimentos se repitieron al menos 3 veces y en cada uno se siguió la evolución de varios liposomas en luego de la inyección del péptido.

1.2.9 Penetración de péptidos antimicrobianos en monocapas lipídicas

Los modelos de monocapas lipídicas permiten estudiar de manera cuantitativa las interacciones de los péptidos con los lípidos que forman las membranas celulares, pudiendo comparar la afinidad de los péptidos por las membranas en estudio.

En estos ensayos se cuantificó la inserción espontánea de los péptidos en una monocapa lipídica a una presión superficial lateral inicial (Π_i), midiendo los cambios de presión superficial con una placa de platino conectada a una electrobalanza (KSV layer builder, biolin scientific Ab. Finland). Las monocapas de los lípidos se establecieron a la Π_i deseada sobre la superficie de 2 ml de buffer Tris-HCl (20 mM NaCl 145 mM pH 7,4) confinado en una cuba cilíndrica de teflón (3,8 cm²) a temperatura ambiente. Al estabilizarse la Π_i , se inyectaron los péptidos (0,3 -1,5 mM en DMSO) en la cuba a través de un orificio lateral. La inyección se realizó con agitación constante hasta alcanzar una concentración de péptido entre 800 y 1200 nM. Una vez estabilizado el sistema se mide la nueva presión superficial lateral (Π). Con los resultados de

estos experimentos se realizó una regresión lineal Π_i vs. $\Delta\Pi$ y se calculó la Π_i máxima a la que los péptidos no pueden ingresar en la monocapa (Π_{cutoff}) de forma espontánea. El Π_{cutoff} es el punto de la regresión cuando $\Delta\Pi=0$ y nos permite comparar la afinidad de los péptidos a los diferentes lípidos. Como control sin péptido se inyectaron en la cuba 10 μl de DMSO puro, no observándose cambios en la Π .

1.3 Resultados

1.3.1 Efecto de los péptidos antimicrobianos sobre las bacterias

1.3.1.1 Concentración inhibitoria mínima (CIM)

A fin de determinar la susceptibilidad de los lactobacilos estudiados a los AMPs se realizaron ensayos de CIM. Se probaron la β defensina humana 2 (hBD2), nisina, aureína 1.2, maculatina 1.1 y citropina 1.1. La nisina, es una bacteriocina de alto PM producida por *Lactococcus lactis*) que si bien es estructuralmente muy diferente a los otros AMPs se incluyó en este ensayo como un control positivo de péptido formador de poros (Zacharof y Lovitt, 2012). La determinación de la CIM nos permite comparar la sensibilidad relativa de las cepas con respecto a los diferentes péptidos y también comparar el poder inhibitorio de los péptidos entre sí. El valor de CIM de un péptido es inversamente proporcional a su poder inhibitorio.

En la Tabla 1.2 se resumen los resultados de los experimentos. Para todos los péptidos ensayados la cepa CIDCA 331 resultó ser más sensible que la cepa CIDCA 133. En el caso de los péptidos de anfibios las CIM determinadas para la cepa CIDCA 133 fueron el doble de la observada con la cepa CIDCA 331. Cuando se utilizó nisina, la CIM de la cepa CIDCA 133 fue cuatro veces mayor que la correspondiente a la cepa CIDCA 331. La CIM correspondiente a la cepa CIDCA 133 con la hBD2 fue 500 veces mayor que la de la cepa CIDCA 331. Al comparar los péptidos entre sí observamos que el que presentó mayor actividad antimicrobiana fue la hBD2, seguido por la nisina, luego se ubicaron la maculatina 1.1, la citropina 1.1 y la aureína 1.2.

Tabla 1.2. Concentración inhibitoria mínima de péptidos antimicrobianos

Péptido antimicrobiano	Cepa	
	CIDCA 331	CIDCA 133
Maculatina (μM)	$7,8 \times 10^{-1}$	1,6
Aureína (μM)	25,0	50,0
Citropina (μM)	1,6	3,1
hBD-2 (μM)	$1,0 \times 10^{-3}$	0,5
Nisina (μM)	$2,3 \times 10^{-1}$	0,9

1.3.1.2 Cinéticas de crecimiento

Una vez determinadas las CIM de los péptidos para ambos lactobacilos, se estudió la cinética de crecimiento de las bacterias en presencia de los péptidos de anfibios, con el objetivo de evaluar qué parámetros de la curva de crecimiento se encuentran más afectados. A fin de permitir el crecimiento de las bacterias se emplearon concentraciones de péptidos correspondientes a la mitad de la CIM de la cepa más sensible; en nuestro caso la cepa CIDCA 331.

A semejanza de los ensayos de CIM se evidenció un efecto diferente en las dos cepas utilizadas. Utilizando concentraciones de maculatina 1.1 ($0,4 \mu\text{M}$), aureína 1.2 ($12 \mu\text{M}$) y citropina 1.1 ($0,8 \mu\text{M}$), el crecimiento de la cepa CIDCA 133 fue semejante al control durante todas las etapas de la curva de crecimiento (Figura 1.2A). En el caso de la cepa CIDCA 331 se observó una inhibición significativa del crecimiento durante la fase exponencial de la curva para las mismas concentraciones (Figura 1.2B). Sin embargo, para dicha cepa, la cosecha máxima en el estado estacionario varió sólo ligeramente entre las células incubadas con los péptidos respecto a los controles. Esto indicaría que a concentraciones por debajo de la CIM los péptidos causarían un daño reversible en las células que permite a la población bacteriana recuperarse luego de 24 h de incubación. Un resultado semejante podría obtenerse también a consecuencia de una disminución de la inhibición por efecto estequiométrico debido al aumento del número de bacterias en crecimiento.

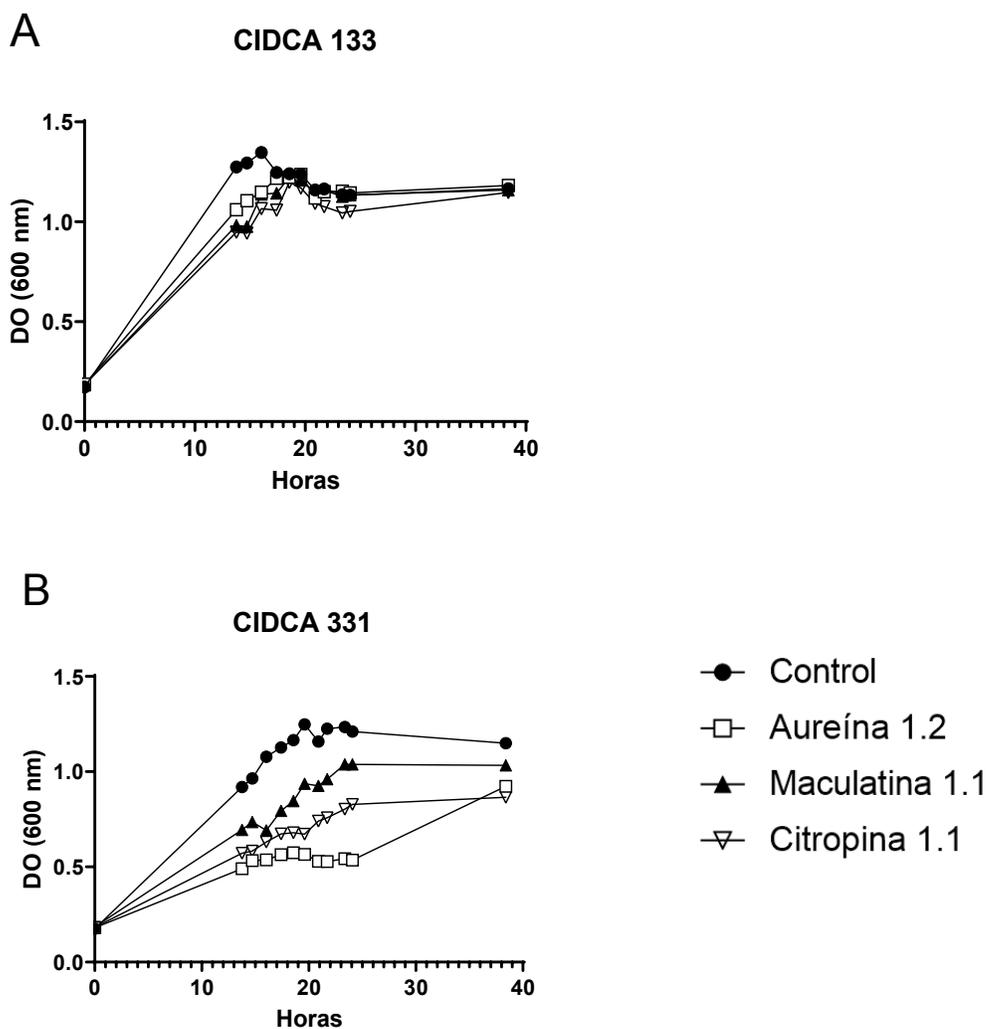


Figura 1.2: Cinéticas de crecimiento de las cepas CIDCA 133 (A) y CIDCA 331 (B) en presencia de péptidos antimicrobianos. Una concentración de 1×10^6 UFC/ml de cada cepa fue incubada a 37°C en MRS con $12 \mu\text{M}$ de aureína 1.2 (C); $0,8 \mu\text{M}$ de citropina1.1 (B); $0,8 \mu\text{M}$ de maculatina 1.1 (\$) y sin péptidos ("). Cada resultado representa la media \pm la desviación estándar de un experimento representativo $n=3$.

1.3.1.3 Citometría de flujo

Mediante los ensayos de CIM y de cinética de crecimiento se evaluó a nivel poblacional el efecto de los AMPs sobre los lactobacilos estudiados. Por otro lado, se realizaron ensayos de citometría de flujo de suspensiones bacterianas incubadas con los diferentes péptidos para evaluar el efecto en forma individual. La viabilidad de las bacterias se determinó utilizando las sondas fluorescentes SYTO 9 e ioduro de propidio. Para los ensayos realizados con los péptidos de anfibios se emplearon concentraciones de péptidos iguales a la CIM determinada para la cepa CIDCA 331. En la Figura 1.3A se muestran dos citogramas característicos de la marcación de bacterias con SYTO 9 e ioduro de propidio (IP) que constituyen el modelo de análisis para los diferentes péptidos. En la región R3 de los citogramas encontramos a las bacterias dañadas o muertas que dejan ingresar el IP; en la región R2 se encuentran las bacterias viables que sólo fueron marcadas con SYTO 9.

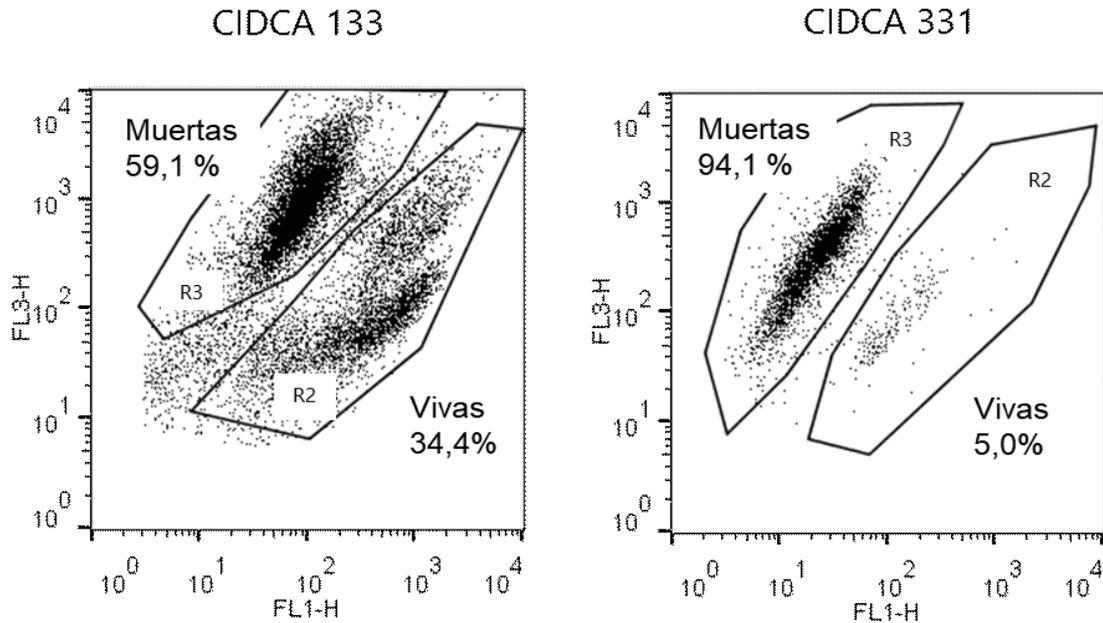
En la figura 1.3 A podemos observar la diferencia de sensibilidad al péptido citropina de las dos cepas estudiadas. En efecto, para la cepa CIDCA 133 encontramos en la región de células viables (R2) un 35% de las células frente al 5% que se observa para la cepa CIDCA 331, mientras que en la región de células dañadas (R3) hay una población del 65% de la cepa CIDCA 133 frente al 95% de las células de la cepa CIDCA 331.

En la Figura 1.3B se grafican los porcentajes de las bacterias vivas y muertas luego de incubarlas con los diferentes péptidos de anuros siguiendo el modelo de análisis explicado anteriormente. La cepa CIDCA 331 resultó ser más sensible a los péptidos estudiados; más del 95% de las células se ubicaron en la región correspondiente a las bacterias dañadas o muertas (R3), mientras que sólo el 5% restante se ubicó en la región de bacterias viables (R2). En el caso de la cepa CIDCA 133 los porcentajes de células en la región R2 (células viables) fueron significativamente mayores que los de la cepa 331 (20,5%; 33,8% y 29,4%) para aureína1.2, citropina1.1 y maculatina 1.1 respectivamente.

Los ensayos de citometría permitieron afirmar que en el daño producido por los AMPs de anuros sobre los lactobacilos involucra un aumento de la permeabilidad

de membrana, ya que luego de la incubación de las bacterias con los distintos péptidos aumenta en grado variable la entrada de IP a las células.

A



B

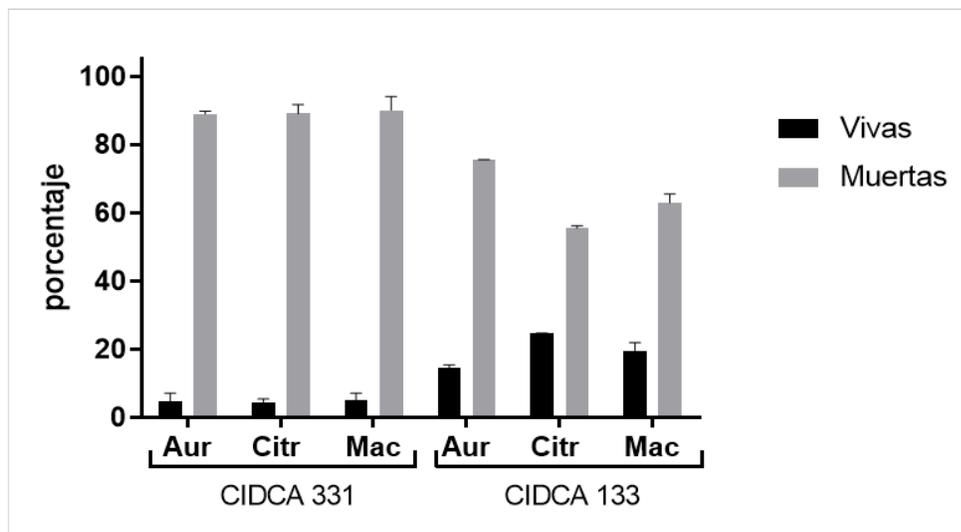
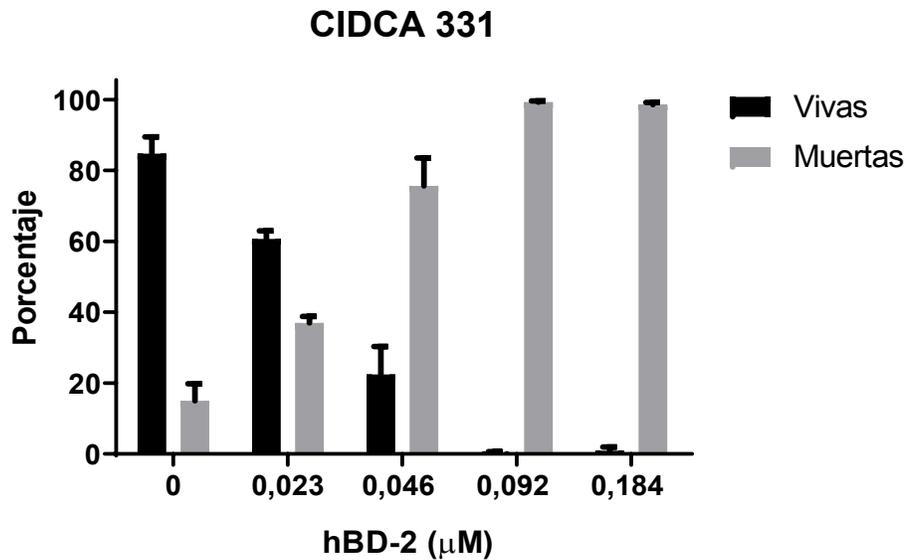


Figura 1.3 Citometría de flujo de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 tratadas con péptidos antimicrobianos de anuros. Las bacterias fueron tratadas con 24 μ M de aureína 1.2; 1,6 μ M de citropina 1.1 y 1,6 μ M de maculatina 1.1 por 60 min a 37 °C. A) Los dot plots muestran regiones de bacterias vivas y muertas de las cepas tratadas con citropina usando SYTO 9 e IP; B) Porcentaje bacterias viables (barras grises) y bacterias muertas (barras negras) dentro de la regiones R2 Y R3 surgido del análisis de dot plot para los diferentes péptidos, las Barras de error muestran el desvío standard de tres replicados.

Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos con los péptidos de anuros con los correspondientes a la hBD2; se incubaron los lactobacilos con concentraciones crecientes de la defensina (0,023 μM , 0,046 μM , 0,092 μM y 0,184 μM) durante 30 min y los resultados se analizaron por citometría de flujo (Figura 1.4). En ambas cepas se observó un claro efecto dosis-respuesta. La cepa CIDCA 133, en concordancia con resultados previos del grupo, resultó ser más resistente que la cepa CIDCA 331 a la hBD2. En efecto, el porcentaje de células vivas fue significativamente mayor en la cepa CIDCA 133 respecto a la cepa CIDCA 331 para todas las concentraciones ensayadas. Es de destacar que aún en concentraciones muy por debajo de la CIM de la cepa CIDCA 133 (CIM hBD2 0,5 μM) hay un alto porcentaje de células permeabilizadas. Si se observa para las concentraciones 0,092 y 0,184 μM se encontró un 60 y 80 % de células IP positivas. Teniendo en cuenta que a estas concentraciones tan inferiores a la CIM las células bacterianas estarían viables, podríamos hablar en este punto de un daño reversible a nivel de la permeabilidad de membrana. Por otro lado, hay que destacar que la viabilidad determinada por citometría de flujo, se basa en un concepto diferente a la hallada mediante recuentos microbianos o cinéticas de crecimiento los cuales se basan en la capacidad de reproducción.

A



B

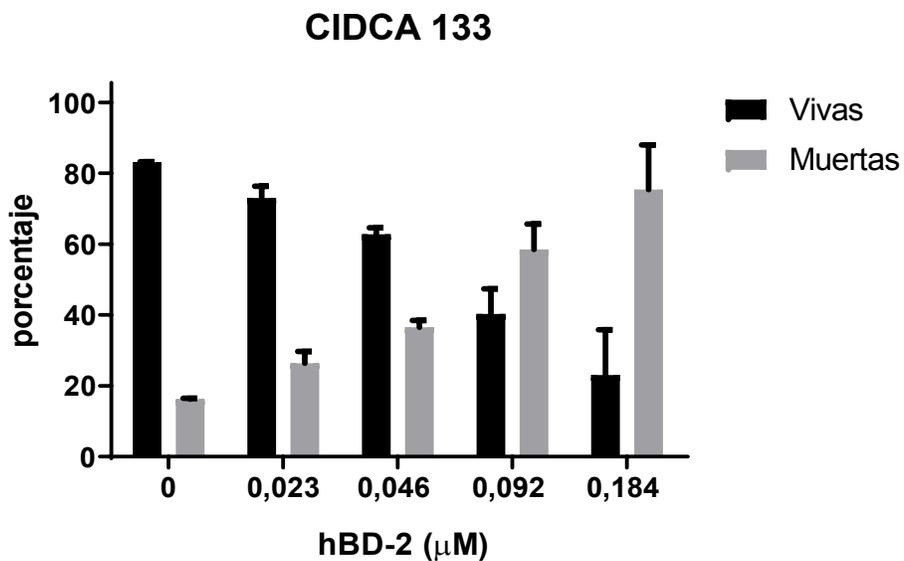


Figura 1.4: Citometría de flujo de cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 tratadas con hBD2. Las bacterias fueron incubadas con 0; 0,023 μM ; 0,046 μM ; 0,092 μM y 0,184 μM de hBD2 durante 60 min a 37 $^{\circ}\text{C}$. Se grafican Porcentaje bacterias viables (barras grises) y bacterias muertas (barras negras) dentro de la regiones R2 Y R3 surgido del análisis de citometría de flujo para los diferentes péptidos, las Barras de error muestran el desvío standard de tres replicados.

1.3.2 Efecto de los péptidos antimicrobianos sobre liposomas y monocapas lipídicas formados con lípidos bacterianos

En la sección anterior se estudió el efecto de los péptidos antimicrobianos sobre las bacterias enteras, encontrándose diferencias entre las cepas evaluadas. En esta sección se busca modelar la interacción de los péptidos y las bacterias utilizando modelos de monocapas lipídicas y liposomas formulados a partir de lípidos extraídos de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331, considerando que el blanco primario de los péptidos es la membrana celular.

1.3.2.1 Efecto de los AMPs sobre la liberación de carboxifluoresceína en vesículas unilamelares grandes (LUVs)

Con el objetivo de evaluar la interacción de los AMPs con los lípidos de las bacterias se realizaron experimentos con LUVs formados con lípidos bacterianos cargados con carboxifluoresceína. La interacción de los péptidos con los liposomas produce la liberación de la carboxifluoresceína generando un aumento de la fluorescencia en el medio. En la Figura 1.5 se muestra la liberación de carboxifluoresceína desde los LUVs luego de su incubación con los AMPs a diferentes concentraciones durante 20 min. Se observó que a altas concentraciones de péptido (20 μM); tanto los liposomas formados con los lípidos de la cepa CIDCA 133 como los formados con la cepa CIDCA 331 fueron desestabilizados por la presencia de los péptidos liberando entre el 80 y 100 % de la CF. Cuando los LUVs se incubaron a concentraciones menores se observó un comportamiento diferencial entre los liposomas de las bacterias, siendo los LUVs de la cepa CIDCA133 más resistentes que los de la cepa CIDCA 331. Por ejemplo, para el caso de la maculatina 1.1 a una concentración de 0,8 μM los liposomas de la cepa CIDCA 133 liberaron cerca de un 50 % de CF mientras que los de la cepa CIDCA 331, casi el 100 % de la CF. Un fenómeno semejante se observó para una concentración de citropina de 0,8 μM donde los liposomas de la cepa CIDCA 133 y CIDCA 331 liberaron 45 % y 87 % de la CF respectivamente. Para el caso de la aureína 1.2 la diferencia entre las formulaciones de liposomas se hizo evidente

recién a una concentración del péptido de 2 μM . A dicha concentración los liposomas de la cepa CIDCA 133 liberaron el 43 % de la CF mientras que los liposomas de la cepa CIDCA 331 liberaron el 86 %. La actividad relativa de los péptidos se correspondió con los resultados obtenidos por ensayos de dilución (CIM), siendo la maculatina 1.1 el péptido de mayor actividad, seguido en orden decreciente por la citropina 1.1 y la aureína 1.2.

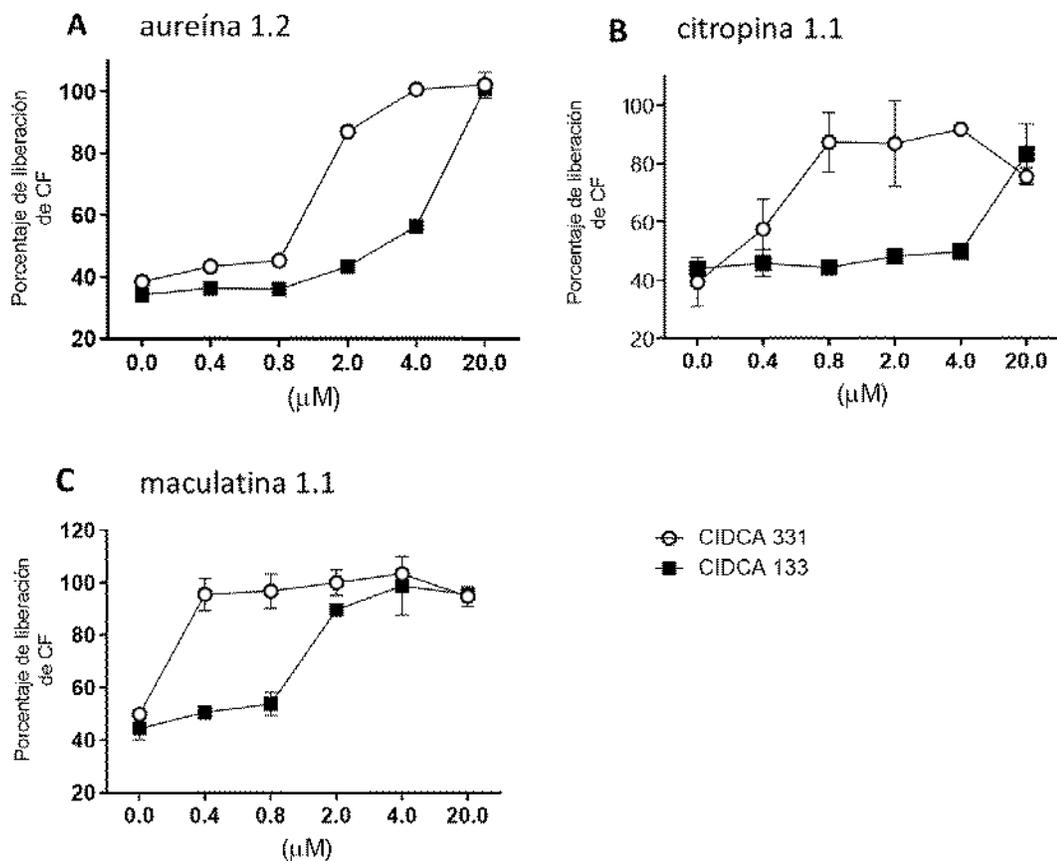


Figura 1.5: Liberación de 5 (6)- carboxifluoresceína (CF) de LUVs. Los liposomas se incubaron con diferentes concentraciones de péptidos de anuros por 20 min. A) aureína; B) Citropina y C) Maculatina. Los liposomas fueron formados a partir de los extractos lipídicos de las cepas CIDCA 133 (%) y la cepa 331 (!). Cada resultado representa la media \pm la desviación estándar de un experimento representativo n=2

1.3.2.2 Efecto de los AMPs sobre vesículas unilamelares gigantes (GUVs)

A fin de investigar el mecanismo por el que los AMPs alteran la permeabilidad de la membrana lipídica de los lactobacilos se realizaron ensayos con vesículas unilamelares gigantes que fueron monitoreadas por microscopía confocal. En este ensayo, los GUVs formados con los lípidos bacterianos no son fluorescentes y se encuentran en un buffer con carboxifluoresceína. La inyección de los AMPs en el medio permeabiliza las membranas y permite el ingreso de CF al interior de los liposomas. Se realizó un seguimiento individual de vesículas en el tiempo. La cinética de entrada de la CF en las vesículas, así como la evolución de la conformación de los liposomas brindan información sobre los posibles mecanismos de acción de los AMPs.

En la Figura 1.6 se ve un resumen de los resultados de estos experimentos. Los paneles de la izquierda corresponden a tiempo 0 y los de la derecha al tiempo final de observación. Asimismo, se muestran las densitometrías de intensidad de color realizadas a lo largo de los recuadros blancos que atraviesan los liposomas. Estas densitometrías permiten distinguir los liposomas intactos (presentan una diferencia de intensidad respecto al exterior) de los que fueron permeabilizados por los péptidos (no hay diferente intensidad de color respecto al exterior).

Al analizar las imágenes se observó que en presencia de maculatina 1.1 se registra un comportamiento similar entre los GUVs de ambas cepas de lactobacilos, con un ingreso del marcador fluorescente en los liposomas luego de 200 s. En las fotografías se observa como el interior de los liposomas, al principio oscuros, se cargan de CF y esto se comprueba además en los gráficos de intensidad de fluorescencia donde se pierde el contraste entre el exterior y el interior del liposoma a tiempo final. La estructura de los GUVs se conservó, aunque se detectó una tendencia a la coalescencia de los liposomas formulados con los lípidos de la cepa CIDCA 331 (Figura 1.6 A).

En presencia de aureína 1.2 y citropina 1.1, los GUVs formulados con los lípidos de la cepa CIDCA133 resultaron ser muy estables, no observándose evidencia del ingreso de colorante luego de 600 s de ensayo (Figura 1.6 B y C). En cambio, los GUVs formulados con lípidos de CIDCA 331 resultaron ser muy sensibles a la presencia de aureína y citropina dejando ingresar el colorante antes de los 300 s. También

pudo registrarse cierta coalescencia de los liposomas de la cepa CIDCA 331, lo cual es indicio de su desestabilización.

En general se observó que, luego de la incubación con los péptidos la CF ingresó tanto a los liposomas de la cepa CIDCA 133 como a los de la cepa 331 de una manera gradual, compatible con un mecanismo de acción de los AMPs de formación de poros. En la Figura 1.7 se muestra un caso representativo de este ingreso paulatino de la CF, con GUVs formados con lípidos de la cepa CIDCA 331 y el péptido aureína 1.2.

En cuanto a la potencia de los AMPs, los resultados de estos experimentos se condicen con los obtenidos previamente con los LUVs; mostrando un mayor efecto desestabilizador de la maculatina seguido por la citropina y la aureína.

A) maculatina 1.1

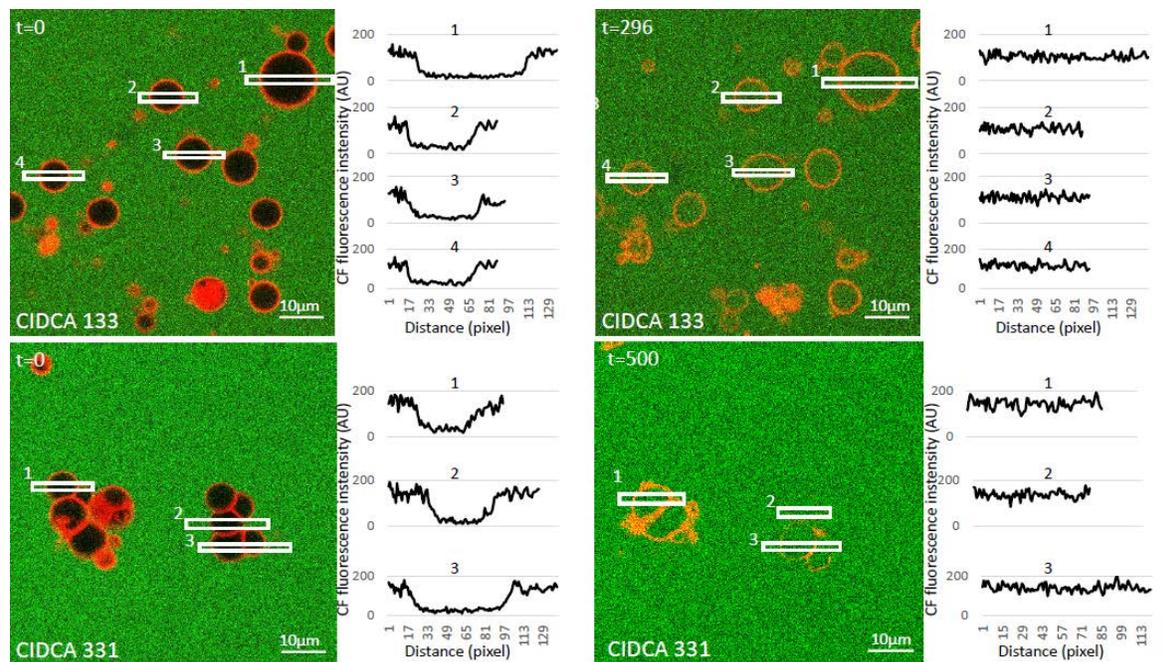
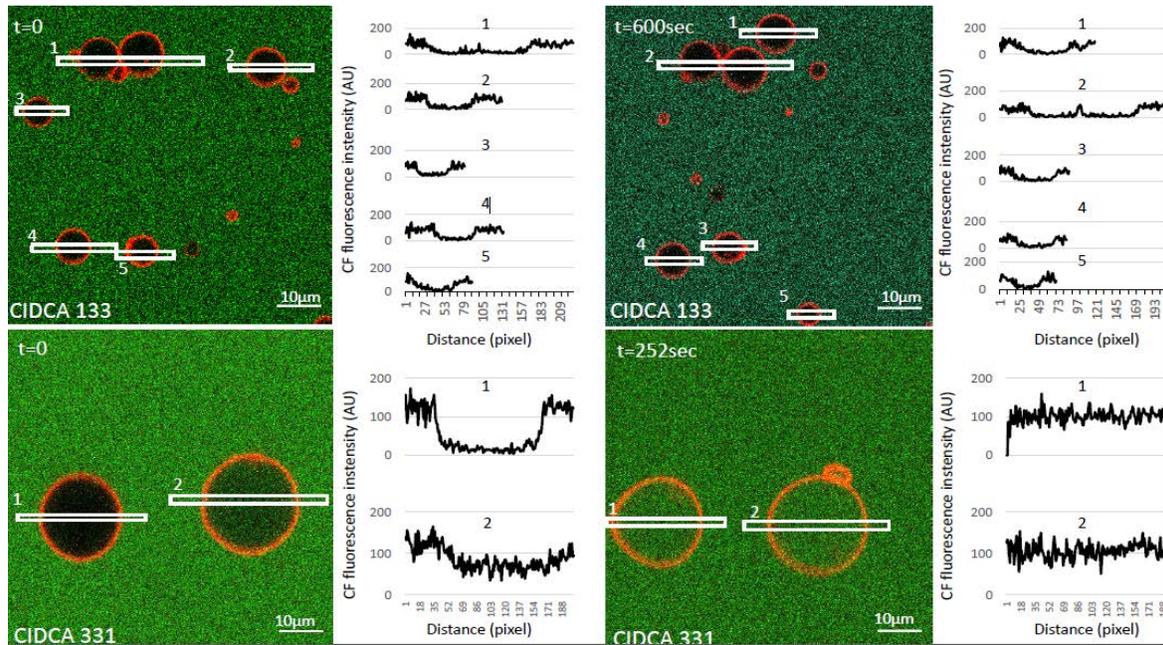


Figura 1.6. Leyenda en página 42

B) aureína 1.2



C) citropina 1.1

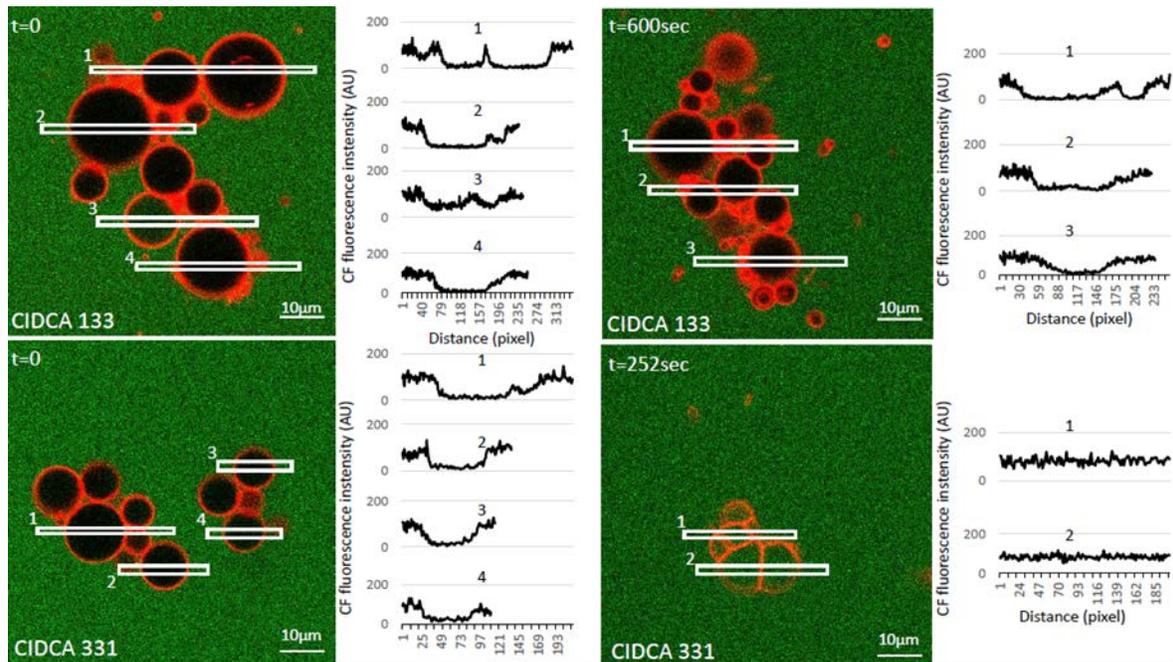


Figura 1.6: Microscopia confocal de GUVs tratados con AMPs. Los GUVs fueron preparados a partir de los extractos lipídicos de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331. Panel A: maculatina 1.1; Panel b: aureína 1.2; panel C: citropina 1.1. Los péptidos fueron agregados a 200 μ M. La densidad de fluorescencia verde (carboxifluoresceína) en la zona indicada por los rectángulos blancos se graficó a la derecha de la micrografía correspondiente.

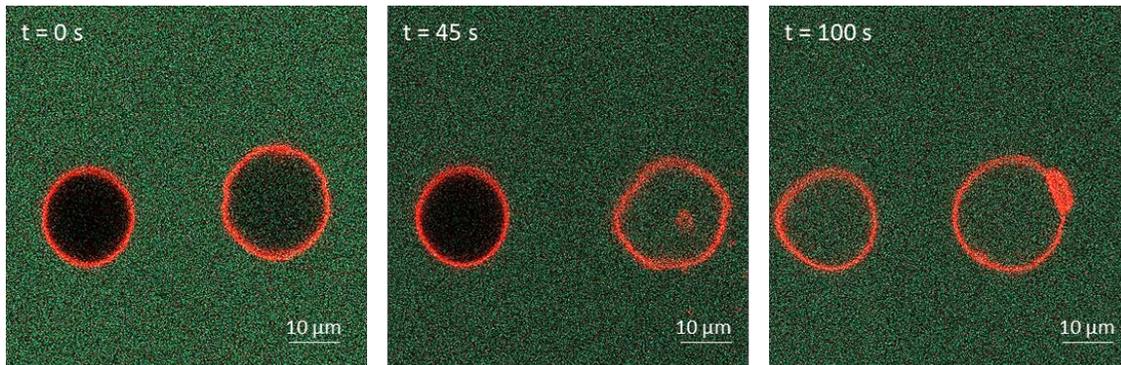


Figura 1.7: Microscopía confocal de GUVs de la cepa CIDCA331 tratados con aureína 1.2. Los péptidos fueron agregados a 200 μM . las fotografías muestran el ingreso de CF a los liposomas permeabilizados a tiempos 0 s, 45 s y 100 s luego de la inyección del péptido.

1.3.2.3 Interacción de péptidos antimicrobianos con monocapas lipídicas.

Los ensayos de monocapas permiten evaluar la afinidad de los péptidos con los lípidos de las cepas en estudio. Para comparar la afinidad de los péptidos por los lípidos se calcula la presión cut off (Π_{cutoff}), que representa la Π_i a la que no se observa inserción de péptidos. Esta presión comparada con la presión de una membrana real podría indicarnos si estos péptidos pueden insertarse en la membrana celular de una bacteria entera.

La Figura 1.8 muestra la inserción de los péptidos en las monocapas lipídicas expresada con $\Delta\Pi$ en función de la Π_i . Las $\Delta\Pi$ fueron mayores, en general, para la monocapas formadas con los lípidos de la cepa CIDCA 331, indicando mayor afinidad de los péptidos por los lípidos de esta cepa. La cepa CIDCA 331 tuvo también valores de Π_{cutoff} más altos que la cepa CIDCA 133 con todos los péptidos, estos se detallan en la Tabla 1.3. Todos los valores de Π_{cutoff} se ubicaron por encima de la presión lateral de una membrana real que se ubica en promedio entre 25 y 35 mN/m^2 (Ambroggio *et al.*, 2004), lo que indica que los péptidos podrían insertarse en las membranas de ambas cepas de lactobacilos.

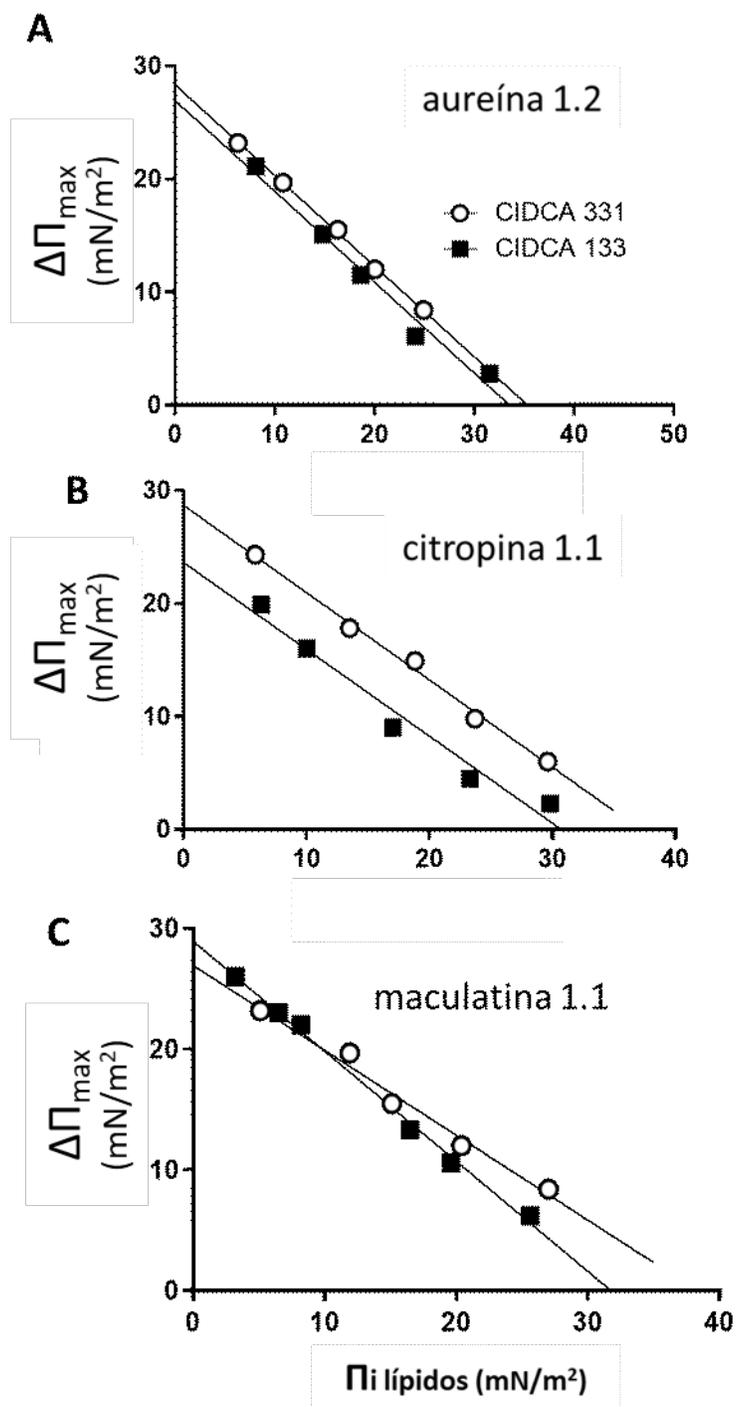


Figura 1.8: Máximo aumento de la presión superficial ($\Delta\Pi_{max}$) en función de la presión inicial (Π_i) de monocapas lipídicas. Lípidos de CIDCA 133 (■) y lípidos de CIDCA 331 (○); (A) aureína 1.2, (B) citropina 1.1 y (C) maculatina 1.1, La concentración final de los péptidos fue 200 nM. La subfase, fue Tris-HCl 20mM NaCl 145mM (pH 7,4).

Tabla 1.3: Presión lateral inicial de cut off (Π_{cutoff}).

Péptido antimicrobiano	Cepa	
	CIDCA 133	CIDCA 331
Aureína	33,5 mN/m ²	35,29 mN/m ²
Citropina	30,74 mN/m ²	37,15 mN/m ²
Maculatina	31,75 mN/m ²	38,32 mN/m ²

1.4 Discusión

En este capítulo se buscó ahondar en el estudio de la susceptibilidad de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 frente a péptidos antimicrobianos de anuros que poseen un origen y estructuras diferentes a las β defensinas humanas previamente estudiadas. Como se mencionó, las cepas CIDCA 133 y 331 presentan una sensibilidad diferente frente a las β defensinas humanas (hBD2 y hBD1) siendo la cepa CIDCA 133 más resistente que la cepa CIDCA 331. Esta susceptibilidad diferencial podría ser extrapolable a otros AMPs y también podría determinar aspectos relevantes en la interacción con el hospedador.

Los péptidos estudiados fueron los péptidos de la piel de la rana australiana del género *Litoria*, maculatina, aureína y citropina. Estos péptidos son candidatos a ser usados como alternativa a antibióticos y poseen una estructura α hélice poco frecuente en los AMPs de humanos.

Los ensayos de interacción de los AMPs de anuros con bacterias enteras (CIM, cinética de crecimiento y citometría de flujo) mostraron una mayor susceptibilidad de la cepa CIDCA 331 frente a la cepa CIDCA 133. La cepa CIDCA 331 presentó valores menores de CIM, un retraso en el crecimiento y un fuerte aumento de la permeabilidad de membrana. Se observó además que los AMPs mostraron diferentes efectos sobre la viabilidad de las bacterias siendo más activa la maculatina, seguido por la citropina y por último la aureína.

Estos resultados, semejantes a los obtenidos con β defensinas, pueden explicarse en base a la composición lipídica de la membrana celular de ambos lactobacilos (Hugo, De Antoni, y Pérez 2010). Debido a la diferencia en la relación glicolípidos /fosfolípidos entre ambas bacterias, la cepa CIDCA 331 posee una mayor densidad

de carga negativa que la cepa CIDCA 133 (la cepa CIDCA 331 posee más fosfolípidos respecto a los glicolípidos). Efectivamente la determinación de potencial ζ (zeta) arrojó un valor de $-28,9 \pm 2,2$ para a cepa CIDCA 331 y $-5,07 \pm 1,5$ para la cepa CIDCA 133 (Hugo, 2007; Tymczynsyn *et al.*, 2007a). La mayor densidad de carga negativa superficial y de membrana de la cepa CIDCA 331 favorece la interacción con los AMPs cargados positivamente.

Por otra parte, la carga neta de los péptidos también influye en la actividad de los mismos. A lo largo de los ensayos se observó una diferente actividad entre los péptidos, (hBD2 > maculatina1.1 > citropina1.1 > aureína 1.2) que se ordenan de mayor a menor coincidentemente con su carga. En efecto, la hBD2 presenta una carga neta de +7, la maculatina 1.1 de +3, la citropina 1.1 una carga neta de +2 y la aureína 1.2 de +1 lo que explica en parte su efectividad (Apponyi *et al.*, 2004; Seto *et al.*, 2007; Li, Zhu y Beuerman, 2009).

Durante los ensayos utilizando liposomas y monocapas formados con los lípidos bacterianos se observó una buena correlación con los resultados obtenidos en los ensayos con las bacterias enteras. Estos modelos de membrana resultaron útiles para indagar sobre las interacciones péptido-bacterias a nivel de la membrana celular.

Cuando se utilizaron LUVs los liposomas formulados con los lípidos de la cepa CIDCA 133 fueron más estables que los de la cepa CIDCA 331, cuando se los enfrentó a concentraciones bajas de los diferentes péptidos. Esta diferencia de estabilidad entre las diferentes cepas también se mantuvo con los GUVs.

Los resultados obtenidos en los ensayos con GUVs brindaron más información sobre los mecanismos por los cuales los péptidos podrían alterar la permeabilidad de las membranas de los liposomas.

Se sabe que el largo de los péptidos puede influir en el mecanismo de acción empleado para desestabilizar las membranas. Como se mencionó anteriormente, la formación de poros toroidales o en empalizada está favorecida en péptidos de mayor longitud, mientras que una interacción tipo alfombra, suele presentarse en péptidos más cortos. Estos mecanismos requieren a su vez de distinto número de moléculas para ser efectivos (Apponyi *et al.*, 2004). De hecho, los péptidos largos que

forman poros necesitan menos moléculas para lograr su efecto permeabilizante mientras que mediante el mecanismo de tipo alfombra es necesaria la adhesión de gran número de moléculas. Estas generalizaciones podrían explicar la mayor actividad observada para la hBD2 y maculatina respecto a la citropina y aureína. En efecto, la hBD2 y la maculatina son péptidos largos y podrían formar un poro real atravesando la membrana aún con relativamente pocas moléculas. Por otra parte la citropina y la aureína, de secuencia más corta, actuarían con el mecanismo de tipo alfombra que necesita de un mayor número de moléculas para ser efectivo.

Estudios anteriores con GUVs formados con fosfatidilcolina (POPC) o una mezcla de fosfatidilglicerol/fosfatidilcolina (POPG/POPC) corroboraron que la citropina y la aureína actuaban mediante un mecanismo de tipo alfombra (Ambroggio *et al.*, 2005). Sin embargo, en los ensayos realizados en este trabajo se observó que en los GUVs formulados con los lípidos de lactobacilos la citropina 1.1, aureína 1.2 y maculatina 1.1, tuvieron un comportamiento similar, semejante al de un péptido formador de poros. En efecto, en estos ensayos los GUVs permitieron la entrada de la CF paulatinamente sin perder su integridad y además se pudo observar la recuperación de la fluorescencia luego de inducir fotobleaching dentro de liposomas permeabilizados (datos no mostrados). El fotobleaching se produce cuando se ilumina un fluoróforo con una luz intensa produciendo la pérdida de fluorescencia. La recuperación de fluorescencia en los GUVs formados con lípidos bacterianos luego del fotobleaching muestra el reingreso del fluoróforo al liposoma a través de poros. Si la desestabilización de la membrana hubiera sido a través de un mecanismo compatible con el modelo de tipo alfombra, el fluoróforo no podría haber reingresado ya que la alteración de la estructura del liposoma es mayor.

En el mismo sentido la formación de un poro estable por parte de la aureína 1.2 es compatible con los resultados obtenidos a través de estudios de modelado computacional de dinámica molecular realizados en un grupo colaborador (Balatti, 2020). Balatti mostró que modelando las interacciones de las moléculas de aureína 1.2 con membranas de composición lipídica similar a CIDCA 331, se producían poros estables que permitían el paso de agua y de moléculas como la sacarosa.

Este diferente mecanismo de acción propuesto para la citropina y aureína frente a los liposomas formados con los lípidos bacterianos respecto a las mezclas POPC se podría atribuir a la mayor complejidad de lípidos. Podría suceder que los lípidos bacterianos resistan el efecto de la solubilización típico del mecanismo de tipo alfombra de la aureína y citropina con lo cual estos péptidos darían lugar a la formación de poros. Nuestros resultados por lo tanto sugieren que frente a composiciones lipídicas diferentes un mismo AMP podría presentar distintos mecanismos de acción.

Los ensayos con monocapas lipídicas también evidenciaron que los péptidos estudiados tienen mayor afinidad por los lípidos de la cepa CIDCA 331 que por los de la cepa CIDCA 133. También se pudo ver que los péptidos podrían ingresar a la monocapa a presiones laterales de los lípidos comparables a las de las membranas naturales y por lo tanto podrían insertarse en membranas de células enteras (Ambroggio *et al.*, 2004).

Los estudios que se realizaron en este capítulo permitieron ampliar el panorama de resistencia de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 y correlacionar la susceptibilidad diferencial frente a péptidos antimicrobianos catiónicos, no solamente abarcando a las β defensinas humanas, sino también a péptidos de diferente origen y estructura como son la los α péptidos de anuros. Asimismo, los resultados obtenidos mostraron que la composición de las membranas bacterianas no sólo influye en la susceptibilidad de los lactobacilos sino también en el mecanismo de acción de los AMPs.

Una mirada global sobre este capítulo nos permite concluir que la composición lipídica de las membranas de los lactobacilos constituye un factor crucial en la interacción con péptidos antimicrobianos. Esto podría implicar ventajas para cepas de baja susceptibilidad como la CIDCA 133, que se verían favorecidas en el entorno intestinal. Por otro lado, los efectos encontrados con péptidos derivados de anuros, plantean un escenario interesante respecto a propiedades conservadas evolutivamente de efectores claves de la respuesta inmune innata.

1.5 Bibliografía

- Ambroggio, Ernesto E., Frances Separovic, John Bowie, y Gerardo D. Fidelio. 2004. "Surface behaviour and peptide-lipid interactions of the antibiotic peptides, Maculatin and Citropin". *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1664 (1): 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.03.013>.
- Ambroggio, Ernesto E., Frances Separovic, John H. Bowie, Gerardo D. Fidelio, y Luis A. Bagatolli. 2005. "Direct Visualization of Membrane Leakage Induced by the Antibiotic Peptides: Maculatin, Citropin, and Aurein". *Biophysical Journal* 89 (3): 1874–81. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.066589>.
- Angelova, M. I., S. Soléau, Ph. Méléard, F. Faucon, y P. Bothorel. 2007. "Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications". *Trends in Colloid and Interface Science VI* 131 (899): 127–31. <https://doi.org/10.1007/bfb0116295>.
- Apponyi, M.A., T.L. Pukala, C.S. Brinkworth, V.M. Maselli, J.H. Bowie, M.J. Tyler, G.W. Booker, et al. 2004. "Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanisms of action and evolutionary significance". *Peptides* 25: 1035–54. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.03.006>.
- Balatti, Galo E. 2020. "Estudio de las interacciones diferenciales de péptidos antimicrobianos sobre membranas modelo de composición variable". Universidad de Buenos Aires.
- Bhatia, Tripta, Peter Husen, Jonathan Brewer, Luis A. Bagatolli, Per L. Hansen, John H. Ipsen, y Ole G. Mouritsen. 2015. "Preparing giant unilamellar vesicles (GUVs) of complex lipid mixtures on demand: Mixing small unilamellar vesicles of compositionally heterogeneous mixtures". *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1848 (12): 3175–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.09.020>.
- Boto, Alicia, Jose Manuel Pérez De La Lastra, y Concepción C. González. 2018. "The road from host-defense peptides to a new generation of antimicrobial drugs". *Molecules* 23 (2). <https://doi.org/10.3390/molecules23020311>.
- Dimitrov, Dimiter S. 1986. "Liposome Electro formation", 303–11.
- Doyle, Jason, Craig S. Brinkworth, Kate L. Wegener, John A. Carver, Lyndon E. Llewellyn, Ian N. Olver, John H. Bowie, Paul A. Wabnitz, y Michael J. Tyler. 2003. "nNOS inhibition, antimicrobial and anticancer activity of the amphibian skin peptide, citropin 1.1 and synthetic modifications: The solution structure of a modified citropin 1.1". *European Journal of Biochemistry* 270 (6): 1141–53. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03462.x>.
- Gómez Zavaglia, A, E a Disalvo, y G L De Antoni. 2000. "Fatty acid composition and freeze-thaw resistance in lactobacilli." *The Journal of dairy research* 67 (2): 241–47. <https://doi.org/10.1017/S0022029900004179>.

-
- Guilhelmelli, Fernanda, Nathália Vilela, Patrícia Albuquerque, Lorena da S Derengowski, Ildinete Silva-Pereira, y Cynthia M. Kyaw. 2013. "Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance". *Frontiers in Microbiology* 4 (DEC): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00353>.
- Hugo, A. A., E. E. Tymczyszyn, A. Gómez-Zavaglia, y P. F. Pérez. 2012. "Effect of human defensins on lactobacilli and liposomes". *Journal of Applied Microbiology* 113 (6): 1491–97. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05433.x>.
- Hugo, A A, G L De Antoni, y P F Pérez. 2010. "Lactobacillus delbrueckii subsp lactis (strain CIDCA 133) resists the antimicrobial activity triggered by molecules derived from enterocyte-like Caco-2 cells". *Letters in Applied Microbiology* 50 (4): 335–40.
- Hugo, Ayelén A. 2007. "Capacidad probiótica de la cepa CIDCA 133 (Lactobacillus delbrueckii subsp lactis): un recorrido desde modelos in vitro a in vivo". Universidad Nacional de La Plata. <https://doi.org/10.35537/10915/2360>.
- Jarczak, J., E.M. Kościuczuk, P. Lisowski, N. Strzałkowska, A. Józwik, J. Horbańczuk, J. Krzyzewski, L. Zwierzchowski, y E. Bagnicka. 2013. "Defensins: Natural component of human innate immunity". *Human Immunology* 74 (9). <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2013.05.008>.
- König, Enrico, Olaf R.P. Bininda-Emonds, y Chris Shaw. 2015. "The diversity and evolution of anuran skin peptides". *Peptides* 63: 96–117. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.11.003>.
- Kumar, Prashant, Jayachandran N. Kizhakkedathu, y Suzana K. Straus. 2018. "Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo". *Biomolecules* 8 (1). <https://doi.org/10.3390/biom8010004>.
- Li, Jing, Hong Yuan Zhu, y Roger W. Beuerman. 2009. "Stimulation of specific cytokines in human conjunctival epithelial cells by defensins HNP1, HBD2, and HBD3". *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 50 (2): 644–53. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-1838>.
- Man, J. C. De, M. Rogosa, y M. Elisabeth Sharpe. 1960. "A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI". *Journal of Applied Bacteriology* 23 (1): 130–35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>.
- Meng, Shuo, Huanli Xu, y Fengshan Wang. 2010. "Research Advances of Antimicrobial Peptides and Applications in Food Industry and Agriculture". *Current Protein & Peptide Science* 11 (4): 264–73. <https://doi.org/10.2174/138920310791233369>.
- Mergaert, P. 2018. "Role of antimicrobial peptides in controlling symbiotic bacterial populations". *Natural Product Reports* 35 (4): 336–56. <https://doi.org/10.1039/c7np00056a>.
- Moal, Vanessa Lievin-Le, y Alain L Servin. 2006. "The Front Line of Enteric Host Defense against

Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides and Microbiota." *Clinical Microbiology Reviews* 19 (2): 315–37. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.315>.

Niederle, M. V., J. Bosch, C. E. Ale, M. E. Nader-Macías, C. Aristimuño Ficoseco, L. F. Toledo, A. Valenzuela-Sánchez, C. Soto-Azat, y S. E. Pasteris. 2019. "Skin-associated lactic acid bacteria from North American bullfrogs as potential control agents of *Batrachochytrium dendrobatidis*". *Plos One* 14 (9): e0223020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223020>.

Okumura, Ryu, y Kiyoshi Takeda. 2018. "Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers". *Inflammation and Regeneration* 38 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/s41232-018-0063-z>.

Rozek, Tomas, Kate L. Wegener, John H. Bowie, Ian N. Olver, John A. Carver, John C. Wallace, y Michael J. Tyler. 2000. "The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*: The solution structure of aurein 1.2". *European Journal of Biochemistry* 267 (17): 5330–41. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01536.x>.

Seto, Gordon W J, Seema Marwaha, Daniel M. Kobewka, Ruthven N A H Lewis, Frances Separovic, y Ronald N. McElhaney. 2007. "Interactions of the Australian tree frog antimicrobial peptides aurein 1.2, citropin 1.1 and maculatin 1.1 with lipid model membranes: Differential scanning calorimetric and Fourier transform infrared spectroscopic studies". *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1768 (11): 2787–2800. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.018>.

Suarez-Carmona, M, P Hubert, P Delvenne, y M Herfs. 2015. "Defensins: 'Simple' antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules?" *Cytokine and Growth Factor Reviews*. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84921342780&partnerID=40&md5=47ef05cd92d04dd7e3dbe328eb2e8b92>.

Tymczynsyn, E. E., M. Del Rosario Díaz, A. Gómez-Zavaglia, y E. A. Disalvo. 2007. "Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose". *Journal of Applied Microbiology* 103 (6): 2410–19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03482.x>.

Wimley, William C. 2010. "Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model". *ACS Chemical Biology* 5 (10): 905–17. <https://doi.org/10.1021/cb1001558>.

Winter, Jochen, y Matthias Wenghoefer. 2012. "Human defensins: Potential tools for clinical applications". *Polymers* 4 (1): 691–709. <https://doi.org/10.3390/polym4010691>.

Zacharof, M.P, y R.W. Lovitt. 2012. "Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article". *APCBEE Procedia* 2: 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010>.

Zhang, Ling-juan, y Richard L Gallo. 2016. "<Zhang, Gallo_2016_Antimicrobial peptides.pdf>". *CURBIO* 26 (1): R14–19. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>.



Capítulo 2:

Caracterización de liposomas formulados con lípidos bacterianos de la cepa CIDCA133.



2.1 Introducción

Los liposomas son vesículas lipídicas que pueden utilizarse como modelos de estudio de la membrana plasmática y como vehículos para el transporte de sustancias bioactivas. Es de destacar que, incluso en forma natural, la mayoría de las bacterias producen y liberan vesículas extracelulares (bacterial membrane vesicles, MVs) formadas con porciones de la membrana plasmática (semejantes a liposomas) que transportan distintas sustancias (DNA, toxinas, fagos). Esto resulta relevante para distintas funciones como transferencia horizontal de genes, infección fágica, y comunicación célula-célula. Actualmente reviste especial interés la utilización de éstas vesículas de membrana en biomedicina o nanotecnología (Toyofuku, Nomura y Eberl, 2019).

En el capítulo anterior se formularon liposomas con los lípidos extraídos de los lactobacilos para evaluar su estabilidad frente a péptidos antimicrobianos (AMPs). Considerando la mayor resistencia de los liposomas formulados con los lípidos extraídos de la cepa CIDCA 133 frente a los α y β AMPs se decidió profundizar en otras propiedades de estos liposomas que podrían ser relevantes para la interacción con células eucarióticas. En este capítulo se abordó la caracterización de liposomas formulados con los lípidos de la cepa CIDCA 133 comparándolos con liposomas de lecitina (fostatidilcolina).

Los liposomas poseen la capacidad de encapsular sustancias de orígenes diversos como péptidos, oligonucleótidos o plásmidos. Por su naturaleza anfífilica pueden encapsular tanto sustancias hidrofóbicas como hidrofílicas (Jones, 2013). Se destacan también por su biocompatibilidad, su baja inmunogenicidad, baja toxicidad, bajo costo de fabricación y facilidad de funcionalización (Cleal *et al.*, 2013). Sin embargo,

las formulaciones convencionales de liposomas poseen una pobre penetración celular y baja estabilidad en el torrente sanguíneo, por lo que deben ser modificados para aumentar su desempeño *in vivo* (Oku, 1999; Tseng, 2002). Esto se logra variando la composición lipídica de las formulaciones o agregando diferentes moléculas que mejoren la interacción de los liposomas con los sitios blanco.

La composición lipídica de los liposomas determinará gran parte de sus características fisicoquímicas, así como su estabilidad y su afinidad por diferentes sustancias a transportar. Lípidos que contengan ácidos grasos insaturados, como por ejemplo el ácido linoleico (18:2), favorecerán la flexibilidad de la membrana al modificar su fluidez, aumentando así la estabilidad de los liposomas. Los lípidos cargados positivamente pueden mejorar la interacción con compuestos aniónicos por interacciones electrostáticas como por ejemplo la unión de DNA con el reactivo lipofectamina (formulado con lípidos catiónicos y neutros) (Drummond, Zignani y Leroux, 2000). Los lípidos cargados negativamente, como la dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), pueden disminuir la interacción de los liposomas con proteínas del suero ya que la mayoría de éstas poseen carga negativa y serían repelidas electrostáticamente (Foteini *et al.*, 2019). Por otra parte, los azúcares unidos a las cabezas polares de los fosfolípidos formando glicolípidos, pueden proteger la integridad de los liposomas durante procesos de stress osmótico, al interactuar mejor con el agua circundante formando puentes de hidrógeno (Bendas *et al.*, 1996).

Los lípidos de bacterias ácido lácticas resultan buenos candidatos para la formulación de liposomas ya que contienen una alta relación de ácidos grasos insaturados: saturados y una alta relación molar de azúcares: lípidos, composición que les otorgarían mayor estabilidad y resistencia al *stress* osmótico. Los lípidos de las bacterias ácido lácticas en particular, están compuestos por cardiolipina y fosfatidilglicerol como los principales fosfolípidos, además de glicolípidos y lípidos neutros (Gómez Zavaglia, Disalvo, y De Antoni 2000). En las bacterias los lípidos de la membrana celular cumplen un papel crucial en su respuesta frente a diferentes tipos de *stress* ambiental como son la deshidratación o los cambios de temperatura (Gómez Zavaglia, Disalvo y De Antoni, 2000). Estas propiedades podrían ser aprovechadas también para aumentar la estabilidad de las formulaciones de liposomas.

El agregado de polímeros u otro tipo de moléculas a la formulación de los liposomas contribuye a mejorar su desempeño para interactuar con células eucariotas, vehicular compuestos u otorgarles nuevas funcionalidades. Estas nuevas funcionalidades pueden convertirlos en liposomas que responden a estímulos como cambios de pH o temperatura, así como otorgarles otras propiedades como aumentar su tiempo de vida media, o dirigirse a receptores específicos. En este sentido, el agregado de polímeros como el polietilenglicol (PEG) puede proteger a los liposomas de la acción de las proteínas del suero aumentando su vida media, impidiendo que las opsoninas se unan a su superficie (Środa *et al.*, 2005). La adición de azúcares como la sacarosa o la trehalosa en las suspensiones de liposomas aumentan la estabilidad de la membrana durante procesos de *stress* osmótico por remplazo de moléculas de agua de hidratación de los lípidos, previniendo así la fusión de los liposomas y la pérdida de su contenido (Crowe, Crowe y Rudolph, 1985; Harrigan, Madden y Cullis, 1990). Es de destacar también que la conjugación de liposomas con anticuerpos monoclonales pueden dirigirlos a blancos específicos (Huwlyer, Drewe y Krähenbühl, 2008).

Uno de los polímeros utilizados para modificar las propiedades de liposomas es el colesterol- poli (2-dimetilaminoetil metacrilato) (CHO-PDMAEMA). Se trata de un polímero catiónico capaz de modificar su conformación con los cambios de pH. La adición de una molécula de colesterol (CHO) permite que el polímero se ancle a los liposomas y pueda ser incorporado establemente a los mismos. El agregado de este polímero a formulaciones de liposomas los hace sensibles a los cambios de pH y por su carga positiva a pH=7 favorece su interacción con las superficies de carga negativa como por ejemplo las membranas de las células eucariotas. Su estructura se muestra en la Figura 2.1.

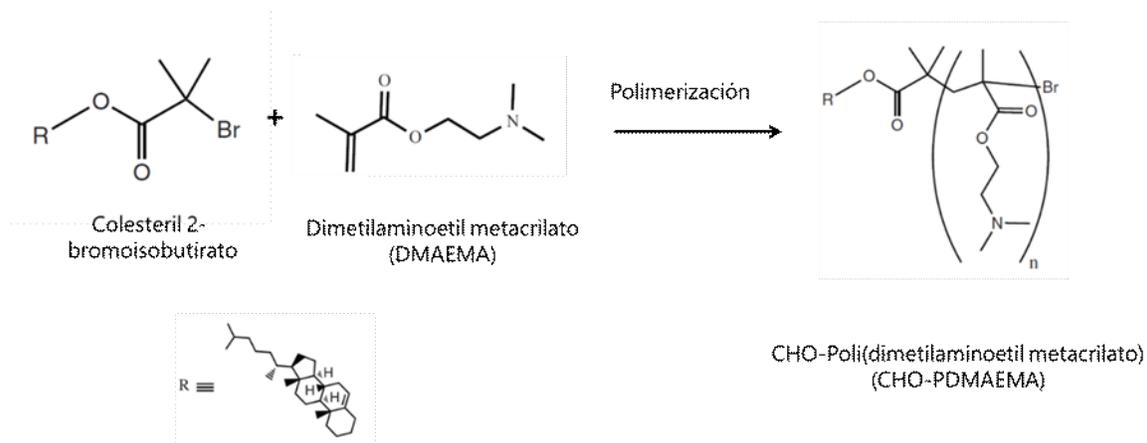


Figura 2.1 Polimerización de PDMAEMA

Durante los ensayos realizados en este trabajo de tesis se elaboraron formulaciones de liposomas con y sin el agregado del polímero catiónico CHO-PDMAEMA a fin de otorgarles nuevas propiedades. Estas propiedades se evaluaron en el contexto de interacción con el hospedador, utilizando para ello distintos modelos de células eucariotas en cultivo.

Se sabe que los liposomas se pueden incorporar a las células eucariotas de forma pasiva por fusión en la membrana celular o en forma activa con gasto de energía por medio de diferentes mecanismos de endocitosis. La endocitosis implica la incorporación del liposoma al interior del citoplasma a través de la emisión de prolongaciones de la membrana plasmática y su alojamiento en una vesícula intracelular. Las diferentes vías de endocitosis conducen las vesículas formadas a distintos compartimentos intracelulares, algunos de ellos degradativos. El conocimiento de los mecanismos de endocitosis que la célula eucariota emplea para captar determinados liposomas permite mejorar las estrategias de transporte de sustancias buscando la utilización de vías no degradativas intracelulares.

Las vías de endocitosis de las células eucariotas se pueden clasificar en dos grandes categorías, fagocitosis y pinocitosis. La fagocitosis se produce en células especializadas del sistema inmune (principalmente macrófagos y neutrófilos) e interviene en la incorporación de microorganismos y cuerpos apoptóticos, siendo principalmente una vía degradativa (Nordenfelt y Tapper, 2011). La pinocitosis se presenta en todas las células y comprende las vías de incorporación de pequeños volúmenes

de líquidos y solutos que pueden ser conducidos tanto a vesículas degradativas como no degradativas.

Existen descritas al menos cuatro vías de pinocitosis bien diferenciadas: la endocitosis mediada por clatrin, la endocitosis por caveolas, macropinocitosis y la endocitosis independiente de clatrin o caveolas (Cleal *et al.*, 2013).

La vía mediada por clatrin comienza con la unión de ligandos a receptores específicos en la membrana de las células (receptores de lipoproteínas LDL, receptores de transferrina entre otros), los complejos receptor-ligando luego se agrupan en zonas de la membrana plasmática que se recubren de clatrin formando una vesícula intracelular. Este endosoma comienza a acidificarse y termina fusionándose con compartimentos lisosomales, donde el pH ácido activa enzimas líticas constituyendo así una vía degradativa.

Las caveolas son pequeños microdominios hidrofóbicos de las membranas plasmáticas ricos en colesterol y glicosfingolípidos. Asociadas a las caveolas se encuentran las caveolinas, una familia de proteínas que se unen a colesterol (Matveev *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2002). A través de la vía de caveolas se endocitan ligandos como el virus sv40, la toxina del cólera y la albúmina (Khalil *et al.*, 2006). Las vesículas formadas por esta vía, caveosomas, son transportadas directamente al aparato de Golgi y o al retículo endoplasmático sin pasar por los compartimentos lisosomales (Ferrari *et al.*, 2003).

La macropinocitosis es un mecanismo de endocitosis no específica, en el que se generan grandes vesículas por una invaginación de la membrana plasmática mediada por actina. Por el tamaño de las vesículas formadas es una forma eficiente de incorporar a la célula macromoléculas solubles y en algunos casos hasta bacterias enteras (Boye *et al.*, 2016). En macrófagos la vía de macropinocitosis produce macropinosomas que se acidifican y luego termina fusionándose con compartimentos lisosomales (Meier *et al.*, 2002). En células no fagocíticas el camino que recorren los macropinosomas es distinto, no se dirigen hacia lisosomas y sus contenidos son reciclados nuevamente hacia la membrana citoplasmática, constituyendo así una vía no degradativa (Swanson y Watts, 1995).

En un cuarto tipo de mecanismos se incluyen las vías independientes de clatrina y caveolas que involucran a *rafts* lipídicos para la formación de vesículas que se dirigen a compartimentos no degradativos (Sandvig *et al.*, 2011; Cleal *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta la mayor estabilidad de los liposomas formulados con los lípidos de la cepa CIDCA 133 frente a los AMPs se decidió indagar más en profundidad acerca de sus características y se compararon formulaciones de liposomas de lecitina con liposomas de lípidos extraídos de dicha cepa. También se evaluó la funcionalidad de los liposomas luego de la incorporación del polímero CHO-PDMAEMA. Se determinó la estabilidad de los liposomas en el tiempo, a diferentes pH y en medios con suero fetal bovino. En segundo lugar, se estudió la incorporación de los liposomas por células eucariotas, se evaluaron los mecanismos de endocitosis así como el destino intracelular. En tercer lugar, se estudió la estabilidad de las formulaciones frente a diferentes condiciones de *stress* térmico y de deshidratación.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Extracción de lípidos de lactobacilos

La extracción de los lípidos bacterianos para la formulación de los liposomas se realizó de la manera descrita en el capítulo 1.

2.2.2 Formulación de liposomas multilamelares fluorescentes

Se prepararon diferentes formulaciones de liposomas a partir de los lípidos extraídos de la cepa CIDCA 133 y lecitina comercial mediante la técnica de evaporación reversa de acuerdo a Winkowski y col (Winkowski, Ludescher y Montville, 1996). Para esto, soluciones clorofórmicas de lecitina a una concentración de 6,25 mM (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) o del extracto lipídico de lactobacilos (4 mg/ml) se secaron bajo corriente de nitrógeno y luego se suspendieron con agitación en buffers acuosos que permiten el autoensamblado de los liposomas multilamelares.

Los liposomas sensibles al pH se formularon con el agregado del polímero colesterol- Poli (2-dimetilamino) etilmetacrilato (CHO-PDMAEMA). En este caso las soluciones de lípidos se mezclaron con una solución clorofórmica del polímero CHO-PDMAEMA en una relación molar polímero/lípido del 5 % o 10 % antes de secar las mezclas con nitrógeno. Los films lipídicos, con o sin el agregado del polímero, fueron luego rehidratados con un solución de calceína 60 mM en buffer HEPES 100 mM pH=8; a fin de generar liposomas fluorescentes. Para extraer el exceso de calceína las suspensiones de liposomas se centrifugaron por 10 min a 10000 g y fueron lavadas dos veces con buffer HEPES 100 mM pH=7. Luego de los lavados, las suspensiones fueron almacenadas a 4 °C hasta el momento de su utilización.

Dentro de los liposomas, la fluorescencia de la calceína se encuentra parcialmente apantallada debido a su alta concentración, cuando los liposomas se desestabilizan y la calceína se libera al medio su fluorescencia aumenta. A diferencia de la carboxifluoresceína, la fluorescencia de la calceína no se ve afectada por los cambios de pH, por esta razón se la eligió para llevar a cabo los experimentos de este capítulo donde los liposomas se someten a entornos con distintos pHs. En las formulaciones que fueron sometidas a procesos de stress (refrigeración, congelamiento, deshidratación) se añadió trehalosa (concentración final 250 nM) a la solución de calceína. Las diferentes formulaciones de liposomas empleadas en este capítulo se detallan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Formulaciones de liposomas

Nombre	Lípido		Porcentaje PDMAEMA		Trehalosa
	lecitina	CIDCA 133	5%	10%	
LEC	•				
LECPD5	•		•		
LECPD10	•			•	
LECtre	•				•
LECPD5tre	•		•		•
LECPD10tre	•			•	•
CIDCA133		•			
CIDCA133PD5		•	•		
CIDCA133PD10		•		•	
CIDCA133tre		•			•
CIDCA133PD5tre		•	•		•
CIDCA133PD10tre		•		•	•

2.2.3 Ensayos de liberación de calceína.

La estabilidad de las diferentes formulaciones de liposomas se evaluó midiendo la fluorescencia de la calceína liberada desde los mismos. Se estudió su estabilidad durante un periodo de 24 h y a diferentes pHs luego de 2 h de incubación.

Los liposomas fueron preparados como se describió anteriormente y se suspendieron en buffer HEPES 100 mM pH=7. La liberación de calceína se monitoreó con un lector de microplacas (Synergy HT Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA) a 37 °C y a diferentes pHs utilizando longitudes de onda de excitación de 485/20 nm y de emisión de 528/20 nm. A tiempo final, se lisaron la totalidad de los liposomas con tritón X-100 (1µl, 10% p/v) para obtener la fluorescencia máxima.

La liberación de calceína se expresó como porcentaje según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ liberación} = \frac{[F - F_i]}{[F_t - F_i]} \times 100$$

Siendo F la fluorescencia medida en cada punto, F_i la fluorescencia inicial, F_t la fluorescencia máxima luego de agregado de Triton X-100.

2.2.4 **Ensayo de estabilidad en suero**

La estabilidad en suero de las diferentes formulaciones de liposomas se evaluó midiendo la liberación de calceína como se describió anteriormente. Los liposomas se suspendieron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) con distintos porcentajes (100 %, 50 %, 25 % y 0 %) de suero fetal bovino sin inactivar (Natocor, Córdoba. Argentina). La liberación de calceína se monitoreó durante 7 h.

2.2.5 **Ensayos de incorporación de liposomas en células eucariotas**

Distintas líneas celulares (HEK-293, Caco 2/TC7 y RAW 264.7) se emplearon para evaluar la incorporación de los liposomas. Se eligieron con el objetivo de estudiar la interacción de los liposomas con células de distintas funcionalidades. Las células HEK-293 constituyen una línea humana de fácil transfección proveniente del tejido embrionario de riñón. La línea celular Caco-2/TC7 proviene de un adenocarcinoma de colon (ATCC HTB-37) y conforma un modelo de epitelio intestinal de origen humano. Las células Caco-2/TC7, una vez crecidas a confluencia, exhiben un patrón de diferenciación característico de los enterocitos, como son el ribete en cepillo y uniones estrechas funcionales (Pinto y col., 1983; Chantret y col., 1994). Por su parte, la línea RAW264.7 (ATCC TIB-71), es una línea macrofágica murina que presentan funcionalidad fagocítica y adherente.

Las diferentes líneas fueron cultivadas en medio DMEM (GIBCO BRL Life Technologies, Rockville, MD, USA) suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino inactivado por calor (30 min, 60 °C), 1 % (v/v) aminoácidos no esenciales (GIBCO BRL Life Technologies, Rockville, MD, USA), 1 % (v/v) penicilina/ estreptomicina. Las células fueron incubadas a 37 °C en estufa con atmósfera controlada de 5% CO₂ y 95% aire.

Para realizar los ensayos, las células se sembraron en placas de cultivo de 24 fosas a una concentración de 1×10^5 células/fosa y se incubaron hasta post confluencia temprana. Las monocapas se lavaron 2 veces con buffer PBS y se las incubó durante 30 min a 37°C con los liposomas fluorescentes suspendidos en DMEM base sin suero (relación aproximada 100 : 1 liposoma-célula). Transcurrido el tiempo de incubación las monocapas se lavaron 2 veces con buffer PBS para eliminar los liposomas no internalizados. Las células fueron removidas con tripsina 0,25% (Trypsin-EDTA, GIBCO, Life Technologie) incubandándolas durante 5 min a 37 °C y transferidas a tubos para su análisis por citometría de flujo.

2.2.6 Ensayos de inhibición de endocitosis por células eucariotas

Se utilizaron las células HEK-29 las cuales fueron incubadas con los liposomas conteniendo calceína como se describió anteriormente. La incorporación de los liposomas a las células se evaluó por citometría de flujo. Para bloquear las vías endocíticas se añadieron inhibidores una hora antes del agregado de los liposomas. Los inhibidores utilizados fueron: wortmanina (25 nM) y citocalasina D (9,8 μM) que bloquean la macropinocitosis (Sigma–Aldrich Co. MO. USA); genisteína (200 μM), metil β ciclodextrina (4,4 mM) (Sigma–Aldrich Co. MO. USA) y nistatina (50 μM) (Denver Pharma Buenos Aires, Argentina) que inhiben la vía endocítica mediada por caveolas y como inhibidores de la vía mediada por clatrin se usaron NH₄Cl (30 mM) y clorpromazina (10 μM) (Sanofi-Aventis Gentilly, France). En la tabla 2 se detallan los blancos de acción de cada inhibidor.

La viabilidad celular, luego del tratamiento con los inhibidores, se determinó utilizando yoduro de propidio (IP) (concentración final 20 μM) (Thermo Fisher, Waltham MA, USA). Los análisis de citometría de flujo fueron realizados un citómetro

FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Para cada muestra se midió la fluorescencia verde (FL1) y roja (FL2) de 10.000 eventos.

Tabla 2.2. Inhibidores de endocitosis

Inhibidor	vía endocítica	Mecanismo
wortmanina	macropinocitosis	Inhibidor de la fosfatidilinositol 3-kinasa.
citocalasina D	macropinocitosis	Impide la la polimerización y elongación de filamentos de actina.
metil β ciclodextrina	caveolas	Extrae colesterol de la membrana plasmática de forma reversible.
nistatina	caveolas	Modifica las propiedades de los dominios ricos en colesterol.
genisteína	caveolas	Causa una interrupción local de la red de actina, impidiendo el reclutamiento de la dinamina II.
clorpromazina	clatrininas	Transloca clatrininas y a su receptor desde la membrana plasmática a vesículas intracelulares
NH₄Cl	clatrininas	Evita la acidificación de los endosomas

2.2.7 Localización intracelular de liposomas.

El destino intracelular de los liposomas en células eucariotas se estudió por microscopía confocal. Las células HEK-293 se crecieron sobre cubreobjetos de vidrio (Assistant, GlaswarenfabrikKG, Sondheim, Germany) para su posterior observación al microscopio. Se utilizaron moléculas fluorescentes trazadoras, cuyas vías de endocitosis se conocen, junto con los liposomas marcados con calceína, evaluando conjuntamente su localización intracelular para determinar las vías de endocitosis empleadas. Se empleó transferrina marcada con Alexa 596 (Invitrogen, Eugene OR, USA) que ingresa a la célula por la vía dependiente de clatrininas y albúmina marcada con Alexa

647 (Invitrogen, Eugene OR, USA) que ingresa a la célula por la vía de caveolas. También se utilizó la sonda LysoTracker DND-99 que marca compartimentos intracelulares ácidos.

En el ensayo, las células eucariotas se lavaron 2 veces con buffer PBS, y se incubaron durante 30 min en DMEM base conteniendo los liposomas fluorescentes y el marcador de endocitosis a estudiar: transferrina Alexa 596 (10 µg/mL) o albúmina Alexa 647 (30 µg/mL). A su vez, para evaluar la localización de los liposomas en compartimentos intracelulares ácidos se añadió LysoTracker DND-99 10 µM (Molecular Probes, Oregon, USA) por 30 min a 37 °C. Luego de la incubación los cubre objetos se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con una solución de paraformaldehído 3 % p/v en buffer PBS. A continuación, se colocaron los vidrios en portaobjetos con medio de montaje que previene la pérdida de fluorescencia (SlowFade Gold Antifade Mountant Thermofisher, EEUU). Las imágenes confocales fueron tomadas usando un microscopio confocal Leica (LEICA TCS SP5, Leica Microscopy Systems Ltd.CH Heerbrugg, Switzerland). El análisis de las imágenes se realizó usando el software Leica Application Suite X (Leica Microsystems) y Fiji – ImageJ (NIH, USA).

2.2.8 Ensayos de estabilidad.

Los liposomas pueden ser utilizados para evaluar la estabilidad de las membranas ante condiciones de estrés como son la congelación y el secado. Teniendo en cuenta estos objetivos se estudió la estabilidad de los liposomas formulados con lecitina y con los lípidos bacterianos. Así mismo se evaluó el efecto del agregado de trehalosa como crioprotector en las formulaciones usadas.

Para estos ensayos se formularon liposomas fluorescentes con y sin crioprotector, resuspendiendo los films lipídicos en buffer HEPES 100 mM pH=7 con o sin el agregado de trehalosa (250 mM). Los liposomas se conservaron durante 28 días refrigerados a 4 °C, congelados a –80 °C o liofilizados. La liofilización se llevó a cabo a –50 °C y 0,04 mbar de presión en un liofilizador Heto FD4 (Heto Lab Equipment, Denmark), partiendo de liposomas que fueron previamente almacenados a –80 °C

por 48 h. Pasado el tiempo de almacenamiento, se evaluó la estabilidad de las formulaciones y la capacidad de internalización de los liposomas por las células epiteliales y fagocíticas

2.2.9 **Análisis estadístico**

Los análisis de la varianza (ANOVA) se realizaron usando el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, EEUU). La comparación de las medias se realizó por el método de Tukey, considerando como estadísticamente significativa la diferencia cuando $p < 0,05$.

2.3 **Resultados**

2.3.1 **Estabilidad de liposomas.**

Se evaluó la estabilidad de los liposomas formulados con los lípidos de la cepa CIDCA 133 y el polímero CHO-PDMAEMA, utilizando liposomas fluorescentes cargados de calceína con diferentes relaciones molares del polímero. La liberación de la calceína refleja el aumento de permeabilidad del liposoma y pérdida de su estabilidad.

En la Figura 2.2A se muestran los resultados de los ensayos de liberación de calceína realizados a 37 °C y pH 7. La incorporación del polímero a las formulaciones estabilizó fuertemente a los liposomas. Los liposomas sin polímero liberaron el 60 % de su contenido en los primeros 10 minutos. Los liposomas formulados con el polímero sólo tuvieron una liberación significativa de su contenido después de 200 min de incubación. A tiempos prolongados (240 min) la formulación CIDCA133PD10 con un 10 % de polímero resultó ser más estable con un 8 % de liberación de calceína frente a la CIDCA133PD5, con 5 % de polímero, que liberó un 25 % de la calceína.

Se observó además que la estabilidad de los liposomas resultó depender fuertemente del pH (Figura 2.2 B). En concordancia con la Figura 2.2A los liposomas sin el agregado del polímero, liberaron el 60 % de su contenido a pH=7 luego de 20 min de incubación. A pH ácidos estos liposomas fueron desestabilizándose gradualmente

hasta la liberación total de su contenido a pH=3. Los liposomas sin el polímero, mostraron un aumento de la estabilidad con el aumento del pH. Por otra parte a las formulaciones con el polímero (CIDCA133PD5 y CIDCA133PD10, fueron más estables con respecto a los liposomas que sólo contenían los lípidos bacterianos a pH 7. Los entornos ácidos o alcalinos determinaron una desestabilización de los liposomas con el polímero siendo muy notable la abrupta liberación de calceína cuando el pH pasó de 7 a 6. Este comportamiento es atribuible al cambio de conformación del CHO-

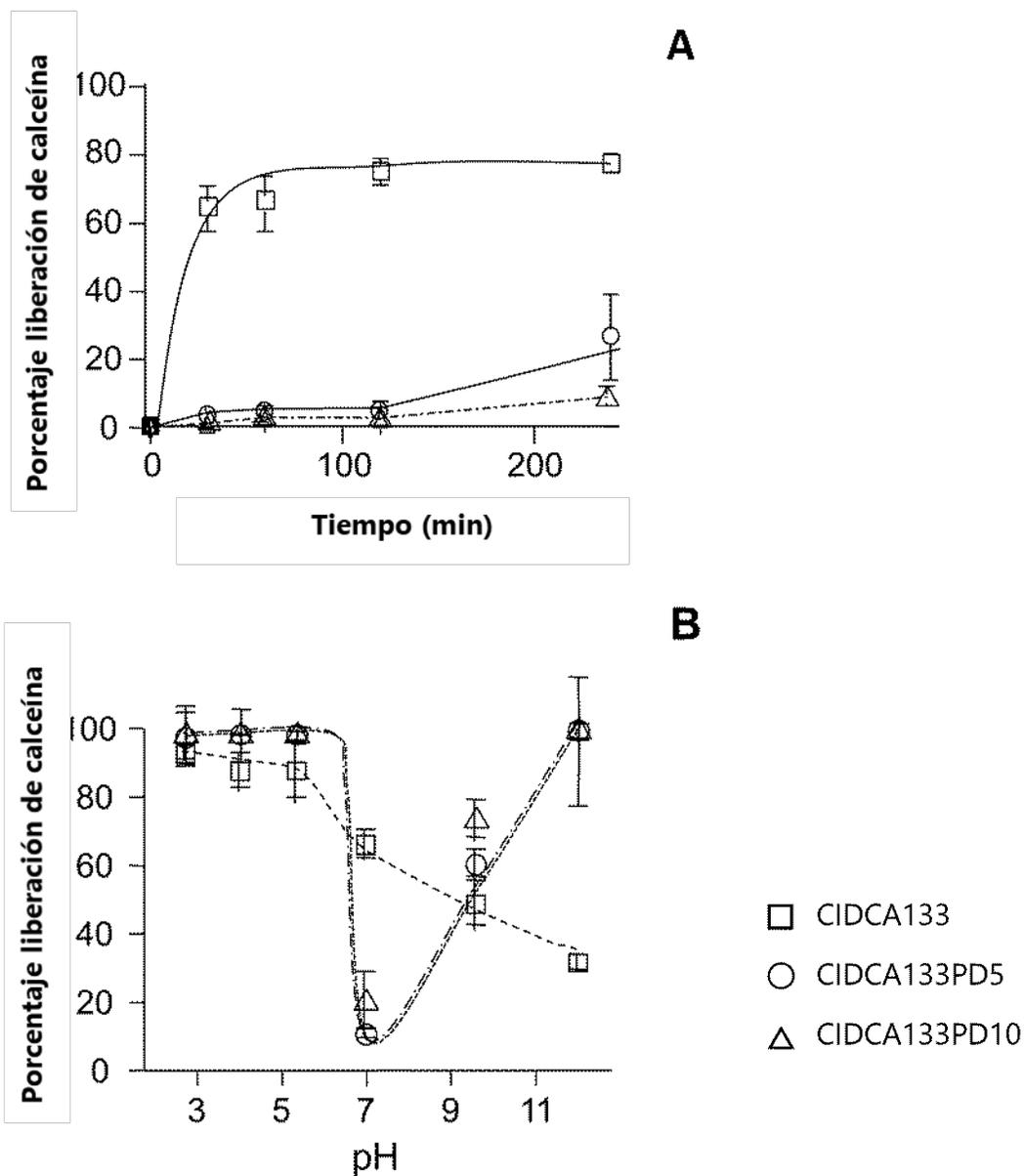


Figura 2.2 Perfiles de liberación de calceína de complejos polímero/liposomas preparados con lípidos extraídos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 y diferentes concentraciones de CHO-PDMAEMA: CIDCA133 (C), CIDCA133PD5 (!) y CIDCA133 PD10 (B). (A) cinética de liberación de calceína a 37 °C y pH=7,0. (B) liberación de calceína a diferentes pHs luego de 20 min de incubación a 37 °C. Cada resultado representa la media \pm la desviación estándar de un experimento representativo n=3.

PDMAEMA, que ocurre a pH 6 aproximadamente, desestabilizando en forma drástica al liposoma. Considerando la relevancia biológica de estas observaciones

si bien el pH fisiológico es de 7, pueden existir intracelularmente entornos levemente ácidos de pH=6-6,5 en lisosomas tempranos o fuertemente ácidos (pH=4) como los fagolisosomas. Por lo tanto, estudiar el comportamiento de los liposomas a estos pH reviste especial interés en el caso de su incorporación por una vía endocítica. Por otra parte los pH alcalinos no son frecuentes a nivel intracelular, aunque si en el entorno intestinal.

Los liposomas formulados con lecitina tuvieron un comportamiento semejante a los liposomas formulados con los lípidos bacterianos. En efecto, los liposomas LECPD10 y LECPD5 resultaron ser más estables a pH=7 que los liposomas de lecitina sola (LEC) y mostraron un perfil de estabilidad a diferentes pH comparables a los que se obtuvieron con los lípidos bacterianos (Alves *et al.*, 2013) (datos no mostrados).

2.3.2 Estabilidad en suero

En la Figura 2.3 se muestran los resultados de los ensayos de estabilidad de las diferentes formulaciones de liposomas en presencia de suero fetal bovino. Los liposomas formulados con los lípidos de las bacterias resultaron ser más estables que los que contenían lecitina en todas las concentraciones de suero ensayadas. Las curvas de las cinéticas de liberación de calceína de las formulaciones CIDCA133 y CIDCA133PD10 mostraron una forma diferente a la observada con las formulaciones con lecitina LEC y LECPD10 con una liberación lenta del fluoróforo. Esta forma en las curvas de liberación de calceína podría indicar que, para ser desestabilizados, los liposomas CIDCA133 y CIDCA133PD10, necesitan de una interacción distinta con los componentes del suero que los formulados con lecitina. Si comparamos globalmente las formulaciones, el agregado del polímero dio lugar a una disminución de la estabilidad frente al suero respecto a las preparaciones sin polímero formuladas tanto con lecitina como con lípidos bacterianos.

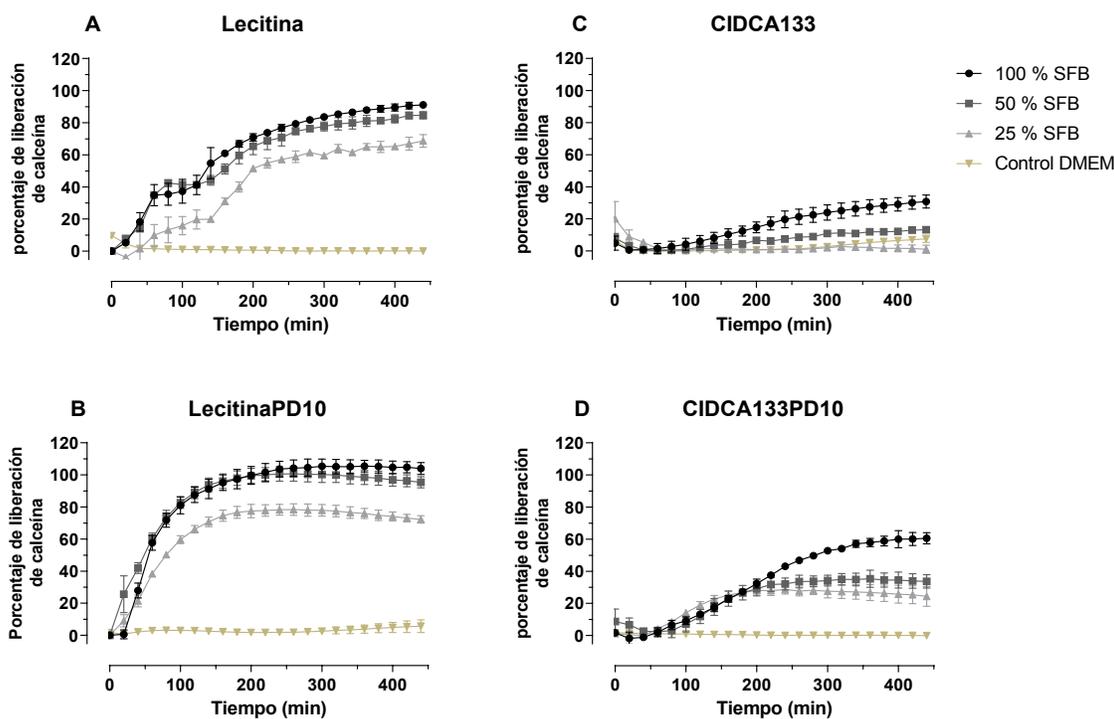


Figura 2.3. Cinética de liberación de calceína de liposomas en presencia de suero fetal bovino. Los liposomas fueron incubados a 37 °C en medio DMEM con diferentes porcentajes de suero fetal bovino. 100% (●), 50% (■), 25% (▲) y 0% (▼). Cada resultado representa la media ± la desviación estándar de un experimento representativo n=3.

2.3.3 Endocitosis de liposomas.

Durante los ensayos de estabilidad se evaluó el comportamiento de los liposomas formulados con lípidos de la cepa CIDCA 133 con o sin el agregado de CHO-PDMAEMA y se lo comparó con liposomas control de LC en diferentes condiciones de pH y concentraciones de suero. Un punto central de nuestro interés fue determinar cómo interaccionan estos liposomas con las células eucariotas. Para ello se evaluó la incorporación a diferentes líneas celulares de liposomas marcados y sus posibles vías de internalización.

En primer lugar, se evaluó la incorporación en células HEK293 de los liposomas de lecitina cargados de calceína con y sin el agregado del polímero CHO-PDMAEMA. La cuantificación se realizó por citometría de flujo y por microscopía confocal.

En la Figura 2.4A se puede observar la incorporación de los liposomas cuando las células se incubaron a 37 °C y a 4 °C. Se utilizaron estas dos temperaturas a fin de investigar si la incorporación de los liposomas obedece a un proceso activo por parte de las células eucariotas. Los liposomas formulados sin el polímero no fueron incorporados a las células a ninguna de las temperaturas de incubación, no habiendo diferencia en la fluorescencia con las células control. El agregado del polímero CHO-PDMAEMA a los liposomas de lecitina aumentó significativamente su incorporación a las células.

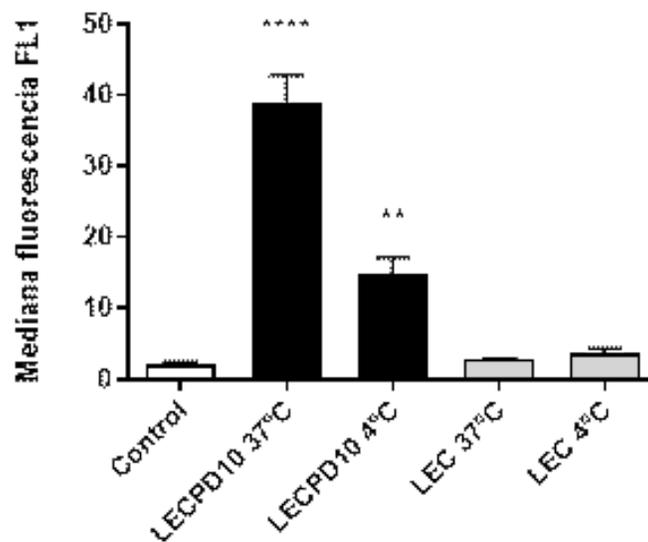


Figura 2.4 Internalización de liposomas de lecitina con y sin CHO-PDMAEMA en células HEK-293. La internalización se expresa como la mediana de la intensidad de la fluorescencia verde (FL1) obtenidos por citometría. (%) LECPD10, (%) LEC, (C) células control sin liposomas. Las células fueron incubadas durante 30 min con los liposomas a 4 °C o 37 °C. Los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control: **p < 0,05; **** p < 0,001 ,Tukey.

Dado que los liposomas sin el polímero no son incorporados por las células, sólo se pudo evaluar la condición de diferentes temperaturas con los liposomas conteniendo el polímero. Se observó que hubo una disminución significativa en la incorporación de los liposomas cuando las células son incubadas a 4 °C. Estos resultados indicarían que el mecanismo implicado en su internalización a la célula es un mecanismo activo que requiere de gasto de energía. A 4°C el metabolismo celular se

encuentra disminuido por lo que los mecanismos que involucren un gasto energético se verán afectados.

En la Figura 2.5 se muestran fotos representativas de los ensayos de adhesión e internalización de liposomas en las células eucarióticas. Se puede observar la diferencia en la internalización que presentan las formulaciones LEC y LECPD10, siendo mayor la incorporación para la formulación que contiene el polímero. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por citometría de flujo (Figura 2.4).

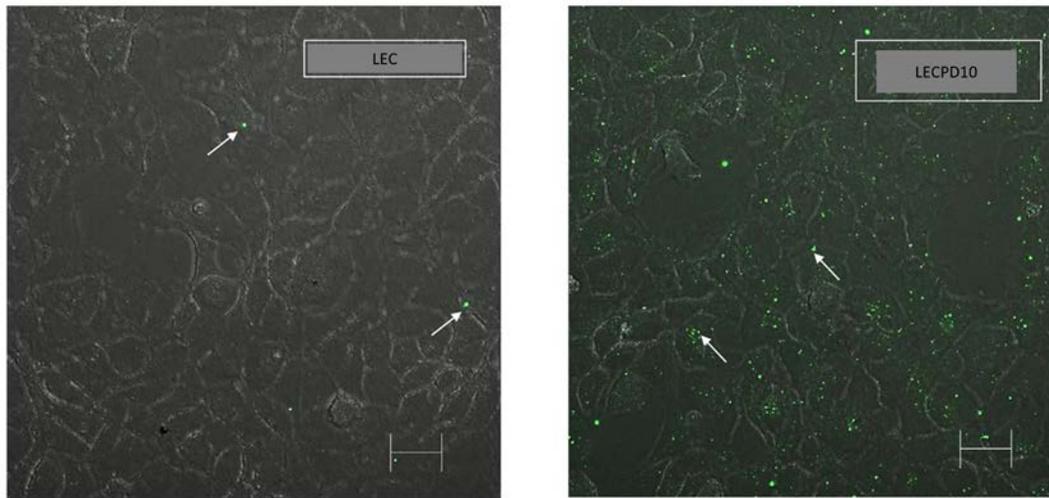


Figura 2.5. Microfotografías de células HEK-293 tomadas por microscopía confocal, correspondientes a las imágenes superpuestas de los canales de fluorescencia verde (liposomas cargados de calceína) y luz visible. Las células fueron incubadas 30 min con liposomas de lecitina o liposomas de lecitina con CHO-PDMAEMA a 37°C. Las flechas indican la localización de los liposomas cargados de calceína. Se muestra la proyección en z (0,3 μm de plano confocal). Pinhole 1 A.U.

En los ensayos con las formulaciones de liposomas CIDCA133 y CIDCA133PD10 se obtuvieron resultados comparables con los formulados con lecitina (LEC y LECPD10). La formulación CIDCA133PD10 mostró ser internalizada en mayor medida que los liposomas sin el polímero. Los liposomas desnudos formulados con los lípidos de la cepa CIDCA 133 tuvieron una incorporación muy baja por las células (Figura 2.6),

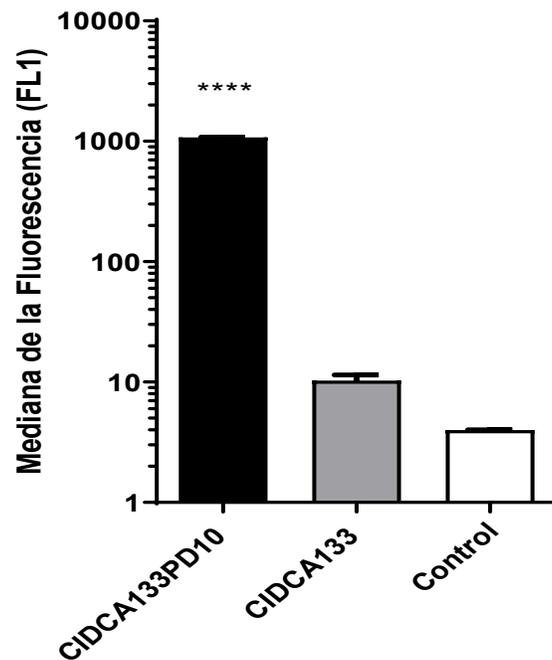


Figura 2.6. Internalización de liposomas de la cepa CIDCA133 con y sin CHO-PDMAEMA en células HEK-293. La internalización se expresa como la mediana de la intensidad de la fluorescencia verde (FL1) obtenidos por citometría. (%) CIDCA133PD10, (%) CIDCA133, (C) células control sin liposomas. Las células fueron incubadas durante 30 min con los liposomas a 37 °C. Se realizó un análisis de varianza ANOVA, los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control: **** $p < 0,0001$, Tukey.

Con el fin de determinar el mecanismo por el que los liposomas ingresan a las células se realizaron ensayos utilizando inhibidores de las diferentes vías de endocitosis. En estos ensayos se utilizaron las formulaciones de liposomas con 10 % de CHO-PDMAEMA, con lecitina o con lípidos bacterianos de la cepa CIDCA 133 ya que fueron los que presentaron mejor incorporación. En la Figura 2.7 se muestran los resultados obtenidos.

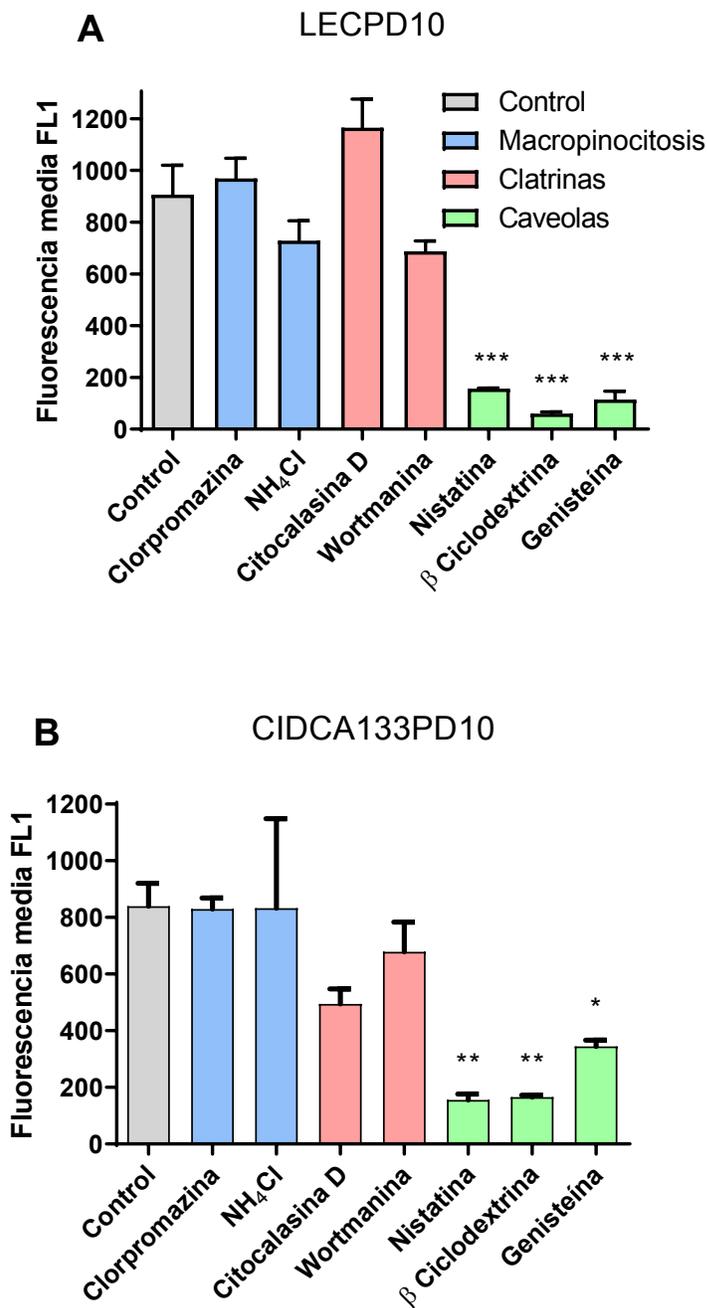


Figura 2.7 Efecto de inhibidores de endocitosis en la incorporación de liposomas en células HEK 293. La cuantificación se realizó por citometría de flujo. La internalización se expresa como la media de la intensidad de la fluorescencia verde (FL1). (A) Liposomas formulados con lecitina y CHO-PDMAEMA; (B) liposomas formulados con lípidos de la cepa CIDCA 133 y CHO-PDMAEMA. La barra gris corresponde las células incubadas con los liposomas sin inhibidores. Las células fueron preincubadas con los inhibidores por 60 min y luego con los liposomas correspondientes por 30 min. Los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, Tukey.

Para ambas formulaciones se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la internalización respecto al control cuando se utilizaron inhibidores de la vía endocítica mediada por caveolas (genisteína, nistatina y metil β ciclodextrina), mientras que la internalización no se vio afectada cuando se utilizaron inhibidores de la vía dependiente de clatrin (NH₄Cl, clorpromazina), ni por los inhibidores de la macropinocitosis (wortmanina, citocalasina D). Estos resultados indicarían que las formulaciones de liposomas ingresarían a las células por la vía de caveolas, vía que dirige las estructuras internalizadas hacia compartimentos intracelulares no degradativos.

Para descartar que las diferencias encontradas en los ensayos anteriores se deban a un daño celular provocado por los tratamientos con los inhibidores se evaluó la viabilidad de las células con yoduro de propidio, los resultados se muestran en la Figura 2.8.

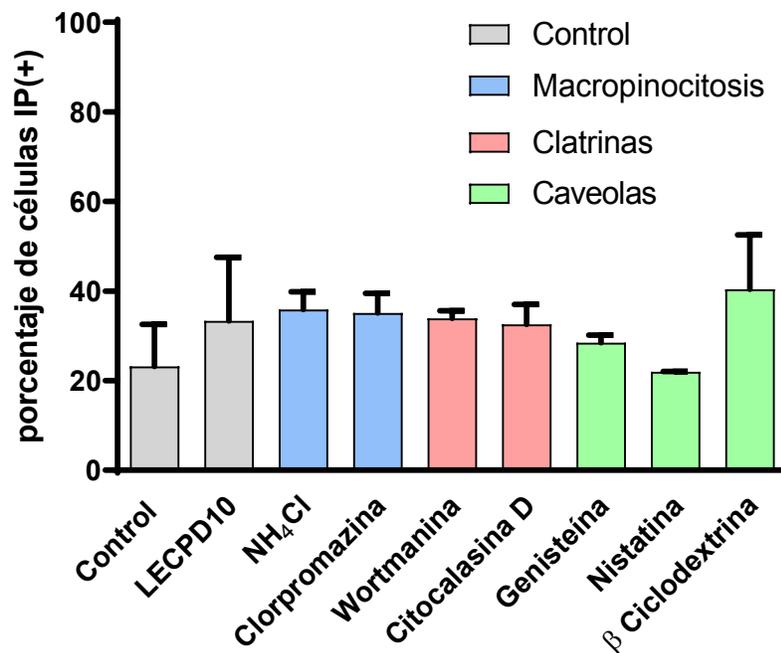


Figura 2.8. Viabilidad de las células tratadas con inhibidores de endocitosis. El gráfico muestra el porcentaje de células yoduro de propidio positivas luego de ser incubadas con inhibidores de endocitosis durante 60 min y con liposomas durante 30 min.

No hubo un aumento significativo del porcentaje de células IP positivas entre las células tratadas con los inhibidores y las células control sin tratar, indicando que los tratamientos con inhibidores no afectaron la viabilidad de las células en relación a los controles no tratados.

2.3.4 Localización intracelular.

La localización intracelular de los liposomas fluorescentes se estudió por microscopía confocal.

El objetivo de los ensayos fue determinar a qué tipo de compartimento intracelular se dirigían los liposomas internalizados. Para esto se utilizaron proteínas marcadas con fluorocromos que permiten seguir las vesículas a través de diferentes vías endocíticas. Se empleó transferrina para la vía de clatrina y albúmina para la vía de caveolas. Se utilizó, a su vez, la sonda LysoTracker que marca compartimentos intracelulares de bajo pH (lisosomas).

Las células se coincubaron con los liposomas y se realizó el análisis de imágenes de microscopía confocal. En la Figura 2.10 podemos observar colocalización de los liposomas con la albúmina marcada (Figura 2.10 C, Figura 2.11), lo que es compatible con una internalización mediante la vía endocítica de caveolas. También se observa que no existe colocalización de los liposomas con la sonda LysoTracker o con la transferrina esto indicaría que las vesículas no son dirigidas hacia compartimentos ácidos, ni ingresarían por la vía de las clatrina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente por citometría (Figura 2.7) indicando que la internalización de los liposomas es compatible con una vía no degradativa tal como la vía de caveolas.

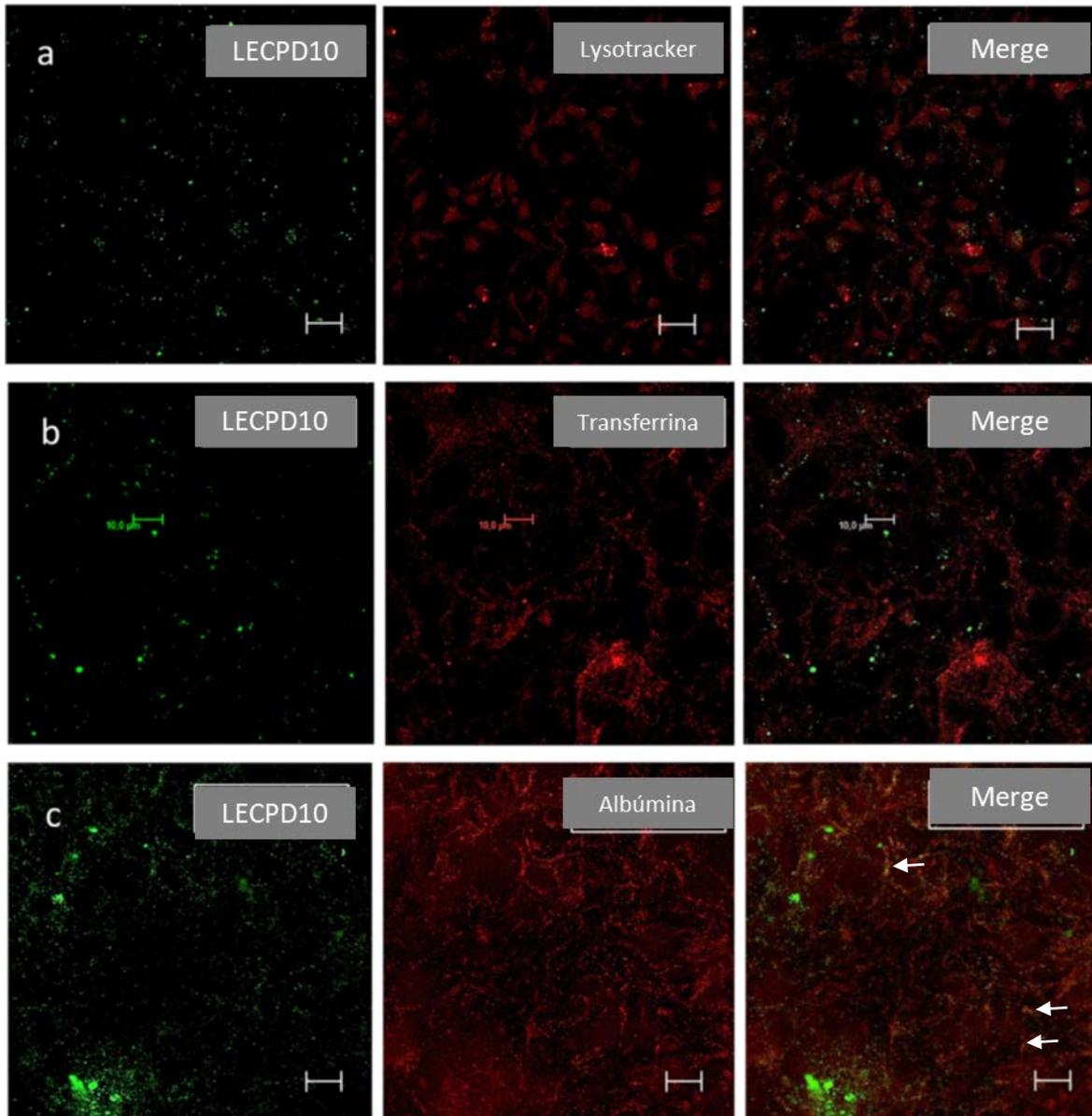


Figura 2.9. Interacción de células HEK-293 con liposomas de lecitina y CHO-PDMAEMA (LECPD10). Las células fueron incubadas por 30 min con liposomas cargados de calceína. (a) Lyso-tracker. (b) transferrina (c) albumina. El canal verde corresponde a los liposomas cargados de calceína el canal rojo a los marcadores lyso-tracker, transferrina o albúmina. Las flechas blancas indican liposomas colocalizando con los marcadores. Las barras marcan una distancia de 10 μ m. Las imágenes corresponden a un corte en z de 0,3 μ m de sección. Pinhole 1AU.

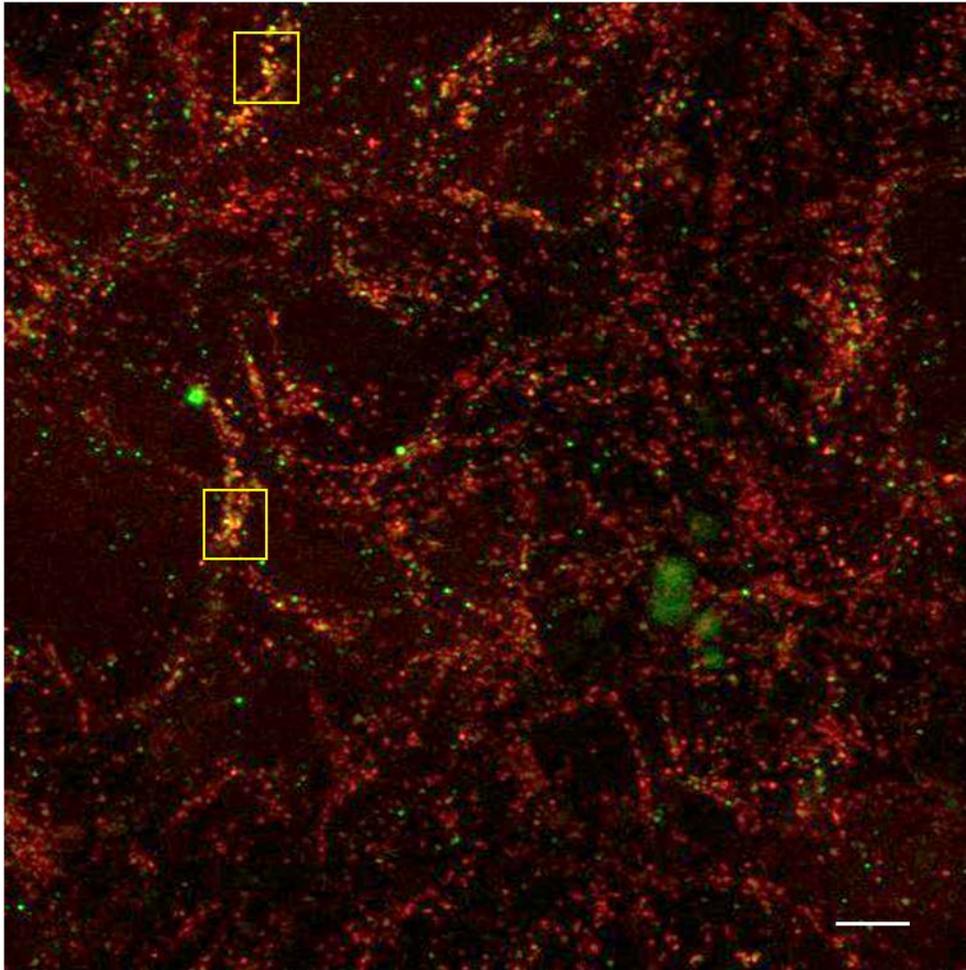


Figura 2.10. Microscopía confocal de células HEK-293 incubadas con liposomas de lecitina y CHO-PDMAEMA (LECPD10) en presencia de albumina marcada. Las células fueron incubadas por 30 min con liposomas cargados de calceína. El canal verde corresponde a los liposomas cargados de calceína, el canal rojo a albúmina albumina marcada. Las regiones amarillas indican liposomas colocalizando con el marcador. La barra blanca marca una distancia de 10 μm . Las imágenes corresponden a un corte en z de 0,3 μm de sección. Pinhole 1AU.

2.3.5 Ensayos de conservación

Las diferentes formulaciones de liposomas se sometieron a distintos procesos de conservación (refrigeración a 4°C, congelación a -80°C y liofilización) y se evaluó su estabilidad en el tiempo. Los liposomas cargados con calceína, se almacenaron durante 28 días a 4 °C, - 80 °C o, en el caso de liposomas liofilizados, a 4°C. La estabilidad evaluó mediante medidas de liberación de calceína luego de 2 h de incubación a 37°C. En estos experimentos los liposomas formulados con los lípidos de lactobacilos se compararon con liposomas formados con lecitina, a fin de evidenciar el efecto de la composición en la estabilidad de los liposomas. También se evaluó el efecto de la inclusión del azúcar trehalosa como crioprotector en las formulaciones.

En la Figura 2.12 se muestran los resultados obtenidos. Las formulaciones con lípidos bacterianos y con lecitina colocados a 4 °C y a -80 °C mostraron ser muy estables. En estas condiciones los liposomas CIDCA133PD5, CIDCA133PD10 y LECPD5 liberaron menos de 20 % de la calceína total, sólo la formulación con lecitina LECPD10 fue menos estable liberando un 40 % de la calceína a 4 °C y 60 % a -80 °C. La trehalosa mostró un efecto positivo para la estabilidad de la formulación LECPD10.

El proceso de liofilización produjo un efecto muy adverso para la estabilidad de todas las formulaciones ensayadas. Los liposomas liofilizados resultaron ser los menos estables luego de su reconstitución. En efecto, se observó una liberación de calceína del 70 % en las formulaciones con lípidos bacterianos sin encontrarse diferencias significativas entre CIDCA133PD5 y CIDCA133PD10. Para el caso de las formulaciones con lecitina (LECPD5 y LECPD10) liofilizadas, la liberación de calceína fue aún mayor llegando al 90 %. La presencia de trehalosa tuvo un efecto estabilizante de los liposomas liofilizados LECPD5 y LECPD10 obteniéndose un porcentaje de liberación de calceína de 60 %, (comparable a los obtenidos con las formulaciones con lípidos de la cepa CIDCA 133). Este efecto estabilizante del disacárido no se observó para los liposomas formulados con lípidos bacterianos. Esta diferencia puede deberse a que, en las formulaciones con lípidos bacterianos, los azúcares de los glicolípidos podrían estar cumpliendo una función estabilizadora y el agregado de trehalosa no tendría un efecto adicional.

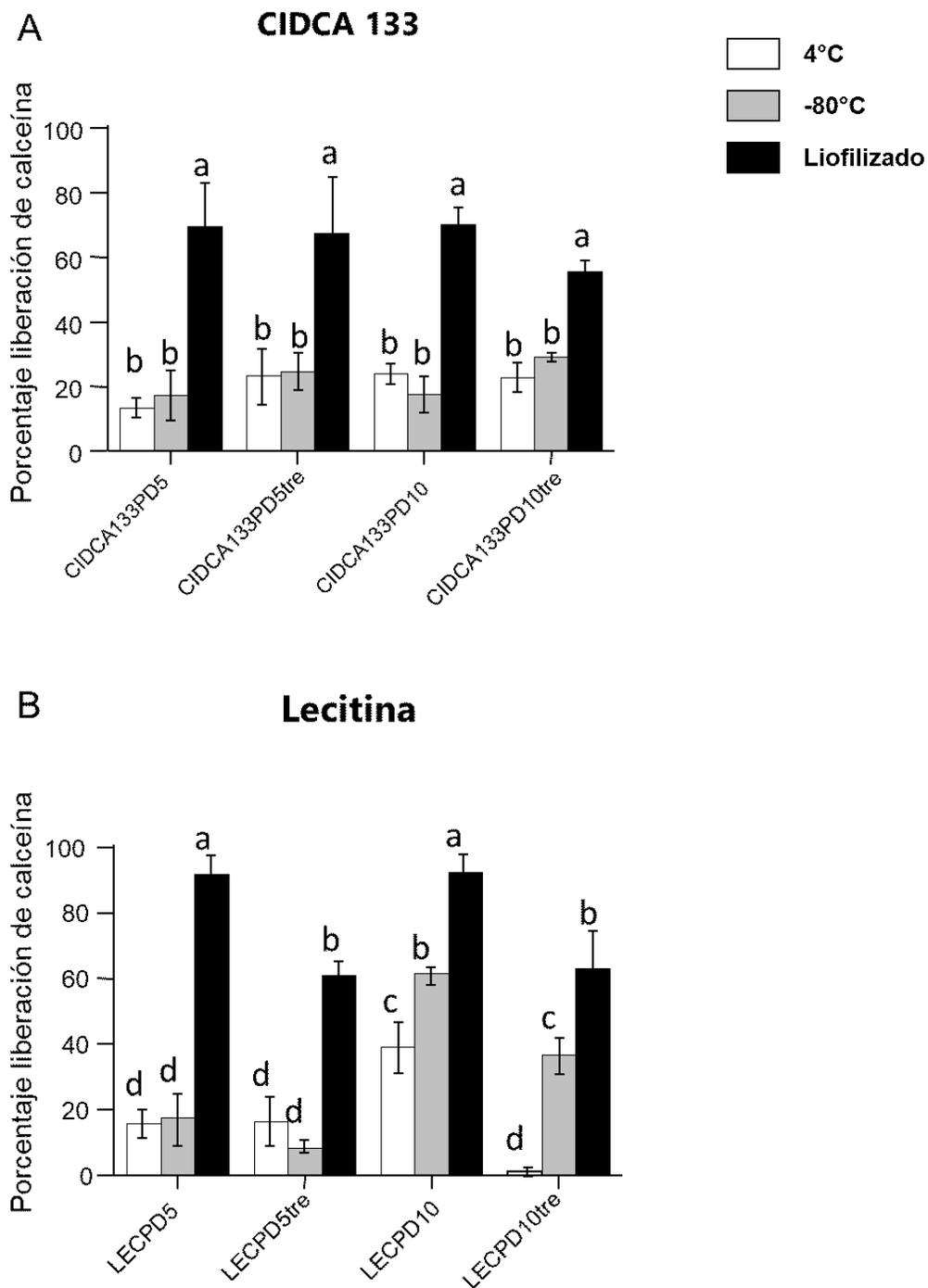


Figura 2.11. Liberación de calceína de liposomas luego de 7 días de almacenamiento a 4°C, -80 °C y liofilizados. (A) liposomas formulados con lípidos extraídos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 y (B) liposomas formulados con lecitina. Cada resultado representa la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras (a, b, c y d) indican diferencias significativas con $P < 0,05$, Tukey

Se estudió también la endocitosis en células epiteliales y fagocíticas de las formulaciones de los liposomas CIDCA133PD5 y CIDCA133PD10 luego de los diferentes procesos de almacenamiento. Los resultados se muestran en la Figura 2.13. Las formulaciones almacenadas a 4 °C y a -80 °C tuvieron una mejor incorporación a las células que los liposomas liofilizados. El agregado de trehalosa en general mejoró la internalización de los liposomas tanto en células epiteliales, como en las células fagocíticas, lo que podría deberse al estado de conservación de los mismos al momento del ensayo. La mayor diferencia se registró entre las formulaciones LECPD5 y LECPD5tre. Se observó una correlación entre la estabilidad de la formulaciones luego de su almacenamiento y su incorporación en células eucariotas, encontrándose mayores porcentajes de incorporación de liposomas con las formulaciones más estables.

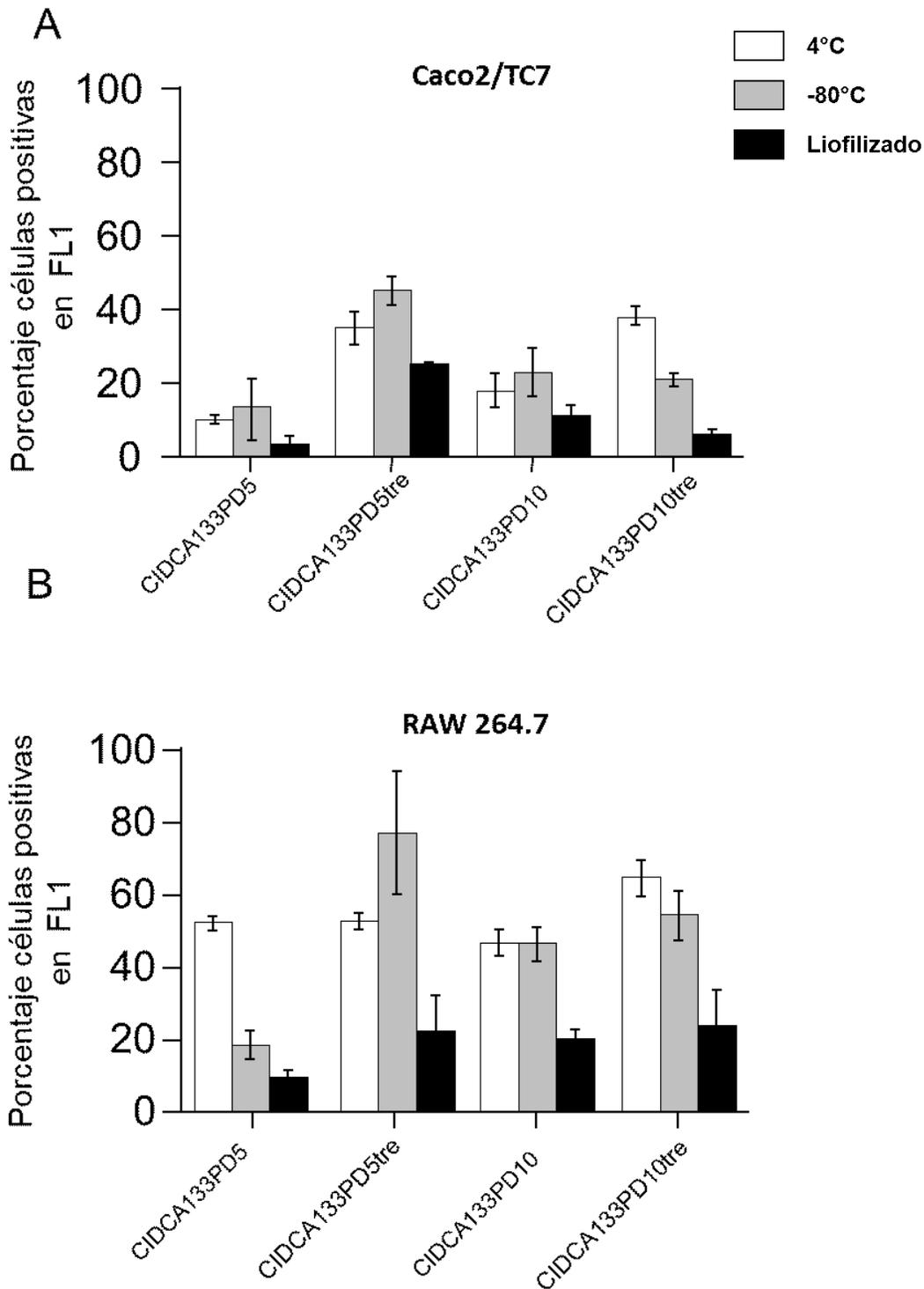


Figura 2.12. Incorporación de liposomas formulados con los lípidos de la cepa CIDCA 133 en células fagocíticas y epiteliales a 37°C. La cuantificación se realizó por citometría de flujo. La internalización se expresa como la mediana de la intensidad de la fluorescencia verde (FL1). (A) Células Caco2/TC7; (B) células Raw 264.7. Cada resultado representa la media \pm la desviación estándar de las medias de tres experimentos independientes.

2.4 Discusión

En este capítulo se estudiaron en mayor profundidad las características de los liposomas formados con lípidos extraídos de la cepa de lactobacilos CIDCA 133 y se compararon con los formulados con lecitina. A su vez se evaluaron las propiedades de estos liposomas luego de la incorporación del polímero CHO-PDMAEMA.

Tanto las formulaciones de liposomas que contenían los lípidos bacterianos como los que contenían lecitina resultaron ser más estables hacia pH alcalinos desestabilizándose hacia pH ácidos hasta liberar su contenido completamente a pH= 3. El agregado del polímero PDMAEMA estabilizó las formulaciones de liposomas a pH=7 y al mismo tiempo les otorgó una mayor sensibilidad a los cambios de pH, debido a los cambios conformacionales que sufre el polímero cuando se encuentra a pH ácidos, esta cualidad podría ser relevante para la liberación del contenido de los liposomas en compartimentos intracelulares ácidos.

Los liposomas que contenían lípidos bacterianos fueron más estables en presencia de los componentes de suero fetal bovino, comparadas con los liposomas de lecitina. Al mismo tiempo las formulaciones con PDMAEMA resultaron menos estables que las formulaciones sin polímero al incubarlos en presencia de suero fetal bovino. Los componentes del suero que podrían ser importantes para la estabilidad de liposomas son variados y podrían estar interviniendo de diferente manera en las distintas formulaciones de liposomas. Por ejemplo, se ha encontrado que las proteínas de suero, en general, interaccionan con liposomas modificando su estabilidad (Wolfram *et al.*, 2014). En lo que respecta a las proteínas del sistema de complemento, debe tenerse en cuenta que los experimentos se realizaron con suero normal (no inactivado) lo cual sugiere que al menos parte de los componentes del sistema de complemento podrían tener participación (Devine y Bradley, 1998).

El tamaño de las partículas, que modificaría las interacciones con los componentes del suero también podría influir directamente sobre la estabilidad (Aggarwal *et al.*, 2009). En efecto los liposomas que contienen lípidos bacterianos son de menor tamaño que las formulaciones con lecitina ($110,6 \pm 0,4$ nm vs $198,7 \pm 1,8$ nm respectivamente) (Alves *et al.*, 2013, 2014), Este hecho podría explicar parte

de las diferencias observadas ya que los liposomas más pequeños como los formulados con lípidos bacterianos tienen una superficie con una mayor curvatura lo que desfavorecería la interacción con las proteínas del suero (Aggarwal *et al.*, 2009). Aunque el panorama es complejo y no ha sido objetivo de este trabajo de tesis dilucidar los mecanismos involucrados, es importante destacar que la composición de los liposomas y la inclusión de lípidos bacterianos en su formulación han demostrado ser relevantes para la estabilidad aún en presencia de un entorno complejo en medios de suspensión con suero.

El efecto de la composición sobre la estabilidad también se evidenció en los estudios de congelación/descongelación deshidratación/rehidratación. Los liposomas de lípidos bacterianos fueron más estables que los formulados con lecitina. Esto puede explicarse por la alta relación molar azúcar:lípido en la composición de los liposomas bacterianos. Se sabe que en la composición de la membrana de la cepa CIDCA 133 hay una alta proporción de glicolípidos, con una relación 11:1 azúcar:lípido (Gómez Zavaglia, Disalvo y De Antoni, 2000). Se ha encontrado que relaciones azúcar/lípido elevadas pueden evitar la fusión y agregación de liposomas durante el proceso de deshidratación y rehidratación (Zhang *et al.* 2005). Un efecto similar se observó al agregar trehalosa en las formulaciones de lecitina. En general el porcentaje de polímero no afectó la estabilidad de las formulaciones de liposomas de manera clara durante la congelación o la deshidratación.

Los ensayos de endocitosis realizados mostraron que los liposomas se internalizaban en las células eucariotas por un mecanismo activo. Estos resultados están en consonancia con trabajos previos que indican que los liposomas se incorporan preferentemente a las células por mecanismos activos y no por fusión (Bajoria, Sooranna y Contractor, 1997; Simões *et al.*, 2001). Se sabe también que el polímero PDMAEMA puede ser incorporado activamente a las células por endocitosis (Jones, Poniris, y Wilson 2004). La incorporación del PDMAEMA mejoró notablemente la interacción de los liposomas tanto de lecitina como los formulados con lípidos bacterianos con las células eucariotas aumentando su internalización. El agregado de PDMAEMA a las formulaciones de liposomas les otorga una carga superficial positiva

(Alves *et al.*, 2013, 2014) que favorecería la interacción con las membranas celulares de carga negativa, aumentando su internalización.

El estudio de las vías de endocitosis y los ensayos de localización intracelular permitieron determinar que los liposomas formulados con PDMAEMA ingresan a las células por la vía endocítica de caveolas. Como ya se mencionó esta es una vía de endocitosis no degradativa que transporta sustancias directamente a retículo endoplasmático o al aparato de Golgi sin pasar por compartimentos lisosomales lo cual favorecería la preservación del contenido transportado por el liposoma. La internalización por esta vía es altamente deseada en el caso del uso de liposomas para el delivery de compuestos bioactivos (Wang *et al.* 2011). El destino intracelular de los liposomas no se vio afectado por la composición lipídica de las formulaciones, obteniéndose resultados similares tanto con los liposomas formulados con lecitina como los formulados con los lípidos bacterianos.

A partir de los ensayos a diferentes temperaturas de refrigeración y de liofilización se encontró una correlación entre la eficiencia de incorporación de los liposomas en las células y la estabilidad de las formulaciones de liposomas; siendo los liposomas mejor preservados los que se incorporaron en mayor proporción.

Los liposomas son modelos para el estudio tanto del delivery de sustancias bioactivas como de las vesículas naturalmente formadas por las bacterias (MVs). Las MVs median múltiples respuestas entre las bacterias y las células del hospedador y su estudio puede ser importante para entender parte de los mecanismos subyacentes al efecto probiótico (Al-Nedawi *et al.*, 2015). Los liposomas formulados con los lípidos de la cepa CIDCA 133 fueron muy estables en suero y a pH 7 lo que indicaría que podrían permanecer intactos por un largo tiempo y mediar respuestas distantes desde su origen. También fueron resistentes ante condiciones de stress osmótico por privación de agua. En conjunto estas propiedades revelan la gran estabilidad de estos liposomas, que estaría asociada a su composición lipídica. La incorporación del polímero PDMAEMA aumentó la adhesión e incorporación a células eucariotas y aumentó la sensibilidad a los cambios de pH. La adquisición de estas propiedades podría convertir a los liposomas formulados con los lípidos bacterianos en buenos can-

didatos para desarrollar sistemas de delivery. Las bacterias tienen diferente composición lipídica en su membrana lo cual influye en la forma de interacción con componentes del sistema inmune del hospedador como las defensinas. Los sistemas modelo utilizados demostraron que esta composición es altamente relevante para explicar propiedades fisicoquímicas y la interacción con células eucariotas. Aunque estos modelos simplificados no contemplan la totalidad de los elementos estructurales bacterianos involucrados en la interacción con el hospedador, la existencia de vesículas formadas con lípidos de las membranas bacterianas demostrada en numerosas especies de bacterias tanto gramnegativas como grampositivas, entre las que se incluyen las del género *Lactobacillus* (Al-Nedawi *et al.*, 2015; Jan, 2017; Rubio *et al.*, 2017; Toyofuku, Nomura y Eberl, 2019), sugiere que son factibles interacciones de lípidos bacterianos directamente con las células del hospedador. Este panorama potencia la relevancia de los estudios con liposomas modelo para contribuir a la comprensión de la interacción de los microorganismos con el hospedador.

2.5 Bibliografía

- Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A., & McNeil, S. E. (2009). Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(6), 428–437. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.009>
- Al-Nedawi, K., Mian, M. F., Hossain, N., Karimi, K., Mao, Y. K., Forsythe, P., ... Bienenstock, J. (2015). Gut commensal microvesicles reproduce parent bacterial signals to host immune and enteric nervous systems. *FASEB Journal*, 29(2), 684–695. <https://doi.org/10.1096/fj.14-259721>
- Alves, P., Hugo, A. A., Szymanowski, F., Tymczyszyn, E. E., Pérez, P. F., Coelho, J. F. J., ... Gómez-Zavaglia, A. (2014). Stabilization of polymer lipid complexes prepared with lipids of lactic acid bacteria upon preservation and internalization into eukaryotic cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 446–451. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.043>
- Alves, P., Hugo, A. A., Tymczyszyn, E. E., Ferreira, A. F., Fausto, R., Pérez, P. F., ... Gómez-Zavaglia, A. (2013). Effect of cholesterol-poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) on the properties of stimuli-responsive polymer liposome complexes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 104, 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.016>
- Bajoria, R., Sooranna, S. R., & Contractor, S. F. (1997). Endocytotic uptake of small unilamellar liposomes by human trophoblast cells in culture. *Human Reproduction*, 12(6), 1343–1348. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.6.1343>
- Bendas, G., Wilhelm, F., Richter, W., & Nuhn, P. (1996). Synthetic glycolipids as membrane-bound cryoprotectants in the freeze-drying process of liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(4), 211–222. [https://doi.org/10.1016/0928-0987\(95\)00054-2](https://doi.org/10.1016/0928-0987(95)00054-2)
- Boye, L., Welsby, I., Lund, L. D., Goriely, S., & Frøkiær, H. (2016). Plasma membrane Toll-like receptor activation increases bacterial uptake but abrogates endosomal *Lactobacillus acidophilus* induction of interferon- β . *Immunology*, 149(3), 329–342. <https://doi.org/10.1111/imm.12650>
- Cleal, K., He, L., D. Watson, P., & T. Jones, A. (2013). Endocytosis, Intracellular Traffic and Fate of Cell Penetrating Peptide Based Conjugates and Nanoparticles. *Current Pharmaceutical Design*, 19(16), 2878–2894. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990297>
- Crowe, L. M., Crowe, J. H., & Rudolph, A. (1985). Preservation of Freeze-Dried Liposomes by Trehalose One of the practical difficulties with the frequently proposed use of liposomes for delivery of water-soluble substances to cells in whole organisms is that liposomes are relatively unstable during storage. *Measurement*, 242(1).
- Devine, D. V., & Bradley, A. J. (1998). The complement system in liposome clearance: Can complement deposition be inhibited? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32(1–2), 19–29.

[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00129-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00129-4)

- Drummond, D. C., Zignani, M., & Leroux, J. C. (2000). Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Progress in Lipid Research*, 39(5), 409–460. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(00\)00011-4](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(00)00011-4)
- Ferrari, A., Pellegrini, V., Arcangeli, C., Fittipaldi, A., Giacca, M., & Beltram, F. (2003). Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 Tat fusion proteins visualized in real time. *Molecular Therapy*, 8(2), 284–294. [https://doi.org/10.1016/S1525-0016\(03\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S1525-0016(03)00122-9)
- Foteini, P., Pippa, N., Naziris, N., & Demetzos, C. (2019). Physicochemical study of the protein–liposome interactions: influence of liposome composition and concentration on protein binding. *Journal of Liposome Research*, 29(4), 313–321. <https://doi.org/10.1080/08982104.2018.1468774>
- Gómez Zavaglia, A., Disalvo, E. a, & De Antoni, G. L. (2000). Fatty acid composition and freeze-thaw resistance in lactobacilli. *The Journal of dairy research*, 67(2), 241–247. <https://doi.org/10.1017/S0022029900004179>
- Harrigan, P. R., Madden, T. D., & Cullis, P. R. (1990). Protection of liposomes during dehydration or freezing. *Chemistry and Physics of Lipids*, 52(2), 139–149. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(90\)90157-M](https://doi.org/10.1016/0009-3084(90)90157-M)
- Harris, J., Werling, D., Hope, J. C., Taylor, G., & Howard, C. J. (2002). Caveolae and caveolin in immune cells: Distribution and functions. *Trends in Immunology*, 23(3), 158–164. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02161-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02161-5)
- Huwyler, J., Drewe, J., & Krähenbühl, S. (2008). Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs. *International Journal of Nanomedicine*, 3(1), 21–29. <https://doi.org/10.2147/ijn.s1253>
- Jan, A. T. (2017). Outer Membrane Vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: A perspective update. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01053>
- Jones, R. A., Poniris, M. H., & Wilson, M. R. (2004). PDMAEMA is internalised by endocytosis but does not physically disrupt endosomes. *Journal of Controlled Release*, 96(3), 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.02.011>
- Khalil, I. A., Kogure, K., Akita, H., & Harashima, H. (2006). Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacological Reviews*, 58(1), 32–45. Recuperado de <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33644593889&partnerID=40&md5=2eda353513c42633d844d3d747104218>
- Matveev, S., Li, X., Everson, W., & Smart, E. J. (2001). The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49(3), 237–250. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00138-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00138-7)

-
- Meier, O., Boucke, K., Hammer, S. V., Keller, S., Stidwill, R. P., Hemmi, S., & Greber, U. F. (2002). Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *Journal of Cell Biology*, 158(6), 1119–1131. <https://doi.org/10.1083/jcb.200112067>
- Nordenfelt, P., & Tapper, H. (2011). Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(2), 271–284. <https://doi.org/10.1189/jlb.0810457>
- Oku, N. (1999). Anticancer therapy using glucuronate modified long-circulating liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 40(1–2), 63–73. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(99\)00040-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(99)00040-X)
- Rubio, A. P. D., Martínez, J. H., Casillas, D. C. M., Leskow, F. C., Piuri, M., & Pérez, O. E. (2017). *Lactobacillus casei* BL23 produces microvesicles carrying proteins that have been associated with its probiotic effect. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01783>
- Sandvig, K., Pust, S., Skotland, T., & van Deurs, B. (2011). Clathrin-independent endocytosis: Mechanisms and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(4), 413–420. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.03.007>
- Simões, S., Slepushkin, V., Düzgünes, N., & Pedroso de Lima, M. C. (2001). On the mechanisms of internalization and intracellular delivery mediated by pH-sensitive liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1515(1), 23–37. Recuperado de <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035500592&partnerID=40&md5=04d64ca8a24a67a01c90fece0b2e2b21>
- Środa, K., Rydlewski, J., Langner, M., Kozubek, A., Grzybek, M., & Sikorski, A. F. (2005). Repeated injections of PEG-PE liposomes generate anti-PEG antibodies. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10(1), 37–47.
- Swanson, J., & Watts, C. (1995). Macropinocytosis. *Trends in Cell Biology*, 5(November), 424–428.
- Toyofuku, M., Nomura, N., & Eberl, L. (2019). Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology*, 17(1), 13–24. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>
- Tseng, Y.-L. (2002). Translocation of Liposomes into Cancer Cells by Cell-Penetrating Peptides Penetratin and Tat: A Kinetic and Efficacy Study. *Molecular Pharmacology*, 62(4), 864–872. <https://doi.org/10.1124/mol.62.4.864>
- Wang, Z., Tiruppathi, C., Cho, J., Minshall, R. D., & Malik, A. B. (2011). Delivery of nanoparticle-complexed drugs across the vascular endothelial barrier via caveolae. *IUBMB Life*, 63(8), 659–667. <https://doi.org/10.1002/iub.485>
- Winkowski, K., Ludescher, R. D., & Montville, T. J. (1996). Physicochemical characterization of the nisin-membrane interaction with liposomes derived from *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 323–327.

Wolfram, J., Suri, K., Yang, Y., Shen, J., Celia, C., Fresta, M., ... Ferrari, M. (2014). Shrinkage of pegylated and non-pegylated liposomes in serum. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 294–300. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.10.009>

Zhang, J. A., Anyarambhatla, G., Ma, L., Ugwu, S., Xuan, T., Sardone, T., & Ahmad, I. (2005). Development and characterization of a novel Cremophor® EL free liposome-based paclitaxel (LEP-ETU) formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59(1), 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.06.009>



Capítulo 3:

Interacción de lactobacilos de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 con células epiteliales intestinales en modelos *in vitro*.



3.1 Introducción

La microbiota intestinal tiene un impacto trascendental en el desarrollo del sistema inmune y su regulación, en la obtención de metabolitos esenciales para el hospedador, la modificación de los nutrientes y los fármacos administrados. Asimismo las células de la mucosa intestinal controlan y modelan la microbiota por diferentes mecanismos físicos y químicos. La microbiota tiende a generar una respuesta tolerogénica en el hospedador lo cual se logra a partir del establecimiento de una interrelación dinámica. Los microorganismos probióticos constituyen parte de esta microbiota y para poder colonizar el ámbito intestinal necesitan sobrevivir tanto a los procesos digestivos, como a las barreras naturales que se les presentan. En este sentido, en el capítulo 1 se observó que la cepa CIDCA 133 era capaz de resistir la acción bactericida de ciertos AMPs, mientras que la cepa CIDCA 331 se mostró altamente susceptible. La diferencia en sensibilidad frente a péptidos antimicrobianos de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 podría influir en la supervivencia y la colonización del intestino, asimismo podría extenderse también a una respuesta diferencial de las células en contacto con los lactobacilos, constituyendo capacidades probióticas distintivas de las cepas.

Un aspecto clave de la interacción entre los microorganismos comensales y las células del epitelio intestinal es la unión de los receptores celulares con diferentes ligandos que se encuentran en los microorganismos. Los mencionados receptores reconocen patrones moleculares conservados en diferentes grupos de microorganismos (PRRs, *pattern recognition receptors*, en inglés), acoplándose a vías de señalización intracelular que determinan la expresión de diferentes citoquinas, quimoquinas y péptidos antimicrobianos. A nivel intestinal, los enterocitos integran las señales de los diferentes PRRs registrando su entorno y pueden regular la respuesta inmune

umentando la actividad de macrófagos y células NK y /o modificando la secreción de citoquinas; siendo actores claves en la respuesta tolerogénica o no ante los microorganismos (Wang et al. 2019).

Entre los PRRs de los enterocitos, se encuentran los receptores de tipo Toll (TLR, *Toll like receptor*, en inglés) y los receptores de tipo NOD (NLR, *nucleotide binding oligomerization domains like receptor*, en inglés). Estos receptores reconocen patrones moleculares ampliamente conservados tanto en microorganismos patógenos como comensales y también pertenecientes a moléculas endógenas que funcionan como señales de daño celular (Yu, Wang y Chen, 2010; Satoh y Akira, 2016).

Los TLRs son receptores transmembrana que se encuentran tanto en la superficie exterior de las células (TLR1, 2, 3, 4, 5, 6) como en vesículas intracelulares (TLR3, 7, 8, 9). Estos receptores pueden reconocer moléculas de naturaleza muy variada, entre las que se encuentran ácidos nucleicos, lípidos, oligosacáridos y proteínas; cada tipo de TLR puede, además, reconocer más de un tipo de ligando. Ejemplos de ligandos de los receptores TLR son: el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas reconocido por TLR4, la flagelina reconocida por el TLR5, el peptidoglicano y el ácido lipoteicoico reconocidos por el TLR2 (Froy, 2005; Zeuthen, Fink y Frøkiær, 2008; Van Bergenhenegouwen *et al.*, 2014).

Los receptores NLRs comprenden una amplia familia de receptores, con 23 receptores descritos en humanos que poseen un dominio conservado de unión a nucleótidos y un dominio rico en leucina (Kingeter y Lin, 2012). En el epitelio intestinal podemos encontrar a los receptores NOD-1 y NOD-2 pertenecientes a esta familia. Estos son receptores intracelulares y típicamente reconocen al ácido γ -D-glutamil-mesodiaminopimélico presente en el peptidoglicano de bacterias Gram negativas (NOD-1) y muramildipéptido que es un péptido presente en la estructura del peptidoglicano (receptores NOD-2) (Wollny *et al.*, 2018).

El ambiente intestinal presenta diversas barreras químicas a las cuales la microbiota debe resistir a fin de colonizarlo. Entre ellas juegan un rol esencial las defensinas. Las defensinas expresadas a nivel intestinal humano son: las α defensinas HD-5, HD6 producidas por las células de Paneth, y las β defensinas hBD1, hBD2 y hBD3

producidas por los enterocitos. Las defensinas cumplen múltiples roles en la respuesta inmune innata y adaptativa que van más allá de su actividad antimicrobiana. En este sentido se sabe que las defensinas poseen actividad quimioattractante de células inmunes. Por ejemplo la β defensina humana 2 (hDB2) y la β defensina humana 3 (hBD3) son respectivamente quimioattractantes de mastocitos y macrófagos (Hazlett y Wu, 2011). Estas defensinas funcionan también como moduladores de la respuesta inmune en un contexto inflamatorio intestinal, colaborando con la protección de los enterocitos al promover la secreción de mucus y disminuir la expresión de enzimas formadoras de radicales libres como iNOS (sintasa inducible de óxido nítrico) y COX-2 (ciclooxigenasa 2) (Han *et al.*, 2015; Meade y O'Farrelly, 2019). En cuanto a la respuesta adaptativa se encontró que pueden amplificar la respuesta inmune, induciendo citoquinas proinflamatorias como IL-6 e IL-8 en monocitos que promueven la actividad y respuesta de los linfocitos T (Boniotto *et al.*, 2006).

Esta multifuncionalidad de las β defensinas, observada en los organismos superiores, resulta de suma importancia en el control de la diversidad y distribución de las poblaciones microbianas de la microbiota. Por esto Meade y O'Farrelly ubican a estos péptidos en el centro del balance en la relación e intercomunicación entre la microbiota y el hospedador, denominándolos los "granjeros" del microbioma (Meade y O'Farrelly, 2019). De hecho, numerosos casos de disbiosis (desbalance de las poblaciones microbianas de la microbiota) se deben a una expresión alterada de β defensinas fenómeno que también se observa en enfermedades gastrointestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, en inglés) o la enfermedad de Crohn (Aldhous, Noble y Satsangi, 2009).

Si bien en el ambiente intestinal se encuentran presentes distintas defensinas, nuestros estudios se focalizaron en las β defensinas producidas por los enterocitos (hBD1 y hBD2) En particular, la β defensina 2 (hBD2), de naturaleza inducible, presentó mayor diferencia en la actividad antimicrobiana frente a los lactobacilos (Alves *et al.*, 2013)(Alves *et al.*, 2013)(Hugo, De Antoni, y Pérez 2010; Alves *et al.* 2013).

La regulación de la expresión de hBD2 en el epitelio intestinal se encuentra mediada por receptores tipo Toll como el TLR2, TLR3 TLR4, TLR5, TLR6, TLR9, los

receptores NOD y también los receptores de TNF- α , IL-1 e IL-17 entre otros. Por la acción de estos receptores se activan las cascadas de señalización de las proteínquinas activadas por mitógenos (MAPK, mitogen-activated protein kinase, en inglés) y la activación de la vía de NF- κ B (*nuclear factor kappa B*, en inglés) que regulan la expresión de hBD2 a nivel transcripcional. La vía de las MAPK incluye distintos intermediarios como las proteínas p38 MAPK, ERK (*extracellular signal regulated kinase*) y JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), que derivan en la activación, de los factores de transcripción AP-1 (activator protein-1, en inglés), uniéndose al promotor del gen de hBD2 aumentando su expresión. Por otra parte, la vía de señalización por NF- κ B implica la activación de los factores de transcripción de la familia de NF- κ B que se encuentran secuestrados en el citosol unidos a las proteínas inhibitorias I κ B. Cuando se activa esta vía, la proteína I κ B es fosforilada por la quinasa de I κ B (IKK), liberando los factores NF- κ B p65 y p50. Los factores NF- κ B p65/p50 libres son luego translocados dentro del núcleo donde activan la expresión de hBD2 (Takaesu *et al.*, 2003; Froy, 2005; Gan *et al.*, 2014). En la Figura 3.1 se muestra un esquema de la inducción de hBD2 tomado del trabajo de Froy y col (Froy, 2005).

También se ha descrito una regulación epigenética de la expresión de hBD2 por desacetilación de histonas a través de la histona desacetilasa (HDAC). La actividad de dicha enzima puede ser modificada por la interacción de la células epiteliales con microorganismos probióticos o metabolitos producidos por los mismos como el butirato (Yin y Chung, 2011; Chen *et al.*, 2020). Cuando las histonas se encuentran acetiladas, los factores de transcripción pueden unirse al DNA permitiendo la transcripción de los genes, en cambio cuando la histonas se encuentran desacetiladas la cromatina presenta una estructura más condensada que impide la unión de los factores de transcripción y previene la transcripción de los genes (Yin y Chung, 2011).

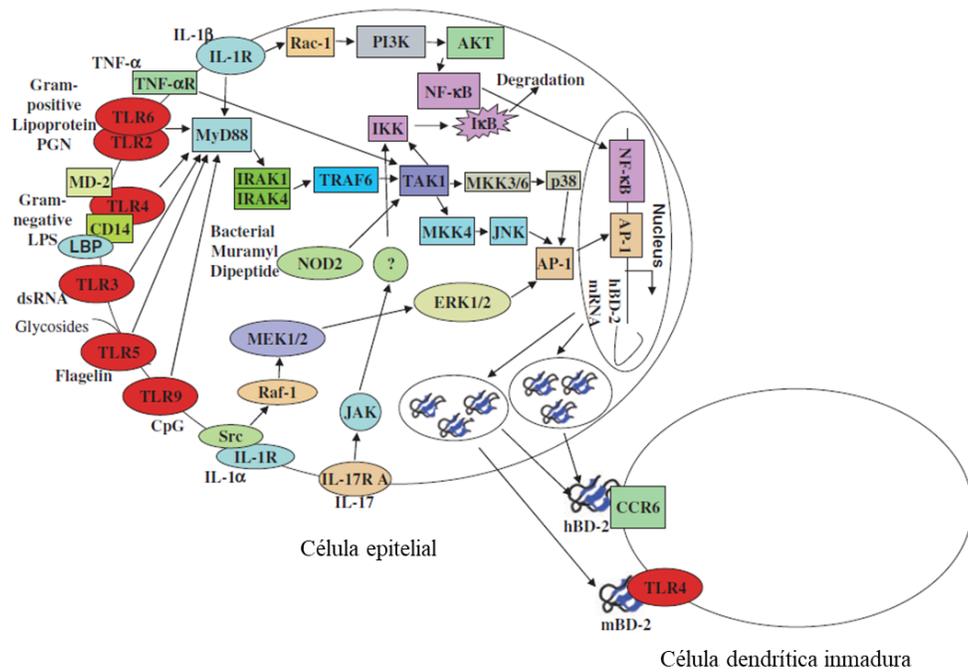


Figura 3.1. Expresión de hBD2 por sus diferentes vías de señalización. Esquema tomado del trabajo de Froy y col (Froy, 2005)

Teniendo en cuenta, además, que las defensinas desempeñan un papel central en la conformación del microbioma y que los lactobacilos son parte de ella, resulta de particular interés investigar si dichas bacterias tienen influencia en su expresión. Este aspecto se sumaría a las diferencias de susceptibilidad a péptidos antimicrobianos encontradas entre las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 y podría contribuir al conocimiento del efecto de los microorganismos sobre el hospedador.

En este capítulo se estudió la respuesta de células epiteliales intestinales desencadenada por la interacción con lactobacilos de diferente sensibilidad a péptidos antimicrobianos. Para esto evaluó la expresión de la hBD2 (inducible) en enterocitos en cultivo y también se estudió la activación de factores de transcripción asociados a la repuesta inmune innata para determinar las vías de señalización involucradas durante la interacción enterocito-lactobacilos.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Para los ensayos se utilizaron las cepas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (CIDCA 331) y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (CIDCA 133), las cuales se cultivaron en caldo (MRS) a 37 °C en aerobiosis por 16 h antes de los experimentos. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación y a continuación lavadas dos veces con buffer fosfato salino (PBS). Los pellets obtenidos fueron luego suspendidos en diferentes medios y llevados a la concentración adecuada para los ensayos.

Para los ensayos realizados con bacterias muertas las suspensiones bacterianas fueron tratadas con calor o radiación UV. Las bacterias muertas por calor se obtuvieron incubando las suspensiones bacterianas (1×10^8 UFC/ml) a 80 °C durante 10 min. En el caso de las bacterias muertas por radiación UV, las suspensiones de lactobacilos se colocaron sobre una placa de Petri y se irradiaron durante 30 min con luz UV (254 nm) con una exposición de 7,89 J/cm² a una distancia de 10 cm.

3.2.2 Ensayo de expresión de beta defensina 2

Se evaluó la capacidad de las cepas de lactobacilos CIDCA 133 y CIDCA 331, de inducir o de modular la expresión de hBD2 en enterocitos humanos en cultivo (línea Caco-2/TC7). Como control positivo se utilizó flagelina (FliC) de *Salmonella entérica* serovar *Enteritidis* que es un inductor de hBD2 a través de TLR5 (Schlee *et al.*, 2007). La flagelina se obtuvo mediante un protocolo de purificación en nuestro laboratorio (Iraporda, 2016). La determinación de la expresión de defensina se realizó por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

En los ensayos, se utilizaron placas de cultivo de 24 fosas con células Caco-2/TC7 crecidas hasta postconfluencia temprana incubándolas durante 7 días a 37 °C en medio DMEM con 15% SFB y Penicilina / Estreptomina (1000 UI, 1000 µg/ml). Las células fueron lavadas dos veces con PBS y se las incubó por 18 h con una suspensión en DMEM de lactobacilos viables o inactivados por calor con una concentración final de 1×10^8 UFC/ml. Transcurridas las 18 h, las fosas se lavaron con PBS y se renovó el medio de cultivo agregando en algunas condiciones FliC (1,5 µg/ml).

Las monocapas se incubaron durante otras 6 h y finalmente se procedió al lisado de las células. Para ello se lavaron las monocapas con PBS y se añadió el buffer de lisis del kit de purificación RNAspin mini (GE Healthcare UK) por 2 minutos a temperatura ambiente. El lisado se guardó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de la purificación del RNA.

3.2.2.1 Purificación de RNA

Para la obtención de RNA total se utilizó el protocolo de purificación del kit comercial RNAspin mini (GE Healthcare UK). Esta purificación se basa en la utilización de una columna de afinidad para concentrar los ácidos nucleicos totales. La adición posterior de la enzima DNAsa permite obtener RNA ultra puro. Durante la purificación se utilizó material libre de RNAsa, DNAsa y pirógenos. El RNA obtenido se guardó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2.2 Transcripción reversa

Se realizó la técnica de transcripción reversa (Reverse transcription-PCR, RT-PCR) para sintetizar DNA complementario (cDNA) del RNA presente en la muestra. Dado que el objetivo es transcribir todo el RNA presente en la muestra se utilizaron primers con secuencias aleatorias (*random primers*).

La mezcla de reacción para la transcripción reversa inicial contuvo $1\text{ }\mu\text{l}$ de *random primers* más $11\text{ }\mu\text{l}$ de muestra ($1\text{ }\mu\text{g}$ de RNA extraído) y se realizó un ciclo de desnaturalización a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min en un termociclador. Pasados los 10 min, los tubos se enfriaron inmediatamente en hielo y se les agregaron $8\text{ }\mu\text{l}$ de una premezcla conteniendo: $1\text{ }\mu\text{l}$ Inhibidor de RNAsa, $1\text{ }\mu\text{l}$ Ditioneitol, $4\text{ }\mu\text{l}$ buffer de reacción 5X (Invitrogen), $1\text{ }\mu\text{l}$ dNTPs 10 mM, $1\text{ }\mu\text{l}$ MMLV-Reverse Transcriptase (Invitrogen), obteniéndose un volumen final de $20\text{ }\mu\text{l}$ por tubo. La reacción se llevó a cabo en un ciclador térmico con el siguiente programa: 1) $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min; 2) $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 h. El cDNA obtenido se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2.3 PCR cuantitativa en tiempo real

La cuantificación de la expresión de los genes se realizó por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) empleando el protocolo del kit comercial SYBR™ Green

PCR Master Mix (Invitrogen) que utiliza una mezcla de reacción lista para usar con el colorante SYBR® Green I, DNA polimerasa AmpliTaq Gold®, dNTPs con dUTP y buffer. El colorante SYBR Green se une al DNA de doble hebra y emite fluorescencia verde cuando es excitado con luz azul o UV. La intensidad de la fluorescencia verde observada es proporcional a la cantidad de DNA de doble hebra producto de la PCR. Para la cuantificación, se mide en cada ciclo de PCR la fluorescencia emitida por la muestra y por lo tanto el aumento del producto de amplificación en cada ciclo. Las medidas de fluorescencia fueron registradas por el software del equipo (BIO-rad iQ5 Optical System Software) que las grafica en función del número de ciclos de la PCR.

Este método sólo permite determinar la expresión relativa de un gen entre las distintas muestras ya que no se sabe la correspondencia del número de copias con la fluorescencia medida. El software determina un valor de fluorescencia umbral y calcula para cada muestra el número de ciclos en los que se alcanza este umbral de fluorescencia. A este número se lo denomina C_t . La muestra que tenga el mayor número de copias tendrá el C_t menor ya que alcanzara la fluorescencia umbral en menor cantidad de ciclos. La expresión relativa de los genes se calcula relacionando los C_t de las diferentes muestras. Para cada reacción se utilizó: 1 μ l de primer *Forward* y 1 μ l de primer *Reverse* (concentración final 0,5 μ M); 10 μ l dilución 1/20 de molde de cDNA; 12 μ l Master Mix (colorante SYBR® Green I, DNA polimerasa AmpliTaq Gold®, dNTPs con dUTP y buffer) (Invitrogen).

El programa de ciclado de temperaturas fue el siguiente: Paso 1: 95 °C 10 min x 1 ciclo; Paso 2: (95 °C 15 seg, 60 °C 1 min) x 40 ciclos.

Para el análisis de los resultados de la PCR cuantitativa en tiempo real, se utilizó el método de C_t comparativo descrito por Livak y Schmittgen, empleando el gen β -actina como normalizador (Livak y Schmittgen, 2001). Como se dijo anteriormente, el C_t es el ciclo de la PCR en el que se supera un determinado umbral de fluorescencia. A partir de este punto, la fluorescencia es significativamente superior a la basal. Para comparar entre muestras, para cada una se normaliza el C_t del gen de interés respecto al gen de referencia generando un delta (ΔC_t). Luego, se comparan los ΔC_t de cada muestra experimental (ΔC_tM), con el ΔC_t de la muestra utilizada como control basal (ΔC_tC) para obtener el $\Delta\Delta C_t$.

La cantidad relativa en cada muestra está definida por la siguiente fórmula:

$$2^{-(\Delta\Delta C_t)} = 2^{-(\Delta C_{tM} - \Delta C_{tC})}$$

En todos los casos se chequearon los productos de amplificación analizando las curvas de *melting* para corroborar que el producto amplificado sea el esperado y único. Durante las corridas se incluyeron los controles negativos: uno con la mezcla de reacción sin ácidos nucleicos y otro con la mezcla de reacción y RNA extraído.

Tabla 3.1. Secuencia de los primers utilizados para qRT-PCR.

Primer	Secuencia 5'-3' (fwrđ -rev)	referencia
β -actina	CCT GGC ACC CAG CAC AAT GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT	Rumbo y col., 2004
hBD2	GCC TCT TCC AGG TGT TTT TGG TGG TTT ACA TGT CGC ACG TC	Este trabajo ^a

^a Los primers de hBD-2 se diseñaron utilizando la herramienta Primer-BLAST(Ye *et al.*, 2012)

3.2.3 Evaluación de la vía del factor de transcripción NF- κ B en la línea reportera HT-29-NF- κ B-GFP

Con el fin de evaluar la capacidad de activación y modulación de la vía de transcripción de NF- κ B, se utilizaron las células HT-29-NF- κ B-GFP que constituyen una línea de enterocitos humanos reportera.

La línea reportera fue provista por la Dr. Mariela Bollati del Institut Pasteur de Montevideo (IP Montevideo). Fue obtenida mediante transfección estable con el plásmido pNF- κ B- hrGFP (Stratagene, EEUU) que posee el gen de proteína fluorescente verde(GFP) bajo el control de un promotor conteniendo 5 sitios de unión para NF- κ B (Mastropietro *et al.*, 2015). La transfección con el plásmido pNF- κ B- hrGFP permite evaluar de forma indirecta la vía de activación de NF- κ B a través de la expresión de la proteína GFP. Para el mantenimiento de esta línea celular se utilizó medio DMEM con 10% v/v SFB (Gibco Thermo Fisher Scientific, EEUU) inactivado, 4 mM GlutaMAX y antibióticos. Las células se cultivaron a 37 °C en atmósfera con 5% CO₂

– 95% aire y se se utilizaron en estado de post confluencia luego de 7 días de incubación.

Durante los ensayos, se utilizaron monocapas sembradas en placas de cultivo de 24 fosas con una concentración inicial de 2×10^5 células por fosa; incubándolas durante 7 días. Una vez crecidas las células, se lavaron dos veces con PBS y se reemplazó el medio de cultivo habitual por DMEM sin suero. Posteriormente se añadió a las monocapas una suspensión de lactobacilos con una concentración de 5×10^7 UFC/fosa y se las incubó a 37 °C durante 5 h. Transcurrido ese tiempo, se lavaron las monocapas dos veces con PBS para retirar las bacterias no adheridas, se añadió flagelina (FliC 1,5 µg/ml) como control positivo y se incubó durante 18 h. Las células fueron removidas usando tripsina (Trypsin-EDTA, GIBCO, Thermo Fisher Scientific, EEUU) y se analizaron por citometría de flujo en un citómetro BD FACSCalibur™ (Becton, Dickinson & Company, EEUU). Se cuantificó el porcentaje de eventos positivos para fluorescencia verde (expresión de GFP). Los resultados se analizaron con el software FlowJo X (Becton, Dickinson & Company, EEUU).

3.2.4 Evaluación de la activación del promotor de ccl20 en Caco-2 ccl20: luc

La línea Caco-2 ccl20: luc es una línea de enterocitos humanos reportera de la quimoquina CCL20. La línea expresa la luciferasa de la luciérnaga (*Lampyris noctiluca*) bajo el control del promotor de CCL20 (Nempont *et al.*, 2008). CCL20 es una quimoquina atrayente de células dendríticas y en menor medida de macrófagos. Este sistema permite evaluar de manera sencilla la respuesta proinflamatoria, ya que la actividad del promotor de CCL20 es altamente inducible mediante estímulos proinflamatorios como los agonistas de los receptores TLRs, por lo que resulta un indicador muy sensible de la activación de la respuesta innata (Romanin *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se utilizó el sistema Caco-2 ccl20:luc provista por el Dr. Martín Rumbo del Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Universidad Nacional de La Plata) para evaluar el efecto de la incubación de lactobacilos con enterocitos en presencia

de estímulos proinflamatorios como flagelina (FlIC). La actividad luciferasa del sistema es proporcional a la expresión del gen *ccl20*. Para su determinación se utilizó el kit comercial "Luciferase Assay System" (Promega, EEUU). La medida de la actividad enzimática se lleva a cabo mediante la reacción descrita en la Figura 3.2 y es cuantificada utilizando un luminómetro.

El cultivo y mantenimiento de la línea Caco-2 *ccl20: luc* se realizó de la misma manera que para la línea Caco-2/TC7.

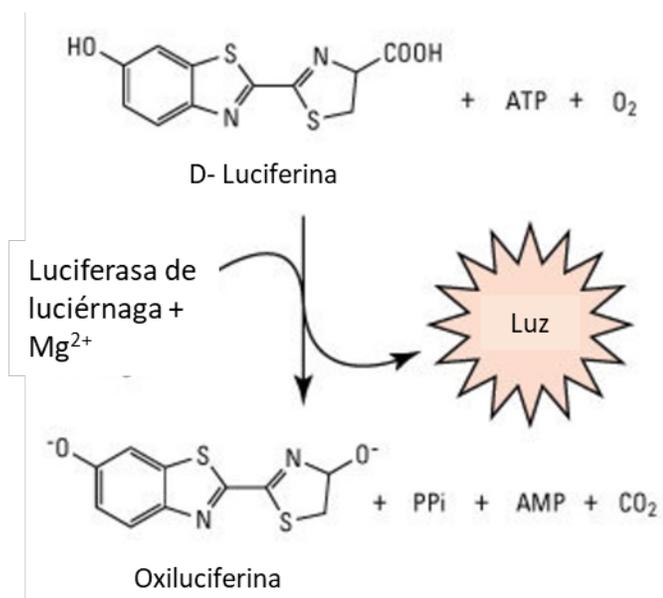


Figura 3.2. Reacción de la enzima luciferasa. Imagen modificada de Thermo Fisher Scientific.

El ensayo se realizó partiendo de placas de cultivo de 24 fosas con células Caco-2 *ccl20: luc* postconfluentes. Se ensayaron distintas condiciones utilizando FlIC como control positivo y suspensiones de lactobacilos en presencia o no de FlIC. Los lactobacilos se emplearon en una concentración final de 1×10^8 UFC/ml y se incubaron durante 45 min sobre las células. Trascurrido el tiempo de incubación se agregó FlIC 1,5µg/ml en las fosas correspondientes y se incubaron las monocapas durante 5 h más. Luego se retiró el sobrenadante de las fosas y se lisaron las células con el buffer de lisis del kit comercial Luciferase Assay System (Promega, EEUU) (Tris-fosfato 25mM, DTT2mM, ácido tetra acético 1,2-diaminociclohexano, 10% glicerol y 1% Tri-

tón X-100). El lisado celular fue conservado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de la determinación de la actividad de la enzima luciferasa. La cuantificación se realizó con un luminómetro Labsystems Luminoskan TL Plus (Thermo Scientific, EEUU), tomando $8\text{ }\mu\text{l}$ del lisado y agregándole $40\text{ }\mu\text{l}$ del sustrato luciferina, la medida se realizó dentro de los 10 segundos de haber realizado la mezcla.

3.2.5 Análisis estadístico

Los análisis de la varianza (ANOVA) se realizaron usando el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, EEUU). La comparación de las medias se realizó por el método de Tukey, considerando como estadísticamente significativa la diferencia cuando $p < 0,05$.

3.3 Resultados

3.3.1 Expresión de beta defensina 2 (hBD2)

En este ensayo, se estudió la expresión de hBD2 en células Caco-2/TC7, en presencia de los lactobacilos CIDCA 133 y 331 utilizando la técnica qRT-PCR. Se utilizó flagelina (FliC) como control positivo de la expresión de hBD2. A su vez se determinó el efecto de la preincubación de los lactobacilos en la expresión de hBD2 en presencia de FliC.

En un primer paso se puso a punto el sistema enfrentando a las células con FliC y con una suspensión de los lactobacilos. Se probó con un tiempo corto de estímulo de 2 h y uno largo de 24 h.

Los resultados de estos ensayos demostraron que la respuesta a ambos tiempos es casi equivalente excepto para el caso de la cepa CIDCA 331 donde la expresión de hBD2 fue significativamente mayor con el estímulo de 24 h (Figura 3.3).

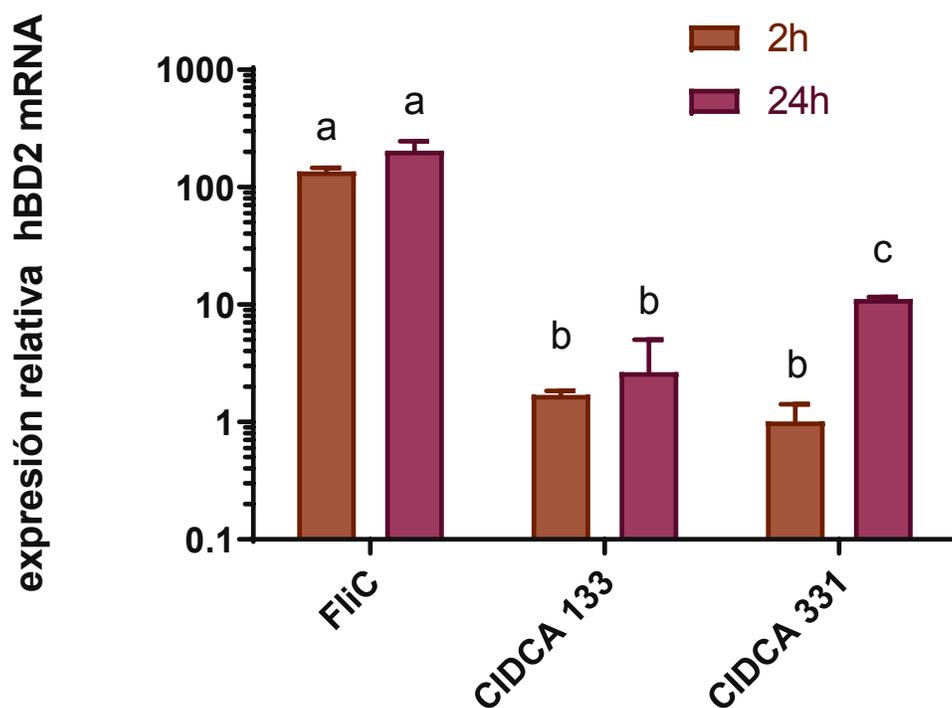


Figura 3.3. Expresión de mRNA de hBD2 en células caco2/TC7 con respecto al control basal. Las células fueron estimuladas con suspensiones de lactobacilos (1×10^8 UFC/ml) o con flagelina (1,5 μ g/ml). Durante 2 o 24 h. Cada resultado representa la media \pm la desviación estándar de un experimento representativo (n=3). Letras diferentes indican una diferencia significativa ($P < 0,05$; Tukey)

Posteriormente se realizaron ensayos con la intención de comprobar si la preincubación con las cepas bacterianas producía un efecto diferencial en la expresión de hBD2 ante el estímulo con FliC. Para este ensayo se realizó una preincubación de 16 h con una suspensión de lactobacilos seguida por un estímulo de 5 h con FliC. Los resultados se muestran en la Figura 3.4.

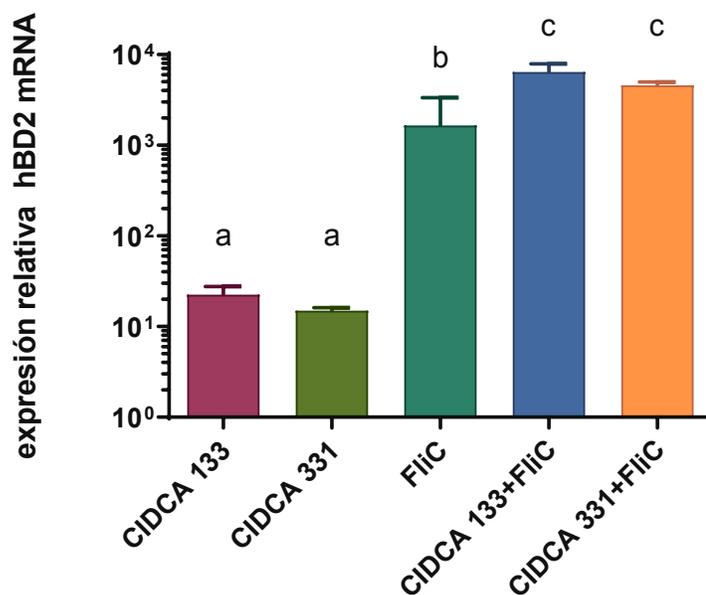


Figura 3.4. Expresión de mRNA de hBD2 en células Caco2/TC7 con respecto al control de expresión en células no estimuladas. Las células fueron estimuladas durante 16 h con suspensiones de lactobacilos (1×10^8 UFC/ml), seguido por un estímulo de 5 h con flagelina (1,5 μ g/ml). Cada resultado representa la media \pm la desviación estándar de un experimento representativo (n=3). Letras diferentes indican una diferencia significativa ($P < 0,05$; Tukey).

Se observó que, las células pretratadas con las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 y luego estimuladas con FliC mostraron una mayor expresión de hBD2 con respecto a las células que sólo fueron estimuladas con FliC. En efecto, la coincubación de los lactobacilos con FliC incrementó la expresión de hBD2 entre 6400 y 4600 veces (cepas CIDCA133 y CIDCA 331 respectivamente) respecto al basal, frente a un incremento de 1600 veces para las células que sólo fueron estimuladas con FliC. Por otra parte, se encontró que las cepas de lactobacilos por sí solas pudieron estimular la expresión de hBD2 aunque en menor magnitud que la flagelina. Estos últimos resultados concuerdan con los mostrados en la Figura 3.3 donde se evidencia que los lactobacilos son inductores débiles de la expresión de hBD2.

Con el objeto de determinar si es necesaria la viabilidad de las bacterias para estimular la expresión de la hBD2, se compararon los resultados utilizando bacterias vivas o muertas por calor (HK, *heat killed*, en inglés).

Como puede apreciarse en la Figura 3.5, no se observaron diferencias en la expresión de la hBD2 entre las células tratadas con bacterias viables o bacterias inactivadas por calor. Los lactobacilos inactivados por UV tuvieron un efecto semejante que los inactivados por calor en la expresión de la hBD2 (no mostrado).

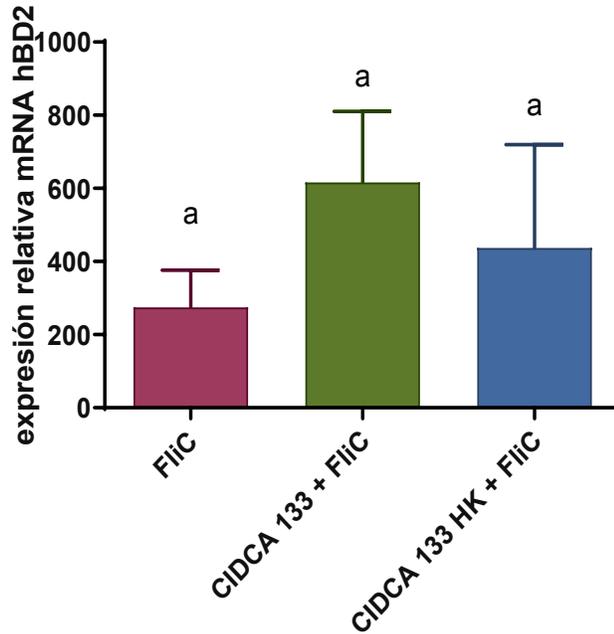


Figura 3.5. Expresión de mRNA de hBD2 en células Caco2/TC7. Las células fueron estimuladas por 16 horas con suspensiones de *Lactobacillus* CIDCA 133, se utilizaron bacterias vivas, y bacterias muertas por calor (CIDCA133HK). Luego de la incubación con las bacterias, se estimuló las células durante 5 h con flagelina. Cada resultado representa la media \pm la desviación estándar de un experimento representativo (n=3). Letras diferentes indican una diferencia significativa ($P < 0,05$; Tukey).

3.3.2 Modulación del factor de transcripción NF- κ B en la línea reportera HT-29-NF- κ B-GFP

El factor de transcripción NF- κ B, juega un rol muy importante en la regulación de la respuesta inmune. La fosforilación de su inhibidor ($I\kappa B\alpha$), permite la translocación del factor NF- κ B al núcleo activando la transcripción de diferentes genes involucrados especialmente en una respuesta proinflamatoria. Se sabe que la expresión

de la hBD2 se encuentra en parte regulada por la activación de NF- κ B (Vora *et al.*, 2004; Froy, 2005).

Usando la línea celular reportera HT-29-NF- κ B-GFP se evaluó la activación de esta vía incubando las células con los lactobacilos y con un estímulo proinflamatorio, como FliC.

Los resultados de estos experimentos se pueden ver en la Figura 3.6.

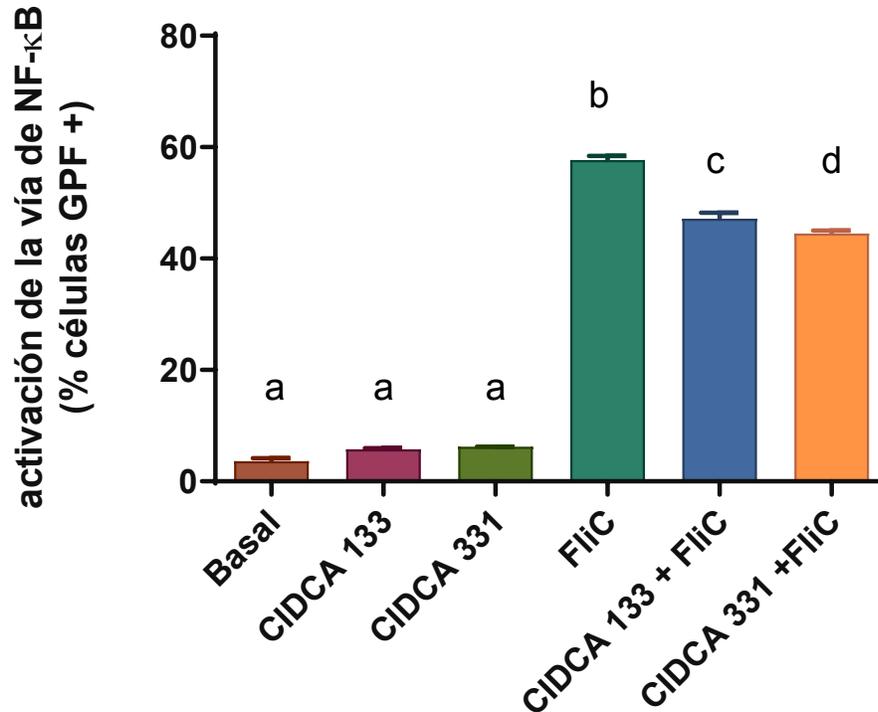


Figura 3.6. Porcentaje de células HT-29- GFP FliC positivas. Las células HT-29-NF- κ B-GFP Se estimularon durante 5 h con suspensiones de bacterias y luego durante 16 h con FliC. Cada resultado representa la media \pm la desviación estándar de un experimento representativo n=3. Letras diferentes indican una diferencia significativa ($P < 0,05$; Tukey).

Estimulando las células solamente con las suspensiones de lactobacilos no se observó expresión de la proteína GFP lo cual indica que no hubo activación de la vía de NF- κ B. El estímulo proinflamatorio (FliC) aumentó significativamente el porcentaje de células GFP positivas hasta alrededor de 60 %. La presencia de los lactobacilos en las células tratadas con FliC originó una menor activación de la vía NF- κ B evidenciada por una reducción significativa de las células GFP positivas respecto a las células que no fueron incubadas con bacterias.

3.3.3 Evaluación de la activación de ccl20 en Caco-2 ccl20: luc

Se utilizó como abordaje complementario relacionado con la vía de NF- κ B, el sistema reportero Caco-2 ccl20: luc dado que la expresión de la quimoquina CCL20 también está regulada por el factor de transcripción NF- κ B. La activación del promotor de CCL20 en este modelo produce la expresión de la enzima luciferasa indicando una activación de la vía NF- κ B.

Empleando este sistema se estudió el efecto inmunomodulatorio de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 sobre la activación del promotor de ccl20. Se utilizó FliC como control positivo. Los resultados se muestran en la Figura 3.7.

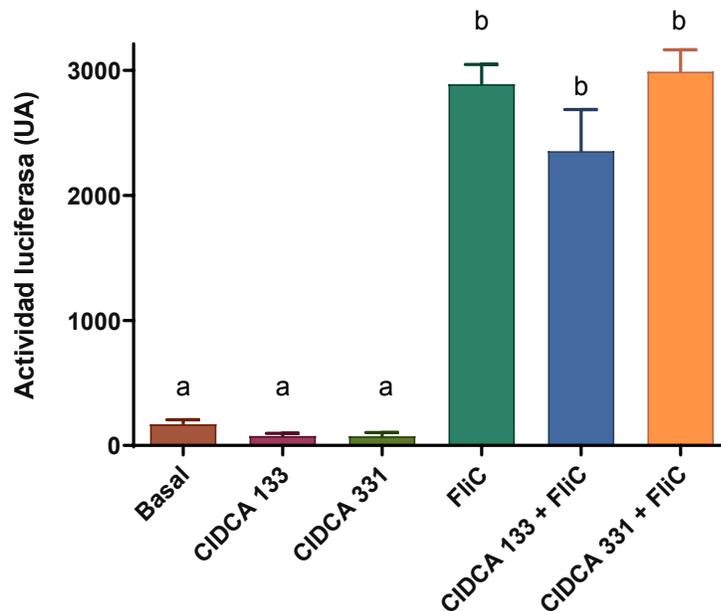


Figura 3.7. Efecto de la preincubación de células Caco-2 ccl20: luc con lactobacilos de la cepa CIDCA 133 o CIDCA 331 sobre la actividad luciferasa expresada en unidades arbitrarias (UA). Las células fueron preincubadas durante 45 min con suspensiones de bacterias (1×10^8 bacterias/ml) y cuando fue necesario se añadió posteriormente flagelina 1.5 μ g/ml durante 5 h. Cada resultado representa la media \pm la desviación estándar de un experimento representativo n=3. Letras diferentes indican una diferencia significativa ($P < 0,05$; Tukey).

La incubación con FliC produjo un aumento significativo de la fluorescencia indicando la expresión de ccl20 y la activación de NF- κ B. Los lactobacilos por sí solos

no fueron capaces de aumentar significativamente la fluorescencia respecto al control. Por otra parte, se observó una tendencia a la disminución de la fluorescencia cuando las células fueron preincubadas con la cepa CIDCA 133 seguido de la estimulación con FliC. Este resultado correlaciona con los obtenidos utilizando la línea reportera HT-29 GFP (Figura 3.6) donde se observó una disminución significativa de la activación de vía NF- κ B inducida por FliC cuando las células se preincubaron con los lactobacilos.

Para evaluar si el efecto modulador encontrado en la línea Caco-2 ccl20 Luc dependía de la viabilidad de la bacterias, se utilizaron suspensiones de bacterias muertas por luz UV y se repitió el esquema de estimulación utilizado anteriormente. Los resultados mostrados en la Figura 3.8 evidencian que las bacterias inactivadas por UV producen el mismo efecto que las viables (Figura 3.7).

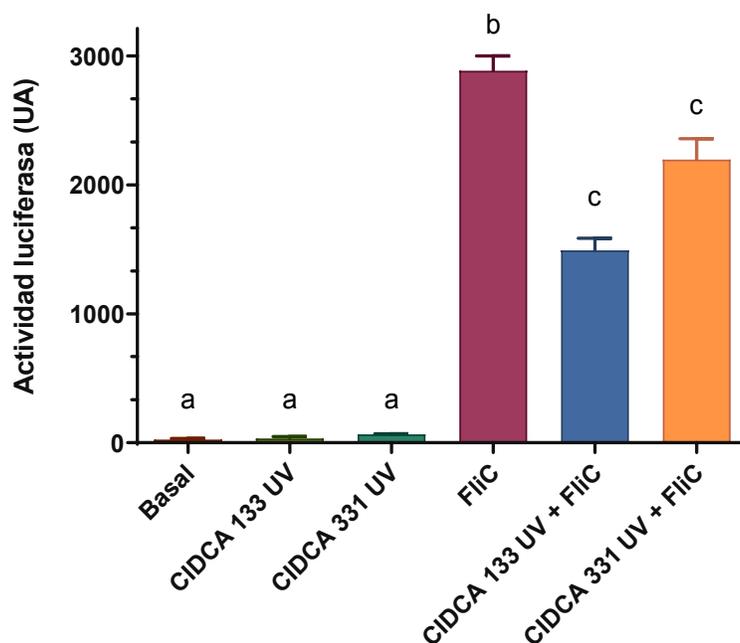


Figura 3.8. Efecto de la viabilidad de los lactobacilos de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 sobre la actividad luciferasa inducida por flagelina en células Caco-2 ccl20: luc, expresada en unidades arbitrarias (UA). Las células fueron preincubadas durante 45 min con suspensiones de bacterias muertas por luz UV (1×10^8 UFC/ml) y luego durante 5 h con flagelina 1.5 μ g/ml cuando fue necesario. Cada resultado representa la media \pm la desviación estándar de un experimento representativo (n=3). Letras diferentes indican una diferencia significativa ($P < 0,05$; Tukey).

Las bacterias solas no produjeron un aumento en la activación de CCL20 en las células Caco-2 ccl20: luc. Se observó a su vez que, la preincubación con lactobacilos de células estimuladas con FliC disminuyeron la expresión de la vía NF- κ B en comparación con la células estimuladas solamente con FliC. En efecto, la incubación con FliC produjo una luminiscencia de 2880 UA en las células reporteras, mientras que en las células preincubadas con lactobacilos y FliC hubo una disminución de la actividad lucifereasa del 49% (1490 ua de luminiscencia) para la cepa CIDCA 133 y del 24% (2190 ua de luminiscencia) para la cepa CIDCA 331.

3.4 Discusión

En este capítulo se estudió la expresión de la hBD2 y la activación de la vía de señalización de NF- κ B de células del epitelio intestinal en interacción con las cepas de lactobacilos CIDCA 133 y CIDCA 331.

Los resultados de los experimentos realizados mostraron la capacidad de ambos lactobacilos (CIDCA 133 y CIDCA 331) de estimular la expresión de hBD-2 en forma moderada. A su vez, se evidenció un efecto sinérgico en la expresión de hBD-2 cuando se incubaron los enterocitos con los lactobacilos y la flagelina. Este efecto, además, no dependió de la viabilidad de los lactobacilos indicando que la respuesta se produce por factores estructurales de las bacterias como componentes de la pared celular, motivos CpG o MVs (vesículas extracelulares bacterianas) entre otros (Froy, 2005; Kaparakis *et al.*, 2010; Gan *et al.*, 2014).

El aumento de la expresión de hBD2 podría afectar la viabilidad de microorganismos con distinta sensibilidad a péptidos antimicrobianos. De esta manera, cepas más resistentes como la cepa CIDCA133 podrían sobrevivir a mayores concentraciones de hBD2 mientras que cepas más sensibles como la cepa CIDCA 331, no. En este último caso, la estimulación de hBD2 por parte de la cepa CIDCA 331 tendría un efecto suicida o perjudicial para la bacteria. El efecto sinérgico observado con el estímulo conjunto de lactobacilos y flagelina sobre la expresión de hBD2 indicaría que la presencia de los lactobacilos en el intestino estaría potenciando, al menos transitoriamente, la producción de hBD2 frente a estímulos proinflamatorios lo cual podría

ser altamente relevante para la respuesta del hospedador a microorganismos presentes en el entorno intestinal.

La regulación de la expresión de la hBD2 en células epiteliales es compleja e involucra gran cantidad de vías de señalización intracelular que modifican su expresión a nivel transcripcional y epigenético (Froy, 2005; Chen *et al.*, 2020). Una de las principales vías involucradas en la expresión de hBD2 es la vía de NF- κ B cuya activación está asociada también a la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL1 y CCL20. En este trabajo se utilizaron dos líneas celulares reporteras para la evaluación de la vía de NF- κ B, observándose que no existió activación en presencia de los lactobacilos y que ante un estímulo proinflamatorio como la flagelina los lactobacilos disminuyen su expresión. Estos resultados plantearon el interrogante sobre la vía utilizada por los lactobacilos para inducir la expresión de la hBD2, ya que si bien las bacterias fueron inductores débiles de la defensina; la vía de señalización de NF- κ B parecería no estar implicada. Analizando los componentes involucrados en el diseño experimental tanto la flagelina como los lactobacilos estarían utilizando receptores Toll para inducir la expresión de hBD2. En efecto, la flagelina es un agonista de TLR5 que estimula la expresión de hBD2 activando NF- κ B por una cascada de señalización que incluye a la proteína adaptadora MyD88, las quinasas IRAK1, IRAK4, el factor TRAF6, y las quinasas TAK1, IKK α e IKK β . Por otra parte, las bacterias Gram positivas, como los lactobacilos, podrían inducir la expresión de hBD2 por activación del receptor TLR2 a través de la unión con el peptidoglicano de la pared celular. El hecho de que tanto las bacterias viables como las inactivadas produjeran un efecto equivalente en la inducción de hBD2 apoya la hipótesis de que un componente estructural como el peptidoglicano estaría actuando como estímulo de TLR2. El TLR2 también utiliza una vía de señalización intracelular similar a TLR5 para concluir en la activación de NF- κ B para estimular respuestas. Sin embargo, teniendo en cuenta lo antes expuesto, los lactobacilos parecen no estar utilizando la vía del NF- κ B para aumentar la expresión de la hBD2, más aún disminuyen la activación de NF- κ B inducida por FliC. Otros trabajos también han reportado una modulación independiente de NF- κ B en la expresión de hBD2 por microorganismos comensales (Chung y Dale, 2008). Estos autores demostraron que usando inhibidores de la vía de activación de NF- κ B

no se observaba disminución en la expresión de hBD2 cuando se estimulaba las células con bacterias comensales. En nuestros resultados se observa también un contraste entre el efecto modulador que los lactobacilos produjeron en la activación de NF- κ B inducida por flagelina, y el aumento sinérgico en la expresión de hBD2 que produjo la coincubación de lactobacilos con flagelina. Estas evidencias avalan nuevamente que la regulación de la expresión de la hBD2 en enterocitos por los lactobacilos involucra vías de señalización diferentes de la vía de NF- κ B. En este contexto, las vías de MAPK o la inducción de genes por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) podrían ser vías alternativas para considerar. Al respecto, se encuentra descrito que algunos lactobacilos pueden estimular la producción de ROS en enterocitos por medio de la enzima NADPH oxidasa1 (NOX-1) y que bajos niveles de ROS pueden aumentar la actividad del factor de transcripción Nrf-2, que regula la inducción de genes como la hBD2 (Gloire, Legrand-Poels y Piette, 2006; Jones *et al.*, 2013, 2015; Houghton, Fassett y Coombes, 2016). Asimismo, se sabe que la inducción de ROS en enterocitos produce una disminución de la activación de NF- κ B al inhibir la ubiquitinación del inhibidor I κ B (Neish y Naumann, 2011).

Es importante remarcar que, en estudios realizados en nuestro laboratorio, la cepa CIDCA133 mostró tener capacidad para inducir la producción de ROS en macrófagos murinos y que tanto la cepa CIDCA 133 como la cepa CIDCA 331 fueron inductores de ROS en las células Caco-2/TC7 (Hugo *et al.*, 2017; Romanin, 2013). Estas evidencias nos llevan a pensar que la señalización por especies reactivas del oxígeno podría ser una vía alternativa a NF- κ B para inducir la expresión de hBD-2 en células Caco-2/TC7.

Al considerar en conjunto los resultados observamos que la interacción de los lactobacilos con las células epiteliales produjo un aumento de la expresión de hBD2 y también modificó la respuesta de estas células frente a estímulos proinflamatorios como la flagelina reafirmando el potencial uso probiótico de las cepas CIDCA133 y CIDCA 331. Si bien los efectos producidos por ambas cepas sobre los enterocitos fueron similares, no podemos descartar que exista una diferencia en contextos más complejos como un sistema *in vivo*, donde la sensibilidad de las cepas a péptidos antimicrobianos podría cobrar mayor relevancia.

En el ambiente intestinal, la presencia de mucus y gradientes de péptidos antimicrobianos (de concentración decreciente hacia el lumen) actuaría como barrera limitando la interacción de las bacterias con las células del epitelio intestinal (Dupont *et al.*, 2015). En este escenario, bacterias de mayor resistencia a los AMPs como la cepa CIDCA 133, podría mantenerse viables e interactuar con los enterocitos; mientras que bacterias más sensibles como la cepa CIDCA 331 serían inactivadas. Esto daría una ventaja a microorganismos como la cepa CIDCA 133 para interactuar con las células del hospedador.

3.5 Bibliografía

- Aldhous, M. C., Noble, C. L., & Satsangi, J. (2009). Dysregulation of human β -defensin-2 protein in inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*, 4(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006285>
- Alves, P., Hugo, A. A., Tymczyszyn, E. E., Ferreira, A. F., Fausto, R., Pérez, P. F., ... Gómez-Zavaglia, A. (2013). Effect of cholesterol-poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) on the properties of stimuli-responsive polymer liposome complexes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 104, 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.016>
- Boniotto, M., Jordan, W. J., Eskdale, J., Tossi, A., Antcheva, N., Crovella, S., ... Gallagher, G. (2006). Human β -defensin 2 induces a vigorous cytokine response in peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1433–1441. Recuperado de <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33645757768&partnerID=40&md5=06185151b7723279162617d978aebd40>
- Chen, J., Zhai, Z., Long, H., Yang, G., Deng, B., & Deng, J. (2020). Inducible expression of defensins and cathelicidins by nutrients and associated regulatory mechanisms. *Peptides*, 123(November 2019), 170177. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170177>
- Chung, W. O., & Dale, B. A. (2008). Differential utilization of nuclear factor- κ B signaling pathways for gingival epithelial cell responses to oral commensal and pathogenic bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(2), 119–126. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00398.x>
- Dupont, A., Heinbockel, L., Brandenburg, K., & Hornef, M. W. (2015). Antimicrobial peptides and the enteric mucus layer act in concert to protect the intestinal mucosa. *Gut Microbes*, 5(6), 761–765. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.972238>
- Froy, O. (2005). Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways. *Cellular Microbiology*, 7(10), 1387–1397. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00590.x>
- Gan, Y., Cui, X., Ma, T., Liu, Y., Li, A., & Huang, M. (2014). Paeoniflorin Upregulates β -Defensin-2 Expression in Human Bronchial Epithelial Cell Through the p38 MAPK, ERK, and NF- κ B Signaling Pathways. *Inflammation*, 37(5), 1468–1475. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9872-7>
- Gloire, G., Legrand-Poels, S., & Piette, J. (2006). NF- κ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochemical Pharmacology*, 72(11), 1493–1505. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.04.011>
- Han, F., Zhang, H., Xia, X., Xiong, H., Song, D., Zong, X., & Wang, Y. (2015). Porcine β -Defensin 2 Attenuates Inflammation and Mucosal Lesions in Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis. *The Journal of Immunology*, 194(4), 1882–1893. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402300>

-
- Hazlett, L., & Wu, M. (2011). Defensins in innate immunity. *Cell and Tissue Research*, 343(1), 175–188. Recuperado de <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79151473786&partnerID=40&md5=9af249145f6740754fb7392c26b98303>
- Houghton, C. A., Fassett, R. G., & Coombes, J. S. (2016). Sulforaphane and Other Nutrigenomic Nrf2 Activators: Can the Clinician's Expectation Be Matched by the Reality? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7857186>
- Hugo, A.A., De Antoni, G. L., & Pérez, P. F. (2010). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (strain CIDCA 133) resists the antimicrobial activity triggered by molecules derived from enterocyte-like Caco-2 cells. *Letters in Applied Microbiology*, 50(4), 335–340. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02796.x>
- Hugo, Ayelén A., Rolny, I. S., Romanin, D., & Pérez, P. F. (2017). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (strain CIDCA 133) stimulates murine macrophages infected with *Citrobacter rodentium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 0. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2219-4>
- Iraporda, C. (2016). Evaluación de la actividad biológica de leches fermentadas artesanales: Función de la fracción no microbiana.
- Jones, R. M., Desai, C., Darby, T. M., Luo, L., Wolfarth, A. A., Scharer, C. D., ... Neish, A. S. (2015). Lactobacilli Modulate Epithelial Cytoprotection through the Nrf2 Pathway. *Cell Reports*, 12(8), 1217–1225. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.042>
- Jones, R. M., Luo, L., Ardita, C. S., Richardson, A. N., Kwon, Y. M., Mercante, J. W., ... Neish, A. S. (2013). Symbiotic lactobacilli stimulate gut epithelial proliferation via Nox-mediated generation of reactive oxygen species. *EMBO Journal*, 32(23), 3017–3028. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.224>
- Kaparakis, M., Turnbull, L., Carneiro, L., Firth, S., Coleman, H. A., Parkington, H. C., ... Ferrero, R. L. (2010). Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 12(3), 372–385. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01404.x>
- Kingeter, L. M., & Lin, X. (2012). C-type lectin receptor-induced NF- κ B activation in innate immune and inflammatory responses. (December 2011), 105–112. <https://doi.org/10.1038/cmi.2011.58>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods*, 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Mastropietro, G., Tiscornia, I., Perelmutter, K., Astrada, S., & Bollati-Fogolín, M. (2015). HT-29 and Caco-2 reporter cell lines for functional studies of nuclear factor kappa B activation. *Mediators of Inflammation*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/860534>

-
- Meade, K. G., & O'Farrelly, C. (2019). B-Defensins: Farming the microbiome for homeostasis and health. *Frontiers in Immunology*, 10(JAN), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03072>
- Neish, A. S., & Naumann, M. (2011). Microbial-induced immunomodulation by targeting the NF- κ B system. *Trends in Microbiology*, 19(12), 596–605. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.08.004>
- Nempont, C., Cayet, D., Rumbo, M., Bompard, C., Villeret, V., & Sirard, J.-C. (2008). Deletion of Flagellin's Hypervariable Region Abrogates Antibody-Mediated Neutralization and Systemic Activation of TLR5-Dependent Immunity. *The Journal of Immunology*, 181(3), 2036–2043. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.2036>
- Romanin, D. E. (2013). Modulación de la respuesta inmune innata epitelial por microorganismos potencialmente probióticos aislados de kéfir (Universidad Nacional de La Plata). <https://doi.org/10.35537/10915/68044>
- Romanin, D., Serradell, M., González Maciel, D., Lausada, N., Garrote, G. L., & Rumbo, M. (2010). Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2–3), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.014>
- Satoh, T., & Akira, S. (2016). Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins. 1–7. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0040-2016.Correspondence>
- Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T. A., Stange, E. F., & Fellermann, K. (2007). Induction of human β -defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infection and Immunity*, 75(5), 2399–2407. <https://doi.org/10.1128/IAI.01563-06>
- Takaesu, G., Surabhi, R. M., Park, K. J., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., & Gaynor, R. B. (2003). TAK1 is critical for I κ B kinase-mediated activation of the NF- κ B pathway. *Journal of Molecular Biology*, 326(1), 105–115. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01404-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01404-3)
- Van Bergenhenegouwen, J., Kraneveld, A. D., Rutten, L., Kettelarij, N., Garssen, J., & Vos, A. P. (2014). Extracellular vesicles modulate host-microbe responses by altering TLR2 activity and phagocytosis. *PLoS ONE*, 9(2), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089121>
- Vora, P., Youdim, A., Thomas, L. S., Fukata, M., Tesfay, S. Y., Lukasek, K., ... Abreu, M. T. (2004). β -Defensin-2 Expression Is Regulated by TLR Signaling in Intestinal Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*, 173(9), 5398–5405. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.9.5398>
- Wang, L., He, Z., Tian, P., & Wang, G. (2019). Lactic Acid Bacteria and Host Immunity. *En Lactic Acid Bacteria*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7832-4_9
- Wollny, T., Piktel, E., Durnaś, B., & Bucki, R. (2018). Regulation of Cationic Antimicrobial Peptides

Expression in the Digestive Tract. *Antimicrobial Peptides in Gastrointestinal Diseases*, 1–20. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814319-3.00001-5>

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

Yin, L., & Chung, W. O. (2011). Epigenetic regulation of human B-defensin 2 and CC chemokine ligand 20 expression in gingival epithelial cells in response to oral bacteria. *Mucosal Immunology*, 4(4), 409–419. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.83>

Yu, L., Wang, L., & Chen, S. (2010). Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(11), 2592–2603. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01127.x>

Zeuthen, L. H., Fink, L. N., & Frøkiær, H. (2008). Toll-like receptor 2 and nucleotide-binding oligomerization domain-2 play divergent roles in the recognition of gut-derived lactobacilli and bifidobacteria in dendritic cells. *Immunology*, 124(4), 489–502. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02800.x>

Capítulo 4:

Interacción de las cepas CIDCA133 y CIDCA 331 con células fagocíticas en un modelo *in vitro*.



4.1 Introducción

Las células fagocíticas cumplen un papel principal en mantener la homeostasis intestinal, desencadenando y regulando la respuesta inmune. En el entorno intestinal, macrófagos y células dendríticas desempeñan funciones diferentes pero a la vez complementarias.

Los macrófagos se ubican en la *lamina propria* del intestino actuando como efectores de la inmunidad innata, ejerciendo un papel central en la respuesta inflamatoria intestinal. Además de desempeñar funciones fagocíticas y de presentación de antígenos, asumen un rol importante tanto en la activación como en la resolución de la respuesta inflamatoria, secretando diferentes citoquinas pro y anti inflamatorias (Chanput et al., 2013; Porcheray et al., 2005). Por su parte, las células dendríticas fagocitan y procesan antígenos actuando principalmente como células presentadoras de antígenos integrando así la inmunidad innata con la inmunidad adaptativa (Cerovic et al., 2014).

Tanto en el entorno intestinal como *in vitro*, los macrófagos se polarizan hacia distintos fenotipos de diferenciación frente a diversos estímulos externos. Los fenotipos pueden ser de tipo proinflamatorio M1 (también llamado tipo I o clásico), hasta macrófagos M2 (también llamados de tipo II o alternativos) que presentan características regulatorias. Los macrófagos M1 pueden inducirse cuando las células son estimuladas por lipopolisacárido (LPS) o interferón γ (IFN- γ). Este fenotipo se asocia a macrófagos con elevada actividad fagocítica y con un perfil de secreción de citoquinas proinflamatorias como IL12, IL1 y TNF- α . Los macrófagos M2, en general de tipo regulatorio, intervienen en la resolución del estado inflamatorio y en la reparación del daño tisular. Estos macrófagos, pueden clasificarse a su vez en: M2a, feno-

tipo que se genera por estimulación por IL-4 e IL-13, M2c, fenotipo regulatorio activado por IL10 y el factor de crecimiento tumoral β 1 (TGF- β 1) y el fenotipo M2b, intermedio entre los anteriores y que puede obtenerse por ejemplo, por estimulación con LPS + IL1- β (Mantovani *et al.*, 2004; Mosser y Edwards, 2009).

La clasificación de los macrófagos en perfiles M1/M2, se utiliza para describir los dos extremos de un espectro de fenotipos que presentan en la realidad diferencias graduales. La diferenciación de los macrófagos ha mostrado tener una gran plasticidad, pudiendo modificarse en el tiempo en respuesta a cambios en el microambiente donde se encuentran. De esta manera, un mismo macrófago con un fenotipo de activación clásica M1 puede cambiar a un perfil regulatorio M2 ayudando en la resolución de un proceso inflamatorio cuando aumentan las señales anti-inflamatorias (Benoit, Desnues y Mege, 2008; Murray, 2017).

La actividad fagocítica tanto de los macrófagos como de las células dendríticas es crucial para disminuir la carga bacteriana en el sitio de infección y para el procesamiento-presentación de antígenos (Lim, Grinstein y Roth, 2017). La fagocitosis como se mencionó en el capítulo 2 es un mecanismo de endocitosis activo propio de las células de la línea mieloide del sistema inmune. La fagocitosis comienza con la unión de los microorganismos o partículas a fagocitar a receptores de membrana de la célula fagocítica. Los microorganismos son reconocidos directamente por los receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs, descritos en el capítulo 3) o de forma indirecta a través de receptores de opsoninas (Mosser y Zhang, 2011).

La unión de los microorganismos a los receptores activa señales intracelulares que producen una restructuración de la actina formando pseudópodos que envuelven e internalizan a los microorganismos constituyendo una vesícula denominada fagosoma temprano. El fagosoma atraviesa por un proceso de maduración uniéndose de manera secuencial a diferentes endosomas: tempranos, tardíos y por último a lisosomas para pasar a formar el fagolisosoma. A lo largo del proceso de maduración se van produciendo cambios en la composición de las proteínas de la membrana del endosoma, como así también cambios en la composición en el interior de endosoma que se va acidificando y se va volviendo más oxidativo y degradativo.

La mayor parte de la actividad destructiva y antimicrobiana se genera dentro del fagolisosoma. En su interior se produce la acidificación del medio, la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y se desarrolla la actividad lítica de proteínas, péptidos antimicrobianos y enzimas como son las defensinas, catelicidinas, lipasas y proteasas (Flannagan, Jaumouillé y Grinstein, 2012).

Reconocer la influencia de las bacterias comensales en la capacidad fagocítica, así como el destino propio de las mismas al ser fagocitadas es esencial para comprender el rol de los probióticos en la respuesta inmune intestinal. En este sentido, se ha demostrado que las bacterias probióticas tienen la capacidad de aumentar la actividad fagocítica en macrófagos (Kaushal y Kansal, 2014). También se ha descrito que pueden inducir su diferenciación o modificar su fenotipo de activación tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (Christoffersen *et al.*, 2014; Jang *et al.*, 2014; Ohue-Kitano *et al.*, 2018; Wang, Liu y Zhao, 2019).

Muchos de los efectos encontrados mostraron ser dependientes de la cepas utilizadas, indicando distintas capacidades para interactuar con las células del hospedador (Christoffersen *et al.*, 2014; Jang *et al.*, 2014; Lebeer, Vanderleyden, & De Keersmaecker, 2008). Por ejemplo, Jang y col (Jang *et al.* 2013) encontraron que la cepa *Lactobacillus brevis* G-101 modificaba la polarización de macrófagos peritoneales de ratón de M1 hacia un perfil M2. También se ha descrito el efecto inverso (desde perfil M2 a M1) debido a la administración de un cóctel probiótico conteniendo *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* DWT1 y *Streptococcus thermophilus* DWT4 (Guha *et al.*, 2019). Incluso se observaron otros cambios en la polarización de macrófagos por acción de los probióticos como de macrófagos M1 o sin inactivar hacia un fenotipo mixto o hacia perfiles M1 (Ji *et al.*, 2013; Isidro, 2014).

Los probióticos modifican la polarización de los macrófagos por intermedio de diferentes vías de señalización intracelular. La polarización hacia perfiles M2 ha sido asociada a la regulación de la activación de la vías de NF- κ B, MAPK, PI3K/Akt y STAT; la polarización hacia perfiles M1 depende de la activación de la vía de NF- κ B y STAT1, pero no se conocen con certeza los mecanismos moleculares que explican las diferencias encontradas entre las diferentes cepas bacterianas (Wang, Liu, y Zhao 2019).

En este capítulo se estudiaron diferentes aspectos de la interacción de las cepas de lactobacilos CIDCA 133 y CIDCA 331 con macrófagos derivados de la línea celular monocítica THP-1. En primer lugar, se estudiaron la asociación y fagocitosis de los lactobacilos utilizando células THP-1 diferenciadas. Por otro lado, se evaluó la influencia de las bacterias en la diferenciación de los de los monocitos.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Para los ensayos se utilizaron las cepas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 331 y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133. Las cepas fueron reactivadas dos veces en caldo MRS e incubadas a 37 °C en aerobiosis por 16 h antes de los experimentos. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 10000 g por 5 min y a continuación se lavaron dos veces con PBS. Los pellets obtenidos fueron luego suspendidos en diferentes medios y llevados a la concentración adecuada para los diferentes ensayos, a través de la medición de su densidad óptica.

4.2.2 Marcación de bacterias con isotiocianato de fluoresceína (FITC)

Suspensiones de lactobacilos en PBS de concentración 1×10^8 UFC/ml se centrifugaron y se marcaron con una solución de FITC 0,3 mg/ml en buffer pH=7 (50 mM de NaHCO_3 y 100 mM de NaCl) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de la incubación, las bacterias se lavaron dos veces con PBS para eliminar el exceso de colorante y mantuvieron en la oscuridad hasta su uso.

4.2.3 Mantenimiento de la línea THP-1

Se utilizó la línea THP-1 humanas como modelo de monocitos-macrófagos. Las células THP-1 son células leucémicas no adherentes que presentan características similares a los monocitos primarios. Esta línea fue mantenida en medio DMEM con

agregado de 2 gr/l NaHCO₃, 10 % v/v SFB (Gibco) inactivado por calor y 4 mM GlutaMAX. Cada 2 o 3 días se evaluó la concentración de células y se agregó medio fresco ajustando la concentración a $5,5 \times 10^5$ células /ml. Los cultivos se mantuvieron en estufa gaseada con atmósfera humidificada con 5% v/v CO₂ -95% aire.

Los monocitos de la línea THP-1 pueden diferenciarse a macrófagos con el uso de distintos estímulos como son la vitamina D o los ésteres de forbol (Auwerx, 1991) Durante los ensayos se utilizó el acetato de forbol miristato (PMA) como agente de diferenciación. El PMA es un análogo del diacil glicerol, que puede activar la proteína-quinasa C (PKC) promoviendo así la diferenciación de los monocitos hacia macrófagos (Liu y Heckman, 1998).

La diferenciación de los monocitos THP-1 se realizó de dos formas distintas. Para realizar los ensayos de fagocitosis se utilizó una alta concentración de PMA (200 ng/ml durante 48 h) induciendo un perfil de activación M1 (Daigneault *et al.*, 2010). Por otro lado, en los ensayos de polarización de macrófagos, se utilizó una concentración de PMA 40 veces menor (5 ng/ml), a fin de evitar una marcada polarización hacia un perfil M1 (Park *et al.*, 2007). Los macrófagos diferenciados con baja concentración de PMA se encuentran en un estado no activado (M0) que permite estudiar el efecto de estímulos débiles sobre su activación, siendo posibles de diferenciación tanto hacia un perfil M1 como a M2.

4.2.4 Evaluación de la fagocitosis por citometría de flujo

Para los ensayos de fagocitosis se utilizaron células THP1 diferenciadas a macrófagos con PMA en alta concentración (200 ng/ml x 48 h) y suspensiones de bacterias marcadas con FITC como se describió anteriormente. Las células se lavaron dos veces con PBS para retirar el medio DMEM con suero que se reemplazó luego por medio DMEM base. Las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C con las bacterias en diferentes multiplicidades de infección (100:1, 50:1 y 25:1 bacterias por célula). Pasado el tiempo de incubación se retiró el medio de cultivo de la placa y se lavó dos veces con buffer PBS helado para detener la fagocitosis y retirar las bacterias que

no estuvieran adheridas. Luego de los lavados se desprendieron las células de la placa mecánicamente con *scraper* colocándolas en tubos de citometría.

Cada muestra fue analizada en el citómetro dos veces. La primera adquisición cuantificó la fluorescencia total de los eventos dada por las bacterias asociadas a las células (bacterias adheridas + bacterias internalizadas). En la segunda adquisición, se añadió a los tubos una solución de azul tripán 0,4 % v/v pH=4 (concentración final 0,2% p/v) permitiendo la cuantificación de la fluorescencia sólo de las bacterias internalizadas. El azul tripán es un colorante que no penetra en las células vivas y apantalla la fluorescencia de las bacterias marcadas adheridas por fuera de éstas. El pH bajo también contribuye a disminuir la fluorescencia del FITC (Voyich y DeLeo, 2002). Los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas en el canal de fluorescencia verde (FL1).

4.2.5 Determinación del destino intracelular por microscopía confocal.

Se diferenciaron células THP-1 sobre vidrios siguiendo el protocolo descrito para fagocitosis en placas de cultivo de 24 fosas. El ensayo de fagocitosis se realizó utilizando los lactobacilos marcados con FITC en una multiplicidad de infección 100:1. Bacterias y células se incubaron durante 45 min en medio DMEM base y luego se lavaron las fosas con PBS para desprender las bacterias no adheridas. Con el fin de evidenciar los compartimentos intracelulares ácidos se añadió sobre las células THP-1 la sonda fluorescente LysoTracker® Red DND-99 (200 nM) durante 5 min a 37 °C (Molecular Probes, Oregon, EEUU). La sonda atraviesa las membranas de células vivas a pH neutro y queda retenida en su forma ácida en organelas con pH bajo. Luego de la incubación las células se lavaron dos veces con PBS para retirar el exceso de colorante. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 3 % (p/v) en PBS durante 1 h a 4°C. Una vez fijadas las células se colocaron los vidrios sobre un portaobjetos con medio de montaje para muestras fluorescentes (SlowFade Gold Antifade Mountant Thermofisher, EEUU). Las observaciones microscópicas se realizaron en un microscopio confocal (Leica TCS SP5 Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y

para el procesamiento de imágenes se utilizó el programa Leica LAS AF Lite software (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

4.2.6 Ensayo de supervivencia intracelular

La capacidad de asociación e internalización de los lactobacilos por parte de los macrófagos en cultivo, se determinó también mediante recuento de bacterias viables en placa. Para ello las células THP-1 se diferenciaron con PMA siguiendo el protocolo descrito para fagocitosis. Se infectaron las células con suspensiones de lactobacilos con una multiplicidad de infección de 100:1 (bacterias por célula) y se incubaron durante 45 min a 37 °C en estufa con atmósfera de CO₂. Luego de la incubación se lavaron las células 3 veces con PBS helado, y se dividieron las fosas en dos grupos para determinar por un lado bacterias a asociadas (bacterias adheridas a la superficie más bacterias internalizadas) y por el otro lado las bacterias internalizadas.

Al primer grupo (bacterias asociadas) se le agregó una solución 0,1% de Tritón X100 en agua destilada y se lo incubó por 30 min a 37 °C a fin de lisar las células. Para asegurar la ruptura celular el contenido de cada fosa se disgregó mecánicamente pasándolo 6 veces por una jeringa con aguja 22G. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de cada muestra en solución fisiológica que se sembraron en placas con agar MRS. Las placas se incubaron 48 h a 37°C en aerobiosis. Al segundo grupo se lo incubó durante 60 min con nisina y neomicina 100 µg/ml con el fin de matar las bacterias adheridas por fuera de las células conservando las bacterias vivas intracelulares. Luego de incubar con el antibiótico las células fueron lavadas dos veces con PBS. A continuación, se lisaron las células y se continuó el protocolo de la misma manera que con el primer grupo.

4.2.7 Ensayo de polarización de células THP-1

El estudio de la polarización de los macrófagos se realizó por qRT-PCR midiendo la expresión de marcadores característicos M1 y M2 en las células THP-1.

Tal como se indicó anteriormente, a fin de obtener macrófagos M0 a partir de células monocíticas, se incubaron células THP-1, con una baja concentración de PMA (5 ng/ml) durante 48 h. Con el objetivo de estudiar la influencia de los lactobacilos en la polarización de macrófagos estos macrófagos M0 se incubaron durante 1 h con una suspensión de bacterias a una multiplicidad de infección de 100:1. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y se incubaron durante 6 horas con medio fresco. Finalizado el tiempo de incubación se extrajo el RNA de los macrófagos para su posterior análisis por qRT-PCR.

4.2.7.1 Extracción y purificación de RNA con Trizol®

El Trizol (Invitrogen, Eugene OR, EEUU) es una solución monofásica compuesta principalmente por fenol e isotiocianato de guanidina que permite la precipitación secuencial del RNA, DNA y proteínas de una muestra. Se utilizó según las indicaciones del fabricante. Brevemente, se lisaron las células agregando 1 ml de Trizol por fosa y se transfirió el contenido a tubos tipo Eppendorf incubándolos 5 min a temperatura ambiente. Luego se añadió cloroformo (0,2 ml de cloroformo frío por cada mililitro de Trizol) a fin de obtener 2 fases: una fase inferior orgánica, conteniendo el fenol y el cloroformo, y una fase acuosa superior que contiene el RNA. La fase acuosa se transfirió a tubos nuevos y se le agregó isopropanol frío a fin de precipitar el RNA (0,5 ml por cada ml de Trizol utilizado). Luego de incubar 10 min a temperatura ambiente se centrifugó a 11.000 g durante 10 min a 4 °C. Se conservó el pellet formado que fue luego lavado con etanol 75 %. Para eliminar el etanol se centrifugó a 7.500 g a 4 °C durante 5 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 25 µl de agua bi-distilada y se separó en dos tubos que fueron conservados a -80 °C hasta su análisis.

4.2.7.2 Retrotranscripción y qRT-PCR

La retrotranscripción y la qRT-PCR se realizaron de la forma descrita en el capítulo 3, los *primers* utilizados de detallan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Secuencia de los *primers* utilizados para qRT-PCR

	Marcador	Secuencia 5'-3' (fwrđ – rev) *
Marcadores M1	CCR7 (receptor de quimoquina C-C tipo 7)	CAG CCT TCC TGT GTG GTT TT AAA TGA CAA GGA GAG CCA CC
	CXCL10 (quimoquina CXCL10)	GCT GAT ATG GGG ATA TAG GTT C GCA GGT ACA GCG TAC AGT TC
Marcadores M2	MRC1 (receptor de manosa)	TAC CCC TGC TCC TGG TTT TT CAG CGC TTG TGA TCT TCA TT
	CCL18 (quimoquina CCL18)	TCC TTG TCC TCG TCT GCA C GTG GAA TCT GCC AGG AGG TA
	IL10 (interleuquina 10)	GTG ATG CCC CAA GCT GAG A CAC GGC CTT GCT CTT GTT TT
Gen de referencia	B2M (microglobulina β 2)	TCT CTG CTG GAT GAC GTG AG TAG CTG TGC TCG CGC TAC T

* las secuencias fueron tomadas de qPrimerDepot database (Cui, Taub y Gardner, 2007).

4.2.8 Análisis estadístico

Los análisis de la varianza (ANOVA) y de regresión lineal se realizaron usando el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, EEUU). La comparación de las medias se realizó por el método t de Student, considerando como estadísticamente significativa la diferencia cuando $p < 0,05$.

4.3 Resultados

4.3.1 Ensayos de fagocitosis por citometría de flujo

En la Figura 4.1 se muestran los resultados de los ensayos de asociación y fagocitosis de lactobacilos realizados con células THP-1 diferenciadas a macrófagos. Las células se incubaron con los lactobacilos marcados con FITC y los resultados se cuantificaron por citometría de flujo. Se observó un efecto dosis-respuesta en ambas cepas con respecto a la multiplicidad de infección, aumentando la cantidad de células positivas cuando aumentaba la multiplicidad de infección lo que indica un incremento de la fagocitosis a medida que se incrementa el número de bacterias. Los

porcentajes de bacterias asociadas fueron 3 veces mayores para la cepa CIDCA 133 con respecto a la cepa CIDCA 331 para todas las MOI estudiadas. Al considerar los porcentajes de bacterias internalizadas (luego del apantallamiento con azul tripán), éstos fueron 10 veces más altos para la cepa CIDCA 133 respecto a la cepa CIDCA 331. Los resultados sugieren una mayor capacidad de asociación a los macrófagos de la cepa CIDCA 133 que en parte explica una mayor internalización de la bacteria respecto a la cepa CIDCA 331.

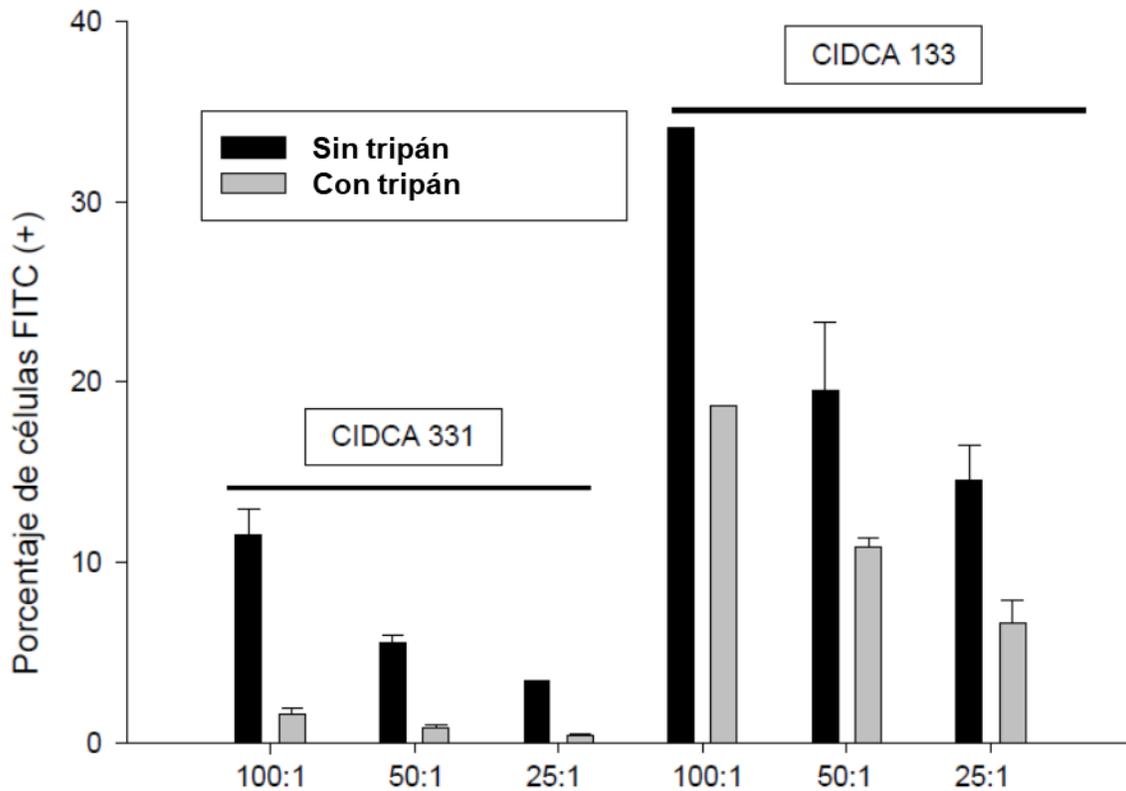


Figura 4.1. Porcentaje de células THP-1 FITC positivas luego de la incubación con lactobacilos marcados. Las células se incubaron con suspensiones de bacterias a diferentes multiplicidades de infección (bacterias:células). Las barras negras representan células fluorescentes sin azul tripán la fluorescencia corresponde a las bacterias asociadas, las barras grises representan células fluorescentes con luego del agregados de azul tripán la fluorescencia corresponde a las bacterias internalizadas. Cada resultado representa la media \pm la desviación estándar de un experimento representativo (n=2)

4.3.2 Determinación del destino intracelular por microscopía confocal

Con el fin de determinar el destino intracelular de los lactobacilos fagocitados, se realizaron estudios de microscopía confocal con las bacterias marcadas con FITC junto con la sonda LysoTracker para identificar los compartimentos ácidos intracelulares. En la Figura 4.2 se pueden observar micrografías que muestran imágenes compuestas de los canales verde (bacterias marcadas con FITC) y rojo (LysoTracker). Las regiones en amarillo representan la colocalización de las marcas verde y roja.

Luego del análisis de las micrografías se observó en varios casos la colocalización de los lactobacilos con LysoTracker, lo que indicaría la presencia de las bacterias en compartimentos ácidos, implicando un tráfico hacia compartimentos degradativos. Se pudo observar también que la cepa CIDCA 133 (Figura 4.2, A) se adhirió e internalizó en mayor cantidad que la cepa CIDCA 331 (Figura 4.2 B). Estos resultados se corresponden con los observados en los ensayos de citometría (Figura 4.1). La Figura 4.3 muestra en mayor detalle la colocalización de los lactobacilos de la cepa CIDCA 331 con la sonda LysoTracker.

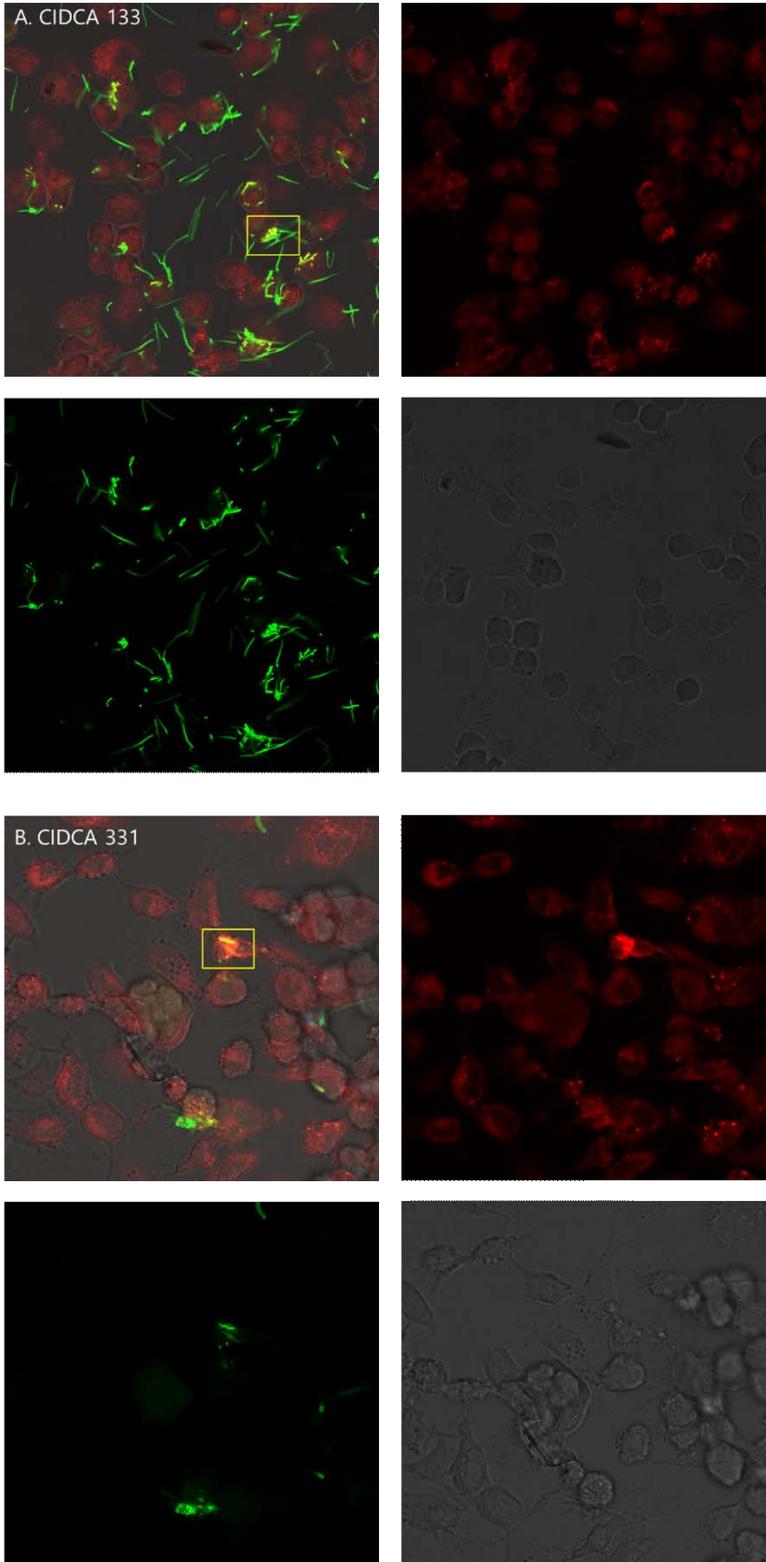


Figura 4.2. Micrografías confocales de células THP1. Las células THP1 fueron incubadas con lactobacilos marcados con FITC durante 45 min y luego marcadas con LysoTracker. El panel A corresponde a células incubadas con la cepa CIDCA 133 y el B a células incubadas con la cepa CIDCA 331. Arriba izq. proyección canales rojo y verde; Arriba derecha canal rojo corresponde al LysoTracker; Abajo izq. canal verde corresponde a las bacterias marcadas con FITC, Abajo derecha canal visible. Las regiones encuadradas en amarillo contienen bacterias colocalizando con compartimentos ácidos. Se muestra la proyección en z (0,3 μm de plano confocal). Pinhole 1 A.U.

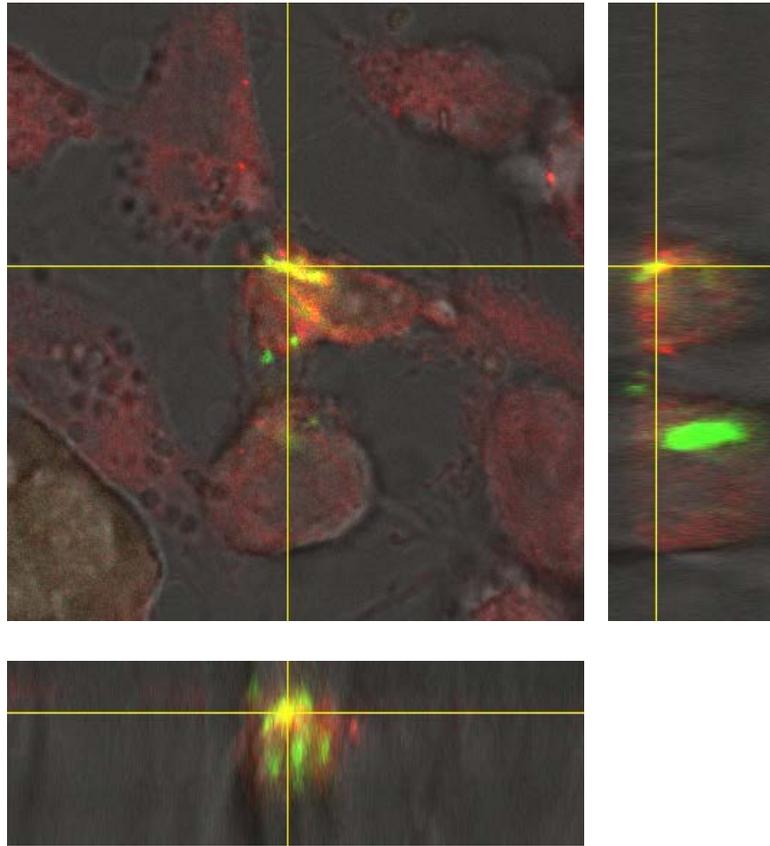


Figura 4.3. Colocalización de lactobacilos CIDCA 331 marcados con FITC con la sonda LysoTracker en células THP1. Las células THP1 fueron incubadas con lactobacilos marcados con FITC durante 45 min y luego marcadas con LysoTracker. El canal verde corresponde a las bacterias marcadas con FITC y el canal rojo corresponde al LysoTracker. La cruz amarilla marca la localización. Se muestra la proyección en z ($0,3 \mu\text{m}$ de plano confocal). Pinhole 1 A.U.

4.3.3 Ensayo de supervivencia intracelular

Con el objetivo de indagar sobre la supervivencia de las bacterias dentro de los macrófagos derivados de las células THP-1, se realizaron recuentos de lactobacilos viables asociados e internalizados (Tabla 4.2). Los resultados obtenidos se condijeron con los obtenidos por citometría y microscopía mostrando una mayor asociación para cepa CIDCA 133 que para la cepa CIDCA 331. La supervivencia intracelular de las bacterias fue muy baja para ambas cepas. Sin embargo, se encontró que la supervivencia de la cepa CIDCA 133 en proporción a las bacterias asociadas, fue el doble que la de la cepa CIDCA 331 a los tiempos estudiados.

Tabla 4.2. Supervivencia intracelular de lactobacilos en células THP-1

	CIDCA 133 (UFC/ml)	CIDCA 331 (UFC/ml)
Bacterias asociadas	$2,27 \pm 0,75 (\times 10^5)$	$2,85 \pm 0,78 (\times 10^4)$
Bacterias internalizadas viables	690 ± 296	40 ± 16
Bacterias internalizadas viables por cada 10^5 bacterias asociadas	304	142

Las células THP-1 se incubaron durante 40 min con una suspensión de bacterias conteniendo 1×10^8 UFC/ml, la determinación de bacterias asociadas (adheridas + internalizadas) e internalizadas se realizó por recuento de bacterias viables. En caso de las bacterias internalizadas, las células se incubaron previamente con antibiótico para inactivar las bacterias asociadas.

4.3.4 Polarización de macrófagos

A fin de estudiar la influencia de los lactobacilos en la polarización de los macrófagos se incubaron células THP-1 en estado M0 con suspensiones de la cepa CIDCA 133 y CIDCA 331. La polarización de los macrófagos se evaluó midiendo la expresión de marcadores característicos de los fenotipos M1 y M2 por qRT-PCR.

En la Figura 4.4 se resumen los resultados obtenidos. Al estimular las células con las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 se observó el aumento de la expresión de los marcadores M1: CCR7 (receptor de quimoquinas C-C tipo 7) y la quimoquina CXCL10. En cuanto a los marcadores M2 se observó una disminución en la expresión del receptor de manosa y no se observó cambio en la expresión de la quimoquina CCL18 y de la interleuquina 10 con respecto a las células sin estimular. Estos resultados indicarían que las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 llevan a los macrófagos a un perfil de activación con un mayor componente M1.

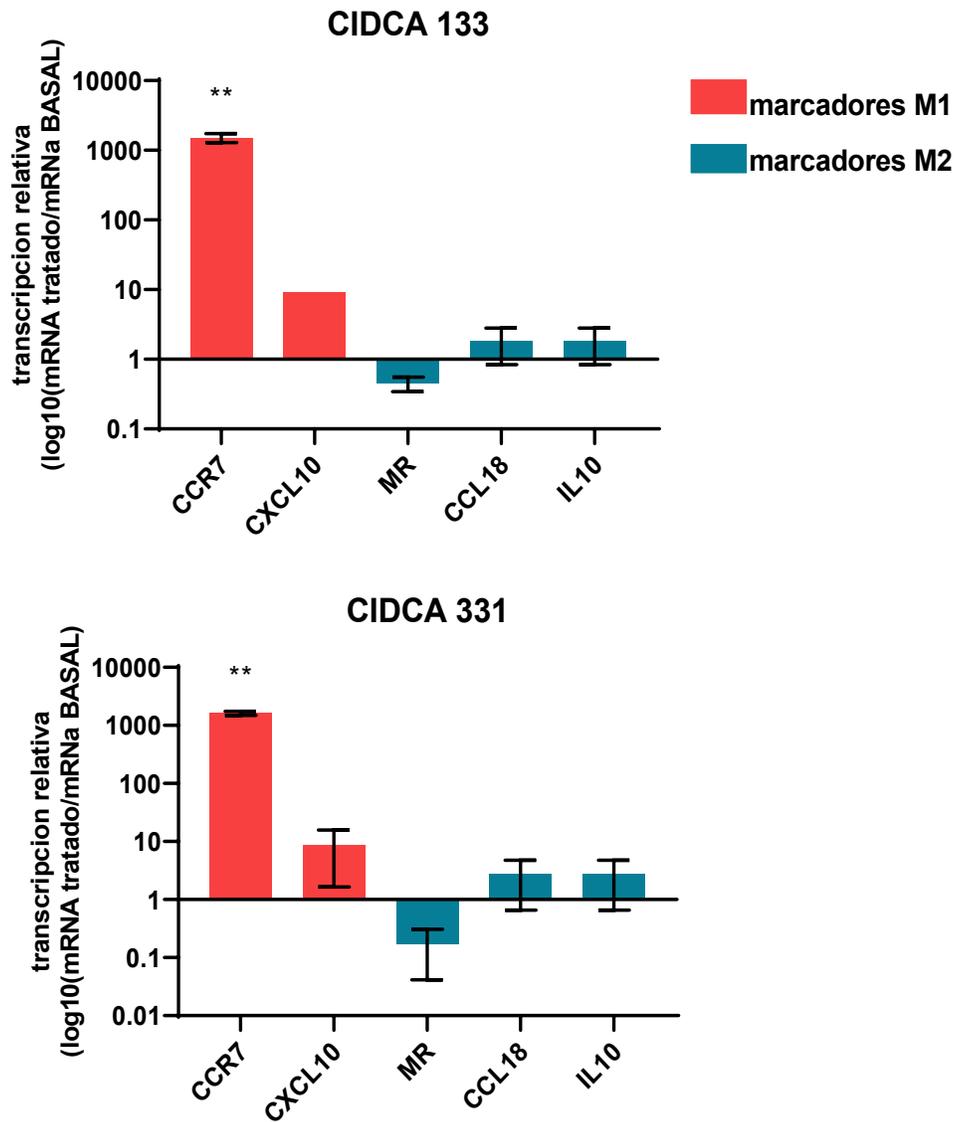


Figura 4.4. Expresión de genes representativos de polarización de macrófagos. En rojo se muestran genes asociados a un fenotipo proinflamatorio M1: CCR7 Y CXCL10; en azul se muestran genes asociados a un fenotipo regulatorio o antiinflamatorio M2: MR (receptor de manosa), CCL18 e IL10. Células THP-1 diferenciadas a M0, fueron incubadas con una suspensión de bacterias conteniendo 1×10^8 UFC/ml durante 1h, luego de la preincubación se lavaron las células con PBS y se las incubó por otras 6 h en medio fresco. Cada resultado representa la media \pm la desviación estándar de un experimento representativo (n=2). Los asteriscos (**) representan una diferencia significativa $P < 0.01$ con respecto a la expresión basal (test t).

4.4 Discusión

En este capítulo se estudió la interacción de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 con macrófagos dado que son actores claves en la mucosa intestinal para la regulación de la respuesta inmune.

Los ensayos de fagocitosis mostraron una mayor capacidad de la cepa CIDCA 133 para interactuar con los macrófagos, observándose una mayor adhesión e internalización respecto a la cepa CIDCA 331. Esta diferencia se pudo registrar tanto en los ensayos realizados por citometría de flujo, en los de microscopia confocal y también en el recuento de bacterias viables. La mayor capacidad de adhesión de la cepa CIDCA 133 podría explicarse en base las diferencias en la composición de las envolturas celulares de las cepas tal como se discutió en el capítulo 1.

La adhesión de la bacterias a las células se produce en primer lugar por interacciones físicas inespecíficas (hidrofobicidad, densidad de carga) y luego a distancias cercanas entran en juego uniones específicas entre diferentes moléculas de la pared celular (proteínas de superficie, peptidoglicano, ácidos teicoicos y lipoteicoicos, polisacáridos) y receptores o moléculas de la superficie de la célula eucariota (TLRs, CLR, mucus) (Pérez *et al.*, 1998; Kos *et al.*, 2003; Deepika y Charalampopoulos, 2010; Alp y Kuleaşan, 2019). Como se mencionó, la cepa CIDCA 133 tiene una menor densidad de carga superficial negativa que la cepa CIDCA 331 (Hugo 2007; Tymczynyn *et al.* 2007b). Esta menor carga negativa disminuiría la repulsión entre la superficie de la bacteria y las membranas eucariotas favoreciendo su interacción. La menor carga superficial negativa de la cepa CIDCA 133 podría explicarse por diferencias a nivel de la composición de la pared celular como pueden ser diferentes grados de D-alanilación de los ácidos teicoicos de las distintas (Koprivnjak y Peschel, 2011) Dada la diferente relación de glicolípidos /fosfolípidos en la composición lipídica de la membrana celular de las cepas, podría pensarse que esta podría también, de forma indirecta, influir en la carga superficial de las bacterias, explicando en parte las diferencias encontradas en los potenciales zeta.

En las dos cepas estudiadas la sobrevivencia de las bacterias dentro de los macrófagos fue muy baja, siendo menor al 1% de las bacterias adheridas a las células. Estos resultados son esperables para microorganismos comensales que no cuentan con

mecanismos de persistencia intracelular como pueden ser la inhibición de la acidificación de las vesículas, el bloqueo de los mecanismos de tráfico intracelular o resistencia a algunos de los efectores microbicidas del fagolisosoma (Uribe-Quero y Rosales, 2017). Cabe destacar que, aun así, se observó una diferencia entre las cepas, siendo la cepa CIDCA 133 más resistente que la cepa CIDCA 331. La mayor supervivencia intracelular de la cepa CIDCA 133 se corresponde con lo observado en el capítulo 1, donde la cepa presenta una gran resistencia a la acción microbicida tanto de los péptidos de anfibios como de la beta defensina 2 humana. Los resultados obtenidos en los ensayos con células fagocíticas podrían indicar una variación entre las cepas en cuanto a la cinética de muerte intracelular. Esto podría, en parte, estar relacionado con las diferencias de susceptibilidad a péptidos antimicrobianos entre los microorganismos.

En los ensayos de polarización de macrófagos se observó que tanto la cepa CIDCA 133 como CIDCA 331 activaron los macrófagos M0 hacia un perfil de marcadores de carácter M1. El mecanismo por el cual las cepas de lactobacilos ejercerían este efecto podría ser la activación de la vía de NF- κ B por interacción con receptores TLR2 o NOD2. Se sabe que, los macrófagos activados hacia perfil M1 muestran una gran capacidad fagocítica y de presentación de antígenos; a su vez producen citoquinas proinflamatorias como IL12, IL6, IL23 y TNF- α , y muestran un incremento en la producción de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y oxígeno (ROS) (Mantovani *et al.*, 2004; Benoit, Desnues y Mege, 2008). Este tipo de respuesta de los macrófagos por interacción con microorganismos potencialmente probióticos ha sido correlacionado en diferentes estudios con una mayor resistencia a infecciones por microorganismos, como por ejemplo *Candida albicans* o *Salmonella typhimurium* (Salva, Villena y Alvarez, 2010; Marranzino *et al.*, 2012). Estudios anteriores en nuestro laboratorio también demostraron que la cepa CIDCA133 posee la capacidad de aumentar la respuesta de macrófagos murinos frente a infecciones con *Citrobacter rodentium*, polarizándolos hacia un perfil del tipo M1, aumentando tanto la capacidad fagocítica de los macrófagos como su actividad microbicida por aumento de la producción de ROS (Hugo *et al.* 2017).

Cabe mencionar que el perfil de activación de los macrófagos obtenido por interacción con los lactobacilos podría ser diferente si se utilizan macrófagos con distinto estado de activación inicial, sea M1 o M2. De hecho, se sabe que macrófagos con distinto perfil de diferenciación presentan una diferente ubicación y niveles de expresión de los receptores celulares, principalmente TLR2 y NOD2, que determinarían en parte el efecto ejercido por los lactobacilos. Al respecto, Habil y col encontraron que una misma cepa probiótica podía tener tanto un efecto inmunoestimulador como inmunomodulador sobre macrófagos M1 y M2 debido a que presentaban diferente expresión del correceptor CD14 (Habil *et al.*, 2011). Es posible también que el perfil de activación de los macrófagos por la interacción con los lactobacilos varíe si se le suma otro estímulo proinflamatorio más fuerte como la presencia de un patógeno. Este efecto fue observado en el capítulo anterior donde la respuesta de los enterocitos fue distinta si se incubaban sólo con los lactobacilos o se añadía la flagelina.

Considerando en conjunto los resultados obtenidos en este capítulo, las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 mostraron diferencias al momento de interactuar con macrófagos en lo que respecta a la adhesión de las bacterias y su fagocitosis. Sin embargo, esto no influyó en la respuesta de los macrófagos que mostraron una polarización hacia un perfil de activación M1 al ser incubadas con ambas cepas. Al igual que con los ensayos realizados con células epiteliales en el capítulo 3, no podemos descartar un efecto distinto entre las cepas sobre la polarización de los macrófagos en un contexto más complejo como es la mucosa intestinal, ya que la respuesta de otros tipos celulares (enterocitos, células dendríticas, células T) podrían afectar de forma directa o indirecta la polarización de los macrófagos intestinales.

La presencia de macrófagos M1 a nivel intestinal por efecto de la interacción del hospedador con las cepas CIDCA133 y CIDCA 331 podría tener un efecto beneficioso aumentando la resistencia frente a infecciones con microorganismos patógenos, acelerando los mecanismos de destrucción y desencadenando una respuesta proinflamatoria moderada transitoria.

4.5 Bibliografía

- Alp, D., & Kuleaşan, H. (2019). Adhesion mechanisms of lactic acid bacteria: conventional and novel approaches for testing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2730-x>
- Auwerx, J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, 47(1), 22–31. <https://doi.org/10.1007/BF02041244>
- Benoit, M., Desnues, B., & Mege, J.-L. (2008). Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *The Journal of Immunology*, 181(6), 3733–3739. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.3733>
- Cerovic, V., Bain, C. C., Mowat, A. M., & Milling, S. W. F. (2014). Intestinal macrophages and dendritic cells: What's the difference? *Trends in Immunology*, 35(6), 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.04.003>
- Chanput, W., Mes, J. J., Savelkoul, H. F. J., & Wichers, H. J. (2013). Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food Funct.*, 4(2), 266–276. <https://doi.org/10.1039/C2FO30156C>
- Christoffersen, T. E., Hult, L. T. O., Kuczkowska, K., Moe, K. M., Skeie, S., Lea, T., & Kleiveland, C. R. (2014). In Vitro Comparison of the Effects of Probiotic, Commensal and Pathogenic Strains on Macrophage Polarization. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12602-013-9152-0>
- Cui, W., Taub, D. D., & Gardner, K. (2007). qPrimerDepot: A primer database for quantitative real time PCR. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL. 1), 805–809. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl767>
- Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B., & Dockrell, D. H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE*, 5(1). Recuperado de <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77649267205&partnerID=40&md5=a6de306e600b865950f2e8b094fb6a7c>
- Deepika, G., & Charalampopoulos, D. (2010). Surface and adhesion properties of lactobacilli. En *Advances in applied microbiology* (1a ed., Vol. 70). [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70004-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70004-6)
- Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., & Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annual review of pathology*, 7, 61–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132445>
- Guha, D., Banerjee, A., Mukherjee, R., Pradhan, B., Peneva, M., Aleksandrov, G., ... Aich, P. (2019). A probiotic formulation containing *Lactobacillus bulgaricus* DWT1 inhibits tumor growth by activating pro-inflammatory responses in macrophages. *Journal of Functional Foods*, 56(March),

- Habil, N., Al-Murrani, W., Beal, J., & Foey, A. D. (2011). Probiotic bacterial strains differentially modulate macrophage cytokine production in a strain-dependent and cell subset-specific manner. *Beneficial Microbes*, 2(4), 283–293. <https://doi.org/10.3920/BM2011.0027>
- Hugo, A. A. (2007). Capacidad probiótica de la cepa CIDCA 133 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis*): un recorrido desde modelos in vitro a in vivo (Universidad Nacional de La Plata). <https://doi.org/10.35537/10915/2360>
- Hugo, A. A., Rolny, I. S., Romanin, D., & Pérez, P. F. (2017). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (strain CIDCA 133) stimulates murine macrophages infected with *Citrobacter rodentium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 0. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2219-4>
- Isidro, R. A. (2014). The Probiotic Mixture VSL#3 Alters the Morphology and Secretion Profile of Both Polarized and Unpolarized Human Macrophages in a Polarization-Dependent Manner. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 05(03). <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000227>
- Jang, S. E., Hyam, S. R., Han, M. J., Kim, S. Y., Lee, B. G., & Kim, D. H. (2013). *Lactobacillus brevis* G-101 ameliorates colitis in mice by inhibiting NF- κ B, MAPK and AKT pathways and by polarizing M1 macrophages to M2-like macrophages. *Journal of Applied Microbiology*, 115(3), 888–896. <https://doi.org/10.1111/jam.12273>
- Jang, Se Eun, Han, M. J., Kim, S. Y., & Kim, D. H. (2014). *Lactobacillus plantarum* CLP-0611 ameliorates colitis in mice by polarizing M1 to M2-like macrophages. *International Immunopharmacology*, 21(1), 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.04.021>
- Ji, J., Hu, S. L., Cui, Z. W., & Li, W. F. (2013). Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* mediate M1 macrophage polarization in mouse bone marrow-derived macrophages. *Archives of microbiology*, 195(5), 349–356. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0877-7>
- Kaushal, D., & Kansal, V. K. (2014). Dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* improves phagocytic potential of macrophages in aged mice. *Journal of Food Science and Technology*, 51(6), 1147–1153. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0637-8>
- Koprivnjak, T., & Peschel, A. (2011). Bacterial resistance mechanisms against host defense peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(13), 2243–2254. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0716-4>
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., & Matošić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94(6), 981–987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2008). Genes and Molecules of *Lactobacilli*

Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 728–764.
<https://doi.org/10.1128/membr.00017-08>

- Lim, J. J., Grinstein, S., & Roth, Z. (2017). Diversity and versatility of phagocytosis: Roles in innate immunity, tissue remodeling, and homeostasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00191>
- Liu, W. S., & Heckman, C. A. (1998). The sevenfold way of PKC regulation. *Cellular Signalling*, 10(8), 529–542. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(98\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(98)00012-6)
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- Marranzino, G., Villena, J., Salva, S., & Alvarez, S. (2012). Stimulation of macrophages by immunobiotic *Lactobacillus* strains: Influence beyond the intestinal tract. *Microbiology and Immunology*, 56(11), 771–781. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2012.00495.x>
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2009). The Full Specter Of Macrophage Activation. 8(12), 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448.Exploring>
- Mosser, D. M., & Zhang, X. (2011). Measuring opsonic phagocytosis via Fc γ receptors and complement receptors on macrophages. *Current Protocols in Immunology*, (SUPPL. 95), 1–12. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1427s95>
- Murray, P. J. (2017). Macrophage Polarization. *Annual Review of Physiology*, 79(1), 541–566. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034339>
- Ohue-Kitano, R., Yasuoka, Y., Goto, T., Kitamura, N., Park, S. B., Kishino, S., ... Kawada, T. (2018). A-Linolenic acid-derived metabolites from gut lactic acid bacteria induce differentiation of anti-inflammatory M2 macrophages through G protein-coupled receptor 40. *FASEB Journal*, 32(1), 304–318. <https://doi.org/10.1096/fj.201700273R>
- Park, E. K., Jung, H. S., Yang, H. I., Yoo, M. C., Kim, C., & Kim, K. S. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation Research*, 56(1), 45–50. <https://doi.org/10.1007/s00011-007-6115-5>
- Pérez, P. F., Minnaard, Y., Disalvo, E. A., & De Antoni, G. L. (1998). Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Applied and environmental microbiology*, 64(1), 21–26.
- Porcheray, F., Viaud, S., Rimaniol, A. C., Léone, C., Samah, B., Dereuddre-Bosquet, N., ... Gras, G. (2005). Macrophage activation switching: An asset for the resolution of inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*, 142(3), 481–489. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x>

-
- Salva, S., Villena, J., & Alvarez, S. (2010). Immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from goat milk: Impact on intestinal and respiratory infections. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1–2), 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.013>
- Tymczyszyn, E. E., Del Rosario Díaz, M., Gómez-Zavaglia, A., & Disalvo, E. A. (2007). Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2410–2419. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03482.x>
- Uribe-Quero, E., & Rosales, C. (2017). Control of phagocytosis by microbial pathogens. *Frontiers in Immunology*, 8(OCT), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01368>
- Voyich, J. M., & DeLeo, F. R. (2002). Host-pathogen interactions: Leukocyte phagocytosis and associated sequelae. *Methods in Cell Science*, 24(1–3), 79–90. <https://doi.org/10.1023/A:1024154200702>
- Wang, Y., Liu, H., & Zhao, J. (2019). Macrophage Polarization Induced by Probiotic Bacteria: a Concise Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09612-y>

Capítulo 5:

Efecto de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 en un modelo murino.



5.1 Introducción

En los capítulos anteriores se estudió, mediante distintos ensayos *in vitro*, la interacción de las cepas de lactobacilos CIDCA 133 y CIDCA 331 con diferentes componentes presentes a nivel intestinal: péptidos antimicrobianos (AMPs), células epiteliales intestinales y células fagocíticas. Estas aproximaciones arrojaron resultados que permitieron explicar algunos mecanismos de interacción entre los distintos actores de la relación bacteria-célula epitelial o fagocítica y AMPs. Sin embargo, una visión completa de las interacciones sólo puede obtenerse desde los estudios *in vivo*.

Los animales de experimentación constituyen un sistema biológico complejo que permite evaluar todas las interacciones de los sistemas biológicos y sus respuestas. En especial para los modelos a nivel gastrointestinal, los estudios *in vivo* permiten determinar la presencia de signos clínicos de desorden intestinal, cambios a nivel histológico de orden inflamatorio, modificaciones en la microbiota y fundamentalmente la respuesta inmune del hospedador tanto adaptativa como innata de manera integral. Los modelos murinos han sido ampliamente utilizados para estudiar los efectos de los microorganismos probióticos. Estos ensayos han demostrado que la ingesta de probióticos puede proteger al hospedador frente a enteropatógenos (Claes *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2017), Además son capaces de modificar la microbiota intestinal y producir un efecto sobre el tejido adiposo en ratones obesos (Alard *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2017); mejorar la biodisponibilidad de nutrientes (Dudonné *et al.*, 2015), o de generar una respuesta inmune local o a distancia (Bonet *et al.*, 2006; Dogi, Galdeano y Perdigón, 2008; Bereswill *et al.*, 2017). Los modelos murinos han sido también utilizados para estudiar los efectos psicológicos del consumo de probióticos indagando en la relación entre los cambios en la microbiota y el comportamiento y estado de ansiedad de los ratones (Emge *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2018).

En nuestro laboratorio, se han utilizado diferentes modelos de ratones y meriones para estudiar el efecto probiótico de distintas cepas bacterianas sobre la interacción parásito-hospedador en infecciones por *Giardia intestinalis* (Humen *et al.*, 2005; Teijeiro, 2019) observando un efecto protector del probiótico frente a la infección con *Giardia*. El modelo de ratones BALB/c ha sido utilizado también por Hamet y col. para estudiar la influencia del exopolisacárido producido por los microorganismos el kéfir (kefirán) sobre la microbiota de los ratones (Hamet *et al.* 2016), encontrando que la administración kefirán modificaba la composición de la microbiota intestinal propiciando el aumento de las poblaciones de bacterias del género *Bifidobacterium*.

Con el objetivo de estudiar el efecto global de la administración oral de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 se realizó un ensayo *in vivo* en un modelo murino. Es importante destacar que la cepa CIDCA133 en particular, ha demostrado tener propiedades protectoras frente a la infección con *E. coli* enterohemorrágica, mejorando la supervivencia de los ratones y protegiéndolos del daño intestinal y renal producido por el patógeno (Hugo 2007). En el presente trabajo se focalizó en evaluar la influencia de estas cepas sobre la microbiota del ratón y la respuesta inmune mediante la evaluación de marcadores relevantes en el entorno intestinal.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Cepas bacterianas

Se utilizaron las cepas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (CIDCA 331) y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (CIDCA133). Las cepas se cultivaron a 37 °C en medio MRS durante 16 h.

Los inóculos utilizados para la administración oral se prepararon a partir de suspensiones de bacterias provenientes de cultivos frescos que fueron centrifugados y posteriormente lavados con PBS y conservados a -80 °C en una solución de sacarosa al 20 % p/v hasta el momento de su uso. Durante los ensayos las suspensiones bacterianas se diluyeron en el agua de bebida. La concentración final de lactobacilos en el agua de bebida fue de 1×10^8 UFC/ml.

5.2.2 Animales utilizados y condiciones de mantenimiento

Se utilizaron ratones hembra libres de patógenos específicos (SPF) de 6 a 8 semanas de edad de la cepa BALB/c AnNLAE cuyos progenitores proceden del National Institute of Health (EEUU), obtenidos del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Una vez trasladados al bioterio de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas, se realizó una semana de adaptación a las nuevas condiciones de alojamiento. Los ratones fueron mantenidos en cajas con entre 9 y 12 individuos, con un lecho de viruta esterilizada y con ciclos de 12 h luz/oscuridad. Durante los experimentos los ratones fueron alimentados con una dieta normal en forma de pellets y agua *ad libitum*. Los procedimientos fueron realizados bajo normas internacionales de trabajo con animales de experimentación y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP) (Protocolo número: 003-23-16)

5.2.3 Diseño experimental

Los ratones fueron separados en tres grupos según el tratamiento: Control, Grupo CIDCA 133 y Grupo CIDCA 331. Estos dos últimos recibieron en el agua de bebida diariamente durante 7 días las suspensiones de los respectivos lactobacilos, mientras que el grupo control sólo recibió la solución de sacarosa utilizada como crioprotector (Tabla 5.1). Se realizaron dos muestreos: a las 24 h de la primera administración de las bacterias y a los 7 días (Figura 5.1). El sacrificio fue realizado por inhalación de CO₂.

Inmediatamente luego del sacrificio, se procedió a la toma de muestras. De cada ratón se tomaron muestras de materia fecal y de placas de Peyer, bazo y nódulos linfáticos mesentéricos (MLN). Las muestras de materia fecal se conservaron a -80 °C hasta el momento de su utilización. Las muestras de placas de Peyer destinadas a histología se fijaron en etanol 96 % y se conservaron a temperatura ambiente; las muestras para el estudio de expresión de citoquinas y defensinas por qRT-PCR se conservaron en buffer de preservación RNA/ater RNA Stabilization Reagent (QIAGEN GmbH, Alemania) a -20 °C.

5.2.5 Estudio de la microbiota intestinal por electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE)

Se realizaron análisis por electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) con el fin de estudiar el efecto de la administración de los lactobacilos sobre las poblaciones bacterianas de la microbiota intestinal de los ratones, a partir de muestras de materia fecal,

La técnica de DGGE se puede emplear para el estudio de comunidades bacterianas aprovechando la gran variabilidad interespecie de regiones del genoma bacteriano (Wang et al. 2008). La técnica DGGE permite la separación de fragmentos de DNA del mismo tamaño, pero con diferente secuencia de nucleótidos en función de su contenido de GC mediante el uso de un gradiente desnaturizante de urea/formamida en un gel de poliacrilamida. Con este fin, se amplifica una región de DNA bacteriano con mucha variabilidad entre especies, como puede ser la sub unidad 16s del rRNA los cuales se separan de menor a mayor contenido de GC en el gel (Muyzer y Smalla, 1998).

5.2.5.1 Purificación de DNA.

La purificación del DNA de las muestras de materia fecal de ratón se realizó utilizando el kit de purificación QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego de la purificación de las muestras se cuantificó el DNA obtenido utilizando espectrómetro NanoDrop™ 2000 (Thermofisher) y se evaluó la calidad de la purificación mediante electroforesis en gel de agarosa.

5.2.5.2 Amplificación rDNA 16s bacteriano.

Para analizar la comunidad bacteriana de las muestras se amplificó la región variable V8 del gen del rRNA 16s utilizando los *primers* para eubacterias GC-341f y 907r (Wang y col., 2008) las secuencias se detallan en la Tabla 5.2.

Para las reacciones de PCR se usaron 3 µl de molde, 15 µl de *master mix* DREAMtaq (invitrogen), 3 µl de cada primer (concentración final 5 µM), 5 µl de agua

para completar un volumen final de reacción de 30 µl. La amplificación se realizó en un termociclador Biorad T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc. EEUU).

El programa utilizado fue el siguiente: Paso 1: un 1 ciclo de 4 min a 94 °C 4 min; Paso 2: 10 ciclos de (94 °C 30 seg, 62 °C 45 seg, 72 °C 1 min). Paso 3: 25 ciclos de (94 °C 30 seg, 57 °C 45 seg, 72 °C 1min); Paso 4: un ciclo de 72 °C 10 min. Luego del ciclado se chequeó el éxito de la reacción corriendo un gel de agarosa al 1%.

Tabla 5.2. Secuencia de los primers de eubacterias para DGGE.

Primer	Secuencia 5'-3'	Referencia
GC-341f	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CCT CCT ACG GGA GGC AGC AG	(Wang <i>et al.</i> , 2008)
907r	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	(Wang <i>et al.</i> , 2008)

5.2.5.3 Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante

Los productos PCR fueron analizados por DGGE en un equipo DGGE-2401 (C.B.S. Scientific Co., Del Mar, CA, USA) utilizando geles de poliacrilamida 8% p/v en buffer TAE (detalle en apéndice). La puesta a punto de las condiciones de la electroforesis fue realizada previamente en nuestro laboratorio por Hamet (Hamet, 2012). Se utilizó un gradiente desnaturalizante urea/formamida 40-60% (100% corresponde a 7 M de urea y 40% v/v de formamida). La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante 100 V durante 16 h a 60 °C. Los geles se tiñeron con SYBR Gold (Invitrogen, Oregon, USA) 0,2 µl/ml en buffer TAE durante 30 min y se visualizaron bajo luz UV en un transiluminador GelDoc XR (BioRad, EEUU). El análisis de las fotografías de los geles se realizó con el software GelCompar II (AppliedMaths, bioMérieux, Francia). El análisis de agrupamiento se realizó por el método UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*) utilizando el coeficiente similitud de Jaccard.

5.2.6 Expresión de citoquinas y defensinas

Con el fin de evaluar la influencia de los tratamientos con lactobacilos sobre la respuesta inmune intestinal se midió la expresión de citoquinas y β defensina 3

(mBD3) en placa de Peyer por qRT-PCR. Las muestras de placa de Peyer conservadas en RNAlater fueron retiradas del mismo y colocadas en un tubo conteniendo el buffer de lisis del kit comercial RNAspin mini (GE Healthcare UK), las muestras fueron luego homogeneizadas utilizando un equipo de disgregación (IKA T 10 basic, ULTRA-TURRAX). El RNA contenido en las muestras homogeneizadas fue purificado siguiendo el protocolo indicado en el kit comercial RNAspin mini (GE Healthcare UK). Una vez obtenido el RNA purificado fue cuantificado utilizando un espectrómetro NanoDrop™ 2000 (Thermofisher). Las muestras se conservaron a -80°C hasta el momento de la retrotranscripción. Se estandarizó la cantidad de RNA a utilizar en la reacción de PCR en $1\ \mu\text{g}$ por reacción.

5.2.6.1 RT PCR y qRT-PCR.

La retrotranscripción de RNA y las reacciones de PCR cuantitativas en tiempo real se realizaron de la manera descrita en el capítulo 3. Los primers utilizados se describen en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Secuencia de los primers utilizados para qRT-PCR.

Primer	Secuencia 5'-3' (fwrđ -rev)	referencia
β-Actina	CGT CAT CCA TGG CGA ACT G GCT TCT TTG CAG CTC CTT CGT	(Rumbo <i>et al.</i> , 2004)
TNF-α	CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A CCT CCA CTT GGT GGT TTG CT	(Roberts <i>et al.</i> , 2008)
IL12	CAC ATG TCA CTG CCC GAG AGT GCA AAG AAA CAT GGA CTT CAA CTT C	(Rolny, 2013)
IL10	CAT TTG AAT TCC CTG GGT GAG A TGC TCC ACT GCC TTG CTC TT	(Rolny, 2013)
mBD3	GCA TTG GCA ACA CTC GTC AGA CGG GAT CTT GGT CTT CTC TA	(Manko <i>et al.</i> , 2017)

5.2.7 Análisis estadístico

Los análisis de la varianza (ANOVA) se realizaron usando el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, EEUU). La comparación de las medias se realizó por el

test t de Student, considerando como estadísticamente significativa la diferencia cuando $p < 0,05$.

5.3 Resultados

5.3.1 Histología

El análisis microscópico de las tinciones con azul de Alcían de las muestras de intestino mostró una morfología normal tanto en las vellosidades como en las criptas sin evidencia de procesos inflamatorios o daño debido a la ingesta de los lactobacilos. El azul de Alcían permite evidenciar las células productoras de mucus. Los preparados presentaron una cantidad similar de células caliciformes sin observarse diferencias en número entre las muestras de los diferentes grupos de ratones; esto se repitió tanto en las muestras pertenecientes al sacrificio del día 1 como para las del día 7 (Figura 5.2).

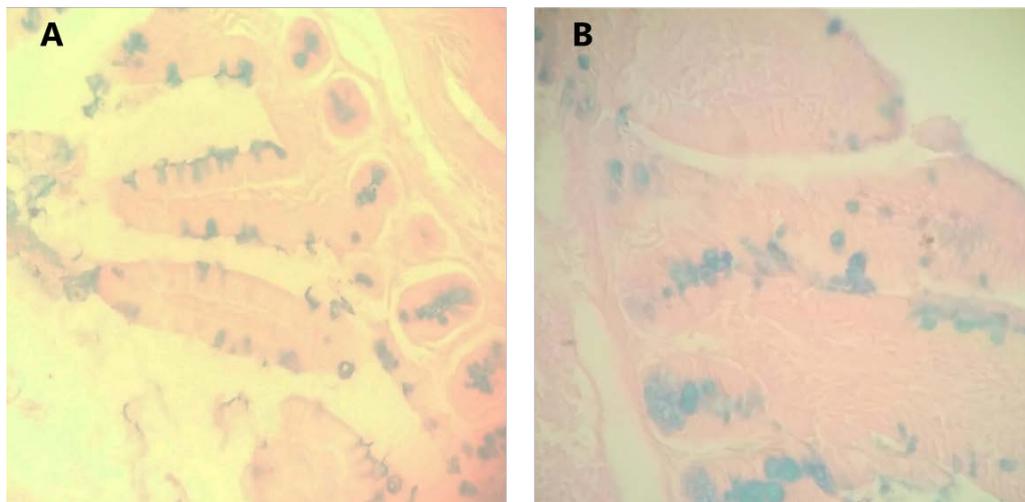


Figura 5.2. Tinciones con azul de Alcían. Las microfotografías muestran cortes de intestino delgado de ratón teñidas con azul de Alcían, La fotografía A corresponde a una muestra del grupo de ratones que consumió la cepa CIDCA 133 durante 1 día. La fotografía B corresponde a una muestra del grupo de ratones que consumió la cepa CIDCA 331 durante 7 días.

Las tinciones de hematoxilina y eosina de nódulos linfáticos mesentéricos y bazo, al igual que las muestras de intestino no mostraron evidencia de procesos inflamatorios a causa los diferentes tratamientos. En la Figura 5.3 se pueden ver cortes de bazo de ratones representativos de los diferentes grupos. En la Figura 5.4 se muestran cortes representativos de los nódulos linfáticos mesentéricos de los diferentes grupos de ratones. La estructura de ambos tejidos es normal sin infiltrados inflamatorios ni edemas para todos los tratamientos y tiempos analizados.

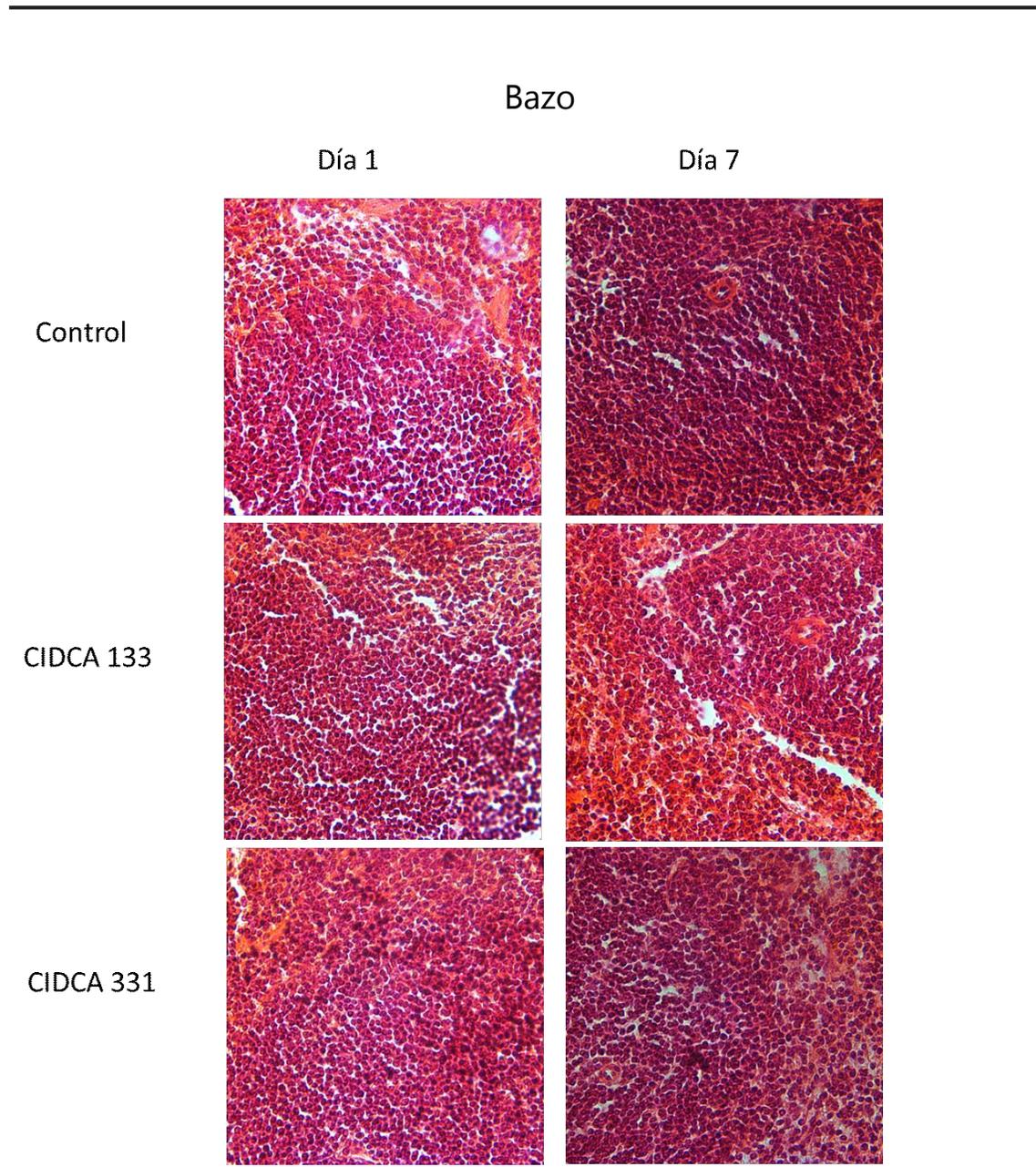


Figura 5.3. Tinciones de Hematoxilina-Eosina de cortes de bazo. Las micrografías corresponden a imágenes representativas de los diferentes grupos de ratones según indican las filas y las columnas. La primera columna corresponde a ratones sacrificados el día 1 y la segunda a ratones sacrificados el día 7.

Nódulos linfáticos mesentéricos

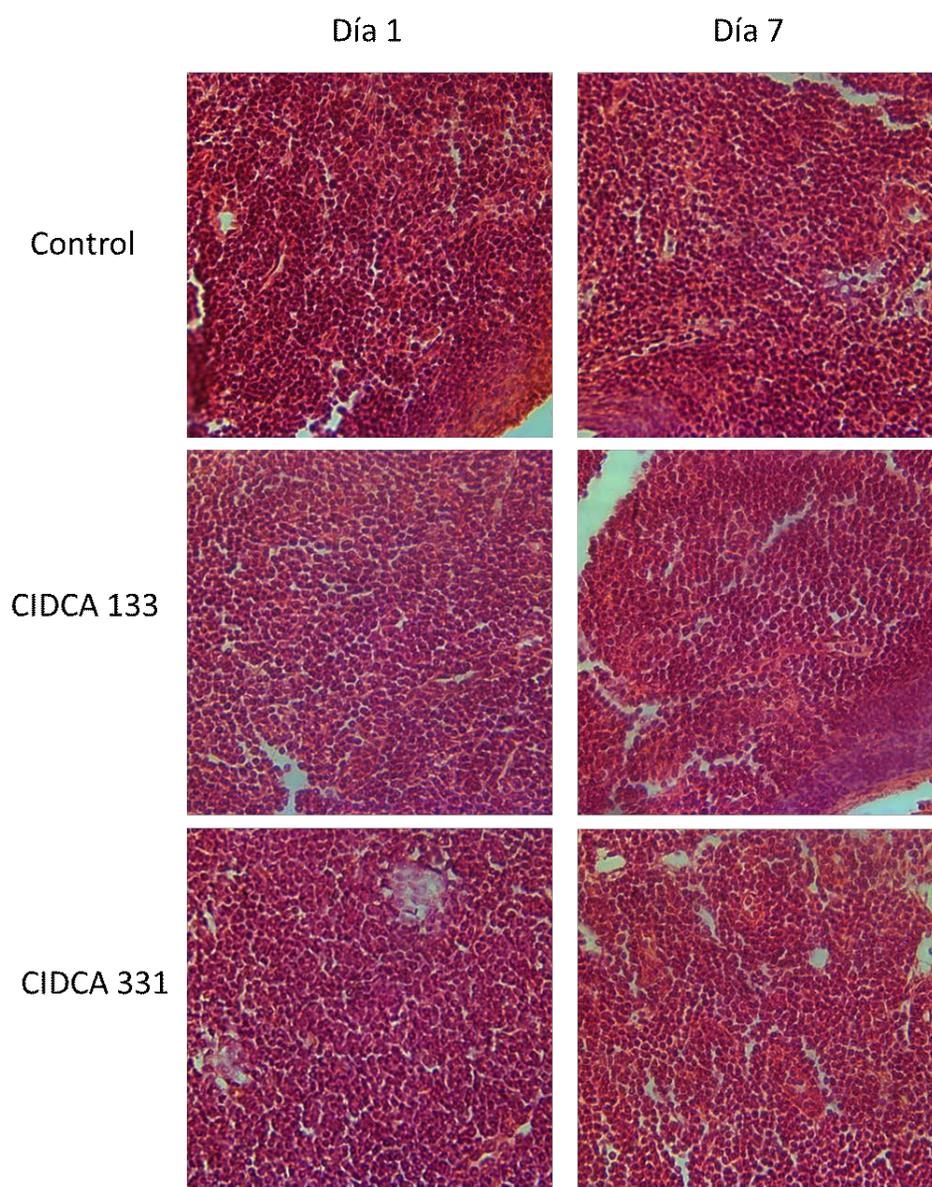


Figura 5.4. Tinciones de Hematoxilina-Eosina de cortes nódulos linfáticos mesentéricos. Las micrografías corresponden a imágenes representativas de los diferentes grupos de ratones según indican las filas y las columnas. La primer columna corresponde a ratones sacrificados el día 1 y la segunda a ratones sacrificados el día 7.

5.3.2 Análisis de la microbiota intestinal por DGGE

Se evaluó mediante DGGE la diversidad de Eubacterias en heces de ratón, empleando *primers* universales (GC-341f /907r). Se extrajo y amplificó el rDNA bacteriano de muestras de materia fecal de tres individuos de cada grupo de ratones. Los geles obtenidos se analizaron con el software GelCompar II y se obtuvieron los dendrogramas que se observan en las Figura 5.5. Se observó que los perfiles de las muestras obtenidas en el día 1 no se agruparon en clusters definidos que separen los distintos grupos experimentales. Este resultado podría deberse al corto tiempo de administración de los lactobacilos prevaleciendo en este punto la variabilidad entre los individuos más que el efecto de los diferentes tratamientos.

En contraste, los perfiles de las muestras correspondientes a los animales sacrificados al día 7 comenzaron a mostrar una divergencia entre los diferentes grupos experimentales. Se registraron diferencias en los patrones de bandas de las muestras correspondientes a los ratones de los grupos CIDCA 133 y CIDCA 311 (recuadros rojos, Figura 5B). Esto evidenciaría cambios en la composición de la microbiota de los ratones tratados con los probióticos. Los cambios en las bandas ocurridos a los 7 días se reflejaron en distintos agrupamientos respecto al día 1. De hecho, las muestras correspondientes a los animales tratados con la cepa CIDCA133 se agruparon en un clúster definido con una similitud de 68% mientras que las muestras correspondientes a los animales tratados con la cepa CIDCA 331 se agruparon en un clúster junto con los controles.

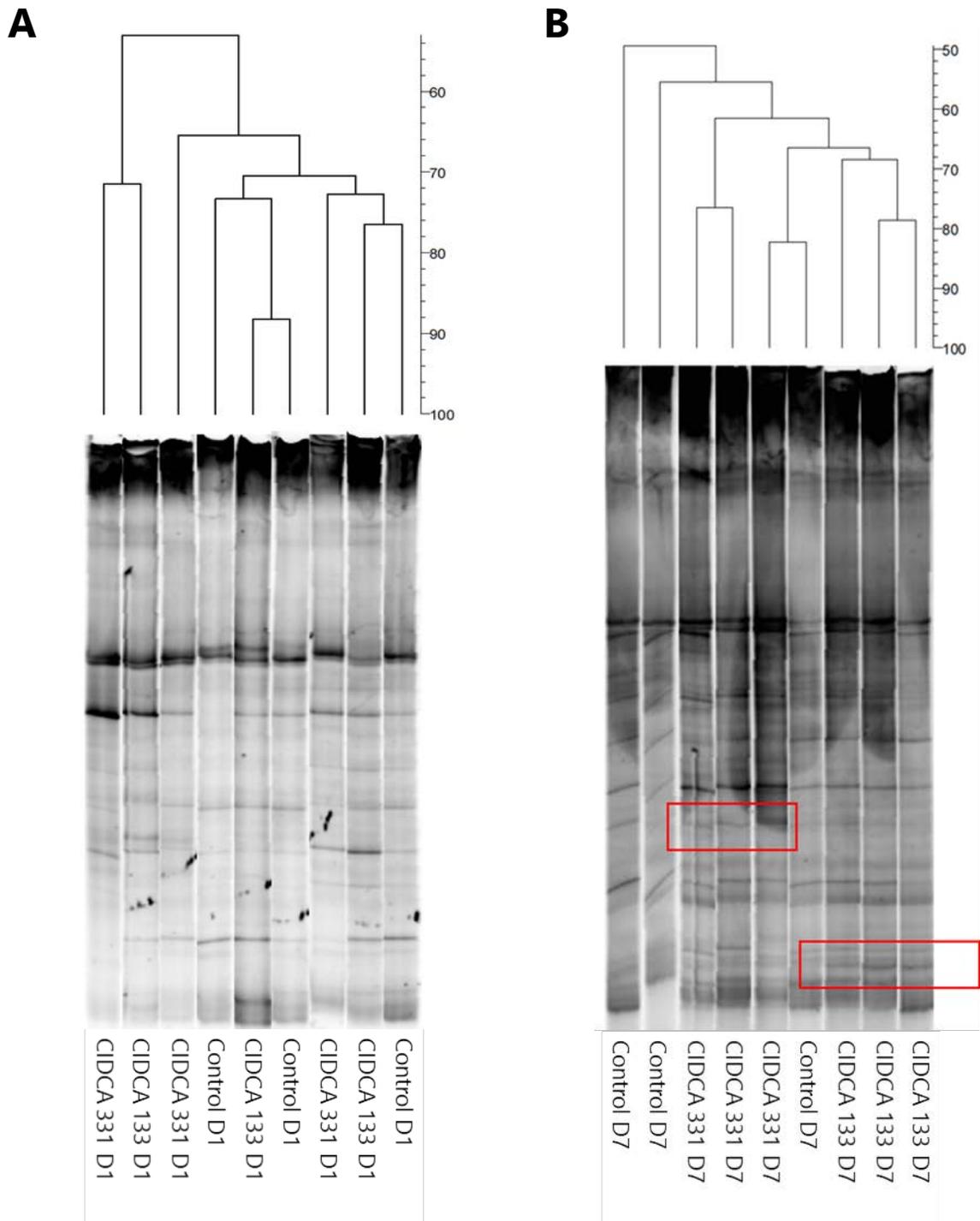


Figura 5.5. Agrupamiento según los patrones de bandas de los perfiles de DGGE de las muestras de heces de ratones. La Figura A corresponde a las muestras de los ratones del sacrificio del día 1, la Figura B corresponde a las muestras del sacrificio del día 7. Los recuadros rojos señalan zonas modificadas por el tratamiento. El análisis de agrupamiento se realizó por el método UPGMA utilizando el coeficiente similitud de Jaccard.

5.3.3 Expresión de defensinas en intestino de ratón

Se estudió la expresión de la beta defensina 3 de ratón (mBD3) que es homóloga a la hBD2 humana en muestras de placas de Peyer. Al día 1 se pudo observar una tendencia al aumento de la expresión de mBD3 en los grupos tratados con bacterias con respecto al grupo control, la expresión para el grupo CIDCA 133 fue 3.5 veces mayor que el control mientras que para grupo CIDCA 331 fue 2 veces mayor que el control (Figura 5.6). Al día 7 los niveles de expresión de mBD3 en los grupos tratados con los lactobacilos disminuyeron con respecto al día 1, para la cepa CIDCA133 la expresión fue 0.3 veces la del grupo control del día 7 mientras que la expresión en el grupo CIDCA 331 fue igual a la del grupo control (Figura 5.6).

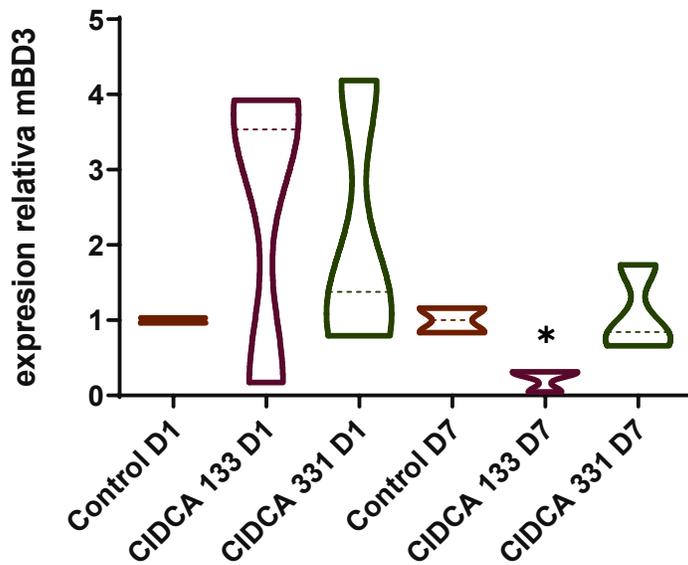


Figura 5.6. Expresión de mRNA de beta defensina 3 de ratón. Se muestran la expresión relativa de mBD3 en placa de Peyer. D1 grupos correspondientes al sacrificio del día1; D7 grupos de ratones correspondientes al sacrificio del día 7. Cada resultado representa la media \pm la desviación estándar (n=3). Los asteriscos representan una diferencia con respecto al control del día correspondiente de $p < 0.05$ en t test.

5.3.4 Expresión de citoquinas en placas de Peyer

Se estudiaron los niveles de expresión de genes de citoquinas en las muestras obtenidas de placas de Peyer. Los valores encontrados se muestran en la Figura 5.7. Al día 1 los grupos de ratones que consumieron los lactobacilos mostraron una tendencia al aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-12 con respecto al grupo control. Al día 7 los niveles de TNF e IL-12 bajaron para los grupos que consumieron lactobacilos en referencia al grupo control. Por otro lado, hubo una disminución de los niveles de expresión de IL-10 en los grupos que recibieron los lactobacilos tanto al día 1 como al día 7.

Los resultados indicarían que, la ingesta de lactobacilos induce transitoriamente, a tiempos tempranos, un perfil de citoquinas de carácter proinflamatorio a nivel intestinal, que se atenúa a los 7 días de consumo.

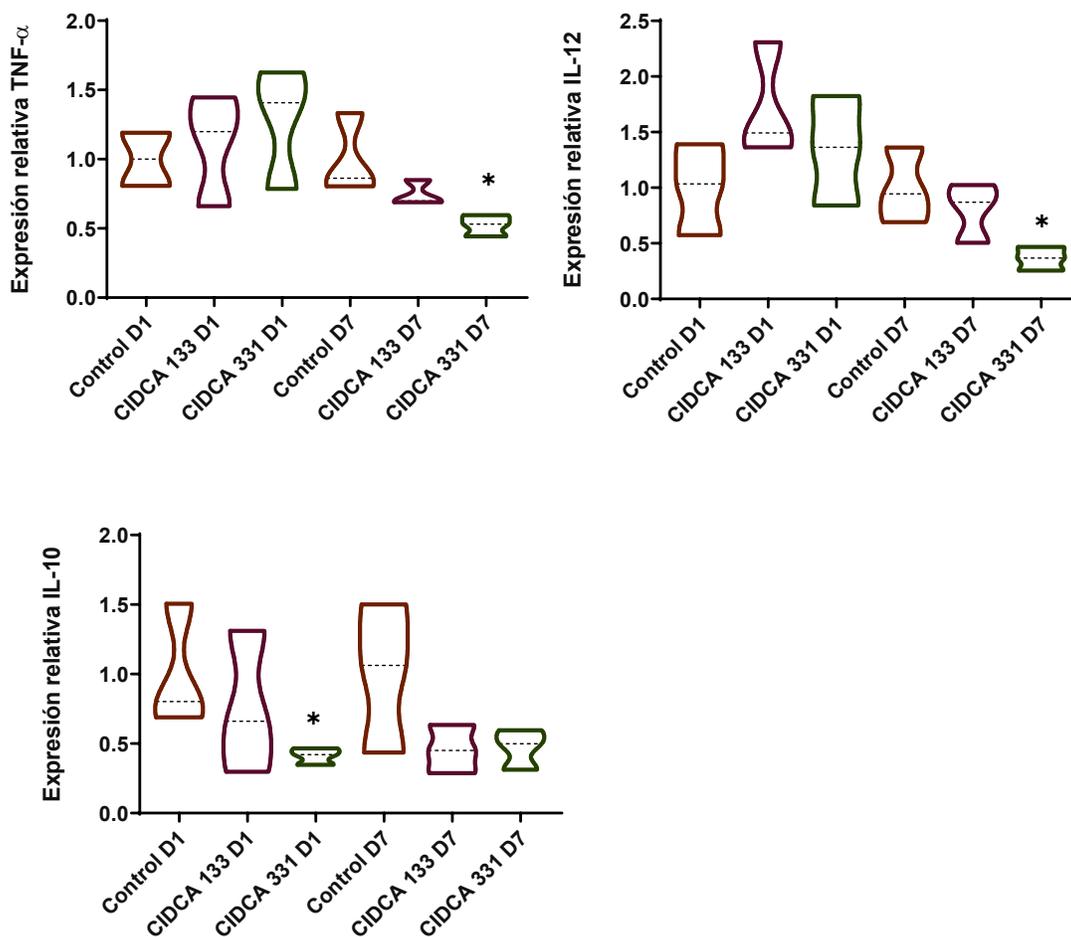


Figura 5.7. **Expresión de mRNA de citoquinas en placas de Peyer de ratón.** Se muestra la expresión de mRNA de citoquinas con respecto a la expresión de las mismas en el grupo control del día correspondiente. D1 grupos correspondientes al sacrificio del día1; D7 grupos de ratones correspondientes al sacrificio del día 7. Cada resultado representa la media \pm la desviación estándar (n=3). Los asteriscos representan una diferencia con respecto al control del día correspondiente de $p < 0.1$ en t test.

5.4 Discusión

Si bien los lactobacilos en general cuentan con un status GRAS (*generally recognized as safe*) su inocuidad para adicionarlos en alimentos para consumo humano debe ser demostrada (Adams y Marteau, 1995; FAO/WHO, 2002). En nuestro caso, las cepas no ocasionaron signos de desorden intestinal observándose que

tanto las mucosas de los ratones control como de los tratados presentaban un aspecto normal. Tampoco se registraron cambios en el comportamiento y la salud de los ratones. En general se observó una respuesta de moderada intensidad del hospedador frente al tratamiento con el probiótico la cual produjo efectos más sutiles respecto a los que provocarían microorganismos patógenos. Aun así, se pudieron registrar respuestas del hospedador que se encontraron en sintonía con las obtenidas en los modelos *in vitro* evaluados en los capítulos anteriores.

La presencia de los lactobacilos tuvo un impacto en el perfil de la microbiota intestinal. Los análisis de DGGE mostraron cambios en la agrupación de los clusters entre los ratones que recibieron lactobacilos y los ratones control a los 7 días. En efecto, al inicio los clusters contienen individuos de los distintos tratamientos mientras que a los 7 días se distinguen 3 grupos relacionados entre sí: los ratones que recibieron la cepa CIDCA 133, los que recibieron la cepa CIDCA 331, entremezclado con un control y más distante el resto de los individuos correspondientes al grupo control. La dispersión inicial de los clusters observada al día 1 posiblemente implique que la administración durante un día de los probióticos no fue suficiente para superar la contribución de la variabilidad biológica de la microbiota intestinal sobre los agrupamientos. Este tipo de variaciones inter individuos inicial han sido documentadas ampliamente utilizando la técnica de DGGE tanto en modelos animales como en humanos (Zoetendal, Akkermans y De Vos, 1998; Montesi *et al.*, 2005; Snart *et al.*, 2006).

Los cambios en los perfiles observados al día 7 debido al tratamiento con lactobacilos, pueden deberse a la aparición de bandas correspondientes a los microorganismos administrados así como también a cambios concomitantes en otras poblaciones bacterianas (Sui *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2011). Un estudio preliminar por RT-qPCR realizado sobre estas mismas muestras mostró indicios de un aumento de las poblaciones del filo firmicutes en los grupos tratados con lactobacilos (datos no mostrados). En el filo firmicutes se encuentran agrupadas bacterias grampositivas de bajo contenido CG como los géneros *Clostridium*, *Bacillus* también *Lactobacillus*; lo cual sugeriría que serían todas o algunas de éstas poblaciones las que estarían incrementándose (Galperin, 2013).

En ensayos similares, Teijeiro (Teijeiro, 2019), en su trabajo de tesis doctoral, observó una disminución en los géneros *Clostridium* y un aumento en los géneros *Lactobacillus* (pertenecientes al filo firmicutes) en los grupos de ratones a los cuales se les administró la cepa *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. Si bien las técnicas de DGGE y RT-qPCR realizadas en este trabajo no permiten distinguir entre los diferentes géneros bacterianos, si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por Teijeiro podríamos especular que los cambios observados podrían deberse a un aumento de la proporción de microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus*, lo que conllevaría un efecto beneficioso para el hospedador.

Al analizar la respuesta inmune intestinal pudo observarse que en tiempos cortos (1 día) los lactobacilos aumentan en forma moderada el nivel de las citoquinas proinflamatorias estudiadas y al cabo de 7 días estos valores descienden a niveles aún menores que el control. En el caso de las citoquinas antiinflamatorias a tiempos cortos no se observan cambios en la expresión de IL-10 pero luego de 7 días los niveles caen por debajo del control. Ambas cepas de lactobacilos produjeron un perfil de respuesta de citoquinas semejante en los ratones. Los resultados indicarían que la ingesta de cantidades elevadas de lactobacilos induce a nivel intestinal una respuesta de tipo proinflamatoria de baja intensidad en forma temprana y transitoria. Este tipo de respuesta inflamatoria moderada por efecto de las bacterias lácticas ha sido documentada en otros trabajos y se la ha vinculado con los varios mecanismos presentes en la mucosa intestinal para mantener la homeostasis y no desencadenar respuestas inflamatorias exageradas ante los microorganismos comensales (Honda y Takeda, 2009; Chiba *et al.*, 2010). En los ensayos realizados *in vitro* en el capítulo 4 también se observó una respuesta proinflamatoria donde observamos una polarización de macrófagos hacia un perfil de activación con de tipo M1.

Cuando se estudió la inducción de β defensinas en las muestras de placas de Peyer se registró que a tiempos cortos ambos lactobacilos podrían aumentar la expresión de la mBD3 y que la expresión cae a niveles basales luego de 7 días. Estos resultados conciben con lo evaluado *in vitro* respecto a la expresión de la hBD2 en células Caco-2/TC7 (capítulo 3), donde se observó que los lactobacilos fueron inductores moderados de la defensina. En conjunto podríamos afirmar que los lactobacilos

fueron capaces de aumentar la expresión de las β defensinas inducibles intestinales tanto *in vitro* como *in vivo*. Al igual que en los ensayos de expresión de citoquinas los niveles de sobreexpresión de defensinas no son muy elevados. Esto indicaría que la administración de lactobacilos genera un aumento de los niveles de β defensina y de "alerta" temprana del sistema inmune cuya respuesta determina en parte la supervivencia y/o permanencia de estos lactobacilos a nivel intestinal.

Los resultados de este capítulo mostraron que la administración de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 tuvo un efecto sobre la microbiota intestinal del ratón y produjeron una respuesta inmune que podría ser beneficiosa para proteger al hospedador. El análisis de la respuesta de los ratones ante la ingesta de los lactobacilos fue coincidente con los resultados obtenidos utilizando modelos *in vitro*, poniendo de manifiesto efectos de la interacción bacteria-hospedador en un sistema más complejo como es un modelo murino.

5.5 Bibliografía

- Adams, M. R., & Marteau, P. (1995). On the safety of lactic acid bacteria from food. *International Journal of Food Microbiology*, 27(2–3), 263–264. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00067-T](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00067-T)
- Alard, J., Lehrter, V., Rhimi, M., Mangin, I., Peucelle, V., Abraham, A. L., ... Grangette, C. (2016). Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. *Environmental Microbiology*, 18(5), 1484–1497. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13181>
- Bereswill, S., Ekmekci, I., Escher, U., Fiebiger, U., Stingl, K., & Heimesaat, M. M. (2017). *Lactobacillus johnsonii* ameliorates intestinal, extra-intestinal and systemic pro-inflammatory immune responses following murine *Campylobacter jejuni* infection. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02436-2>
- Bonet, M. E. B., Chaves, A. S., Mesón, O., & Perdígón, G. (2006). Immunomodulatory and anti-inflammatory activity induced by oral administration of a probiotic strain of *Lactobacillus casei*. *European Journal of Inflammation*, 4(1), 31–41. <https://doi.org/10.1177/1721727X0600400104>
- Chiba, Y., Shida, K., Nagata, S., Wada, M., Bian, L., Wang, C., ... Nomoto, K. (2010). Well-controlled proinflammatory cytokine responses of Peyer's patch cells to probiotic *Lactobacillus casei*. *Immunology*, 130(3), 352–362. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03204.x>
- Claes, I. J. J., De Keersmaecker, S. C. J., Vanderleyden, J., & Lebeer, S. (2011). Lessons from probiotic-host interaction studies in murine models of experimental colitis. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(10), 1441–1453. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100139>
- Dogi, C. A., Galdeano, C. M., & Perdígón, G. (2008). Gut immune stimulation by non pathogenic Gram(+) and Gram(-) bacteria. Comparison with a probiotic strain. *Cytokine*, 41(3), 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.11.014>
- Dudonné, S., Varin, T. V., Forato Anhe, F., Dubé, P., Roy, D., Pilon, G., ... Desjardins, Y. (2015). Modulatory effects of a cranberry extract co-supplementation with *Bacillus subtilis* CU1 probiotic on phenolic compounds bioavailability and gut microbiota composition in high-fat diet-fed mice. *PharmaNutrition*, 3(3), 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2015.04.002>
- Emge, J. R., Huynh, K., Miller, E. N., Kaur, M., Reardon, C., Barrett, K. E., & Gareau, M. G. (2016). Modulation of the microbiota-gut-brain axis by probiotics in a murine model of inflammatory bowel disease. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 310(11), G989–G998. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00086.2016>
- FAO/WHO. (2002). Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.

-
- Galperin, M. Y. (2013). Genome Diversity of Spore-Forming Firmicutes Bacterial systematics from Gram stain to 16S rRNA. *Microbiol Spectr.*, 1(2), 1–27. <https://doi.org/10.1128/microbiolspectrum.TBS-0015-2012>
- Hamet, M. F., Medrano, M., Pérez, P. F., & Abraham, A. G. (2016). Oral administration of kefir exerts a bifidogenic effect on BALB/c mice intestinal microbiota. *Beneficial Microbes*, Vol. 7, pp. 237–246. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0103>
- Hamet, María Fernanda. (2012). Polisacáridos de bacterias lácticas de fermentos artesanales para el desarrollo de alimentos funcionales (Universidad Nacional de La Plata). <https://doi.org/10.35537/10915/18241>
- Honda, K., & Takeda, K. (2009). Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria. *Mucosal Immunology*, 2(3), 187–196. <https://doi.org/10.1038/mi.2009.8>
- Huang, E., Kang, S., Park, H., Park, S., Ji, Y., & Holzapfel, W. H. (2018). Differences in anxiety levels of various murine models in relation to the gut microbiota composition. *Biomedicines*, 6(4). <https://doi.org/10.3390/biomedicines6040113>
- Hugo, A. A. (2007). Capacidad probiótica de la cepa CIDCA 133 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis*): un recorrido desde modelos in vitro a in vivo (Universidad Nacional de La Plata). <https://doi.org/10.35537/10915/2360>
- Humen, M. A., De Antoni, G. L., Benyacoub, J., Costas, M. E., Cardozo, M. I., Kozubsky, L., ... Pérez, P. F. (2005). *Lactobacillus johnsonii* La1 antagonizes *Giardia intestinalis* in vivo. *Infection and Immunity*, 73(2), 1265–1269. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.1265-1269.2005>
- Larsen, N., Vogensen, F. K., Gøbel, R., Michaelsen, K. F., Al-Soud, W. A., Sørensen, S. J., ... Jakobsen, M. (2011). Predominant genera of fecal microbiota in children with atopic dermatitis are not altered by intake of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bi-07. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(3), 482–496. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01024.x>
- Manko, A., Motta, J. P., Cotton, J. A., Feener, T., Oyeyemi, A., Vallance, B. A., ... Buret, A. G. (2017). *Giardia* co-infection promotes the secretion of antimicrobial peptides beta-defensin 2 and trefoil factor 3 and attenuates attaching and effacing bacteria-induced intestinal disease. *PLoS ONE*, 12(6), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178647>
- Martín, R., Chain, F., Miquel, S., Motta, J. P., Vergnolle, N., Sokol, H., & Langella, P. (2017). Using murine colitis models to analyze probiotics-host interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(February), S49–S70. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux035>
- Montesi, A., García-Albiach, R., Pozuelo, M. J., Pintado, C., Goñi, I., & Rotger, R. (2005). Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 98(3), 281–289.

- Muyzer, G., & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 73(1), 127–141. <https://doi.org/10.1023/A:1000669317571>
- Park, S., Ji, Y., Jung, H. Y., Park, H., Kang, J., Choi, S. H., ... Holzapfel, W. H. (2017). *Lactobacillus plantarum* HAC01 regulates gut microbiota and adipose tissue accumulation in a diet-induced obesity murine model. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(4), 1605–1614. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7953-2>
- Roberts, R., Moreno, G., Bottero, D., Gaillard, M. E., Fingerhann, M., Graieb, A., ... Hozbor, D. (2008). Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine*, 26(36), 4639–4646. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.004>
- Rolny, I. S. (2013). Microorganismos intestinales: estudio de *Bacillus cereus* en modelos de interacción con el hospedador (p. 266). p. 266. <https://doi.org/10.35537/10915/26402>
- Rumbo, M., Sierro, F., Debard, N., Kraehenbuhl, J. P., & Finke, D. (2004). Lymphotoxin β receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium. *Gastroenterology*, 127(1), 213–223. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.018>
- Snart, J., Bibiloni, R., Grayson, T., Lay, C., Zhang, H., Allison, G. E., ... Tannock, G. W. (2006). Supplementation of the diet with high-viscosity beta-glucan results in enrichment for lactobacilli in the rat cecum. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1925–1931. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1925-1931.2006>
- Sui, J., Leighton, S., Busta, F., & Brady, L. (2002). 16S ribosomal DNA analysis of the faecal lactobacilli composition of human subjects consuming a probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* NCFMR. *Journal of Applied Microbiology*, 93(5), 907–912. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01767.x>
- Teijeiro, M. (2019). Productos fermentados deshidratados probióticos para la prevención de giardiasis (Universidad Nacional de La Plata). Recuperado de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/88859>
- Wang, J., Ma, T., Zhao, L., Lv, J., Li, G., Liang, F., & Liu, R. (2008). PCR-DGGE method for analyzing the bacterial community in a high temperature petroleum reservoir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1981–1987. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9694-6>
- Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. L., & De Vos, W. M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3854–3859.

Discusión General

En este trabajo de tesis doctoral se buscó profundizar en el conocimiento de la potencialidad probiótica de las cepas de lactobacilos CIDCA 133 y CIDCA 331 focalizando en la relevancia de la resistencia de las cepas a péptidos antimicrobianos. Los péptidos antimicrobianos cumplen un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y su interacción con los distintos microorganismos probióticos resulta de particular interés.

Se utilizaron diferentes modelos que permitieron estudiar la interacción bacteria/péptido y bacteria/hospedador a diferentes niveles.

Los modelos de interacción entre bacterias y péptidos permitieron indagar más profundamente sobre la resistencia diferencial a las β defensinas de la cepa CIDCA 133 respecto a la cepa CIDCA 331, observándose que el patrón de sensibilidad de las cepas se conservaba con péptidos de estructura y origen distintos, como son los α péptidos de anuros aureína, maculatina y citropina. Los resultados sugieren que las diferencias presentes principalmente en la membrana de las cepas condicionarían su resistencia frente a péptidos catiónicos de forma más general y por mecanismos conservados que se mantuvieron a lo largo de la evolución de las bacterias en distintas especies de hospedadores.

Los modelos de interacción de liposomas y monocapas utilizando lípidos extraídos de las cepas de los lactobacilos, con los péptidos antimicrobianos, aportaron resultados semejantes a los obtenidos con bacterias enteras mostrando una mayor afinidad de los AMPs por los lípidos de la cepa CIDCA 331. Es importante mencionar, que estudios recientes *in silico* utilizando la técnica de dinámica molecular también confirman nuestras observaciones (Balatti, 2020). La diferente susceptibilidad a los AMPs de las cepas de lactobacilos podría atribuirse en parte, a la mayor proporción

de fosfolípidos en la membrana celular de la cepa CIDCA 331 lo que le daría una mayor densidad de carga negativa comparada con la de la cepa CIDCA 133.

Los resultados obtenidos demostraron por otra parte que la composición de la membrana no sólo influye en la susceptibilidad a los AMPs sino también en los mecanismos de acción. En efecto, se pudo comprobar que en las membranas formadas con lípidos bacterianos los péptidos aureína 1.2 y citropina 1.1 que suelen presentar un mecanismo de acción del tipo alfombra actuaron por un mecanismo formador de poros. Este último resultado, también tuvo su correlato en las simulaciones hechas *in silico* por Balatti que demostraron la formación de un poro estable de aureína en la membrana modelo de la cepa CIDCA 331 que no fue observado en los modelos de membrana de la cepa CIDCA 133 (Balatti, 2020).

Cuando se evaluó la estabilidad *in vitro* de liposomas formulados con los lípidos de la cepa CIDCA 133 se observó que fueron más resistentes con respecto a los formulados con lecitina tanto en presencia de los componentes del suero como durante procesos de congelación/descongelación y deshidratación/rehidratación resaltando así la importancia que tiene la composición de los liposomas sobre sus propiedades fisicoquímicas.

Este hecho se evidencia también al evaluar los resultados obtenidos con las formulaciones de liposomas a los que se les agregó el polímero PDMAEMA. El agregado del polímero permitió obtener liposomas sensibles al pH que liberan su contenido a pH levemente ácido y que pueden ser incorporados por células eucariotas. Las formulaciones de liposomas con PDMAEMA fueron internalizadas por las células epiteliales por un mecanismo endocítico dependiente de caveolas direccionando las vesículas a compartimentos no degradativos.

Para abordar el estudio de la interacción bacteria/hospedador se utilizaron distintos modelos celulares como enterocitos y macrófagos.

Las cepas estudiadas mostraron la capacidad de estimular una secreción moderada de hBD2 en enterocitos y al mismo tiempo pudieron modular la respuesta celular en presencia de un agonista TLR5 tal como la flagelina. Se observó un efecto sinérgico en la expresión de hBD2 junto a la flagelina, así como una disminución en

la expresión de NF- κ B. Los lactobacilos tendrían entonces un efecto dual, promoviendo la acción de un estímulo proinflamatorio como la flagelina en el caso de la expresión de hBD-2 pero a su vez modulando otras de sus respuestas al disminuir la cascada de señalización vía NF- κ B.

En los modelos de células fagocíticas las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 diferenciaron a los macrófagos hacia un perfil de tipo M1 que se caracterizan por una activa capacidad fagocítica y la secreción de citoquinas proinflamatorias. Los ensayos de fagocitosis realizados en macrófagos permitieron encontrar que tanto la adhesión a las células como la internalización de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 son diferentes. Si bien estas diferencias no se vieron reflejadas en la respuesta celular de los macrófagos, la mayor internalización y sobrevivencia intracelular de la cepa CIDCA 133 sostiene la hipótesis planteada en el presente trabajo, que plantea que una sensibilidad distinta de las bacterias frente a péptidos antimicrobianos podría determinar un diferente destino intracelular en macrófagos y, por consiguiente, una diferente respuesta.

El estudio del efecto de las cepas en un modelo *in vivo* mostró que la administración de las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 produjo cambios en la microbiota intestinal de los ratones y tuvo un efecto sobre la respuesta inmune, provocando un aumento en la expresión de mBD3 (β defensina de ratón análoga a la hBD2) y presentando a tiempos cortos un perfil de citoquinas proinflamatorias compatible con un perfil de activación M1 de macrófagos.

El conjunto de los resultados es compatible con un modelo donde la composición de la membrana plasmática de los lactobacilos afecta la susceptibilidad a los diferentes AMPs y signa en parte su posibilidad de permanecer viables en el ámbito intestinal. En este caso la cepa CIDCA 133 presentaría una ventaja adaptativa respecto a la cepa CIDCA 331. De hecho, otras propiedades que favorecen la colonización intestinal como son la tolerancia al pH ácido y a la bilis o la adhesión a enterocitos están presentes también en la cepa CIDCA 133. Los lactobacilos por otra parte se mostraron como inductores moderados de una respuesta transitoria de tipo proinflamatorio tanto *in vitro* como a nivel intestinal siendo inductores de β defensinas y de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL12, llevando a los macrófagos

hacia un perfil M1. Esto generaría un estado de alerta temprana del sistema inmune que favorecería la respuesta frente a microorganismos que presenten la potencialidad de generar situaciones adversas para el hospedador. Sin embargo, los lactobacilos fueron capaces también de modular una señal de activación proinflamatoria generada por un inductor fuerte como flagelina disminuyendo la señalización a través de NF- κ B. Este hecho junto a la sinergia observada en la inducción de la expresión de hBD2 en presencia de flagelina, nos muestra que los lactobacilos pueden actuar tanto como inmunoestimuladores o supresores dependiendo de la presencia o no de otros factores luminales. Esta dualidad en su rol de agonistas de la respuesta inmune presente en las bacterias con potencialidad probiótica, ha sido demostrada también para las bifidobacterias en otros sistemas experimentales (Assad, 2019).

Dado que la cepa CIDCA 133 presenta varias características que favorecerían su supervivencia y colonización a nivel intestinal sería posible que *in vivo* su impacto en la respuesta del hospedador sea diferente a cepas con características opuestas tales como la cepa CIDCA 331. De hecho, los estudios llevados a cabo mediante DGGE, mostraron que la administración de la cepa CIDCA 133 produjo cambios apreciables en la microbiota lo cual se evidenció por el agrupamiento de los animales en un cluster bien definido.

El presente trabajo de tesis amplía el panorama sobre las interacciones que se verifican entre el hospedador y los microorganismos benéficos en el tracto digestivo. Se introduce la susceptibilidad diferencial a péptidos antimicrobianos de origen eucariótico como variable relevante en el estudio de los mecanismos que explican el efecto de microorganismos probióticos y se asigna un rol fundamental a la composición de las membranas bacterianas para entender, cómo microorganismos que presentan capacidad moderada como agonistas de la respuesta inmune, ejercen un efecto en diferentes escenarios de estimulación.

El trabajo se enmarca en la búsqueda de los factores claves que determinan las interacciones de los microorganismos intestinales con el hospedador lo cual es de fundamental relevancia para el diseño racional de alimentos funcionales.

Perspectivas

Concluido este trabajo se abren nuevas perspectivas de estudio. Los resultados obtenidos con los modelos de membrana lipídica de lactobacilos llevan a pensar en profundizar el estudio de la interacción de péptidos antimicrobianos con membranas bacterianas a nivel molecular e identificar las interacciones fisicoquímicas que pueden determinar la susceptibilidad de las cepas de lactobacilos ante la acción de un determinado péptido antimicrobiano

A partir de los experimentos realizados con liposomas bacterianos también se abre el panorama para indagar si las cepas CIDCA 133 y CIDCA 331 forman naturalmente vesículas extracelulares (MVs) y de ser así, qué rol cumplen éstas en los efectos producidos por las bacterias en células eucariotas. En este sentido los modelos de liposomas bacterianos utilizados en este trabajo podrían ser una buena herramienta para evaluar la interacción de las células eucariotas con las MVs.

Otra perspectiva que se desprende de los estudios realizados con liposomas funcionales con PDMAEMA, luego de caracterizar sus propiedades fisicoquímicas y su mecanismo de internalización celular, es la de evaluar la factibilidad del uso de los liposomas formulados con lípidos bacterianos y el polímero como sistema de *delivery* de sustancias activas.

Los estudios sobre el efecto de las cepas bacterianas sobre la regulación de la expresión de defensinas abren interrogantes sobre los mecanismos a través de los cuales se produce esta inducción y las vías de señalización que intervienen en su regulación. En este contexto, los ensayos realizados permitieron determinar que la expresión de hBD2 se produce de manera independiente de la activación de NF- κ B pero resta identificar los receptores y las vías que intervienen, en este punto existen varios candidatos a evaluar como son las vías de MAPK, mecanismos relacionados con la inducción de ROS así como también mecanismos epigenéticos. Estos estudios

permitirían entender mejor los factores que determinan la interacción de diferentes microorganismos con el hospedador.

En el mismo sentido, los resultados obtenidos en los ensayos de polarización de macrófagos nos impulsan a estudiar con mayor detalle los perfiles de activación de los mismos en contacto con los microorganismos. En este punto se realizaron ensayos con macrófagos diferenciados con PMA, como siguiente paso se podrían estudiar el efecto de los lactobacilos sobre macrófagos en diferentes estados de activación. Estos ensayos nos podrían dar información del efecto de estas bacterias cuando interaccionan con subpoblaciones celulares presentes naturalmente en la mucosa intestinal.

A raíz de los efectos producidos por las cepas estudiadas sobre la microbiota de los ratones, resulta interesante realizar estudios más exhaustivos utilizando técnicas más poderosas, como la secuenciación de la subunidad 16S, que permitan obtener información más detallada de los cambios que se producen en la microbiota.

Las perspectivas desarrolladas en esta parte evidencian las proyecciones del trabajo que ha efectuado un recorrido desde aproximaciones experimentales con modelos simplificados de interacción hasta la complejidad de las interacciones que se verifican en modelos *in vivo* de mamíferos.

Apéndice



Medios de cultivo

Medio de Man, Rogosa, Sharpe (MRS)

Componente	para 1000ml
Peptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Extracto de levadura	5 g
D (+) glucosa	20 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Tween 80	1 g
Citrato ácido de amonio	2 g
Acetato de sodio	5 g
MgSO ₄	0,1 g
MnSO ₄	0,05 g
H ₂ O	c.s.p. 1000 ml

pH=6,4 – 6,6

El agar MRS se preparó adicionado 1,5 g/l de agar-agar al medio MRS

Medio Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) completo

Componente	Para 1000 ml
DMEM (Gibco, EEUU)	1 sobre
Suero Fetal Bovino	180 ml
Aminoácidos no esenciales (100X)	13 ml
Penicilina / Estreptomina (1000 UI, 1000 µg/ml)	13 ml
Gentamicina (50 mg/ml)	10 ml
NaHCO ₃	2 g
H ₂ O	c.s.p. 1000 ml

pH=6,9-7,2

El suero fetal bovino se inactivó 30 min a 60 ° C. Una vez preparado, el medio se esterilizó por filtración a través de una membrana de 0,22 µm.

DMEM Adhesión

Componente	Para 1000 ml
DMEM	1 sobre
NaHCO ₃	2 g

H ₂ O	c.s.p 1000 ml
pH=6,9-7,2	

Una vez preparado, el medio se esterilizó por filtración a través de una membrana de 0,22µm.

Buffer fosfato salino (PBS)

Componente	Para 1000 ml
NaCl	8,02 g
KCl	0,231 g
Na ₂ HPO ₄	1,17 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
H ₂ O	c.s.p 1000 ml
pH=7,2 – 7,4	

Procesamiento de las muestras histología

Las muestras fijadas en etanol 96°, fueron deshidratadas e incluidas en parafina. Posteriormente, los órganos incluidos en parafina fueron cortados con un micrótopo y los cortes presentados sobre porta objetos para su posterior tinción.

Desparafinización de los cortes

1. Xileno (3 veces durante 5 min cada vez)
2. Etanol absoluto (2 veces durante 2 min cada vez)
3. Etanol 96° (2 veces durante 2 min cada vez)
4. Etanol 80° – 70° (2 min)
5. Agua destilada (1 min)

Tinción de Hematoxilina - Eosina

1. Colocar en solución de Hematoxilina durante 5 min
2. Lavar con agua corriente, luego agua acida (pH=6) durante 3 min. aprox. (el preparado adquiere un color morado), agua corriente y finalmente agua destilada para terminar de lavarlo
3. Colocar en solución de Eosina durante 30 segundos
4. Lavar con etanol 70° una vez rápidamente
5. Deshidratar en etanol 96° (2 veces durante 2 min.), etanol absoluto (2 veces durante 2 min.), xilol (2 veces durante 2 min.)
6. Montar en portaobjeto usando bálsamo de Canadá.

Tinción de azul de Alcían

1. colocar en acético 3% durante 3 min
2. Luego en una solución de azul de Alcían (azul de Alcian 0,5 g/l en ácido acético 3 % (v/v), pH=2,5).
3. Lavar con agua
4. Colocar en solución de Eosina durante 30 segundos
5. Lavar con etanol 70° una vez rápidamente
6. Deshidratar en etanol 96° (2 veces durante 2 min.), etanol absoluto (2 veces durante 2 min.), xilol (2 veces durante 2 min.)
7. Montar en portaobjeto usando bálsamo de Canadá.

Preparación de los geles y siembra de las muestras para DGGE

Los geles de DGGE se armaron entre dos vidrios separados por dos lengüetas plásticas que sirven de borde lateral del gel. Para el armado de los geles con el gradiente desnaturalizante, se utilizó un sistema de dos vasos comunicantes conectado a una bomba peristáltica. Se prepararon las soluciones desnaturalizantes de trabajo (Tabla 1) a partir de soluciones desnaturalizantes 0 y 80 % y se generó un gradiente de 40 % a 60% (Tabla 2).

Tabla 1. Soluciones de trabajo para el armado de los geles de DGGE.

Concentración desnaturalizante	Solución 0 % desnaturalizante	Solución 80 % desnaturalizante
40%	5,75 ml	5,75 ml
60%	2,87 ml	8,63 ml

Tabla 2. Composición de las soluciones desnaturalizantes 0% y 80% para DGGE

Componente	0 % desnaturalizante	80 % desnaturalizante
Acrilamida-Bis 40%	20 ml	20 ml
Buffer TAE 50X	2 ml	2 ml
Urea	-	33,6 g
Formamida deionizada	-	32 ml
Agua destilada	c.s.p. 100 ml	c.s.p. 100 ml

Inmediatamente antes de su uso, se le agregó a cada una de estas soluciones de trabajo 4.4 μ l de Tetrametiletilendiamina (TEMED) y 44 μ l de persulfato de amonio 10 % p/v; iniciando la reacción de polimerización del gel. Las soluciones se colocaron en el sistema de vasos comunicantes, colocando aquella con mayor concentración de urea/formamida en el vaso más cercano al conducto de salida y agitando durante la preparación del gel con un agitador magnético. Una vez polimerizado el gel se añadió una solución de *stacking* (solución desnaturalizante 0%, TEMED, persulfato de amonio) con el objetivo de completar el volumen perdido y para permitir además que la muestra ingrese en una banda bien definida al gel desnaturalizante. Una vez formado el gel, los vidrios conteniendo el mismo se montaron sobre el soporte correspondiente y se colocaron en la cuba con buffer TAE (Tris, ácido acético, EDTA) a 60 °C. Luego se sembraron en cada fosa 20 μ l de muestra con 5 μ l de buffer siembra.

Tinción y análisis de los geles de DGGE

Los geles fueron teñidos con una solución de Sybr Gold 0,2 µl/ml en buffer TAE durante 30 min. Finalizada la tinción, la visualización de las bandas se realizó en un transiluminador UV con cámara fotográfica acoplada GelDoc XR (BioRad, EEUU). Las fotografías obtenidas se analizaron posteriormente utilizando el software GelCompar II (AppliedMaths, bioMérieux, Francia). El análisis de agrupamiento se realizó por el método UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*) utilizando el coeficiente similitud de Jaccard

