



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

Trabajo de Tesis Doctoral

Potencialidad probiótica de lactobacilos con capa S. Estudios sobre la inocuidad, efecto antimicrobiano y capacidad inmunomoduladora de *Lactobacillus kefir*.

LIC. PAULA CARASI

DIRECTORA: DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES SERRADELL
CODIRECTORA: DRA. GRACIELA LILIANA DE ANTONI

La Plata

2014

El presente trabajo, para optar por el grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue desarrollado en la Cátedra de Microbiología, bajo la dirección de las Dras. María de los Ángeles Serradell y Graciela Liliana De Antoni.

A continuación se detallan los trabajos científicos que se elaboraron a partir de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral:

1. “Surface proteins from *Lactobacillus kefir* antagonize *in vitro* cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxins”.

Autores: P. Carasi, F.M. Trejo, P.F. Pérez, G.L. De Antoni, M. Serradell. *Anaerobe* 2012 – 18 (1):135-142 doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.11.002

2. “Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus”.

Autores: P. Carasi, N. Ambrosio, G.L. De Antoni, P. Bressollier, M.C. Urdaci, M. Serradell. *Journal of Dairy Research* 2014 - 81(1):16-23. doi:10.1017/S0022029913000526

3. “Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated *Lactobacillus kefir*”.

Autores: P. Carasi, M. Diaz, S.M. Racedo, G.L. De Antoni, M.C. Urdaci, M. Serradell. *BioMed Research International – Special Issue: Role of Microorganisms Present in Dairy Fermented Products in Health and Disease* 2014 - 1-7. doi:10.1155/2014/208974

4. “Impact of Kefir derived *Lactobacillus kefir* on the mucosal immune response and gut microbiota”.

Autores: P. Carasi, S.M. Racedo, C. Jacquot, D.E. Romanin, M. Serradell, M.C. Urdaci. *Journal of Immunology Research – Special Issue: Intestinal Microbiota as Modulators of the Immune System* 2014 - 1-11. doi: 10.1155/2014/361604

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que formaron parte de mi vida académica desde que ingresé a la Facultad:

A Patricio de Urraza por abrirme las puertas del Laboratorio de Microbiología.

A Graciela De Antoni, por brindarme la posibilidad de realizar esta tesis e incluirme en su grupo de trabajo.

A mi directora, María Serradell, por su apoyo, consejos, paciencia y generosidad. Gracias por ayudarme a crecer y acompañarme en este camino.

A María Urdaci, por permitirme ser parte de su laboratorio, y a Claudine Jacquot y Anne Marie Elie por acompañarme y ayudarme siempre tanto dentro como fuera del trabajo.

A Silvia Racedo, por su ayuda desinteresada y por hacer de cada viaje a Bordeaux una experiencia inolvidable.

A mis compañeros y amigos con los que compartí la carrera, a cada persona con la que alguna vez esterilicé o compartí una pipeta, hice, discutí o deliré sobre algún experimento en el laboratorio, a aquellos con los que di clases, a la gente con la que trabajé en los proyectos de extensión y a quienes tuve la suerte de conocer en el Departamento de Ciencias Biológicas.

Les agradezco porque de cada uno de ustedes he aprendido algo y eso es lo más importante que me llevo de estos años.

Por último, quiero agradecer a mi familia, por su apoyo incondicional en cada uno de los proyectos que comienzo.

Índice

Índice

Introducción general	1
Abreviaturas y anglicismos	7
Capítulo 1: Estudios <i>in vitro</i>	9
Introducción	9
Objetivos	11
Resultados y discusión	13
1. Parámetros asociados a inocuidad	13
1.1. Sensibilidad a antimicrobianos	13
1.2. Capacidad hemolítica	16
1.3. Producción de citotoxinas	17
2. Características fisiológicas	18
2.1. Capacidad de adhesión a mucus gastrointestinal	18
2.2. Resistencia al pasaje gastrointestinal	35
3. Propiedades probióticas o funcionales	39
3.1. Efecto antimicrobiano	39
3.2. Antagonismo de factores solubles secretados por patógenos sobre células en cultivo	42
3.2.1. Antagonismo de factores extracelulares citotóxicos de <i>Bacillus cereus</i>	42
3.2.2. Antagonismo de factores extracelulares citotóxicos de <i>Clostridium difficile</i>	49
3.3. Propiedades inmunomodulatorias	56
3.3.1. Propiedades inmunomodulatorias sobre PMBC	57
3.3.2. Propiedades inmunomodulatorias sobre células Caco-2	63
3.3.3. Modulación del sistema reportero Caco-2 ccl20: luc	67
Conclusiones	69
Capítulo 2: Estudios <i>in vivo</i>	71
Introducción	71
Objetivos	73
Primera parte: Inocuidad, modulación del sistema inmune y efecto sobre la microbiota intestinal de la administración de <i>L. kefir</i> CIDCA 8348	75
Resultados y discusión	76
1.1. Evaluación de parámetros asociados a inocuidad	77
1.1.1. Estado general de los animales y necropsia	77

1.1.2.	Translocación de microorganismos a órganos estériles	79
1.2.	Evaluación de componentes asociados a la función de la barrera epitelial	80
1.2.1.	Producción de mucinas	81
1.2.2.	Producción de IgA	85
1.2.3.	Uniones entre células epiteliales	87
1.3.	Estudio del impacto sobre el sistema inmune de mucosas	90
1.3.1.	Expresión de citoquinas y quimoquinas en sitios inductores	91
1.3.2.	Expresión de citoquinas y quimoquinas en sitios efectores	92
1.3.3.	Secreción de citoquinas por explantes de íleon y colon en presencia de un estímulo pro-inflamatorio	96
1.4.	Efecto sobre la microbiota fecal	98
1.4.1.	Estudios cualitativos	99
1.4.2.	Estudios cuantitativos	101
	Conclusiones	107
	Segunda parte: Efecto de la administración de <i>L. kefir</i> CIDCA 8348 en un modelo de inflamación intestinal inducida por DSS	109
2.1.	Estado general de los animales y necropsia	111
2.2.	Expresión génica en secciones de colon	117
2.3.	Secreción de citoquinas por explantes de colon	123
2.4.	Expresión génica en mLN	124
2.5.	Efecto sobre la microbiota fecal	127
2.5.1.	Estudios cualitativos	128
2.5.2.	Estudios cuantitativos	130
	Conclusiones	139
<hr/>		
	Conclusiones generales	141
<hr/>		
	Materiales y métodos	143
<hr/>		
	1. Microorganismos y condiciones de cultivo	143
1.1.	<i>Lactobacillus kefir</i>	143
1.2.	Microorganismos patógenos	144
1.3.	Medios de cultivo bacteriano	145
1.4.	Tinción de Gram	145
1.5.	Marcación de bacterias con CFDA-SE	145
	2. Células eucariotas y condiciones de cultivo	146

2.1. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	146
2.2. Línea celular Vero	146
2.3. Líneas celulares epiteliales	147
2.3.1. Caco-2	147
2.3.2. Caco-2/TC-7	147
2.3.3. Caco-2 ccl20: luc	147
2.4. Medios de cultivo celular	148
3. Separación electroforética de proteínas	148
3.1. Separación mediante SDS-PAGE	148
3.2. Tinción de geles	149
3.2.1. Revelado con Coomassie coloidal	149
3.2.2. Revelado con nitrato de plata	149
3.3. Electrotransferencia	150
4. Cuantificación de proteínas	151
5. Biología molecular	151
5.1. Extracción de ARN de células y tejidos, transcripción reversa	151
5.2. Extracción de ADN de microorganismos y materia fecal	152
5.3. Extracción de plásmidos	152
5.4. Amplificación mediante reacción de polimerización en cadena (PCR) de fragmentos de ADN	153
5.5. PCR cuantitativa (qPCR)	153
6. Ensayos <i>in vitro</i>	154
6.1. Extracción de proteínas superficiales de <i>Lactobacillus kefir</i>	154
6.1.1. Extracción mediante LiCl 5 M o NaOH 0,01 M	154
6.1.2. Extracción mediante Proteinasa K	155
6.1.3. Análisis del perfil electroforético de los extractos dializados y pellets bacterianos post-tratamiento	156
6.1.4. Viabilidad bacteriana post-tratamiento	156
6.2. Hidrofobicidad superficial	156
6.3. Actividad hemolítica en medio sólido	157
6.4. Determinación de sensibilidad a antimicrobianos	157
6.4.1. Método de dilución en caldo	157
6.4.2. Detección de genes de resistencia a Cloranfenicol (cat)	158
6.5. Resistencia a las condiciones gastrointestinales	158

6.5.1. Adhesión a mucina gástrica porcina (MG) y células Caco-2/TC-7 post-simulación	159
6.5.2. Evaluación del perfil proteico de bacterias post-simulación	159
6.6. Ensayos de adhesión a componentes del epitelio intestinal	159
6.6.1. Adhesión de <i>L. kefir</i> a mucus gastrointestinal porcino	159
6.6.1.1. Obtención de extracto de mucus intestino delgado y colon de cerdo	159
6.6.1.2. Protocolo para ensayos de adhesión cuantitativos	160
6.6.1.3. Protocolos para ensayos de adhesión cualitativos	162
6.6.2. Adhesión de proteínas de capa S a mucus gastrointestinal porcino	163
6.6.2.1. Adhesión de proteínas de capa S de <i>L. kefir</i> a mucus gastrointestinal porcino en presencia o ausencia de azúcares. Ensayo tipo ELISA	163
6.6.2.2. Adhesión de proteínas de capa S de <i>L. kefir</i> a MG porcina: revelado mediante SDS-PAGE.	164
6.6.2.3. Adhesión de proteínas de capa S de <i>L. kefir</i> a proteínas de mucus de intestino delgado (MID) y de colon (MC). Ensayo tipo <i>Western Blot</i>	164
6.6.3. Adhesión a células Caco-2/TC-7	165
6.7. Inhibición del crecimiento de patógenos	165
6.8. Inhibición de la acción de factores citotóxicos solubles de <i>Bacillus cereus</i>	166
6.8.1. Obtención de sobrenadante de cultivo estéril de <i>B. cereus</i>	166
6.8.2. Preincubación de sobrenadante filtrado de <i>B. cereus</i> con <i>L. kefir</i>	166
6.8.3. Ensayo de citotoxicidad sobre células Caco-2 y Vero	166
6.8.4. Ensayo de hemólisis	167
6.9. Inhibición de la acción de factores citotóxicos solubles de <i>Clostridium difficile</i>	167
6.9.1. Obtención de sobrenadante de cultivo estéril de <i>C. difficile</i>	167
6.9.2. Tratamiento de sobrenadantes filtrados de <i>C. difficile</i>	167
6.9.3. Ensayo de citotoxicidad sobre células Vero	168
6.9.4. Interacción de <i>L. kefir</i> con las toxinas producidas por <i>C. difficile</i>	168
6.9.4.1. Dot Blot	169
6.9.4.2. Microscopía de fluorescencia	169
6.10. Propiedades inmunomodulatorias	169
6.10.1. Ensayos de estimulación sobre células Caco-2 y PBMC	169
6.10.1.1. Cuantificación de expresión génica	170
6.10.1.2. Cuantificación de citoquinas secretadas	170
6.10.2. Ensayos de estimulación sobre el sistema reportero Caco-2 ccl20:luc	171

7. Ensayos <i>in vivo</i>	171
7.1. Animales utilizados y condiciones de alojamiento	171
7.2. Monitoreo del estado general de los animales	171
7.3. Eutanasia, toma de muestras y modo de conservación	172
7.4. Protocolo experimental para estudiar la inocuidad, y modulación del sistema inmune y de la microbiota intestinal	173
7.5. Protocolo experimental para estudiar el efecto de la administración de <i>L. kefir</i> en un modelo de inflamación intestinal inducida por DSS	174
7.6. Procesamiento y análisis de muestras obtenidas de los ensayos <i>in vivo</i>	175
7.6.1. Histología	175
7.6.2. Translocación	176
7.6.3. Análisis de poblaciones celulares de mLN y PP	176
7.6.4. Cuantificación de IgA en materia fecal	177
7.6.5. Cultivo de explantes de íleon y colon	178
7.6.5.1. Cuantificación de citoquinas secretadas	178
7.6.6. Caracterización de microbiota	178
7.6.6.1. Cuantificación de poblaciones bacterianas en materia fecal (qPCR)	178
7.6.6.2. Análisis cualitativo de la microbiota mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)	180
7.6.7. Cuantificación de expresión génica en mLN, PP, secciones de colon e íleon	181
8. Análisis estadístico	182
9. Buffers y soluciones generales	182
Referencias bibliográficas	183
Anexo: Secuenciación del gen de capa S de <i>L. kefir</i>: estudios <i>in silico</i> e <i>in vitro</i>	221

Abreviaturas y anglicismos

ADN: ácido desoxirribonucleico	MID: extracto de mucus de intestino delgado
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	MG: mucina gástrica comercial
ATB: antimicrobiano	mLN: nódulos linfáticos mesentéricos
BAL: bacterias ácido lácticas	PBMC: células mononucleares de sangre periférica
ADNc: ADN copia, generado <i>in vitro</i> a partir de la transcripción reversa de ARN	PCR: <i>polymerase chain reaction</i> - reacción en cadena de la polimerasa
DGGE: electroforesis en gel con gradiente desnaturizante	PP: Placas de Peyer
DO: densidad óptica	qPCR : PCR cuantitativa
DSS: dextran sulfato de sodio	QPS: <i>qualified presumption of safety</i>
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real
GALT: tejido linfoide asociado a la mucosa gastrointestinal	SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamide en presencia de dodecilsulfato sódico
GRAS: <i>generally regarded as safe</i>	TGF β
IFN γ : interferón γ	TGI: tracto gastrointestinal
IgA: inmunoglobulina A	TNF α : factor de necrosis tumoral α
IL: interleuquina	UFC: unidades formadoras de colonia
MC: extracto de mucus de colon	

Introducción general

Introducción general

El tracto gastrointestinal de los mamíferos contiene una gran cantidad de microorganismos, microbiota, con los que se establece una relación simbiótica (Kelly and Mulder 2012; Howarth and Wang 2013). Su presencia permite la fermentación de sustratos que no podrían ser utilizados por el huésped, aporta moléculas esenciales para las células epiteliales, como vitaminas y ácidos orgánicos, previene el crecimiento de bacterias patógenas, y se ha demostrado que juega un rol fundamental en el desarrollo anatómico, fisiológico e inmunológico del hospedador, y que colabora en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Gu et al 2013; Hardy et al 2013; Fung et al 2014).

Desbalances de la microbiota, disbiosis, pueden generarse por diversos motivos, como tratamientos farmacológicos, particularmente tratamientos antibióticos, alteraciones de la inmunidad del huésped o la ingestión accidental de patógenos. La disbiosis tiene consecuencias nocivas para el hospedador y puede contribuir al desarrollo de patologías diversas, como enfermedades inflamatorias intestinales, por lo que el estudio de estrategias que permitan restaurarla o fortalecerla, adquiere cada vez más relevancia (Chow et al 2011; Kelly and Mulder 2012; Howarth and Wang 2013; Kamada et al 2013). Entre las estrategias que se encuentran en desarrollo, es relevante, en el contexto de este trabajo de tesis, destacar el uso de microorganismos probióticos (Dicks and Botes 2010; Roberts et al 2013; Saad et al 2013).

Se define a los alimentos funcionales como aquellos que producen efectos beneficiosos sobre una o más funciones selectivas del organismo además de sus efectos nutritivos intrínsecos. Los alimentos adicionados con microorganismos probióticos, se encuentran en esta categoría. Los probióticos se definen como “microorganismos vivos que, al ser consumidos en cantidades adecuadas, confieren al huésped efectos saludables” (FAO/WHO 2002). Tradicionalmente, las bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* han sido las más utilizadas y estudiadas (Vizoso Pinto 2006; Kim et al 2008; Lebeer et al 2008). Entre los efectos asociados a

su consumo, se incluyen el mejoramiento de la motilidad intestinal, la exclusión competitiva de la adherencia de microorganismos patógenos, la disminución del colesterol sérico, la producción de sustancias antimicrobianas, la modulación de la microbiota intestinal y la modulación de la respuesta inmune a nivel mucosal y sistémico (Dicks and Botes 2010; Rupa and Mine 2012; Howarth and Wang 2013). Los mecanismos a través de los cuales los microorganismos probióticos pueden ejercer sus efectos benéficos, pueden deberse a la interacción directa con las células del huésped o, indirectamente, mediante la secreción de sustancias y la modificación de la composición, diversidad o funciones metabólicas de la microbiota (Collado et al 2008; Lebeer et al 2008; Hemarajata and Versalovic 2013).

Para considerar a un microorganismo como probiótico, éste debe cumplir con requerimientos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO 2002) y el Código Alimentario Argentino (Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca 2011). En este sentido, los microorganismos deben ser evaluados mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, los cuales incluyen:

- criterios asociados con la inocuidad: patogenicidad e infectividad, resistencia a antimicrobianos, capacidad hemolítica, toxicidad;
- criterios tecnológicos: debe tratarse de cepas genéticamente estables, que permanezcan viables durante el procesamiento y almacenamiento, entre otras;
- criterios fisiológicos: como la tolerancia a las condiciones gástricas y a la bilis, la capacidad de adhesión a la superficie de las mucosas;
- criterios asociados a su capacidad probiótica: entre estos podemos mencionar la capacidad de inmunomodulación, la actividad antagónica contra patógenos gastrointestinales, etc.

Los lactobacilos ocupan una gran variedad de nichos incluyendo las mucosas de mamíferos (Sekirov et al 2010; Martín et al 2012) y distintos tipos de alimentos, entre los que se incluyen productos fermentados lácteos y no lácteos (Garrote et al 2001; Bernardeau et al 2008; Dušková

et al 2012). Estas bacterias son comúnmente utilizadas como organismos probióticos en alimentos funcionales, ya que son considerados microorganismos inocuos, principalmente por su uso histórico en la alimentación humana y animal. Por otro lado, se ha demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento o invasión de bacterias patógenas y parásitos (Servin 2004; Humen et al 2005; Hugo et al 2008) y para modular el sistema inmune (Corthésy et al 2007; Wells 2011). En particular, cepas de las especies *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, como LGG, y *L. plantarum*, principalmente la cepa 299V, son las que se han estudiado en mayor cantidad de trabajos científicos. Las mismas se han utilizado en ensayos clínicos realizados tanto en niños como en adultos, sanos o diagnosticados con enfermedades inflamatorias gastrointestinales o alérgicas, y, en la mayor parte de los casos, se ha demostrado el efecto inmunomodulatorio y la mejora de síntomas asociados con las patologías mencionadas (Toh et al 2012; Simrén et al 2013).

El Kefir es un alimento descrito por el Código Alimentario Argentino (art. 553 res. 1276, 19/7/88), que se obtiene por fermentación de leche con gránulos de kefir. Estos gránulos contienen una microbiota compleja constituida por bacterias lácticas, bacterias ácido-acéticas y levaduras, que se desarrollan de manera simbiótica en una matriz de polisacárido y proteína. El kefir se consume desde hace miles de años sin que se hayan registrado efectos adversos y se ha administrado en forma empírica para el tratamiento de enfermedades de diferente naturaleza (Farnworth 2005; Machado et al 2013). Distintos investigadores han demostrado que el Kefir posee propiedades probióticas dado que, por ejemplo, inhibe el crecimiento de patógenos intestinales (Garrote et al 2000; Kakisu et al 2007; Londero et al 2011) y ejerce efectos de modulación sobre la respuesta inmune sistémica y en la mucosa intestinal (Thoreux and Schmucker 2001; Vinderola et al 2005; Vinderola et al 2006; Vinderola et al 2007; Franco et al 2013). Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el aislamiento, caracterización y estudio de las propiedades probióticas de los microorganismos presentes en el Kefir resulta de particular interés. Entre las especies del género *Lactobacillus* halladas en productos fermentados con gránulos

de kefir, *Lactobacillus kefir* es una de mayoritarias (Garrote et al 2005; Chen et al 2008; Magalhães et al 2010; Kesmen and Kacmaz 2011).

Estudios realizados utilizando cepas aisladas en nuestro laboratorio (Garrote et al 2001), han demostrado la potencialidad probiótica de *Lactobacillus kefir* (Garrote 2000; Golowczyc 2008). Todas las cepas adhieren a células de la línea epitelial intestinal Caco-2, pero sólo algunas de ellas son capaces de co-agregar con *Escherichia coli* (Golowczyc 2008). Sus productos de secreción inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (Londero 2012), algunas de las cepas disminuyen la capacidad de *Shigella flexneri* de invadir células Hep-2 (Kakisu et al 2013b) y los efectos citotóxicos de las toxinas de *E. coli* enterohemorrágica sobre células Vero (Kakisu et al 2013a). Además, se han realizado ensayos de persistencia en tracto gastrointestinal en ratones BALB/c, en los que se demostró que estas bacterias permanecen viables en materia fecal a partir del segundo día de iniciado el tratamiento y hasta 5 días posteriores a su finalización en una concentración superior a 10^7 UFC/g (Golowczyc et al 2004).

Desde el punto de vista tecnológico, las cepas de *L. kefir* son capaces de permanecer viables luego de ser sometidas a procesos de conservación, como liofilización y secado en spray, conservando sus propiedades probióticas (Golowczyc et al 2010; Golowczyc et al 2011; Bolla et al 2011).

Por otro lado, se ha demostrado que estos lactobacilos heterofermentativos, poseen una superficie hidrofóbica, recubierta con proteínas de capa S (Garrote et al 2004), una estructura cristalina macromolecular bidimensional formada por subunidades glicoproteicas cuya presencia se ha descrito en numerosas especies de bacterias y *Archaea* (Sára and Sleytr 2000; Mobili et al 2009). Si bien las funciones más conocidas de la capa S se han relacionado con el mantenimiento de la forma celular y su participación en la adhesión microbiana a diferentes superficies (Vélez et al 2007; Sengupta et al 2013), se le han atribuido otras funciones relevantes como la interacción con otros microorganismos (Golowczyc et al 2009; Beganović et al 2011). Además, se han descrito propiedades muy interesantes desde el punto de vista funcional, como protección

contra patógenos (Johnson-Henry et al 2007; Golowczyc et al 2007) y modulación de la expresión de mediadores por células inmunes (Konstantinov et al 2008; Sekot et al 2011).

Teniendo en cuenta la potencialidad probiótica de *Lactobacillus kefir*, el **objetivo general** de este trabajo de tesis doctoral fue estudiar las propiedades probióticas de cepas de *L. kefir* mediante ensayos *in vitro*, y seleccionar, a partir de los resultados obtenidos, una cepa adecuada para realizar estudios *in vivo* en ratones sanos y utilizando un modelo murino de inflamación intestinal.

Capítulo 1: Estudios *in vitro*

Introducción

En general, los lactobacilos son considerados microorganismos GRAS (*generally regarded as safe*) por la FDA (Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos de América), y la mayor parte de ellos, como *Lactobacillus kefir*, se encuentran incluidos en la lista del QPS (*qualified presumption of safety*) de la Unión Europea (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) 2012). Esto se debe a dos motivos principales, el primero, es su uso histórico y seguro en productos fermentados y, el segundo, es que forman parte de la microbiota del tracto gastrointestinal humano. Sin embargo, ciertas especies de lactobacilos han sido identificadas en casos de sepsis, endocarditis o bacteriemias, mayormente en pacientes con enfermedades crónicas severas (Land et al 2005; Fradiani et al 2010; Suárez-García et al 2012; Gouriet et al 2012). Por este motivo, se exige la evaluación de parámetros asociados a seguridad tanto *in vitro* como *in vivo*. En particular, entre los ensayos que pueden realizarse *in vitro*, el Código Alimentario Argentino (CAA) establece, en el artículo 1389 (Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca 2011), la necesidad de evaluar la presencia de resistencias transferibles a antimicrobianos y la capacidad hemolítica de cepas probióticas.

Por otro lado, los microorganismos con potencialidad probiótica, deben poseer características fisiológicas que les permitan resistir las condiciones del ambiente gastrointestinal para llegar viables al intestino y colonizarlo, al menos, en forma transitoria (Tuomola et al 2001). En este sentido, el CAA establece la necesidad de realizar pruebas de resistencia a las condiciones gástricas y a la presencia de bilis. Finalmente, es necesaria la evaluación de las propiedades probióticas o funcionales, que son aquellas que podrían redundar en un efecto beneficioso para el huésped.

En este capítulo, se describirán los resultados de los ensayos *in vitro* realizados con el fin de dar respuesta a los requerimientos mencionados.

Objetivos

Evaluar parámetros asociados a inocuidad y propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus kefir* mediante ensayos *in vitro*.

Seleccionar una cepa de *Lactobacillus kefir* para realizar ensayos *in vivo*.

Objetivos particulares

- Evaluar la sensibilidad a antimicrobianos y la capacidad hemolítica de cepas de *Lactobacillus kefir*.
- Estudiar la resistencia al pasaje a través del tracto gastrointestinal y la capacidad de adhesión a mucus gastrointestinal y células epiteliales intestinales en cultivo de cepas de *Lactobacillus kefir*.
- Evaluar la capacidad de inhibir del crecimiento de patógenos y de antagonizar el efecto de sus productos de secreción sobre células.
- Estudiar las propiedades inmunomodulatorias sobre células en cultivo.

Resultados y Discusión

Los aislamientos de *Lactobacillus kefir* utilizados en este trabajo de tesis doctoral, fueron obtenidos a partir de gránulos de kefir y caracterizados previamente teniendo en cuenta la fermentación de azúcares, crecimiento a 15 y 45 °C, la producción de gas a partir de glucosa y su perfil de proteínas de célula entera (Garrote et al 2001), espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (Bosch et al 2006) y análisis de perfiles de enzimas de restricción de amplicones del ADNr 16S y *Random Amplified Polymorphic* ADN (RAPD-PCR) (Delfederico et al 2005). Esta última técnica, permitió la diferenciación de las cepas de *L. kefir*.

1. Parámetros asociados a la seguridad de las cepas en estudio

1.1. Sensibilidad a antimicrobianos

Se evaluó la sensibilidad de distintas cepas de *L. kefir* a ocho antimicrobianos (ATB) de importancia en la clínica humana y veterinaria. La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó utilizando el protocolo descrito en la norma ISO 10932 (2010). El protocolo detallado se encuentra descrito en los Materiales y Métodos, sección 6.3.1. La especie *Lactobacillus kefir* posee un metabolismo heterofermentativo obligado, por lo que se consideraron los puntos de corte establecidos por EFSA (2012) para este tipo de microorganismos.

En la tabla 1.1 se muestran los resultados obtenidos. La mayoría (6 de 8) de las cepas de *L. kefir* presentaron valores de CIM por debajo de los puntos de corte recomendados para lactobacilos heterofermentativos (EFSA, 2012). Sin embargo, las cepas CIDCA 8321 y 8345 fueron resistentes a cloranfenicol.

Tabla 1.1. Sensibilidad a antibióticos: concentración inhibitoria mínima (CIM) evaluada según la norma ISO 10932:2010^a

ATB	Concentración inhibitoria mínima (mg/L)								
	Punto de corte ^b	CIDCA 8321	CIDCA 8325	CIDCA 8345	CIDCA 8348	CIDCA 83115	CIDCA 83111	CIDCA 83113	JCM 5818
Ampicilina	2	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032
Clindamicina	1	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032
Cloranfenicol	4	8	4	16	2	2	1	1	2
Eritromicina	1	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125
Gentamicina	16	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Kanamicina	32	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
Estreptomina	64	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Tetraciclina	8	<0,125	<0,125	<0,125	4	2	8	<0,125	<0,125

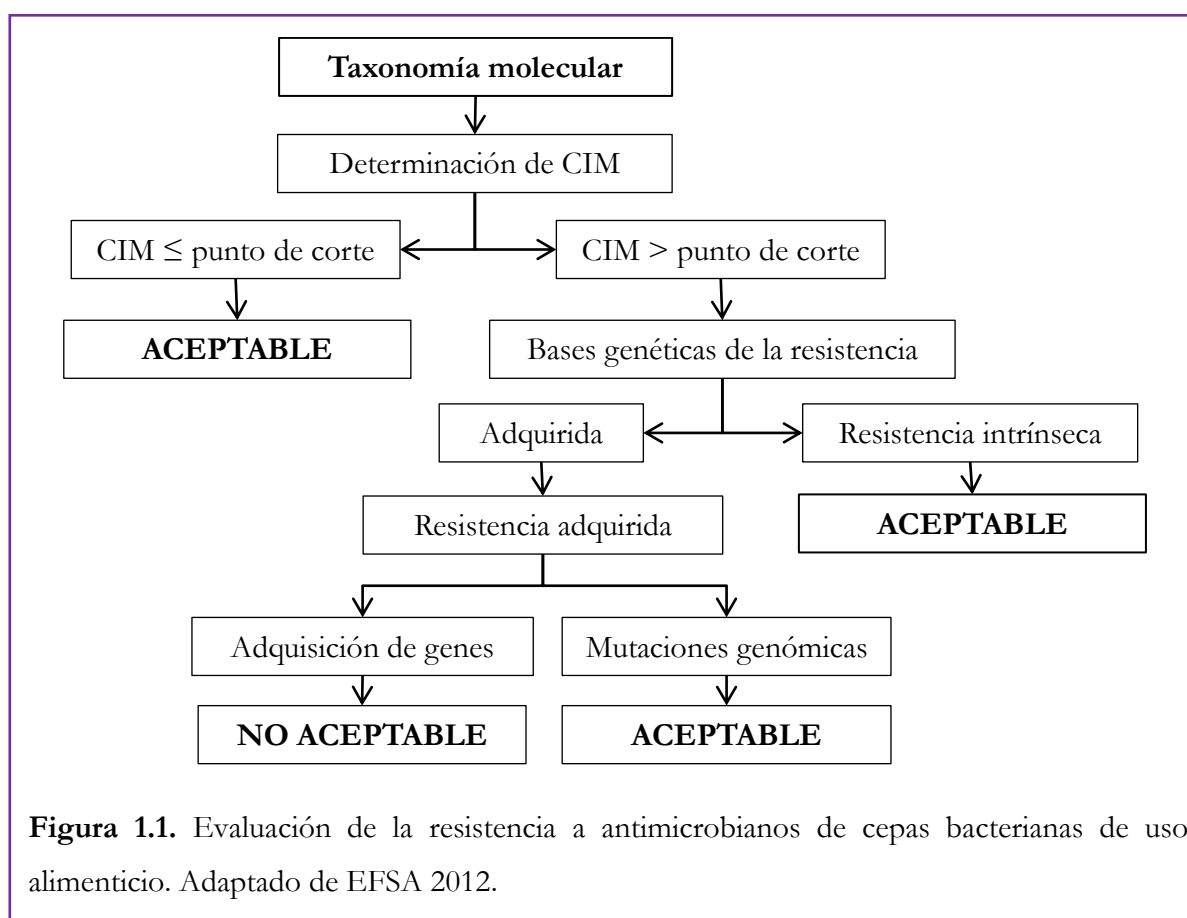
^a MyM, sección 6.4.1, (International Organization for Standardization 2010)

^b EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) 2012

En el caso de *L. kefir*, la sensibilidad a ATB y la presencia de genes de resistencia, fue estudiada únicamente en tres publicaciones. Nawaz y colaboradores (2011) trabajaron con microorganismos aislados de productos fermentados, entre los que contaron con un único aislamiento de *L. kefir*, obtenido a partir de un yogurt comercial. Este aislado resultó ser sensible a todos los ATB estudiados, excepto kanamicina, vancomicina y tetraciclina. Más aún, encontraron que la cepa era portadora de uno de los genes de resistencia a tetraciclina descritos en lactobacilos (Gueimonde et al 2013). En el mismo sentido, Chang y colaboradores (2011), estudiaron la presencia de genes de resistencia a tetraciclina en BAL aisladas de intestino de cerdo. Observaron que los nueve aislamientos de *L. kefir* con los que trabajaron eran resistentes a este antimicrobiano (CIM > 256 µg/mL) y portadores de al menos un gen de resistencia. Los altos valores de CIM reportados en esta publicación, podrían asociarse con el origen de las cepas. La tetraciclina es un antimicrobiano frecuentemente utilizado en la producción porcina por lo que la presencia de genes de resistencia a tetraciclina en el 100% de las cepas estudiadas, podría asociarse a un proceso de selección inducido por la administración reiterada de este ATB. Finalmente, Zheng y col. (2013) realizaron estudios utilizando una cepa de *L. kefir* aislada de gránulos de kefir. Observaron que este aislado era sensible a gentamicina, eritromicina, cloranfenicol y tetraciclina, pero resistente a vancomicina aunque resultó negativa para los genes de

resistencia que evaluaron. Estos resultados no son llamativos, ya que la resistencia a vancomicina es una de las resistencias intrínsecas mejor caracterizadas en el género *Lactobacillus* (Danielsen and Wind 2003; Gueimonde et al 2013).

El CAA establece, en su artículo 1389, que las cepas no deberán ser portadoras de genes de resistencia a antibióticos transferibles, sin indicar la metodología para determinarlo. Por este motivo, se tomó como referencia lo recomendado por EFSA (2012). El esquema de la figura 1.1, resume el criterio seguido.



Dada la alta sensibilidad a antimicrobianos observada en los aislados de *L. kefir* (tabla 1.1), podemos considerar que no poseen genes de resistencia. Sin embargo, si se deseara utilizar las cepas CIDCA 8321 o 8345, sería necesario estudiar el mecanismo responsable de la resistencia observada a cloranfenicol. Se ha descrito que la resistencia adquirida a este antimicrobiano puede deberse a la

presencia del gen *cat* (*chloramphenicol acetyltransferase*), descrito con localización plásmidica, en especies de *Lactobacillus* (Gueimonde et al 2013). La presencia de este gen se estudió mediante PCR (MyM, secciones 5.2 y 6.4.2) y se determinó que ninguna de las cepas lo posee. Más aún, se ha comprobado que las cepas de *L. kefir* bajo estudio no poseen plásmidos (MyM, sección 5.3). Los mismos resultados se obtuvieron para otras cepas de la misma especie, en estudios realizados por Mainville y col (2006). Por otro lado, Hummel y col. (2007) propusieron que en los casos de resistencia a cloranfenicol en ausencia del gen *cat*, la acetilación podría no ser el mecanismo responsable de la resistencia observada. En ese sentido, los bajos valores de CIM se han asociado con la presencia de bombas que permitirían el eflujo de antimicrobianos, y otras moléculas, desde el citoplasma bacteriano al exterior (Shazali et al 2014; Casado Muñoz et al 2014).

1.2. Capacidad hemolítica

La actividad hemolítica es un factor de virulencia muy frecuentemente encontrado en microorganismos patógenos. En el artículo 1389 del CAA, se establece que una cepa probiótica no debe poseer fenotipo hemolítico. Es por esto, que se continuaron los estudios de inocuidad *in vitro*, evaluando la capacidad hemolítica de las distintas cepas de *L. kefir* (MyM, sección 6.3). Se trabajó con el medio de cultivo LAPTg debido a que *L. kefir* no es capaz de crecer en agar Columbia, y el MRS, medio de elección para lactobacilos, posee detergentes que interfieren en los ensayos.

Son varios los autores que han estudiado la capacidad hemolítica de microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus*. En general, este género no presenta actividad hemolítica (Mourad and Nour-Eddine 2006; Vesterlund et al 2007; Thirabunyanon et al 2009; Kaktcham et al 2012); sin embargo, en los casos en que se ha encontrado, se ha tratado de cepas α - hemolíticas y el porcentaje de aislados positivos ha sido muy bajo (Maragkoudakis et al 2006; Ruiz-Moyano et al 2009; Lee et al 2009; Adimpong et al 2012). Únicamente Baumgartner y col. (1998), quienes trabajaron con aislados de *L. rhamnosus* de distintos orígenes, encontraron que los 53 microorganismos bajo estudio

presentaban este factor de virulencia. En este trabajo de tesis, ninguna de las cepas de *L. kefir* estudiadas presentó fenotipo hemolítico.

1.3. Producción de citotoxinas

Es frecuente estudiar la citotoxicidad de patógenos sobre líneas celulares (Minnaard et al 2001; Trejo et al 2010; Kakisu et al 2013a). Si bien el CAA establece que la toxicidad aguda, de cepas probióticas, debe evaluarse *in vivo*, es interesante destacar que en el contexto de ensayos realizados sobre células en cultivo, tanto como parte de este trabajo de tesis como de otros realizados previamente en nuestro laboratorio, distintas líneas celulares se incubaron con cepas de *L. kefir*. En ningún caso se observaron efectos sobre la viabilidad celular o alteraciones de su estructura. Se han ensayado las siguientes líneas celulares: células Vero (Bolla et al 2013; Kakisu et al 2013a), HepG-2 (Gerbino et al 2014), Caco-2, Caco-2 ccl20:luc y Caco-TC7 (Golowczyc et al. 2007; Romanin et al. 2010, este trabajo) y Hep-2 (Kakisu et al 2013b). Por otro lado, los mismos resultados se obtuvieron, en este trabajo de tesis, utilizando glóbulos rojos humanos y células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Hasta este punto, hemos comprobado que ninguna de las cepas de *L. kefir* presentó fenotipo hemolítico ni toxicidad sobre células eucariotas. Por otro lado, se observó una alta sensibilidad a antimicrobianos y ausencia de genes de resistencia a cloranfenicol en las cepas resistentes. Dado que, desde este punto de vista, las cepas pueden considerarse aptas para ser utilizadas como microorganismos probióticos, se continuó estudiándolas *in vitro* mediante la evaluación de sus características fisiológicas y, posteriormente, sus propiedades probióticas o funcionales.

2. Características fisiológicas

Son muchas las características que pueden evaluarse para seleccionar un microorganismo potencialmente probiótico. En este trabajo de tesis, se evaluó la aptitud de las cepas de *L. kefir* para resistir a las condiciones gastrointestinales y adherirse a componentes del epitelio gastrointestinal intestinal. En todos los ensayos, se trabajó con siete cepas de *Lactobacillus kefir* (MyM, sección 1.1), cuatro de ellas con capacidad de autoagregación (*L. kefir* CIDCA 8321, CIDCA 8345, CIDCA 8348, y CIDCA 83115) y tres no autoagregantes (*L. kefir* CIDCA 83111, CIDCA 83113 JCM 5818).

2.1. Capacidad de adhesión a mucus gastrointestinal

Un criterio de selección importante para microorganismos probióticos, es la adhesión a la mucosa intestinal, ya que aseguraría la colonización de las superficies mucosas, al menos, en forma transitoria. De esta forma, el microorganismo no sólo podría interactuar con las células epiteliales y del sistema inmune de mucosas, sino que también sería capaz de interferir en la adhesión de patógenos a estas superficies (Muñoz-Provencio et al 2009).

Son varios los modelos *in vitro* que se han propuesto para el estudio de estas interacciones. Por un lado, se utilizan sistemas de interacción con líneas celulares epiteliales (Caco-2, HT-29 y HT-29 MTX) y, por otro, sistemas de unión a mucus o mucinas (Deepika and Charalampopoulos 2010). Golowcyc y col. (2007) demostraron que *L. kefir* es capaz de adherirse a la línea celular Caco-2/TC-7. En esta sección se mostrarán los resultados obtenidos del estudio de la interacción de *L. kefir* con mucus de distintas porciones del tracto gastrointestinal porcino.

El mucus es una capa gelatinosa que se encuentra sobre la superficie apical de las células epiteliales y que funciona como la primera barrera física entre el lumen y el epitelio. En cada sección del tracto gastrointestinal, tiene una composición bien definida (Andrianifahanana et al 2006; McGuckin et al 2011). Es por esto que se evaluó la capacidad de adhesión a mucus de origen porcino, de distintas regiones: mucina gástrica (MG), extracto de mucus de intestino delgado (MID) y extracto

de mucus de colon (MC). Para los ensayos que se describen a continuación, se utilizó mucina gástrica comercial tipo II y los extractos fueron obtenidos según la técnica descrita en la sección 6.5.1 de materiales y métodos, a partir de tejidos de animales sanos. En la figura 1.2 se muestra la heterogeneidad proteica de los extractos mencionados.

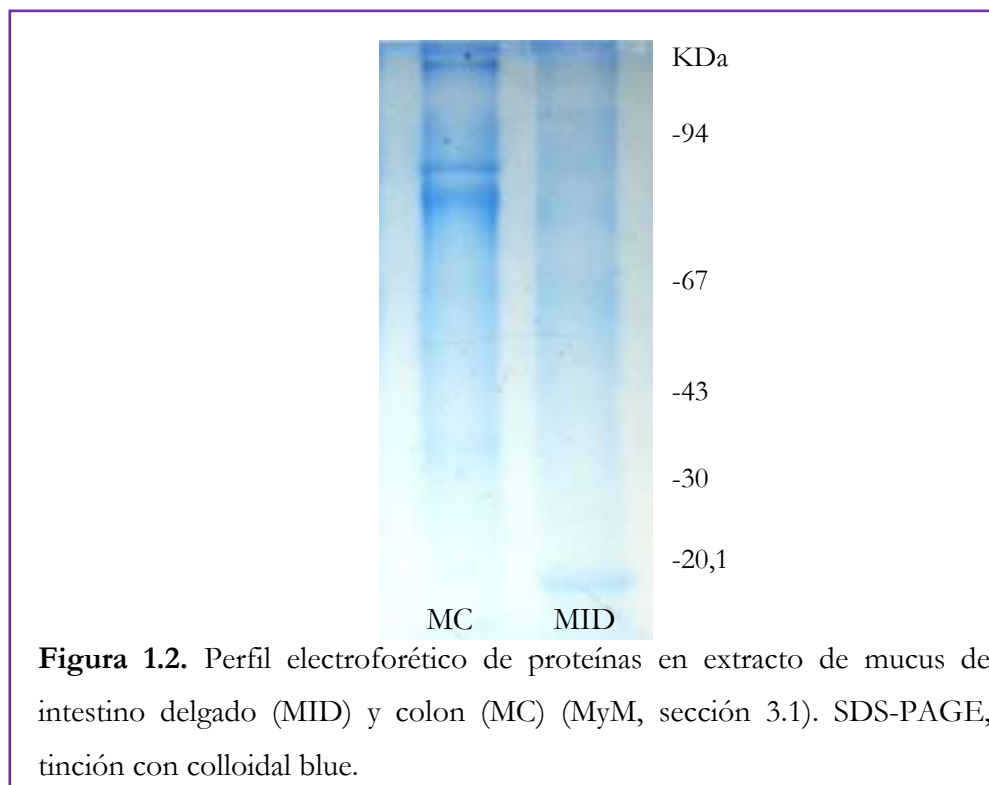


Figura 1.2. Perfil electroforético de proteínas en extracto de mucus de intestino delgado (MID) y colon (MC) (MyM, sección 3.1). SDS-PAGE, tinción con colloidal blue.

Se realizaron ensayos de adhesión cualitativos mediante microscopía de fluorescencia (MyM, sección 6.6.1.3), en los que las bacterias fueron incubadas previamente con CFDA-SE (MyM, sección 1.5). Esta molécula no polar atraviesa pasivamente la membrana celular y es convertida a su forma aniónica (CFSE) por las esterasas intracelulares de bacterias viables (Wang et al 2005), a las que confiere fluorescencia verde. Si bien todas las cepas estudiadas mostraron cierto grado de adhesión al soporte de vidrio (figura 1.3.A), en ningún caso se formaron agregados bacterianos. Luego de la preincubación del soporte con MG, MID y MC, se observó que las bacterias, incluso las cepas no auto-agregantes, se adherían formando cúmulos en las tres matrices (figura 1.3.B, C, D).

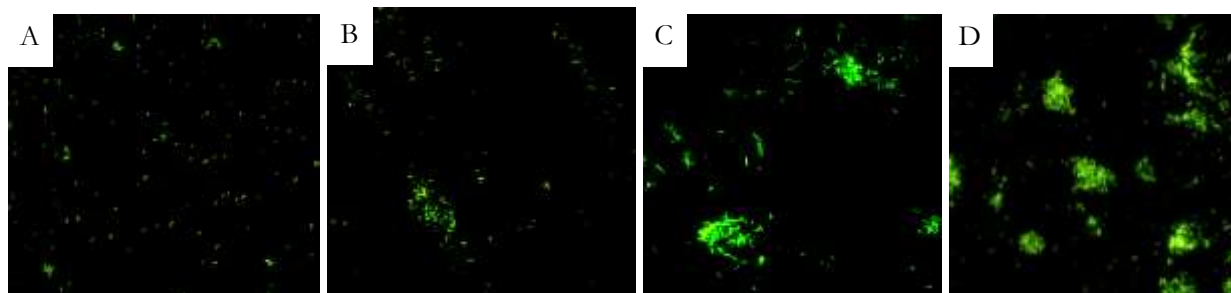


Figura 1.3. Adhesión de *Lactobacillus kefir* JCM 5818 a mucus gastrointestinal porcino (MyM, sección 6.6.1.3). Las bacterias se incubaron con CFSE (MyM, sección 1.5) y posteriormente sobre la matriz de interés. En las microfotografías se observan las bacterias con fluorescencia verde. Bacterias adheridas a (A) Soporte de vidrio, (B) soporte de vidrio incubado previamente con MG, (C) soporte de vidrio incubado previamente con MID y (D) soporte de vidrio incubado con MG.

Para caracterizar el fenómeno de adhesión de las cepas de *L. kefir* a los distintos sustratos, se realizaron ensayos cuantitativos (MyM, sección 6.6.1). En una primera etapa se seleccionaron tres cepas (CIDCA 8348, 83115 y JCM 5818) para determinar la concentración de saturación del sistema. En la figura 1.4 se muestran los resultados obtenidos. En los tres casos, la linealidad se perdió a partir del agregado de 10^{10} UFC/cm² (correspondientes a $1,1 \times 10^{11}$ UFC/mL).

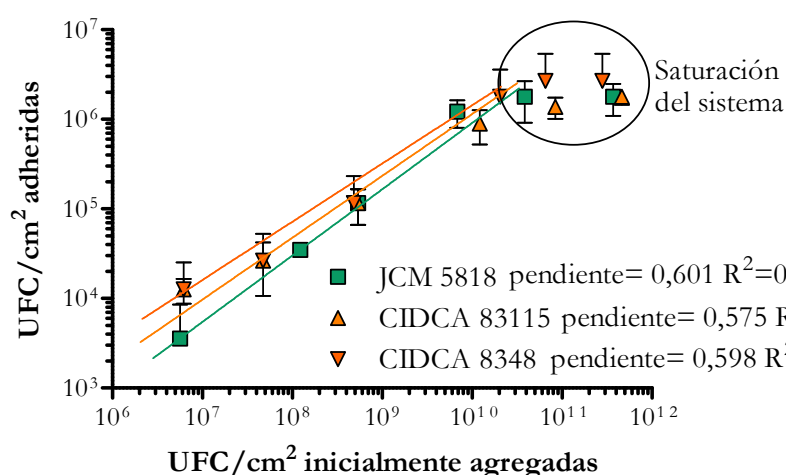


Figura 1.4. Relación entre la concentración inicial de bacterias agregadas y su adhesión a MG (MyM, sección 6.6.1). Estos ensayos permitieron establecer la concentración de saturación del sistema. En el gráfico se muestran las pendientes obtenidas para las cepas estudiadas, parámetro que indica la afinidad de cada una de ellas por la matriz.

A partir de estos resultados, se estableció la concentración de 10^8 UFC/cm² para la realización de los ensayos. Otro dato interesante que se obtuvo de estos experimentos, fue que la pendiente de las curvas obtenidas en la región lineal, que puede asociarse con la afinidad de las bacterias por la matriz, no presentó diferencias significativas entre las distintas las cepas estudiadas.

En la figura 1.5 se muestran los resultados obtenidos al estudiar la adhesión de 7 cepas de *L. kefir* a MG, MID y MC con una inoculación inicial de 10^8 UFC/cm². No se observaron diferencias significativas en la adhesión de las distintas cepas a una misma matriz, lo que se correlaciona con lo observado al analizar las pendientes de las curvas graficadas en la figura 1.4. Sin embargo, al comparar la capacidad de adhesión a las distintas matrices, se observó una tendencia a una adhesión menor a MC que a MID y MG.

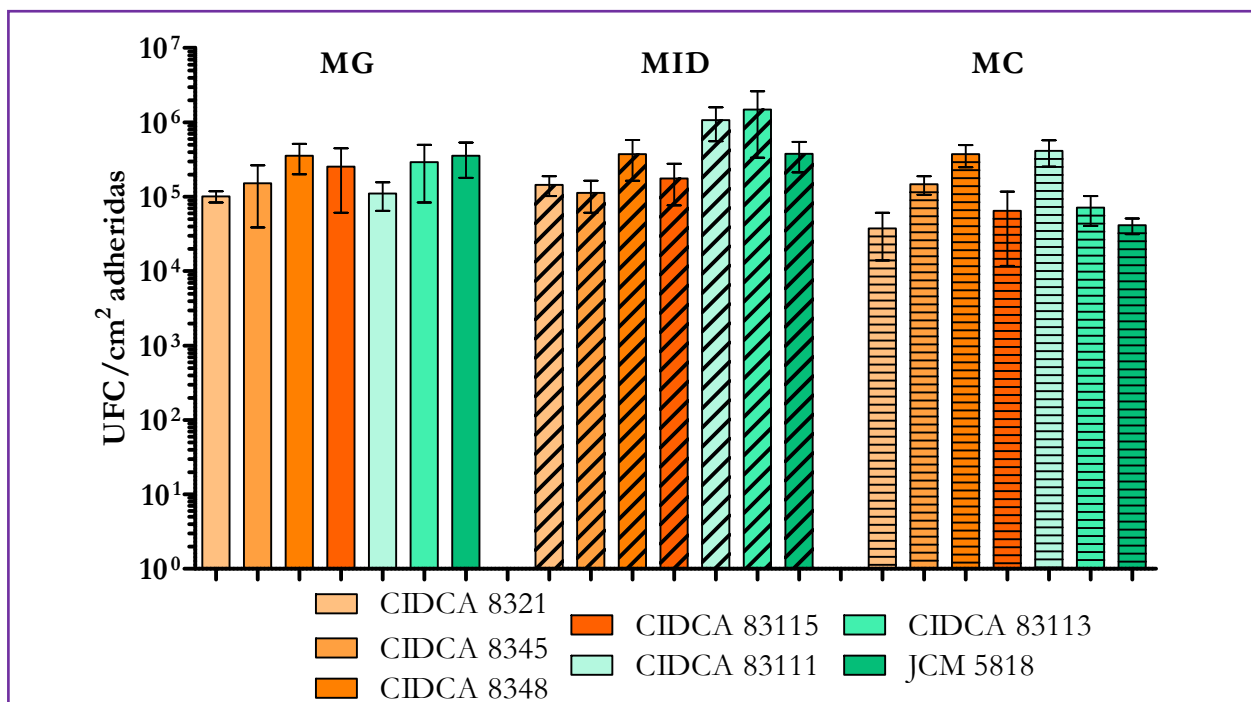


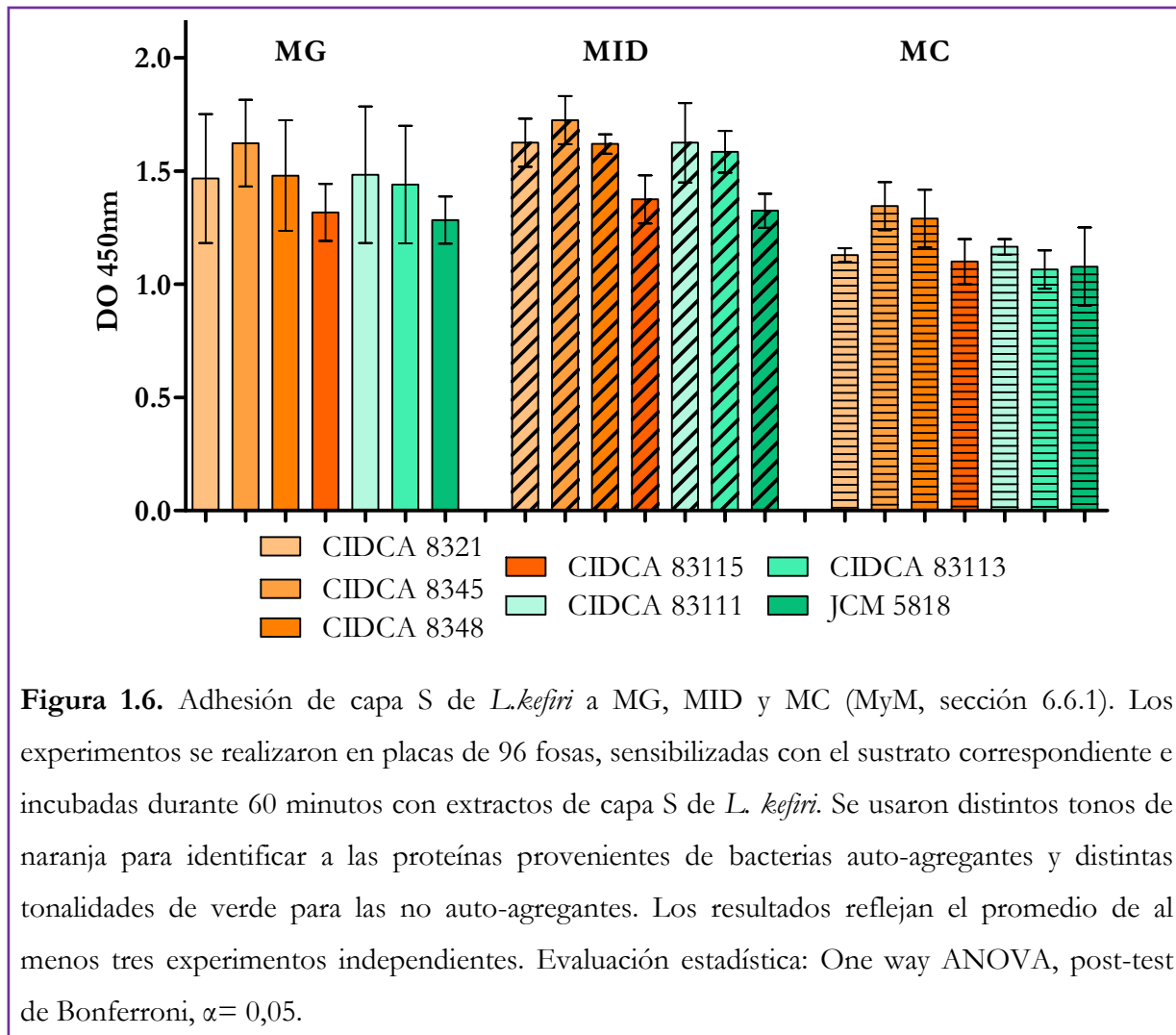
Figura 1.5. Adhesión de *L. kefir* a MG, MID y MC (MyM, sección 6.6.1). Los experimentos se realizaron en placas de 96 fosas, sensibilizadas con el sustrato correspondiente e incubadas durante 60 minutos con 10^8 CFU/cm² de *L. kefir*. Se cuantificó mediante recuento en placa. Los resultados reflejan el promedio de al menos tres experimentos independientes. En todos los casos, el pegado de *L. kefir* al soporte fue sustraído del recuento obtenido. Evaluación estadística: One way ANOVA, post-test de Bonferroni, $\alpha = 0,05$.

Al analizar los porcentajes de adhesión para *Lactobacillus* disponibles en la bibliografía, no se encontraron estudios realizados con cepas de *L. kefir*. La evaluación de los resultados obtenidos para otras especies, demuestra que la capacidad de adhesión a mucus es cepa dependiente (Ouwehand et al 2000; Lee et al 2000; Tallon et al 2007; Mackenzie et al 2010). Las cepas de *L. kefir* presentaron un porcentaje de adhesión variable, entre 0,08 y 5,0 %, un valor relativamente bajo si se lo compara con los descritos para otros lactobacilos como *L. rhamnosus* GG (Ouwehand et al. 1999), *L. johnsonii* LA1 (Ouwehand et al. 2000) o *L. plantarum* 299v (Tallon et al. 2007). Sin embargo, otros autores han reportado una gran variabilidad en la capacidad de adhesión a mucus de distintos microorganismos probióticos (Tuomola et al. 2000; MacKenzie et al. 2010).

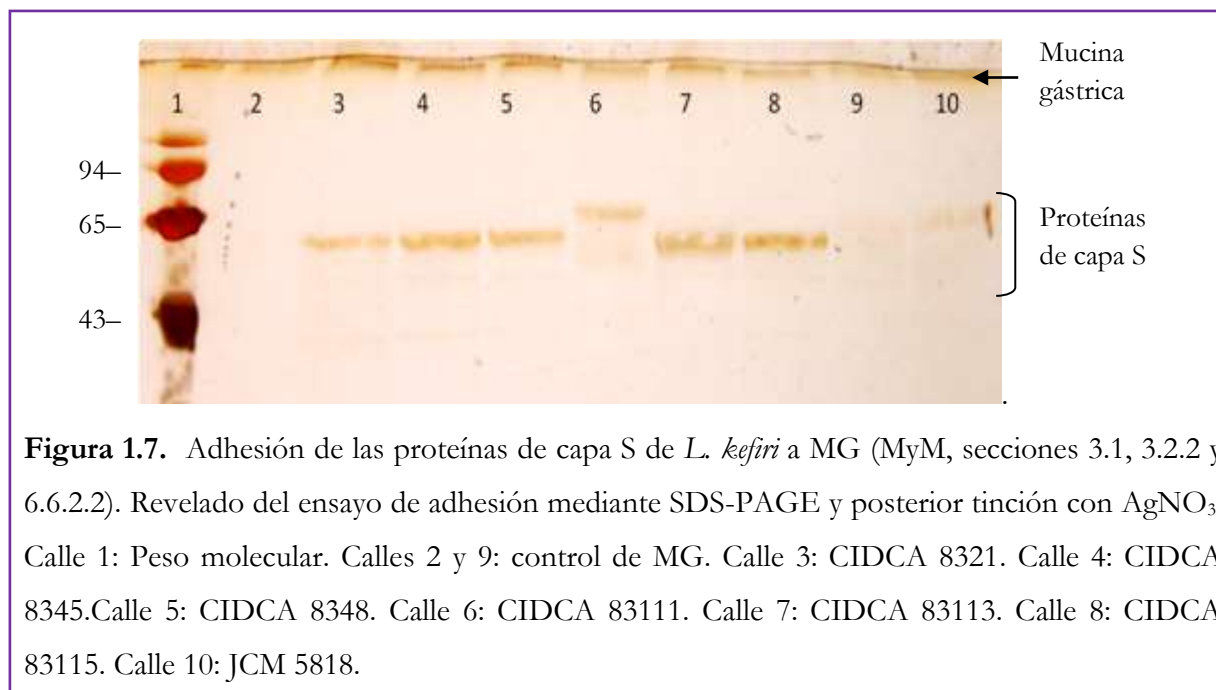
Previamente se ha reportado la presencia de proteínas de capa S glicosiladas sobre la superficie de *Lactobacillus kefir* (Garrote et al 2004; Mobili et al 2009b). Esta clase de proteínas forman la capa más externa de los microorganismos que las poseen (Sleytr et al 2007), por lo que podrían estar involucradas en los mecanismos de adhesión de las bacterias al mucus gastrointestinal. Varios autores han demostrado que ciertas proteínas de superficie de lactobacilos están involucradas en los procesos de adhesión de los microorganismos a líneas celulares epiteliales, mucinas del tracto gastrointestinal y proteínas de matriz extracelular (Rojas et al 2002; Granato et al 2004; Buck et al 2005; Wang et al 2008; Van Tassel and Miller 2011), así como también se ha reportado que ciertos arreglos glicosilados y el ácido lipoteicoico están involucrados en las mencionadas interacciones (Mukai et al 1992; Henriksson and Conway 1996; Pretzer et al 2005). En este contexto se decidió evaluar el rol de las proteínas de capa S en la adhesión a mucus. En primer lugar, se analizó la capacidad de adhesión de las proteínas de capa S, y posteriormente, se evaluó la adhesión de bacterias sometidas a tratamientos que eliminan las proteínas superficiales.

Para la obtención de las proteínas de capa S, se utilizó el agente caotrópico LiCl (MyM, sección 6.1) y los extractos proteicos obtenidos se dializaron contra PBS para la realización de los ensayos de adhesión. Finalmente, se cuantificó la capa S adherida al mucus gastrointestinal revelando con un

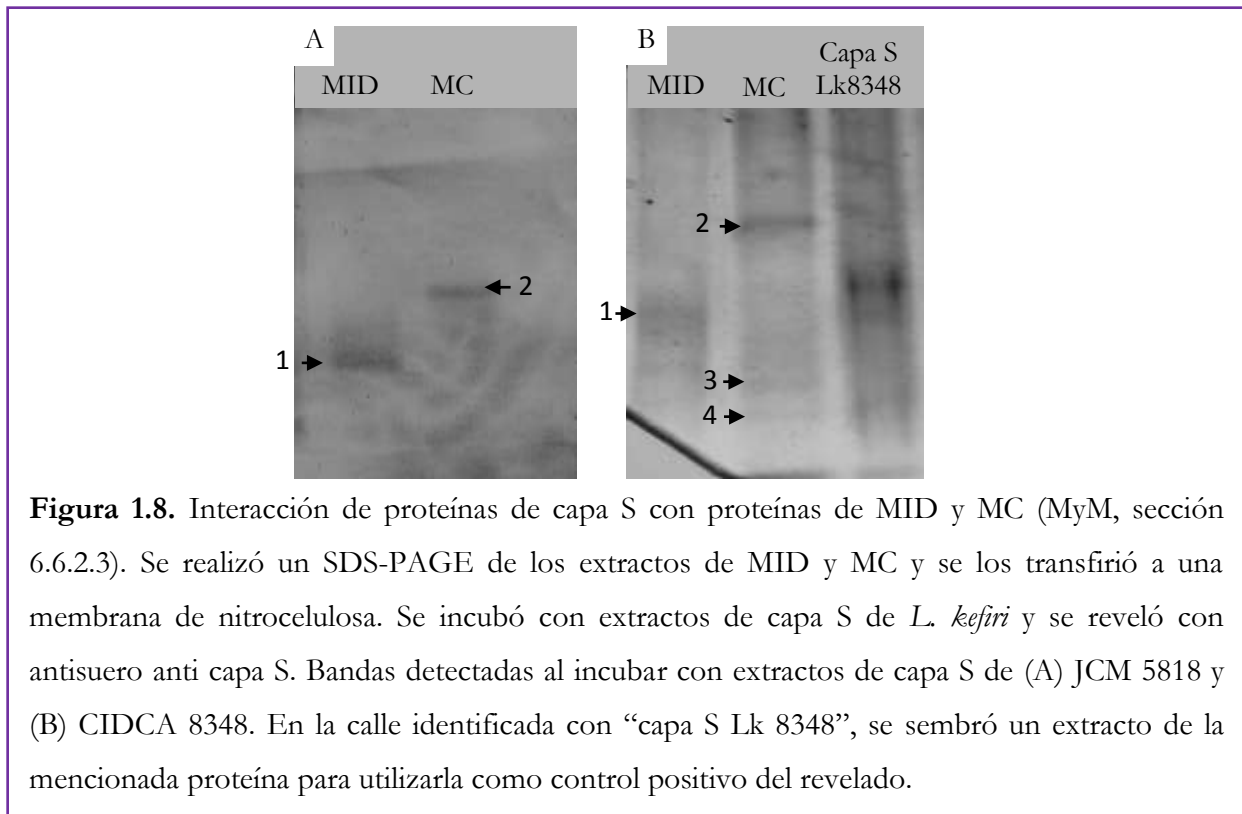
antisuero específico contra capa S (MyM, sección 6.6.2.1). Con estos ensayos se demostró que las proteínas de todas las cepas fueron capaces de adherirse a MG, MID y MC (fig. 1.6).



Se complementaron estos resultados, en el caso de la interacción con MG, mediante la visualización de las proteínas por SDS-PAGE (MyM, secciones 3.1 y 6.6.2.2). La figura 1.7 muestra un gel de poliacrilamid, revelado mediante tinción con nitrato de plata (MyM, sección 3.2.2), en el que se visualizan las bandas correspondientes a las proteínas de capa S (parte central) y MG, mucina tipo II (parte superior), luego de la realización del ensayo de adhesión (MyM, sección 6.6.2.2).



Dado que estos extractos MID y MC son mucho más complejos que MG (figura 1.2), se utilizó una metodología diferente para evaluar la afinidad de las proteínas de capa S por las proteínas de los extractos de mucus. Se realizó un SDS-PAGE de MID y MC, luego las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se incubó con proteínas de capa S extraídas de distintas cepas y se reveló con antisuero anti capa S de *L. kefir* (MyM, sección 6.6.2.3). Dado que el antisuero utilizado no detecta a las proteínas del extracto de mucus, sólo se visualizaron las bandas de proteínas de MID y MC a las cuales se adhirieron las proteínas de capa S. En la figura 1.8 se muestran sólo los resultados obtenidos para una cepa auto-agregante (*L. kefir* CIDCA 8348) y una no agregante (*L. kefir* JCM 5818). Es importante destacar que las bandas 1 y 2 se visualizaron con los extractos de todas las cepas bajo estudio. Por otro lado, en general, se detectó un número mayor de bandas luego de la incubación con extractos de capa S de cepas con capacidad de auto-agregación. Esto podría deberse a una afinidad diferencial o, simplemente, a una mayor capacidad de auto-ensamblado de las proteínas de capa S provenientes de cepas auto-agregantes, lo que permitiría la visualización de bandas con menor afinidad.



Dado que, hasta este punto, se observaron comportamientos similares entre cepas, se seleccionaron dos cepas auto-agregantes (*L. kefir* CIDCA 8348 y 83115) y una cepa no agregante (JCM 5818) para profundizar los estudios.

Se continuó analizando el rol de las proteínas de capa S en la interacción con mucus, mediante la evaluación de la adhesión bacteriana a MG, MID y MC, luego de la remoción de las proteínas superficiales con distintos tratamientos: químicos (MyM, sección 6.1.1) y enzimáticos (MyM, sección 6.1.2). La extracción de las proteínas de capa S utilizando LiCl o NaOH, redujo significativamente la adhesión de *L. kefir* a todas las matrices (figura 1.9). Sin embargo, en ninguna de las cepas se registraron diferencias significativas en la adhesión bacteriana antes y después del tratamiento con proteinasa K (figura 1.9).

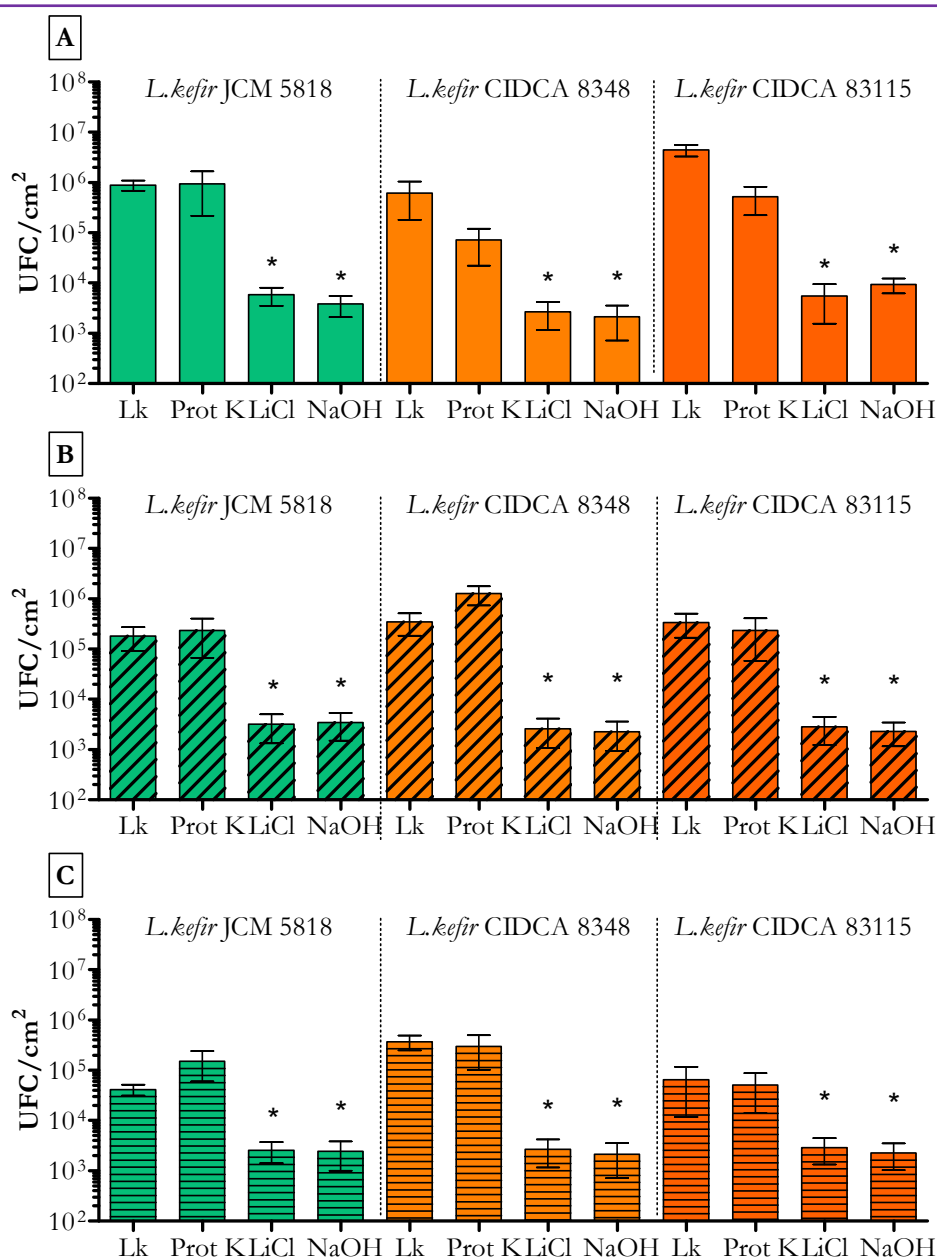


Figura 1.9. Efecto de distintos tratamientos sobre la adhesión de *L. kefir* a mucus gastrointestinal (MyM, sección 6.6.1). Se realizaron los ensayos de adhesión a (A) MG, (B) MID y (C) MC de las cepas de *L. kefir* CIDCA 8348, CIDCA 83115 y JCM 5818 después de tratarlas con 0,2 mg/mL de proteinasa K 30 min a 37 ° C (Prot), 5 M LiCl o NaOH 0,01 M durante 30 min a 4 °C. Los resultados reflejan el promedio de al menos tres experimentos independientes. Evaluación estadística: One way ANOVA, post-test de Bonferroni, $\alpha = 0,05$.

Se evaluó el efecto de los tratamientos realizados sobre la hidrofobicidad superficial (MyM, sección 6.2) y el perfil SDS-PAGE de los extractos de proteínas de superficie (MyM, sección 3.1). Los tratamientos realizados provocaron una drástica disminución de la hidrofobicidad de todas las cepas

(tabla 1.2), si bien el efecto sobre las proteínas superficiales fue diferente. En la figura 1.10 se puede observar que los tratamientos químicos no fueron capaces de eliminar completamente las proteínas de capa S de la superficie, mientras que el tratamiento enzimático sí lo hizo.

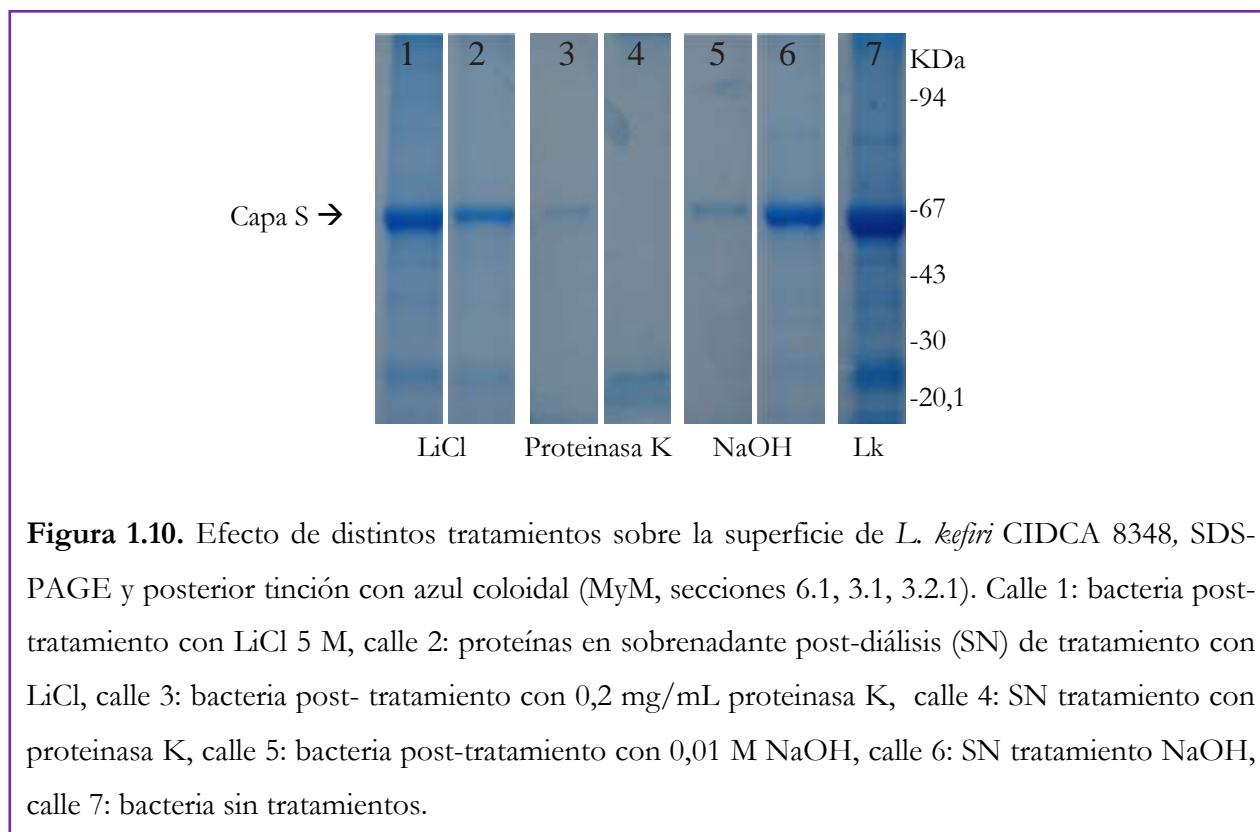


Figura 1.10. Efecto de distintos tratamientos sobre la superficie de *L. kefir* CIDCA 8348, SDS-PAGE y posterior tinción con azul coloidal (MyM, secciones 6.1, 3.1, 3.2.1). Calle 1: bacteria post-tratamiento con LiCl 5 M, calle 2: proteínas en sobrenadante post-diálisis (SN) de tratamiento con LiCl, calle 3: bacteria post- tratamiento con 0,2 mg/mL proteinasa K, calle 4: SN tratamiento con proteinasa K, calle 5: bacteria post-tratamiento con 0,01 M NaOH, calle 6: SN tratamiento NaOH, calle 7: bacteria sin tratamientos.

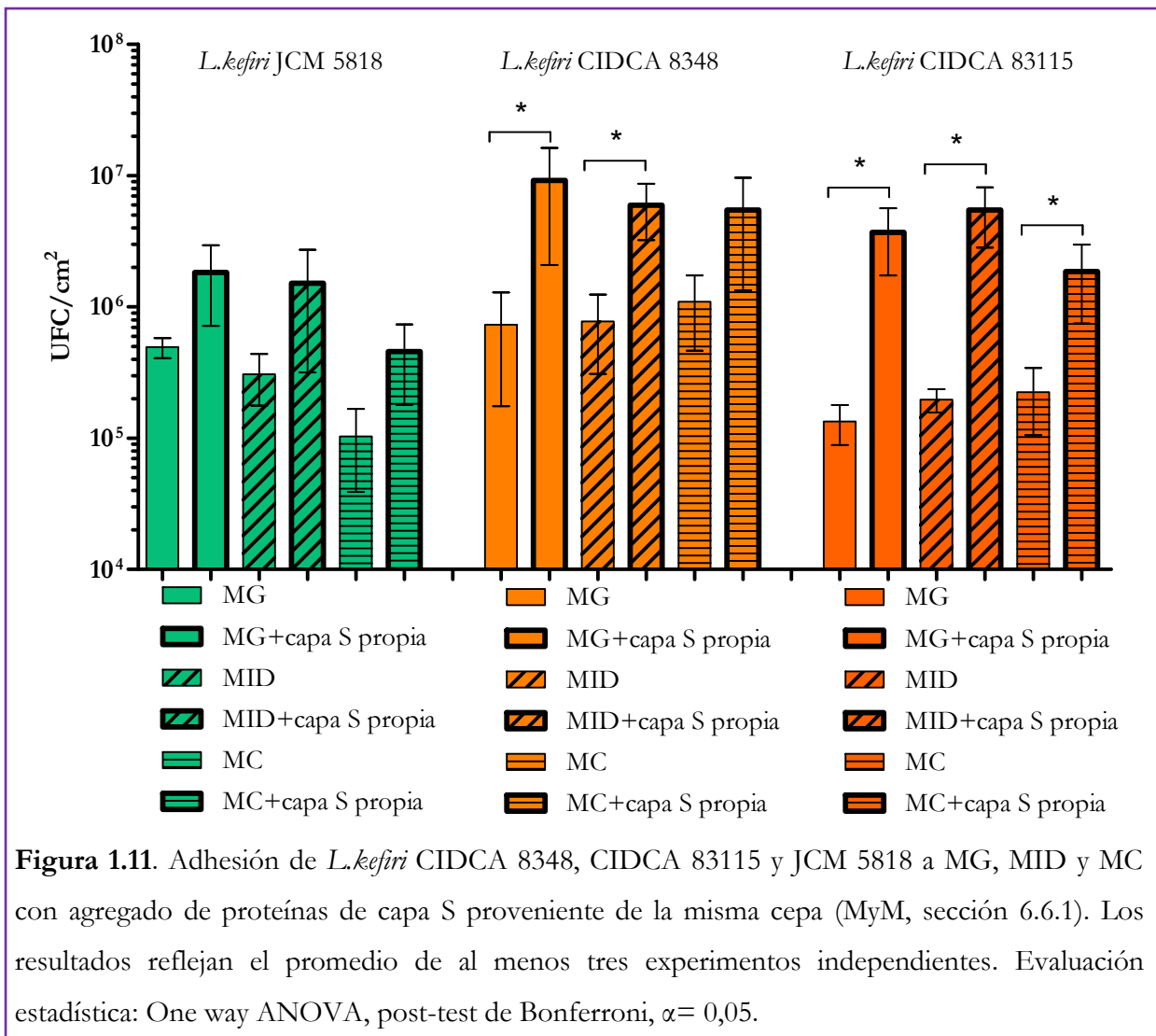
Tabla 1.2. Hidrofobicidad superficial de *L. kefir* (MyM sección 6.2)

Tratamiento	CIDCA 8321	CIDCA 8345	CIDCA 8348	CIDCA 83115	CIDCA 83111	CIDCA 83113	JCM 5818
Bacterias no tratadas	56 ± 3	54 ± 4	59 ± 5	58 ± 4	56 ± 6	57 ± 3	62 ± 4
NaOH 0,01 M	0	0	2 ± 1	0	0	0	0
LiCl 5M	0	2 ± 1	0	0	0	0	3 ± 2
Proteinasa K 0,2 mg/mL	0	0	0	0	0	0	0

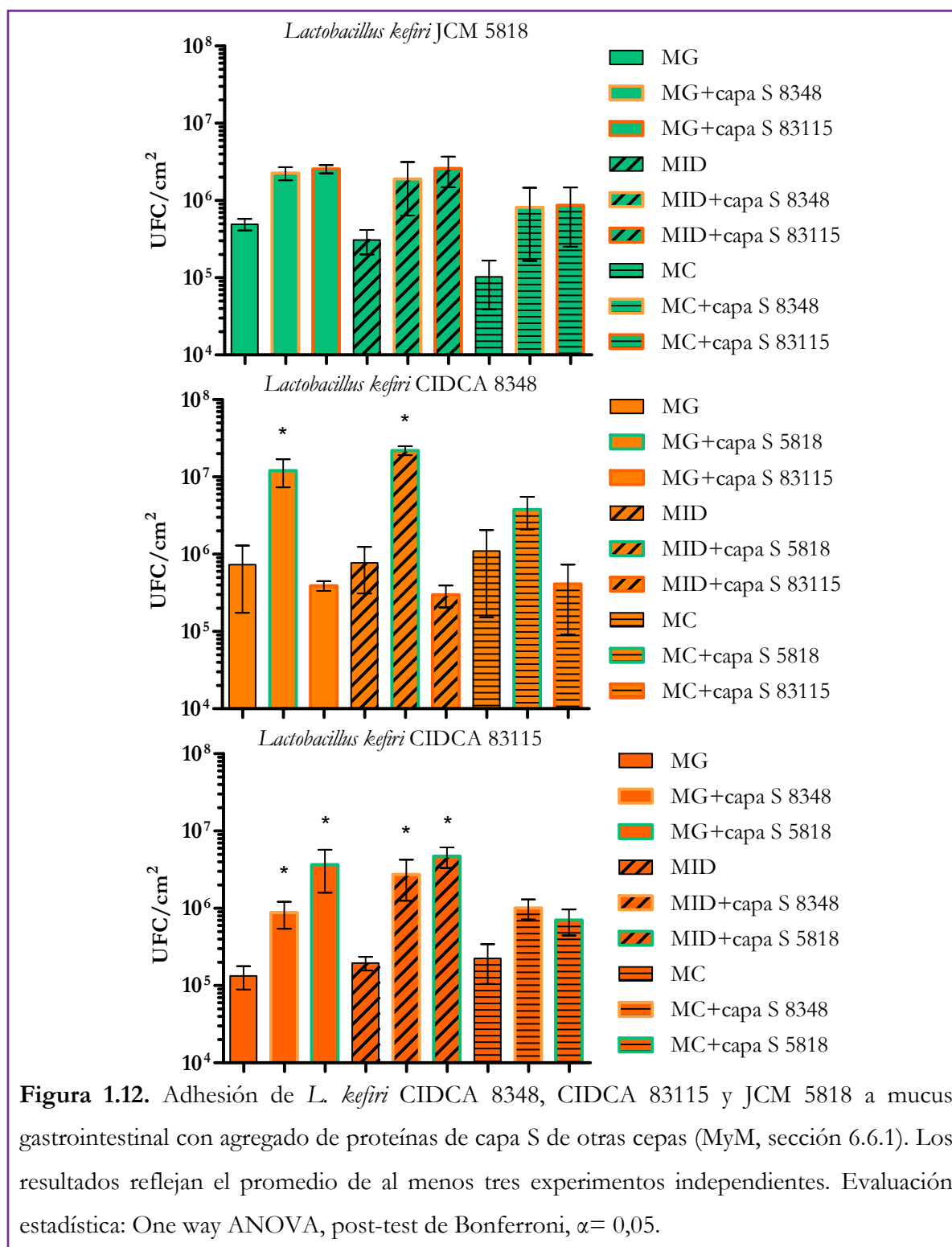
Ensayos realizados previamente en nuestro laboratorio mostraron que la superficie de *L. kefir* es altamente hidrofóbica (Londero et al. 2009; Golowczyc 2008) y todos los tratamientos realizados modifican dramáticamente esta condición (tabla 1.2). Debido a la naturaleza generalmente hidrofóbica

del mucus gastrointestinal, se podría esperar que una reducción de la hidrofobicidad bacteriana condujera a una disminución de la adhesión (Van Tassel and Miller 2011). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con LiCl o NaOH reduce significativamente la capacidad de adhesión de *L. kefir* a mucus, sin eliminar completamente las proteínas de capa S de la superficie. Sin embargo, el uso de métodos químicos para extraer las proteínas superficiales puede resultar en la extracción simultánea de otros componentes que podrían estar implicados en la adhesión (Jakava-Viljanen and Palva 2007; Edelman et al 2012). Por otra parte, si bien el tratamiento de las bacterias con proteinasa K también muestra una disminución de la hidrofobicidad de la superficie, esta modificación no se reflejó en una disminución de la adhesión a mucus. Estos resultados sugieren que, además de la extracción de las proteínas de superficie y los cambios en la hidrofobicidad, cada uno de los tratamientos genera un conjunto diferente de modificaciones en las superficies bacterianas que afectan su capacidad de interactuar con mucinas y componentes del mucus. El uso de mutantes isogénicos deficientes en los genes que codifican las proteínas de la capa S, sería una mejor alternativa a la hora de evaluar el rol de estas proteínas en los procesos de adhesión. Dado que aún no disponemos de esas herramientas, se realizaron otros experimentos para evaluar el rol de las proteínas de capa S en la adhesión a mucus.

Se evaluó la adhesión de *L. kefir* a mucus en presencia de distintas concentraciones de extractos de capa S soluble provenientes de la misma bacteria (MyM, sección 6.6.1). Si bien, en todos los casos se observó una tendencia a una mayor adhesión, con una concentración proteica de 15 µg/mL, estas diferencias fueron significativas sólo para las cepas auto-agregantes *L. kefir* CIDCA 8348 y CIDCA 83115 interactuando con MG y MID (figura 1.11). Con respecto a la interacción con MC, la adición de proteínas de capa S sólo aumentó la adhesión de la cepa *L. kefir* CIDCA 83115 (figura 1.11).



Si tenemos en cuenta que estas bacterias secretan capa S al medio en el que se encuentran (Golowcyc et al 2007), el incremento de la capacidad de adhesión en presencia de proteínas solubles, podría mejorar la adhesión bacteriana a la capa mucosa, mejorando la interacción de las bacterias probióticas con el epitelio. Por otro lado, el hecho de que el grado de adhesión no aumente en todas las cepas estudiadas, sugiere que las características fisicoquímicas de las proteínas de la capa S podrían determinar su rol en la adhesión bacteriana a estos sustratos (Mobili et al 2009b). En este mismo sentido, y teniendo en cuenta que varias cepas de *L. kefir* están presentes en las leches fermentadas por gránulos de kefir o bien que podrían formularse productos con más de una de ellas, se evaluó la adhesión de distintas cepas de *L. kefir* en presencia de extractos de capa S de otras *L. kefir* (figura 1.12).



Ninguno de los extractos de capa S aumentó la adhesión a MC, y el efecto observado en las otras matrices fue cepa y extracto dependiente, registrándose aumentos de la adhesión de *L. kefir* CIDCA 8348 en presencia de la capa S de *L. kefir* JCM 5818, y de la adhesión de *L. kefir* CIDCA 83115 en presencia de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818. Estos resultados refuerzan la idea

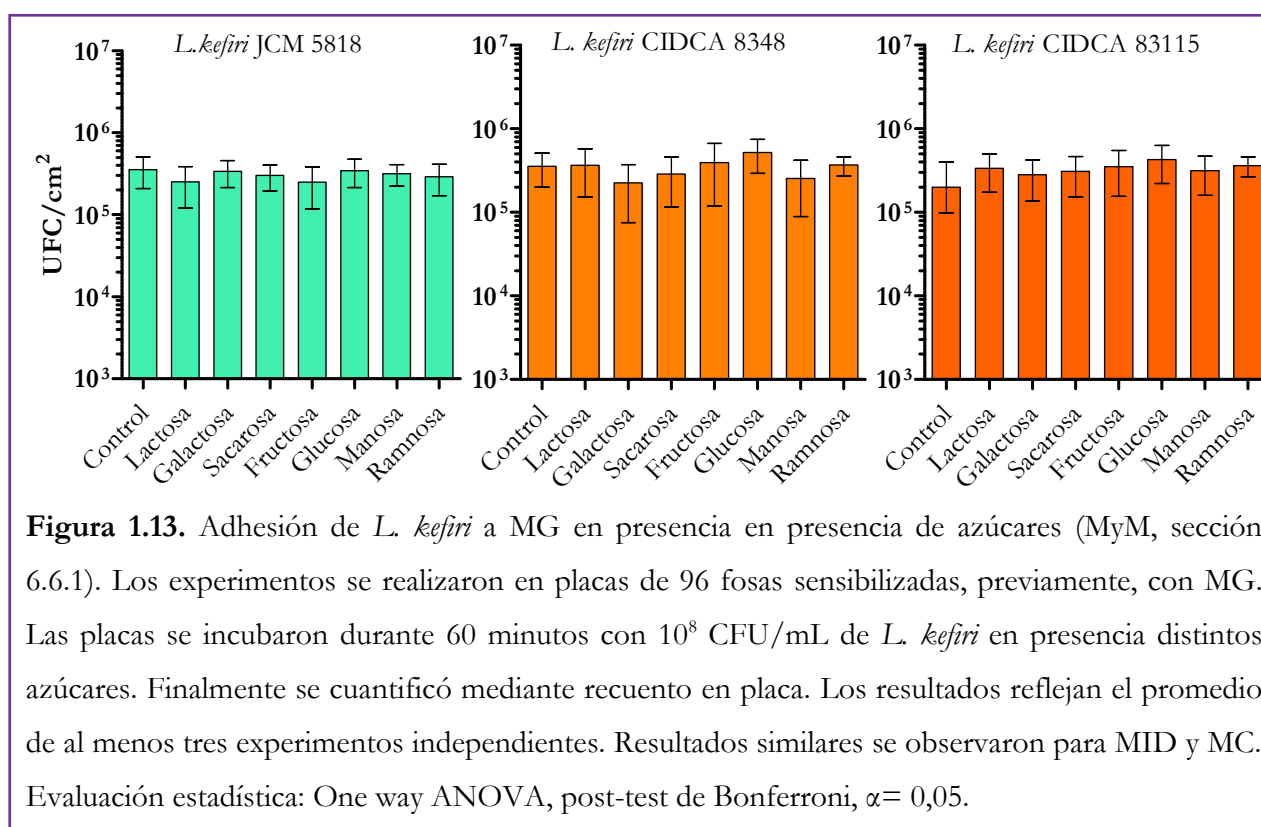
de que las interacciones bacteria-capa S-mucus, dependen fuertemente de las características estructurales de las superficies involucradas. Es importante destacar que la adición de capa S propia o de otra cepa, en ningún caso disminuyó la adhesión de la cepa ensayada.

Varios autores han propuesto que la capa S media la adhesión al epitelio (Hynönen and Westerlund-Wikström 2002; Åvall-Jääskeläinen 2003; Frece et al 2005) pero ninguno de ellos ha evaluado la contribución de las proteínas secretadas a este fenómeno. Entre las proteínas de capa S estudiadas, únicamente se reportó la presencia de dominios de unión a mucus para *L. acidophilus* NCFM (Buck et al 2005). Sin embargo, se han identificado varias proteínas de superficie capaces de unirse a mucus y células epiteliales en otras especies de *Lactobacillus* (Van Tassell and Miller 2011; Turpin et al 2012; Sengupta et al 2013). Ante los resultados obtenidos al realizar los tratamientos para eliminar las proteínas de superficie, sería interesante estudiar mediante técnicas moleculares la presencia de genes que codifiquen para otras proteínas que podrían estar involucradas en los procesos de adhesión de *L. kefir*.

Es válido pensar que la presencia de proteínas de capa S en la mucosa podría aumentar la adhesión al epitelio no sólo de los lactobacilos sino también de bacterias patógenas, lo que podría potenciar sus efectos nocivos. Sin embargo, Chen y col. (2007) demostraron que las proteínas de capa S de *L. crispatus* son capaces de inhibir la adhesión de *S. typhimurium* y *E. coli* O157:H7 a células HeLa, mientras Johnson-Henry y col. (2007) probaron que las proteínas de superficie de *L. helveticus* inhiben la adhesión de *E. coli* O157:H7 a células epiteliales. En el mismo sentido, en nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que las proteínas de capa S de *L. kefir* si bien no modifican la asociación de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis a células epiteliales intestinales Caco-2, disminuyen significativamente su capacidad de invasión (Golowczyc et al 2007).

Golowczyc y col. (2009) determinaron que una actividad de tipo lectina, atribuida a la presencia de capa S en la superficie bacteriana, media la interacción de *L. kefir* con *Saccharomyces lipolytica*. Además, observaron que la co-agregación entre estos microorganismos era completamente inhibida

luego del tratamiento con LiCl, pero no se modificaba incubando a *L. kefir* con proteínasa K, lo que se encuentra con concordancia con lo observado en este trabajo de tesis. Con el fin de comprobar la influencia de este tipo de interacciones en la capacidad de adhesión a mucus gastrointestinal, se realizaron ensayos de adhesión de bacterias o de sus proteínas de capa S en presencia de diferentes azúcares (MyM, sección 6.6.1). En la figura 1.13 se observan los resultados de la adhesión de tres cepas a MG que son representativas de lo ocurrido para todas las cepas en las tres matrices. Ninguno de los siete azúcares ensayados fue capaz de inhibir la adhesión de bacterias enteras a MG, MID y MC en las condiciones de trabajo. Sin embargo, la interacción de las proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348, CIDCA 83115 y JCM 5818 con estas matrices, fue inhibida, al menos, por un azúcar. En la figura 1.14 se muestra el porcentaje de reducción de la adhesión de proteínas de capa S a MG en presencia de azúcares. Perfiles similares de inhibición se registraron utilizando como matrices MID y MC, esos resultados se muestran en la tabla 1.3.



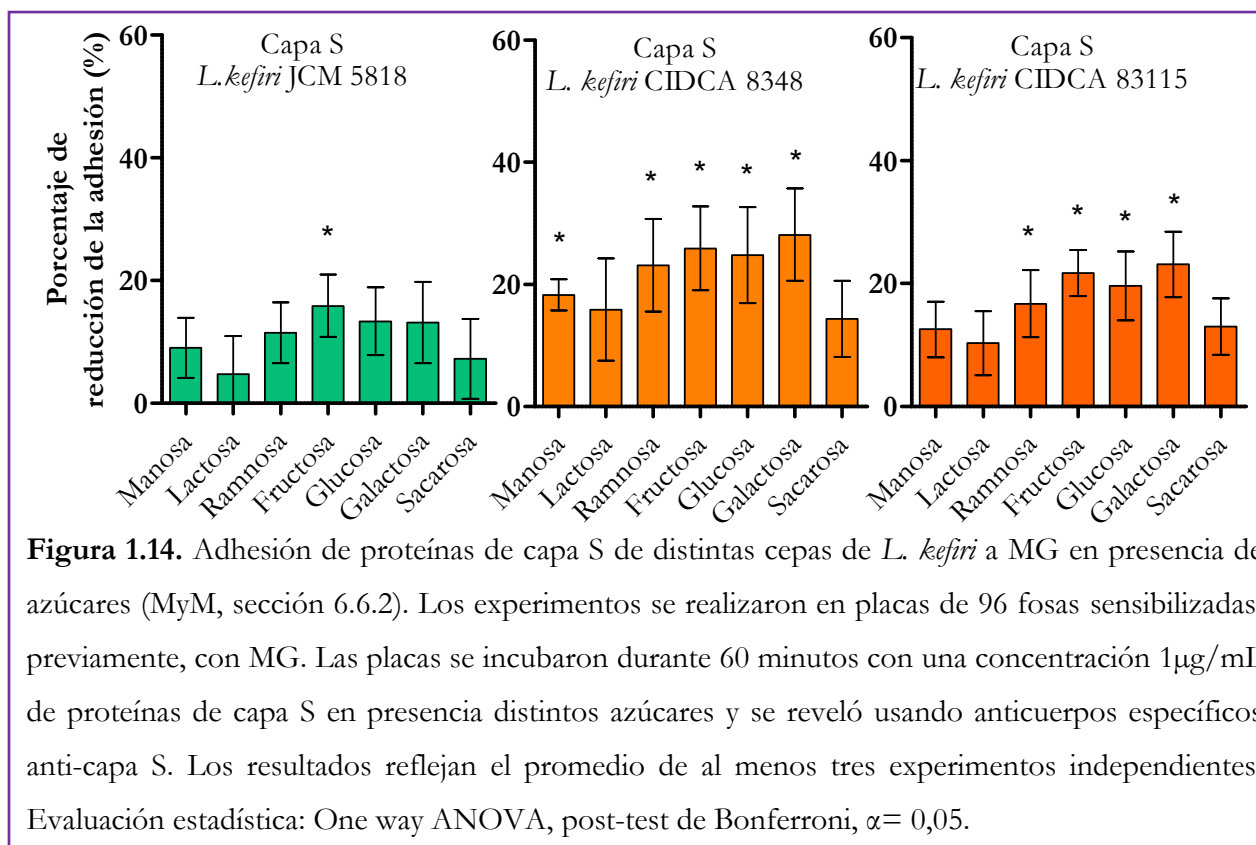
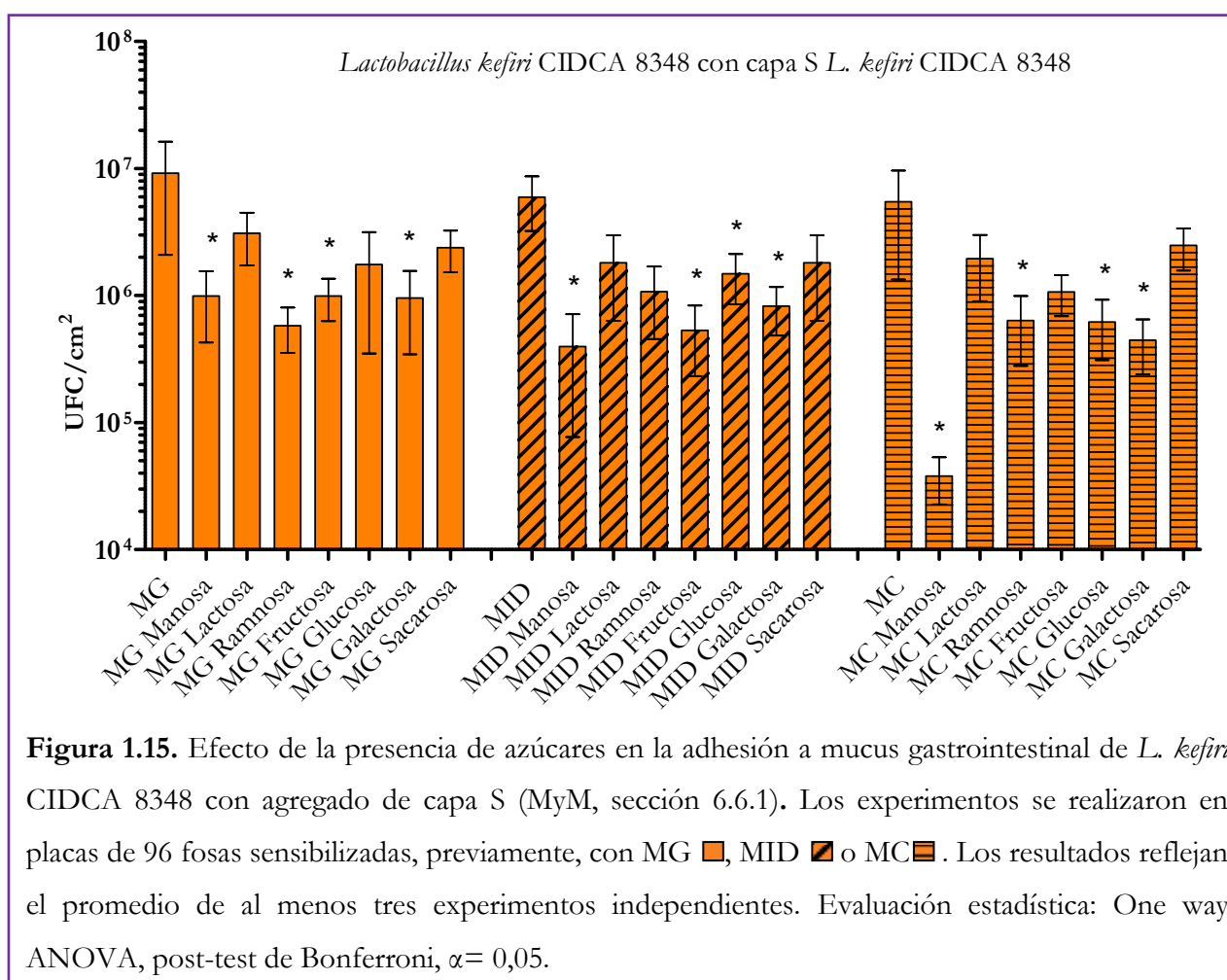


Tabla 1.3. Adhesión de proteínas de capa S a MID y MC en presencia de azúcares.

Porcentaje de reducción de la adhesión de proteínas de capa S						
	CIDCA 8348	CIDCA 83115	JCM 5818	CIDCA 8348	CIDCA 83115	JCM 5818
	Extracto de mucus intestinal (MID)			Extracto de mucus de colon (MC)		
Manosa	18,3 ± 3,9 *	12,0 ± 6,3	9,1 ± 4,6	24,0 ± 5,1 *	11,1 ± 5,5	8,4 ± 5,8
Lactosa	12,6 ± 4,4	10,9 ± 5,0	4,8 ± 5,9	6,7 ± 2,8	13,9 ± 6,0	6,7 ± 6,3
Ramnosa	17,4 ± 3,2 *	16,1 ± 5,2 *	11,5 ± 4,7	16,4 ± 5,6 *	11,3 ± 4,2	12,3 ± 6,4
Fructosa	21,1 ± 6,1 *	21,7 ± 3,5 *	15,9 ± 4,8 *	12,9 ± 6,2	24,8 ± 5,5 *	13,9 ± 6,9
Glucosa	18,5 ± 3,2 *	19,6 ± 5,3 *	13,4 ± 5,2	15,9 ± 3,3 *	20,5 ± 4,2 *	11,1 ± 4,4
Galactosa	20,2 ± 6,9 *	23,1 ± 5,1 *	13,2 ± 6,3	20,8 ± 6,2 *	22,3 ± 5,9 *	9,3 ± 5,5
Sacarosa	13,2 ± 6,8	12,7 ± 3,6	7,3 ± 6,1	10,1 ± 2,9	10,2 ± 4,6	10,3 ± 7,2

Finalmente, se evaluó el efecto del agregado de azúcares en la adhesión de las bacterias a mucus en presencia de capa S soluble (MyM, sección 6.6.1). En la figura 1.15 se muestran los resultados obtenidos para la cepa CIDCA 8348. El agregado de manosa, fructosa, galactosa y ramnosa redujo, a los niveles basales, el incremento de la adhesión ocasionado por la adición de capa S a MG, MID y

MC. La adición de lactosa, glucosa o sacarosa no afectaron esta interacción. Por otro lado, la inhibición por azúcares a MC presentó un patrón similar, aunque se observaron ciertas diferencias con respecto al efecto de la adición de fructosa y glucosa, y una fuerte inhibición en presencia de manosa (alrededor de 100 veces). Efectos similares a los descritos para la cepa *L. kefir* CIDCA 8348, se observaron para *L. kefir* CIDCA 83115. Sin embargo, esta última, no mostró inhibición de la adhesión en presencia de manosa en ninguna de las tres matrices.



En conjunto, este último grupo de resultados indican que los residuos de azúcar podrían estar mediando la interacción entre las proteínas de la capa S en solución y los componentes del mucus, pero no la adhesión directa de las bacterias que poseen proteínas de capa S sobre su superficie. Esas diferencias podrían deberse a la estructura tridimensional adoptada por las proteínas de capa S en cada

condición experimental o a la presencia de otras adhesinas sobre la superficie de la bacteriana que pudieran compensar el efecto de los azúcares sobre la interacción capa S-matriz (Turpin et al 2012; Sengupta et al 2013). Por otro lado, el hecho de que la capa S de cada cepa presentara su propio perfil de inhibición por azúcares, podría deberse a diferencias en la composición y estructura de los restos glicosídicos de cada proteína, las cuales aún no están dilucidadas. Se necesitan más estudios para esclarecer el grado de participación de los restos de azúcar en el mecanismo de adhesión a mucus.

2.2. Resistencia al pasaje gastrointestinal

El CAA establece la necesidad de evaluar la capacidad de los microorganismos potencialmente probióticos, de crecer en medios de cultivo sólido conteniendo sales biliares o lisozima, así como la evaluación de la resistencia a las condiciones gástricas. Trabajos previos realizados en nuestro grupo, demostraron que *L. kefir* presenta mayor sensibilidad a la acidez, parámetro asociado a las condiciones gástricas, que a las sales biliares, parámetro relacionado con el compartimiento intestinal (Golowczyc et al 2008). Para complementar estos estudios, se evaluó la resistencia al pasaje gastrointestinal mediante una aproximación *in vitro* que consiste en realizar incubaciones secuenciales en soluciones que simulan los compartimientos gástrico e intestinal (MyM, sección 6.5). Se cuantificó el número de microorganismos viables, se estudió la morfología bacteriana y se analizó la capacidad de adhesión a componentes del epitelio intestinal luego del tratamiento mencionado.

En la figura 1.16 se puede observar que, para todas las cepas excepto *L. kefir* CIDCA 83111, la incubación en fluidos gástricos durante 90 minutos a pH 2,5, 37°C y con agitación, disminuyó la viabilidad bacteriana entre una y dos unidades logarítmicas respecto del inóculo inicial. La exposición posterior a las condiciones intestinales durante 180 minutos, no modificó significativamente la viabilidad respecto de lo observado en el compartimiento gástrico. Por otro lado, no se observaron diferencias entre cepas auto-agregantes y no auto-agregantes.

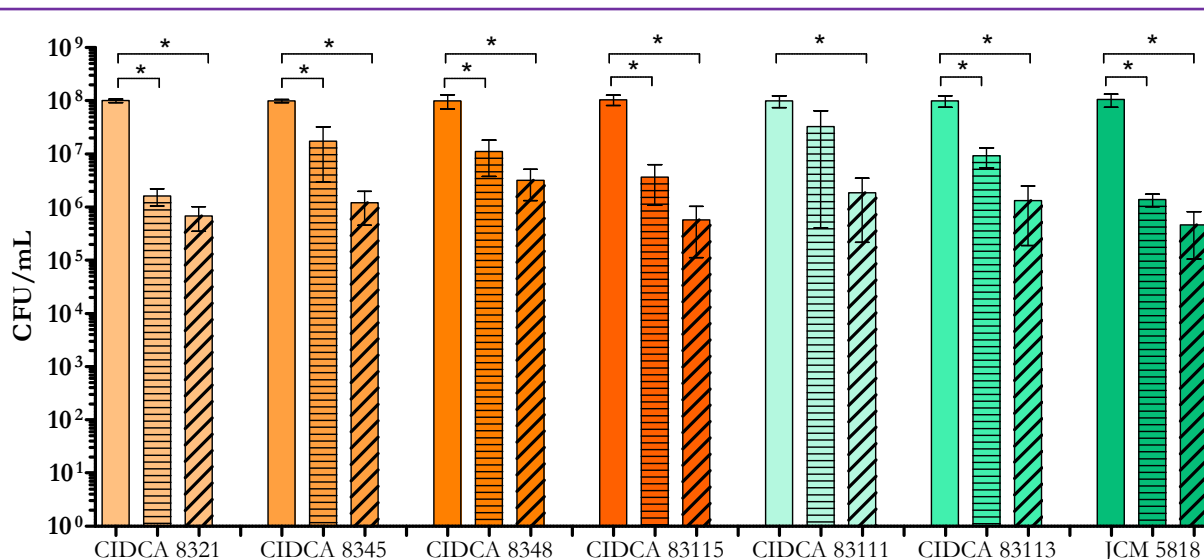
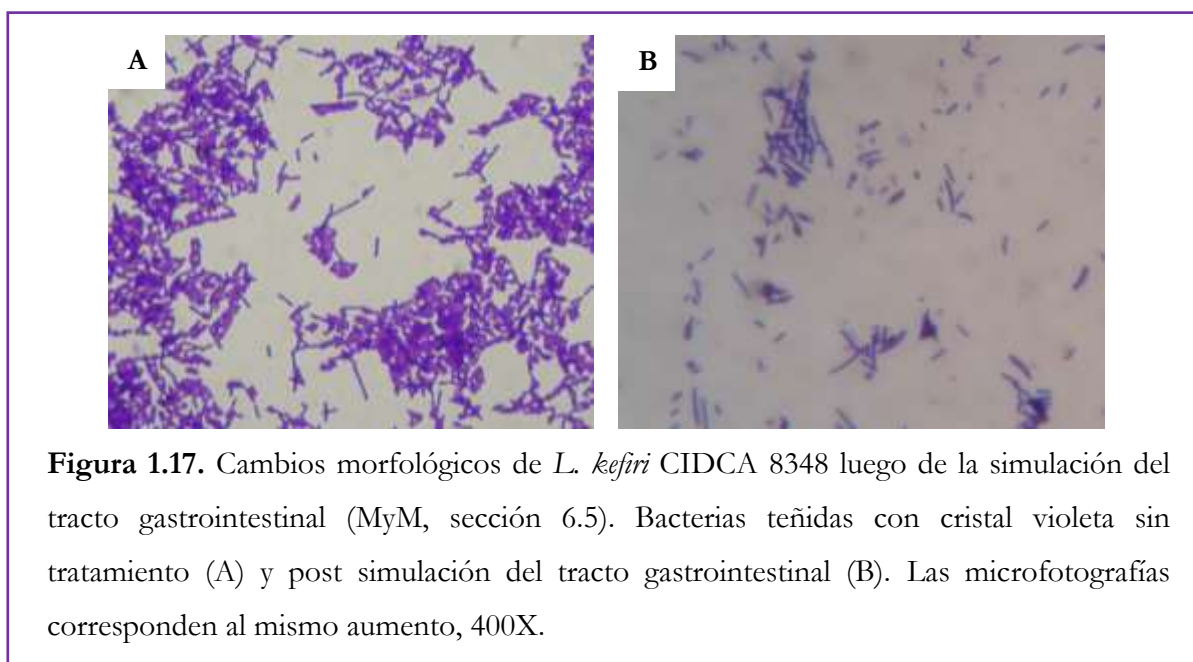


Figura 1.16. Resistencia de distintas cepas de *L. kefir* a las condiciones gastrointestinales (MyM, sección 6.5). En la figura se muestra el inóculo inicial □, el recuento bacteriano luego de la incubación en condiciones gástricas ▨ y, finalmente, luego de una incubación secuencial en los compartimentos gástrico e intestinal ▩. Se usaron distintos tonos de naranja para identificar a las bacterias auto-agregantes y distintas tonalidades de verde para las no auto-agregantes. Los resultados reflejan el promedio de cuatro experimentos independientes. Evaluación estadística: One way ANOVA, post-test de Bonferroni, $\alpha = 0,05$.

En general, la sensibilidad a las condiciones gastrointestinales evaluada *in vitro* no sólo es cepa dependiente, sino que depende fuertemente de los protocolos utilizados (Dunne et al 2001; Grimoud et al 2010; Ayeni et al 2011; Vitali et al 2012). Con respecto a la especie *L. kefir*, nuestros resultados correlacionan con lo observado en las publicaciones de Mainville y col. (2005) y Zheng y col. (2013). Si bien estos autores utilizan soluciones distintas para simular las condiciones gástricas e intestinales, en ambos trabajos las cepas analizadas presentaron una mayor sensibilidad a las condiciones del microambiente gástrico. Además, se han realizado previamente en nuestro grupo de trabajo, ensayos de persistencia en el tracto gastrointestinal de ratones BALB/c a los cuales se les administró, en forma oral, una suspensión de 10^{10} UFC/mL en el agua de bebida de la cepa *L. kefir* CIDCA 8321 durante 10 días consecutivos. En dichas condiciones fue posible detectar (por recuento en MRS y confirmación por dot-blot con el antisuero anti-capa S) las bacterias administradas viables en materia

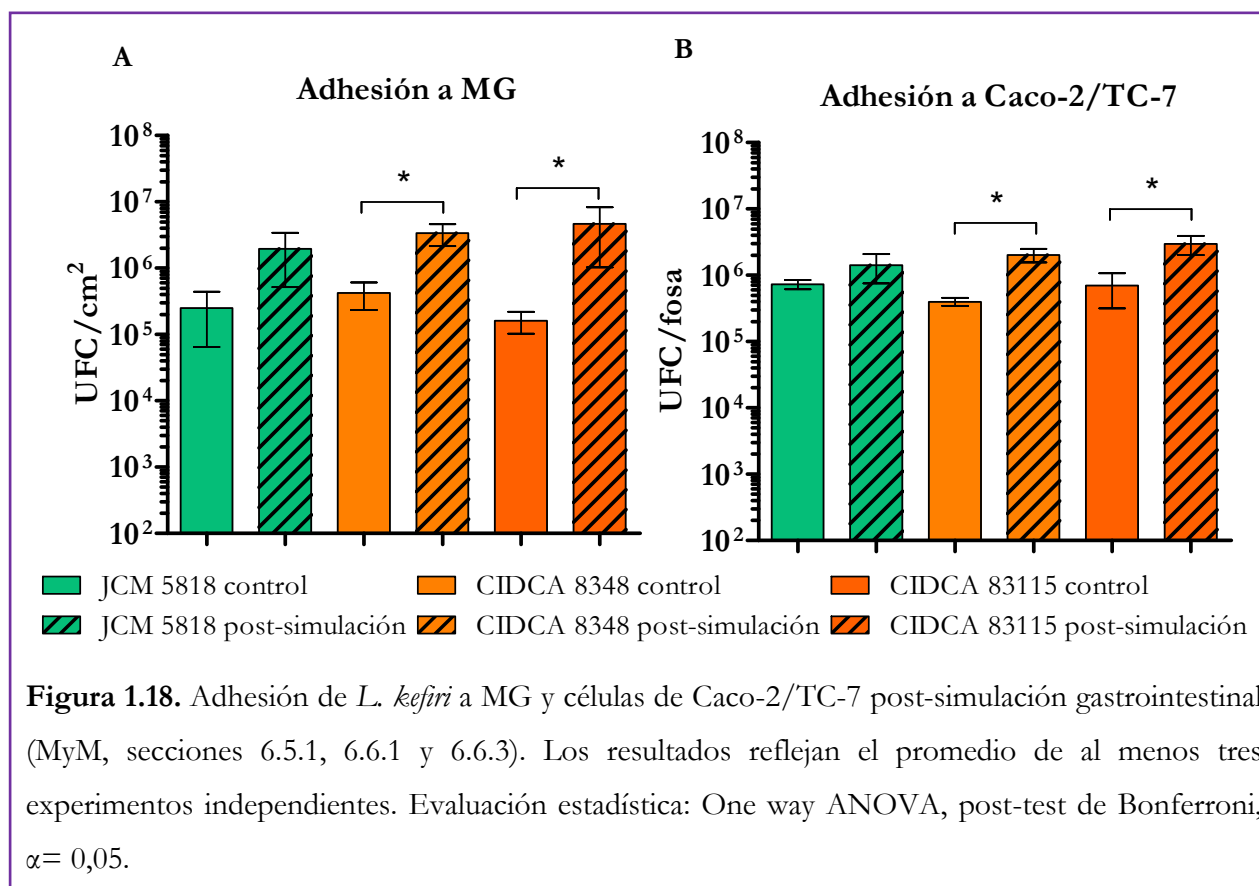
fecal a partir del segundo día de iniciado el tratamiento y hasta cinco días posteriores a su finalización, en una concentración superior a 10^7 UFC/g de materia fecal (Golowczyc et al 2004).

En los paneles A y B de la figura 1.17 se muestran tinciones con cristal violeta de la bacteria *L. kefir* CIDCA 8348 sin tratamiento y luego de la simulación del pasaje a través del tracto gastrointestinal (MyM, sección 6.5). Se puede observar que el grado de agregación se reduce notablemente y los lactobacilos son más largos. En el caso de cepas no auto-agregantes, se observaron cambios morfológicos similares.



Con los experimentos ya descritos, se puso en evidencia que las condiciones de estrés estudiadas, afectan morfológicamente a *L. kefir* y afectan su viabilidad. Dada la importancia de la adhesión al epitelio intestinal para la selección de microorganismos probióticos, se decidió evaluar si los cambios observados afectaban la capacidad de adhesión a células Caco-2/TC-7 (MyM, sección 6.6.3), tomando como punto de partida los resultados previamente obtenidos por Golowczyc y col. (2007), y a mucina gástrica (MyM, sección 6.6.1), estudiada en este trabajo de tesis. En la figura 1.18 se muestran los resultados obtenidos utilizando tres cepas seleccionadas (*L. kefir* CIDCA 8348, 83115 y

JCM 5818). En todos los casos se observó una tendencia a un aumento en la adhesión a mucina y células epiteliales intestinales, sin embargo, este aumento fue significativo sólo en el caso de las cepas auto-agregantes.



Las modificaciones en la morfología de las células bacterianas, así como los cambios en sus propiedades superficiales, auto-agregación y adhesión a mucus y células epiteliales, se pueden asociar con los mecanismos que el microorganismo pone en juego para sobrevivir a las condiciones adversas a las que debe enfrentarse en el tracto gastrointestinal. El estrés generado por las condiciones de bajo pH, la presencia de las enzimas digestivas y de las sales biliares, entre otras, modifican el metabolismo bacteriano, generando alteraciones en proteínas sintetizadas, cambios en la composición de ácidos grasos y fosfolípidos de la membrana celular, etcétera (Kleerebezem et al 2010; Heunis et al 2014; Wu et al 2014). Es posible que, entre las modificaciones mencionadas, se afecte la expresión de moléculas involucradas en la adhesión a componentes del epitelio gastrointestinal (Turpin et al 2012; Sengupta et

al 2013). En colaboración el Dr. Sebastián Trejo, del Servicio de Proteómica y Biología Estructural (SePBioEs) del Instituto de Biotecnología y Biomedicina (IBB) de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), se realizaron geles bidimensionales de extractos proteicos de la cepa *L. kefir* CIDCA 8348 luego de haber sido sometida al tratamiento y se observaron diferencias con los perfiles electroforéticos obtenidos para la bacteria no tratada. Se encuentran planificados estudios de espectroscopía de masa (MALDI-TOF/MS-PMF) para identificar las proteínas que se vieron afectadas.

Hasta este punto hemos demostrado, utilizando metodologías *in vitro*, que las cepas de *L. kefir* son aptas para ser utilizadas como aditivos alimentarios tanto desde el punto de vista de la inocuidad como por su resistencia al pasaje a través del tracto gastrointestinal y su capacidad de adhesión al epitelio. Se continuó la caracterización de las cepas de *L. kefir* evaluando dos aspectos que podrían resultar en un beneficio para el hospedador. En primer lugar, se estudió la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos y antagonizar el efecto de los productos de secreción de *B. cereus* y *C. difficile* sobre células en cultivo y, por último, las propiedades inmunomodulatorias.

3. Propiedades probióticas o funcionales






3.1. Efecto antimicrobiano

La secreción de moléculas capaces de inhibir el crecimiento de patógenos es una característica deseable para un microorganismo probiótico (Dunne et al. 2001). Se evaluó la capacidad de inhibición de *L. kefir* sobre los patógenos *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Shigella flexneri* ATCC 9199, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CIDCA 101, *Bacillus cereus* T1, *Escherichia coli* enterohemorrágica EDL 933 y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (MyM, sección 1.2).

En primer lugar, se evaluó la capacidad de las cepas de *L. kefir* de inhibir el crecimiento de los patógenos mediante la técnica del *spot test* (MyM, sección 6.7). En la figura 1.19, se muestran ejemplos de los resultados obtenidos. En estos ensayos se sembró una gota de cultivo de *L. kefir* en una placa de agar MRS y se la incubó durante 24 horas a 37°C. Al día siguiente, se colocó una capa de agar BHI inoculado en profundidad con el patógeno a ensayar y se incubó durante 18 horas en las condiciones de crecimiento óptimas para la bacteria patógena. En la tabla 1.4, se muestran los perfiles de inhibición obtenidos contra bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas. Es importante destacar, que ninguno de los patógenos estudiados fue inhibido por el agregado de MRS acidificado con HCl o ácido láctico hasta pH 4,5, mínimo pH que se obtienen en cultivos de *L. kefir* (Golowczyc et al 2011).

En términos generales, se observó un efecto inhibitorio mayor sobre los patógenos Gram positivos que sobre las bacterias Gram negativas estudiadas. Además, todas las cepas de *L. kefir* fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Bacillus cereus* y de *Staphylococcus aureus*, pero ninguna afectó el crecimiento de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). Se pudo evidenciar un perfil de inhibición cepa dependiente, lo que correlaciona con lo documentado en bibliografía (Servin 2004; Golowczyc et al 2008). En particular, las cepas *L. kefir* CIDCA 8321, CIDCA 8348 y CIDCA 83111, fueron las que mayor espectro antimicrobiano presentaron, siendo capaces de inhibir a siete de los patógenos ensayados.

Figura 1.19. Ensayos de inhibición de crecimiento bacteriano (MyM, sección 6.7).

<i>E. coli</i> enterohemorrágica		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Bacillus cereus</i>	
					
CIDCA 83111	CIDCA 83113	CIDCA 83111	CIDCA 83113	CIDCA 83111	CIDCA 83113
Sin inhibición (-) $R^1 < 2 \text{ mm}$		Inhibición débil (+) $2 \text{ mm} \leq R^1 < 6 \text{ mm}$		Inhibición Fuerte (++) $6 \text{ mm} \leq R^1$	

¹ Radio de inhibición calculado con la ecuación: $R = (dI - dLk)/2$. Donde: dI es el diámetro de la zona sin crecimiento del patógeno, dLk es el diámetro de la zona de crecimiento del lactobacilo.

Tabla 1.4. Perfiles de inhibición de cepas de *L. kefir* sobre bacterias patógenas (MyM, sección 6.7).

Cepa	Inhibición de patógenos							
	CIDCA 8321	CIDCA 8345	CIDCA 8348	CIDCA 83115	CIDCA 83111	CIDCA 83113	JCM 5818	MRS pH 4,5
Bacilos Gram Negativos								
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	++	+	++	+	+	+	+	-
<i>Salmonella Enterica</i>	+	-	+	-	+	+	-	-
<i>Shigella Flexneri</i>	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacilos Gram Positivos								
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	++	+	++	+	+	++	+	-
Cocos Gram Positivos								
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	+	++	+	++	+	+	-

Sin inhibición (-), inhibición débil (+), inhibición fuerte (++)

Se han descrito muchos mecanismos a través de los cuales las bacterias lácticas inhiben el crecimiento de patógenos. Entre los productos de secreción de lactobacilos con actividad antimicrobiana, se pueden citar la producción de ácidos orgánicos, bacteriocinas y peróxido de hidrógeno (Servin 2004; Lebeer et al 2008). En el caso particular de *L. kefir*, el principal ácido orgánico secretado, como producto de su metabolismo, es el ácido láctico (Bolla 2011). En este trabajo, se determinó que los patógenos estudiados no son inhibidos por MRS acidificado con ácido láctico hasta las concentraciones alcanzadas en cultivos de *L. kefir*. En base a estos resultados, creemos que otras sustancias son responsables de los espectros de inhibición observados. En el mismo sentido, Golowcycz y col. (2009), demostraron que la incubación de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis con sobrenadantes de cultivo filtrados de *L. kefir* CIDCA 8348, disminuye la viabilidad bacteriana, mientras que la acidificación artificial del medio de cultivo no la afecta.

En estudios futuros, sería interesante evaluar las moléculas y mecanismos involucrados en la inhibición de los distintos patógenos debido a que esta propiedad podría ser relevante no sólo desde el punto de vista de la salud animal y humana, sino que también podría considerarse una ventaja en la industria alimenticia (Jack et al. 1995; Vuyst & Leroy 2007; Zacharof & Lovitt 2012).

A continuación, se realizaron estudios con el fin de evaluar la capacidad de *L. kefir* de antagonizar el efecto de los factores extracelulares citotóxicos de dos patógenos, *B. cereus* y *C. difficile*.

3.2. Antagonismo del efecto de factores solubles secretados por microorganismos patógenos sobre células en cultivo

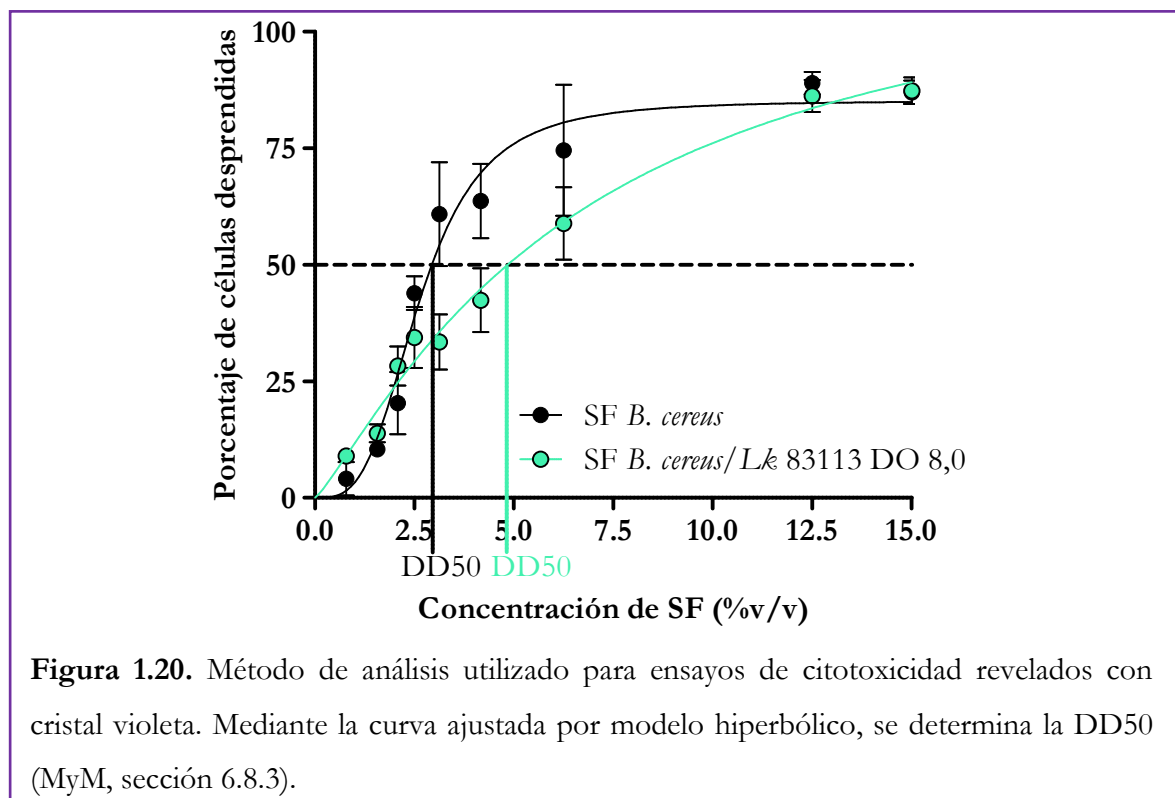
Se evaluó la capacidad de distintas cepas de *L. kefir* de antagonizar el efecto de factores extracelulares de *Bacillus cereus* y *Clostridium difficile* sobre células eucariotas. Los estudios cuyos resultados se discutirán a continuación, fueron realizados en colaboración con los doctores Ivanna Rolny, y Patricia Bolla y Fernando Trejo, respectivamente.

3.2.1. Antagonismo de factores extracelulares citotóxicos de *Bacillus cereus*

Bacillus cereus es un bacilo Gram positivo, catalasa positivo, formador de esporos y móvil. Dado que posee la capacidad de desarrollar aeróbicamente en un amplio rango de temperaturas (entre 10°C y 55°C) y no posee requerimientos nutricionales complejos, puede encontrarse en la tierra, aguas naturales y en gran variedad de alimento, principalmente, cereales y derivados, leche, alimentos secos, especias, productos cárneos y vegetales (Bottone 2010). La patogenicidad de *B. cereus*, tanto intestinal como no intestinal, se asocia íntimamente con la producción de factores extracelulares que afectan la estructura y función de las células eucarióticas. Entre estas moléculas podemos mencionar hemolisinas, fosfolipasas, la toxina emética y varias enterotoxinas (Ceuppens et al 2011).

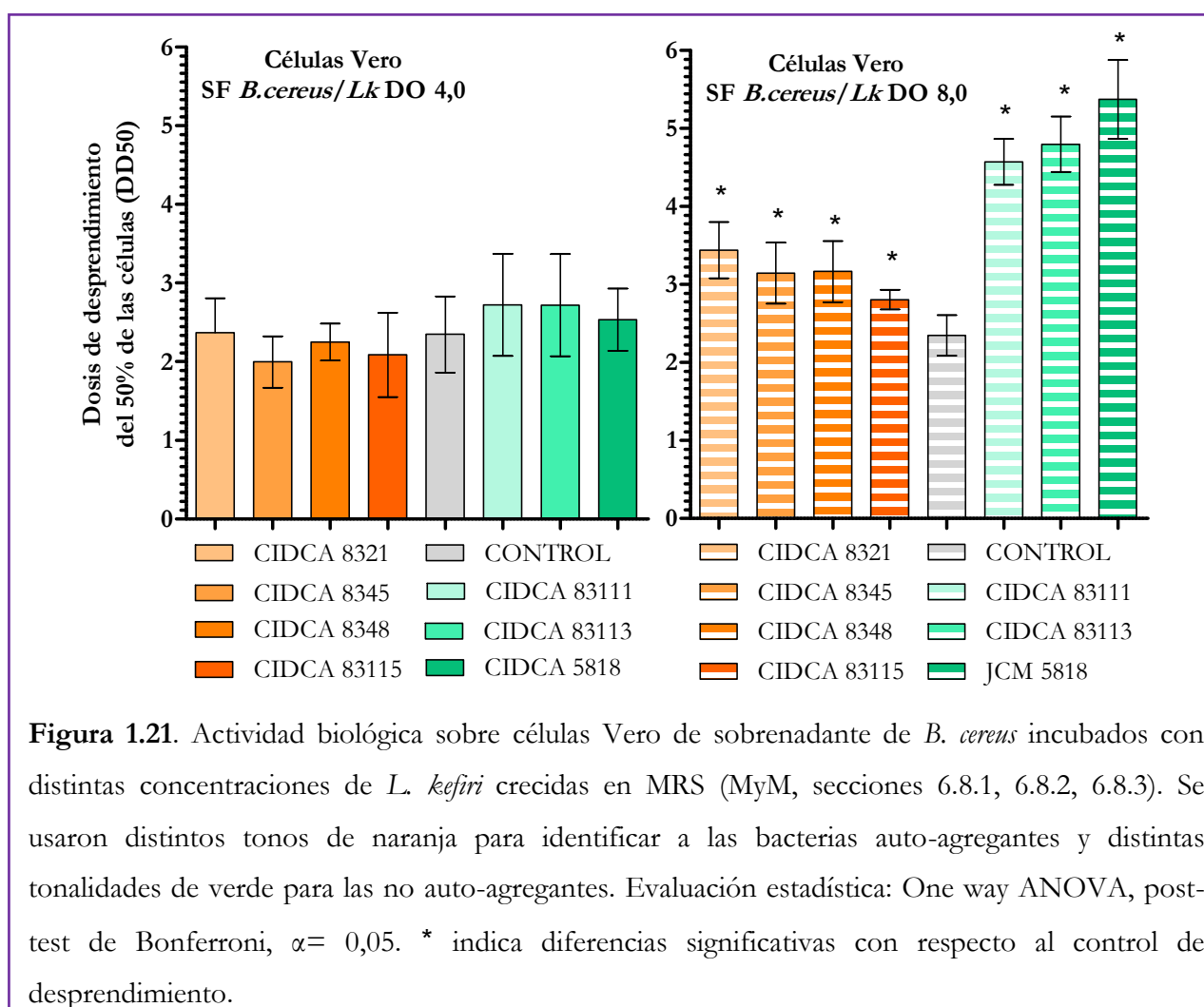
Para los estudios cuyos resultados se muestran a continuación, se trabajó con sobrenadantes filtrados de cultivos de la cepa de *B. cereus* T1 en fase estacionaria (MyM, sección 6.8.1). Los mismos

fueron incubados durante una hora a 37°C y agitación, con distintas concentraciones *L. kefir* en fase estacionaria, crecidas en MRS, (DO^{550nm} 4,0 y 8,0), se separaron los lactobacilos y se evaluó la citotoxicidad sobre células Vero y Caco-2 de los sobrenadantes obtenidos y los no tratados, mediante ensayos de desprendimiento celular revelados con cristal violeta (MyM, sección 6.8.3). En la figura 1.20 se muestra, a modo representativo, el porcentaje de células Vero desprendidas en función de la concentración de sobrenadantes de cultivo no tratado (SF *B. cereus*) y uno tratado con la cepa *L. kefir* CIDCA 83113 a $DO^{550nm}=8,0$ (SF *B. cereus*/*Lk* 83113 DO 8,0). Para comparar los resultados obtenidos entre los distintos tratamientos, se utilizó la dosis de desprendimiento 50 (DD50), que indica concentración de sobrenadante necesaria para producir el desprendimiento del 50 % de las células.



En primer lugar, se analizó el efecto de la incubación de los SF de *B. cereus* con distintas concentraciones de *L. kefir* sobre células Vero. En la figura 1.21 se puede observar que la incubación con $DO^{550nm}=4,0$ de las cepas *L. kefir* no tuvo un efecto sobre la DD50, sin embargo una

concentración mayor de microorganismo fue capaz de aumentar significativamente la dosis necesaria para dañar al 50 % de las células. Por otro lado, el aumento de la DD50 observado, luego de la incubación del SF con *L. kefir* DO^{550nm}=8,0, fue significativamente superior para cepas no auto-agregantes que para las auto-agregantes. Son muchos los mecanismos propuestos para explicar el efecto antagónico ejercido por microorganismos potencialmente probióticos sobre patógenos (Trejo et al 2006; Medrano et al 2008; Hugo et al 2008; Banerjee et al 2009; Kakisu et al 2013a). En este caso particular, el mecanismo por el cual *L. kefir* ejerce antagonismo podría deberse al secuestro o modificación de las toxinas de *B. cereus* por la actividad de moléculas presentes en la superficie bacteriana. Tanto en el caso de una mayor densidad bacteriana como en el caso de cepas no auto-agregantes, la superficie bacteriana disponible es mayor, por lo que las interacciones entre las estructuras superficiales y las toxinas podrían ser más intensas y explicar el efecto observado.



Otro factor a tener en cuenta es que las proteínas de la capa S de las distintas cepas de *L. kefir*, que conforman la estructura más externa de estas bacterias (Sleytr and Beveridge 1999), poseen estructuras primaria y secundarias diferentes (Mobili et al 2009a; Mobili et al 2009b). Estas características, podrían no sólo tener un impacto en las propiedades de auto-agregación, sino también en el tipo de interacciones que la superficie de los lactobacilos establezca con las toxinas, permitiendo explicar, al menos en parte, las diferencias en la capacidad de antagonizar el efecto citotóxico.

Se complementaron los resultados descriptos, evaluando la estructura celular mediante la tinción fluorescente del citoesqueleto con faloidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Minnaard et al 2004). El objetivo de estos ensayos fue demostrar que un menor desprendimiento celular se correlaciona directamente con la conservación de la integridad de las mismas. La faloidina interactúa con los filamentos de actina, debido a la conjugación con fluoresceína (FITC), lo que permite visualizarlos con fluorescencia verde (Cooper 1987). En la figura 1.22.A se muestra el aspecto de las células Vero no tratadas. Se puede observar la distribución homogénea de la fluorescencia celular y zonas con mayor intensidad, es decir con una mayor concentración de F-actina, que corresponden con las regiones de las uniones estrechas entre células adyacentes. En la parte B de esta figura, se observa la pérdida de la integridad del citoesqueleto y la ruptura de las uniones estrechas, lo que provoca redondeo celular, como consecuencia del tratamiento con una concentración de SF *B. cereus* de 2,5 % v/v (DD50). Finalmente, en la figura 1.22.C, se muestra que luego de la incubación de células Vero con una concentración de 2,5 % v/v de SF *B. cereus*/*L. kefir* CIDCA 8348 DO^{550nm}=8,0, no se afectó la integridad celular, lo que correlaciona con los resultados mencionados anteriormente.

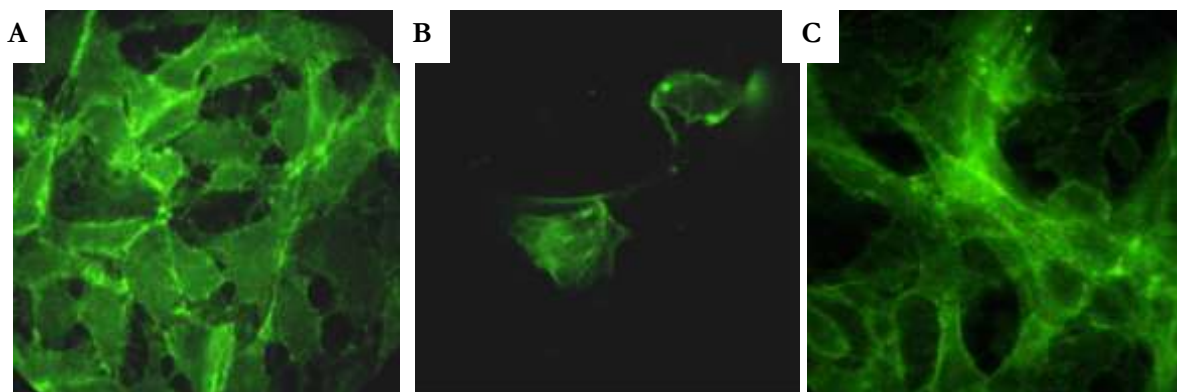


Figura 1.22. Tinción de citoesqueleto, con faloidina-FITC, realizada sobre células Vero (A) o células incubadas con sobrenadantes de *B. cereus* no tratados (B) y tratados con *L. kefir* CIDCA 8348 crecida en MRS (C) (MyM, secciones 6.8.1, 6.8.2, 6.8.3). En B y C, se utilizó la misma dosis de sobrenadante (DD50 del sobrenadante no tratado).

Por otro lado, se realizaron ensayos de citotoxicidad sobre células Caco-2 (MyM, sección 6.8.3). En la figura 1.23 se muestran los resultados obtenidos para dos cepas auto-agregantes y dos no auto-agregantes. Si bien este tipo celular fue más resistente al efecto de los factores extracelulares de *B. cereus* T1, lo que puede evidenciarse al analizar la DD50 de las células tratadas con SF *B. cereus* (control), no se observaron diferencias con los efectos ya descritos sobre células Vero. En ambas líneas celulares, la protección tuvo una relación directa con la carga microbiana utilizada y las cepas de *L. kefir* no auto-agregantes mostraron en efecto antagónico mayor. El hecho de que se observara el efecto protector sobre ambas líneas celulares, parece sugerir que el mismo podría asociarse más a un efecto de las bacterias sobre las toxinas que causan el daño, que a un mecanismo específico sobre los receptores celulares.

Varios autores han descrito que variaciones en el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de lactobacilos, pueden resultar en cambios en el metabolismo bacteriano y en su superficie (Schär-Zammaretti et al 2005). Se evaluó la DD50 luego de realizar la incubación de los sobrenadantes de *B. cereus* con las cepas de *L. kefir* crecidas en LAPTg, pero no se observaron diferencias significativas con el efecto, ya descrito, luego del crecimiento bacteriano en MRS.

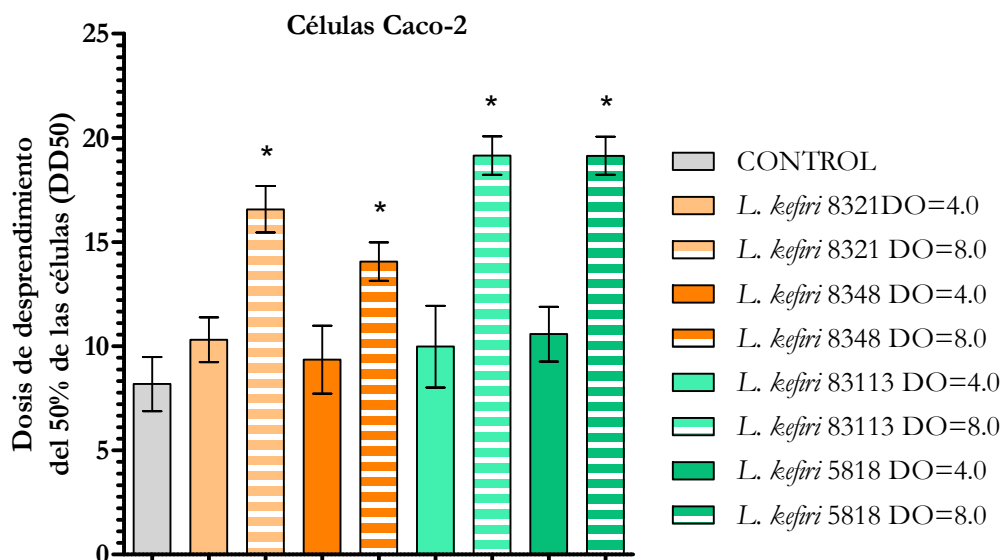


Figura 1.23. Actividad biológica sobre células Caco-2 de sobrenadante de *B. cereus* incubados con distintas concentraciones de *L. kefir* crecidas en MRS (MyM, secciones 6.8.1, 6.8.2, 6.8.3). Evaluación estadística: One way ANOVA, post-test de Bonferroni, $\alpha = 0,05$. * indica diferencias significativas con respecto al control de desprendimiento.

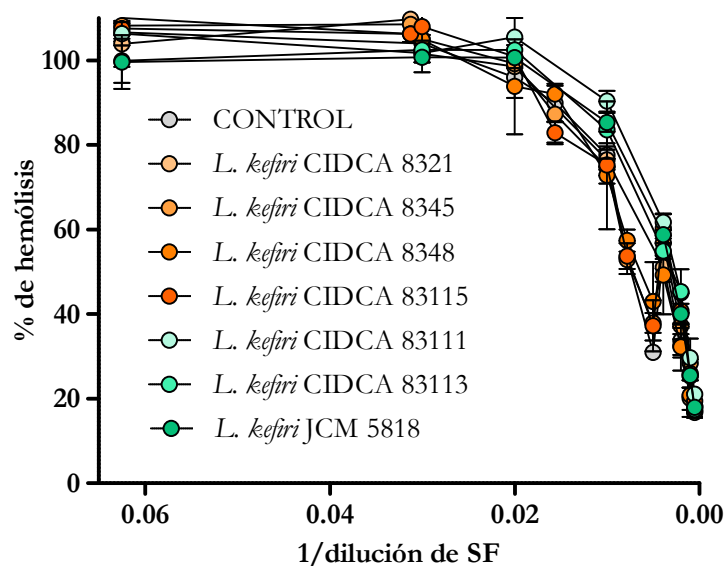


Figura 1.24. Hemólisis de glóbulos rojos humanos incubados con sobrenadantes de *B. cereus* sin tratamiento o incubados con $DO^{550nm}=8,0$ de *L. kefir* crecidas en MRS (MyM, secciones 6.8.1, 6.8.2, 6.8.4). Se incluyeron en estos ensayos un control positivo de hemólisis con agua destilada y dos negativos, uno con solución fisiológica y otro con BHIg.

La secreción de hemolisinas es otra característica patogénica de *Bacillus cereus*. Se evaluó el efecto de la incubación de SF de *B. cereus* con las distintas cepas de *L. kefir* sobre la actividad hemolítica utilizando suspensiones de glóbulos rojos humanos, y se cuantificó el grado de hemólisis midiendo la DO^{540nm} del sobrenadante de cada fosa y relacionándolo con el control positivo de hemólisis (MyM, sección 6.8.4). Ninguna de las cepas utilizadas, a una concentración $DO^{550nm}=8,0$, fue capaz de antagonizar el efecto producido por el SF *B. cereus* (figura 1.24). Tampoco se observaron diferencias entre la incubación de los SF con lactobacilos provenientes de cultivos en fase estacionaria de MRS y LAPTg.

La interacción de distintos dominios de las toxinas de *B. cereus* con los receptores superficiales de las células eucariotas, desencadena una cascada de respuestas celulares que generan modificaciones funcionales y estructurales de las mismas (Minnaard et al 2001; Minnaard et al 2004). El hecho de que no se observara un efecto antagónico sobre las hemolisinas pero sí sobre aquellas que afectan a las células Caco-2 y Vero, podría estar relacionado con la naturaleza de cada una de ellas. De hecho, el tratamiento térmico, durante 5 minutos a $100^{\circ}C$, de los SF inhibió completamente el efecto sobre las líneas celulares sin afectar su actividad hemolítica. En este mismo sentido, Ruas-Madiedo y col. (2010), reportaron que los exopolisacáridos de lactobacilos eran capaces de antagonizar el efecto de las toxinas de *B. cereus* sobre células Caco-2 con mayor efectividad que los exopolisacáridos de bifidobacterias, mientras que en el caso de los eritrocitos el perfil de antagonismo fue inverso. En nuestro caso, no podríamos descartar que las estructuras superficiales de *L. kefir*, entre ellas las proteínas de capa S, mediaran una interacción más eficiente con ciertos factores citotóxicos y no con otros (como las hemolisinas), explicando así las diferencias observadas.

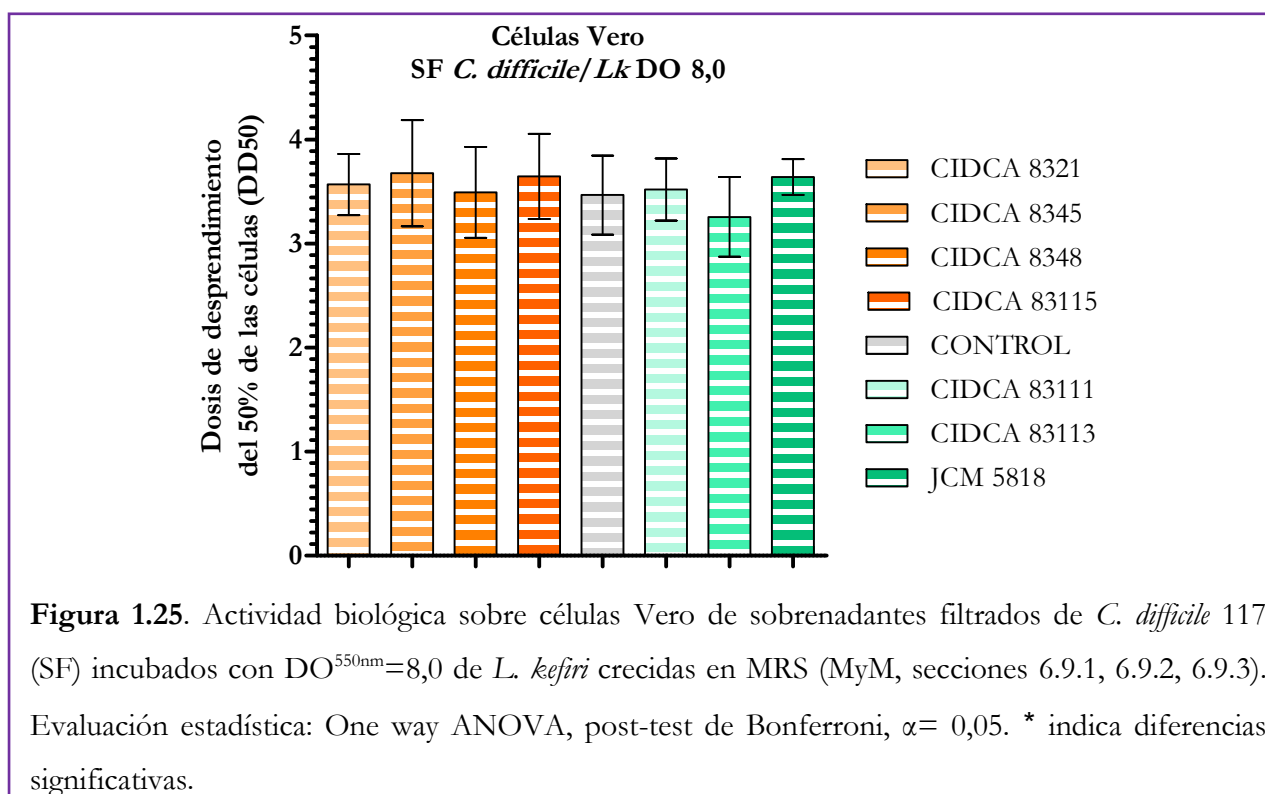
3.2.2. Antagonismo de factores extracelulares citotóxicos de *Clostridium difficile*

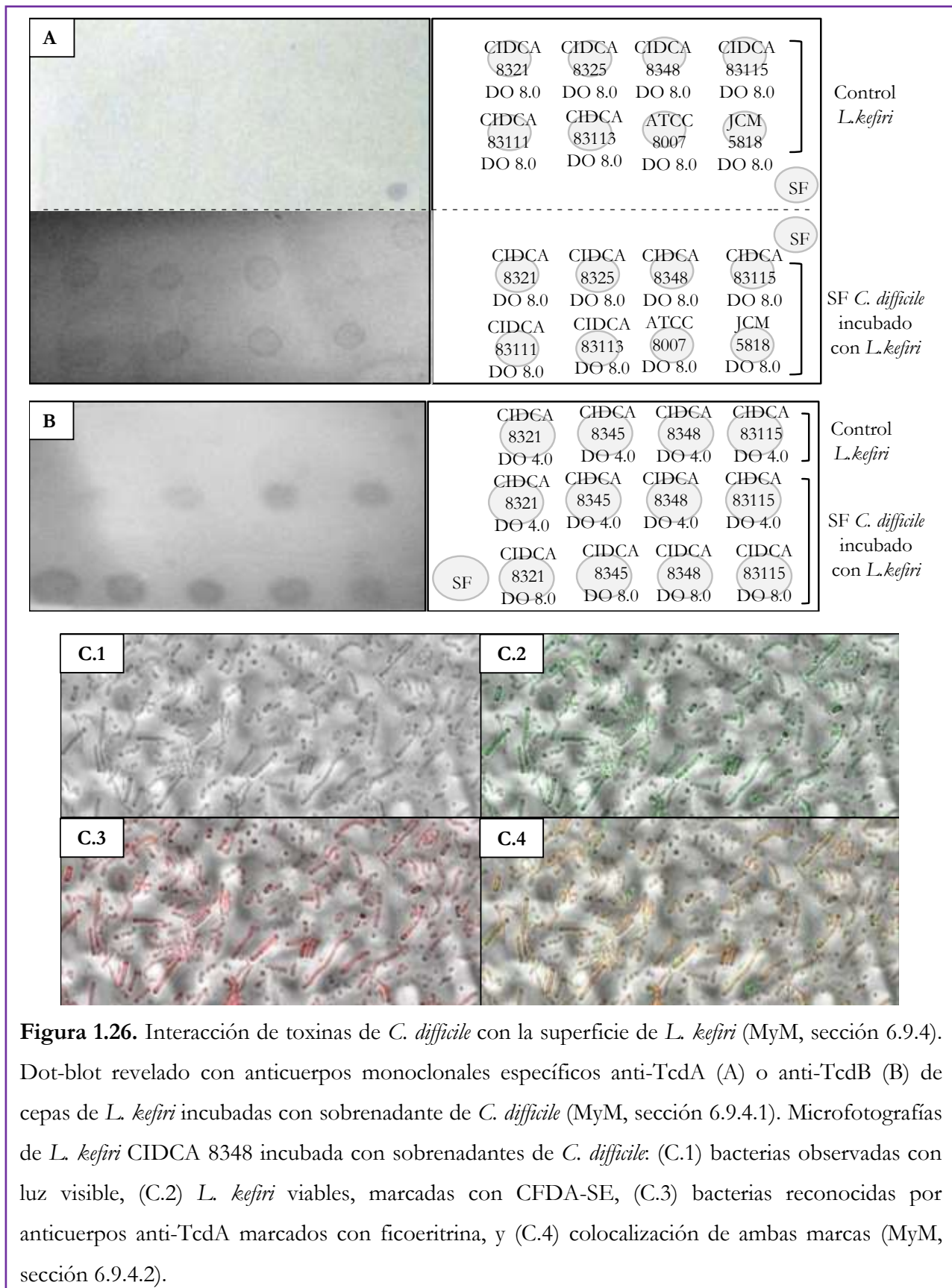
Clostridium difficile es un bacilo anaerobio Gram positivo, formador de esporos, presentes en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes. Su patogenicidad se encuentra asociada a la producción de dos toxinas con actividad glicosiltransferasa, TcdA y TcdB, que afectan la polimerización de actina y el ensamblado del citoesqueleto a través de la inactivación de las Rho GTPasas. Si bien no todas las cepas son capaces de producir toxinas, las que lo hacen pueden causar patologías intestinales de variada severidad en humanos, principalmente asociadas a desbalances en la microbiota (Burke and Lamont 2014). Las infecciones nosocomiales causadas por este patógeno, han aumentado dramáticamente en los últimos años. Se considera que es responsable del 20-30% de los casos de diarrea asociada a antibióticos y del 50-75% de los casos de colitis asociadas al consumo de antibióticos. Por otro lado, la incidencia de diarreas en pacientes hospitalizados causadas por *C. difficile* es de 1:100-1:1000 (Nitzan et al 2013).

Para los ensayos de citotoxicidad, se trabajó con sobrenadantes filtrados de cultivos de la cepa *C. difficile* 117 en fase estacionaria (MyM, sección 6.9.1). En primer lugar, los mismos fueron incubados con suspensiones de distintas densidad de *L. kefir* en fase estacionaria ($DO^{550nm}=4,0$ y $8,0$), se separaron los lactobacilos y se evaluó la citotoxicidad sobre células Vero (MyM, sección 6.9.3). El análisis de los resultados se realizó de la misma manera que para *B. cereus* (figura 1.20) y se compararon las DD50 obtenidas por la preincubación con distintas cepas. La incubación de los sobrenadantes de *C. difficile* 117 (SF) con las distintas cepas de *L. kefir* no modificó la DD50 aún en los ensayos en los que se utilizaron suspensiones bacterianas de $DO^{550nm}=8,0$ (figura 1.25).

Si bien no se observó un aumento de la DD50 al preincubar con *L. kefir*, se decidió evaluar si las toxinas de *C. difficile* se adsorbían sobre la superficie de *L. kefir*. Se utilizaron anticuerpos monoclonales comerciales contra TcdA y TcdB, para realizar ensayos de dot-blot y microscopía de fluorescencia (MyM, sección 6.9.4). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1.26. En los

ensayos de dot-blot (paneles A y B), se puede observar que las bacterias sin tratamiento no presentan reactividad contra los anticuerpos mencionados, mientras que las que fueron incubadas con SF fueron reconocidas por los anticuerpos anti-toxinas aún luego de tres lavados con PBS. Los mismos resultados se obtuvieron mediante microscopía de fluorescencia. El grupo de imágenes que integran el panel C de la figura 1.26 muestra los resultados obtenidos con el anticuerpo anti-TcdA. En el panel C.1 se muestra una microfotografía de las bacterias observadas con la luz visible, en C.2 la fluorescencia verde de las bacterias viables se debe al uso de CFSE, en C.3 se muestran las bacterias con fluorescencia roja debido a la reactividad con anticuerpos contra TcdB y, finalmente, en C.4 se muestra la colocalización de ambas marcas. Con estos resultados, se concluyó que las toxinas de *C. difficile* son adsorbidas sobre la superficie de *L. kefir* pero no en cantidades que permitan disminuir la citotoxicidad de las mismas sobre células Vero.





Dado que la estructura más externa de la superficie de *L. kefir* está formada por proteínas de capa S (Garrote et al 2004; Sleytr et al 2007; Mobili et al 2009b), estas moléculas podrían estar involucradas en la interacción con las toxinas de *C. difficile*. Se decidió estudiar si las proteínas de capa S solubles eran capaces de inhibir la acción de las toxinas de *C. difficile*. Para evaluarlo, se realizaron ensayos de citotoxicidad sobre células Vero preincubando SF con proteínas de capa S de distintas cepas de *L. kefir* (MyM, sección 6.9.2). En la figura 1.27 se muestran los resultados obtenidos. En todos los casos, la preincubación de SF con extractos de capa S, de cepas auto-agregantes o no auto-agregantes, fue capaz de aumentar la DD50. Sin embargo, los extractos de capa S de cepas auto-agregantes tuvieron un efecto significativamente superior que los de las bacterias no auto-agregantes.

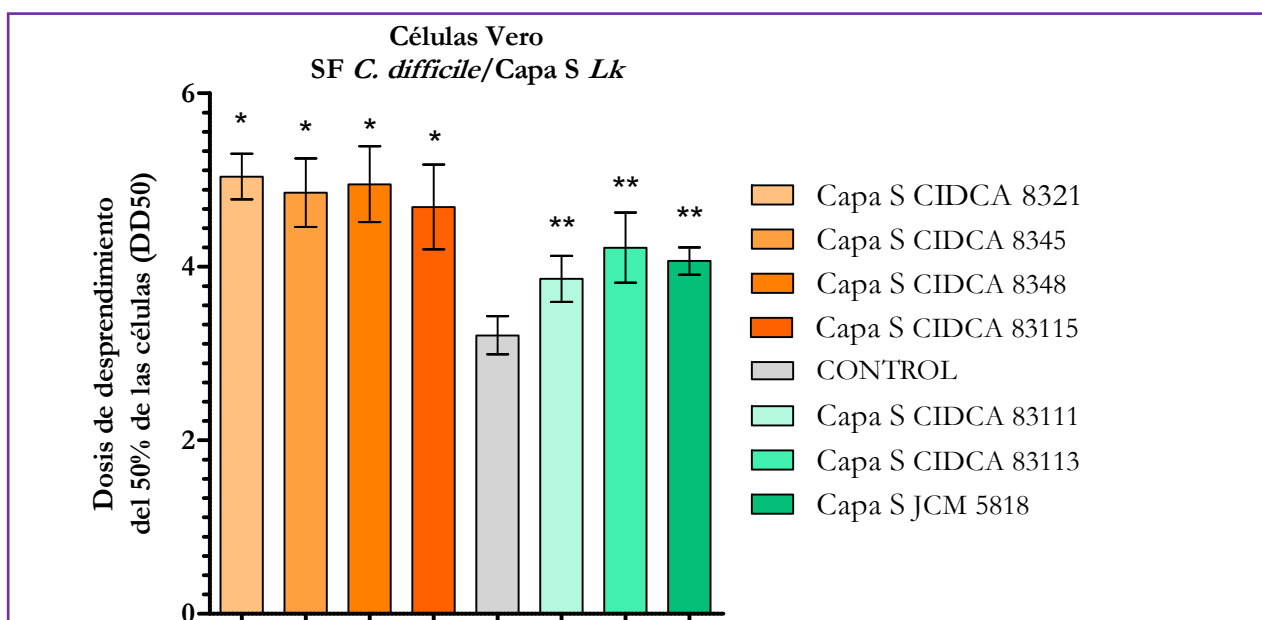
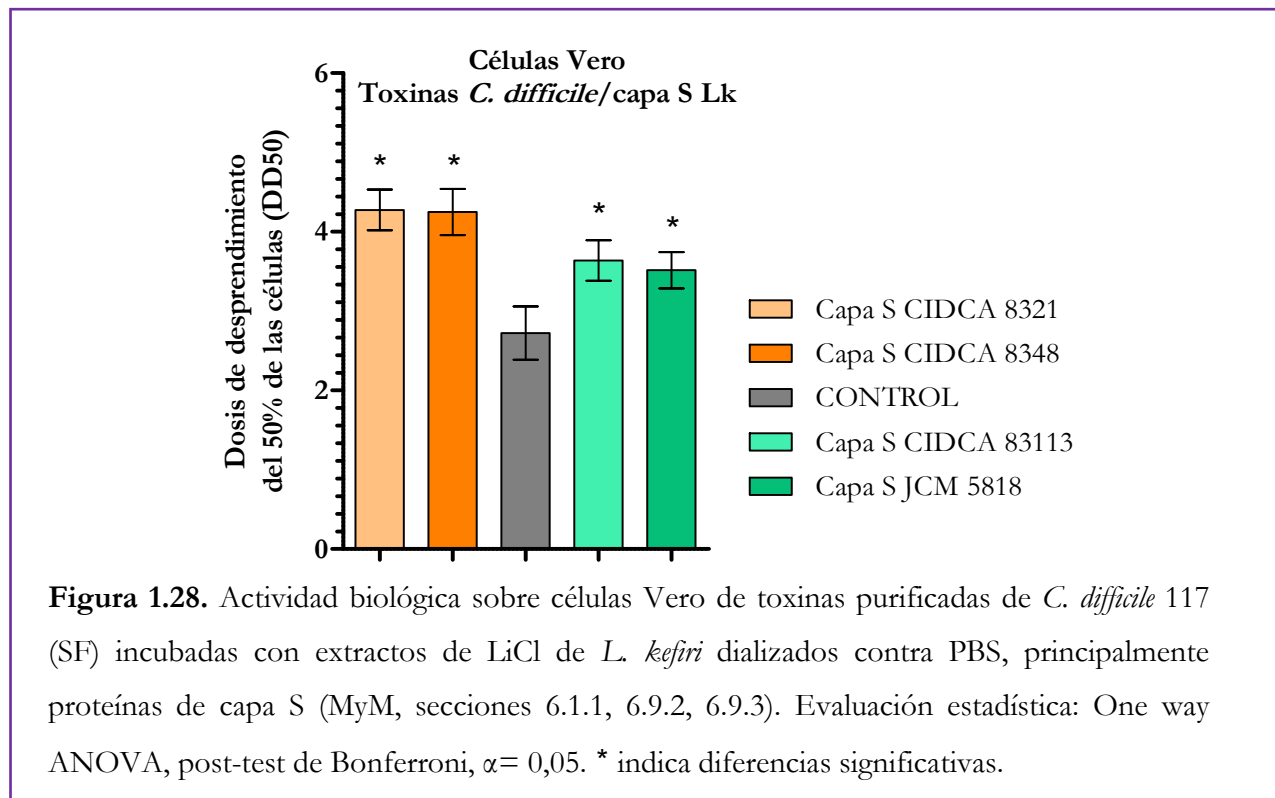


Figura 1.27. Actividad biológica sobre células Vero de sobrenadantes filtrados de *C. difficile* 117 (SF) incubados con extractos de LiCl de *L. kefir* dializados contra PBS, principalmente proteínas de capa S (MyM, secciones 6.1.1, 6.9.2, 6.9.3). Evaluación estadística: One way ANOVA, post-test de Bonferroni, $\alpha = 0,05$. * indica diferencias significativas respecto del control y de las cepas no-agregantes, ** indica diferencias significativas respecto del control.

Se realizaron también, ensayos de citotoxicidad sobre células Vero (MyM, sección 6.9.3) utilizando toxinas de *C. difficile* purificadas. La concentración de TcdA y TcdB se fijó en 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se

las pre-incubó con extractos de capa S de cuatro cepas de *L. kefir* (CIDCA 8321, 8348, 83113 y JCM 5818) antes de incubar sobre las células eucariotas. Los resultados se muestran en la figura 1.28. Los extractos de capa S fueron capaces de inhibir el efecto de las toxinas purificadas sobre células Vero, tal como fue observado en los ensayos realizados utilizando SF.



Para complementar los resultados obtenidos en los ensayos de desprendimiento celular, se evaluó la estructura celular mediante tinción fluorescente del citoesqueleto con faloidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (MyM, sección 6.9.3). Con estos ensayos se demostró la relación directa entre desprendimiento y conservación de la integridad celular. En la figura 1.29.A se muestra el aspecto de las células Vero no tratadas, en las que se observa una distribución homogénea de la fluorescencia celular y zonas con mayor intensidad, que corresponden con las regiones de uniones estrechas entre células adyacentes. En la parte B de esta figura, se observa redondeo celular provocado por la pérdida de la integridad del citoesqueleto y ruptura de las uniones estrechas entre las células, como consecuencia del tratamiento con una concentración de SF *C. difficile* de 3,1 % v/v (DD50). Los

mismos resultados se obtuvieron al pre-incubar el SF *C. difficile* con *L. kefir* CIDCA 8348 DO^{550nm}=8,0 (figura 1.29.D). Finalmente, en la figura 1.29.C, se observa que en la monocapa de células Vero incubada con una concentración de 3,1 % v/v de SF *C. difficile* pre-incubada con extractos de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348, no se afectó la integridad celular.

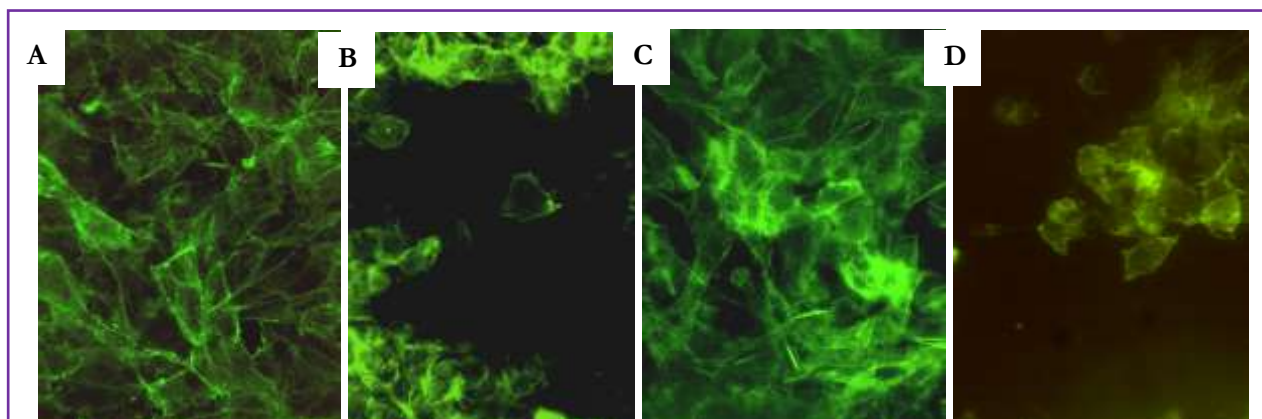
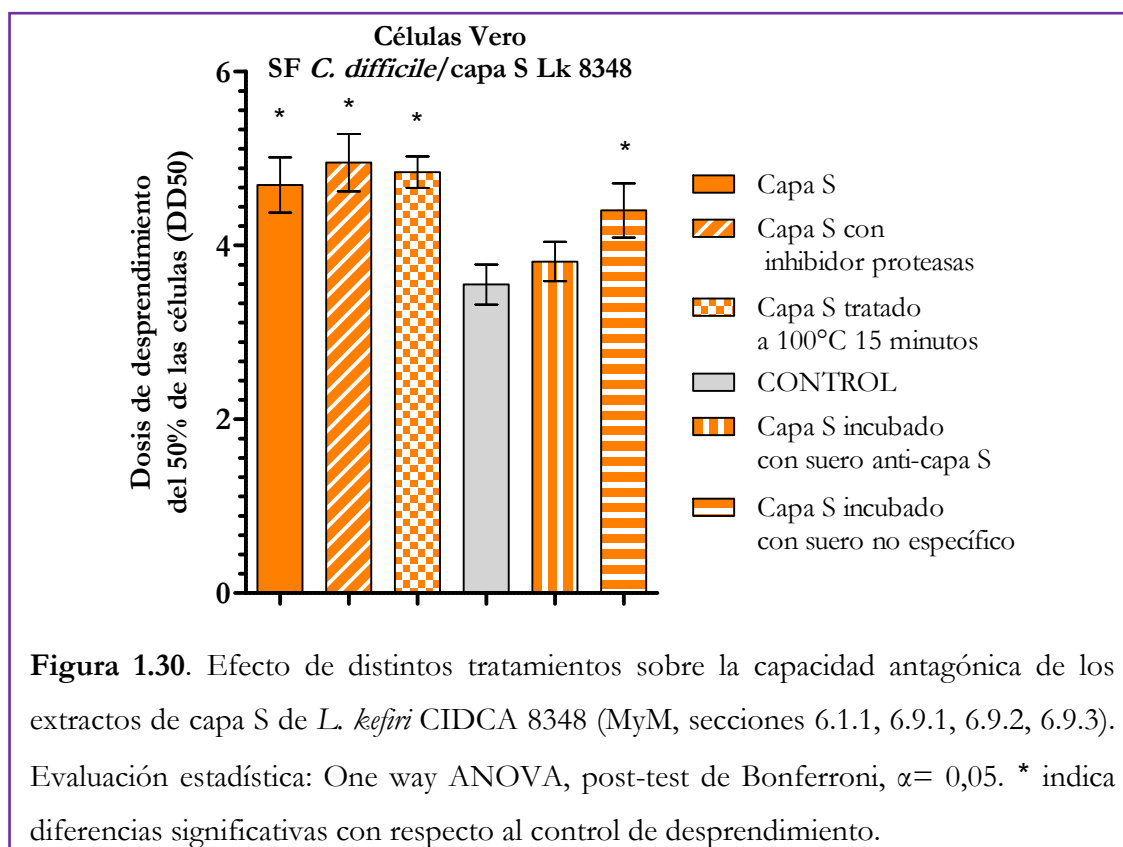


Figura 1.29. Tinción de citoesqueleto, con faloidina-FITC, realizada sobre células Vero (A), células incubadas con SF de *C. difficile* (B), células incubadas con sobrenadantes de *C. difficile* incubados con extractos de LiCl proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348, (C) o células incubadas con sobrenadantes de *C. difficile* incubados *L. kefir* CIDCA 8348 (D) (MyM, secciones 6.1.1, 6.9.1, 6.9.2, 6.9.3). En B, C y D, se utilizó la misma concentración de sobrenadante de *C. difficile* (DD50 del sobrenadante no tratado).

Se ha probado que las proteínas de capa S pueden formar espontáneamente estructuras regulares similares a las presentes en las superficies bacterianas (Sleytr and Beveridge 1999). Sin embargo, se ha descrito que la mayor parte de las proteínas de capa S presentan un superficie externa suave y una interna rugosa (Schuster and Sleytr 2009) que puede estar expuesta en proteínas recristalizadas en solución. Tomando en cuenta estas propiedades, pensamos que las estructuras adoptadas por las proteínas de capa S en solución son diferentes a las que se encuentran sobre la superficie de *L. kefir*, lo que podría causar que la afinidad por las toxinas de *Clostridium* sea diferente. También es posible que la capa S de la superficie bacteriana interactúe con regiones de la toxina (dominios catalíticos o de unión) diferentes de aquellos con los que interactúa la proteína en solución. Por otro lado, Mobili y col. (2009a; 2009b) han determinado, mediante MALDI-TOF y espectroscopía

FTIR, que las proteínas de capa S de distintas cepas de *L. kefir* presentan una altísima heterogeneidad tanto en su estructura primaria como secundaria. Estos hallazgos podrían contribuir para explicar las diferencias observadas en el antagonismo ejercido, sobre la actividad biológica de las toxinas de *C. difficile*, por extractos de capa S de cepas auto-agregantes y no auto-agregantes.

Finalmente, para intentar dilucidar el mecanismo involucrado en la inhibición de la actividad biológica de las toxinas de *C. difficile*, se realizaron distintos tratamientos sobre los extractos de capa S, antes de incubarlos con SF (figura 1.30). Banerjee y col. (2009) propusieron que la disminución de la actividad biológica observada por la incubación de toxinas de *Clostridium* con sobrenadantes de lactobacilos, se debe a la actividad proteolítica de estos últimos. Esta hipótesis correlaciona con lo descrito para *Saccharomyces boulardii* (Castagliuolo et al 1999).



Para poner en evidencia la actividad proteasa, se trató térmicamente el extracto (100°C, 15 minutos) o se incubó con un inhibidor de proteasas. Ninguno de estos dos tratamientos pudo inhibir el efecto protector ejercido sobre las células Vero (figura 1.29), por lo que descartamos la actividad proteolítica como mecanismo de acción. Por otro lado, el único tratamiento capaz de impedir el efecto protector, fue la incubación con anticuerpos policlonales específicos de proteínas de capa S de *L. kefir* (figura 1.30). Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio se debe a una interacción directa entre las toxinas de *C. difficile* y las proteínas de capa S.

Hasta este punto se determinó que las cepas de *L. kefir* poseen propiedades antimicrobianas y que son capaces de inhibir los efectos citotóxicos de ciertos productos de secreción de *B. cereus*, a la vez que sus proteínas de capa S antagonizan el efecto de las toxinas de *C. difficile* sobre células eucariotas. Se continuó la caracterización *in vitro* de las propiedades probióticas, evaluando la capacidad inmunomodulatoria de las distintas cepas de *L. kefir*.

3.3. Propiedades inmunomodulatorias

Se realizó la caracterización de la capacidad inmunomodulatoria de cepas de *L. kefir* sobre células de origen humano. Los estudios *in vitro* permiten la exposición directa de células aisladas a diferentes clases de estímulos. Se trabajó con células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) y la línea celular epitelial intestinal Caco-2 para realizar ensayos de co-incubación en ausencia de estímulos proinflamatorios, y con el sistema reportero Caco-2 ccl20: luc (Nempont et al 2008) para estudiar el impacto de *L. kefir* en la respuesta frente a un agonista de receptores tipo Toll (TLR).

3.3.1. Propiedades inmunomodulatorias sobre PBMC

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) son ampliamente utilizadas para estudiar la capacidad inmunomodulatoria de microorganismos potencialmente probióticos, principalmente los pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Helwig et al 2006; Sokol et al 2008; López et al 2011; Dong et al 2012). Muchos estudios evalúan el efecto de los probióticos en la función inmune, analizando la relación entre las subpoblaciones de linfocitos T CD4+, Th1 y Th2, o el balance de las citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, luego de la co-incubación de PBMC con el microorganismo a estudiar. En general, todas estas bacterias inducen la producción de TNF- α y, particularmente los lactobacilos, suelen ser inductores de citoquinas asociadas al perfil Th1 (tabla 1.5). La correlación que pudiera existir entre el perfil inmunomodulatorio determinado por estos estudios y los resultados *in vivo*, es materia de constante discusión (Foligne et al 2007; Kekkonen et al 2008). En este trabajo de tesis, utilizaremos estos ensayos para realizar una caracterización de las cepas de *L. kefir*. Estos ensayos se realizaron en colaboración con la Dra. Silvia Racedo.

Las células Th1 producen IL-2, IFN- γ y TNF- α que activan a los macrófagos para estimular a las células de la inmunidad contra patógenos intracelulares y promueven la inflamación. Por otro lado, secretan IL-3 y GM-CSF que estimulan la producción de leucocitos en la médula ósea. Las células Th2, secretan IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 y IL-31, responsables de estimular a las células B para producir IgE alérgeno específica, generar inflamación caracterizada por la presencia de eosinófilos, mastocitos y células T CD4+ activadas (Santarlasci et al 2013; Cosmi et al 2013). Las células T regulatorias secretan IL-10 y TGF- β , moléculas capaces de suprimir la producción de IgE y la proliferación Th1/Th2. Por otro lado, las células Th17 secretan IL-17 e IL-22, son las principales responsables de la protección contra patógenos extracelulares y hongos, y reclutan y activan neutrófilos. Interleuquina-17 es una citoquina pro-inflamatoria, que es suprimida por IFN- γ e IL-4. Otras subpoblaciones menos estudiadas son las células Th22, Th9, y las Thf (Zygmunt and Veldhoen 2011; Cosmi et al 2013).

Tabla 1.5. Inducción de mediadores inmunológicos en PBMC por distintos lactobacilos

Lactobacilo estudiado	Principales hallazgos	Referencia
<i>L. rhamnosus</i> GG y E509		
<i>L. plantarum</i> E98	-todas las cepas ↑ TNF-α e IL-6	(Miettinen et al 1996)
<i>L. acidophilus</i> E507	-la inducción de citoquinas es más importante si las bacterias están viables	
<i>L. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> E506 y E510		
<i>L. rhamnosus</i> 50A y 7D	- ↑↑↑ IL-12 <i>L. paracasei</i>	(Hessle et al 1999)
<i>L. plantarum</i> 52A y 67B	- ↑ IL-12 <i>L. plantarum</i> y <i>L. rhamnosus</i>	
<i>L. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> 02A y 34D	- ↑↑↑ IL-10 <i>L. rhamnosus</i> - ↑ IL-10 <i>L. plantarum</i> y <i>L. paracasei</i>	
<i>L. rhamnosus</i> GG	- ↔ IL-4 e IL-5	
<i>L. casei</i> ATCC393	- ↑ IFN-γ para todas las cepas	(Pochard et al 2002)
<i>L. plantarum</i> NCIMB8826		
<i>L. acidophilus</i> LA 201	-todas las cepas ↑ IL-12 e IL-10	(Drouault-Holowacz et al 2006)
<i>L. plantarum</i> LA 301	-la combinación de cepas genera menor estimulación que las cepas aisladas	
<i>L. salivarius</i> LA 302		
<i>L. acidophilus</i> MB 443	- <i>L. bulgaricus</i> y <i>L. plantarum</i> ↑↑↑ IL-10, IL-1β y TNF-α - ↑ IL-10, IL-1β y TNF-α <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> y <i>L. rhamnosus</i>	(Helwig et al 2006)
<i>L. rhamnosus</i> GG		
<i>L. casei</i> MB 451		
<i>L. delbrueckii</i> 453		
<i>L. plantarum</i> MB 452		
<i>L. salivarius</i> Ls33		
<i>L. rhamnosus</i> Lr32	-todas las cepas ↑ TNF-α	(Foligne et al 2007)
<i>L. casei</i> B123	- <i>L. acidophilus</i> IPL908, <i>L. salivarius</i> Ls33 y <i>L. rhamnosus</i> Lr32 ↑↑↑ IL-10	
<i>L. acidophilus</i> NCFM y IPL908	- <i>L. plantarum</i> Lp115, <i>L. plantarum</i> NCIMB8826 y <i>L. acidophilus</i> NCFM ↑↑↑ IL-12	
<i>L. plantarum</i> NCIMB8826 y Lp115		
<i>L. paracasei</i> I 1688, <i>L. salivarius</i> I 1794	-las cepas solas y combinadas ↑ IL-12 e IFN-γ	
<i>L. plantarum</i> L2, L8 y L9		
<i>L. rhamnosus</i> GG	-todas las cepas ↑ TNF-α, IL-10, IFN-γ, IL-12	(Wang et al 2009)
<i>L. acidophilus</i> L050103-12		
<i>L. rhamnosus</i> GG y CS25	-todas las cepas ↑ TNF-α	(Gaudana et al 2010)
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014 y CS23	-todas las cepas ↓ IL-12p40 excepto <i>L. plantarum</i> CS23	
<i>L. delbrueckii</i> M	- ↔ TGF-β e IL-8	
<i>L. fermentum</i> ASt1	- ↑ IL-15 por todas las cepas excepto <i>L. rhamnosus</i> CS25	
<i>L. casei</i> Shirota		(Dong et al 2012)
<i>L. rhamnosus</i> GG ATCC 5310	-todas las cepas ↑ TNF-α, IL-10, IL-6 e IL-1β	
<i>L. plantarum</i> NCIMB 8826	-todas las cepas ↑ IFN-γ excepto <i>L. rhamnosus</i> - <i>L. casei</i> Shirota y <i>L. plantarum</i> ↑ IL-12p70	
<i>L. reuteri</i> NCIMB 11951	- ↔ IL-8	
<i>L. paraplantarum</i> BGCG11	- ↑ TNF-α, IL-10, IFN-γ, IL-6 e IL-1β - ↔ IL-12 y IL-17	(Nikolic et al 2012)

↑: inducción; ↑↑↑: mayor inducción; ↓: disminución; ↔: sin modificación

Es importante destacar que las células T no son las únicas células de los PBMC que producen citoquinas como respuesta al estímulo de los probióticos. Las células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas, monocitos y células B, también contribuyen. Las citoquinas IL-10 e IL-12 son secretadas por las células dendríticas, monocitos y macrófagos, como respuesta a productos bacterianos. La IL-12 promueve las respuestas Th1, y estimula a las células T y NK para secretar IFN- γ , mientras que la IL-10 disminuye la intensidad de las respuestas inflamatorias e induce una respuesta mediada por anticuerpos. Por otro lado, la IL-10 y el TNF- α son producidas por los linfocitos T y los monocitos, y tienen roles opuestos en las respuestas inflamatorias.

Por otro lado, si se tiene en cuenta que las citoquinas son moléculas que se regulan mutuamente, es claro pensar que, el balance entre ellas será crítico en la diferenciación a los distintos perfiles T efectoras. Es por esto que la relación IL-10: IL-12 se usa como un indicador del balance Th1:Th2, mientras que una relación TNF- α : IL-10 elevada, indicaría una potencial polarización hacia un perfil Th1 con un aumento de la respuesta inmune celular. Finalmente, la relación IL-1 β :IL-12, estaría asociada con la inducción de un perfil Th17 (Kaji et al 2010; López et al 2011; Zygmunt and Veldhoen 2011; Dong et al 2012).

En primer lugar, se evaluó la concentración de citoquinas en el sobrenadante de cultivo de PBMC luego de la incubación durante 24 horas con distintas cepas de *L. kefir* (MyM, sección 6.10.1). En la tabla 1.6 se muestran los resultados obtenidos. Como era de esperar, todas las cepas indujeron un aumento significativo de la concentración de TNF- α e IL-8. La concentración de IFN- γ únicamente aumentó en presencia de *L. kefir* CIDCA 8321 y 83115. La mayoría de las cepas aumentaron la expresión de IL-1 β , excepto CIDCA 83111 y JCM 5818. Esta última, tampoco fue capaz de modificar la secreción de IL-6 e IL10, que fueron aumentadas por el resto de las cepas estudiadas. Finalmente, los niveles de IL-2, IL-4, IL-5, TNF- β y TGF- β 1 fueron dosados, pero resultaron indetectables por el método utilizado.

Tabla 1.6. Secreción de citoquinas por PBMC incubados con *L. kefir* (concentraciones expresadas en mg/mL) (MyM, sección 6.10.1).

<i>L. kefir</i>	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-10	IFN- γ	TNF- α	IL-12p70
CIDCA 8321	1,3 \pm 0,5*	1,6 \pm 0,7*	5,8 \pm 1,3	0,20 \pm 0,08*	0,13 \pm 0,02*	10,4 \pm 3,8*	0,31 \pm 0,07
CIDCA 8325	2,1 \pm 0,1*	2,6 \pm 0,1*	4,8 \pm 0,5	0,31 \pm 0,01*	0,06 \pm 0,04	16,2 \pm 0,5*	0,57 \pm 0,09
CIDCA 8345	1,7 \pm 0,1*	2,0 \pm 0,1*	4,4 \pm 0,1	0,23 \pm 0,02*	0,08 \pm 0,02*	15,4 \pm 1,1*	0,44 \pm 0,02
CIDCA 8348	1,9 \pm 0,1*	2,7 \pm 0,4*	3,9 \pm 0,2	0,43 \pm 0,09*	0,08 \pm 0,01*	13,6 \pm 0,2*	0,5 \pm 0,1
CIDCA 83115	1,0 \pm 0,1*	1,8 \pm 0,2*	3,6 \pm 0,2	0,19 \pm 0,01*	0,05 \pm 0,01*	8,6 \pm 0,5*	0,7 \pm 0,2
CIDCA 83111	0,6 \pm 0,1	2,4 \pm 0,1*	3,8 \pm 0,2	0,25 \pm 0,08*	0,10 \pm 0,02*	9,9 \pm 0,2*	0,4 \pm 0,2
CIDCA 83113	1,1 \pm 0,1*	1,7 \pm 0,1*	3,9 \pm 0,2	0,20 \pm 0,01*	0,05 \pm 0,02	7,5 \pm 0,4*	0,47 \pm 0,05
JCM 5818	0,6 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	4,2 \pm 0,3	0,08 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01*	6,9 \pm 1,6*	0,2 \pm 0,1
ATCC 8007	1,2 \pm 0,3*	2,2 \pm 0,1*	3,9 \pm 0,1	0,28 \pm 0,02*	0,06 \pm 0,01*	10,3 \pm 0,7*	0,6 \pm 0,1
PBMC no estimuladas	0,03 \pm 0,02	0,07 \pm 0,02	0,4 \pm 0,2	0,09 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,38 \pm 0,01	0,4 \pm 0,1

Evaluación estadística: One way ANOVA, post-test de Bonferroni, $\alpha = 0,05$. * indica diferencias significativas.

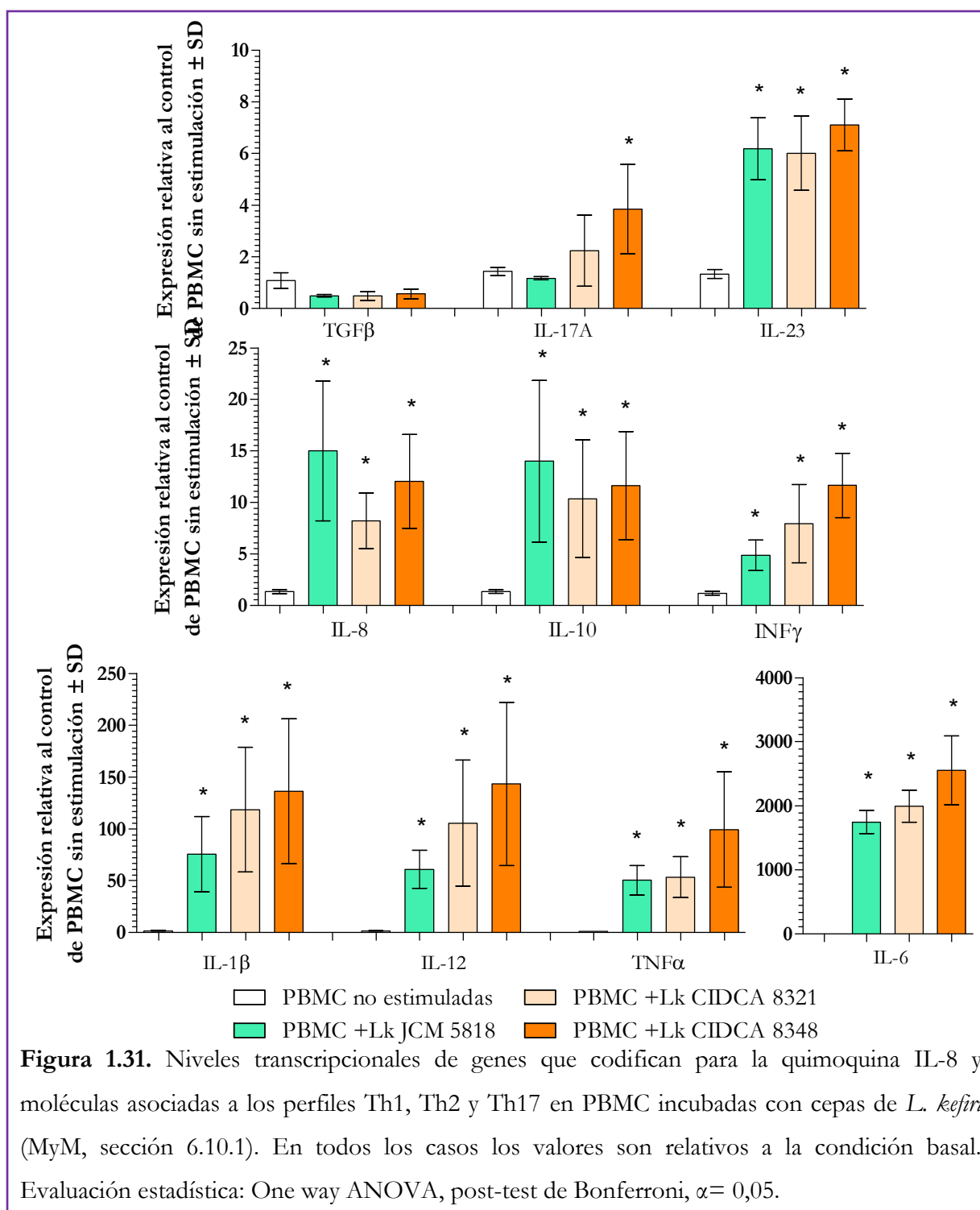
La evaluación de la relación IL-10: IL-12, TNF- α : IL-10 e IL-1 β : IL-12 para cada una de las cepas estudiadas, se muestra en la tabla 1.7. En base a estos resultados, se seleccionaron tres cepas para evaluar la expresión génica. La cepa *L. kefir* CIDCA 8348, fue la que menor relación TNF- α :IL-10 presentó, y mayor IL-10:IL-12. Estos resultados podrían indicar que esta cepa presenta menor relación Th1:Th2. En el otro extremo, encontramos a la cepa JCM 5818, que presenta la relación TNF- α :IL-10 más alta y la menor entre IL-10:IL-12, mientras que la cepa CIDCA 8321, mostró un comportamiento intermedio. En cuanto a la relación IL-1 β : IL-12, asociada con el perfil Th17 (López et al 2011), no se observaron diferencias marcadas entre las cepas.

Tabla 1.7. Relación IL-10: IL-12, TNF- α : IL-10 e IL-1 β : IL-12 determinadas en PBMC luego de la incubación con cepas de *L. kefir*

<i>Lactobacillus kefir</i>	IL-10:IL-12	TNF- α :IL-10	IL-1 β :IL-12
<i>CIDCA 8321</i>	0,66 \pm 0,24 ^{d,e,f}	50,9 \pm 11,4 ^{e,d}	4,2 \pm 0,7 ^c
<i>CIDCA 8325</i>	0,55 \pm 0,06 ^e	51,7 \pm 0,1 ^d	3,7 \pm 0,9 ^c
<i>CIDCA 8345</i>	0,51 \pm 0,02 ^e	66,8 \pm 4,7 ^e	3,9 \pm 0,5 ^c
<i>CIDCA 8348</i>	0,87 \pm 0,18 ^f	31,2 \pm 0,5 ^b	3,8 \pm 0,5 ^c
<i>CIDCA 83115</i>	0,26 \pm 0,01 ^b	44,9 \pm 2,6 ^c	1,4 \pm 0,7 ^b
<i>CIDCA 83111</i>	0,31 \pm 0,02 ^c	39,2 \pm 0,7 ^c	1,6 \pm 0,6 ^b
<i>CIDCA 83113</i>	0,42 \pm 0,02 ^d	37,4 \pm 2,1 ^c	2,3 \pm 0,2 ^b
<i>JCM 5818</i>	0,34 \pm 0,03 ^c	81,8 \pm 19,6 ^f	3,0 \pm 0,9 ^{b,c}
<i>ATCC 8007</i>	0,5 \pm 0,03 ^c	35,2 \pm 3,5 ^b	2,1 \pm 0,8 ^b
PBMC no estimuladas	0,05 \pm 0,02 ^a	8,3 \pm 0,2 ^a	0,08 \pm 0,05 ^a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre resultados.

Para la evaluación de la expresión génica, las PBMC se incubaron durante 4 h con *L. kefir* CIDCA 8348, CIDCA 8321 o JCM 5818 (MyM, sección 6.10.1). Se cuantificó la expresión de la quimoquina IL-8 y de distintas moléculas asociadas a los perfiles Th1, Th2 y Th17 (MyM, sección 6.10.1). En la figura 1.31 se muestran los resultados obtenidos. Se observó que las tres cepas ensayadas incrementaron significativamente la expresión de los genes que codifican para IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF- α , mientras que la expresión de TGF- β no fue modificada. Estos resultados coinciden con el perfil de citoquinas secretadas descripto previamente. Sin embargo, los genes que codifican para IL-12p70 e IFN- γ aumentaron su expresión a pesar de que sus concentraciones no se modificaran en los sobrenadante de cultivo. Por otro lado, se cuantificó la expresión de dos citoquinas que no fueron determinadas en el sobrenadante: IL-23, responsable del mantenimiento del perfil Th17, e IL-17A, principal citoquina secretada por las células Th17. Las tres cepas estudiadas aumentaron la expresión de IL-23, y todas mostraron una tendencia a un aumento de IL17A. Sin embargo, únicamente la incubación de PBMC con *L. kefir* CIDCA 8348 aumento significativamente la expresión de IL-17A.



En general, las especies pertenecientes al género *Lactobacillus*, estimulan la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-12 e IFN- γ , al ser co-incubadas con PBMC. Tal como se observó en nuestros ensayos, la intensidad de esta inducción es dependiente de la cepa utilizada (Gaudana et al 2010; Evrard et al 2011; de Roock et al 2011; Dong et al 2012). Los resultados

obtenidos, sugieren que las cepas de *L. kefir* inducen un perfil Th1 o Th17 en PBMC, y que algunas cepas estimulan también moléculas anti-inflamatorias como IL-10. Estas últimas, son interesantes candidatos para ser utilizados en modelos animales de enfermedades inflamatorias (Foligne et al 2007; Dong et al 2012).

3.3.2. Propiedades inmunomodulatorias sobre células Caco-2

Otro modelo utilizado frecuentemente para el estudio de la capacidad inmunomodulatoria de microorganismos, es la incubación con líneas celulares epiteliales. Para el estudio del efecto de la interacción de *L. kefir* con el epitelio intestinal, se utilizó la línea celular Caco-2. En la tabla 1.8, se muestran los resultados recolectados en bibliografía para distintas especies de *Lactobacillus*, utilizando distintas líneas celulares epiteliales (HT-29, Caco-2 y SW-480). En general el perfil de estimulación es cepa dependiente y, este tipo celular responde con menor intensidad ante los estímulos que las PBMC. Si bien la inducción de mediadores pro-inflamatorios (IL-8, IL-6 and TNF- α) en líneas celulares epiteliales ha sido descrita para algunas cepas de lactobacilos (Gaudana et al. 2010), la mayor parte de los investigadores consideran que la respuesta de estas células, en ausencia de células inmunocompetentes, es muy pobre (Zoumpopoulou et al 2009). Sin embargo, ha sido reportado recientemente, que las bacterias probióticas podrían regular la permeabilidad del epitelio intestinal a través de mecanismos dependientes de TNF- α (Corridoni et al 2012).

En la figura 1.32 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la expresión génica (MyM, sección 6.10.1). Estos ensayos se realizaron con las tres cepas seleccionadas mediante los estudios realizados con PBMC. Si bien la co-incubación con *L. kefir* durante 24 horas, no modificó los niveles de citoquinas secretadas en sobrenadante de cultivo, se observó un aumento significativo de la expresión de IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α en las células co-incubadas con la cepa CIDCA 8348 durante 4 horas. Es importante destacar que otros autores también han observado aumento en la expresión génica de células intestinales estimuladas con lactobacilos, con niveles indetectables de citoquinas en

sobrenadantes de cultivo (Ohkusa et al 2009). Esto podría deberse a la mayor sensibilidad de la técnica utilizada en el primer caso.

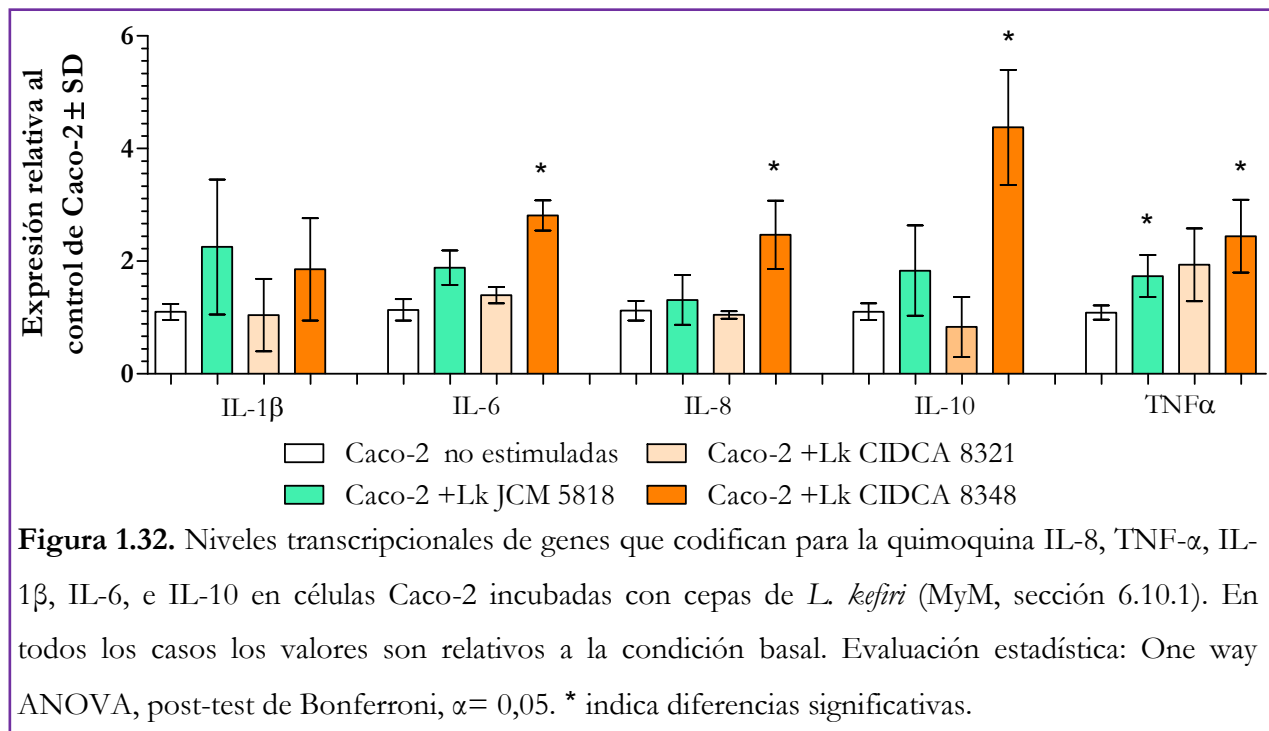
Tabla 1.8. Inducción de mediadores inmunológicos en líneas celulares epiteliales.

Lactobacilo estudiado/ Células y técnica utilizadas	Principales hallazgos	Referencia
<i>Lactobacillus sakei</i> <i>L. johnsonii</i> Caco-2, qRT-PCR	↔ IL-8, IL-1 β y TNF- α	(Haller et al 2000)
<i>L. johnsonii</i> La1 <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LB-021001 SW- 480 y HT-29, ELISA y qRT-PCR	-↔ secreción de IL-8, IL-6, MCP-1, TNF- α e IL-18, por debajo del límite de detección en sobrenadante de cultivo de ambas líneas. Expresión mRNA en SW- 480 y HT-29 -IL-8: \uparrow <i>L. johnsonii</i> y <i>L. delbrueckii</i> -TNF- α , MCP-1, IL-18: ↔ <i>L. johnsonii</i> y <i>L. delbrueckii</i> -IL-6: \uparrow <i>L. johnsonii</i> y <i>L. delbrueckii</i>	(Ohkusa et al 2009)
<i>L. rhamnosus</i> CS25 <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 y CS23 <i>L. delbrueckii</i> M <i>L. fermentum</i> ASt1	-todas las cepas \uparrow TNF- α -todas las cepas \downarrow IL-12p35 excepto <i>L. plantarum</i> CS23 - \uparrow IL-8 <i>L. rhamnosus</i> CS25, <i>L. fermentum</i> y CS23 y <i>L. fermentum</i> - \downarrow IL-8 <i>L. delbrueckii</i> y <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 - \uparrow IL-15 por todas las cepas excepto <i>L. rhamnosus</i> CS25	(Gaudana et al 2010)
<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> Caco-2 y HT-29, qRT-PCR	-IL-4: ↔ en Caco-2; \uparrow <i>L. plantarum</i> , \downarrow <i>L. acidophilus</i> , \downarrow <i>L. paracasei</i> y ↔ <i>L. rhamnosus</i> en HT-29 -IL-10: \downarrow todas las cepas en Caco-2 y HT-29, excepto \uparrow <i>L. plantarum</i> en HT- 29 -TGF- β 1: \uparrow <i>L. rhamnosus</i> en HT-29 -IL-6: ↔ en Caco-2 y HT-29 -IL-18: $\uparrow\uparrow\uparrow$ <i>L. plantarum</i> en HT-29 y $\uparrow\uparrow\uparrow$ <i>L. rhamnosus</i> en las dos líneas celulares. -TNF- α : \downarrow todas las cepas en las dos líneas celulares	(Bahrami et al 2011)

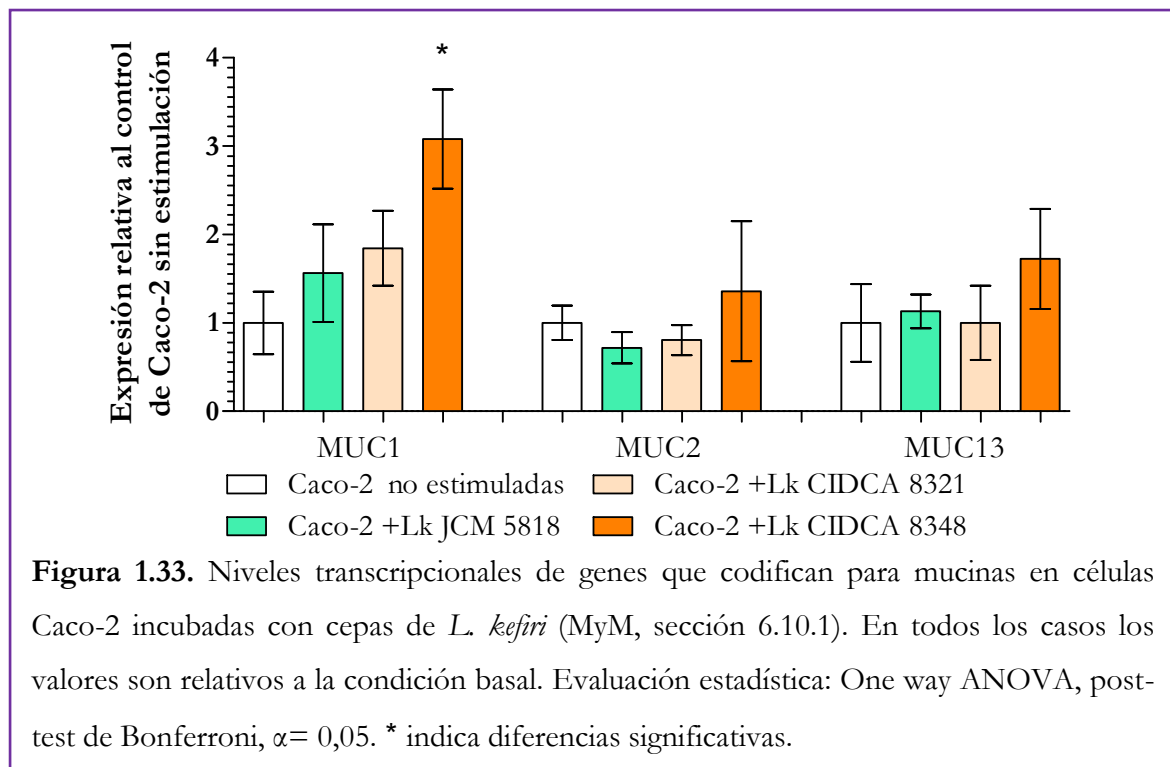
\uparrow : inducción; $\uparrow\uparrow\uparrow$: mayor inducción; \downarrow : disminución; ↔: sin modificación

Las cepas de *L. kefir* utilizadas en este estudio han sido caracterizadas previamente en cuanto a su hidrofobicidad superficial y su capacidad de autoagregación y coagregación con microorganismos, adhesión a células Caco-2 (Golowczyc et al 2007; Golowczyc et al 2009), y se ha descrito, la heterogeneidad de sus proteínas superficiales (Mobili et al 2009b). Las propiedades superficiales

diferenciales de las cepas de *L. kefir* podrían tener un impacto directo en la interacción con las células estudiadas y ser responsables de las diferencias observadas en los perfiles inmunomodulatorios *in vitro*.



Como se indicó previamente en este capítulo, el mucus intestinal es la primera barrera física frente al ingreso de microorganismos y sustancias. Los principales componentes de esta matriz son las mucinas, y las células responsables de su síntesis son las células de Goblet, aunque las células epiteliales también son capaces de sintetizarlas (Kim and Ho 2010). Se han descrito distintos genes que codifican para mucinas, algunas de las cuales son secretadas al medio extracelular, como MUC2, y otras permanecen ancladas a la membrana celular, como MUC1 y MUC13 (McGuckin et al 2011). Se estudió si la interacción con las tres cepas seleccionadas, era capaz de inducir la síntesis de estas proteínas a células Caco-2. En la figura 1.33 se puede observar, para la cepa *L. kefir* CIDCA 8348, un aumento en la expresión de *muc1*, sin variaciones en *muc2* y *muc13* (MyM, sección 6.10.1). Las cepas CIDCA 8321 y JCM 5818, no modificaron la expresión de ninguno de los genes evaluados.



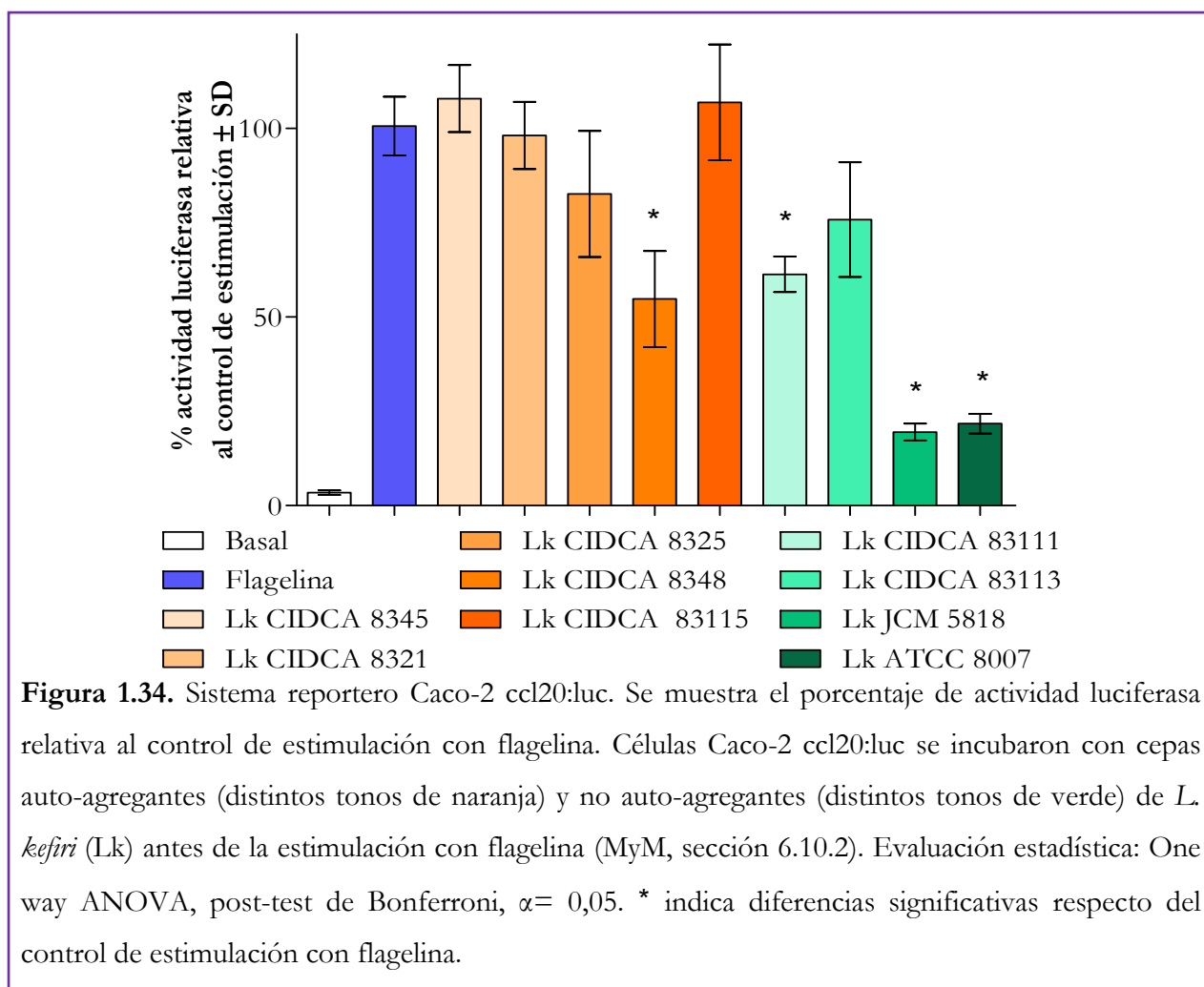
Distintos autores han descrito que la estimulación de la síntesis de mucinas es cepa dependiente. *L. rhamnosus* GG y *L. plantarum* 299v, aumentan la expresión de *muc2* y *muc3* al ser incubadas con células HT-29, en mayor medida que *L. acidophilus* (Mack et al 1999; Mack et al 2003). En la misma línea celular, se observó que *L. coryniformis* y *L. fermentum* aumentaron la expresión de *muc2*, *L. gasseri* y *L. salivarius* incrementaron *muc5b*, y ninguno de los microorganismos mencionados aumentó la síntesis de mRNA de *muc5ac* (Olivares et al 2006). Otros autores reportaron que *L. fermentum* y *L. acidophilus* estimulan la expresión del gen que codifica para MUC1, pero no de MUC2, en las células LS174T (Becker et al 2013) y que *L. casei* GG estimula la síntesis de MUC2 en células Caco-2 (Mattar et al 2002). La inducción de la síntesis de mucinas podría, *in vivo*, ser beneficiosa para el huésped debido a que se fortalecería la barrera física entre el lumen y las células epiteliales, lo que impediría el contacto de estas últimas con bacterias patógenas (Mack et al 1999; Moal and Servin 2006). En particular, se ha propuesto que MUC1, cuya expresión en células Caco-2 se vio aumentada en presencia de *L. kefir* CIDCA 8348, podría proteger de la adhesión de patógenos e inhibir el efecto citotóxico de toxinas bacterianas sobre células epiteliales al estar anclada a la superficie celular,

mientras que la liberación de su fragmento extracelular, podría tener relación con la recuperación epitelial (Kim and Ho 2010; McGuckin et al 2011).

3.3.3. Sistema reportero Caco-2 ccl20: luc

El sistema reportero Caco-2 ccl20: luc (Nempont et al 2008) consiste en una línea celular de epitelio intestinal, Caco-2, que expresa el gen de la luciferasa de luciérnaga (*Lampyris noctiluca*) bajo el control del promotor de la quimoquina CCL20. CCL20 es una molécula quimottractante de células dendríticas y, en menor medida, de macrófagos, y es muy importante tanto en la respuesta inmune intestinal como en la formación del epitelio y tejidos linfoides asociados a mucosas. La actividad del promotor de CCL20 es altamente inducible en la línea celular Caco-2 mediante estímulos pro-inflamatorios como los agonistas TLR, por lo que se considera un indicador de activación de la respuesta innata muy sensible (Romanin et al 2010). Células Caco-2 ccl20:luc confluentes se incubaron con suspensiones de *L. kefir* y, posteriormente, con flagelina. Se cuantificó la actividad luciferasa, para evaluar el efecto anti-inflamatorio de las cepas bajo estudio (MyM, sección 6.10.2). Estos ensayos se realizaron en colaboración con el Dr. David Romanin, quien ha utilizado previamente este sistema reportero para evaluar el potencial anti-inflamatorio de diferentes cepas de lactobacilos y levaduras aisladas de gránulos de kefir (Romanin et al 2010).

En la figura 1.34 se puede observar que el comportamiento de las cepas de *L. kefir* fue variable. Sólo cuatro, de las nueve cepas estudiadas, fueron capaces de disminuir la actividad luciferasa, de las cuales tres no poseen capacidad de auto-agregación (Lk CIDCA 83111, JCM 5818 y ATCC 8007) y sólo *L. kefir* CIDCA 8348, forma parte de las cepas caracterizadas como auto-agregantes. Estos resultados indican el potencial poder anti-inflamatorio de las cepas mencionadas. En este mismo sentido, Carey y col. (2013) demostraron que la incubación de células HT-29 con una cepa de *L. kefir* previo al desafío con *Salmonella* Typhimurium, disminuye la secreción de IL-8 en respuesta a este patógeno.



Es importante destacar que la cepa JCM 5818, que mostró la mayor capacidad anti-inflamatoria en este sistema, fue la que menor relación IL-10: IL-12 y mayor relación TNF- α :IL-10 presentó en PBMC (tabla 1.7). Esta aparente contradicción, radica en que se trata de tipos celulares diferentes y, en consecuencia, de modelos muy diferentes. Por otro lado, la cepa CIDCA 8348 fue la única que mostró potencial anti-inflamatorio en ambos sistemas y produjo una inducción de la expresión de genes de mucinas en células Caco-2. Si bien es posible que cepas que no resultaran seleccionadas mediante ensayos *in vitro*, puedan ejercer un efecto anti-inflamatorio *in vivo* (Mileti et al 2009; Wells 2011), el uso de modelos es frecuente debido a que permite realizar una pre-selección y reducir el uso de animales con finalidad exploratoria (Foligne et al 2007).

Conclusiones

1. Las cepas de *L. kefir* no presentan factores de virulencia:

- ninguna presentó fenotipo hemolítico ni efecto citotóxico sobre células en cultivo;
- todas las cepas fueron sensibles a una amplia variedad de antimicrobianos, y negativas para el gen de resistencia a cloranfenicol.

2. Las cepas de *L. kefir* podrían sobrevivir en el ambiente gastrointestinal y colonizarlo, al menos, en forma transiente:

- se observó una alta resistencia a las condiciones gastrointestinales simuladas, con una mayor sensibilidad al compartimiento estomacal;
- las cepas de *L. kefir* se adhirieron tanto a mucus gastrointestinal como a la línea celular Caco-2, y el pasaje a través del tracto gastrointestinal aumentó la capacidad de adhesión.

3. Las cepas de *L. kefir*, y sus productos de secreción, poseen propiedades antimicrobianas y antagonizan factores extracelulares de patógenos intestinales:

- los productos de secreción de las cepas de *L. kefir* inhibieron el crecimiento de microorganismos patógenos Gram positivos y Gram negativos;
- las cepas de *L. kefir* antagonizaron el efecto de factores extracelulares de *Bacillus cereus* sobre células Vero y Caco-2, pero no modificaron su capacidad hemolítica;
- sus proteínas de capa S, antagonizaron el efecto de las toxinas de *Clostridium difficile* sobre células Vero.

4. Algunas cepas de *L. kefir* presentan propiedades anti-inflamatorias *in vitro*:

- todas las cepas de *L. kefir* modularon la respuesta inmune de PBMC, pero cada cepa presentó distintos grados de polarización Th según las relaciones IL-10: IL12, TNF- α : IL-10 e IL-1 β : IL-12 observadas;
- sólo algunas, ejercieron un efecto anti-inflamatorio en el sistema reportero Caco-2 ccl20: luc estimulado con flagelina.

En base a todos los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, y estudios realizados previamente en nuestro grupo, se seleccionó la cepa *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 para ser estudiada *in vivo*. Utilizando modelos murinos, se evaluaron la inocuidad, el efecto inmunomodulatorio y sobre la microbiota en ratones sanos y en condiciones de inflamación intestinal inducida químicamente por dextran sulfato de sodio.

Capítulo 2: Estudios *in vivo*

Introducción

En el primer capítulo de este trabajo de tesis, se realizaron estudios *in vitro* con el fin de caracterizar distintas cepas de *L. kefir*. Estos experimentos permitieron estudiar las propiedades probióticas en condiciones experimentales extremadamente controladas. Sin embargo, para que un microorganismo pueda ser considerado probiótico, es necesario corroborar mediante ensayos *in vivo* su inocuidad y propiedades probióticas (FAO/WHO 2002; Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca 2011).

Se seleccionó la cepa *L. kefir* CIDCA 8348 para realizar estudios *in vivo* en ratones Swiss. A continuación, se enumeran las características y propiedades, evaluadas principalmente mediante ensayos *in vitro*, que la hacen interesante como potencial microorganismo probiótico:

- en cuanto a su inocuidad, no posee fenotipo hemolítico y es sensible a una amplia variedad de antimicrobianos (capítulo 1, sección 1);
- es capaz de adherirse al mucus gastrointestinal (capítulo 1, sección 2.1.1) y a células Caco-2 (Golowczyc et al 2007);
- posee una alta resistencia a las condiciones gastrointestinales, tratamiento que ocasiona un aumento en su capacidad de adhesión a componentes de la mucosa intestinal (capítulo 1, sección 2.1.2);
- es una cepa con capacidad de auto-agregación y se ha demostrado que co-agrega con otros microorganismos (Golowczyc et al 2007; Golowczyc et al 2009). Esta propiedad es de particular interés, debido a que se ha descrito que la agregación es el principal mecanismo por el cual los microorganismos que componen la microbiota gastrointestinal se adhieren entre sí, y podría permitirle colonizar de manera persistente los biofilms que recubren la mucosa del huésped (Turroni et al 2013).
- modula la respuesta inmune de células en cultivos (capítulo 1, secciones 2.2.4 y 2.2.5) y posee un perfil anti-inflamatorio en el sistema reportero Caco-2 ccl20: luc (capítulo 1, sección 2.2.f);

- sus productos de secreción inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (capítulo 1, secciones 2.2.1; Londero, 2012) y disminuye la capacidad de *Shigella flexneri* de invadir células Hep-2 (Kakisu et al 2013b);
- antagoniza el efecto de factores extracelulares de *Bacillus cereus* sobre células Vero y Caco-2 (capítulo 1, sección 2.2.2) y disminuye los efectos citotóxicos de las toxinas de *E. coli* enterohemorrágica sobre células Vero (Kakisu et al 2013a);
- sus proteínas de capa S inhiben la invasión de *Salmonella* Enterica a células Caco-2 (Golowczyc et al 2007) y antagonizan el efecto de las toxinas de *Clostridium difficile* sobre células Vero (capítulo 1, sección 2.2.3);
- remueve y bioacumula cadmio, zinc y níquel (Gerbino et al 2011; Gerbino et al 2012; Gerbino et al 2014);
- es capaz de permanecer viable luego de ser sometida a procesos de conservación, como liofilización o secado en spray, conservando sus propiedades probióticas (Golowczyc et al 2010; Golowczyc et al 2011; Bolla et al 2011).

Se utilizaron, para los estudios que se detallarán a continuación, ratones Swiss debido a que se trata de animales exocriados. Esto implica que son genéticamente heterogéneos y, por ende, representan mejor la variabilidad genética de una población humana típica (Benavides and Guénet 2003a).

Gran parte de los experimentos, cuyos resultados que se describen continuación, fueron realizados en colaboración con la Dra. Silvia Racedo, en la Unité de Recherche Microbiologie et Biochimie Appliquée, Bordeaux Science Agro, dirigida por la Prof. María C. Urdaci.

Objetivos

Estudiar el efecto de la administración de *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 en ratones sanos y en un modelo murino de inflamación intestinal inducida químicamente.

Objetivos particulares

Primera parte: administración de *L. kefir* CIDCA 8348 a ratones sanos:

- Evaluar parámetros asociados a inocuidad.
- Evaluar el efecto del tratamiento sobre la función de la barrera epitelial.
- Evaluar el efecto del tratamiento sobre el sistema inmune de mucosas.
- Evaluar el efecto del tratamiento sobre la microbiota en materia fecal.

Segunda parte: efecto de la administración de *L. kefir* CIDCA 8348 en un modelo murino de inflamación intestinal:

- Evaluar el efecto del tratamiento sobre parámetros clínicos asociados con el desarrollo de la patología.
- Evaluar el efecto del tratamiento sobre la expresión y secreción de mediadores inmunes.
- Evaluar el efecto del tratamiento sobre la microbiota en materia fecal.

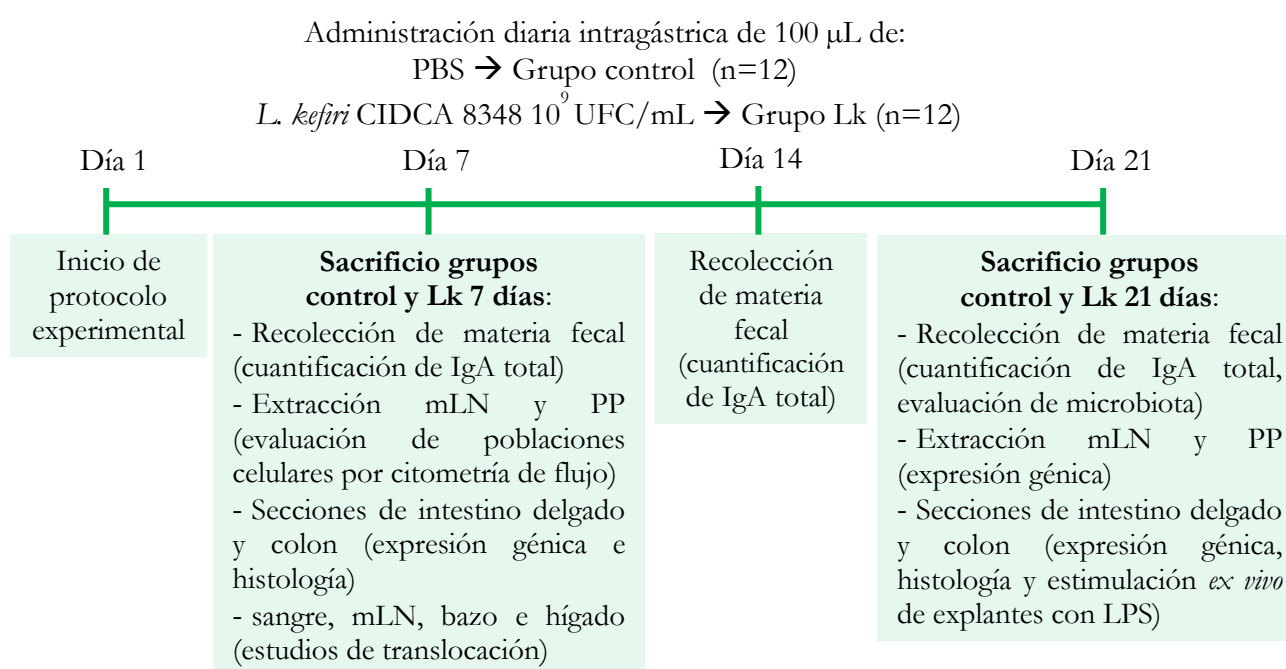
Primera parte

Inocuidad, modulación del sistema inmune y efecto sobre la microbiota intestinal de la administración de *L. kefir* CIDCA 8348

Es frecuente encontrar estudios en los que se evalúa el impacto de la administración de microorganismos probióticos en modelos animales de patologías gastrointestinales (Foligne et al 2007; Chen et al 2012). Sin embargo, en estos modelos, la homeostasis intestinal se encuentra perturbada, mientras que la barrera y la microbiota intestinal suelen estar alteradas, lo que afecta el contacto entre las bacterias probióticas y las células inmunes y del epitelio intestinal (Foligné et al 2006; Turner 2009; Perše and Cerar 2012). Si bien estos estudios son muy valiosos porque permiten analizar el efecto de los tratamientos probióticos en patologías puntuales, brindan poca información sobre la influencia de la administración de microorganismos potencialmente benéficos, sobre tracto gastrointestinal de individuos sanos. Es por esto, que se decidió evaluar, en primer lugar, el efecto de la administración de *L. kefir* CIDCA 8348 a ratones sanos. En particular, mediante la realización de estos ensayos se evaluó la inocuidad de la cepa administrada, su efecto sobre la microbiota y sobre el sistema inmune gastrointestinal.

Resultados y Discusión

Para los resultados que se detallarán a continuación, se trabajó con dos lotes de 12 ratones albinos Swiss de 6 semanas de edad. La mitad de los animales de cada lote fueron sacrificados luego de 7 días de comenzado el protocolo experimental y, el resto, a los 21 días. A continuación se presenta un esquema del protocolo experimental seguido, las muestras que se tomaron durante el desarrollo del mismo y para qué determinaciones se utilizaron (MyM, secciones 7.3, 7.4).



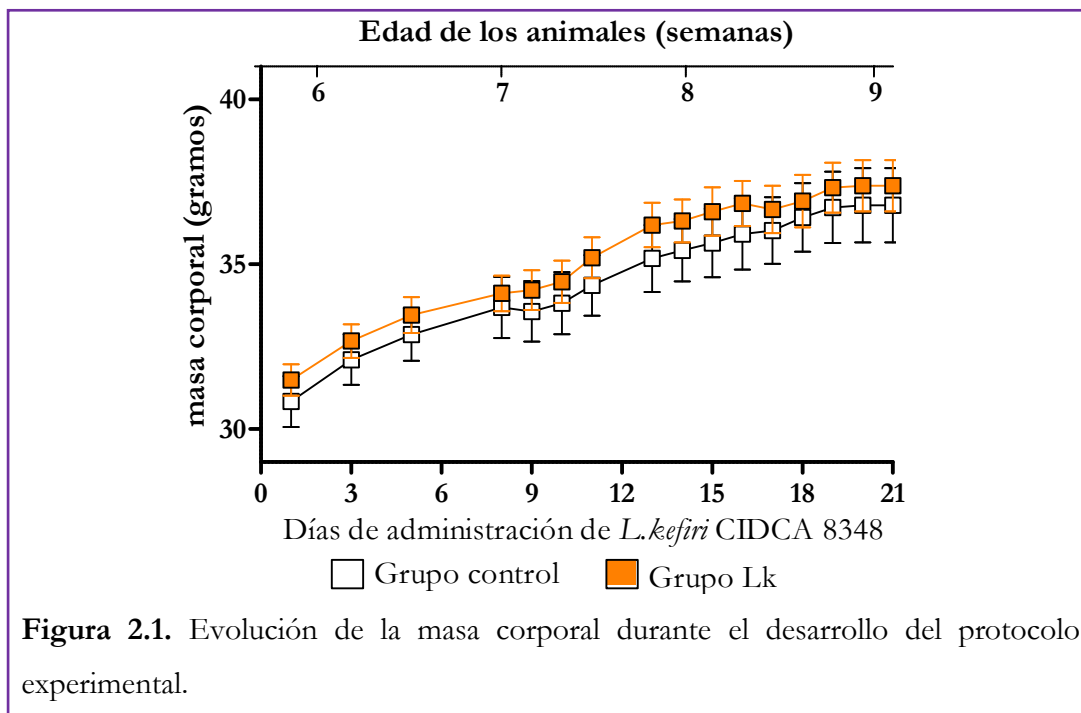
Los resultados se presentarán agrupados en cuatro secciones, con la finalidad de organizar la discusión parcial de los mismos:

- 1.1. Evaluación de parámetros asociados a inocuidad.
- 1.2. Evaluación del efecto de la administración de *L. kefir* CIDCA 8348 sobre componentes asociados a la función de la barrera epitelial.
- 1.3. Evaluación del impacto de *L. kefir* CIDCA 8348 sobre el sistema inmune de mucosas.
- 1.4. Evaluación del efecto de la administración de *L. kefir* CIDCA 8348 sobre la microbiota.

1.1. Evaluación de parámetros asociados a inocuidad

1.1.1. Estado general de los animales y necropsia

Durante el desarrollo del protocolo experimental, se evaluaron diariamente la consistencia de la materia fecal, y el comportamiento y estado general de los animales. En ninguno de los lotes se observaron cambios en la consistencia de la heces, ni comportamientos o signos asociados a malestar o dolor como aislamiento, disminución de la actividad exploratoria e higiénica, piloerección, cambios posturales, hundimiento de los ojos o del abdomen (Canadian Council on Animal Care 1998; Langford et al 2010). Los ratones que se utilizaron se encontraban aún en fase de crecimiento (Benavides and Guénet 2003b). En la figura 2.1 se puede observar que ambos grupos presentaron un aumento de la masa corporal similar y comparable con lo esperado para ratones Swiss de 6 a 9 semanas de edad (Charles River Laboratories 2014).



Los ratones fueron sacrificados por inhalación de CO₂. Durante la necropsia, no se observaron signos de inflamación o daño en ningún órgano interno. Se extrajeron secciones de íleon y colon para estudios histológicos (MyM, secciones 7.3, 7.6.1). En la figura 2.2 se muestran microfotografías de

cortes histológicos de los órganos ya mencionados, de animales control y tratados durante 21 días con *L. kefir* CIDCA 8348. Estos estudios se realizaron en colaboración con la Dra. María José Tolosa. En ninguno de los casos, se observaron parámetros asociados a inflamación (Hove et al 2002) como infiltrados de células mono o polimorfonucleares, edema, erosión o ulceración, ni cambios en la relación vellosidad-cripta, durante el tratamiento diario con *L. kefir*. Resultados similares se observaron en los animales sacrificados a los 7 días.

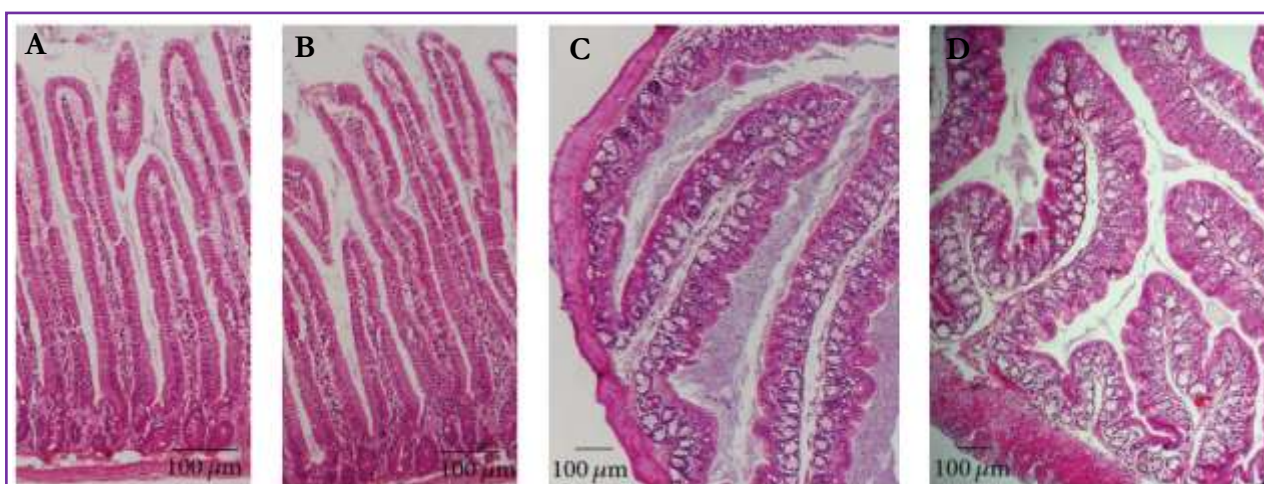


Figura 2.2. Efecto del tratamiento con *L. kefir* CIDCA 8348, estudios histológicos (MyM, secciones 7.3, 7.4). Cortes histológicos de secciones de íleon (A y B) y colon (C y D), de ratones del grupo control y de ratones que recibieron *L. kefir* CIDCA 8348 durante 21 días, respectivamente.

Se complementaron estos resultados mediante el análisis de las citoquinas secretadas por explantes de íleon y colon incubados *ex vivo* durante 24 h (MyM, sección 7.6.5). No se observaron diferencias significativas en la concentración en sobrenadantes de cultivo de moléculas pro-inflamatorias, IL-6, IL-17A, IFN- γ , TNF- α y GM-CSF, secretadas por explantes provenientes de ratones del lote control y del lote Lk. En el mismo sentido, no se observaron diferencias en la longitud promedio del colon de animales de los grupos control y Lk. Este parámetro es relevante dado que el acortamiento del colon se relaciona directamente con la inflamación del mismo (Chen et al 2012; Zhou et al 2012).

1.1.2. Translocación de microorganismos a órganos estériles

Este parámetro está directamente relacionado con la integridad de la barrera epitelial. Sustancias tóxicas, patógenos intestinales como *Salmonella* y distintas patologías pueden modificar la permeabilidad intestinal, ocasionando la translocación de microorganismos desde el tracto gastrointestinal a órganos estériles (Yu et al 2012). Muchos autores han asociado casos de bacteriemia con el consumo de probióticos (Land et al 2005; Suárez-García et al 2012; Gouriet et al 2012), por lo que el Código Alimentario Argentino exige la evaluación de este parámetro para los microorganismos probióticos. Para su evaluación, se cuantificó mediante recuento en placa, la presencia de microorganismos en sangre, bazo e hígado (MyM, secciones 7.4, 7.6.2). Tal como se muestra en la tabla 2.1, los recuentos en íleon, realizados como control positivo de desarrollo, se encontraron por encima de 10^7 UFC/g de órgano, y en sangre, bazo e hígado, no hubo desarrollo microbiano en ninguno de los medios de cultivo utilizados. Estos resultados indican que el tratamiento con *L. kefir* CIDCA 8348 durante 7 días, no generó daños en la barrera epitelial que se tradujeran en la translocación de microorganismos.

Tabla 2.1. Recuento de microorganismos en distintos tejidos.

Órgano	Ratones control 7 días				Ratones Lk 7 días			
	MRS ¹	AN ²	YGC ³	VRBG ⁴	MRS ¹	AN ²	YGC ³	VRBG ⁴
Íleon ⁵	1,1±0,6 10 ⁷	>10 ⁹	>10 ⁷	3,8±0,8 10 ⁷	2,6±0,8 10 ⁷	>10 ⁹	>10 ⁷	4,8±0,9 10 ⁷
Hígado	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
Bazo	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
Sangre	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D

¹ Medio específico para bacterias ácido lácticas, ²Medio no selectivo, ³Medio específico para levaduras,

⁴Medio selectivo para enterobacterias, S/D: sin desarrollo luego de 48 horas de incubación a 37°C.

⁵Datos expresados en UFC/g de órgano.

Los resultados descriptos indican que la administración de *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348, en la dosis y tiempo estudiados, es inocua para ratones Swiss machos de entre 6 y 9 semanas de edad. Lo observado, correlaciona con lo que fuera reportado por Bolla y col. (2011), quienes demostraron que

la administración continua de una mezcla microbiana conteniendo *L. kefir* CIDCA 8348 durante 15 días, resultó inocua para ratones BALB/c y hamsters (Bolla et al 2013).

1.2. Evaluación de componentes asociados a la función de la barrera epitelial

Cada sección del tracto digestivo tiene funciones particulares y la morfología, microbiota y tipo de células presentes en ellas varía notablemente. Sin embargo, todas las regiones comparten ciertas características: la presencia de una única capa de células epiteliales que delimita la mucosa, unidas entre sí a través de uniones estrechas (IJ, del inglés *tight junctions*) responsables de sellar la barrera; la presencia de una capa de mucus sobre el epitelio; y la presencia de células inmunes asociadas. La barrera epitelial debe tolerar a la microbiota intestinal y a los antígenos ingeridos, degradar y absorber nutrientes, y establecer una respuesta protectora ante potenciales patógenos. El correcto funcionamiento depende de la interacción entre todos sus componentes (Turner 2009; Rescigno 2011).

El mucus constituye una de las principales estrategias desarrollada por el tracto gastrointestinal de los mamíferos para mantener la homeostasis intestinal; su función es la minimización del contacto entre los microorganismos presentes en la luz intestinal y la superficie de las células epiteliales (Hooper and Macpherson 2010). Se trata de una barrera física, química e inmune, cuyo mantenimiento depende del balance entre la síntesis, secreción y degradación de las mucinas, y otras moléculas que la forman, la cual es modulada por las glicosidasas microbianas, proteasas y los movimientos peristálticos (Kim and Ho 2010). Asimismo, su fortalecimiento se logra mediante el aumento de la secreción de IgA, la producción de mucinas y péptidos antimicrobianos, entre otras moléculas (Ouwerkerk et al 2013). Este mecanismo de protección no es capaz de impedir completamente el contacto de los microorganismos y sustancias con las células epiteliales, por lo que estas células poseen receptores específicos que les permiten reconocer una potencial amenaza y orquestar una respuesta defensiva (Artis 2008), y a su vez pueden controlar la permeabilidad paracelular a través de la regulación de las uniones entre ellas (Ahrne and Hagslatt 2011).

En la sección anterior se demostró, mediante estudios de translocación, que el tratamiento con *L. kefir* CIDCA 8348 no produjo una disrupción de la barrera epitelial. En esta parte del trabajo, se complementaron esos estudios evaluando el efecto de la administración de *L. kefir* CIDCA 8348 sobre la barrera epitelial mediante el análisis de la expresión de genes de mucinas, zonula occludens-1 y occludina en íleon y colon (MyM, secciones 7.3, 7.6.7) y la cuantificación de IgA total en materia fecal (MyM, secciones 7.3, 7.6.4).

1.2.1. Producción de mucinas

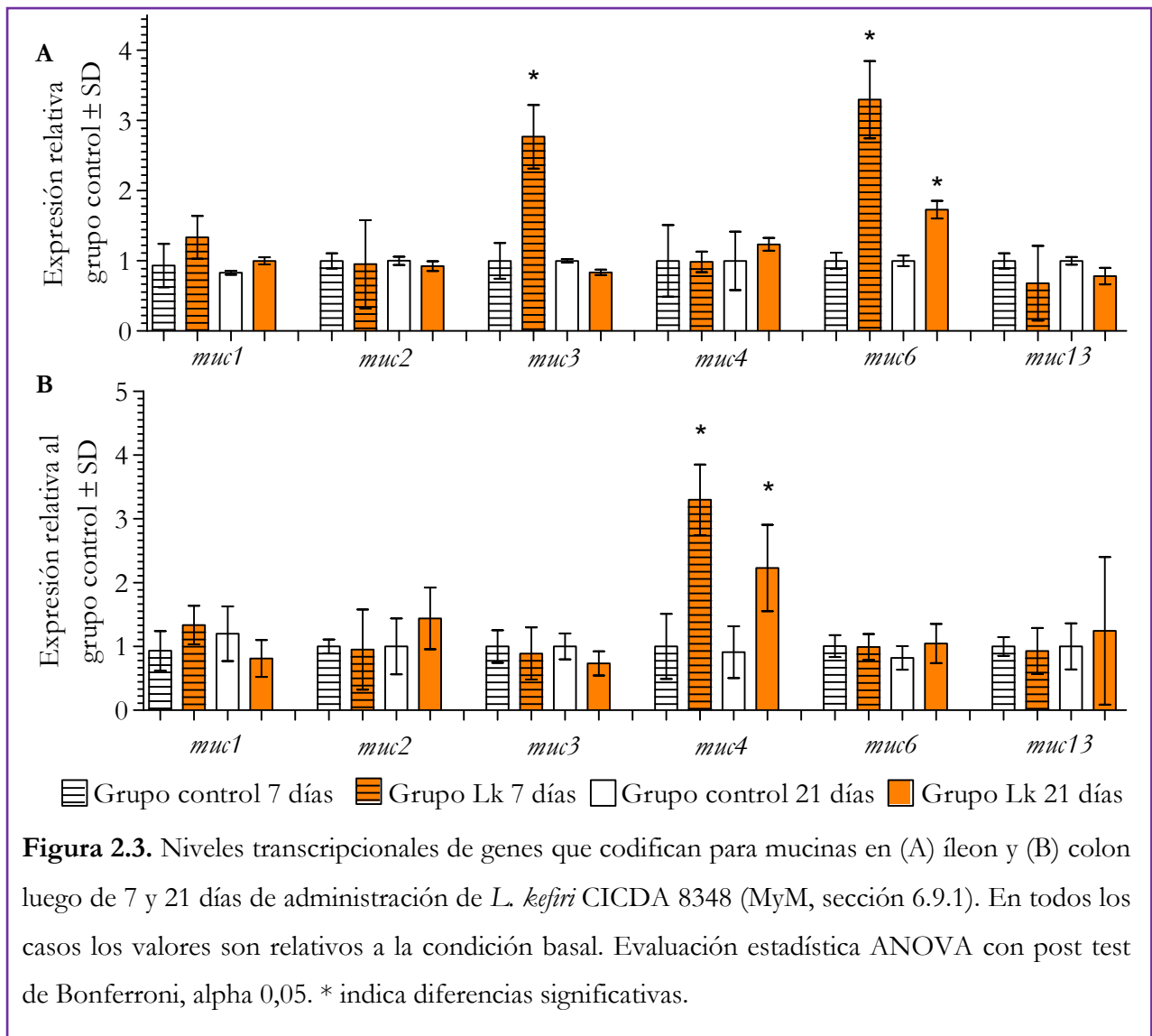
La composición del mucus y su grosor varía en las distintas regiones del tracto gastrointestinal. En condiciones fisiológicas normales, el perfil de mucinas que conforman la capa de mucus se encuentra bien definido. Se considera que la expresión de estas moléculas es regulada tanto por la respuesta inmune innata como adaptativa (Andrianifahanana et al 2006; McGuckin et al 2011). Estas glicoproteínas se clasifican en dos categorías, aquellas que se encuentra unidas a la superficie celular y las que son secretadas (Tarang et al 2012). En la tabla 2.2 se indica la localización en el tracto gastrointestinal y las funciones que se atribuyen a las mucinas cuya expresión se determinó en este trabajo de tesis.

En el modelo de administración de *L. kefir* a ratones sanos, se evaluó la expresión de *muc1*, *muc2*, *muc3*, *muc4*, *muc6* y *muc13* en íleon y colon luego de 7 y 21 días de tratamiento. Se observaron respuestas diferentes en cada sección del tracto gastrointestinal estudiada (figura 2.3): en íleon, *muc3* y *muc6* aumentaron su expresión luego de 7 días, mientras que en colon se observó únicamente un aumento de la expresión de *muc4*. Por otro lado, luego de 21 días, sólo se mantuvo aumentada la expresión de *muc6* en íleon y la de *muc4* en colon. Es importante destacar que la sobreexpresión luego de 21 días de tratamiento fue significativamente inferior a la observada luego de 7 días.

Tabla 2.2. Mucinas: localización en el tracto gastrointestinal y funciones propuestas (Linden et al 2008; Kim and Ho 2010; McGuckin et al 2011; Sheng et al 2012)

Mucina (roedor/humano)	Localización	Función propuesta
Mucinas asociadas a membrana		
Muc1/MUC1	Cavidad oral, estómago, intestino delgado y colon	Barrera física que protege la superficie celular e inhibe el efecto citotóxico de toxinas bacterianas sobre células epiteliales. Su región extracelular, puede ser liberada y poseería actividad relacionada con la recuperación epitelial.
Muc3/MUC17	Intestino delgado y colon	Inhibe la apoptosis y estimula la migración celular. Se la asocia al mantenimiento de la integridad de la capa epitelial superficial.
Muc4/MUC4	Cavidad oral, intestino delgado y colon	Debido a su gran tamaño, se ha propuesto que bloquea el acceso a la superficie de las células epiteliales. Este mecanismo podría proteger al epitelio de la invasión por patógenos.
Muc13/MUC13	Intestino delgado y colon	Inhibe la apoptosis y estimula la migración celular. Se la asocia al mantenimiento de la integridad de la capa epitelial superficial.
Mucinas Secretadas		
Muc2/MUC2	Intestino delgado y colon	Componente principal del mucus, cumple funciones de protección, lubricación y eliminación. Posee sitios de unión y nutrientes para microorganismos.
Muc6/MUC6	Estómago, intestino delgado (baja proporción) y colon	Posee actividad antibacteriana y se propone que tiene un rol fundamental en la protección de células epiteliales frente a sustancias químicas, como el ácido y las proteasas, microorganismos patógenos e injurias mecánicas.

En los ensayos *in vitro* se observó un aumento de la expresión del gen que codifica para MUC1 luego de la incubación de células Caco-2 con *L. kefir* CIDCA 8348 (capítulo 1, sección 2.2.5). Sin embargo, la expresión de *muc1* no resultó afectada en los ensayos *in vivo* (figura 2.3). Ante esta aparente discrepancia entre los resultados, es importante destacar que los ensayos *in vitro* se realizaron con una línea celular intestinal tumoral de origen humano. Ésta podría responder diferente frente al mismo estímulo que las células epiteliales intestinales del ratón. Por otro lado, los modelos *in vitro* son extremadamente simplificados e implican la interacción directa entre la bacteria y la línea celular, mientras que *in vivo* la influencia de otros factores, como la presencia del mucus y la microbiota, modifican la respuesta del huésped frente al microorganismo administrado.



En bibliografía es frecuente encontrar publicaciones en las que se estudia el impacto de patógenos intestinales sobre el perfil de expresión y secreción de mucinas (Lindén et al 2008; McGuckin et al 2011). Sin embargo, no son muchos los trabajos en los que se hayan utilizado modelos *in vivo* de animales sanos para estudiar el efecto de la administración de lactobacilos sobre la producción de mucinas. Caballero-Franco y col. (2007) observaron que la administración intragástrica, durante 7 días, de la mezcla probiótica VSL#3 (compuesta por *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis*, y *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*), aumentó la expresión y secreción de Muc2, sin modificar Muc1 y Muc3, en el colon de ratas Wistar. Sin embargo, Gaudier y col. (2005), no observaron ninguna modificación en la expresión de *muc1*, *muc2*, *muc3* y *muc4* en ciego, colon proximal y distal de ratones

BALB/c que recibieron la misma mezcla probiótica durante 14 días. Estas discrepancias podrían deberse a que se utilizaron distintos roedores, pero también a que los tiempos en los que se realizaron las determinaciones fueron, en el segundo caso, más prolongados. En ese sentido, Dykstra y col. (2011), obtuvieron resultados muy similares a los nuestros, y que corroborarían esta hipótesis. Al evaluar la expresión de *muc1*, *muc2* y *muc3* en yeyuno, íleon, colon proximal y distal en ratas Sprague-Dawley que recibieron diariamente 10^7 o 10^9 UFC de *Lactobacillus plantarum* 299v, observaron un aumento de *muc3* sólo en yeyuno e íleon, luego de dos días de administración. Al cabo de cinco días, el incremento en la expresión de *muc3* fue menor y, finalmente, los niveles de ARNm para esta mucina volvían a los valores encontrados en las ratas control luego de 10 días de administración continua. También observaron que no todas las secciones del tracto evaluadas respondían igual al tratamiento con *L. plantarum*; la expresión de *muc2* aumentó únicamente en yeyuno y ninguna mucina modificó su expresión en colon. Más recientemente, ensayos realizados en ratones Swiss por Duary y col. (2012) y Chandran y col. (2013), demostraron que la administración de 10^8 UFC de *L. plantarum* Lp91 durante 7 días, aumentaba significativamente la expresión de *muc2* en colon pero ninguna otra mucina fue evaluada. Finalmente, Jiang y col. (2011), observaron que la administración de *L. rhamnosus* GG a ratones C57BL/6NHsd durante 7 días, modificó la expresión de *muc3* en colon pero no la de *muc1*, *muc2* y *muc4*.

Las diferencias en la estimulación de la síntesis de mucinas entre distintas regiones del tracto gastrointestinal, observadas por todos los autores citados y halladas también en este trabajo de tesis, podrían deberse a la cantidad de microorganismo probiótico viable que llega a cada zona del TGI. Dykstra y col. (2011), observaron que la administración intragástrica de *L. plantarum* 299v inactivado térmicamente, no modificaba la expresión de genes de mucinas que sí eran estimulados con el microorganismo viable en yeyuno e íleon. Más aún, la inoculación intragástrica no modificó la expresión de *muc2* en colon, pero la administración intrarectal de esta cepa viable aumentó la expresión de *muc2* en esa región. En nuestro caso, las diferencias en la cantidad y composición de la microbiota local (Hakansson and Molin 2011) y en las características y grosor de la capa de mucus

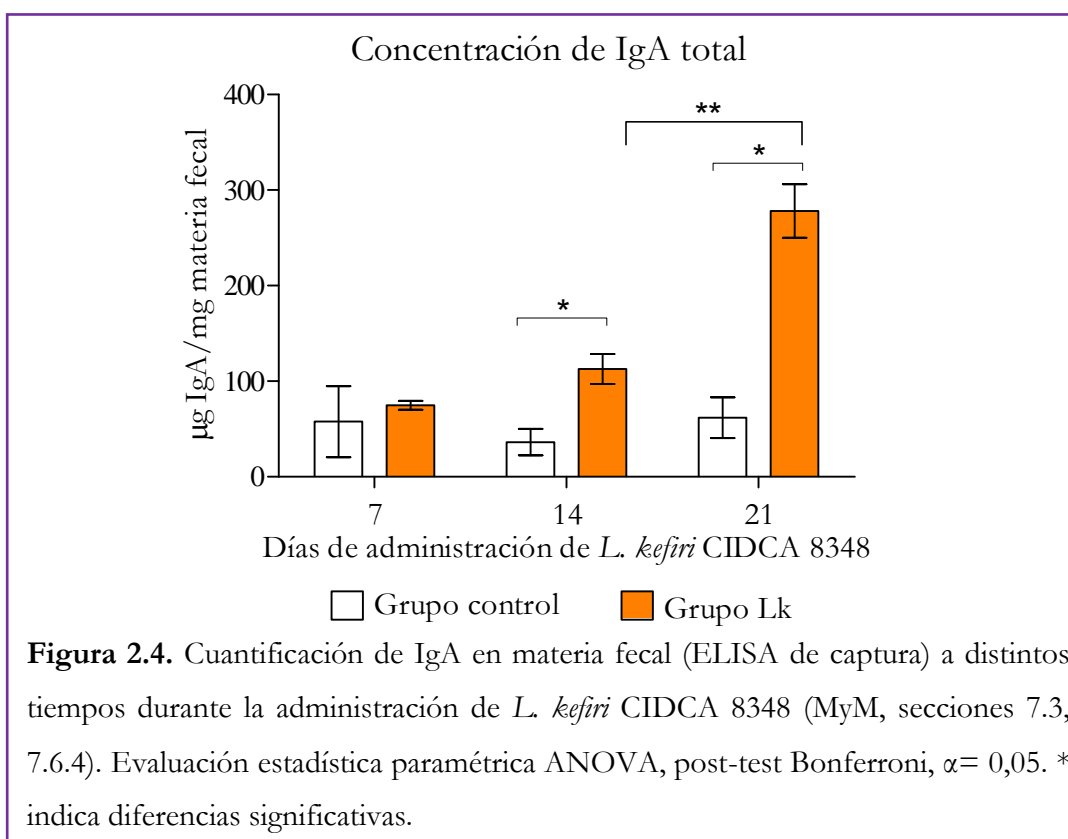
(Andrianifahanana et al 2006; McGuckin et al 2011), podrían ser la causa de una interacción diferente de *L. kefir* con el epitelio y/u ocasionar un impacto diferencial de este microorganismo sobre la microbiota, generando un efecto particular sobre los parámetros estudiados.

Se puede considerar que el aumento de la expresión de mucinas podría tener un impacto positivo sobre la barrera epitelial, si se analizan las funciones propuestas para cada una de ellas (tabla 2.2). Las moléculas modificadas por la administración de *L. kefir* se asocian con el mantenimiento de la integridad epitelial, disminución de la apoptosis e incremento de la migración y diferenciación de las células epiteliales, así como también con la protección física del epitelio frente a sustancias químicas, microorganismos patógenos e injurias mecánicas. De cualquier forma, podrían complementarse estos estudios analizando la secreción, glicosilación y localización de las moléculas sobreexpresadas, ya que se ha asociado la producción incrementada de mucinas con modificaciones postraduccionales aberrantes y localización no fisiológica con distintas clases de patologías (Wang and Fang 2003; Carraway et al 2009).

1.2.2. Producción de IgA

La clase de anticuerpos más abundante encontrada en el lumen intestinal de los mamíferos es la IgA secretoria. Esta molécula forma parte del mucus intestinal y se le atribuyen funciones asociadas al mantenimiento de la homeostasis intestinal debido a su capacidad para controlar la inflamación y regular la respuesta inmune frente a antígenos alimentarios, microorganismos patógenos y microbiota. Posee la capacidad de aglutinar, atrapar y favorecer la eliminación de partículas (microorganismos patógenos y comensales, toxinas y alérgenos, etc), bloquea sitios de adhesión de microorganismos y toxinas a células epiteliales, posee una acción directa sobre la virulencia de ciertos patógenos y promueve la captación de antígenos del lumen intestinal por las células dendríticas del tejido linfoide asociado a la mucosa gastrointestinal (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT), entre otras (Mantis et al 2011; Macpherson et al 2012).

Para evaluar el efecto de la administración de *L. kefir* sobre la secreción de IgA, se cuantificó esta molécula en materia fecal luego de 7, 14 y 21 días de tratamiento y se compararon los niveles con los observados en el lote control (MyM, secciones 7.3, 7.6.4). Si bien no se observaron diferencias en la concentración de IgA total luego de 7 días de administración de *L. kefir*, en las muestras tomadas luego de 14 y 21 días de tratamiento, la cantidad de IgA total fue significativamente mayor en el grupo Lk que en el grupo control (figura 2.4). Por otro lado, se evaluó la expresión del receptor de inmunoglobulinas poliméricas (pIgR) en íleon y colon (MyM, secciones 7.3, 7.6.7). Este receptor no sólo es responsable del transporte de IgA polimérica a la luz intestinal, sino que forma parte del dímero de IgA secretada (componente secretorio) (Brandtzaeg 2011). A pesar del aumento en la secreción de IgA observada, no se modificó la expresión de este gen en íleon y colon luego de 7 y 21 días de administración de *L. kefir* CIDCA 8348.



El incremento en la síntesis y secreción de IgA a la luz intestinal luego de la administración oral de lactobacilos a roedores, humanos y otros mamíferos, ha sido descrito por muchos investigadores

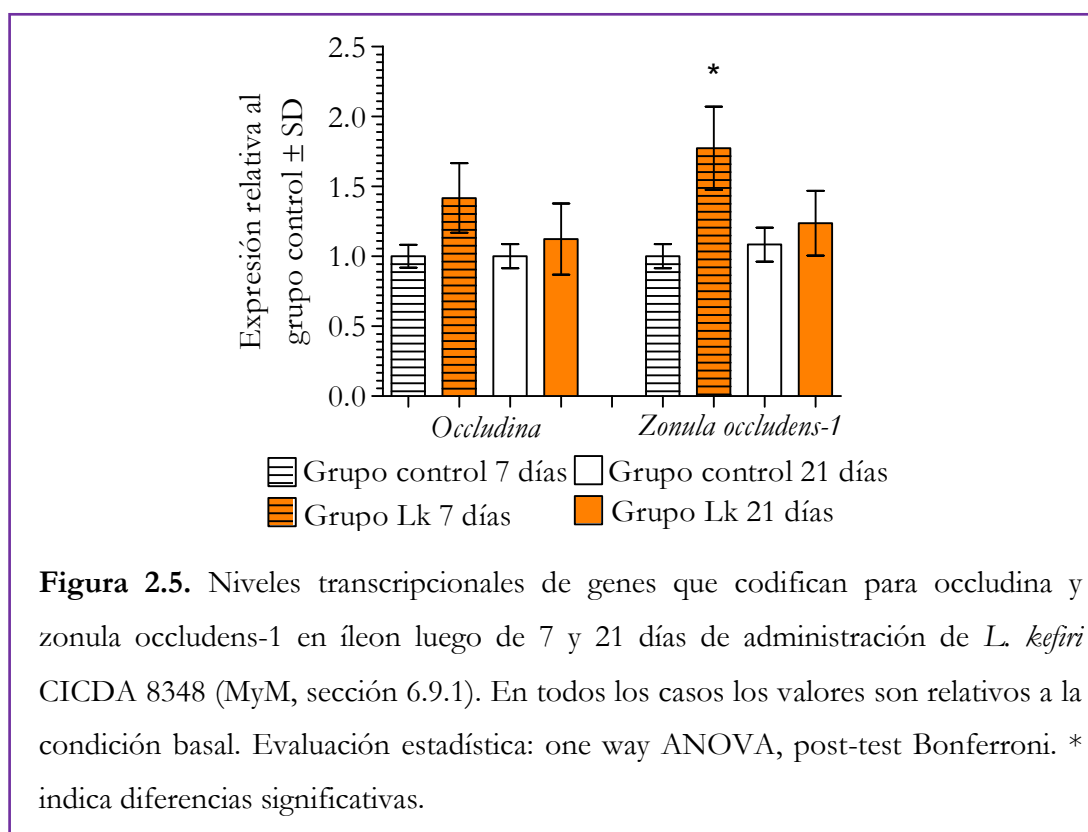
(Ya et al 2008; Frece et al 2009; Ohland and Macnaughton 2010). Asimismo, se ha demostrado que la inducción de IgA secretoria por la administración de *Lactobacillus rhamnosus* GG, es parcialmente responsable del efecto protector ejercido por este probiótico en un modelo porcino de diarrea por *E. coli* (Zhang et al 2010), y el mismo efecto se observó en un modelo murino de infección por virus influenza A (A/NWS/33, H1N1) tratado oralmente con *L. plantarum* (Kawashima et al 2011).

Dada la importancia de esta molécula para la regulación de la homeostasis intestinal y en la protección contra patógenos y tóxicos, entre otras (Brandtzaeg 2011), el aumento en la secreción de IgA inducida por la administración de *L. kefir* CIDCA 8348, podría redundar en un beneficio para el huésped. Sería interesante complementar los resultados obtenidos, evaluando la reactividad de la IgA secretoria frente a distintos microorganismos patógenos y toxinas. Esto podría arrojar información sobre el potencial rol protector frente a infecciones específicas, ya sea favoreciendo la eliminación de los patógenos y/o inhibiendo su unión a receptores específicos (Ohland and Macnaughton 2010). Por otro lado, la evaluación de la afinidad específica por *L. kefir* podría aportar información sobre la capacidad de colonización de esta bacteria ya que ha sido propuesto que la IgA secretoria, en combinación con las mucinas, puede estar asociada con la formación de biofilms de lactobacilos en el tracto gastrointestinal (Mantis et al 2011).

1.2.3. Uniones entre células epiteliales

La permeabilidad paracelular de la barrera intestinal depende de las proteínas que forman las uniones estrechas entre las células epiteliales. Alteraciones en su expresión, pueden ocasionar el ingreso masivo de sustancias y la translocación de microorganismos desde el intestino a órganos estériles. Estas proteínas (occludina, zonula occludens, claudinas), se ubican en la región sub-apical de las membranas laterales, se conectan con los filamentos de actina, y generan una conexión física entre las dichas células (Ahrne and Hagslatt 2011; Camilleri et al 2012). Se ha propuesto que los principales marcadores de la integridad de las uniones estrechas son la zonula occludens-1 (ZO-1) y la occludina (Cani et al 2009) y se ha demostrado, en ratas Sprague-Dawley sanas, la relación inversa entre la

permeabilidad intestinal *in vivo* y la expresión de los genes que codifican para estas proteínas (Liu et al 2012). Es por esto, que se cuantificó la expresión ZO-1 y occludina luego de 7 y 21 días de administración de *L. kefir* CIDCA 8348 en íleon y colon. Se observó un aumento significativo de la expresión de ZO-1 luego de 7 días de administración de *L. kefir* en íleon, pero los niveles de expresión se normalizaron luego tres semanas de tratamiento con *L. kefir* (figura 2.5). En el caso del colon, ninguno de los genes que codifican para las proteínas mencionadas, modificó sus niveles de expresión.



Muchos autores han estudiado los mecanismos por los cuales la administración de lactobacilos afecta la barrera epitelial en modelos animales de patologías. Sin embargo, en estos modelos, la barrera epitelial y la homeostasis suelen estar seriamente afectadas, por lo que el contacto entre las células epiteliales e inmunes y los microorganismos probióticos difícilmente refleje lo que ocurre en intestinos sanos (Foligné et al 2006; Turner 2009). Estudios realizados en ratas sanas por Liu y col. (2012),

demonstraron que la administración de *L. plantarum* durante 30 días disminuye la permeabilidad intestinal, evaluada *in vivo* utilizando dextrosa-FITC, mediante el aumento de la expresión y síntesis de ZO-1 y occludina en íleon y yeyuno, estudiadas mediante qRT-PCR e inmunohistoquímica, respectivamente. Existen fuertes evidencias que indican que uno de los principales receptores involucrados en el reconocimiento de lactobacilos, en particular *L. plantarum*, es el receptor de tipo Toll 2 (TLR2, Karczewski et al. 2010; Kawashima et al. 2011; Smelt et al. 2013b). Estos receptores transmembrana se expresan de manera diferencial en distintos tipos celulares del tracto gastrointestinal sano, incluyendo a las células epiteliales, y tienen funciones asociadas al reconocimiento de microorganismos, la inducción de respuestas antimicrobianas e inmune adaptativa, entre otras (Cario and Podolsky 2005). Por otro lado, se ha probado mediante ensayos *in vitro*, que la estimulación de TLR2 induce una cadena de eventos intracelulares que resultan en una disminución de la permeabilidad paracelular como resultado del aumento de la expresión y translocación de ZO-1 a las uniones estrechas (Cario et al 2004; Cario 2008; Karczewski et al 2010). El mismo mecanismo propuesto para *L. plantarum*, podría estar involucrado con el efecto observado por la administración de *L. kefir* CIDCA 8348 a ratones sanos ya que, de acuerdo a resultados obtenidos por otros investigadores, *L. kefir* también es reconocido a través de TLR2 (Hong et al 2009).

Los resultados obtenidos en esta sección sugieren que la administración de *L. kefir* CIDCA 8348 estimula y fortalece la función de la barrera intestinal. Los estudios realizados podrían complementarse evaluando la permeabilidad *in vivo* y *ex vivo*, usando moléculas como la dextrosa-FITC. Por otro lado, mediante inmunohistoquímica, podría ser interesante analizar la distribución de ZO-1, occludina y otras proteínas de las TJ a distintos tiempos de tratamiento con *L. kefir*, ya que se ha reportado que distribución celular de las proteínas de las TJ afecta directamente la permeabilidad paracelular (Camilleri et al 2012).

1.3. Estudio del impacto sobre el sistema inmune de mucosas

El sistema inmune de la mucosa gastrointestinal, tiene dos funciones importantes: proteger de agentes potencialmente patógenos y tolerar tanto los antígenos ingeridos con los alimentos como a los microorganismos que forman parte de la microbiota (Rescigno 2013). En el intestino sano, los microorganismos probióticos pueden ejercer sus efectos a través de la interacción directa con las células del huésped o, indirectamente, mediante la secreción de metabolitos que puedan interactuar con receptores celulares o modificar la composición, diversidad o funciones metabólicas de la microbiota (Collado et al 2008; Lebeer et al 2008; Hemarajata and Versalovic 2013).

Tal como fue descrito en el capítulo 1, sección 2.2.4, moléculas tales como citoquinas y quimoquinas, secretadas por las células presentes en un tejido, no sólo definen la función o mecanismo efector de la respuesta inmune, sino que también se encuentran implicadas en el desarrollo y diferenciación de las distintas subpoblaciones efectoras (Singh et al 2009; Magombedze et al 2013; Santarlasci et al 2013; Cosmi et al 2013).

El sistema inmune gastrointestinal, puede dividirse en sitios inductores y efectores. Los sitios inductores, incluyen el GALT, compuesto por las placas de Peyer (PP), los folículos linfoides aislados y los nódulos linfáticos mesentéricos (mLN). Por otro lado, los sitios efectores principales son lamina propia (LP) y el epitelio, y contienen grandes cantidades de linfocitos T activados y células plasmáticas secretoras de IgA (Pabst and Mowat 2012). Para estudiar el impacto de la administración continua de *L. kefir* CIDCA 8348 sobre el sistema inmune de mucosas de ratones sanos, se evaluaron distintos parámetros en sitios inductores, PP y mLN, y sitios efectores, íleon y colon.

En primer lugar, se analizó mediante citometría de flujo el impacto de la administración de *L. kefir* CIDCA 8348 durante 7 días en algunas poblaciones celulares de PP y mLN (MyM, sección 7.6.3). No se observaron modificaciones en las poblaciones de células dendríticas (DC), macrófagos o células B no activadas y activadas (CD11c⁺/MHCII⁺, CD11c⁺/CD86⁺, F4/80⁺, F4/80⁺/MHCII⁺, B220⁺ y B220⁺/MHCII⁺, respectivamente). Sin embargo, en mLN, la única población que mostró diferencias significativas entre ambos lotes fue la de células IgA⁺. En los ratones control, el porcentaje

fue de 43 ± 4 % mientras que en los ratones Lk ese porcentaje se incrementó a 56 ± 6 %. El aumento observado en esta población celular, indica que el sistema inmune de mucosas fue estimulado y es esperable que se vea reflejado en un aumento de la IgA secretada a la luz intestinal (Hooper and Macpherson 2010). Esto se corroboró mediante la cuantificación de IgA en materia fecal luego de 7, 14 y 21 días de tratamiento con *L. kefir* (figura 2.4).

1.3.1. Expresión de citoquinas y quimoquinas en sitios inductores

Se continuaron los estudios evaluando, mediante PCR cuantitativa en tiempo real, la expresión de citoquinas y quimoquinas en sitios inductores y efectores (MyM, secciones 5.1, 5.4, 7.6.7). En la tabla M.20 de la sección 7.6.7 de materiales y métodos, se encuentra la lista de los genes cuya expresión fue analizada. Estos resultados se muestran en gráficos en los que el eje de las abscisas representa el \log_2 de la expresión relativa de cada mediador respecto del lote control y el eje de las coordenadas representa el $-\log_{10}$ de la significación estadística (P). Además, para simplificar la visualización de los resultados, se identificaron únicamente los genes cuya expresión se modificó significativamente.

En la figura 2.6 se muestran los resultados obtenidos para ambos sitios inductores. Luego de 21 días de administración de *L. kefir*, en ambos órganos la expresión de *il6* e *il23* disminuyó significativamente ($P < 0,05$), mientras que la expresión de *il1b*, *cxcl1*, *tnfa* y *tgfb* no se modificó. En las PP, también disminuyó la expresión de *ifng* y en el caso de mLN, se observó una disminución de la expresión de *il17a* y un aumento significativo de la expresión de *il10*. Se evaluó también la expresión de los factores de transcripción *ROR γ T* y *FoxP3*. Únicamente en mLN se observó una disminución significativa de la expresión de *rorgt*. Sólo se analizó la expresión génica en PP y mLN luego de 21 días de administración, porque las muestras tomadas luego de 7 días de tratamiento se utilizaron para estudiar poblaciones celulares por citometría de flujo.

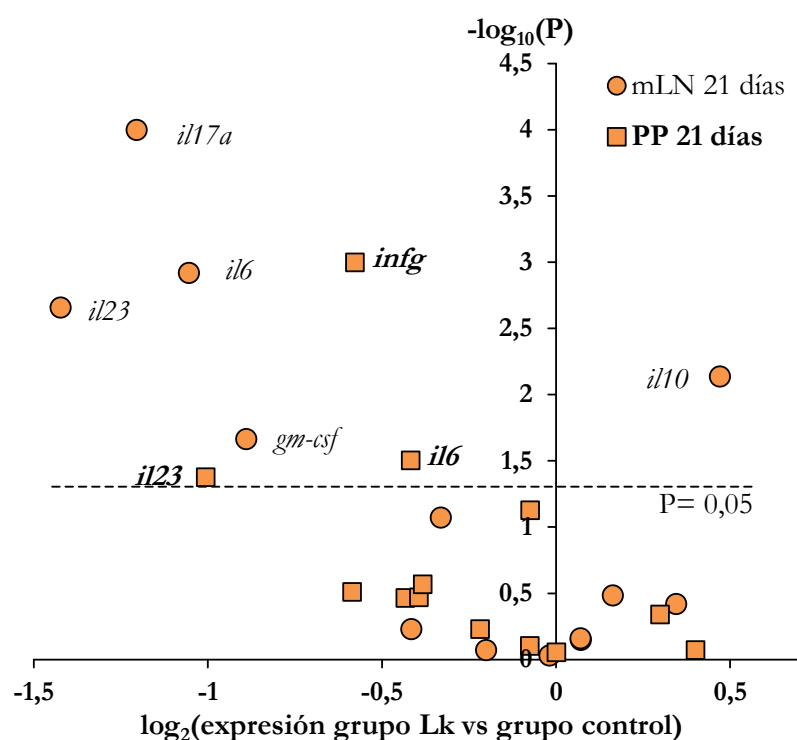
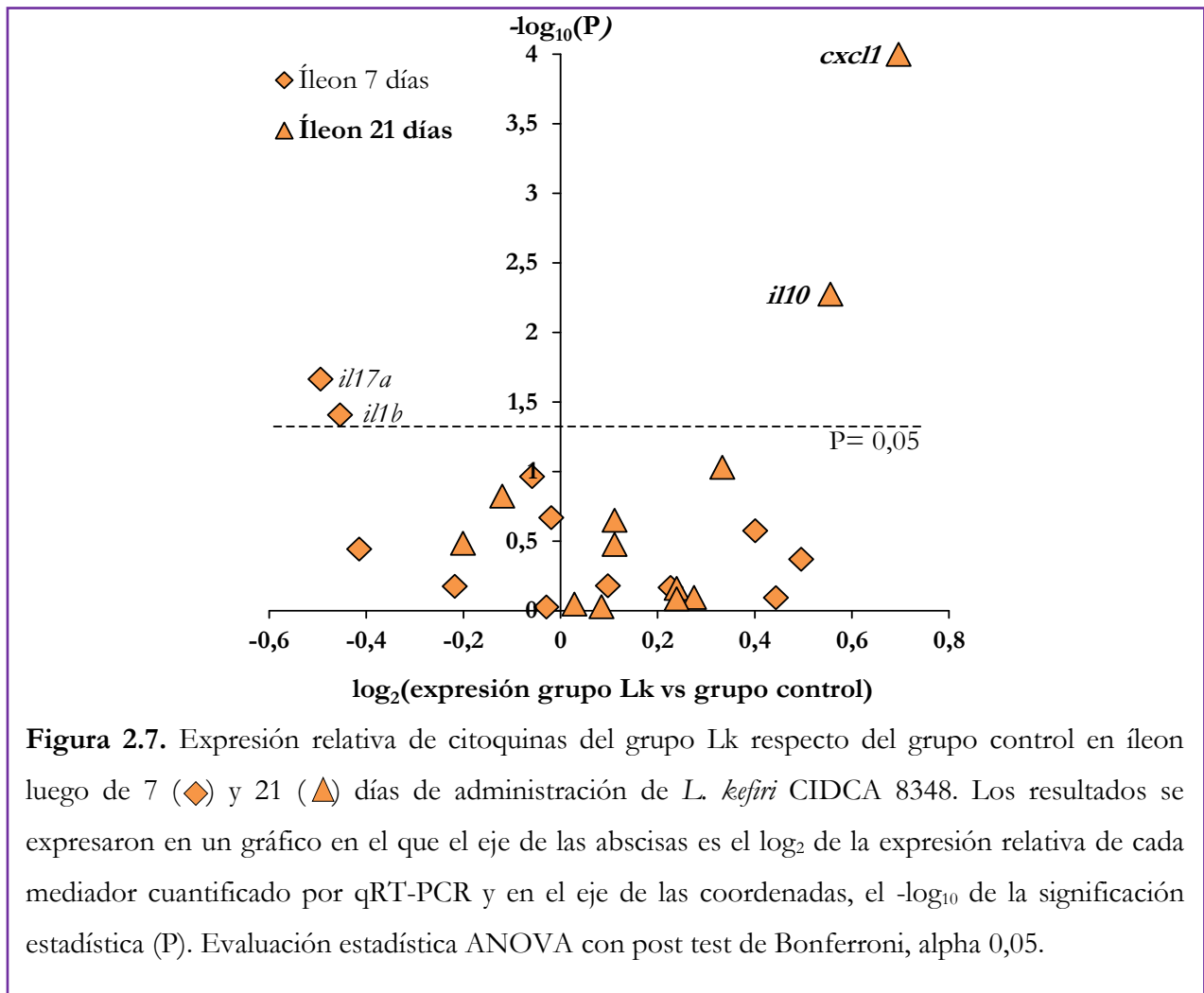


Figura 2.6. Expresión relativa de citoquinas del grupo Lk respecto del grupo control en nódulos linfáticos mesentéricos (mLN, ●) y placas de Peyer (PP, ■) luego de 21 días de administración de *L. kefir* CIDCA 8348. En el eje de las abscisas, se graficó el log₂ de la expresión relativa de cada mediador cuantificado por qRT-PCR y en el eje de las coordenadas, el -log₁₀ de la significación estadística (P). Evaluación estadística ANOVA con post test de Bonferroni, alpha 0,05.

1.3.2. Expresión de citoquinas y quimoquinas en sitios efectores

En la figura 2.7 se muestran los resultados de expresión génica obtenidos en secciones de íleon. La administración de *L. kefir* durante 7 días disminuyó significativamente la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias *il1b* e *il17a*. Luego de tres semanas de tratamiento, estas se normalizaron, y se observó un aumento de la expresión de *ccl1* e *il10*.



En secciones de colon, se analizó la expresión de las mismas moléculas que en íleon. La figura 2.8 muestra, únicamente, las que resultaron modificadas por el tratamiento con *L. kefir*. A diferencia de lo observado en los otros tejidos, no se observaron cambios en la expresión luego de 7 días de administración de *L. kefir*. Sin embargo, el tratamiento prolongado generó una disminución significativa de *il1b*, *ifng* y *gm-csf*.

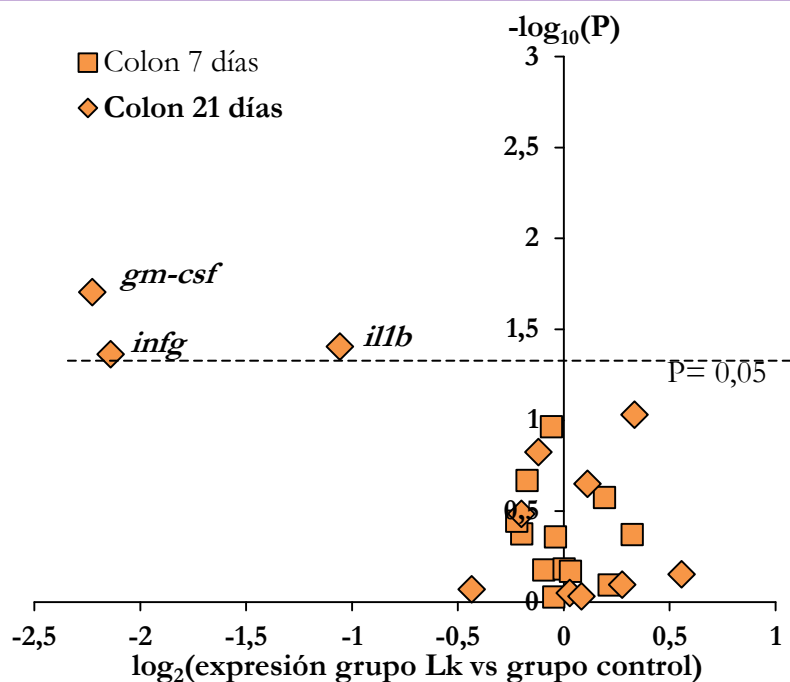


Figura 2.8. Expresión relativa de citoquinas del grupo Lk respecto del grupo control en colon luego de 7 (■) y 21 (◆) días de administración de *L. kefir* CIDCA 8348. Los resultados se expresaron en un gráfico en el que el eje de las abscisas es el \log_2 de la expresión relativa de cada mediador cuantificado por qRT-PCR y en el eje de las coordenadas, el $-\log_{10}$ de la significación estadística (P). Evaluación estadística ANOVA con post test de Bonferroni, alpha 0,05.

Con la finalidad de complementar los resultados previamente discutidos en relación con la producción de IgA (aumento del número de células IgA+ en mLN y de la cantidad de IgA secretada en materia fecal), se evaluó la expresión de moléculas involucradas en el cambio de clase, expansión y diferenciación de células B a células plasmáticas secretoras de IgA (Ohland and Macnaughton 2010; Macpherson et al 2012). Si bien no se detectaron diferencias entre lotes experimentales en la expresión de *april*, *baff* y *tgfb* en sitios inductores y efectores de la respuesta inmune de mucosas, se observó un aumento significativo de *il10* en íleon y mLN. Ha sido descripto que esta citoquina induce la producción de IgA, ya sea a través de inducción de TGF β en las células B, o mediante la potenciación de la maduración luego del cambio de clase (Macpherson et al 2012).

Resulta interesante destacar, el aumento de la expresión de *cxcl1* (también denominada KC) en íleon. Esta molécula, análoga funcional de la quimocina humana IL-8, se encuentra involucrada en el

reclutamiento de neutrófilos a los tejidos. Este tipo celular es crítico en la primera línea de defensa frente a infecciones bacterianas y fúngicas, y se encuentra cada vez más evidencia en relación a su participación en la supresión de la respuesta adaptativa y los mecanismos de reparación tisular (Gabelloni et al 2013). De hecho, se ha demostrado en modelos murinos de colitis inducida químicamente, que su presencia es esencial en el proceso de recuperación tisular (Fournier and Parkos 2012). Sin embargo, también se lo ha asociado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, por lo que el control de la sobrevivencia de los neutrófilos es muy importante para evitar la destrucción masiva de tejidos. En este sentido, el hecho de que la expresión de IL-10 se encuentre aumentada, es de particular relevancia, ya que esta molécula no sólo potencia la funcionalidad de los neutrófilos como la fagocitosis y el estallido respiratorio, sino que también induce apoptosis (Fournier and Parkos 2012; Gabelloni et al 2013). En cuanto al factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), cuya expresión se encuentra disminuida en mLN y colon, es importante resaltar que, tradicionalmente, se la ha considerado una molécula pro-inflamatoria debido a su rol en el reclutamiento, supervivencia, activación y diferenciación de macrófagos y neutrófilos durante procesos inflamatorios (Däbritz 2014). Sin embargo, también es responsable de promover la reparación tisular a través del aumento de la proliferación/supervivencia de las células epiteliales y el reclutamiento de distintos tipos celulares, capaces de colaborar en el proceso de reparación (Egea et al 2010; Däbritz 2014). La expresión disminuida de este mediador, podría asociarse con el fortalecimiento de la barrera epitelial observado, que conlleva a un menor ingreso de antígenos a la lamina propia, y el estado no-inflamatorio de los ratones tratados con *L. kefir* CIDCA 8348.

Smelt y col. (2013) evaluaron el efecto de la administración, durante cinco días, de tres bacterias aisladas de alimentos: *L. plantarum* WCFS1, *L. salivarius* UCC118, y *Lc. lactis* MG1363. El análisis se basó, principalmente, en la evaluación mediante citometría de flujo de las poblaciones de células dendríticas y células T, aisladas de PP y lamina propia de intestino delgado y colon, por lo que el contraste entre resultados, se hace dificultoso. Sin embargo, vale la pena destacar que, a diferencia de lo observado luego de la administración de *L. kefir* CIDCA 8348, todos los microorganismos

aumentaron el número de células dendríticas en PP. Por otro lado, Smelt y col. no observaron diferencias en la expresión de citoquinas en sitios efectores por qRT-PCR, pero se documentaron diferencias en el efecto ejercido por *L. plantarum* y *L. salivarius* en íleon y colon. *L. plantarum* indujo un desvío de las células T hacia un perfil Th2 en íleon mientras en colon generó un perfil regulatorio. En el caso de *L. salivarius*, se observó un perfil regulatorio en íleon y un aumento de la activación de células T CD4⁺ y CD8⁺ en colon. Por su parte, Duary y col. (2012) evaluaron el efecto de la administración de dos cepas de *L. plantarum*, a ratones Swiss, durante 7 días. Con ambas cepas observaron una disminución de la expresión en colon de IL-12 e IL-6 y un aumento de IL-4 e IL-10, sin variaciones en TNF- α .

Si bien la bibliografía utilizada para discutir estos resultados es escasa y no se encontraron trabajos en los que se evalúe el efecto de la administración de probióticos durante períodos prolongados en animales sanos, se puede observar que, tal como sucede *in vitro*, los hallazgos reportados son cepa-dependiente y se han observado efectos diferenciales en íleon y colon.

La disminución de la expresión de citoquinas asociadas a los perfiles Th1 y Th17 en sitios inductores y efectores, junto con el aumento de la expresión del gen que codifica para la IL-10, podrían asociarse con la inducción de un perfil regulatorio o tolerogénico. Para probar esta hipótesis, se evaluó la producción de citoquinas *ex vivo* por explantes de íleon y colon estimulados con LPS.

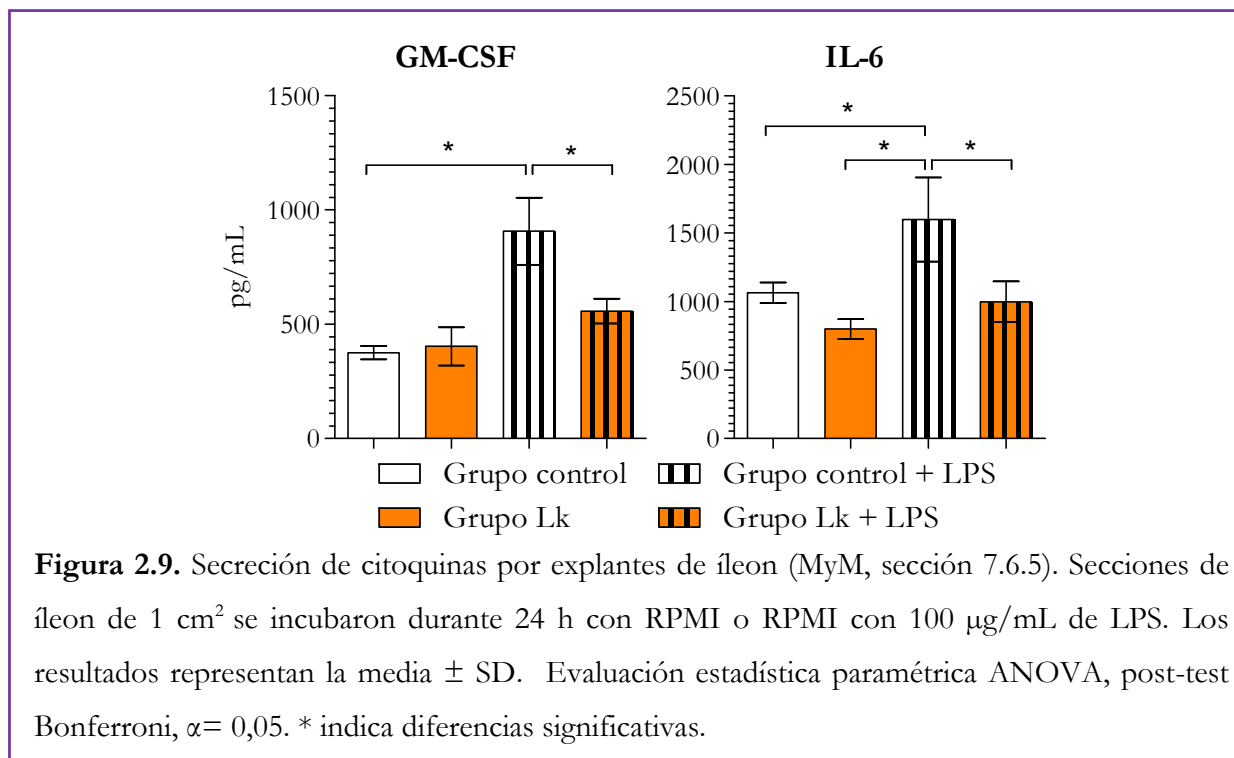
1.3.3. Secreción de citoquinas por explantes de íleon y colon en presencia de un estímulo pro-inflamatorio

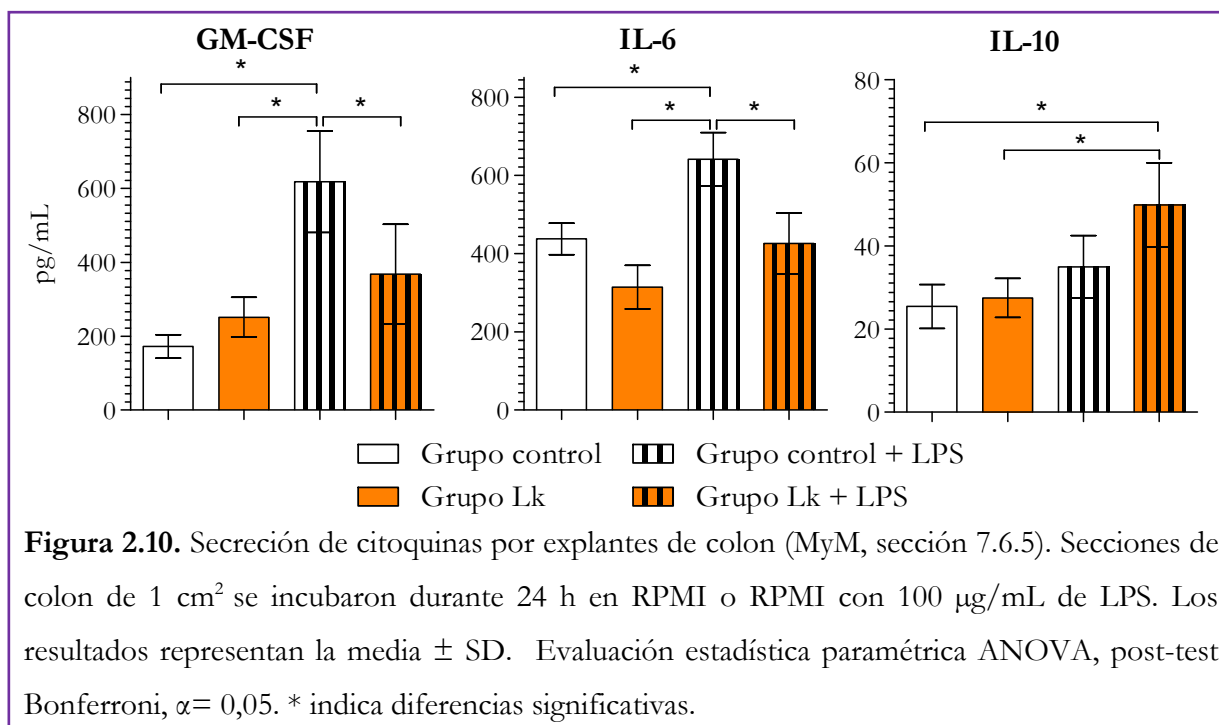
Se estudió la respuesta de explantes de íleon y colon, de ratones control y Lk, en un entorno pro-inflamatorio generado por el agregado de LPS al medio de cultivo (MyM sección 7.6.5). Se cuantificó la concentración de IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF y TGF- β , en sobrenadantes de cultivo, luego de 24 horas de incubación. En todas las condiciones ensayadas, los niveles de TGF- β se encontraron por debajo del límite de detección (MyM sección 7.6.5.1). En las

figura 2.9 y 2.10 se grafican sólo las concentraciones de los mediadores que se modificaron entre los distintos tratamientos.

La estimulación con LPS generó un aumento de GM-CSF e IL-6 tanto en explantes de íleon como de colon provenientes de ratones del grupo control, pero estos mediadores pro-inflamatorios no se modificaron en los tejidos de ratones del grupo Lk posteriormente estimulados con LPS. En este sentido, teniendo en cuenta la participación de GM-CSF en los procesos de reparación tisular asociados a inflamación (Däbritz 2014), la ausencia de inducción de este mediador en los ratones tratados con *L. kefir* podría relacionarse, al menos en parte, al hecho de que el LPS no indujo una respuesta pro-inflamatoria significativa en los tejidos de este grupo de animales. Por otro lado, en el caso de los explantes de colon, la secreción de IL-10 aumentó significativamente únicamente en los tejidos de ratones Lk estimulados LPS.

Estos resultados confirman el fenotipo anti-inflamatorio asociado a la administración de *L. kefir* CIDCA 8348 a ratones Swiss.





1.4. Efecto sobre la microbiota en materia fecal

El tracto gastrointestinal contiene una gran cantidad de microorganismos, microbiota, entre los que se incluyen integrantes del reino fungi, virus, protozoos, archaea y bacterias, en una cantidad que oscila entre 10^{13} – 10^{14} células microbianas (Neish 2009; Quigley 2011; Kamada et al 2013a). La presencia de la microbiota juega un rol fundamental en el desarrollo anatómico, fisiológico e inmunológico del huésped, y presenta, a su vez, grandes variaciones tanto numéricas como de especie según su localización a lo largo del tracto gastrointestinal debido a las condiciones microambientales específicas, entre las que podemos citar el pH, la producción de péptidos anti-microbianos, la disponibilidad de sustratos o nutrientes y la respuesta del sistema inmune de mucosas (Gu et al 2013b; Hardy et al 2013; Fung et al 2014). En relación a esto último, se ha propuesto que el sistema inmune de mucosas es responsable de asegurar la diversificación de la microbiota intestinal, manteniendo el balance entre los simbioses y patobioses, microorganismos potencialmente peligrosos que podrían ser responsables del desarrollo de enfermedades inflamatorias en caso de no ser adecuadamente controlados (Chow et al 2011; Kamada et al 2013a).

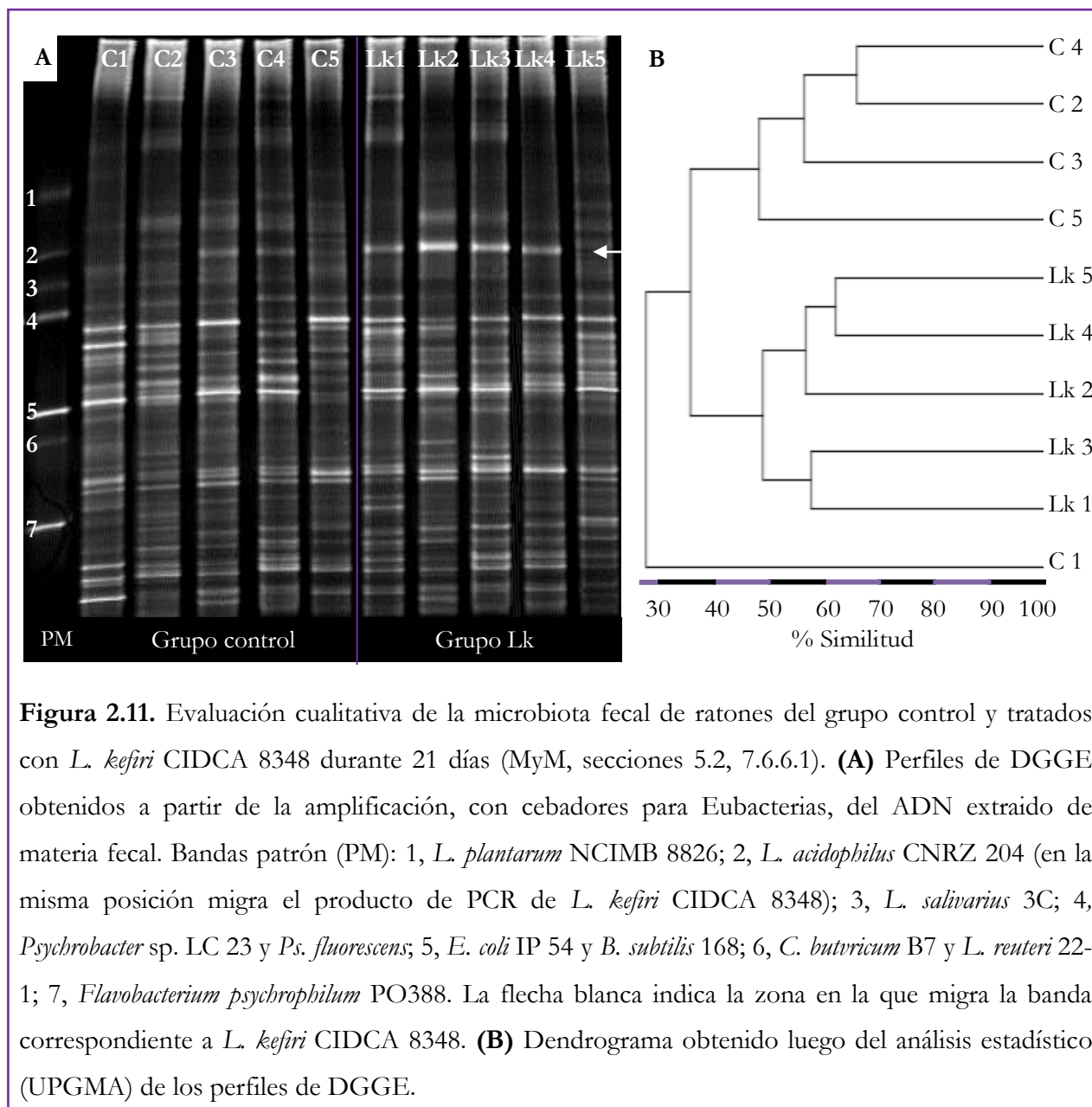
Las eubacterias presentes en la microbiota suelen agruparse según su phylum. En individuos sanos, las bacterias Gram-negativas se encuentran mayoritariamente representadas por los phylum *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*, mientras que las Gram-positivas pertenecen al phylum *Firmicutes* (Thomas et al 2011; Hakansson and Molin 2011). Más aún, se ha descrito que en una microbiota saludable la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* es elevada (Ettreiki et al 2012; Vanhooren et al 2013).

En las secciones anteriores se demostró que la administración de *L. kefir* CIDCA 8348 tiene un efecto sobre la barrera epitelial (capítulo 2, sección 1.2) y el sistema inmune de mucosas (capítulo 2, sección 1.3). Dado que los microorganismos probióticos pueden ejercer sus efectos a través de la interacción directa con las células del huésped o, indirectamente, mediante la secreción de sustancias y la modificación de la composición, diversidad o funciones metabólicas de la microbiota (Collado et al 2008; Lebeer et al 2008; Hemarajata and Versalovic 2013), se decidió estudiar el impacto de la administración de *L. kefir* CIDCA 8348 sobre las poblaciones bacterianas presentes en muestras de materia fecal recolectadas luego de 21 días de tratamiento. Se realizaron estudios cualitativos mediante DGGE (MyM, sección 7.6.6.2) y cuantitativos mediante PCR cuantitativa (MyM, sección 7.6.6.1).

1.4.1. Estudios cualitativos.

Mediante la técnica de DGGE, se evaluaron los perfiles electroforéticos obtenidos en muestras de DNA de materia fecal amplificadas utilizando cebadores para la región V2-V3 del gen 16S ribosomal (Bibiloni et al. 2005; Walter et al. 2000, MyM, sección 7.6.6.2). En la figura 2.11.A, se muestran los perfiles individuales de cinco ratones del grupo control (izquierda) y cinco del grupo Lk (derecha). Para la comparación entre individuos, se consideraron las bandas como caracteres y su presencia o ausencia como el estado de éstos, utilizando el programa PyElph 1.4. La similitud entre perfiles se calculó mediante el coeficiente de Jaccard y el agrupamiento se llevó a cabo mediante el método de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA) empleando el programa SYSTAT versión 12. Los resultados se presentaron en forma de dendrograma (figura 2.11.B).

Los perfiles de bandas DGGE que presentan los individuos tratados, se agruparon en un clúster diferente a los de los individuos control, a excepción del individuo C1 que no agrupó en ningún clúster. Estos resultados indican que la administración de *L. kefir* CIDCA 8348 produjo variaciones en la composición de la microbiota bacteriana en materia fecal. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el número de bandas detectadas en el perfil de DGGE de los individuos pertenecientes al grupo Lk respecto del grupo control (32 ± 3 y 30 ± 2 , respectivamente). Este parámetro es importante, ya que se encuentra asociado con la diversidad bacteriana de las muestras (Fuentes et al 2008).



Si bien se observó, en los ratones del grupo Lk, una mayor intensidad en la posición que migra el producto de amplificación de la cepa *L. kefir* CIDCA 8348 y los lactobacilos del grupo *L. acidophilus*, la utilización de la técnica de DGGE en términos cuantitativos, ha sido muy discutida debido a que no es posible detectar a todos los microorganismos presentes en una muestra por esta metodología (Neilson et al 2013). Es por esto, que se realizaron estudios cuantitativos mediante PCR cuantitativa para complementar estos resultados.

1.4.2. Estudios cuantitativos

Se utilizaron ecuaciones que correlacionan el C(t) con el número de microorganismos (UFC) de cada población bajo estudio (MyM, sección 7.6.6.1). En el caso de bacterias no cultivables, se utilizaron directamente los valores C(t) obtenidos para realizar comparaciones entre lotes.

En primer lugar, se evaluó la cantidad de eubacterias por gramo de materia fecal utilizando cebadores para la región V2-V3 del gen 16S ribosomal (Walter et al. 2000). No se observaron diferencias significativas entre los grupos control y Lk ($7,4 \pm 2,1 \cdot 10^9$ UFC/g y $7,1 \pm 2,2 \cdot 10^9$ UFC/g, respectivamente). Posteriormente, se evaluó el contenido de bacterias pertenecientes a los phylum *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*, y se analizó la relación entre *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. No se observaron diferencias significativas entre los lotes control y Lk en los grupos bacterianos mencionados (figura 2.12), ni en la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* ($1,2 \pm 0,4$ y $1,1 \pm 0,2$, respectivamente).

Muchos autores han documentado la relación directa entre inflamación y la inversión de la relación *Firmicutes/Bacteroidetes*, el aumento de microorganismos pertenecientes al phylum *Proteobacteria* y/o la disminución de la diversidad microbiana (Ettreiki et al 2012; Vanhooren et al 2013; Hold et al 2014). En el grupo experimental tratado con *L. kefir*, no se generaron modificaciones en la microbiota compatibles con lo descrito en contextos inflamatorios. Estos resultados correlacionan con los ya descritos en este capítulo (secciones 1.1 y 1.3).

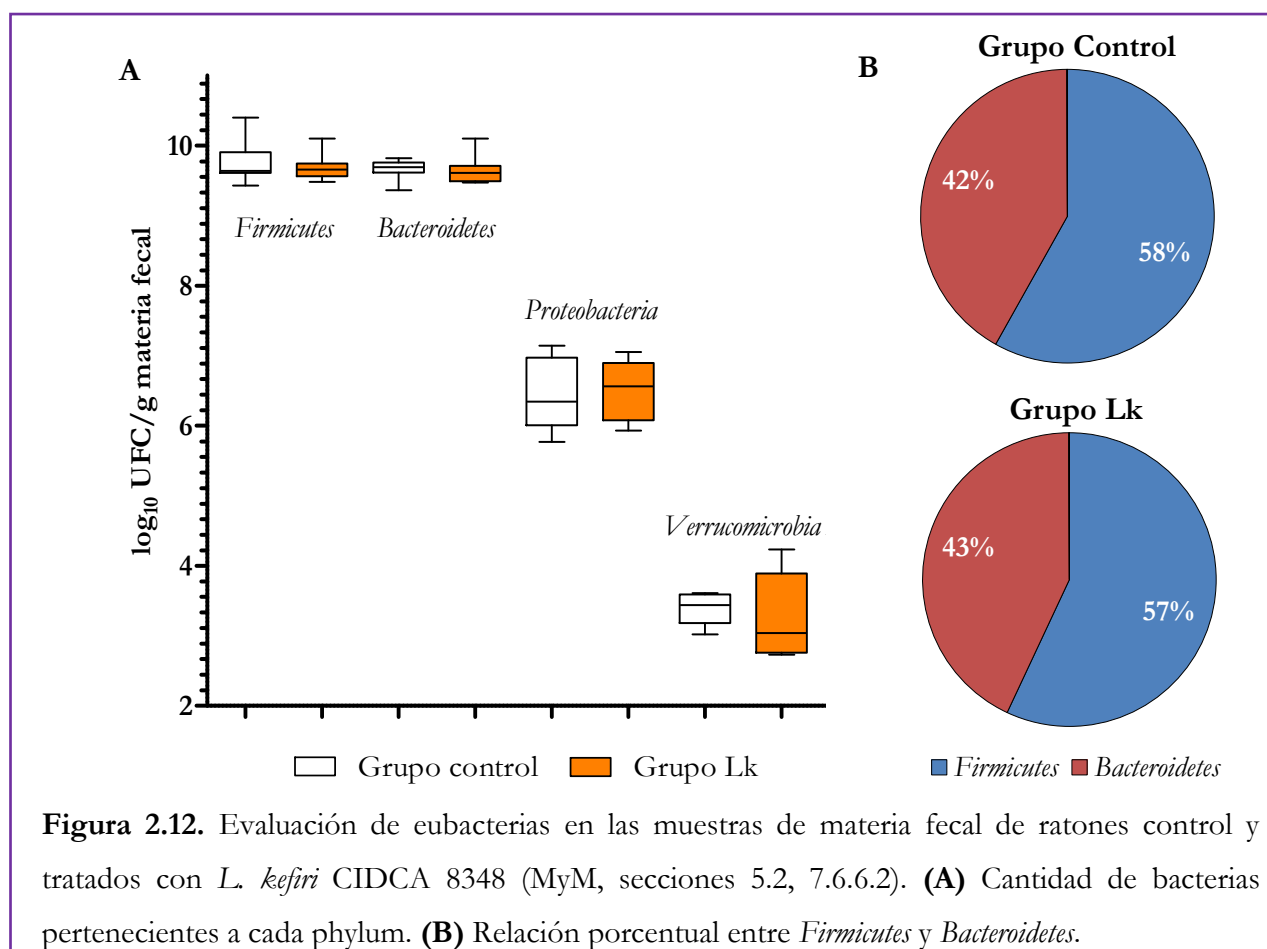


Figura 2.12. Evaluación de eubacterias en las muestras de materia fecal de ratones control y tratados con *L. kefir* CIDCA 8348 (MyM, secciones 5.2, 7.6.6.2). **(A)** Cantidad de bacterias pertenecientes a cada phylum. **(B)** Relación porcentual entre *Firmicutes* y *Bacteroidetes*.

Tabla 2.3. Poblaciones y especies bacterianas estudiadas (MyM, sección 7.6.6.1)

Phylum	Poblaciones y especies	Phylum	Poblaciones y especies	
<i>Firmicutes</i>	<i>Lactobacillus</i> spp	<i>Bacteroidetes</i>	Grupo <i>Bacteroides fragilis</i>	
	Grupo <i>Lactobacillus acidophilus</i> ^a		<i>Prevotella</i> spp	
	<i>Lactobacillus murinus</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacterium</i> spp	
	<i>Lachnospiraceae</i>		<i>Proteobacteria</i>^c	<i>Enterobacteriaceae</i>
	Grupo <i>Clostridium perfringens</i> (cluster I)			<i>Escherichia coli</i>
	Grupo <i>Clostridium coccoides</i> (cluster XIVa)	<i>Verrucomicrobia</i>^d	<i>Akkermansia muciniphila</i>	
	Grupo <i>Clostridium leptum</i> (cluster IV)			
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>				
<i>Enterococcus</i> spp				
Segmented filamentous bacteria ^b				

^a Los cebadores utilizados amplifican microorganismos pertenecientes al grupo *L. acidophilus* y también las especies *L. kefir* y *L. kefiranofaciens*.

^b Bacterias no cultivables, se compararán los c(t).

^c Se consideró que la cantidad de *Proteobacteria* equivale a la obtenida con el cebador de *Enterobacteriaceae*, debido a que ha sido descrito que este phylum es poco abundante y se encuentra dominado por dicha familia (Berry et al 2012)

^d Se consideró que la cantidad de *Verrucomicrobia* equivale a la de *Akkermansia muciniphila*, debido a que es la única especie, descrita en materia fecal, perteneciente a este phylum (Berry et al 2012; Ouwerkerk et al 2013).

Con la finalidad de evaluar cambios en grupos particulares dentro de los phylum ya mencionados, se analizaron las poblaciones y especies que se detallan en la tabla 2.3 (cebadores disponibles en MyM, sección 7.6.6.1). En la figura 2.13, que muestra los resultados obtenidos para *Firmicutes* cultivables, se incluyeron los resultados obtenidos para el phylum *Firmicutes* como referencia. Se puede observar que en el grupo Lk la población de *Lactobacillus* aumentó significativamente a expensas de un aumento en el grupo *L. acidophilus*, cuyo cebador amplifica también para *L. kefir*, y sin modificaciones en la especie *L. murinus* ni en otras poblaciones pertenecientes a este phylum. Desafortunadamente, no se dispone de un cebador específico para *L. kefir*. Sin embargo, estos resultados muestran una cierta correlación con lo observado mediante DGGE.

Como se discutió anteriormente en este capítulo (sección 1.2.3), *L. kefir* es, al igual que otros lactobacilos, reconocido por las células a través de TLR2 (Cario and Podolsky 2005; Hong et al 2009). Dado que se ha demostrado recientemente que la estimulación del TLR2 puede generar, además de la respuesta pro-inflamatoria extensamente estudiada, respuestas anti-inflamatorias, con secreción de IL-10 (Smelt et al 2013a), el aumento de la población de *Lactobacillus* por el tratamiento con *L. kefir*, podría explicar, al menos en parte, los resultados de inmunomodulación obtenidos. El balance entre una respuesta pro- o anti-inflamatoria podría estar dado por la cantidad y composición de agonistas TLR2, así por el tipo de células que presenten el receptor. Además, el estado de activación de las células presentadoras de antígeno podría tener un papel decisivo en el tipo de respuesta a desarrollar. Para intentar dilucidar el mecanismo por el cual la administración de *L. kefir* genera el efecto anti-inflamatorio observado, sería importante estudiar las poblaciones de células presentadoras de antígeno presentes tanto en sitios inductores como efectores del sistema inmune de mucosas.

Es interesante destacar que se observó una menor variabilidad entre individuos del grupo Lk que entre ratones del grupo control en casi todas las poblaciones microbianas analizadas (figura 2.13 y tabla 2.4). Distintos autores han reportado resultados similares y han sugerido que estos hallazgos se deben a que la composición de la comunidad microbiana es estabilizada como consecuencia del tratamiento probiótico (Hemarajata and Versalovic 2013).

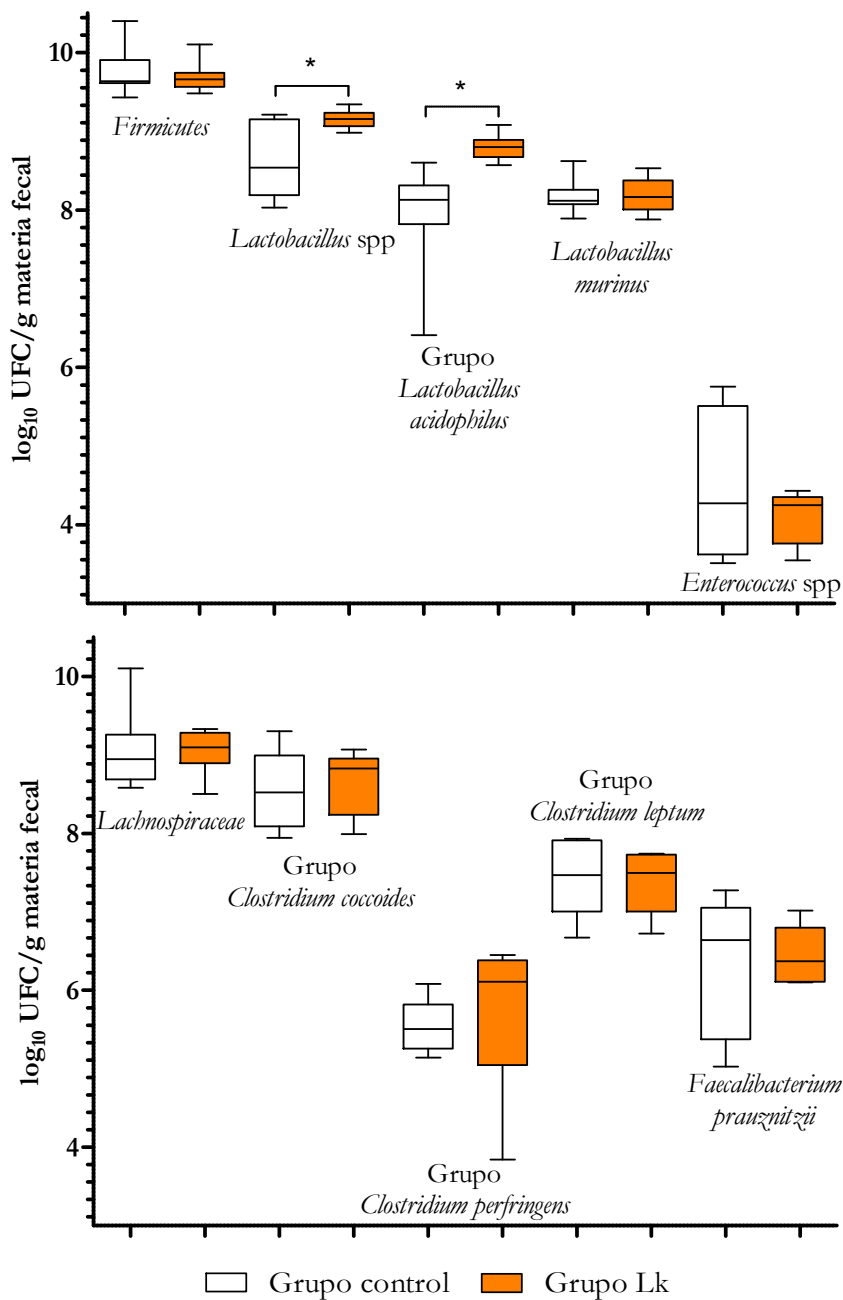


Figura 2.13. Cuantificación de *Firmicutes* cultivables en materia fecal de ratones del grupo control y tratados con *L. kefir* CIDCA 8348 (MyM, secciones 5.2, 7.6.6.1). Evaluación estadística paramétrica ANOVA, post-test Bonferroni, $\alpha = 0,05$. * indica diferencias significativas.

En relación a las poblaciones pertenecientes a otros phylum (tabla 2.3), no se observaron diferencias significativas en la cantidad de microorganismos por gramo de materia fecal (UFC/g de materia fecal) entre los lotes experimentales. Los resultados obtenidos para cada población bacteriana

se encuentran detallados en la tabla 2.4, la cual se ha ubicado en la segunda parte de este capítulo, ya que en ella también se muestran datos experimentales correspondientes a dicha parte.

El siguiente paso en el estudio de las propiedades probióticas de *L. kefir* CIDCA 8348, es el estudio del impacto de su administración en el modelo de inflamación intestinal inducida por dextran sulfato de sodio (DSS), un agente químico que daña la barrera epitelial principalmente a nivel colónico (Zakostelska et al 2011; Claes et al 2011). Si bien la composición de la microbiota varía a lo largo del tracto gastrointestinal, los resultados obtenidos en materia fecal presentan grandes similitudes con lo observado en colon (Gu et al 2013b). En este contexto, es de particular relevancia que no se hayan observado incrementos en grupos bacterianos que incluyen patobiontes entre sus integrantes: poblaciones del phylum *Bacteroidetes*, el grupo *C. perfringens*, *Enterococcus* spp, la familia *Enterobacteriaceae* o la especie *E. coli* (Chow et al 2011; Kamada et al 2013a).

Conclusiones

1. *L. kefir* CIDCA 8348 es inocua para ratones Swiss machos de 6 semanas de edad:

- no se observaron cambios en la consistencia de la heces, ni comportamientos o signos asociados a malestar o dolor;
- ambos lotes experimentales presentaron un aumento de la masa corporal comparable con lo esperado para ratones Swiss de 6 a 9 semanas de edad;
- no se observó translocación de microorganismos a hígado, bazo o sangre;
- no se modificó la longitud del colon ni se observaron cambios histológicos compatibles con inflamación;
- no se observaron incrementos en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por explantes de íleon y colon.

2. La administración de *L. kefir* CIDCA 8348 fortalece la función de la barrera epitelial:

- aumentó el número de células IgA positivas en mLN e incrementó la secreción de IgA, cuantificada en materia fecal;
- aumentó la expresión de mucinas tanto a nivel intestinal como colónico.

3. *L. kefir* CIDCA 8348 ejerce un efecto anti-inflamatorio *in vivo*:

- disminuyó la expresión de moléculas pro-inflamatorias en PP (IL-6, GM-CSF, IL-17A y IFN- γ), mLN (IL-6, GM-CSF y IL-17A) y colon (GM-CSF, IFN- γ y IL-1 β), y aumentó la expresión de IL-10 en mLN y de IL-10 y CXCL-1 en íleon;

- la estimulación *ex vivo* de explantes de íleon y colon con LPS, mostró una disminución significativa de la secreción de IL-6 y GM-CSF en tejidos provenientes de animales tratados con *L. kefir* respecto de los tejidos de animales del lote control.

4. La administración de *L. kefir* CIDCA 8348 modula la microbiota fecal:

- a través del análisis de los perfiles de DGGE, se observaron diferencias en la composición de la microbiota de los animales tratados respecto de los controles, aunque sin una modificación aparente en la diversidad microbiana;
- aumentó significativamente la población de *Lactobacillus*, y en particular el grupo *L. acidophilus* en las muestras de los animales tratados con *L. kefir* respecto del grupo control.
- se observó una menor variabilidad entre individuos del grupo Lk que entre ratones del grupo control en casi todas las poblaciones analizadas, lo que sugiere una mayor estabilidad de la comunidad microbiana;
- no se observaron incrementos en grupos bacterianos que incluyen patobiontes entre sus integrantes: poblaciones del phylum *Bacteroidetes*, el grupo *C. perfringens*, *Enterococcus* spp, la familia *Enterobacteriaceae* o la especie *E. coli*.

Segunda parte

Efecto de la administración de *L. kefir* CIDCA 8348 en un modelo de inflamación intestinal inducida por DSS

Las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD, *Inflammatory Bowel Disease*) son enfermedades multifactoriales, cuyos exponentes principales son la enfermedad de Crohn (CD) y la colitis ulcerosa (UC), cuya frecuencia ha aumentado notablemente en las últimas décadas. Si bien la localización anatómica del foco inflamatorio y los perfiles de respuesta inmunológica generados son diferentes en CD y UC, se cree que ambas enfermedades se originan por una respuesta inmune exacerbada a microorganismos presentes en el contenido intestinal, que llevan a un estado inflamatorio persistente, en individuos con predisposición genética, aunque también se las ha asociado con la dieta, la composición de la microbiota y la edad de los pacientes (Ponder and Long 2013). En particular, la UC presenta una distribución de focos inflamatorios en la mucosa colónica y se ha demostrado el rol de IL-23, entre otras moléculas, en su desarrollo (Saleh and Elson 2011).

En los últimos años se han desarrollado muchos modelos animales para el estudio de IBD, tanto espontáneos como inducidos químicamente o por modificaciones genéticas. Si bien ninguno de ellos representa completamente la patología humana, son valiosos para la evaluación de los factores involucrados en la patogénesis y posibles estrategias terapéuticas, aunque es claro que presentan muchas limitaciones (Valatas et al 2013). Entre los modelos inducidos químicamente, uno de los más usados, debido a la simplicidad de inducción y que puede ser utilizado en distintos roedores de laboratorio, es el modelo de inducción de colitis por dextran sulfato de sodio (DSS). El DSS es administrado en agua de bebida, y variando la concentración, frecuentemente entre 1 y 5% p/v, duración y frecuencia de administración de DSS, puede inducirse colitis aguda y crónica. Si bien este modelo está muy bien establecido y la clínica se asemeja a la UC, los roedores muestran distintas susceptibilidades a DSS que afectan el desarrollo y severidad de la colitis inducida (Claes et al 2011; Perše and Cerar 2012; DeVoss and Diehl 2014). Estas variaciones dependen de la genética del roedor

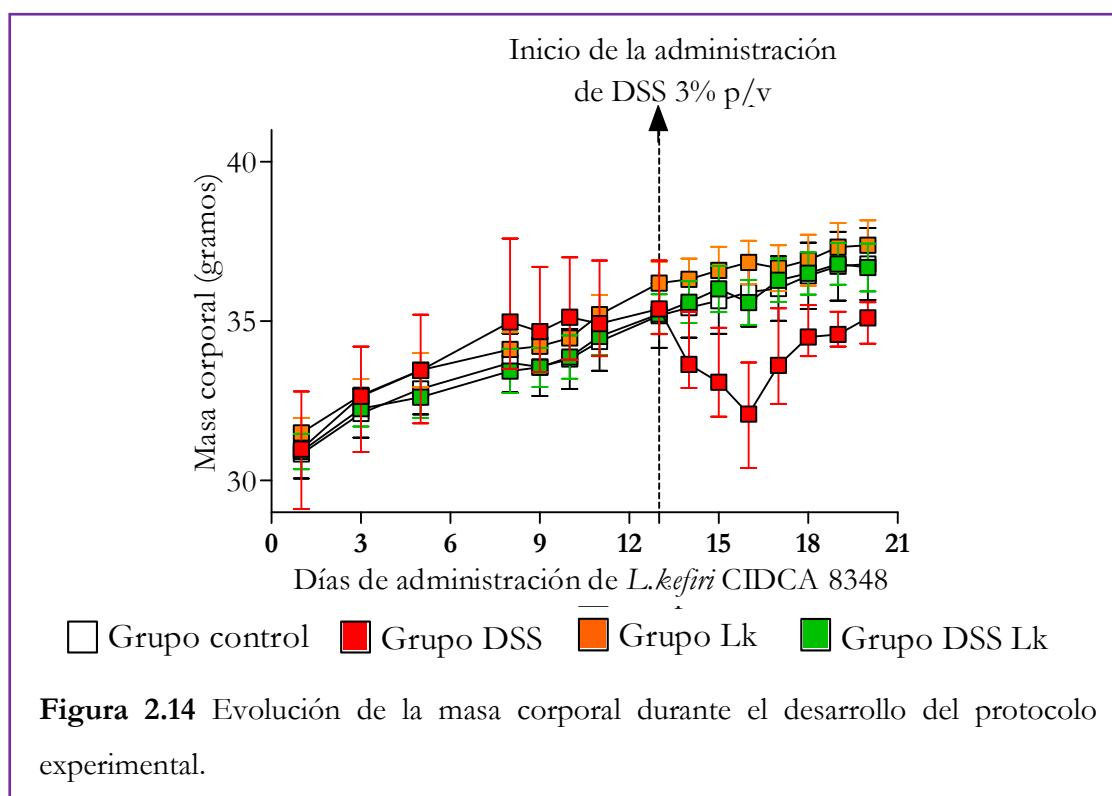
utilizado, del estado microbiológico y microbiota que éste posee, y del peso molecular, concentración y duración del tratamiento con DSS (Perše and Cerar 2012). En general, en el modelo agudo de colitis inducida por DSS, la patología comienza con la disrupción de la barrera epitelial, probablemente como resultado de la quelación de cationes divalentes (como Ca^{2+} y Mg^{2+}), lo que debilita las uniones estrechas entre células epiteliales, ocasionando el aumento de la permeabilidad que conlleva a un ingreso masivo de microorganismos y antígenos del lumen intestinal a la lamina propia, seguida de la infiltración de macrófago, leucocitos y/o neutrófilos. Luego de esta fase de inducción, se genera un proceso inflamatorio que se localiza principalmente en colon y recto (Johansson et al 2010; Zakostelska et al 2011; Claes et al 2011).

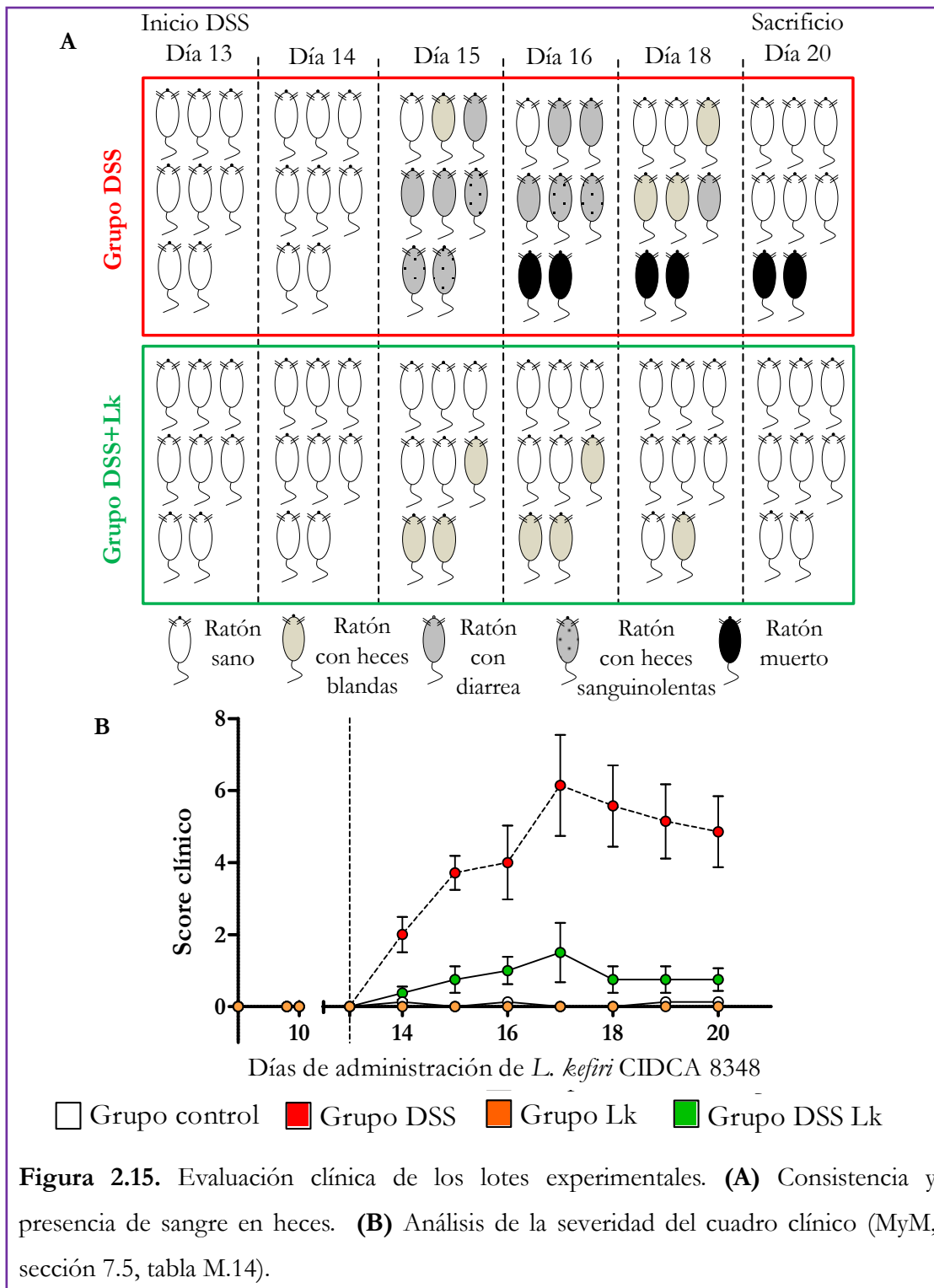
El uso de modelos animales de IBD, ha permitido establecer tres mecanismos principales a través de los cuales los microorganismos probióticos pueden ejercer sus efectos benéficos en modelos de inflamación intestinal, los que dependerán fuertemente de la actividad metabólica y de las estructuras superficiales que posee el probiótico utilizado. En primer lugar, los probióticos podrían restaurar la microbiota intestinal benéfica, simbiosis, y/o excluir e inhibir el crecimiento de patobiontes y patógenos. En segundo lugar, podrían fortalecer las funciones de la barrera epitelial y, finalmente, podrían modular la respuesta inmune, tanto local como sistémica (Zakostelska et al 2011; Claes et al 2011; Rupa and Mine 2012).

Dado que se comprobó la inocuidad de *L. kefir* CIDCA 8348 en ratones Swiss y se observó el potencial efecto anti-inflamatorio luego de su administración continua, se decidió evaluar el efecto de este microorganismo en un modelo agudo de colitis inducida por DSS en ratones Swiss.

A continuación se presenta un esquema del protocolo experimental, las muestras que se tomaron durante el desarrollo del mismo y para qué determinaciones se utilizaron (MyM, secciones 7.3, 7.5).

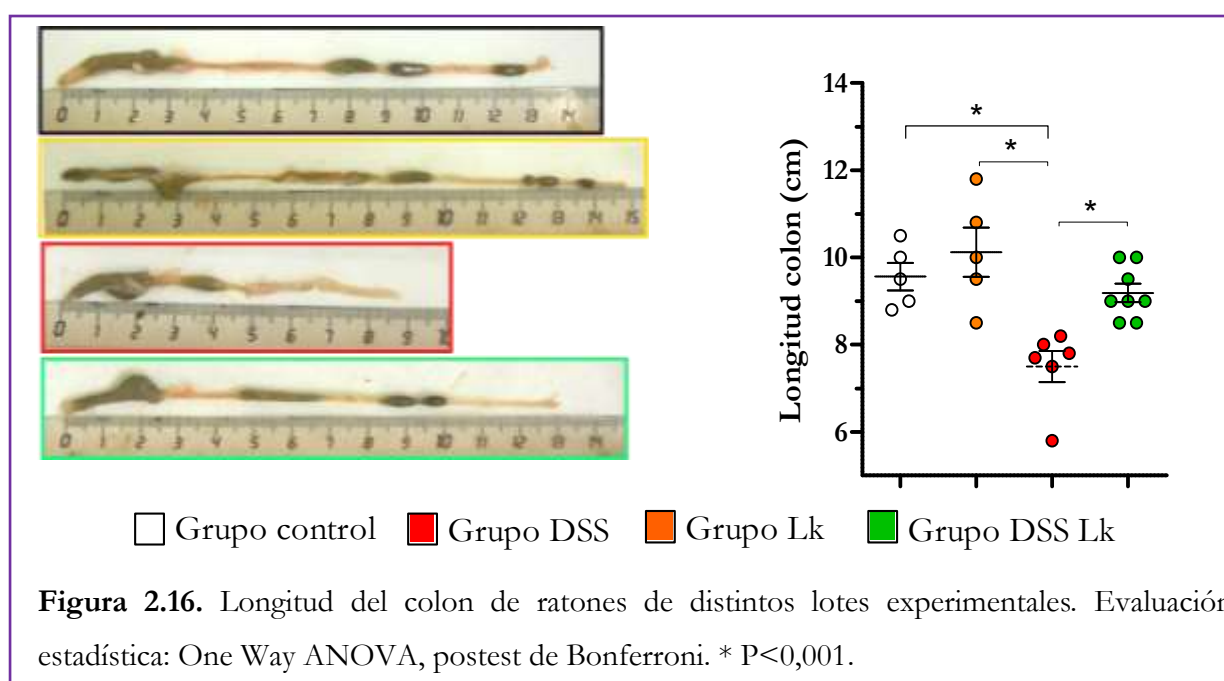
del 20% de su peso en 24 horas (punto final humanitario establecido en este protocolo experimental). Si bien, en este lote experimental, la curva de crecimiento comenzó a normalizarse a partir del día 17, nunca se alcanzó la masa corporal de los individuos del grupo control. En el mismo sentido, en la figura 2.15.A se puede observar que los ratones del grupo DSS, presentaron cuadros diarreicos y heces sanguinolentas. Lo que se ve reflejado en los valores altos del “score clínico” (figura 2.15.B). En cuanto al efecto del tratamiento con *L. kefir*, en los animales que recibieron DSS y *L. kefir* CIDCA 8348, grupo DSS+Lk, no se observaron alteraciones de la curva de crecimiento (figura 2.14) y, aunque algunos ratones presentaron alteraciones en la consistencia de las heces luego de tres días de administración de DSS, ninguno presentó cuadros diarreicos ni heces sanguinolentas (figura 2.15.A). En concordancia con lo descripto, se observó que el “score clínico” diario calculado para el lote DSS+Lk resultó significativamente inferior al del grupo DSS.





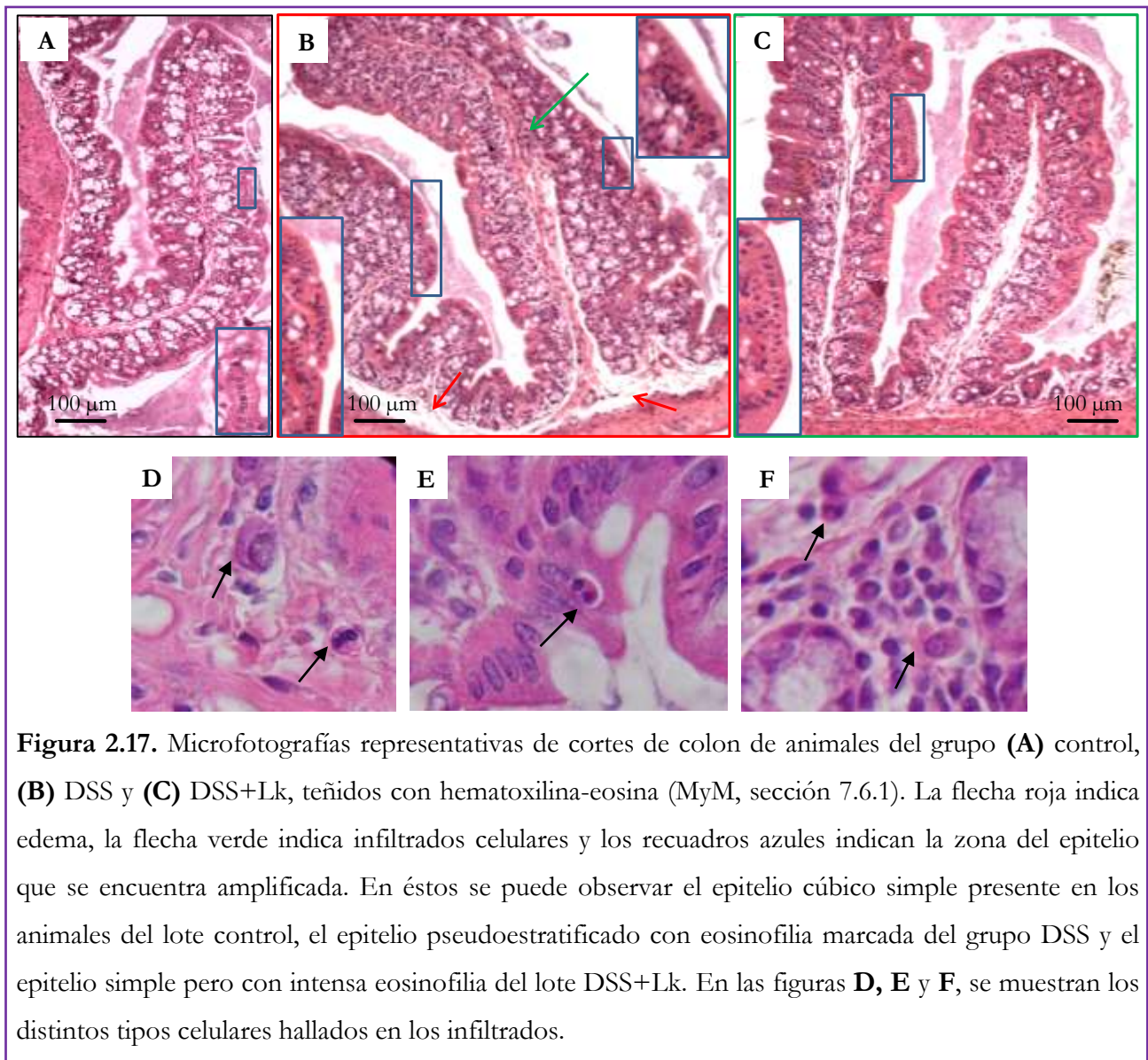
Para continuar evaluando el efecto de *L. kefir* en este modelo de UC, los ratones fueron sacrificados luego de 7 días de administración de DSS (día 20 del inicio del protocolo experimental), y se tomaron las muestras ya indicadas (esquema experimental y MyM, secciones 7.3, 7.5). Entre los parámetros más simples utilizados para evaluar la inflamación intestinal, se encuentra la cuantificación

de la longitud del colon, ya que se ha documentado la relación directa entre inflamación y su acortamiento (Chen et al 2012; Zhou et al 2012). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2.16. En el grupo DSS se observó un acortamiento significativo del colon respecto del grupo control. En el grupo DSS+Lk se registró un aumento significativo de la longitud respecto del grupo DSS, sin diferencias con los lotes control y Lk. Por otro lado, en la misma figura puede observarse que el colon del grupo DSS no presenta heces formes, lo que correlaciona con la diarrea observada en esos animales.



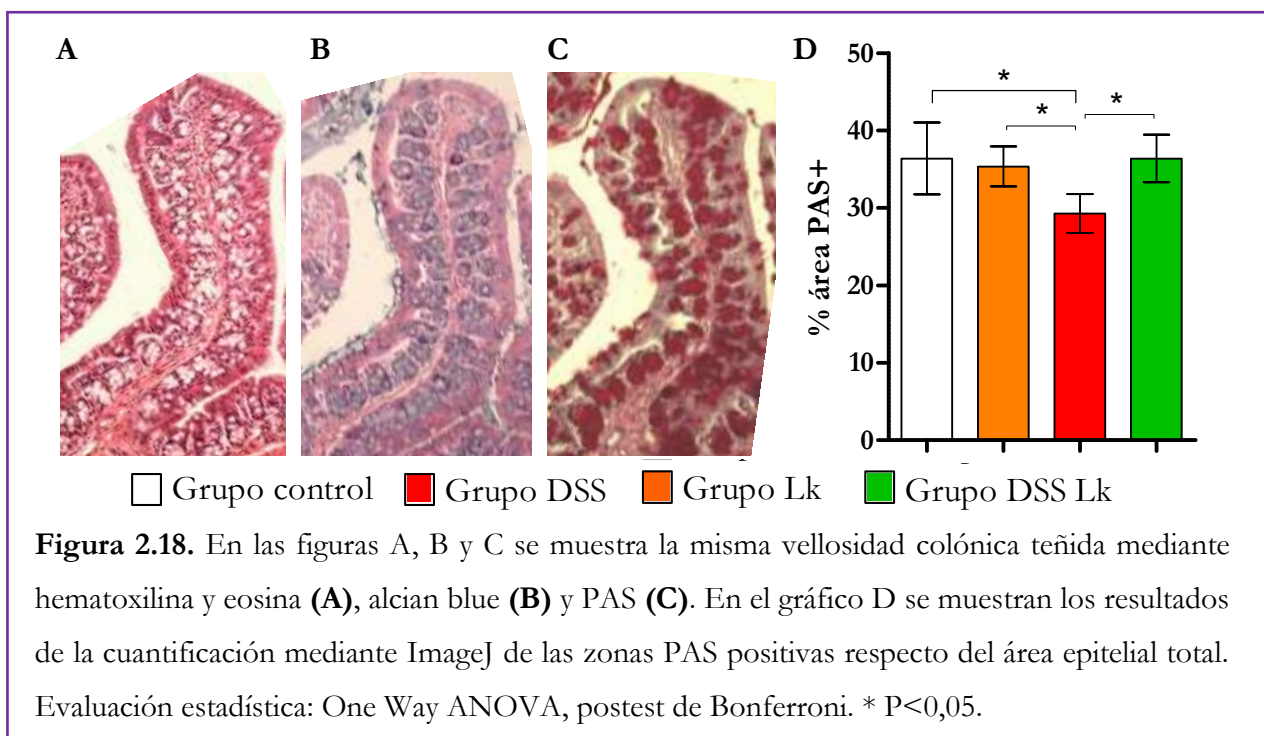
Por otro lado, se realizaron estudios histológicos de secciones de colon teñidas con hematoxilina y eosina (MyM, sección 7.6.1). Los mismos se realizaron en colaboración con la Dra. María José Tolosa. En la figura 2.17 se muestran imágenes representativas de cada lote experimental. En el colon de animales del grupo DSS (fig. 2.17.B), se observaron cambios histológicos asociados con inflamación tales como edema, disrupción del epitelio y presencia de infiltrados celulares, leucocitos, macrófagos y neutrófilos. Asimismo, se observaron características histológicas asociadas con recuperación, como una mayor vascularización, zonas de regeneración epitelial, caracterizadas por la presencia de un epitelio pseudoestratificado fuertemente eosinófilo, e infiltrados de células plasmáticas (Rose et al 2012). En los cortes de colon de los animales del grupo DSS+Lk (figura 2.17.C), en

general, no se observó histopatología compatible con inflamación, aunque se observaron zonas de regeneración epitelial marcadas por la fuerte eosinofilia pero con una distribución celular normal.



Otra de las características de UC y del modelo murino de inflamación por DSS, es la afectación de la barrera epitelial, asociada con una reducción de la expresión de MUC2 y Muc2, respectivamente, y la disminución de la producción de mucinas por las de goblet en colon (Roda et al 2010; Dharmani et al 2011). Dado que las mucinas son glicoproteínas (Tarang et al 2012), se complementaron los estudios ya descritos, a través de la tinción de cortes histológicos de colon utilizando dos coloraciones específicas: azul de alcian en medio ácido y PAS (MyM, sección 7.6.1). Con ambas

tinciones se corroboró que las zonas no teñidas con hematoxilina y eosina se correspondían con acúmulos de mucinas. Finalmente, se cuantificó el área PAS positiva respecto del área epitelial total utilizando el programa ImageJ, y se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 2.18. En los cortes histológicos de los ratones del grupo DSS se observó un porcentaje menor de área PAS positiva que en los ratones de los grupos control, lo que podría relacionarse con una menor producción de Muc2, en las células responsables de su síntesis y secreción. Por otro lado, se ha demostrado que en las fases iniciales de la inflamación inducida por DSS, se genera una secreción exacerbada de mucinas, lo que genera un vaciamiento de las células secretoras (Dharmani et al 2011). El tratamiento con *L. kefir* normalizó este parámetro, ya que no se observaron diferencias entre el área PAS positiva del grupo DSS+Lk y el grupo control. Sin embargo, no es posible precisar si esto se debe a que la secreción exacerbada inicial no ocurrió, o fue menos intensa, o si la síntesis, posterior al vaciamiento, logró revertir el efecto con mayor efectividad.



Son muchos los estudios en los que se ha evaluado el efecto de la administración de lactobacilos en modelos murinos de colitis inducida por DSS. Si bien en muchos casos se observó el efecto

benéfico (Nanda Kumar et al 2008; Chen et al 2012), en otros, el que tratamiento con el potencial microorganismo probiótico, no produjo mejoras o, incluso, exacerbó el cuadro clínico (Daniel et al 2006; Feighery et al 2008; Zhou et al 2012). En nuestro caso, tanto clínica como histológicamente, se observó que la administración de *L. kefir* disminuye los efectos generados por el tratamiento con DSS en ratones Swiss.

Con la finalidad profundizar estos estudios, se utilizaron técnicas moleculares para evaluar el impacto de la administración de *L. kefir* en este modelo de inflamación intestinal.

2.2. Expresión génica en secciones de colon

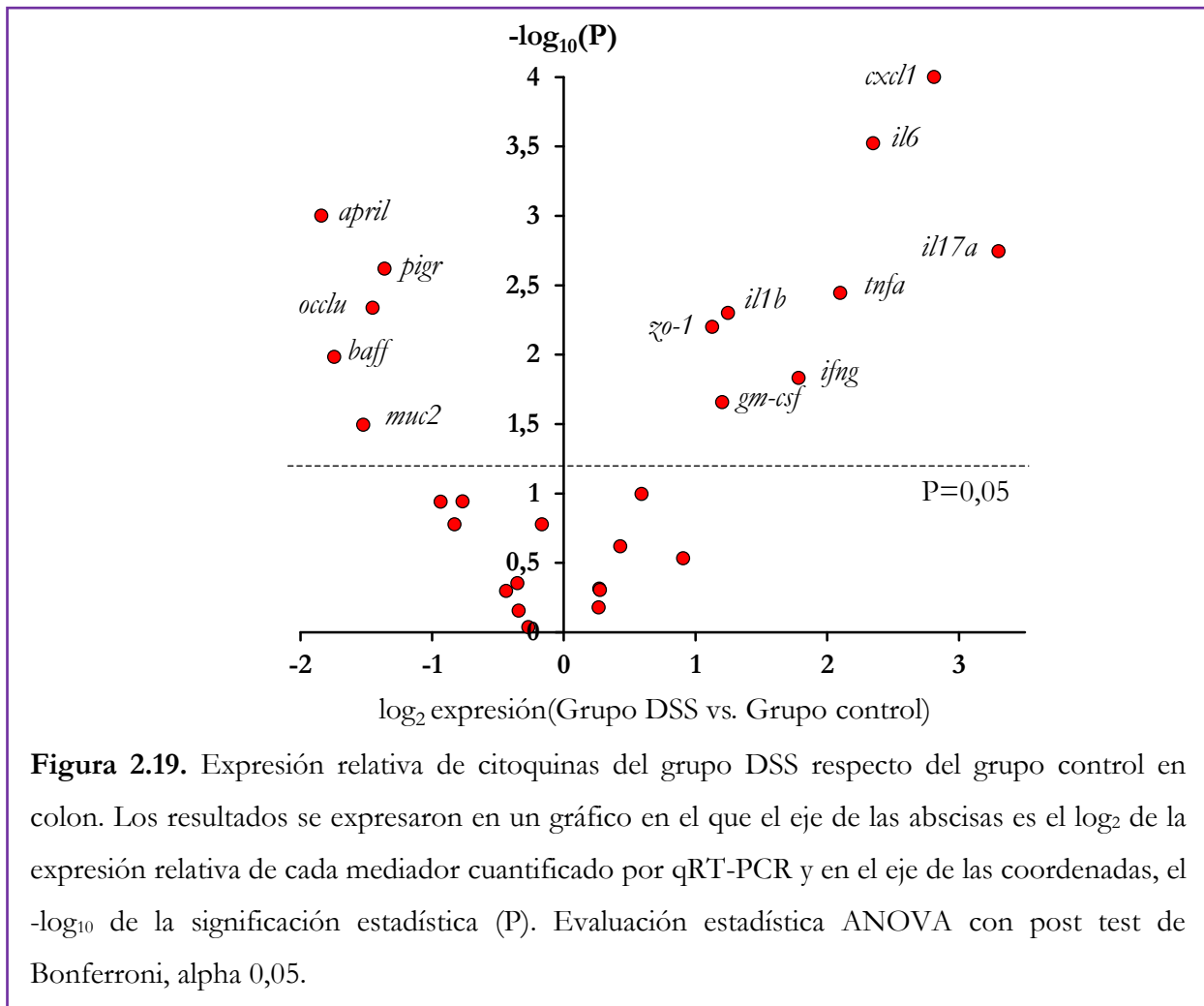
Se cuantificó la expresión de moléculas asociadas al mantenimiento de la función barrera epitelial y a la respuesta inmune de mucosas (MyM, sección 7.6.7). Para simplificar la visualización de los resultados, se identificaron únicamente los genes cuya expresión se modificó significativamente.

En la figura 2.19 se grafican los perfiles de expresión génica de muestras de colon (MyM, secciones 5.1, 5.4, 7.6.7) del grupo DSS con respecto al grupo control. Se observó un aumento de la expresión de genes que codifican para las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-6 e IL-17A. Las mismas, se encuentran asociadas con la respuesta ante microorganismos e inducen el reclutamiento y activación de células que permitirán, o intentarán, controlar el foco infeccioso (Cua and Tato 2010; Kayama and Takeda 2012). Las citoquinas actúan en forma sinérgica para lograrlo. Por ejemplo, citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- α , activan intensamente la vía de NF- κ B y generan ARNm pro-inflamatorios muy poco estables. Por su parte, la IL-17A es un activador débil de NF- κ B, pero resulta altamente patogénica en contextos inflamatorios porque actúa estabilizando los ARNm inducidos por otras, lo que le permite promover y prolongar los procesos inflamatorios (Gu et al 2013a). Entre los posibles ARNm inducidos en este contexto, se encuentra la quimoquina *cxcl-1*.

Una mención especial merecen el aumento de la expresión de los genes que codifican para quimoquina CXCL-1 y GM-CSF. Ya se discutió en la primera parte de este capítulo (sección 1.3.2), el

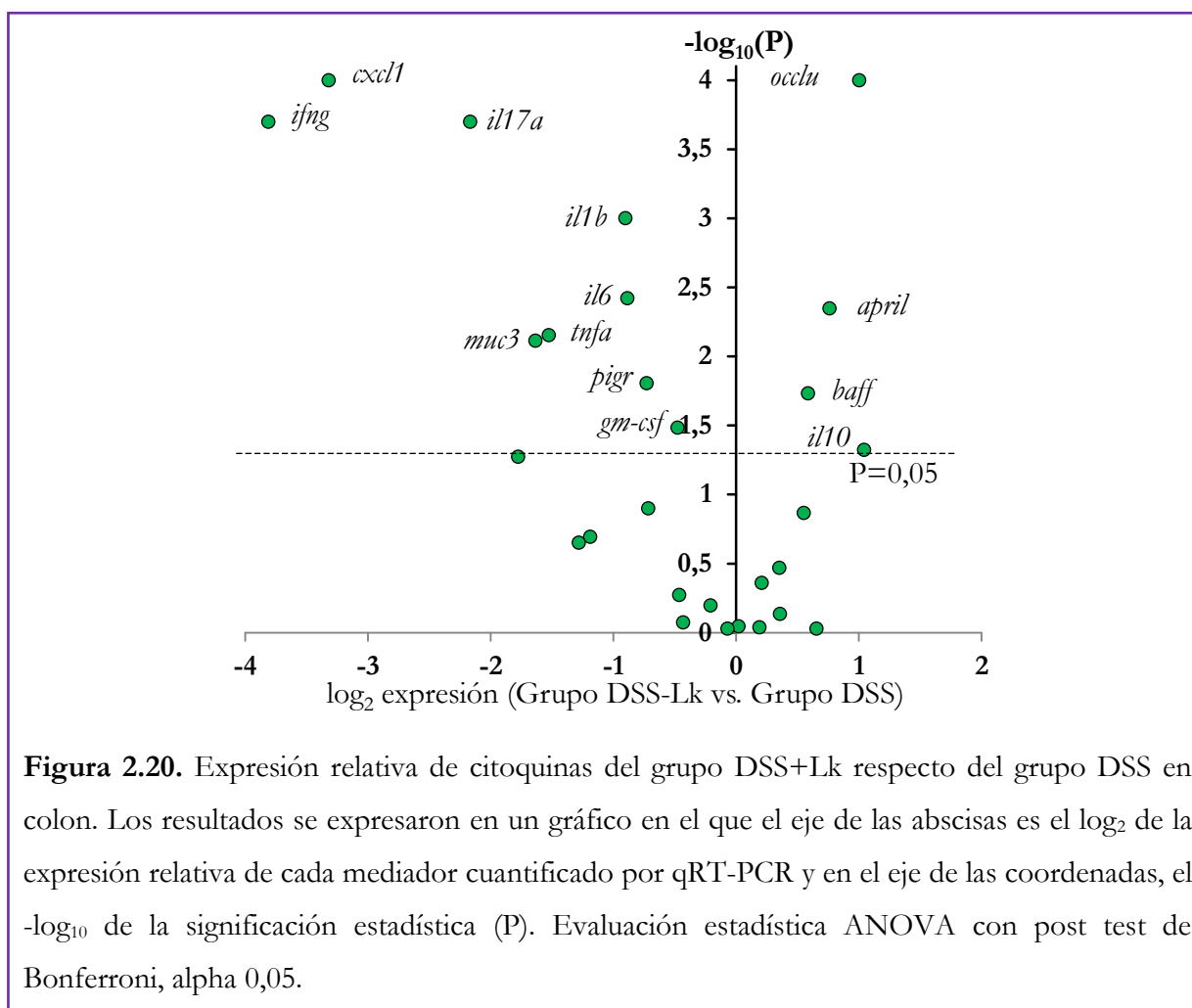
rol de estas moléculas en un contexto no inflamatorio. Sin embargo, la interpretación de los resultados depende fuertemente del contexto en el que se evalúa y, en el caso de patologías inflamatorias, depende del estadio de las mismas. CXCL-1 es una molécula capaz de reclutar neutrófilos, que pueden potenciar inicialmente el proceso inflamatorio, pero su presencia es necesaria tanto para la eliminación de los microorganismos que ingresan desde la luz intestinal, como para la resolución del proceso inflamatorio y la reparación tisular. Estas células son capaces de eliminar restos celulares, y sintetizan y liberan mediadores que promueven la neovascularización y reconstrucción de la capa de enterocitos (Fournier and Parkos 2012; Gabelloni et al 2013). En general, el control de la población de neutrófilos en los tejidos es muy estricto, ya que deben ser eliminados por los macrófagos tisulares para no liberar su contenido de manera descontrolada. En IBD y en los modelos animales de colitis, la eliminación de neutrófilos suele estar retardada, ya sea por la presencia de moléculas anti-apoptóticas como GM-CSF o porque la población de macrófagos es insuficiente para eliminarlos adecuadamente debido a la infiltración exacerbada, lo que conlleva a una potenciación del cuadro inflamatorio por la liberación del contenido tóxico de los mismos (Bernasconi et al 2010; Egea et al 2010; Fournier and Parkos 2012). Ante lo dicho, parecería que el GM-CSF ejerce un efecto nocivo en contextos inflamatorios. Sin embargo, se ha demostrado que es responsable de promover la reparación epitelial a través del aumento de la proliferación, supervivencia y movilización de las células epiteliales, así como el reclutamiento de macrófagos y otros tipos celulares, capaces de colaborar en el proceso de reparación (Egea et al 2010; Däbritz 2014). De hecho, se observó una mayor susceptibilidad al DSS en ratones deficientes en GM-CSF (C57BL/6 GM-CSF^{-/-}) que en ratones que expresan este mediador en niveles normales (Xu et al 2008).

Con respecto a los genes asociados con la función de la barrera epitelial, se observó un aumento de la expresión de $\zeta\theta-1$ y una disminución significativa de la expresión del gen que codifica para Occludina (*occlu*). Por otro lado, disminuyó la expresión de moléculas esenciales para el correcto funcionamiento de la barrera epitelial: *muc2*, principal mucina secretoria, y mediadores asociados con el cambio de clase y secreción de IgA: *baff*, *april* y *pigr*.



Todos los parámetros alterados en el grupo DSS, correlacionan con los resultados ya descritos. Histológicamente se observaron infiltrados cargados principalmente de neutrófilos, que podrían ser reclutados por mediadores como CXCL-1, y el acortamiento del colon documentado se puede asociar con el estado inflamatorio generado por la sobreexpresión de citoquinas pro-inflamatorias. Por otro lado, clínicamente se observó que los animales comenzaron a recuperar su peso y ya no presentaron heces diarreicas y sanguinolentas durante los dos últimos días del tratamiento con DSS, y la histología de colon reveló algunas zonas de franca recuperación epitelial. Esto podría relacionarse con el aumento de expresión de *z0-1* y *gm-csf*, que colaboran con la recuperación de la barrera epitelial. Los resultados coinciden con lo que se encuentra descrito en bibliografía tanto para UC como para modelos murinos de dicha patología (Zakostelska et al 2011; Chen et al 2012; Perše and Cerar 2012; Zhou et al 2012).

Para evaluar el efecto del tratamiento con *L. kefir*, se compararon los perfiles de expresión de entre los grupos DSS+Lk y DSS. En la figura 2.20, se puede observar que *cxcl1*, *gm-csf* y las citoquinas pro-inflamatorias *ifng*, *tnfa*, *il1b*, *il17a* e *il6*, disminuyeron significativamente su expresión en los animales del grupo DSS+Lk respecto del grupo DSS. Por otro lado, se observó un aumento de la expresión de *occlu*, *april* y *baff*, junto con la citoquina anti-inflamatoria *il10*, mientras que se encontró una expresión disminuida de *muc3* y *pigr*.



La producción exacerbada de mediadores pro-inflamatorios ha sido reportada como responsable del daño tisular, tanto en modelos murinos de inflamación intestinal como en IBD (Perše and Cerar 2012; Zhou et al 2012). La disminución de éstas y la mayor expresión de *il10* podrían estar relacionadas con el efecto protector observado al administrar *L. kefir* CIDCA 8348.

Finalmente, en la figura 2.21 se puede observar que, a pesar de que el tratamiento con *L. kefir* contrarrestó algunos de los cambios ocasionados por la administración de DSS, no todos los mediadores volvieron a los niveles de expresión de los ratones de los grupos control y Lk. Los genes que codifican para Muc2, Muc3 y Muc4, APRIL y pIgR se encontraron disminuidos, mientras que los que codifican para ZO-1, IL-17A, GM-CSF e IL-10, aumentaron su expresión en los ratones del grupo DSS-Lk respecto a los grupos control y Lk. Estos resultados indican que, si bien se mejoró notablemente el cuadro clínico y los parámetros histopatológicos con el tratamiento con *L. kefir*, esto se debió a una mejor resolución o control de la inflamación y no a una falta de respuesta ante la toxicidad del DSS.

En relación a las moléculas asociadas con la producción de IgA, su expresión disminuida podría deberse a un menor número de células epiteliales completamente diferenciadas o funcionales. De hecho, histológicamente se observa, en los animales del grupo DSS+Lk, la presencia de zonas de regeneración epitelial, lo que demuestra que el epitelio resultó erosionado en algún momento del tratamiento y logró reestablecerse. En el caso de pIgR, este receptor es sintetizado únicamente por dicha población celular (Brandtzaeg 2011). Con respecto a APRIL, esta citoquina es secretada por varios tipos celulares, sin embargo, las principales productoras, e inductoras de su secreción por parte de las células dendríticas, son las células epiteliales (Rescigno 2011).

Por otro lado, la sobreexpresión de *zo-1*, también puede asociarse con una barrera epitelial en recuperación (Mennigen et al 2009; Zakostelska et al 2011), y en los últimos años se ha demostrado que esta proteína no sólo posee funciones estructurales, sino que está involucrada en la regulación de la progresión del ciclo celular y la proliferación de las células epiteliales (Bauer et al 2010; Corr et al 2014).

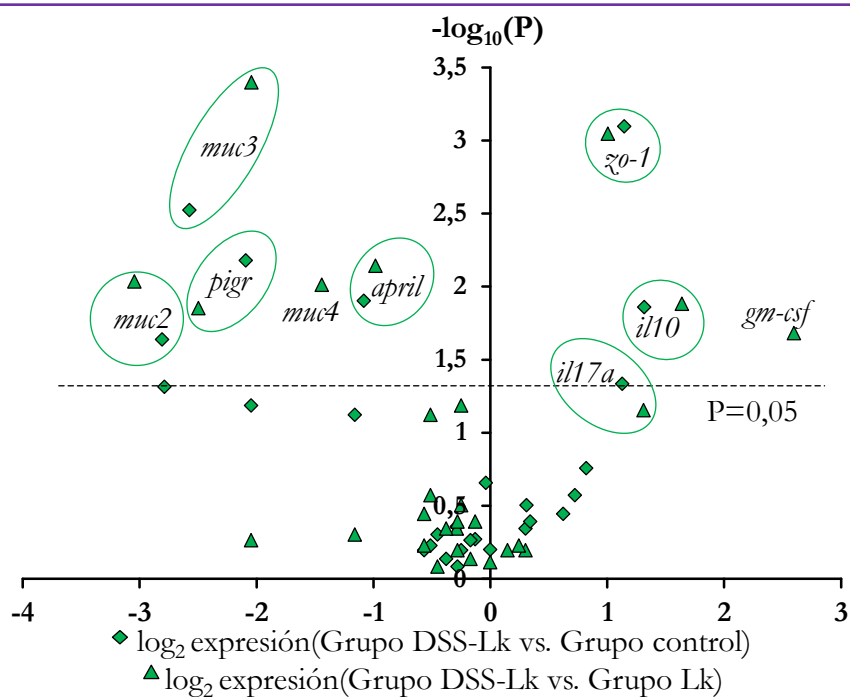


Figura 2.21. Expresión relativa de citoquinas del grupo DSS-Lk respecto del grupo control y del grupo DSS-Lk respecto del grupo Lk en colon. Los resultados se expresaron en un gráfico en el que el eje de las abscisas es el \log_2 de la expresión relativa de cada mediador cuantificado por qRT-PCR y en el eje de las coordenadas, el $-\log_{10}$ de la significación estadística (P). Evaluación estadística ANOVA con post test de Bonferroni, alpha 0,05.

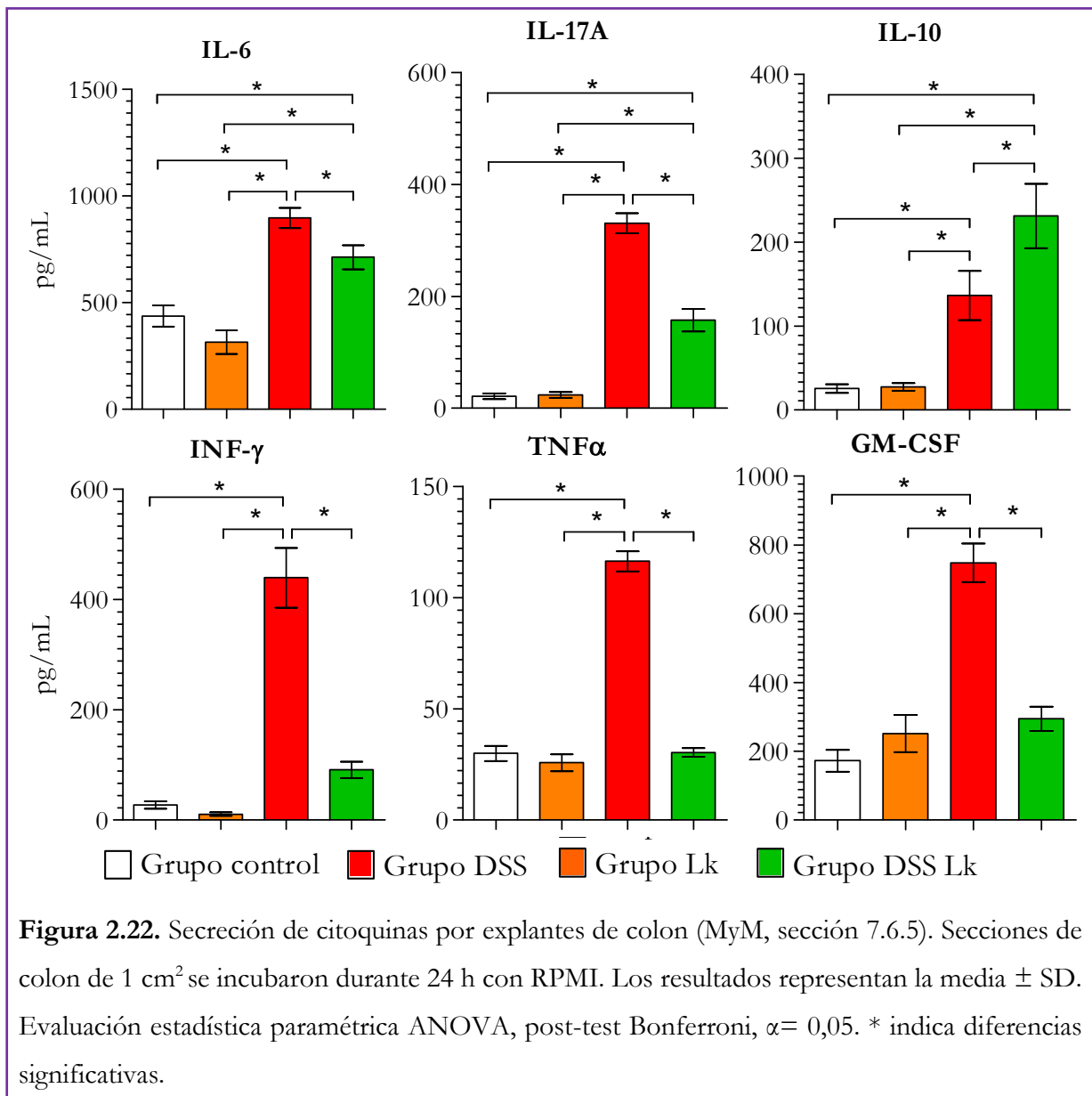
La sobreexpresión de *il17a*, puede asociarse con el daño generado por el DSS y la inflamación inducida por este proceso. Además, estos resultados apoyan la hipótesis de que el tratamiento con *L. kefir* no inhibe la toxicidad del DSS, sino que mejora la resolución del proceso inflamatorio inducido por éste. Por su parte, el GM-CSF actuaría como una molécula protectora, promoviendo la reparación de la barrera epitelial (Däbritz 2014). En el mismo sentido, el aumento de expresión de *il10* en el grupo DSS+Lk, respecto de los lotes control y Lk, podría asociarse con el mecanismo de observado, ya que esta citoquina anti-inflamatoria, y las células que la producen, podría atenuar la respuesta inflamatoria exacerbada producida por el ingreso de antígenos luego de la disrupción de la capa epitelial por la administración de DSS. Si bien la inducción de IL-10 tendría un rol fundamental en el mecanismo por el cual un microorganismo probiótico ejerce su efecto protector en nuestro modelo, han sido documentadas mejoras en modelos de colitis en ratones deficientes en IL-10 (Claes et al 2011).

Finalmente, otro parámetro que se encontró alterado en los ratones del grupo DSS+Lk respecto de los lotes control y Lk, fue la expresión de mucinas al final del protocolo experimental, luego de 7 días de tratamiento con DSS. En particular, se observó una disminución significativa de la expresión de *muc2*, *muc3* y *muc4*; esta última, sólo respecto del grupo Lk. Resultados similares han sido documentados por otros autores (Hoebler et al 2006; Dharmani et al 2011). Tanto Hoebler y col. (2006) como Dharmani y col. (2011), demostraron que durante los primeros días de administración de DSS, se genera una sobreexpresión de mucinas (*muc1*, *muc2*, *muc3* y *muc4*) en colon, pero como consecuencia del tratamiento prolongado, más de cinco días, se generó en ambos casos, una normalización o disminución de la expresión de mucinas, principalmente *muc2* y *muc3*.

2.3. Secreción de citoquinas por explantes de colon

Se complementaron los estudios de expresión génica, evaluando las citoquinas secretadas *ex vivo* por explantes de colon (MyM, sección 7.6.5). El perfil de citoquinas secretadas (figura 2.22), concuerdan con los resultados de expresión génica ya discutidos.

Todas las citoquinas pro-inflamatorias estudiadas (IL-6, IFN- γ , IL-17A, TNF α) se secretaron en niveles significativamente superiores en los explantes de ratones del grupo DSS respecto de lo observado en los tejidos de los grupos control y Lk. El mismo efecto se observó para el factor de crecimiento GM-CSF. En el caso de los explantes de los ratones del grupo DSS+Lk, se observó una disminución significativa de la concentración de IL-6, IFN- γ , IL-17A, TNF α y GM-CSF, respecto del grupo DSS. Sin embargo, sólo para IFN- γ , TNF α y GM-CSF se observaron niveles de secreción iguales a los obtenidos para los grupos control y Lk. La citoquina anti-inflamatoria IL-10, aumentó significativamente tanto en tejidos provenientes del grupo DSS como del grupo DSS-Lk. Además, entre estos dos lotes se registraron diferencias, siendo mayor la concentración de IL-10 observada en los sobrenadantes de explantes del grupo tratado con *L. kefir*.



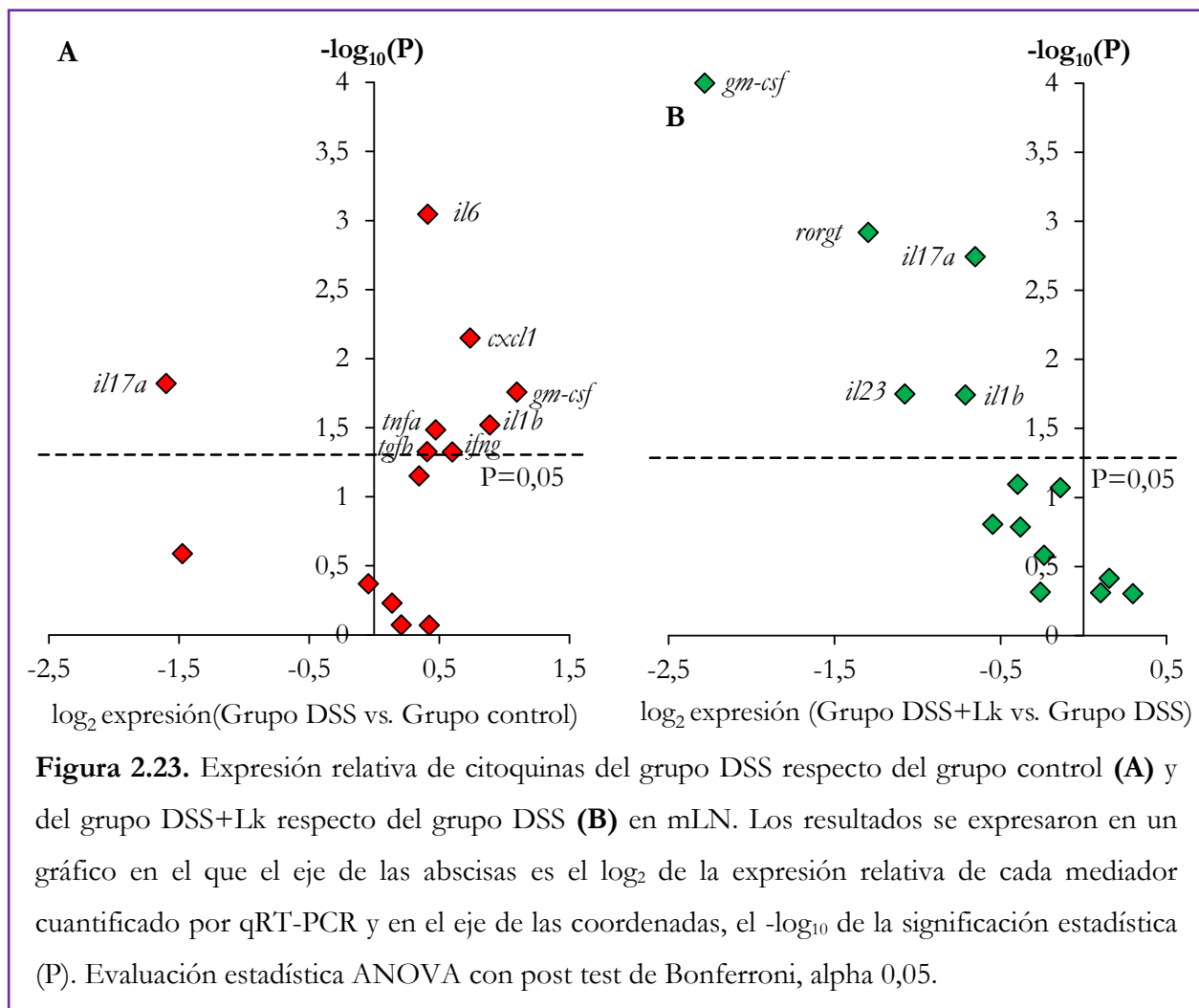
Para terminar de analizar el efecto de la administración de *L. kefir* CIDCA 8348 en el modelo de inflamación intestinal generado por DSS, se evaluó el impacto en la expresión génica en los mLN.

2.4. Expresión génica en mLN

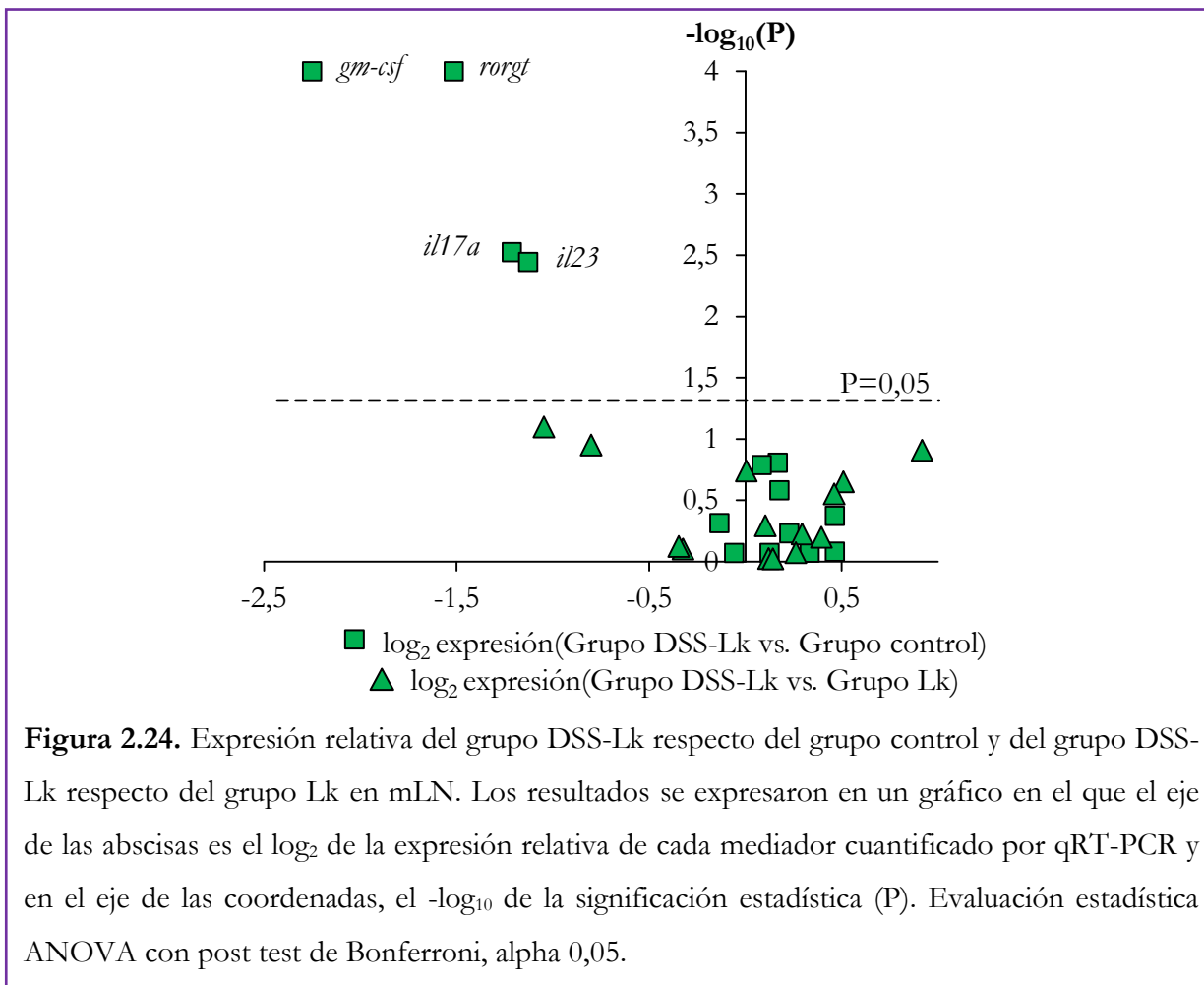
En la figura 2.23.A se muestran los resultados obtenidos luego del análisis de la expresión génica del grupo DSS respecto del grupo control. Se observó una sobreexpresión de las citoquinas

pro-inflamatorias *il6*, *il1b*, *ifng* y *tnfa*. También se incrementó la expresión de *cxcl1*, *tgfb* y *gm-csf*. Además, se observó una disminución de la expresión de *il17a*. Este resultado, aparentemente contradictorio, fue también documentado por Hall y col. (2011). En los ensayos realizados por estos investigadores, se observó una disminución de las células IL-17 positivas en mLN luego de 8 días de administración de DSS, acompañado de un aumento de poblaciones de células positivas para IL-10, IL-6, TNF- α e IFN- γ . Esto podría asociarse con la inducción de células Tr1 o Th3, cuya función es regulatoria, y son capaces de producir IL-10 o TGF- β , respectivamente, y bajos niveles de IL-17 (Jäger and Kuchroo 2010; Honda and Littman 2012).

Para evaluar el efecto del tratamiento con *L. kefir*, se compararon los perfiles de expresión de entre los grupos DSS+Lk y DSS. En la figura 2.23.B, se puede observar que *gm-csf* e *il1b* disminuyeron significativamente su expresión en el grupo DSS+Lk. Además, la disminución de *il17a*, *il23* y el factor de transcripción *rorgt*, podría asociarse con una disminución de las células Th17. Zakostelska y col. (2011), quienes estudiaron el impacto de *Lactobacillus casei* en el mismo modelo, observaron un aumento en la cantidad de células regulatorias Treg en mLN; en nuestros experimentos no se observaron cambios en la expresión de *foxp3*, factor de transcripción asociado con esta población, ni en la expresión de moléculas anti-inflamatorias como IL-10 en este sitio inductor. Sin embargo, es posible que los tiempos en los que se realizaron las determinaciones fuesen demasiado prolongado y que las células generadas hubiesen migrado al sitio efector. Otra posibilidad, es que las células inducidas por el tratamiento con *L. kefir* sean otras células regulatorias como Tr1 o Th3, que no expresan Foxp3, y cuya inducción ha sido reportada por cambios en la microbiota intestinal y por la administración de probióticos (Jäger and Kuchroo 2010; Honda and Littman 2012; Jeon et al 2012).



Finalmente, en la figura 2.24 se observa que los ratones del grupo DSS+Lk disminuyeron significativamente la expresión de moléculas asociadas con la población de células Th17, *il17a*, *il23* y *rorgt*, respecto del lote control, pero no presentaron diferencias en ninguno de los genes estudiados al ser comparados con los animales del lote Lk. Estos resultados podrían indicar que el tratamiento preventivo con *L. kefir* (13 días antes del inicio de la administración de DSS), generó cambios en los sitios inductores del GALT, en particular mLN, que protegieron de la inflamación exacerbada. De hecho, en la primera parte de este capítulo (figura 2.6), se puede observar que los mismos parámetros que resultaron modificados en los ratones del grupo DSS+Lk respecto del grupo control, se afectaron en los ratones del lote Lk respecto del lote control.



2.5. Efecto sobre la microbiota fecal

Ya se discutió en la primera parte de este capítulo, que la microbiota gastrointestinal es esencial para un adecuado desarrollo anatómico, fisiológico e inmunológico del huésped (Gu et al 2013b; Hardy et al 2013; Kamada et al 2013a; Fung et al 2014). Las perturbaciones en la composición de las comunidades microbianas, disbiosis, se encuentran asociadas con el desarrollo de un gran número de patologías, con lo que se ha comprobado que el balance entre patobiontes y simbiosites es crítico en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Hemarajata and Versalovic 2013; Kamada et al 2013a). En particular, se ha demostrado en modelos animales de UC y CD, tanto inducidos como espontáneos y genéticamente diseñados, que los primeros pueden promover y perpetuar estas afecciones, mientras que los segundos, son cruciales para reducir la susceptibilidad a este tipo de

patologías (Kamada et al 2013a). Por lo expuesto, el estudio del rol de los probióticos en la prevención de este tipo de patologías, adquiere particular importancia. En este contexto, se decidió evaluar el efecto sobre la microbiota de la administración de *L. kefir* CIDCA 8348 en el modelo de colitis inducida por DSS.

2.5.1. Estudios cualitativos

En primer lugar se evaluaron, mediante la técnica de DGGE, los perfiles electroforéticos obtenidos a partir de muestras de DNA de materia fecal amplificadas utilizando cebadores para la región V2-V3 del gen 16S ribosomal (Walter et al. 2000, MyM, sección 7.6.6.2). Para la comparación entre individuos, se consideraron las bandas como caracteres y su presencia o ausencia como el estado de éstos, utilizando el programa PyElph 1.4. La similitud entre perfiles se calculó mediante el coeficiente de Jaccard y el agrupamiento se llevó a cabo mediante el método de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA) empleando el programa SYSTAT versión 12.

En la figura 2.25.A, se muestran los perfiles individuales de cinco ratones del grupo control (C1 a C5), seis ratones del grupo DSS (D1 a D6) y cinco del grupo DSS+Lk (DL1 a DL5). A partir de éstos, se obtuvieron los agrupamientos que muestran en la figura 2.25.B. Los animales de los lotes DSS y DSS+Lk agruparon en clústers diferentes que coincidieron con el tratamiento recibido, a excepción del individuo D1 que agrupó en el clúster del lote control. Por otro lado, con respecto a la diversidad, que puede asociarse con el número de bandas obtenidas en los perfiles DGGE (Fuentes et al 2008), si bien no se observaron diferencias significativas entre los lotes experimentales, en el lote DSS se observó una tendencia a menor número de bandas (figura 2.25.C).

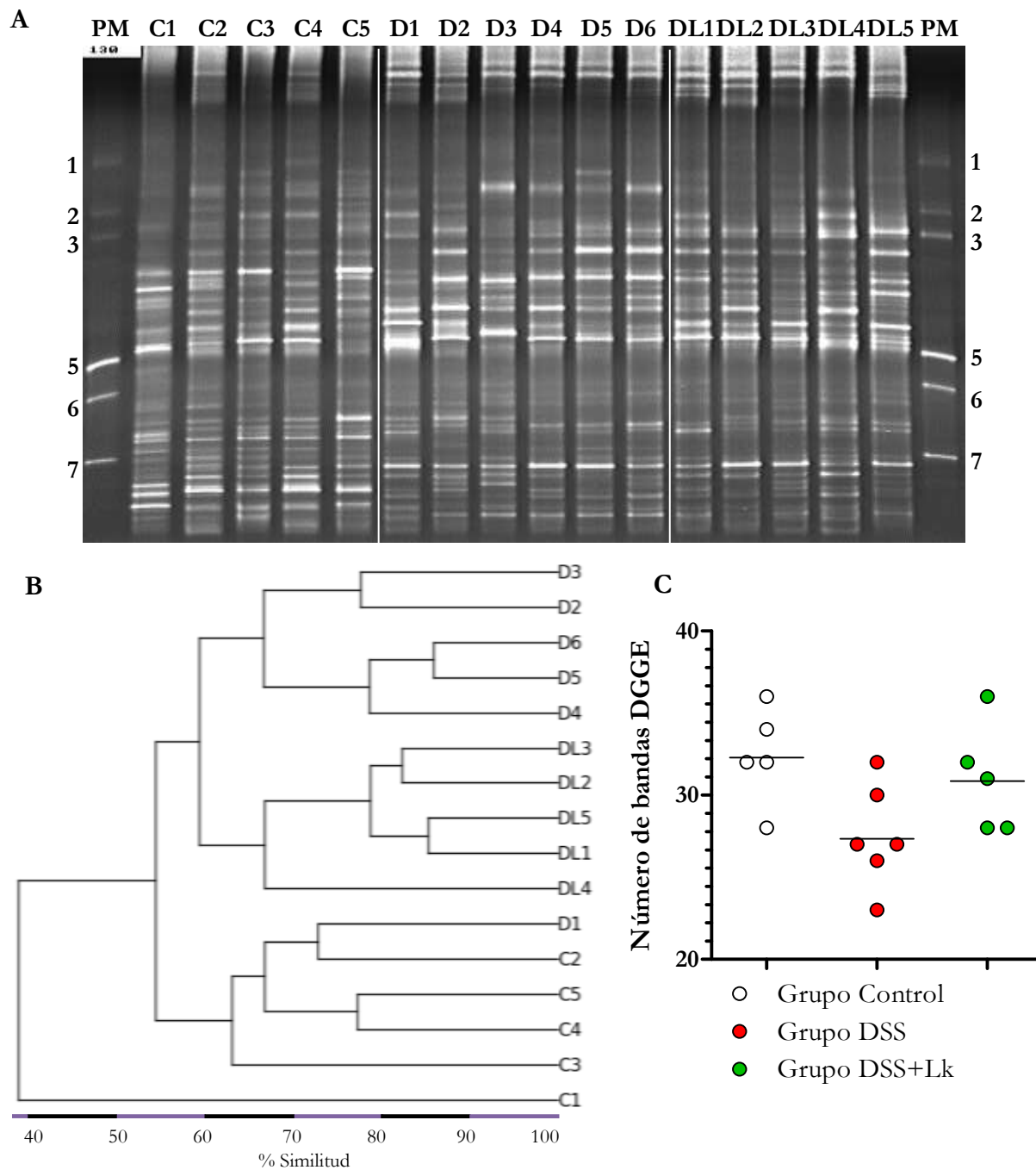
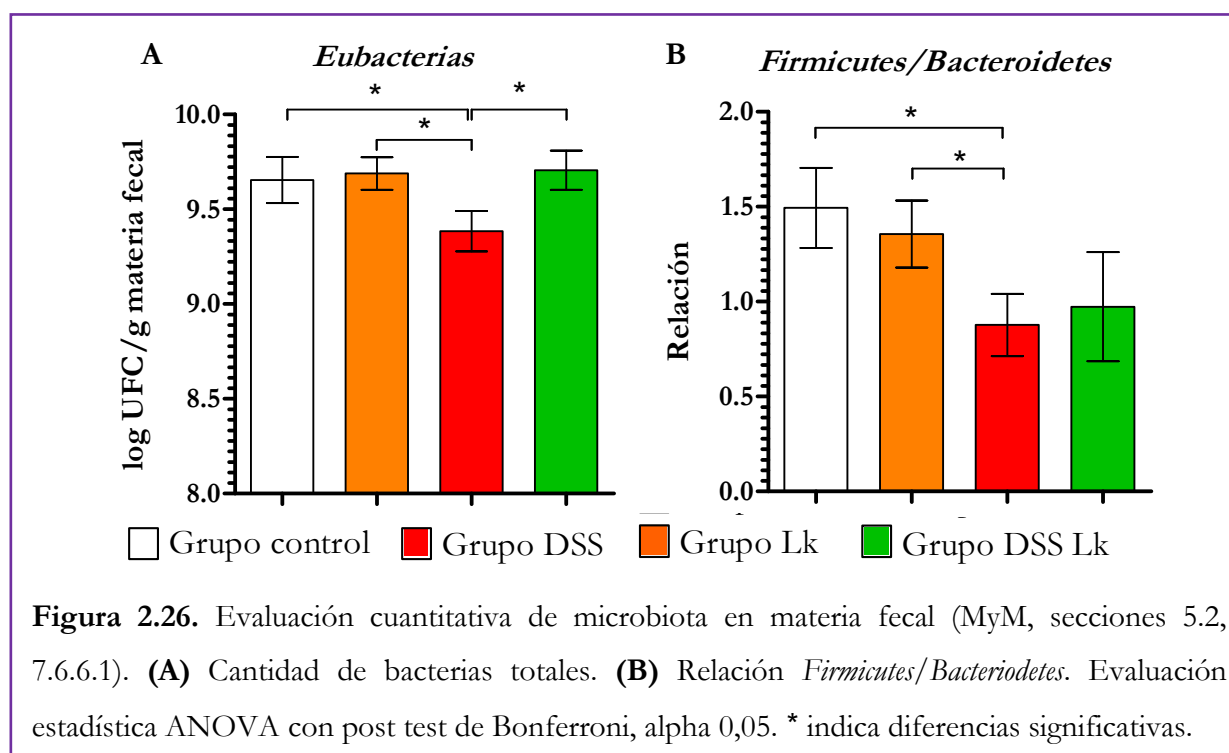


Figura 2.25. Evaluación cualitativa de microbiota fecal (MyM, secciones 5.2, 7.6.6.2). **(A)** Perfiles de DGGE obtenidos a partir de la amplificación con cebadores para Eubacterias. Bandas patrón (PM): 1, *L. plantarum* NCIMB 8826; 2, *L. acidophilus* CNRZ 204 y *L. kefir* CIDCA 8348; 3, *L. salivarius* 3C; 5, *E. coli* IP 54 y *B. subtilis* 168; 6, *C. butyricum* B7 y *L. reuteri* 22-1; 7, *Flavobacterium psychrophilum* PO388. **(B)** Dendrograma obtenido luego del análisis estadístico (UPGMA). **(C)** Número de bandas en los perfiles electroforéticos de los ratones de cada lote experimental.

2.5.2. Estudios cuantitativos

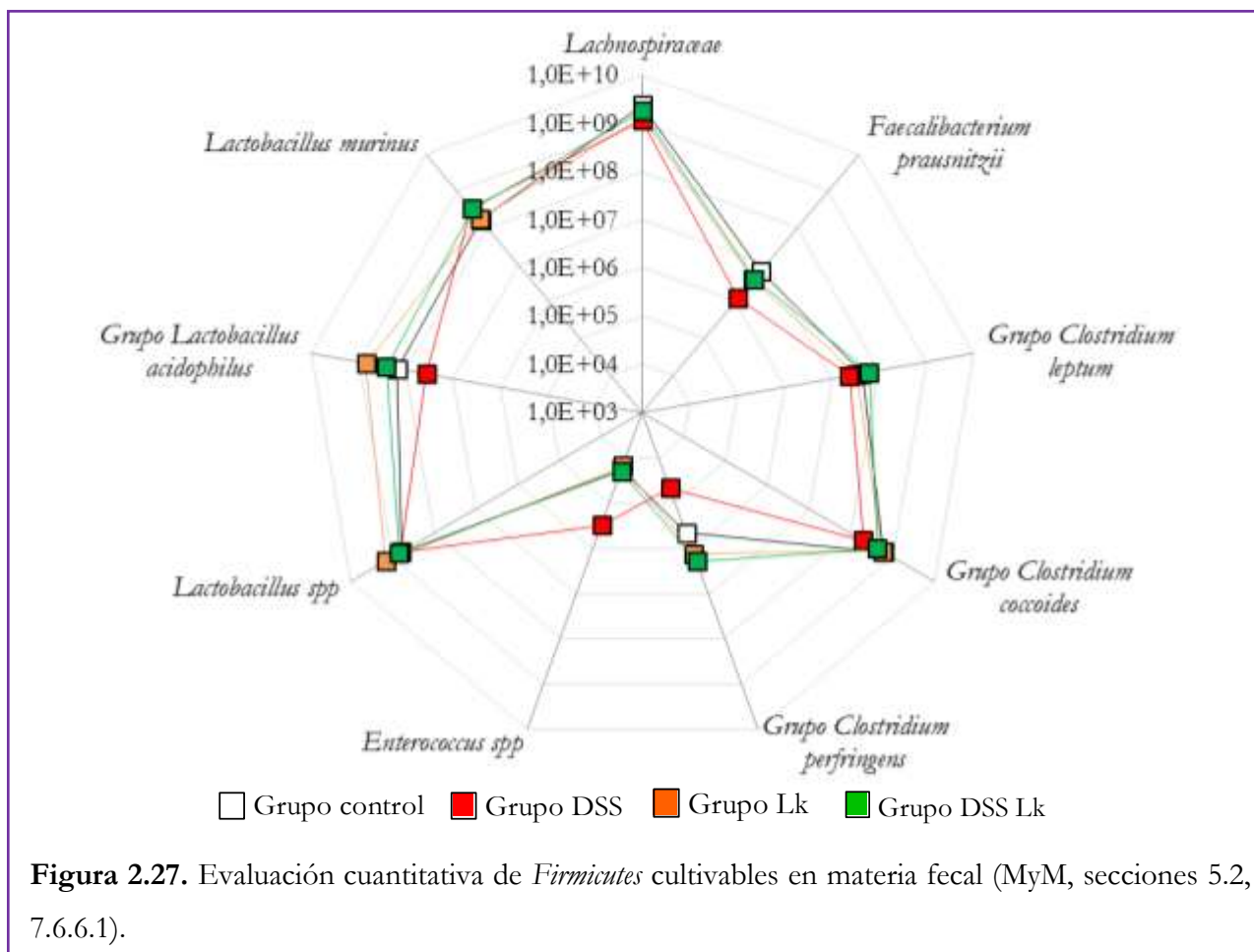
Se utilizaron ecuaciones que correlacionan el C(t) con el número de microorganismos (UFC) de cada población bajo estudio (MyM, sección 7.6.6.1). En el caso de bacterias no cultivables, se utilizaron los valores C(t) obtenidos para realizar comparaciones entre lotes.

En primer lugar, se evaluó la cantidad de *Eubacteria* por gramo de materia fecal utilizando cebadores para la región V2-V3 del gen 16S ribosomal (Walter et al. 2000, MyM, sección 7.6.6.2). En el lote DSS, se observó una disminución significativa en la cantidad de bacterias totales respecto de los demás lotes experimentales (figura 2.26.A). Con respecto a la relación entre los phylum cuantificados, si bien no se observaron diferencias significativas en la cantidad de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (tabla 2.4), se observó una inversión de la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* en el grupo DSS respecto de los lotes control y Lk, mientras que el grupo DSS+Lk no se diferenció de ninguno de los demás lotes (figura 2.26.B). Estos resultados coinciden con los descritos en la bibliografía para diferentes contextos inflamatorios (Ettreiki et al 2012; Vanhooren et al 2013; Hold et al 2014; Schwab et al 2014).

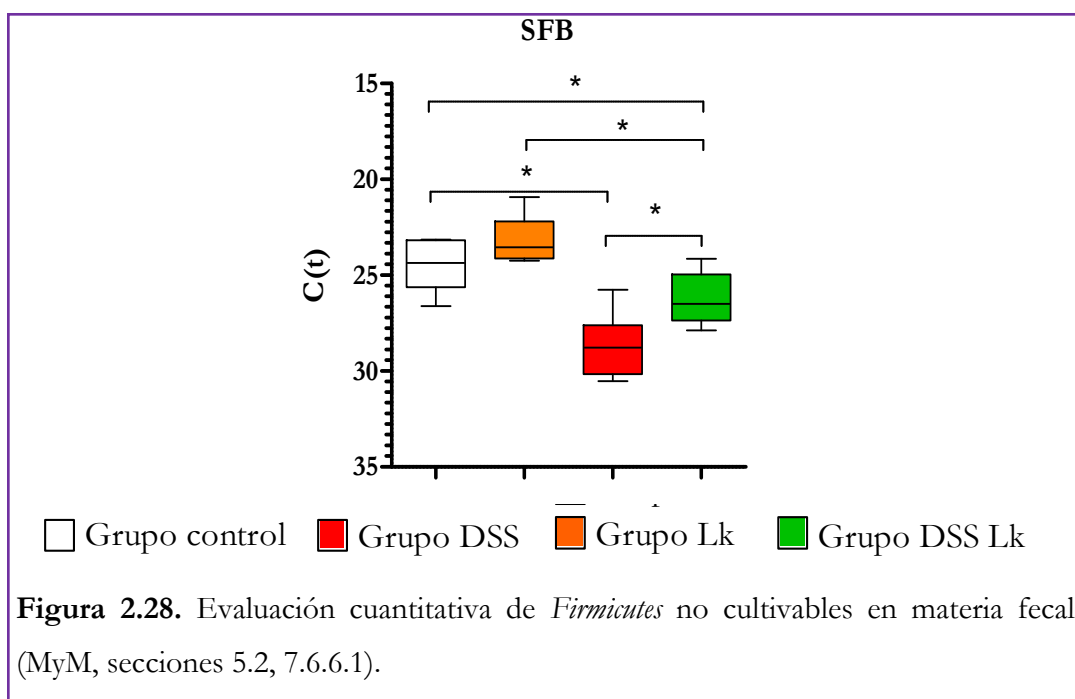


Con la finalidad de hacer un estudio más profundo del impacto de la administración de *L. kefir* en la microbiota fecal en este modelo animal, se analizaron distintas poblaciones y/o especies de cada uno de los phylum mencionados (cebadores disponibles en MyM, sección 7.6.6.1). En la tabla 2.4 se muestran los resultados obtenidos.

Las poblaciones y especies pertenecientes al phylum *Firmicutes*, se modificaron por los tratamientos realizados. En la figura 2.27 se muestra la media obtenida para cada lote experimental y en la tabla 2.4 se indican el valor, la desviación y si las diferencias resultaron significativas. En el grupo DSS se observó un aumento significativo de la población de *Enterococcus* y una disminución significativa de *Faecalibacterium prausnitzii* y de los grupos *L. acidophilus* y *C. perfringens*, respecto de los otros lotes experimentales. El tratamiento con *L. kefir*, grupo DSS+Lk, revirtió las modificaciones mencionadas.



Entre los *Firmicutes* estudiados, también se analizaron las bacterias filamentosas segmentadas (SFB). Para estos análisis, se compararon los C(t) entre los lotes experimentales, debido a que no es posible correlacionar UFC con C(t), parámetro directamente proporcional al número de copias de ADN diana, debido a que no es posible cultivar a estos anaerobios estrictos (Ivanov and Honda 2012). Se observó una disminución significativa de esta población en los grupos DSS y DSS+Lk, aunque estos últimos mostraron niveles más cercanos a los observados en los lotes control y Lk (figura 2.28).

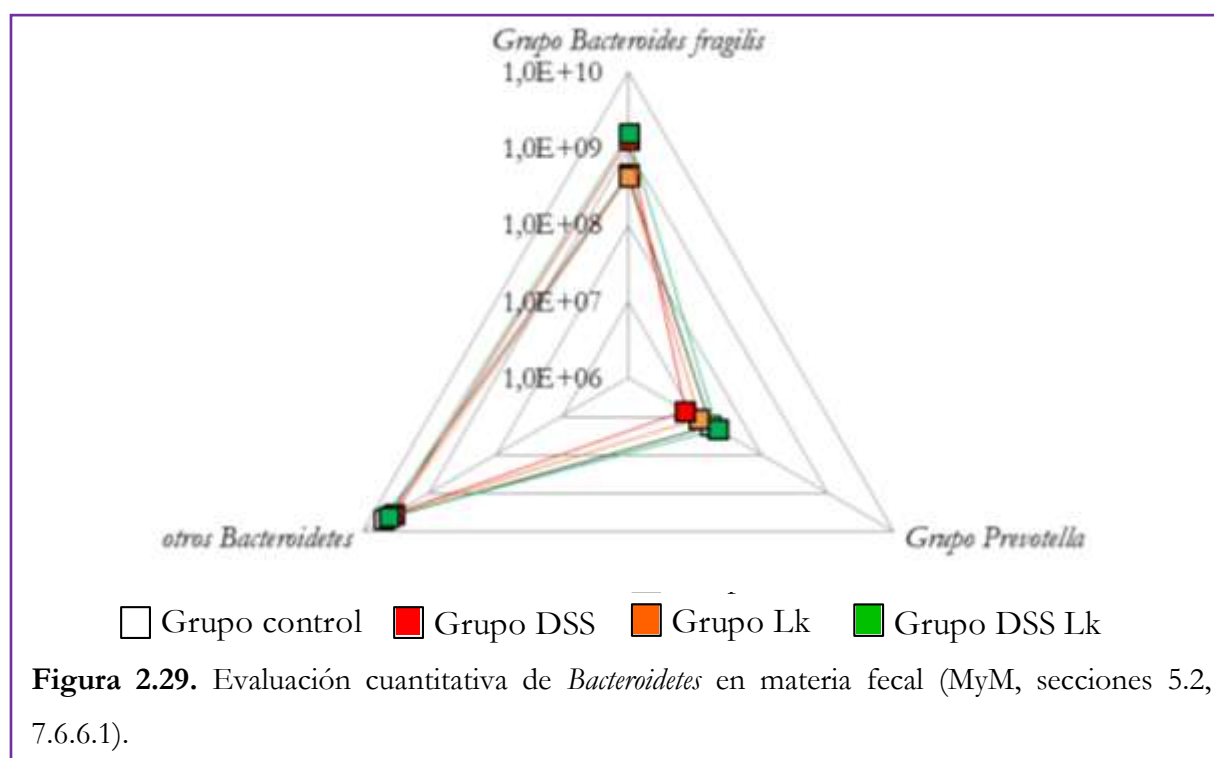


Como se indicó previamente, no se observaron diferencias entre lotes en la cantidad de *Bacteroidetes*. Sin embargo, se observó un aumento significativo en el grupo *Bacteroides fragilis* en la materia fecal de los lotes DSS y DSS+Lk respecto de los lotes control y Lk (figura 2.29, tabla 2.4). Por otro lado, se observó una tendencia a una disminución de *Prevotella* spp en el lote DSS, pero probablemente debido a la alta dispersión de estos resultados, la misma no resultó significativa.

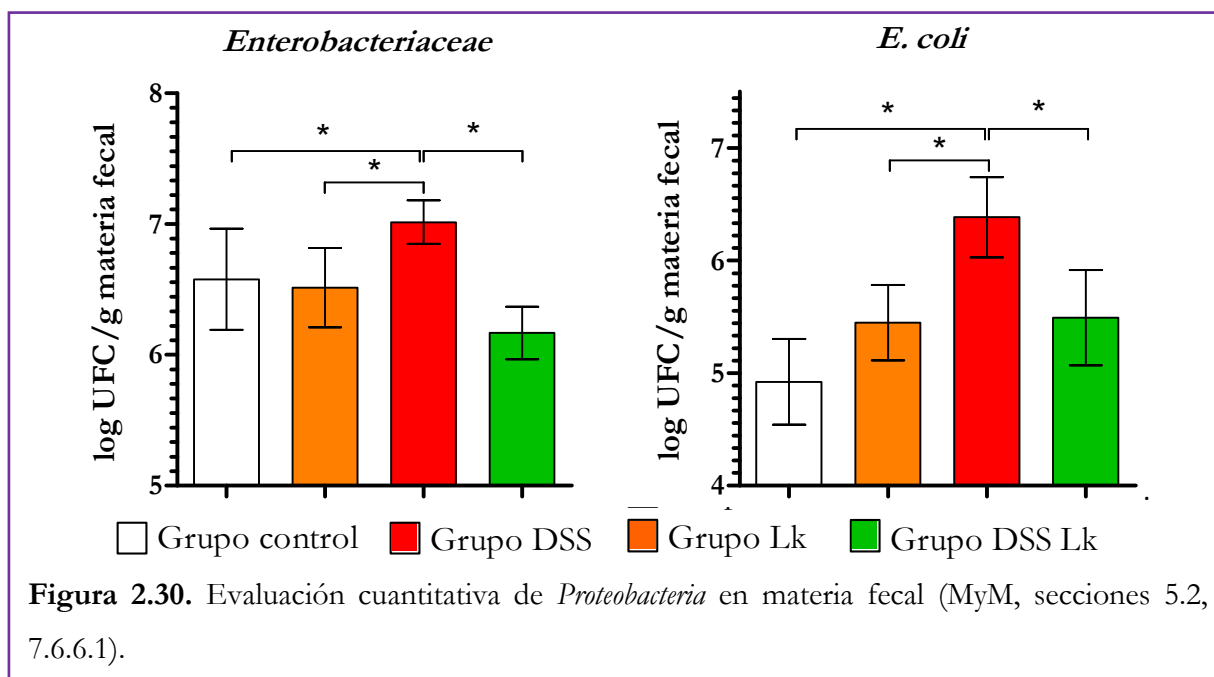
Tabla 2.4. Evaluación cuantitativa de microbiota en materia fecal (MyM, secciones 5.2, 7.6.6.1).

	Grupo control	Grupo Lk	Grupo DSS	Grupo DSS+Lk
<i>Firmicutes</i>	7,3 ± 4,6 10 ⁹ a	5,2 ± 1,7 10 ⁹ a	3,0 ± 2,1 10 ⁹ a	3,7 ± 1,3 10 ⁹ a
<i>Lachnospiraceae</i>	2,3 ± 2,0 10 ⁹ a	2,8 ± 0,8 10 ⁹ a	1,1 ± 0,6 10 ⁹ a	1,8 ± 1,1 10 ⁹ a
<i>Grupo Clostridium leptum</i>	4,4 ± 3,0 10 ⁷ a	3,3 ± 1,7 10 ⁷ a	2,3 ± 1,1 10 ⁷ a	6,1 ± 2,7 10 ⁷ a
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	6,7 ± 3,4 10 ⁶ a	3,9 ± 1,4 10 ⁶ a	1,2 ± 0,7 10 ⁶ b	4,1 ± 2,0 10 ⁶ a,b
<i>Grupo Clostridium coccoides</i>	3,3 ± 2,1 10 ⁸ a	5,5 ± 2,2 10 ⁸ a	2,0 ± 1,1 10 ⁸ a	4,3 ± 2,0 10 ⁸ a
<i>Grupo Clostridium perfringens</i>	4,6 ± 2,8 10 ⁵ a	1,4 ± 1,2 10 ⁶ a	4,7 ± 4,0 10 ⁴ b	2,0 ± 1,7 10 ⁶ a
<i>Enterococcus</i> spp	3,1 ± 1,8 10 ⁴ a	1,6 ± 0,7 10 ⁴ a	3,1 ± 2,4 10 ⁵ b	2,0 ± 1,7 10 ⁴ a
<i>Lactobacillus</i> spp	6,2 ± 5,2 10 ⁸ a	1,4 ± 0,3 10 ⁹ b	6,3 ± 3,5 10 ⁸ a	7,0 ± 3,5 10 ⁸ a,b
<i>Grupo Lactobacillus acidophilus</i>	1,5 ± 1,0 10 ⁸ a	6,9 ± 1,1 10 ⁸ b	6,7 ± 3,3 10 ⁷ c	2,9 ± 2,1 10 ⁸ a,b
<i>Lactobacillus murinus</i>	1,6 ± 0,6 10 ⁸ a	1,7 ± 0,8 10 ⁸ a	3,4 ± 1,8 10 ⁸ a	3,2 ± 2,3 10 ⁸ a
<i>Bacteroidetes</i>	5,2 ± 1,7 10 ⁹ a	3,9 ± 0,5 10 ⁹ a	4,7 ± 1,7 10 ⁹ a	5,7 ± 2,5 10 ⁹ a
<i>Grupo Bacteroides fragilis</i>	4,6 ± 3,1 10 ⁸ a	4,3 ± 2,6 10 ⁸ a	1,3 ± 0,8 10 ⁹ b	1,6 ± 0,7 10 ⁹ b
<i>Prevotella</i> spp	1,8 ± 0,5 10 ⁷ a	1,2 ± 0,7 10 ⁷ a	9,7 ± 7,1 10 ⁶ a	2,2 ± 1,2 10 ⁷ a
<i>Actinobacteria</i>				
<i>Bifidobacterium</i> spp	2,4 ± 1,3 10 ³ a	4,3 ± 3,8 10 ³ a	7,4 ± 6,1 10 ³ a	9,5 ± 6,8 10 ³ a
<i>Proteobacteria</i>				
<i>Enterobacteria</i>	6,7 ± 5,4 10 ⁶ a	4,7 ± 3,0 10 ⁶ a	1,3 ± 0,7 10 ⁷ b	1,9 ± 0,9 10 ⁷ a
<i>Escherichia coli</i>	1,3 ± 0,9 10 ⁵ a	3,6 ± 1,6 10 ⁵ a	3,9 ± 2,7 10 ⁶ b	5,3 ± 3,4 10 ⁵ a
<i>Verrucomicrobia</i>				
<i>Akkermansia muciniphila</i>	2,8 ± 1,1 10 ³ a	3,9 ± 2,8 10 ³ a	4,1 ± 3,0 10 ⁷ b	3,9 ± 2,8 10 ⁸ c

Letras diferentes indican diferencias significativas entre resultados.



En lo que respecta a miembros de otros phylum, no se observaron diferencias significativas ni en *Actinobacteria* ni en *Bifidobacterium* spp (tabla 2.4). Por otro lado, el único representante del phylum *Verrucomicrobia*, la bacteria *Akkermansia muciniphila* (Berry et al 2012; Ouwerkerk et al 2013), incrementó notablemente, entre 4 y 5 unidades logarítmicas, su presencia en la materia de fecal de los animales de los grupos DSS y DSS+Lk (tabla 2.4). Por último, en el caso del phylum *Proteobacteria*, cuyo aumento se ha documentado en contextos inflamatorios gastrointestinales tanto en modelos murinos como en humanos (Ettreiki et al 2012; Vanhooren et al 2013; Hold et al 2014; Schwab et al 2014), se observó un aumento significativo de la familia *Enterobacteriaceae* y de la especie *E. coli* en el grupo DSS, mientras que en el grupo DSS+Lk se registraron valores comparables con los presentes en los lotes control y Lk (figura 2.30, tabla 2.4).



La disminución de miembros del phylum *Firmicutes*, junto con el aumento de poblaciones del phylum *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* se han sido descrito tanto en modelos animales de IBD como en humanos (Berry and Reinisch 2013; Hold et al 2014; Schwab et al 2014). En nuestro modelo encontramos un aumento de los grupos *Bacteroides fragilis* y *Enterococcus* spp, *Akkermansia muciniphila* y de la familia *Enterobacteriaceae*, en particular, *E. coli*, junto con una disminución de SFB y los grupos *L. acidophilus* y de *C. perfringens* en los ratones del grupo DSS respecto de los lotes control y Lk.

Se ha propuesto que, en el contexto de las IBD, ocurre una reorganización de las especies de *Bacteriodes*, y *Bacteroides fragilis* sería la especie predominante en los biofilms de pacientes enfermos (Maynard et al 2012; Hold et al 2014), y además tendría un rol protector en este modelo ya que se ha probado su capacidad para inducir células T regulatorias (Ivanov and Honda 2012; Kamada et al 2013b). Por su parte, la disminución del grupo *C. perfringens*, podría asociarse con el proceso de disrupción de la barrera epitelial. Se ha propuesto que la sobreexposición de los receptores TLR5 localizados en la región basolateral de las células epiteliales, a la microbiota, como consecuencia de daños en la barrera, generaría un aumento de la respuesta frente a flagelina, lo que disminuiría a estas poblaciones (Schwab et al 2014). De hecho, si bien sólo fue significativa la disminución del grupo *C. perfringens*, los otros dos grupo de clostridios evaluados también mostraron una tendencia a disminuir

su concentración y se observó una disminución significativa de *Faecalibacterium prausnitzii*, una bacteria que pertenece al grupo *Clostridium leptum*.

Se ha descrito que la disminución de miembros del phylum *Firmicutes*, permite el desarrollo y la invasión de los tejidos por patobiontes, entre lo que podemos citar a algunos *Enterococcus*, como *Enterococcus faecalis*, y a integrantes de la familia *Enterobacteriaceae*, como *E. coli* (Hardy et al 2013). Entre los mecanismos de protección, es importante destacar que los clostridiales y los lactobacilos como *Bacteroides fragilis*, son importantes productores de ácidos grasos de cadena corta. Estas moléculas impactan positivamente en el funcionamiento de las células epiteliales y de otras poblaciones celulares, como células dendríticas y macrófagos de la lamina propia, y se las considera esenciales para el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Además, promueven la disminución de pH en el microambiente gastrointestinal, lo que favorecería a los microorganismos benéficos y reduciría la viabilidad y crecimiento de patógenos (Hardy et al 2013; Hold et al 2014; Schwab et al 2014) y se ha demostrado su capacidad para inducir la síntesis de MUC2, principal componente del mucus gastrointestinal (Burger-van Paassen et al 2009). En el caso particular de *F. prausnitzii*, se ha descrito extensamente su efecto anti-inflamatorio y capacidad de producir ácidos grasos de cadena corta, principalmente butirato (Sokol et al 2008; Berry and Reinisch 2013). Esta especie se encuentra disminuida en las fases inflamatorias, tanto en UC como en CD, y se la propone como un marcador de recuperación (Berry and Reinisch 2013).

Otra población que se modificó por el tratamiento con DSS fue SFB. Estos son microorganismos no cultivables incluidos dentro del phylum *Firmicutes* y, hasta este momento, son las únicas bacterias de la microbiota cuya capacidad para inducir células Th17 se ha comprobado (Ivanov and Honda 2012). Estas células son esenciales en la defensa frente a patógenos intestinales y, las células Th17 inducidas por SFB, no inducen inflamación (Ivanov and Honda 2012; Goto and Ivanov 2013). Si bien algunos autores consideran a estas bacterias patobiontes (Chow et al 2011), es importante destacar que el efecto patogénico de SFB se ha observado en modelos animales con afectaciones severas de la inmunidad como los ratones SCID, en los que cualquier microorganismo

podría generar un efecto nocivo (Ivanov and Honda 2012). La disminución de SFB observada en este modelo de UC, podría deberse a la pérdida de células epiteliales por acción del DSS, ya que las SFB se encuentran adheridas a las mismas (Caselli et al 2010).

Finalmente, se observó un aumento de *Akkermansia muciniphila* en los ratones del grupo DSS respecto de los lotes control y Lk. Se ha reportado que esta bacteria degradadora de mucina se encuentra disminuida en pacientes con UC (Berry and Reinisch 2013; Lennon et al 2014), sin embargo otros autores reportaron el aumento de esta población luego de cinco días de administración de DSS y un retorno a los niveles de los ratones normales luego de 14 días (Schwab et al 2014). Estas diferencias podrían deberse a los tiempos en los que se realizan las determinaciones, que podrían tener relación con lo que le sucede en la capa de mucosa, la cual ya se ha discutido que sufre modificaciones importantes en las distintas fases (inducción, recuperación y cronicidad) del modelo (Hoebler et al 2006; Dharmani et al 2011).

El tratamiento con *L. kefir* logró revertir muchos de los cambios ocasionados por la administración de DSS. Sin embargo, ciertas poblaciones, como el grupo *Bacteroides fragilis*, las SFB y *Akkermansia muciniphila*, permanecieron alteradas. Por lo dicho, el hecho de que *F. prausnitzii*, los grupos *C. perfringens* y *L. acidophilus* se encuentren disminuidas en el grupo DSS mientras que el grupo DSS+Lk se observaron valores comparables con los de los lotes control y Lk, se podría relacionar con la disminución, y retorno a los valores normales, de los grupos potencialmente peligrosos como *Enterococcus* spp, *Enterobacteriaceae* y *E. coli*. Más aún, los productos de secreción de los *Firmicutes* mencionados, podrían colaborar con la resolución del proceso inflamatorio.

Conclusiones

1. El tratamiento con la cepa *L. kefir* CIDCA 8348 disminuye los efectos nocivos generados por la administración de DSS en ratones Swiss:

- en ninguno de los animales del lote DSS+Lk se observó una disminución significativa de la masa corporal, respecto de lo esperado para ratones Swiss de 6 a 9 semanas de edad, ni el desarrollo de cuadros diarreicos;
- en los animales del grupo DSS+Lk no se modificó la longitud del colon respecto de los lotes control y Lk;
- histológicamente se observaron zonas de regeneración epitelial pero sin signos de infiltrados inflamatorios;

Para intentar explicar la mejora en el cuadro clínico observada en los animales que recibieron DSS en el agua de bebida y tratamiento con *L. kefir* CIDCA 8348, deberíamos considerar que:

2. El tratamiento con *L. kefir* CIDCA 8348 disminuye la expresión de mediadores pro-inflamatorios inducidos por la administración de DSS:

- en colon, la expresión de los genes que codifican para GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-17A e IL-6, disminuyó significativamente en los animales del grupo DSS+Lk respecto del grupo DSS, mientras que la expresión de IL-10 aumentó. El mismo perfil se observó al evaluar los mediadores secretados por explantes de colon *ex vivo*.
- en mLN, se observó una expresión disminuida de moléculas asociadas al perfil Th17 en el grupo DSS+Lk respecto del grupo DSS.

3. El tratamiento con *L. kefir* CIDCA 8348 restaura, al menos parcialmente, la disbiosis generada por la administración de DSS:

- la administración de DSS disminuyó significativamente la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* y el tratamiento con *L. kefir* no logró revertir este parámetro;
- en el grupo DSS+Lk no se observaron cambios en poblaciones asociadas con inflamación como la familia *Enterobacteriaceae* y *Enterococcus* spp.;
- las poblaciones *C. perfringens* y *L. acidophilus*, así como la especie *F. prausnitzii*, resultaron disminuidas por la administración de DSS, sin embargo, en la materia fecal de los animales del grupo DSS+Lk, se encontraron en valores comparables con los del grupo control.

Conclusiones generales

Conclusiones generales

El objetivo de este trabajo de tesis doctoral fue estudiar las propiedades probióticas de las distintas cepas de *L. kefir*, mediante ensayos *in vitro*, para seleccionar la cepa más apta para la realización de estudios *in vivo* en ratones sanos y utilizando un modelo murino de inflamación intestinal.

En general, todas las cepas de *L. kefir* estudiadas podrían haber sido seleccionadas para la realización de estudios *in vivo*. Esto se debe a que, desde el punto de vista de la inocuidad, ninguna presentó fenotipo hemolítico o citotoxicidad sobre células en cultivo, y todas las cepas fueron sensibles a una amplia variedad de antimicrobianos. En el mismo sentido, todas las cepas podrían colonizar al menos en forma transiente el tracto gastrointestinal, debido a que presentaron una sensibilidad similar al pasaje a través del tracto gastrointestinal simulado y fueron capaces de adherirse tanto al mucus intestinal como a la línea celular Caco-2. Sin embargo, se observaron diferencias al analizar las propiedades probióticas. Si bien todas las cepas presentaron actividad antimicrobiana contra patógenos Gram positivos y Gram negativos, fueron capaces de antagonizar el efecto de los productos de secreción de *B. cereus* y *C. difficile* sobre células en cultivo y modularon la respuesta de PBMC, la cepa *L. kefir* CIDCA 8348 fue seleccionada debido a que mostró un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de microorganismos patógenos, una mayor relación de IL-10: IL12 en PBMC y un efecto anti-inflamatorio en el sistema reportero Caco-2 ccl20: luc.

La cepa *L. kefir* CIDCA 8348 se administró durante 21 días a ratones Swiss sanos de 6 semanas de edad. Estos estudios demostraron que el tratamiento es inocuo e impacta positivamente sobre la microbiota fecal aumentando la cantidad de *Lactobacillus*. Además, fortalece la función de la barrera epitelial gracias al incremento de la producción de IgA secretoria y la expresión de mucinas a nivel intestinal y colónico. Finalmente, el efecto anti-inflamatorio se evidenció por la disminución de la expresión de mediadores pro-inflamatorios en sitios inductores y efectores del sistema inmune de mucosas y por la disminución significativa de la secreción de

citoquinas pro-inflamatorias luego de la estimulación *ex vivo* de explantes de íleon y colon con LPS en tejidos provenientes de animales tratados con *L. kefir* respecto de los tejidos de animales del lote control.

Por último, administración de *L. kefir* CIDCA 8348 en un modelo murino de inflamación intestinal inducida químicamente por dextran sulfato de sodio (DSS), demostró el perfil anti-inflamatorio de esta cepa. Los animales que recibieron el tratamiento probiótico mostraron mejoras significativas en el cuadro clínico. El efecto observado podría relacionarse con la disminución de la expresión y secreción de mediadores pro-inflamatorios, y el aumento de moléculas anti-inflamatorias, por explantes de colon de animales tratados con *L. kefir* y DSS respecto del lote que recibió únicamente DSS. En el mismo sentido, se observó que la disbiosis generada por el DSS, fue restaurada o prevenida, al menos parcialmente, por el tratamiento con *L. kefir* CIDCA 8348.

Lactobacillus kefir CIDCA 8348 es un buen candidato para ser considerado por la industria alimenticia, ya que cumple con los requerimientos establecidos por el Código Alimentario Argentino y ha demostrado poseer propiedades benéficas en modelos *in vivo*.

Materiales y métodos

Materiales y Métodos

En la presente sección, se describirán los materiales y las técnicas empleadas durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

1. Microorganismos, características principales y condiciones de cultivo

1.1. *Lactobacillus kefir*

En el presente trabajo se utilizaron cepas de la especie *Lactobacillus kefir* aisladas a partir de gránulos de kefir y cepas de colección. En la tabla M.1 se indican las cepas utilizadas y características relevantes de las mismas.

Tabla M.1. Cepas de *Lactobacillus kefir* utilizadas

<i>Cepas de Lactobacillus kefir</i>					
Gránulo de origen/Cepa	Características		Gránulo de origen/Cepa	Características	
	PMr Capa S ^d	Auto- agregación ^e		PMr Capa S ^d	Auto- agregación ^e
Gránulo AGK1^a			Gránulo AGK4^a		
CIDCA 83111	69 kDa	-	CIDCA 8345	66 kDa	+
CIDCA 83113	66 kDa	-	CIDCA 8348	66 kDa	+
CIDCA 83115	66 kDa	+			
Gránulo AGK2^a			Cepas de referencia		
CIDCA 8321	66 kDa	+	ATCC 8007 ^b	71 kDa	-
CIDCA 8325	66 kDa	+	JCM 5818 ^c	69 kDa	-

PMr: peso molecular relativo; - : cepa no autoagregante; + : cepa autoagregante

^a Detalles sobre los gránulos y cepas aisladas de kefir (Garrote et al 2001), ^b ATCC, *American Type Culture Collection*, ^c JCM, *Japan Collection of Microorganisms*, ^d (Garrote et al 2004) ^e Mobili, 2008.

Los lactobacilos se cultivaron en caldo MRS, en condiciones aeróbicas, durante 48 horas, a 37 °C. La pureza de los cultivos se verificó mediante observación microscópica de preparados fijados y teñidos mediante la técnica descrita por Gram (MyM, sección 1.4).

Las diferentes cepas de *L. kefir* se conservaron a -80°C en leche descremada estéril.

1.2. Microorganismos patógenos

En la tabla M.2 se indican las cepas de microorganismos patógenos utilizadas en este trabajo. Las diferentes cepas bacterianas se conservaron a -80°C en caldo BHI con glicerol (concentración final 10 % v/v).

Clostridium difficile se cultivó en anaerobiosis, durante 48 horas, a 37 °C en caldo BHI (Brain-Heart infusión - BIODAR Diagnostics, Beauvais, Francia) suplementado con cisteína (concentración final 0,05 % p/v). Las cepas de *Bacillus cereus* se cultivaron en condiciones aeróbicas, con agitación, durante 16 horas, a 32 °C en caldo BHI suplementado con glucosa (concentración final 0,1 % p/v). El cultivo del resto de los microorganismos mencionados en la tabla M.2, se realizó en condiciones aeróbicas, con agitación, durante 16 horas, a 37 °C en caldo BHI.

Tabla M.2. Cepas de bacterias patógenas utilizadas

Bacterias patógenas	
Gram positivos	Gram negativos
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 ^a	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199 ^a
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 ^a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 ^a
<i>Bacillus cereus</i> T1 ^b	EHEC O157:H7 ATCC 700927 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ^a	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis CIDCA 101 ^d
<i>Clostridium difficile</i> 117 ^c	

^a ATCC: *American Type Culture Collection*. ^b US Department of Agriculture, ARS Eastern Regional Research Center, Microbial Food Safety Research Unit, Philadelphia, USA. ^c Servicio de bacteriología del Hospital Dr. Muñiz, Buenos Aires, Argentina. ^d Hospital de Pediatría Prof. Juan P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina.

1.3. Medios de cultivo bacteriano

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados por calor húmedo, en autoclave, a 1 atmósfera de sobrepresión durante 15 minutos.

Tabla M.3. Medios de cultivo

Medios de cultivo comerciales	
Caldo De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (DIFCO, Detroit, USA)	
Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) (Biokar Diagnostic, Argentina)	
Agar VRBG (Biokard Diagnostic, Beauvais, France)	
Agar YGC (Biokard Diagnostic, Beauvais, France)	
Medios de cultivo formulados	
Caldo LAPTg	- 1,0 % p/v Extracto de levadura - 1,5 % p/v Peptona - 1,0 % p/v Triptona - 1,0 % p/v D(+)glucosa - 0,1 % v/v Tween 80
Caldo BHIg	- 100 mL caldo BHI - 1,0 % p/v D(+)glucosa
Agar BHI, BHIg, LAPTg o MRS	- 100 mL caldo BHI, BHIg, LAPTg o MRS - 1,5 % p/v agar agar
Agar blando BHI o BHIg	- 100 mL caldo BHI, LAPTg o MRS - 0,7 % p/v agar agar
Agar LAPTg-Sangre	- 95 mL caldo LAPTg - 1,5 % p/v agar agar - 5 % v/v sangre humana (adicionada luego de la esterilización del medio de cultivo)

1.4. Tinción de Gram

Esta tinción se utilizó para comprobar la pureza de los cultivos microbianos (Gram 1884; Smith and Hussey 2005).

1.5. Marcación de bacterias con CFDA-SE

La succinimidil éster diacetato de carboxifluoresceína (CFDA-SE), es una molécula no polar que atraviesa pasivamente la membrana celular. Es convertida a su forma aniónica (CFSE)

por las estearasas intracelulares de bacterias viables (Wang et al 2005), y les confiere fluorescencia verde. Se marcó las bacterias con esta molécula, para la realización de ensayos por microscopía de fluorescencia.

Para la marcación de los microorganismos se lavó con buffer fosfato salino (PBS, MyM, sección 9) un cultivo en fase estacionaria, se ajustó a DO^{550nm} 1 en PBS y se agregó CFDA-SE en una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se incubó a 37°C, en agitación, durante 30 minutos, al abrigo de la luz. Finalmente, se lavó la suspensión bacteriana tres veces con PBS.

2. Células eucariotas y condiciones de cultivo

Todas las células se mantuvieron utilizando el medio de cultivo adecuado (se indicará para cada línea celular), a 37 °C, en estufa con atmósfera controlada (5 % v/v de CO_2 - 95% v/v de aire).

2.1. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Las PBMC se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por el Banco Nacional de ADN de la Universidad de Salamanca (2010). Las PBMC se aislaron por medio de un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA), centrifugando a 1600 rpm durante 30 min a 20°C. Las muestras de sangre con las que se trabajó, fueron cedidas por el Banco de Sangre de Bordeaux (EFS Aquitaine, Francia). Los cultivos se mantuvieron en RPMI completo (tabla M.4).

Para la realización de los ensayos, las células se distribuyeron en placas de 12 fosas (Greiner Bio One, Frickenhausen, Alemania) a una concentración de 2×10^6 células/fosa.

2.2. Línea celular Vero

La línea celular Vero es derivada de fibroblastos de riñón de mono verde africano. Las células se crecieron en DMEM completo (tabla M.4) en las condiciones descritas por Ammerman y col. (2008).

Según el tipo de ensayo, las células fueron cultivadas en placas de 24 o 48 fosas (Greiner Bio One, Frickenhausen, Alemania) durante 2 días.

2.3. Líneas celulares epiteliales

2.3.1. Caco-2

Las células Caco-2 provienen de un carcinoma de colon humano, se diferencian en enterocitos maduros luego de llegar a confluencia, y son células polarizadas con desarrollo del borde apical "en cepillo" (Blum et al. 1999). Las células se crecieron en DMEM completo (tabla M.4) en las condiciones descritas por Hashimoto y Shimizu (1993).

Para la realización de los ensayos, las células fueron cultivadas en placas de 12 fosas (Greiner Bio One, Frickenhausen, Alemania) durante 14 días.

2.3.2. Caco-2/TC-7

La línea celular Caco-2/TC-7 es un clon aislado de la línea celular Caco-2. Estas células se diferencian a enterocitos en tiempos más cortos y formando una población más homogénea que la línea Caco-2 (Turco et al 2011). Las células se crecieron en DMEM completo (tabla M.4) en las condiciones descritas por Hashimoto y Shimizu (1993).

Para la realización de ensayos de adhesión de lactobacilos, las células fueron cultivadas en placas de 24 fosas durante 7 días.

2.3.3. Caco-2 ccl20: luc

El sistema reportero Caco-2 ccl20: luc consiste en células Caco-2 capaces de expresar el gen de la luciferasa de luciérnaga (*Lampryda noctiluca*) bajo el control del promotor de la quimoquina CCL20 (Nempont et al 2008). Las células se crecieron en medio DMEM completo (tabla M.4).

Para los ensayos, las células fueron cultivadas en placas de 48 fosas durante 7 días.

2.4. Medios de cultivo celular

Los medios de cultivo suplementados se esterilizaron por filtración (0,22 μm ; Steritop™, Millipore).

Tabla M.4. Medios utilizados para cultivo de células y tejidos

Ingrediente	RPMI Completo	RPMI Tejidos	DMEM Completo	DMEM Adhesión
RPMI ^a	1 sobre	1 sobre	-	-
DMEM ^b	-	-	1 sobre	1 sobre
Penicilina/estreptomicina (1000 IU, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ^c	13 mL	13 mL	13 mL	-
Aminoácidos no esenciales ^d	13 mL	13 mL	13 mL	-
Gentamicina (50 mg/mL)	10 mL	20 mL	10 mL	-
NaHCO_3	2,0 g	2,0 g	2,0 g	2,0 g
L-glutamina	0,3 mg	0,3 mg	0,3 mg	-
Suero fetal bovino inactivado ^e	180 mL	-	120 mL	-
Agua miliQ	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL
pH	7,5 \pm 0,1	7,5 \pm 0,1	7,5 \pm 0,1	7,5 \pm 0,1

^a RPMI-1640, GIBCO, Grand Island N.Y., USA; ^b Dulbecco Modified Eagle's Medium, GIBCO, Grand Island N.Y., USA; ^c GIBCO, Grand Island N.Y., USA; ^d MEM Non-essential amino acids solution (100X), GIBCO, Grand Island N.Y., USA; ^e BIOSER, Argentina. El suero fue inactivado térmicamente, incubándolo 30 minutos a 60 °C.

3. Separación electroforética de proteínas

3.1. Separación mediante SDS-PAGE

Se utilizó la técnica desarrollada por Laemmli (1970). Los geles se prepararon con una concentración de acrilamida 12 % p/v en el gel separador y 4% p/v en el gel apilador (Manns 2011). Las corridas electroforéticas se realizaron a voltaje constante, 120 V, hasta que el frente de corrida alcanzó el extremo inferior del gel, en un sistema vertical Bio-Rad Mini Protean III (Bio Rad Lab, C.A.).

3.2. Tinción de geles

Se utilizaron diferentes técnicas para la tinción de geles en función de la concentración de proteínas esperada:

3.2.1. Revelado con Coomasie coloidal

1. Se colocó el gel en agitación durante 30 minutos en la solución de fijación 1.
2. Se colocó el gel en agitación durante 20 minutos con 100 mL de la solución de fijación 2.
Descartar y repetir el procedimiento.
3. Se colocó el gel en la solución de coloración durante 30 minutos, en agitación, y luego agregar 1 mL de Coomasie G250 2 % p/v. Mantener en agitación toda la noche.
4. Al día siguiente, lavar con agua destilada y visualizar las bandas.

Tabla M.5. Soluciones utilizadas para el revelado con Colloidal Blue

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

3.2.2. Revelado con nitrato de plata (mayor sensibilidad)

1. Se colocó en solución de fijación, en agitación durante al menos 3 horas.
2. Se lavó dos veces con etanol 50 % v/v y dos veces con etanol 30 % v/v.
3. Se colocó en solución para pre-tratamiento durante 1 minuto (guardar 2 mL).
4. Se lavó con agua 1 minuto, se repitió 4 veces.
5. Se colocó en solución de impregnación durante 30 minutos en agitación.

6. Se lavó con agua 1 minuto, 2 veces.
7. Se incubó en solución de revelado durante 10 minutos en agitación y se detuvo con la solución de punto final.

Tabla M.6. Soluciones utilizadas para la tinción con nitrato de plata

Denominación	Ingredientes	Volumen final
Solución de fijación	- 100 mL de etanol absoluto - 24 mL de ácido acético glacial - 0,2 mL de formaldehído 37 %	200 mL
Solución de pretratamiento	- 20 mg tiosulfato de sodio Na ₂ S ₂ O ₃	100 mL
Solución de impregnación	- 200 mg de AgNO ₃ - 0,075 mL de formaldehído 37%	100 mL
Solución de revelado	- 6,0 g de Na ₂ CO ₃ - 0,05 mL de formaldehído 37% - 2 mL de solución de pre-tratamiento	100 mL
Solución de punto final de revelado	- 50 mL de metanol - 12 mL de ácido acético glacial	100 mL

3.3. Electrotransferencia

Esta técnica permite transferir proteínas que fueron separadas mediante SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de un campo eléctrico.

Se utilizó el equipo Mini Trans-Blot System (Bio-Rad) y las transferencias se realizaron a corriente constante, 300mA, durante 60 minutos, en un baño de hielo para evitar un aumento excesivo de temperatura. Luego de finalizada la electrotransferencia, las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con Rojo Ponceau para evaluar el éxito del procedimiento. Este colorante tiñe de forma reversible las proteínas, por lo que se eliminó mediante lavados de la membrana con TBS (tabla M.21), para realizar el revelado de la membrana por técnicas inmunoquímicas.

Tabla M.7. Soluciones utilizadas para realizar las electrotransferencias

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

4. Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el método de Bradford (Bradford 1976; Ernst and Zor 2010). Se realizó una curva patrón utilizando un stock comercial de albúmina bovina de 2 mg/mL (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit).

5. Biología molecular

5.1. Extracción de ARN de células y tejidos, transcripción reversa

Para la obtención de ARN total de células, se utilizó el kit comercial RNeasy Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del proveedor (Qiagen 2010). Se realizó un tratamiento adicional con DNasa (Turbo DNA-free, Ambion, Inc.). Se cuantificó el ARN en el extracto, utilizando un espectrofotómetro NanoDropTM1000 (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE, USA) y su pureza se analizó a través de la relación entre la absorbancia a 260 y 280 nm. Finalmente, se evaluó la integridad del ARN obtenido, mediante electroforesis en gel de agarosa 1,8 % p/v teñido con bromuro de etidio.

Para la extracción de ARN a partir de tejidos, estos últimos se conservaron en RNAlater (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) a -20°C hasta el momento de la extracción. Para la

obtención de ARN, se colocaron 100 mg de tejido en tubos de 2 mL conteniendo esferas de cerámica de 1,4 mm de diámetro (Lysing matrix D tubes, MP Biomedicals, Solon, OH) y 1 mL de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA), y se homogeneizaron en Ribolyser (Hybaid). Después de este paso, se continuó con el protocolo de purificación utilizado para células (RNeasy Mini kit y tratamiento con DNAsa).

Para la realización de determinaciones utilizando PCR cuantitativa, las muestras de ARN obtenidas fueron transcritas a ADNc utilizando la enzima Maxima Reverse Transcriptase (Fermentas, France) con una cantidad de ARN de 1 µg cada 20µL de mezcla de reacción (Thermo Scientific 2012) y cebadores oligo (dT)₁₅ (GenBiotech, Argentina). Se utilizó el siguiente programa: 50 °C for 30 min, 85 °C 5 min. Los productos obtenidos, se conservaron a -20°C hasta su utilización.

5.2. Extracción de ADN de microorganismos y materia fecal

Para la obtención de ADN de las muestras de materia fecal de animales, se utilizó el kit comercial NucleoSpin Soil Genomic DNA isolation kit (Macherey-Nagel). Se pesaron aproximadamente 100 mg de materia fecal, que fueron resuspendidos en buffer TE (MyM, sección 9) para la obtención de una concentración final de 200 mg/mL. Luego de la extracción realizada según lo indicado por el proveedor (Macherey-Nagel 2011), el ADN obtenido se trató con RNAsa 100 µg/mL (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos a 37°C para eliminar posibles contaminaciones. Finalmente, se cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDropTM1000 y se analizó el extracto en un gel de agarosa 1 % p/v.

5.3. Extracción de plásmidos

Para la obtención de ADN plasmídico se utilizó la técnica descrita por Voskuil y Chambliss (1993). Como control positivo de la extracción, se utilizó la cepa *Lactobacillus plantarum* 299V que contiene cuatro plásmidos (Johansson et al 1995).

5.4. Amplificación mediante reacción de polimerización en cadena (PCR) de fragmentos de ADN

Esta técnica se utilizó para la evaluación de la presencia de genes de resistencia a cloranfenicol (MyM, sección 6.3.2) y para el análisis de la microbiota bacteriana mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, MyM, sección 7.6.6.1). En todos los casos, se utilizó el ciclador MyCycler Thermal (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) Para la preparación de las mezclas de reacción, se utilizaron las concentraciones indicadas en la tabla M.8.

Tabla M.8. Concentraciones de reactivos en la mezcla de reacción.

Componente	Concentración final
Cebadores (GenBiotech, Argentina)	0,5 μ M de cada uno
dNTPs (Fermentas, Francia)	1 mM de cada uno
Composición de mezcla de reacción (Fermentas, Francia)	2,5 mM MgCl ₂ ; 10 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl; 0,1% v/v Triton X-100; 0,2 mg/mL BSA
Polimerasa (Fermentas, Francia)	0,05 U/ μ L Taq polimerasa
DNA molde	0,5-1 ng/ μ L de mezcla de reacción

5.5. PCR cuantitativa (qPCR)

Se utilizó el sistema de detección CHROMO 4™ System (BioRad, USA). Para las reacciones se utilizó la mezcla Maxima® SYBR® Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas, France), a la cual se adicionaron 0,5 μ M de cada cebador y una cantidad estandarizada de ADNc (1 μ L de ADNc obtenido a partir de 1 μ g de ARN en 20 μ L de mezcla de reacción para transcripción reversa, para cuantificación de expresión génica) o ADN (20 ng, para estudios de microbiota en materia fecal). Se indicarán los cebadores utilizados en los apartados que corresponda.

Para el estudio de la expresión génica, se usaron los genes fosforilribosiltransferasa (HPRT) y β 2 microglobulina (B2m) como genes normalizadores o de referencia. Los resultados se

analizaron por el método de C(t) comparativo descrito por Livak y Schmittgen (2001). Brevemente, 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 del nivel basal. Para comparar entre muestras, para cada una se normaliza el C(t) del gen de interés respecto al gen referencia ($\Delta C(t)$). Luego, se comparan los $\Delta C(t)$ de cada muestra experimental ($\Delta C(t), me$), con el $\Delta C(t)$ de la muestra utilizada como control ($\Delta C(t), c$) para obtener el $\Delta\Delta C(t)$. La cantidad relativa en cada muestra, viene definida por la siguiente fórmula: $2^{-\Delta\Delta C(t)}$.

La determinación de las condiciones óptimas de amplificación para los cebadores utilizados en la evaluación de la expresión génica (tablas M.11 y M.20), se realizó como parte del desarrollo de este trabajo de tesis. Se realizó un gradiente de temperaturas de hibridación (T_a), luego se estudió el producto obtenido analizando la temperatura de fusión (T_m) y corriendo geles de agarosa para asegurar la presencia de un producto único de amplificación que posteriormente se envió a secuenciar para corroborar la identidad del fragmento amplificado. Todos los cebadores utilizados fueron seleccionados para evitar la formación de dímeros y para que el amplicón contuviera secuencias de diferentes exones, evitando así la amplificación de ADN genómico contaminante en la muestra de ADNc. De cualquier forma, se incluyeron en cada una de las corridas, dos controles negativos: uno, con la mezcla de reacción sin ácidos nucleicos y otro, con la mezcla de reacción y ARN.

6. Ensayos *in vitro*

6.1. Extracción de proteínas superficiales de *Lactobacillus kefir*

Para la extracción de proteínas de superficie se utilizaron las metodologías que se describen a continuación:

6.1.1. Extracción mediante LiCl 5 M o NaOH 0,01 M

Se modificó la técnica de extracción con LiCl descrita por Mobili y col. (2009) para obtener mayor cantidad de proteínas solubles.

Protocolo

1. Se centrifugaron 5 minutos a 10.000 g y 10°C, 50 mL de cultivo de *L. kefir* en fase estacionaria (condiciones de cultivo indicadas en MyM sección 2.1)
2. Se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 25 mL de PBS.
3. Se resuspendió el pellet del último lavado en 10 mL de LiCl (JT Baker) 5 M o 10 mL de NaOH 0,01M.
4. Se incubó en agitación (Environ shaker, Lab-line instruments Inc. Melrose Park, IL, USA) en baño de hielo y 250 rpm, durante 60 minutos al utilizar LiCl y 30 minutos al utilizar NaOH.
5. Se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 10°C.
6. Se separó el pellet para evaluar la viabilidad bacteriana luego del tratamiento o se lavó dos veces con 10 mL de PBS para realizar ensayos con los lactobacilos tratados.
7. Se filtró el sobrenadante con filtro de 0,45 µm; se dializó usando una membrana de celulosa (SpectraPor membrane tube, MWCO 6000-8000, Spectrum Medical Industries, California, USA) con agitación suave durante 36 hs contra 15 litros de T-PBS (3 cambios de 5 L cada uno) a temperatura ambiente.
8. Se centrifugó el dializado a 12.000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente y determinó proteínas en el sobrenadante mediante el método de Bradford (MyM, sección 4).

6.1.2. Extracción mediante Proteinasa K

Esta metodología se utilizó únicamente para eliminar proteínas de la superficie bacteriana y utilizar las bacterias para ensayos de adhesión a mucina y mucus porcinos.

Protocolo:

1. Se centrifugaron 5 minutos a 10.000 g y 10°C, 10 mL de cultivo de *L. kefir* en fase estacionaria
2. Se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 10 mL de PB.
3. Se resuspendió el pellet del último lavado en 10 mL de una solución de Proteinasa K (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) en PBS a una concentración final de 0,01 % p/v,

durante 30 minutos a 37°C.

4. Se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 10°C y se realizaron dos lavados con 10 mL de PBS.
5. Se separó el pellet para evaluar la viabilidad bacteriana luego del tratamiento o para realizar ensayos con los lactobacilos tratados.

6.1.3. Análisis del perfil electroforético de los extractos dializados y pellets bacterianos post-tratamiento

Se compararon los perfiles de proteínas de las bacterias tratadas con los distintos agentes, con los perfiles de los controles sin tratamiento y con los del sobrenadante de extracción, mediante SDS-PAGE (MyM, sección 3).

6.1.4. Viabilidad bacteriana post-tratamiento

El número de microorganismos viables se evaluó mediante recuento en placa de agar MRS. En todos los casos, las condiciones de los protocolos de extracción fueron ajustadas de manera tal de obtener el mayor rendimiento sin que la viabilidad bacteriana resultara afectada.

6.2. Hidrofobicidad superficial

La determinación de la hidrofobicidad superficial se realizó según lo descripto por Gómez Zavaglia y col. (2002). Brevemente, dos mililitros de suspensiones de *L. kefir* a DO^{600nm} 1,0 se mezclaron por inversión con 500 μ L de xileno. Se esperó que las fases se separaran por decantación y se determinó la absorbancia de la fase acuosa. Se determinó el porcentaje de hidrofobicidad mediante la siguiente ecuación: $H\% = [(A_i - A_f) / A_i] \times 100$, donde A_i es la absorbancia inicial de la suspensión bacteriana en fase acuosa y A_f representa la absorbancia de la fase acuosa luego de la extracción con xileno.

En algunos ensayos se realizó la extracción de las proteínas superficiales con LiCl 5 M (MyM sección 6.1.1), NaOH 0,01 M (MyM sección 6.1.1) o proteinasa K (MyM sección 6.1.2) y

se determinó el porcentaje de hidrofobicidad antes y después de la extracción.

6.3. Actividad hemolítica en medio sólido

Para asegurar la ausencia de actividad hemolítica (requisito establecido por el CAA para cepas probióticas), se realizaron estrías en agar LAPTg suplementado con sangre humana (MyM, sección 1.3). Los glóbulos rojos humanos fueron obtenidos a partir de muestras de sangre de donores sanos (grupo 0), las cuales se colectaron en tubos con heparina como anticoagulante. El paquete globular se lavó 3 veces con solución fisiológica estéril y se conservó a 4°C hasta su utilización. Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 37°C. *L. kefir* no es capaz de crecer en el medio de cultivo estándar utilizado para estos estudios, agar Columbia, por lo que se utilizó el microorganismo β -hemolítico *E. faecalis* ATCC 29212, capaz de crecer en ambos medios, para validar estas determinaciones. Se analizó la presencia de hemólisis α , β o γ , que se corresponden con halos verdes, incoloros o ausentes, respectivamente.

6.4. Determinación de sensibilidad a antimicrobianos

6.4.1. Método de dilución en caldo

La técnica de dilución en caldo, permite medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un antimicrobiano (ATB) frente a un cultivo bacteriano. Estos ensayos se realizaron siguiendo los lineamientos descritos en la norma ISO 10932:2010 (International Organization for Standardization 2010). Brevemente, las soluciones stock de ATB se diluyeron en medio LSM (90 % IST, 10% MRS) para obtener soluciones en el rango indicado en la tabla M.9. Los inóculos bacterianos se prepararon a partir de cultivos de 48 h, los mismos se ajustaron a una DO^{625nm} en una solución 0,85% p/v de NaCl y se diluyeron 500 veces en caldo LSM. Finalmente, se inocularon 50 μ L del inóculo bacteriano a 50 μ L de la dilución de ATB correspondiente en placas de 96 fosas. Las mismas se incubaron a 37°C durante 48 h y se evaluó el crecimiento bacteriano. La reproducibilidad de esta prueba es de \pm una dilución.

Tabla M.9. Preparación de antimicrobianos y punto de corte para lactobacilos.

Antimicrobiano	Solvente para preparación de solución madre (100 g/L) ^a	Rango de concentraciones ensayadas ^b	Punto de corte ^c
Ampicilina	Buffer fosfato 0,1M, pH 8,0	16 - 0,032 mg/L	2
Clindamicina	Agua miliQ	16 - 0,032 mg/L	1
Cloranfenicol	Etanol 95% v/v	64 - 0,25 mg/L	4
Eritromicina	Etanol 95% v/v	64 - 0,125 mg/L	1
Estreptomicina	Agua miliQ	256 - 0,5 mg/L	16
Gentamicina	Agua miliQ	128 - 0,5 mg/L	32
Kanamicina	Agua miliQ	256 - 2 mg/L	64
Tetraciclina	Agua miliQ	128 - 0,125 mg/L	8

^a Norma ISO 20776-1:2006 (International Organization for Standardization 2006).

^b Todos los antimicrobianos se diluyeron en agua MiliQ

^c EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) 2012

6.4.2. Detección de genes de resistencia a cloranfenicol (*cat*)

Para la detección del gen de resistencia a cloranfenicol, *cat* (*chloramphenicol acetyl transferase*), se usaron los cebadores y el programa de PCR descritos por Hummel y col. (2007). El fragmento de PCR esperado tiene un tamaño de 300 pb.

6.5. Resistencia a las condiciones gastrointestinales

Para la evaluación de la resistencia a las condiciones gastrointestinales, se utilizó el protocolo descrito por Grimoud y col. (2010) con algunas modificaciones.

Protocolo

1. A partir de un cultivo de *L. kefir* en fase estacionaria, se realizaron dos lavados con PBS y se prepararon 10 mL de suspensión de 10^8 UFC/mL (aproximadamente DO^{550nm} 0,2).
2. Se centrifugaron y resuspendieron en 10 mL de solución gástrica simulada (tabla M.10). Se incubó a 37 °C, con agitación a 200 rpm durante 90 minutos.
3. Se realizaron dos lavados con PBS, se separó 1 mL para realizar recuentos de microorganismos viables y se resuspendió el resto, en 9 mL de solución intestinal simulada

(tabla M.10). Se incubó a 37 °C, durante 180 minutos, con agitación a 200 rpm.

4. Luego, se realizaron dos lavados con PBS, y se realizó el recuento de microorganismos viables.

Tabla M.10. Soluciones utilizadas para la simulación de los compartimientos gastrointestinales.

Denominación	Ingredientes (volumen final 1000 mL)	Concentraciones
Solución gástrica pH 2,5	- 7,25 g NaCl - 0,52 g KCl - 3,8 g NaHCO ₃ - 3,0 g pepsina porcina (Sigma-Aldrich)	NaCl 125 mM KCl 7 mM NaHCO ₃ 45 mM Pepsina 0,3% p/v
Solución intestinal pH 8,0	- 1,3 g NaCl - 0,25 g KCl - 0,65 g NaHCO ₃ - 1,0 g pancreatina porcina (Sigma-Aldrich) - 1,5 g sales biliares (Sigma-Aldrich)	NaCl 22 mM KCl 3,2 mM NaHCO ₃ 7,6 mM Pancreatina 0,1% p/v Sales biliares 0,15% p/v

6.5.1. Adhesión a mucina gástrica porcina (MG) y células Caco-2/TC-7 post-simulación

Suspensiones de distintas cepas de *L. kefir* se sometieron al protocolo indicado en la sección 6.5 de Materiales y Métodos. Parte de las bacterias obtenidas al finalizar el protocolo experimental de simulación del pasaje a través del tracto gastrointestinal, se utilizaron para realizar ensayos de adhesión a MG (MyM, sección 6.6.1.2) y células Caco-2/TC-7 (MyM, sección 6.6.3).

6.6. Ensayos de adhesión a componentes de epitelio intestinal

6.6.1. Adhesión de *L. kefir* a mucus gastrointestinal porcino

6.6.1.1. Obtención de extracto de mucus intestino delgado y colon de cerdo

Se utilizó la metodología descrita por Conway y col. (1990) con algunas modificaciones. Se denominará "MID" al extracto obtenido de secciones de intestino delgado y "MC" al extracto obtenido se secciones de colon de cerdo.

Protocolo

1. Se cortó el intestino delgado o colon en secciones de 1,5 cm de longitud, y éstas se colocaron en PBS limpio y estéril a temperatura ambiente.
2. Se colocaron las porciones en una caja de Petri y, sosteniendo un extremo con una pinza, se apretó con otra para eliminar la materia fecal del interior. Se transfirió a un recipiente con PBS limpio y estéril a temperatura ambiente.
3. Se abrieron las porciones con tijera y se raspó con una espátula la superficie interna.
4. Se colocó lo extraído en 6 mL de PBS limpio cada 7 secciones procesadas.
5. Se centrifugaron a 11.000 g durante 20 minutos, a temperatura ambiente, para eliminar las bacterias y células.
6. Se guardó el sobrenadante (debería tener una consistencia viscosa) a -20 °C.
7. Análisis del extracto obtenido: se analizó el extracto mediante electroforesis en gel (MyM, sección 3) y se cuantificó el contenido de proteínas por el método de Bradford (MyM, sección 4).

6.6.1.2. Protocolo para ensayos de adhesión cuantitativos

Se siguió el protocolo descrito por Sánchez y col. (2010) con algunas modificaciones. Se realizaron ensayos de adhesión bacteriana y de adhesión de proteínas de superficie. Todos los ensayos de adhesión se realizaron al menos tres veces, con cuatriplicados intra-ensayos. Durante la puesta a punto de estos ensayos, se corroboró que la solución de Tritón X-100, en los tiempos y temperatura empleados, no afectara la viabilidad bacteriana.

Preparación de soluciones: se analizó la adhesión a distintas matrices que representan distintas porciones del tracto gastrointestinal.

1. Mucina gástrica: se preparó una solución 30 mg/mL de mucina gástrica porcina tipo III parcialmente purificada (Sigma-Aldrich, USA) en PBS.
2. Extractos MID y MC: se trabajó con soluciones de una concentración de 2 mg/mL en PBS.

Preparación de suspensiones bacterianas: se trabajó con suspensiones de bacterias sometidas a distintos tratamientos.

- Suspensión de 10^9 UFC/mL (aproximadamente DO^{550nm} 1) y diluciones seriadas (1/10), a partir de un cultivo de *L. kefir* en fase estacionaria, para evaluar el efecto de la concentración inicial de bacterias agregadas sobre el número de bacterias adheridas.
- Suspensión de 10^8 UFC/mL (aproximadamente DO^{550nm} 0,2) post-simulación del pasaje a través del tracto gastrointestinal (MyM, sección 6.4).
- Suspensión de 10^8 UFC/mL (aproximadamente DO^{550nm} 0,2) post-tratamiento con LiCl, NaOH o proteinasa K para eliminación de proteínas de superficie (MyM, sección 6.1).
- Suspensión de 10^8 UFC/mL (aproximadamente DO^{550nm} 0,2) en presencia de azúcares (lactosa, glucosa, sacarosa, fructosa, ramnosa, manosa, galactosa) a una concentración final 80 mM.

Preparación de placas de las distintas matrices

1. Se colocaron 100 μ L de la solución de la matriz de interés en cada fosa de microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Maxisorp Nunc, Roskilde, Denmark). Se incubaron durante una hora a 37°C y, luego, durante toda la noche a 4°C.
2. Se realizó una segunda incubación con durante 2 horas a 37°C con 150 μ L de la misma solución para bloquear todos los sitios de la placa.
3. Se lavó dos veces con 200 μ L de PBS.

Para todos los tres ensayos de adhesión que se describen a continuación, se prosiguió el protocolo a partir de la preparación de placas.

Ensayos de adhesión

Ensayo de adhesión bacteriana a las distintas matrices

4. Se colocaron 100 μL de la suspensión bacteriana y se incubó durante 2 horas a 37 °C.
5. Se lavó seis veces con 200 μL de PBS estéril para remover las bacterias no adheridas.
6. Se agregaron 200 μL de una solución 0,5% v/v de Tritón X-100 en PBS y se incubó durante 30 minutos a 37°C para remover las bacterias adheridas.
7. Se tomaron 100 μL del contenido de cada fosa, y se realizó recuento en placa para determinar el número de bacterias adheridas.

Ensayo de adhesión bacteriana a las distintas matrices en presencia de proteínas de superficie o de azúcares

4. Se colocaron 100 μL de una solución 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteínas de superficie, obtenidas por extracción con LiCl (MyM, sección 6.1), en PBS o en presencia de azúcares (lactosa, glucosa, sacarosa, fructosa, ramnosa, manosa, galactosa) a una concentración final 80 mM. Se incubó durante 2 horas a 37 °C.
5. Se lavó seis veces con 200 μL de T-PBS para remover las proteínas no adheridas.
6. Se colocaron 100 μL de la suspensión bacteriana de 10^8 UFC/mL (obtenida a partir de un cultivo de *L. kefir* en fase estacionaria). Se incubó durante 2 horas a 37 °C.
7. Se lavó seis veces con 200 μL de PBS estéril para remover las bacterias no adheridas.
8. Se agregaron 200 μL de una solución 0,5% v/v de Tritón X-100 y se incubó durante 30 minutos a 37°C para remover las bacterias adheridas.
9. Se tomaron 100 μL del contenido de cada fosa, y se cuantificó mediante recuento en placa el número de bacterias adheridas.

6.6.1.3. Protocolos para ensayos de adhesión cualitativos

Adhesión de bacterias a mucus gastrointestinal: revelado con microscopia de fluorescencia

1. Se colocaron 500 μL de la solución de la matriz de interés sobre cubreobjetos de vidrio. Se incubaron durante una hora a 37°C y, luego, durante toda la noche a 4°C.
2. Se realizó una segunda incubación con durante 2 horas a 37°C con la misma solución.
3. Se lavó dos veces con PBS.

4. Se colocaron 100 μL de una suspensión de *L. kefir* teñidas con CFDA-SE (MyM, sección 1.5) y se incubó durante 2 horas a 37 °C.
5. Se lavó tres veces con 500 μL de PBS estéril para remover las bacterias no adheridas.
6. Finalmente, la suspensión bacteriana se visualizó en el microscopio de fluorescencia (Leica DMLB equipado con una cámara Leica DC100. Leica Microscopy Systems Ltd. CH Heerbrugg, Switzerland).

6.6.2. Adhesión proteínas de capa S a mucus gastrointestinal porcino

6.6.2.1. Adhesión de proteínas de capa S de *L. kefir* a mucus gastrointestinal porcino en presencia o ausencia de azúcares. Ensayo tipo ELISA.

Protocolo

1. Se colocaron 100 μL de la solución de la matriz de interés en cada fosa de microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Maxisorp Nunc, Roskilde, Denmark). Se incubaron durante una hora a 37°C y, luego, durante toda la noche a 4°C.
2. Se realizó una segunda incubación con durante 2 horas a 37°C con 150 μL de la misma solución para bloquear todos los sitios de la placa.
3. Se lavó dos veces con 200 μL de PBS.
4. Se colocaron 100 μL de una solución 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteínas de superficie, obtenidas por extracción con LiCl (MyM, sección 6.1), en PBS o en presencia de azúcares (lactosa, glucosa, sacarosa, fructosa, ramnosa, manosa, galactosa) a una concentración final 80 mM. Se incubó durante 2 horas a 37 °C.
5. Se lavó seis veces con 200 μL de T-PBS para remover las proteínas no adheridas.
6. Se reveló utilizando un antisuero de conejo específico contra las proteínas de capa S de *L. kefir* (Garrote et al 2005), en conjunto con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con biotina (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) y estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA). Los anticuerpos se incubaron una hora a 37°C,

realizando lavados con T-PBS entre pasos. Las placas fueron incubadas usando el sustrato de peroxidasa PNPP (para-nitrofenilfosfato), de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Sigma, St. Louis, MO) y se realizó la lectura de absorbancia a 405 nm.

6.6.2.2. Adhesión de proteínas de capa S de *L. kefir* a MG porcina: revelado mediante SDS-PAGE.

Protocolo

El ensayo de adhesión se realizó como se indicó en 6.6.2.1, hasta el paso 5. Para el revelado, se procedió de la siguiente forma:

6. Se adicionaron 100 μ L de una solución de SDS 5% p/v a cada fosa. Se incubó 30 minutos en agitación y se recolectó el contenido.
7. Las muestras fueron dializadas, usando una membrana de celulosa MWCO 6000-8000, contra agua destilada, para eliminar el exceso de detergente, y las muestras fueron liofilizadas.
8. Finalmente, se realizó la separación electroforética de las muestras mediante SDS-PAGE (MyM, sección 3.1), y reveló mediante tinción con nitrato de plata (MyM, sección 3.2.2).

6.6.2.3. Adhesión de proteínas de capa S de *L. kefir* a proteínas de mucus de intestino delgado (MID) y de colon (MC). Ensayo tipo Western Blot.

Protocolo

1. Se realizó la separación electroforéticas de las proteínas de MID y MC mediante SDS-PAGE (MyM, sección 3.1) y se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (MyM, sección 3.3).
2. La membrana de nitrocelulosa se incubó con extractos de proteínas de superficie de *L. kefir* CIDCA 8348 o JCM 5818 (MyM, sección 6.1.1) durante 30 minutos a 37°C.
3. Se lavó utilizando T-TBS y se incubó con una solución de T-TBS con 3% p/v de leche descremada durante 30 minutos a 37°C.
4. Se incubó con antisuero de conejo específico contra las proteínas de capa S de *L. kefir*

(Garrote et al 2005), en conjunto con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con biotina (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) y estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA). Los anticuerpos se incubaron una hora a 37°C, realizando lavados con T-PBS entre pasos.

5. El revelado se realizó utilizando una solución 4-cloro-1-naftol 9 mg/mL (el sólido se solubilizó en 3 mL de metanol y se agregaron 15 mL de TBS), y 18 µL de H₂O₂ 30% v/v (E. Merck, Alemania).

6.6.3. Adhesión a células Caco-2/TC-7

Se utilizó la línea celular Caco-2/TC-7 para el estudio de la adhesión de lactobacilos a células intestinales *in vitro*, según el protocolo descrito por Golowczyc y col. (2007). Los resultados representan la media de tres ensayos en tres pasajes consecutivos, con cuatriplicados intra-ensayo.

6.7. Inhibición del crecimiento de patógenos

Spot test

Se estudió la capacidad de distintas cepas de *L. kefir* para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, utilizando la metodología descrita por Schillinger y Luckett (1989). Se sembraron 15 µL de un cultivo en fase estacionaria de *L. kefir* sobre la superficie de una placa de MRS agar 1,5 % p/v y se incubó durante 48 horas a 37°C, luego se colocó una capa de agar blando BHI o BHIg inoculado con un microorganismo patógeno de la tabla M.2 y se incubó durante 16 horas a 37°C. Se midió el halo de inhibición (dI), zona sin crecimiento, y el diámetro de la zona de crecimiento del lactobacilo (dLk). Los resultados se expresan como el radio de inhibición (R), calculado con la ecuación: $R = (dI - dLk)/2$.

Todos los ensayos de inhibición se realizaron al menos tres veces, con duplicados intra-ensayo.

6.8. Inhibición de la acción de factores citotóxicos solubles *Bacillus cereus*

6.8.1. Obtención de sobrenadante de cultivo estéril de *B. cereus*

Se centrifugaron a 16.000 g durante 15 minutos, cultivos de *B. cereus* en fase estacionaria (MyM, sección 1.2), y se filtraron con membrana de 0,22 μm .

6.8.2. Preincubación de sobrenadante filtrado de *B. cereus* con *L. kefir*

El volumen necesario de suspensión de *L. kefir* para obtener $\text{DO}^{550\text{nm}}$ 4,0 y 8,0 se centrifugó y se resuspendió en sobrenadante filtrado de *B. cereus*. Se incubó durante una hora a 37°C en agitación y, posteriormente, los lactobacilos se separaron por centrifugación.

6.8.3. Ensayo de citotoxicidad sobre células Caco-2 y Vero

Células Caco-2 o Vero confluentes (MyM, secciones 2.2 y 2.3.1), se incubaron con diluciones seriadas de los sobrenadantes de *B. cereus* tratados o no con las distintas cepas de *L. kefir* durante una hora a 37°C. Todos los ensayos se repitieron al menos cuatro veces.

Se evaluó el daño producido cuantificando, mediante tinción con cristal violeta (Minnaard et al 2001), la cantidad de células no desprendidas. La actividad citotóxica de los sobrenadantes, se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de células desprendidas} = 100 \times (1 - (\text{DO}_m - \text{DO}_0) / (\text{DO}_b - \text{DO}_0))$$

Donde DO_m es la absorbancia de la muestra a evaluar, DO_0 es la absorbancia leída en una fosa que no contenía células (control de lavado) y DO_b corresponde a la absorbancia de células incubadas en presencia de medio de DMEM adhesión. Para el modelado de la fracción de células desprendidas en función de la concentración de sobrenadante, se utilizó una ecuación hiperbólica (Trejo et al. 2010). De esta forma, se pudo calcular la dosis necesaria para producir el desprendimiento del 50% de las células, parámetro que es inversamente proporcional a la actividad citotóxica de una muestra.

En otros ensayos, se evaluó el daño generado en el citoesqueleto celular realizando tinción

con faloidina-FTTC como fue descrito por Minnaard y col. (2004). Para estos experimentos, las células fueron crecidas sobre vidrios, se realizaron los ensayos de citotoxicidad con se indicó previamente en esta sección. Luego de la tinción con faloidina-FTTC, las células se observaron en un microscopio de fluorescencia (Leica DMLB equipado con una cámara Leica DC100. Leica Microscopy Systems Ltd. CH Heerbrugg, Switzerland).

6.8.4. Ensayo de hemólisis

Se determinó la actividad hemolítica de sobrenadantes *B. cereus* tratados o no con las distintas cepas de *L. kefir*. Se realizaron diluciones seriadas y se incubaron con una suspensión de glóbulos rojos humanos (MyM, sección 6.3) 4% v/v durante 2 hs a 37°C y 16 hs a 4°C. Se determinó el efecto hemolítico mediante lectura visual y medición de DO^{540nm}. El control positivo de hemólisis se realizó agregando agua destilada a la suspensión de glóbulos rojos. El porcentaje de hemólisis se calculó mediante la expresión: % de hemólisis= 100 x (DO de la muestra/ DO control positivo)

6.9. Inhibición de la acción de factores citotóxicos solubles de *Clostridium difficile*

6.9.1. Obtención de sobrenadante de cultivo estéril de *C. difficile*

Se centrifugaron a 16.000 g durante 15 minutos, cultivos de *C. difficile* en fase estacionaria (MyM sección 2.2), y se filtraron con membrana de 0,22 µm.

6.9.2. Tratamiento de sobrenadantes filtrados de *C. difficile*

Se realizaron distintos tratamientos sobre los sobrenadantes de *C. difficile*, que fueron luego utilizados para realizar ensayos de citotoxicidad sobre células Vero:

1. El volumen necesario de suspensión de *L. kefir* para obtener DO^{550nm} 4,0 y 8,0 se centrifugó y se resuspendió en el sobrenadante filtrado de *C. difficile*. Se incubó durante 1 hora a 37°C en agitación y, posteriormente, los lactobacilos se separaron por centrifugación. Los

sobrenadantes se utilizaron para los ensayos sobre células Vero y los lactobacilos se emplearon para microscopía de fluorescencia y dot-blot (MyM, sección 6.9.4).

2. Sobrenadantes filtrados de *C. difficile* se incubaron durante 1 hora a 37°C con extractos de proteínas de superficie de *L. kefir* (MyM, sección 6.1.1) a una concentración proteica final de 25 µg/mL (MyM, sección 4). En algunos ensayos, se realizó esta incubación en presencia de un coctel de inhibidores de proteasas (P8340, Sigma, USA).

3. Para algunos ensayos, las proteínas de superficie fueron previamente tratadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-capa S durante 30 minutos a 37 °C o calentadas a 100°C durante 15 minutos y, posteriormente, se incubó los sobrenadantes filtrados de *C. difficile* durante 1 hora a 37°C con los estos extractos.

6.9.3. Ensayo de citotoxicidad sobre células Vero

Los ensayos se realizaron como fue descrito por Trejo y col. (2010). Las células se incubaron durante 16 h con diluciones seriadas de sobrenadantes de cultivo de *C. difficile* o a sobrenadantes de cultivo sometidos a distintos tratamientos como incubación con *L. kefir* o extractos de proteínas de superficie de *L. kefir*. La evaluación del daño generado sobre las células por los sobrenadantes sometidos a distintos tratamientos, se realizó mediante tinción con cristal violeta y citoesqueleto, tal como fue descrito en la sección 6.7.3 (Minnaard et al 2001; Minnaard et al 2004).

6.9.4. Interacción de *L. kefir* con las toxinas producidas por *C. difficile*

Para evaluar la interacción entre *L. kefir* y los factores citotóxicos solubles producidos por *C. difficile*, se realizaron ensayos utilizando anticuerpos monoclonales contra las toxinas A (TcdA) y B (TcdB) (Meridian Life Science, Inc.).

6.9.4.1. Dot Blot

Suspensiones de *L. kefir* se incubaron con sobrenadantes de *C. difficile* durante 1 hora a 37°C. Las bacterias se lavaron tres veces con PBS y se sembraron 5 µL en membranas de nitrocelulosa. Se bloqueó la membrana con una solución 3% p/v de leche descremada en T-TBS (MyM, sección 9) y se las incubó con anticuerpo monoclonal de ratón anti-TcdA o anti-TcdB (Meridian Life Science, Inc., USA). Se reveló el ensayo usando un anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano y una solución 4-cloro-1-naftol 9 mg/mL (el sólido se solubilizó en 3 mL de metanol y se agregaron 15 mL de TBS), y 18 µL de H₂O₂ 30% v/v (E. Merck, Alemania).

6.9.4.2. Microscopia de fluorescencia

Una suspensión de *L. kefir* CIDCA 8348 DO^{550nm} 8,0 previamente teñida con CFDA-SE (MyM, sección 1.6), se incubó con sobrenadantes de *C. difficile* durante 1 hora a 37°C. Las bacterias se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en 15 µL del mismo buffer. Para evaluar la interacción de la superficie bacteriana con las toxinas de *C. difficile*, las bacterias se incubaron con anticuerpo monoclonal de ratón anti-TcdB (Meridian Life Science, Inc., USA), luego con anti-ratón IgG (Sigma Aldrich, USA) y estreptavidina-PE (eBioscience, USA). Finalmente, se visualizó en el microscopio confocal (LEICA TCS SP5, Leica Microscopy Systems Ltd. CH Heerbrugg, Switzerland). Bacterias no incubadas con sobrenadantes de *C. difficile* se utilizaron como control negativo.

6.10. Propiedades inmunomodulatorias

6.10.1. Ensayos de estimulación sobre células Caco-2 y PBMC

Estos ensayos se realizaron co-cultivando 2-5 x 10⁷ UFC/fosa de placas con PBMC (MOI 10) y 2-5 x 10⁸ UFC/fosa de placas de células Caco-2 (MOI 100). Para cuantificar las citoquinas secretadas por las células estimuladas por *L. kefir*, la co-incubación se llevó a cabo durante 24 horas, se recolectaron los sobrenadantes y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento. Para el

análisis de la expresión génica, el ensayo tuvo una duración de 4 horas, las células fueron colocadas en buffer de lisis (Qiagen 2010) y los lisados se conservaron a -80°C .

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y la viabilidad celular fue evaluada midiendo la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial según el protocolo descrito por Medrano y col. (Medrano et al 2008).

6.10.1.1. Cuantificación de expresión génica

Luego de extraer ARN de las células y sintetizar el ADNc (MyM, sección 5.1), se comparó la expresión de genes entre los distintos tratamientos mediante qPCR (MyM, sección 5.4). En la tabla M.11, se indican todos los cebadores utilizados.

Tabla M.11. Cebadores utilizados para evaluar expresión génica en la línea celular Caco-2

Gen	Secuencia 5' - 3' (directo y reverso)	Gen	Secuencia 5' - 3' (directo y reverso)
<i>b2-m</i>	GGCTATCCAGCGTACTCCAAA CGGCAGGCATACTCATCTTTTT	<i>il23</i>	GGACAACAGTCAGTTCTGCTT CACAGGGCTATCAGGGAGC
<i>hpvt</i>	ATTGTAATGACCAGTCAACAGGG GCATGTGTTTTGCCAGTGTCAA	<i>ifng</i>	TGGCTTTTCAGCTCTGCATCGT CCGCTACATCTGAATGACCTGCAT
<i>il1b</i>	CTCGCCAGTGAAATGATGGCT GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT	<i>tnfa</i>	ATGAGCACTGAAAGCATGATCC GAGGGCTGATTAGAGAGAGGTC
<i>il6</i>	AAATTCGGTACATCCTCGACGG GGAAGGTTTCAGGTTGTTTTCTGC	<i>tgfb1</i>	CAAGCAGAGTACACACAGCAT TGCTCCACTTTTAACTTGAGCC
<i>il8</i>	TTTTGCCAAGGAGTGCTAAAGA AACCTCTGCACCCAGTTTTTC	<i>muc1</i>	TGCTTACAGCTACCACAGCCCCT TCGGTGCTGGGATCTTCCAGAGA
<i>il10</i>	ACTTTAAGGGTTACCTGGGTTGTC TCACATGCGCCTTGATGTCTG	<i>muc2</i>	AGGCTCCTACAAGGAATTTGC CATCGCTCTTCTCAATGAGCA
<i>il12p70</i>	CCTTGCACTTCTGAAGAGATTGA ACAGGGCCATCATAAAAGAGGT	<i>muc13</i>	GTGGGCACCATCGCTGGCAT GGTGAAGCCTGTCGACCGCA
<i>il17a</i>	CAATCCCACGAAATCCAGGATG GGTGGAGATTCCAAGGTGAGG		

6.10.1.2. Cuantificación de citoquinas secretadas

Se cuantificó la concentración de citoquinas en sobrenadantes de cultivo de células Caco-2 y PBMC, utilizando el kit Human Th1/Th2 11plex FlowCytomix Kit (eBioscience, Bender MedSystems GmbH, Austria). La preparación de muestras se efectuó según el protocolo del proveedor (eBioscience 2012) y el análisis se realizó en un citómetro BD Accuri C6.

La concentración de TGF- β , se determinó utilizando un ELISA de captura comercial (ELISA Ready Set Go!, eBioscience), cuya sensibilidad es de 8,0 pg/mL.

6.10.2. Ensayos de estimulación sobre el sistema reportero Caco-2 ccl20:luc

Estos ensayos se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Romanin y colaboradores (Romanin et al 2010). Se trabajó con células Caco-2 ccl20: luc confluentes, las que fueron preincubadas con una suspensión de 10^8 UFC/mL de *L.kefiri* durante 30 minutos y luego fueron estimuladas con flagelina purificada a partir de un cultivo de *Salmonella* Typhimurium (FliC) (1 μ g/mL) durante 4 horas. Se cuantificó la actividad luciferasa en los lisados celulares, siguiendo las especificaciones del kit Luciferase Assay System (Promega, Madison WI, USA).

Los ensayos se realizaron por triplicado, con duplicados intra-ensayos y los resultados se expresaron como el porcentaje de la media del control positivo de estimulación (FliC).

7. Ensayos *in vivo*

7.1. Animales utilizados y condiciones de alojamiento

Los protocolos experimentales que serán descritos en las secciones 7.4 y 7.5, se ejecutaron utilizando ratones albinos Swiss machos, libres de patógenos específicos (SPF), de cinco semanas de edad (Janvier, Le Genest St Isle, Francia).

En ambos casos, antes de dar comienzo a los protocolos experimentales, se permitió la adaptación de los animales, a los nuevos macro y microambiente, durante una semana. Los animales se mantuvieron en cubetas de plástico, con un lecho de viruta esterilizada. Se los alimentó *ad libitum* con una dieta para ratones en forma de pellets, y con libre acceso a agua esterilizada. El ciclo de luz/oscuridad fue de 12/12 horas y la temperatura se fijó en 22 ± 2 °C.

7.2. Monitoreo del estado general de los animales

Se evaluó diariamente el comportamiento y estado general de los animales, analizando signos asociados a malestar o dolor siguiendo los lineamientos establecidos por el Consejo Canadiense de Protección de los Animales (1998) y lo descrito por Langford y col. (2010). También se evaluaron la masa corporal y la consistencia de la materia fecal.

7.3. Eutanasia, toma de muestras y modo de conservación

Al finalizar los protocolos experimentales, los animales se sacrificaron por inhalación de CO₂. La disección se realizó en condiciones de esterilidad dentro de una cabina de seguridad biológica tipo II utilizando material quirúrgico estéril.

Muestras y conservación

1. Materia fecal para determinación de IgA: la toma de muestra se realizó separando a los animales en cajas estériles. Se tomaron, al menos, cinco pellets por ratón y se colocaron en tubos tarados con PBS suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (P8340, Sigma, USA), en baño de hielo. La muestra se mantuvo a -20°C hasta su procesamiento.
2. Materia fecal para extracción de ADN: la toma de muestra se realizó separando a los animales en cajas estériles. Se tomaron, al menos, tres pellets por ratón y se colocaron tubos estériles. La muestra se mantuvo a -20°C hasta su procesamiento.
3. Placas de Peyer (PP) y nódulos linfáticos mesentéricos (mLN) para estudios por citometría de flujo: se extrajeron los tejidos y se colocaron en eppendorfs con PBS, en baño de hielo. Las muestras se procesaron el día del sacrificio, y se mantuvieron en baño de hielo hasta su utilización.
4. Tejidos para histología: secciones de íleon y colon se colocaron en tubos con etanol absoluto. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento.
5. Tejidos para extracción de ARN (qRT-PCR): secciones de íleon y colon, PP y mLN, se colocaron en tubos con RNALater (Qiagen 2006). Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento.

6. Tejidos para cultivo: secciones de íleon y colon se cortaron en fragmentos de 1 cm de longitud, se colocaron en tubos con RPMI tejidos (tabla M.4). Las muestras se procesaron el día del sacrificio, y se mantuvieron en baño de hielo hasta su utilización.

7. Evaluación de translocación intestinal: se tomaron muestras de sangre, y se extrajeron el bazo, el hígado y una porción de íleon de 5 cm en condiciones de asepsia. La muestra de sangre se recolectó en un tubo con anticoagulante, el bazo e hígado se colocaron en tubos pesados con 500 μ L de PBS estéril. En el caso del íleon, se realizaron lavados con 500 μ L de PBS estéril que fueron conservados para la cuantificación de microorganismos. Las muestras se procesaron el día del sacrificio, y se mantuvieron en baño de hielo hasta su utilización.

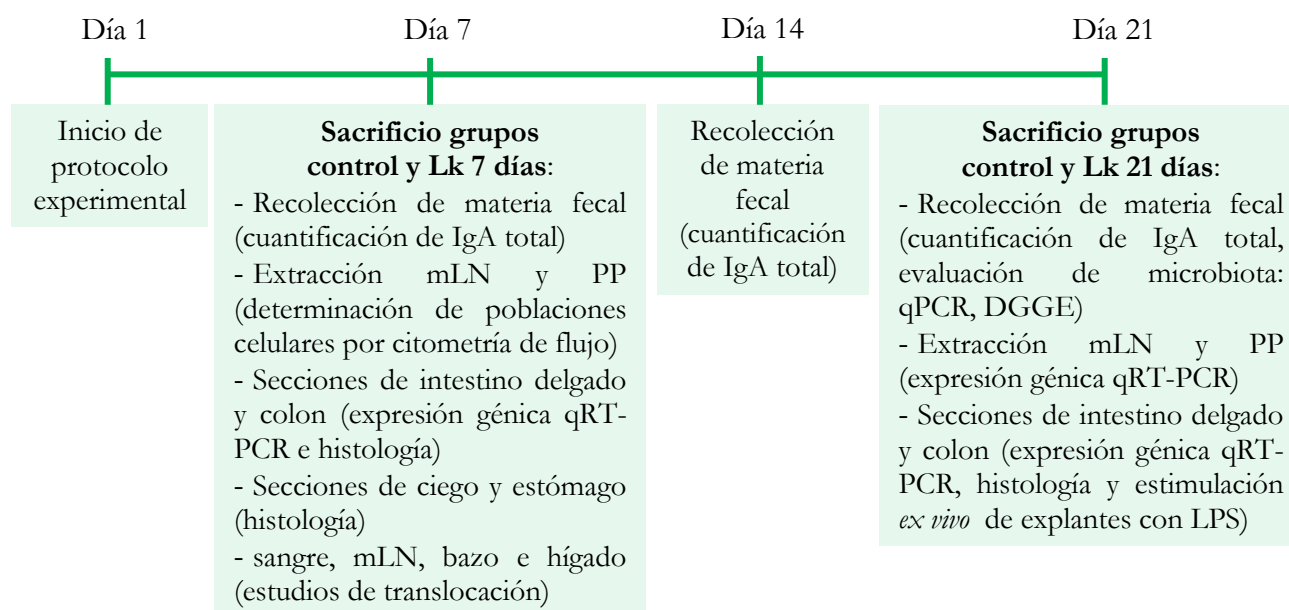
7.4. Protocolo experimental para estudiar la inocuidad, y modulación del sistema inmune y de la microbiota intestinal

Se trabajó con dos lotes de 12 ratones albinos Swiss de 6 semanas de edad: uno recibió diariamente 10^8 UFC/ratón de la cepa de *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 (grupo Lk) y el otro PBS (grupo control) mediante inoculación intragástrica. La mitad de los animales de cada lote se sacrificó a los 7 días y, el resto, a los 21 días.

Tabla M.12. Tratamiento recibido por cada lote experimental.

Denominación del lote	Tratamiento diario	
	PBS	10^8 UFC/ratón
Control 7 días	X	
Control 21 días	X	
Lk 7 días		X
Lk 21 días		X

A continuación se presenta un esquema del protocolo experimental seguido, en el que se indican las muestras que fueron tomadas durante el desarrollo del mismo:



Las muestras extraídas se conservaron como se indica en la sección 7.3 hasta su procesamiento.

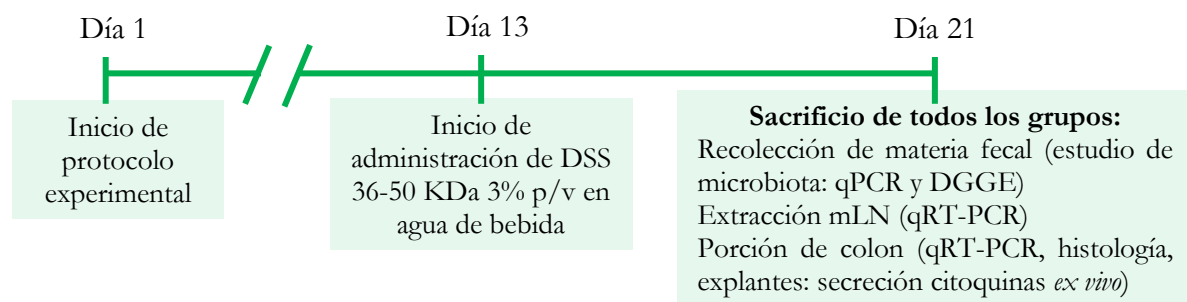
7.5. Protocolo experimental para estudiar el efecto de la administración de *L. kefir* en un modelo de inflamación intestinal inducida por DSS

Se trabajó con cuatro lotes de ocho ratones albinos Swiss de 6 semanas de edad: dos de ellos recibieron diariamente, mediante inoculación intragástrica, 10^8 UFC/ratón de la cepa de *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 (grupos Lk y DSS+Lk) y los otros dos, PBS (grupos control y DSS). La administración de dextran sulfato de sodio (DSS, peso molecular 36 - 50 KDa, MP Biomedicals, Solon, OH, Estados Unidos) 3% p/v en agua de bebida comenzó luego de 14 días (grupos DSS y DSS+Lk). Los animales se sacrificaron a los 21 días del comienzo del protocolo experimental.

Tabla M.13. Tratamiento recibido por cada lote experimental.

Denominación del lote	Tratamiento diario		Administración de DSS (día 13)	
	PBS	10^8 UFC/ratón	Agua de bebida	DSS 3% p/v
Control	X		X	
Lk		X	X	
DSS	X			X
DSS+Lk		X		X

A continuación se presenta un esquema del protocolo experimental seguido, en el que se indican las muestras que fueron tomadas durante el desarrollo del mismo:



Durante el desarrollo del protocolo experimental, se evaluaron diariamente la masa corporal y la consistencia de la materia fecal, el estado general y el comportamiento de los animales (Canadian Council on Animal Care 1998; Langford et al 2010). Se estableció como punto final humanitario un descenso de masa corporal mayor al 20% en 24 horas.

Se valoró, diariamente, la severidad de la patología en cada individuo, según los parámetros propuestos por Zhou y col. (2012). Se asignó un valor de “severidad de enfermedad” diario, para cada animal, que corresponde a la suma de los valores asignados a cada parámetro. Los mismos se indican en la tabla M.14.

Tabla M.14. Valoración de parámetros clínicos.

Valoración	Pérdida de peso (%)	Consistencia de la materia fecal	Presencia de sangre en materia fecal
0	< 1	Normal	Ausente
1	1-5	Blandas y formes	
2	5-10	Blandas formes y no formes	Macroscópica escasa
3	10-15	Blandas no formes	
4	> 15	Diarrea	Macroscópica abundante

7.6. Procesamiento y análisis de muestras obtenidas de los ensayos *in vivo*

7.6.1. Histología

Las muestras se procesaron según los protocolos descritos en el libro “Técnicas

Histotecnológicas” (Prophet et al 1995). Las secciones de íleon y colon se tiñeron con hematoxilina-eosina (Sainte-Marie 1962). En el caso de las muestras de colon, también se realizaron las tinciones de PAS, utilizando un kit comercial (Polysciences Inc. 2007), y de azul de Alcian (Azul de Alcian 0,5 g/L en ácido acético 3 % v/v, pH: 2,5). Las áreas PAS positivas, se cuantificaron utilizando el programa ImageJ.

7.6.2. Translocación

Las muestras de bazo e hígado se colocaron en eppendorfs pesados conteniendo PBS estéril, para el cálculo, por diferencia, del peso del órgano a analizar. Los tejidos se disgregaron mecánicamente y una vez obtenidos los homogenatos, se realizaron los recuentos en placa en los siguientes medios de cultivo: agar MRS, agar nutritivo, agar VRBG (agar Bilis y Rojo Violeta con Glucosa) e YGC (agar extracto de levadura, glucosa y cloranfenicol). Las muestras de sangre fueron sembradas sin hacer diluciones en los medios de cultivo mencionados.

Para realizar un control de los medios de cultivo, se hicieron diluciones seriadas del contenido del íleon, para el cual los recuentos se encuentran, en general, entre 10^8 - 10^9 UFC/g de tejido en todos los medios utilizados.

7.6.3. Análisis de poblaciones celulares de mLN y PP

Las poblaciones celulares se estudiaron realizando marcaciones con los anticuerpos que se indican en la tabla M.15. Las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo BD Accuri C6 con su correspondiente programa de análisis de datos.

Las células se extrajeron mediante disgregación mecánica de los órganos (PP y mLN), se lavaron con PBS-SFB y se recuperaron por centrifugación (5 minutos a 500 g). Se realizó recuento en cámara de Neubauer de las suspensiones obtenidas y se distribuyeron 3×10^5 células/tubo de citometría para proceder a su marcación. Las incubaciones con los anticuerpos se realizaron a 4°C durante 30 minutos al resguardo de la luz. En todos los casos, se incluyeron

células sin marcar, marcaciones simples para la selección de las regiones a analizar (en el caso de marcaciones dobles), y controles de isotipo, según haya sido el origen de los anticuerpos usados.

Tabla M.15. Anticuerpos utilizados.

Anticuerpos	eBioscience
FTTC-conjugated anti-mouse/human CD45R (B220)	11-0452
PE conjugated anti-mouse MHC Class II (I-A/I-E)	12-5321-83
Biotin conjugated anti-mouse F4/80 Antigen - Pan Macrophage Marker	13-4801-82
Biotin conjugated anti-mouse CD11c	13-0114-82
PE conjugated anti-mouse CD86 (B7-2)	13-0862-82
Anti-mouse IgA monoclonal antibody FTTC-conjugated	11-4204-82
Streptavidin FTTC-conjugated	11-4317-87

7.6.4. Cuantificación de IgA en materia fecal

Se cuantificó la concentración de IgA en materia fecal (μg de IgA/g de material fecal), mediante ELISA de captura, utilizando la técnica descrita por BD Pharmingen y los reactivos indicados en la tabla M.16. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

La extracción de IgA de material fecal se realizó siguiendo el protocolo descrito por Peters y col. (Peters et al 2004). Se pesaron 500 mg de materia fecal y se resuspendieron en 5 mL de PBS al que se adicionó previamente 0,5 % v/v de Tween 20 (SIGMA, St. Louis, MO USA) y 0,05 % p/v de azida de sodio (SIGMA, St. Louis, MO USA). Las muestras se homogeneizaron por inversión manual y utilizando el vortex, y fueron centrifugadas a 1500g durante 20 minutos a 4°C. Se conservó el sobrenadante a -20°C hasta su utilización.

Tabla M.16. Reactivos utilizados para la realización del ELISA de captura para determinar IgA.

Reactivos utilizados	Función en el ELISA	Código proveedor
Purified mouse IgA kappa	IgA purificada (curva patrón)	BD 553476
Purified rat anti-mouse IgA	Anticuerpo de captura	BD 556969
Biotin rat anti-mouse IgA	Anticuerpo de detección	BD 556978
Streptavidin horseradish peroxidase	Anticuerpo de revelado	BD 554066
Trimethylbenzidine (TMB)	Sustrato para revelado	BD OptEIA 555214

7.6.5. Cultivo de explantes de íleon y colon

Los cultivos de tejidos provenientes de ratones se realizaron según el protocolo descrito por Gibson y col. (2008). Secciones de íleon y colon fueron cortadas en fragmentos de 1 cm de longitud y lavados tres veces en RPMI tejido frío (tabla M.4). Finalmente, se colocaron en placas de cultivo celular de 24 fosas con 1 mL de RPMI tejido (tabla M.4) y se incubaron en atmósfera controlada a 37°C durante 24 horas. Se recolectaron los sobrenadantes y se guardaron a -80°C hasta su análisis. En algunos ensayos, se adicionó LPS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) hasta una concentración final en medio de cultivo de 100 µg/mL (Dionne et al 2003; Chatelais et al 2011).

7.6.5.1. Cuantificación de citoquinas secretadas

Se cuantificó la concentración de citoquinas en sobrenadantes de explantes de colon e intestino delgado de animales sometidos a distintos tratamientos mediante ELISA de captura comercial (ELISA Ready Set Go!, eBioscience). En la tabla M.17, se indica la sensibilidad de cada uno de los kits utilizados.

Tabla M.17. Sensibilidad de los kits utilizados para la detección de citoquinas.

Citoquina	Sensibilidad	Citoquina	Sensibilidad
IL-4	4,0 pg/mL	IFN-γ	15,0 pg/mL
IL-6	4,0 pg/mL	GM-CSF	4,0 pg/mL
IL-10	30,0 pg/mL	TNF-α	8,0 pg/mL
IL-17A	30,0 pg/mL	TGF-β (humano y ratón)	8,0 pg/mL

7.6.6. Caracterización de microbiota

7.6.6.1. Cuantificación de poblaciones bacterianas en materia fecal (qPCR)

A continuación se muestra una tabla con los cebadores que se utilizaron para evaluar distintas poblaciones en materia fecal.

Tabla M.19. Cebadores utilizados para la determinación de la microbiota en materia fecal.

Cebador	Secuencias 5' - 3' (directo y reverso)	Referencia
Bacteria (HDA)	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC	(Walter et al 2000)
<i>Firmicutes</i>	GGAGYATGTGGTTTAAATTCGAAGCA AGCTGACGACAACCATGCAC	(Guo et al 2008)
<i>Lactobacillus</i> spp.	AGCAGTAGGGAATCTTCCA ATTYCACCGCTACACATG	(Walter et al 2000)
<i>Lactobacillus murinus</i>	GTGGCGAACGGGTGAGTAA GCACCTGTTTCCAAGTGTTATCC	(Deloris et al 2006)
Grupo <i>Lactobacillus acidophilus</i>^a	AGAGGTAGTAACTGGCCTTTA GCGGAAACCTCCCAACA	(Malinen et al 2003)
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	AGATGGCCTCGCGTCCGA CCGAAGACCTTCTTCCTCC	(Wang et al 1996)
<i>Enterococcus</i> spp.	CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT ACTCGTTGTACTTCCCAATTGT	(Rinttilä et al 2004)
<i>Lachnospiraceae</i>	CGGTACCTGACTAAGAAGC AGTTYATTCTTGCGAACG	(Corby-Harris et al 2007)
Grupo <i>Clostridium leptum</i>	GCACAAGCAGTGGAGT CTTCCTCCGTTTTGTCAA	(Matsuki et al 2004)
Grupo <i>Clostridium perfringens</i>	ATGCAAGTCGAGCGATG TATGCGGTATTAATCTTCCTTT	(Rinttilä et al 2004)
Grupo <i>Clostridium coccooides</i>	CGGTACCTGACTAAGAAGC CTTCCTCCGTTTTGTCAA	(Rinttilä et al 2004)
<i>Bacteroidetes</i>	GGARCATGTGGTTTAAATTCGATGAT AGCTGACGACAACCATGCAG	(Guo et al 2008)
Grupo <i>Bacteroides fragilis</i>	CTGAACCAGCCAAGTAGCG CCGCAAACCTTTCACAACTGACTTA	(Liu et al 2003)
<i>Prevotella</i> spp	CACCAAGGCGACGATCA GGATAACGCCYGGACCT	(Larsen et al 2010)
<i>Bifidobacterium</i> spp	TCGCGTCYGGTGTGAAAG CCACATCCAGCRTCCAC	(Rinttilä et al 2004)
<i>Segmented filamentous bacteria</i> (SFB)	GACGCTGAGGCATGAGAGCAT GACGGCACGGATTGTTATTCA	(Harley et al 2013)
<i>Akkermansia muciniphila</i>	CAGCACGTGAAGGTGGGGAC CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT	(Arbolea et al 2012)
<i>Enterobacteriaceae</i>	TGCCGTAACCTTCGGGAGAAGGCA TCAAGGCTCAATGTTCAAGTGC	(Matsuda et al 2007)
<i>Escherichia coli</i>	CATGCCGCGTGTATGAAGAA CGGGTAACGTCAATGAGCAAA	(Huijsdens et al 2002)

^a Especies amplificadas: *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. amylolyticus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* y *L. kefirii*; ^b Para obtener el valor de UFC/g de materia fecal, se multiplica por la dilución del ADN realizada para colocar 20 ng por tubo de reacción.

7.6.6.2. Análisis cualitativo de la microbiota mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

Para el análisis de la microbiota mediante DGGE, se extrajo ADN de muestras de materia fecal (MyM, sección 5.2) y se amplificó la región V2-V3 del gen del ARNr 16S utilizando los cebadores que se indican en la tabla M.18. La PCR se realizó en un volumen final de 75 μ L, conteniendo 50 ng de DNA, con las concentraciones de reactivos ya indicadas (MyM 5.3). El programa utilizado fue el siguiente: una desnaturalización inicial durante 4 min a 94°C, seguida de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 56°C, y 30 s a 72°C y una extensión final de 30 min a 72°C. En todos los casos, se incluyó un control negativo sin ADN, y los productos de PCR se chequearon en un gel de agarosa 1% p/v teñido con bromuro de etidio.

Tabla M.18. Cebadores utilizados para DGGE.

Cebador	Secuencias 5'--- 3'	Referencia
HDA1-GC	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	(Muyzer et al 1993)
HDA2	GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC	(Muyzer et al. 1993)

Esta técnica permite la separación de fragmentos de ADN en función del contenido y distribución C+G usando geles con gradiente desnaturizante. Se utilizó un gel conteniendo 8 % p/v de poliacrilamida con un rango desnaturizante entre 30 y 50% (100% de desnaturalización, solución 7 M de urea y 40% v/v de formamida). Se utilizó el sistema *Bio-Rad Model 475 gradient delivery system* (BioRad, Hercules, CA, USA) para el armado de los geles. La electroforesis se realizó utilizando TAE 0.5X (tabla M.21), la separación se realizó durante 5 horas a 60°C con una corriente constante de 125 mA. Luego de la electroforesis, los geles fueron teñidos durante 15 minutos en una solución de TAE 1X conteniendo bromuro de etidio a una concentración final de 10 mg/mL y visualizaron bajo luz U.V.

Para comparar los perfiles DGGE de distintos individuos se consideraron las bandas como caracteres y su presencia o ausencia como el estado de estos caracteres, utilizando el programa PyElph 1.4. La similitud entre perfiles se calculó mediante el coeficiente de Jaccard y el

agrupamiento se llevó a cabo mediante el método de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA) empleando el programa SYSTAT versión 12. Los resultados se presentaron en forma de dendrograma.

7.6.7. Cuantificación de expresión génica en mLN, PP, secciones de colon e íleon

Se extrajo ARN de los tejidos, se sintetizó el ADNc (MyM sección 5.1) y se comparó la expresión de genes entre los distintos grupos experimentales mediante PCR cuantitativa en tiempo real (MyM sección 5.4). En la tabla M.20, se indican todos los cebadores utilizados.

Tabla M.20. Cebadores utilizados para evaluar la expresión génica en tejidos de ratón.

Gen	Secuencias 5'-3' (directo y reverso)	Gen	
<i>actB</i>	GGCTGTATTCCCCTCCATCG CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	<i>ifng</i>	TGGCATAGATGTGGAAGAAAAGAG TGCAGGATTTTCATGTCCACAT
<i>b2-m</i>	ACCCGCCTCACATTGAAATCC CGATCCCAGTAGACGGTCTTG	<i>tnfa</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>hpert</i>	GTTAAGCAGTACAGCCCCAAA AGGGCATATCCAACAACAACTT	<i>tgfb</i>	CCGCAACAACGCCATCTATG CTCTGCACGGGACAGCAAT
<i>april</i>	CTTTCGGTTGCTCTTTGGTTG CGACAGCACAAAGTCACAGC	<i>muc1</i>	CTCACGGACGCTACGTGCC CCGCCAAAGCTGCCCAAGT
<i>baff</i>	CGACACGCCGACTATACGAAA CCTGTTTGCCTCACCCTATTT	<i>muc2</i>	ACCGCCTCACTCTGCCCAA TGCAGCCACTGCCCGTGATG
<i>pIgR</i>	CTATTGGTGTCTTACCAATGGTG CTGTTGCGTTCTGTGGCGT	<i>muc3</i>	CATGTCGACGCGGAGGTGGG TGTCGGGGCAGGGAGTGGAG
<i>cxcl-1</i>	CTGGGATTCACCTCAAGAACATC CAGGGTCAAGGCAAGCCTC	<i>muc4</i>	ACAATGCCCTCCACAAAAAGT GCTGTGTGTTGGCAATTTCTG
<i>gm-csf</i>	ATGCCTGTCACGTTGAATGA CCGTAGACCCTGCTCGAATA	<i>muc6</i>	ACATTGAAGCAAGAGTCTAAGGG GTGGTACTGTGGTCTCCGT
<i>il1b</i>	GCAACTGTTCCCTGAACTCAACT ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT	<i>muc13</i>	ACCTGGGCTGGACAGGCTGA AGCCCGCATGCACACACAA
<i>il6</i>	TAGTCCTTCCCTACCCCAATTTCC TTGGTCCCTTAGCCACTCCTTC	<i>occlu</i>	AGGAGTTAACGTCGTGGACCGG GGCAGGAATGCTGTCAITTTGCAG
<i>il10</i>	AGAAGCATGGCCCAGAAATCA GGCCTTGTAGACACCTTGGT	<i>zo-1</i>	ACCCGAACTGATGCTGTGGATAG AAATGGCCGGGCAGAACTTGTGTA
<i>il12p70</i>	GAGGTGGACTGACTCCCGA CAAGTCTTGGGCGGGTCTG	<i>rorgt</i>	ACCTCCACTGCCAGCTGTGTGCTGTC TCATTTCTGCACTTCTGCATGTAGAC
<i>il17a</i>	TTTAACTCCCTTGGCGCAAAA CTTCCCTCCGCATTGACAC	<i>foxp3</i>	GGCCCTTCTCCAGGACAGA GCTGATCATGGCTGGGTGT
<i>il23</i>	AGCAACTTCACACCTCCCTAC ACTGCTGACTAGAACTCAGGC		

8. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar en los casos en los que la distribución de los datos fue normal y para la evaluación estadística se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un post-test de Bonferroni de comparaciones múltiples, $\alpha = 0,05$. Para datos con distribución no normal, los resultados se expresaron mediante cajas en las que se indica la mediana y los valores mínimos y máximos obtenidos, la evaluación estadística se realizó con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y post-test de Dunns, $\alpha = 0,05$. Todos los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism, version 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA).

9. Buffers y soluciones generales

A menos que se indique, todos los buffers se prepararon en agua destilada y todas las sales y drogas generales empleadas fueron suministradas por Laboratorios Anedra (Argentina).

Tabla M.21. Soluciones buffer utilizadas.

Buffer fosfato salino (PBS)	Buffer Tris salino (TBS)	Buffer TE (5X)	Buffer TAE (50X)
9,0 g de NaCl 0,144 g de NaH ₂ PO ₄ 0,795 g de K ₂ HPO ₄	6,0 g de Tris-Base 5,9 g de NaCl	54,0 g Tris-Base 20 mL EDTA 0,5M 27,5 g Ácido bórico	242,0 g Tris-Base 100,0 mL EDTA 0,5M 57,1 mL ácido acético glacial
pH 7,2 \pm 0,1	pH 7,4 \pm 0,1	pH 8,0 \pm 0,1	pH 8,4 \pm 0,1
Volumen final 1000 mL			

- **Solución fisiológica:** 0,85 % p/v NaCl
- **T-PBS:** PBS suplementado con 0,05% v/v de Tween 20 (SIGMA, St. Louis, MO USA).
- **T-TBS:** TBS suplementado con 0,05% v/v de Tween 20.
- **Diluyente anticuerpos para ELISA y Dot-blot:** T-TBS suplementado con 10 % p/v de leche descremada en polvo (Svelty, Nestlé).
- **Diluyente anticuerpos para citometría (PBS-SFB):** T-PBS suplementado con 5 % v/v de suero fetal bovino (BIOSER, Argentina).

Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas

- Adimpong, D. B., Nielsen, D. S., Sørensen, K. I., Derkx, P. M. F., & Jespersen, L. (2012). Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. *BMC Microbiology*, *12*(1), 75–86. doi:10.1186/1471-2180-12-75
- Ahrne, S., & Hagslatt, M.-L. J. (2011). Effect of lactobacilli on paracellular permeability in the gut. *Nutrients*, *3*(1), 104–17. doi:10.3390/nu3010104
- Ammerman, N., Beier-Sexton, M., & Azad, A. (2008). Growth and maintenance of Vero cell lines. *Current Protocols in Microbiology, Appendix(4E)*, 1–10. doi:10.1002/9780471729259.mca04es11.
- Andrianifahanana, M., Moniaux, N., & Batra, S. K. (2006). Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1765*(2), 189–222. doi:10.1016/j.bbcan.2006.01.002
- Arboleya, S., Binetti, A., Salazar, N., Fernández, N., Solís, G., Hernández-Barranco, A., Gueimonde, M. (2012). Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiology Ecology*, *79*(3), 763–72. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01261.x
- Artis, D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Reviews. Immunology*, *8*(6), 411–20. doi:10.1038/nri2316
- Åvall-Jääskeläinen, S. (2003). Surface Display of the Receptor-Binding Region of the Lactobacillus brevis S-Layer Protein in *Lactococcus lactis* Provides Nonadhesive Lactococci with the Ability To Adhere to Intestinal Epithelial Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(4), 2230–2236. doi:10.1128/AEM.69.4.2230
- Ayeni, F. A., Sánchez, B., Adeniyi, B. A., Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., & Ruas-Madiedo, P. (2011). Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. *International Journal of Food Microbiology*, *147*(2), 97–104. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.014

- Bahrami, B., Macfarlane, S., & Macfarlane, G. T. (2011). Induction of cytokine formation by human intestinal bacteria in gut epithelial cell lines. *Journal of Applied Microbiology*, 110(1), 353–63. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04889.x
- Banco Nacional de ADN - Universidad de Salamanca. (2010). Extracción de PBMC a partir de sangre periférica. <http://www.bancoadn.org/documentacion/separacionPBMC.pdf>
- Banerjee, P., Merkel, G. J., & Bhunia, A. K. (2009). *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus B-30892 can inhibit cytotoxic effects and adhesion of pathogenic *Clostridium difficile* to Caco-2 cells. *Gut Pathogens*, 1(1), 8. doi:10.1186/1757-4749-1-8
- Bauer, H., Zweimueller-Mayer, J., Steinbacher, P., Lametschwandtner, A., & Bauer, H. C. (2010). The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 402593. doi:10.1155/2010/402593
- Baumgartner, A., Kueffer, M., Simmen, A., & Grand, M. (1998). Relatedness of *Lactobacillus rhamnosus* Strains Isolated from Clinical Specimens and Such from Food-stuffs, Humans and Technology. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 31(5), 489–494.
- Becker, S., Oelschlaeger, T. A., Wullaert, A., Pasparakis, M., Wehkamp, J., Stange, E. F., Vlantis, K. (2013). Bacteria regulate intestinal epithelial cell differentiation factors both *in vitro* and *in vivo*. *PloS One*, 8(2), e55620. doi:10.1371/journal.pone.0055620
- Beganović, J., Frece, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., & Sušković, J. (2011). Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(1), 43–53. doi:10.1007/s10482-011-9563-4
- Benavides, F., & Guénet, J. (2003a). Biología y manejo reproductivo del ratón. En Universidad De Alcala De Henares (Ed.), *Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones* (pp. 59–83).
- Benavides, F., & Guénet, J. (2003b). Las líneas genéticamente estandarizadas y los controles de la pureza genética. En Universidad De Alcala De Henares (Ed.), *Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones* (pp. 105–136).

- Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S., & Guéguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), 278–85. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015
- Bernasconi, E., Favre, L., Maillard, M. H., Bachmann, D., Pythoud, C., Bouzourene, H., Velin, D. (2010). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor elicits bone marrow-derived cells that promote efficient colonic mucosal healing. *Inflammatory Bowel Disease*, 16(3), 428–41. doi:10.1002/ibd.21072
- Berry, D., & Reinisch, W. (2013). Intestinal microbiota: a source of novel biomarkers in inflammatory bowel diseases? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27(1), 47–58. doi:10.1016/j.bpg.2013.03.005
- Berry, D., Schwab, C., Milinovich, G., Reichert, J., Ben Mahfoudh, K., Decker, T., Loy, A. (2012). Phylotype-level 16S rRNA analysis reveals new bacterial indicators of health state in acute murine colitis. *The ISME Journal*, 6(11), 2091–106. doi:10.1038/ismej.2012.39
- Bibiloni, R., Simon, M. A., Albright, C., Sartor, B., & Tannock, G. W. (2005). Analysis of the large bowel microbiota of colitic mice using PCR / DGGE. *Letters in Applied Microbiology*, 41(1), 45–51. doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01720.x
- Bolla, P. A. (2011). *Desarrollo de un alimento funcional deshidratado constituido por microorganismos aislados de kefir*.
- Bolla, P. A., Carasi, P., Bolla, M. D. L. A., De Antoni, G. L., & Serradell, M. D. L. A. (2013a). Protective effect of a mixture of kefir-isolated lactic acid bacteria and yeasts in a hamster model of *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*, 21, 28–33. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.03.010
- Bolla, P. A., Carasi, P., Serradell, M. D. L. A., De Antoni, G. L. (2013b). Kefir-isolated *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inhibits the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* *in vitro*. *Journal of Dairy Research*, 80(1), 96–102. doi:10.1017/S0022029912000623
- Bolla, P. A., Serradell, M. D. L. A., de Urraza, P. J., & De Antoni, G. L. (2011). Effect of freeze-drying on viability and *in vitro* probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *Journal of Dairy Research*, 78(1), 15–22. doi:10.1017/S0022029910000610

- Bosch, A., Golowczyc, M. A., Abraham, A., Garrote, G. L., De Antoni, G. L., & Yantorno, O. (2006). Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology*, 111(3), 280–7. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.010
- Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 382–98. doi:10.1128/CMR.00073-09
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>
- Brandtzaeg, P. (2011). The gut as communicator between environment and host: immunological consequences. *European Journal of Pharmacology*, 668 Suppl(0014), S16–32. doi:10.1016/j.ejphar.2011.07.006
- Buck, B., Altermann, E., Svingerud, T., & Klaenhammer, T. R. (2005). Functional Analysis of Putative Adhesion Factors in *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8344–8351. doi:10.1128/AEM.71.12.8344
- Burger-van Paassen, N., Vincent, A., Puiman, P. J., van der Sluis, M., Bouma, J., Boehm, G., Renes, I. B. (2009). The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *The Biochemical Journal*, 420(2), 211–9. doi:10.1042/BJ20082222
- Burke, K. E., & Lamont, J. T. (2014). *Clostridium difficile* Infection: A Worldwide Disease. *Gut and Liver*, 8(1), 1–6. doi:10.5009/gnl.2014.8.1.1
- Camilleri, M., Lasch, K., & Zhou, W. (2012). Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *American Journal of Physiology*, 303(7), G775–85. doi:10.1152/ajpgi.00155.2012
- Canadian Council on Animal Care. (1998). Choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing. In *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* (2° ed., p. 33). CCAC.

- Cani, P. D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Delzenne, N. M. (2009). Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, 58(8), 1091–103. doi:10.1136/gut.2008.165886
- Carasi, P., Trejo, F. M., Pérez, P. F., De Antoni, G. L., & Serradell, M. D. L. A. (2012). Surface proteins from *Lactobacillus kefir* antagonize in vitro cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxins. *Anaerobe*, 18(1), 135–42. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.11.002
- Carey, C. M., & Kostrzynska, M. (2013). Lactic acid bacteria and bifidobacteria attenuate the proinflammatory response in intestinal epithelial cells induced by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(1), 9–17. doi:10.1139/cjm-2012-0446
- Cario, E. (2008). Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2. *Mucosal Immunology*, 1 Suppl 1(11), S62–6. doi:10.1038/mi.2008.47
- Cario, E., Gerken, G., & Podolsky, D. K. (2004). Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology*, 127(1), 224–238. doi:10.1053/j.gastro.2004.04.015
- Cario, E., & Podolsky, D. K. (2005). Intestinal epithelial TOLLerance versus inTOLLerance of commensals. *Molecular Immunology*, 42(8), 887–93. doi:10.1016/j.molimm.2004.12.002
- Carraway, K. L., Theodoropoulos, G., Kozloski, G. A., & Carothers Carraway, C. A. (2009). Muc4/MUC4 functions and regulation in cancer. *Future Oncology*, 5(10), 1631–40. doi:10.2217/fon.09.125
- Casado Muñoz, M. D. C., Benomar, N., Lerma, L. L., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2014). Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 110–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.025
- Caselli, M., Holton, J., Boldrini, P., Vaira, D., & Calò, G. (2010). Morphology of segmented filamentous bacteria and their patterns of contact with the follicle-associated epithelium of the

- mouse terminal ileum: implications for the relationship with the immune system. *Gut Microbes*, 1(6), 367–72. doi:10.4161/gmic.1.6.14390
- Castagliuolo, I., Riegler, M. F., Valenick, L., LaMont, J. T., & Pothoulakis, C. (1999). *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infection and Immunity*, 67(1), 302–7.
 - Castellazzi, A M., Valsecchi, C., Montagna, L., Malfa, P., Ciprandi, G., Avanzini, M. A., & Marseglia, G. L. (2007). *In vitro* activation of mononuclear cells by two probiotics: *Lactobacillus paracasei* I 1688, *Lactobacillus salivarius* I 1794, and their mixture (PSMIX). *Immunological Investigations*, 36(4), 413–21. doi:10.1080/08820130701361160
 - Ceuppens, S., Rajkovic, A., Heyndrickx, M., Tsilia, V., Van De Wiele, T., Boon, N., & Uyttendaele, M. (2011). Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(3), 188–213. doi:10.3109/1040841X.2011.558832
 - Chandran, A., Duary, R. K., Grover, S., & Batish, V. K. (2013). Relative expression of bacterial and host specific genes associated with probiotic survival and viability in the mice gut fed with *Lactobacillus plantarum* Lp91. *Microbiological Research*, 168(9), 555–62. doi:10.1016/j.micres.2013.04.010
 - Chang, Y.-C., Tsai, C.-Y., Lin, C.-F., Wang, Y.-C., Wang, I.-K., & Chung, T.-C. (2011). Characterization of tetracycline resistance lactobacilli isolated from swine intestines at western area of Taiwan. *Anaerobe*, 17(5), 239–45. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.08.001
 - Charles River Laboratories. (2014). Swiss Webster. [http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/swiss-webster-\(cfw\)-mouse](http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/swiss-webster-(cfw)-mouse)
 - Chatelais, L., Jamin, A., Gras-Le Guen, C., Lallès, J.-P., Le Huërou-Luron, I., & Boudry, G. (2011). The level of protein in milk formula modifies ileal sensitivity to LPS later in life in a piglet model. *PLoS One*, 6(5), e19594. doi:10.1371/journal.pone.0019594
 - Chen, H.-C., Wang, S.-Y., & Chen, M.-J. (2008). Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*, 25(3), 492–501. doi:10.1016/j.fm.2008.01.003

- Chen, X., Xu, J., Shuai, J., Chen, J., Zhang, Z., & Fang, W. (2007). The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 307–312. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.007
- Chen, Y. P., Hsiao, P. J., Hong, W. S., Dai, T. Y., & Chen, M. J. (2012). *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 isolated from milk kefir grains ameliorates experimental colitis in vitro and in vivo. *Journal of Dairy Science*, 95(1), 63–74. doi:10.3168/jds.2011-4696
- Chow, J., Tang, H., & Mazmanian, S. K. (2011). Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Current Opinion in Immunology*, 23(4), 473–80. doi:10.1016/j.coi.2011.07.010
- 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 & Food Research*, 55(10), 1441–53. doi:10.1002/mnfr.201100139
- Collado, M. C., Isolauri, E., & Salminen, S. (2008). Specific probiotic strains and their combinations counteract adhesion of *Enterobacter sakazakii* to intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, 285(1), 58–64. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01211.x
- Consejo Canadiense de Protección de los Animales. (1998). Control del dolor animal en la investigación, la enseñanza y pruebas. In L. Estol & R. Dugas (Eds.), *Manual sobre cuidado y uso de animales de experimentación* (2nd ed., Vol. 1, pp. 193–213). Ottawa, Ontario, Canada: Consejo Canadiense de Protección de los Animales.
- Conway, P. L., Welin, A., & Cohen, P. S. (1990). Presence of K88-specific receptors in porcine ileal mucus is age dependent. *Infection and Immunity*, 58(10), 3178–82.
- Cooper, J. A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of Cell Biology*, 105(4), 1473–8.
- Corby-Harris, V., Pontaroli, A. C., Shimkets, L. J., Bennetzen, J. L., Habel, K. E., & Promislow, D. E. L. (2007). Geographical distribution and diversity of bacteria associated with

- natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), 3470–9. doi:10.1128/AEM.02120-06
- Corr, S. C., Palsson-McDermott, E. M., Grishina, I., Barry, S. P., Aviello, G., Bernard, N. J., O'Neill, L. A. J. (2014). MyD88 adaptor-like (Mal) functions in the epithelial barrier and contributes to intestinal integrity via protein kinase C. *Mucosal Immunology*, 7(1), 57–67. doi:10.1038/mi.2013.24
 - Corridoni, D., Pastorelli, L., Mattioli, B., Locovei, S., Ishikawa, D., Arseneau, K. O., Pizarro, T. T. (2012). Probiotic bacteria regulate intestinal epithelial permeability in experimental ileitis by a TNF-dependent mechanism. *PLoS One*, 7(7), e42067. doi:10.1371/journal.pone.0042067
 - Corthésy, B., Gaskins, H., & Mercenier, A. (2007). Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *The Journal of Nutrition, Effects of*, 781–790. Retrieved from <http://jn.nutrition.org/content/137/3/781S>
 - Cosmi, L., Maggi, L., Santarlasci, V., Liotta, F., & Annunziato, F. (2013). T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry*. doi:10.1002/cyto.a.22348
 - Cua, D. J., & Tato, C. M. (2010). Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 10(7), 479–89. doi:10.1038/nri2800
 - Däbritz, J. (2014). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor and the intestinal innate immune cell homeostasis in Crohn's disease. *American Journal of Physiology*, 306(6), G455–65. doi:10.1152/ajpgi.00409.2013
 - Daniel, C., Poiret, S., Goudercourt, D., Dennin, V., Leyer, G., & Pot, B. (2006). Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5799–805. doi:10.1128/AEM.00109-06
 - Danielsen, M., & Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82(1), 1–11.
 - De Moreno de LeBlanc, A., Dogi, C. A., Galdeano, C. M., Carmuega, E., Weill, R., & Perdígón, G. (2008). Effect of the administration of a fermented milk containing *Lactobacillus casei*

- DN-114001 on intestinal microbiota and gut associated immune cells of nursing mice and after weaning until immune maturity. *Immunology*, 9, 27. doi:10.1186/1471-2172-9-27
- De Roock, S., van Elk, M., Hoekstra, M. O., Prakken, B. J., Rijkers, G. T., & de Kleer, I. M. (2011). Gut derived lactic acid bacteria induce strain specific CD4(+) T cell responses in human PBMC. *Clinical Nutrition*, 30(6), 845–51. doi:10.1016/j.clnu.2011.05.005
 - Deepika, G., & Charalampopoulos, D. (2010). Surface and adhesion properties of lactobacilli. In *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 70, pp. 127–52). doi:10.1016/S0065-2164(10)70004-6
 - Delfederico, L., Hollmann, A., Martínez, M., Iglesias, N. G., De Antoni, G. L., & Semorile, L. (2005). Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 72, 1–8.
 - Deloris, A., Orcutt, R., Henry, J., Baker, J., Bissahoyo, A., & Threadgill, D. (2006). Quantitative PCR assays for mouse enteric flora reveal strain-dependent differences in composition that are influenced by the microenvironment. *Mammalian Genome*, 17(11), 1093–1104.
 - DeVoss, J., & Diehl, L. (2014). Murine models of inflammatory bowel disease (IBD): challenges of modeling human disease. *Toxicologic Pathology*, 42(1), 99–110. doi:10.1177/0192623313509729
 - Dharmani, P., Leung, P., & Chadee, K. (2011). Tumor necrosis factor- α and Muc2 mucin play major roles in disease onset and progression in dextran sodium sulphate-induced colitis. *PloS One*, 6(9), e25058. doi:10.1371/journal.pone.0025058
 - Dicks, L. M. T., & Botes, M. (2010). Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. *Beneficial Microbes*, 1(1), 11–29. doi:10.3920/BM2009.0012
 - Dionne, S., Laberge, S., Deslandres, C., & Seidman, E. G. (2003). Modulation of cytokine release from colonic explants by bacterial antigens in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 133(1), 108–114.

- Dong, H., Rowland, I., & Yaqoob, P. (2012). Comparative effects of six probiotic strains on immune function *in vitro*. *The British Journal of Nutrition*, 108(3), 459–70. doi:10.1017/S0007114511005824
- Drouault-Holowacz, S., Foligné, B., Dennin, V., Goudercourt, D., Terpend, K., Burckel, A., & Pot, B. (2006). Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement Lactibiane Tolérance: *in vitro* and *in vivo* considerations. *Clinical Nutrition*, 25(6), 994–1003. doi:10.1016/j.clnu.2006.03.006
- Duary, R. K., Bhausheb, M. A., Batish, V. K., & Grover, S. (2012). Anti-inflammatory and immunomodulatory efficacy of indigenous probiotic *Lactobacillus plantarum* Lp91 in colitis mouse model. *Molecular Biology Reports*, 39(4), 4765–75. doi:10.1007/s11033-011-1269-1
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Collins, J. K. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 Suppl), 386S–392S.
- Dušková, M., Šedo, O., Kšicová, K., Zdráhal, Z., & Karpíšková, R. (2012). Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *International Journal of Food Microbiology*, 159(2), 107–14. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.029
- Edelman, S. M., Lehti, T. A., Kainulainen, V., Antikainen, J., Kylväjä, R., Baumann, M., Korhonen, T. K. (2012). Identification of a high-molecular-mass *Lactobacillus* epithelium adhesin (LEA) of *Lactobacillus crispatus* ST1 that binds to stratified squamous epithelium. *Microbiology*, 158(Pt 7), 1713–22. doi:10.1099/mic.0.057216-0
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Food, E., & Authority, S. (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10(6), 1–10. doi:10.2903/j.efsa.2012.2740.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2012). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2012 update). *EFSA Journal*, 10(12), 3020. doi:10.2903/j.efsa.2012.3020.

- Egea, L., Hirata, Y., & Kagnoff, M. F. (2010). GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 4(6), 723–31. doi:10.1586/egh.10.73
- Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the Bradford protein assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (38), 1–6. doi:10.3791/1918
- Ettoreiki, C., Gadonna-Widehem, P., Mangin, I., Coëffier, M., Delayre-Orthez, C., & Anton, P. M. (2012). Juvenile ferric iron prevents microbiota dysbiosis and colitis in adult rodents. *World Journal of Gastroenterology*, 18(21), 2619–29. doi:10.3748/wjg.v18.i21.2619
- Evrard, B., Coudeyras, S., Dosgilbert, A., Charbonnel, N., Alamé, J., Tridon, A., & Forestier, C. (2011). Dose-dependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *PloS One*, 6(4), e18735. doi:10.1371/journal.pone.0018735
- FAO/WHO. (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. FAO/WHO (pp. 1–11).
- Farnworth, E. E. R. (2005). Kefir—A complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin*, 2(1), 1–17. doi:10.1616/1476-2137.13938.
- Feighery, L. M., Smith, P., O'Mahony, L., Fallon, P. G., & Brayden, D. J. (2008). Effects of *Lactobacillus salivarius* 433118 on intestinal inflammation, immunity status and in vitro colon function in two mouse models of inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 53(9), 2495–506. doi:10.1007/s10620-007-0157-y
- Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S., Pot, B. (2007). Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology*, 13(2), 236–43.
- Foligné, B., Nutten, S., Steidler, L., Dennin, V., Goudercourt, D., Mercenier, A., & Pot, B. (2006). Recommendations for improved use of the murine TNBS-induced colitis model in evaluating anti-inflammatory properties of lactic acid bacteria: technical and microbiological aspects. *Digestive Diseases and Sciences*, 51(2), 390–400. doi:10.1007/s10620-006-3143-x
- Fournier, B. M., & Parkos, C. A. (2012). The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunology*, 5(4), 354–66. doi:10.1038/mi.2012.24

- Fradiani, P. A., Petrucca, A., Ascenzioni, F., Di Nucci, G., Teggi, A., Bilancini, S., & Cipriani, P. (2010). Endocarditis caused by *Lactobacillus jensenii* in an immunocompetent patient. *Journal of Medical Microbiology*, 59(Pt 5), 607–9. doi:10.1099/jmm.0.017764-0
- Franco, M. C., Golowczyc, M. A., De Antoni, G. L., Pérez, P. F., Humen, M., & Serradell, M. D. L. A. (2013). Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection. *Journal of Medical Microbiology*, 62(Pt 12), 1815–22. doi:10.1099/jmm.0.068064-0
- Frece, J., Kos, B., Svetec, I. K., Zgaga, Z., Beganović, J., Lebos, A., & Susković, J. (2009). Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice. *Journal of Dairy Research*, 76(1), 98–104. doi:10.1017/S0022029908003737
- Frece, J., Kos, B., Svetec, I. K., Zgaga, Z., Mrsa, V., & Susković, J. (2005). Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 98(2), 285–92. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02473.x
- Fuentes, S., Egert, M., Jiménez-Valera, M., Ramos-Cormenzana, A., Ruiz-Bravo, A., Smidt, H., & Monteoliva-Sanchez, M. (2008). Administration of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* affects the diversity of murine intestinal lactobacilli, but not the overall bacterial community structure. *Research in Microbiology*, 159(4), 237–243. doi:10.1016/j.resmic.2008.02.005
- Fung, T. C., Artis, D., & Sonnenberg, G. F. (2014). Anatomical localization of commensal bacteria in immune cell homeostasis and disease. *Immunological Reviews*, 260(1), 35–49. doi:10.1111/imr.12186
- Gabelloni, M. L., Trevani, A. S., Sabatté, J., & Geffner, J. (2013). Mechanisms regulating neutrophil survival and cell death. *Seminars in Immunopathology*, 35(4), 423–37. doi:10.1007/s00281-013-0364-x
- Garrote, G. (2000). *Bacterias y levaduras para la industria alimentaria: Kefir*.
- Garrote, G., Abraham, A., & de Antoni, G. (2000). Inhibitory power of Kefir: the role of organic acids. *Journal of Food Protection*, 63(3), 364–369.

- Garrote, G., Abraham, A., & De Antoni, G. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 68(4), 639–52. doi:10.1017/S0022029901005210
- Garrote, G., Delfederico, L., Bibiloni, R., Abraham, A., Fernando Perez, P., Semorile, L., & De Antoni, G. (2004). Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins. *Journal of Dairy Research*, 71(2), 222–230. doi:10.1017/S0022029904000160
- Garrote, G., Serradell, M. D. L. A., Abraham, A., Añon, M. C., Fossati, C., & De Antoni, G. (2005). Development of an immunochemical method to detect *Lactobacillus kefir*. *Food and Agricultural Immunology*, 16(3), 221–233. doi:10.1080/09540100500244146
- Gaudana, S. B., Dhanani, A. S., & Bagchi, T. (2010). Probiotic attributes of *Lactobacillus* strains isolated from food and of human origin. *The British Journal of Nutrition*, 103(11), 1620–8. doi:10.1017/S0007114509993643
- Gaudier, E., Michel, C., Segain, J., Cherbut, C., & Hoebler, C. (2005). The VSL# 3 probiotic mixture modifies microflora but does not heal chronic dextran-sodium sulfate-induced colitis or reinforce the mucus barrier in mice. *Journal of Nutrition*, 135(12), 2753–2761.
- Gerbino, E., Carasi, P., Tymczyszyn, E. E., & Gómez-Zavaglia, A. (2014). Removal of cadmium by *Lactobacillus kefir* as a protective tool against toxicity. *Journal of Dairy Research*, 81(3), 280–287. doi:10.1017/S0022029914000314
- Gerbino, E., Mobili, P., Tymczyszyn, E. E., Frausto-Reyes, C., Araujo-Andrade, C., & Gómez-Zavaglia, A. (2012). Use of Raman spectroscopy and chemometrics for the quantification of metal ions attached to *Lactobacillus kefir*. *Journal of Applied Microbiology*, 112(2), 363–71. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05210.x
- Gerbino, E., Mobili, P., Tymczyszyn, E., Fausto, R., & Gómez-Zavaglia, A. (2011). FTIR spectroscopy structural analysis of the interaction between *Lactobacillus kefir* S-layers and metal ions. *Journal of Molecular Structure*, 987(1-3), 186–192. doi:10.1016/j.molstruc.2010.12.012
- Gibson, D. L., Ma, C., Rosenberger, C. M., Bergstrom, K. S. B., Valdez, Y., Huang, J. T., Vallance, B. A. (2008). Toll-like receptor 2 plays a critical role in maintaining mucosal integrity

- during *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Cellular Microbiology*, 10(2), 388–403.
doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01052.x
- Golowczyc, M. (2008). *Caracterización taxonómica, probiótica y tecnológica de lactobacilos aislados de kefir*.
 - Golowczyc, M., Gugliada, M. J., Hollmann, A., Delfederico, L., Garrote, G. L., Abraham, A., De Antoni, G. (2008). Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic. *Journal of Dairy Research*, 75(2), 211–7.
doi:10.1017/S0022029908003117
 - Golowczyc, M., Mobili, P., Garrote, G. L., Abraham, A., & De Antoni, G. L. (2007). Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 118(3), 264–73.
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.042
 - Golowczyc, M., Mobili, P., Garrote, G. L., Serradell, M. D. L. A., Abraham, A., & De Antoni, G. L. (2009). Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins. *Journal of Dairy Research*, 76(1), 111–6. doi:10.1017/S0022029908003749
 - Golowczyc, M., Mobili, P., Serradell, M. D. L. A., Garrote, G., Abraham, A., & De Antoni, G. L. (2004). *Lactobacillus kefir*, un microorganismo con potencialidad probiótica. In *Simposio Internacional de Biotecnología. Aplicaciones en Alimentos, salud y Medio Ambiente - II Simposio Argentino-Italiano de Bacterias Lácticas*. San Miguel de Tucumán.
 - Golowczyc, M., Silva, J., Abraham, A., De Antoni, G. L., & Teixeira, P. (2010). Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 7–12.
doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02759.x
 - Golowczyc, M., Silva, J., Teixeira, P., De Antoni, G. L., & Abraham, A. (2011). Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 556–60.
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.005

- Gómez Zavaglia, A., Kociubinski, G., Pérez, P., Disalvo, E., De Antoni, G., & Pe, P. (2002). Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 93(5), 794–9.
- Goto, Y., & Ivanov, I. (2013). Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal–host immune crosstalk. *Immunology and Cell Biology*, 91(3), 204–214. doi:10.1038/icb.2012.80.
- Gouriet, F., Million, M., Henri, M., Fournier, P.-E., & Raoult, D. (2012). *Lactobacillus rhamnosus* bacteremia: an emerging clinical entity. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(9), 2469–80. doi:10.1007/s10096-012-1599-5
- Gram, H. (1884). Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten: in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte Der Medicin*, 2, 185–189.
- Granato, D., Bergonzelli, G., Pridmore, R. D., Marvin, L., Rouvet, M., & Corthésy-Theulaz, I. (2004). Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infection and Immunity*, 72(4), 2160–2169. doi:10.1128/IAI.72.4.2160
- Grimoud, J., Durand, H., Courtin, C., Monsan, P., Ouarné, F., Theodorou, V., & Roques, C. (2010). *In vitro* screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe*, 16(5), 493–500. doi:10.1016/j.anaerobe.2010.07.005
- Gu, C., Wu, L., & Li, X. (2013a). IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. *Cytokine*, 64(2), 477–85. doi:10.1016/j.cyto.2013.07.022
- Gu, S., Chen, D., Zhang, J.-N., Lv, X., Wang, K., Duan, L.-P., Wu, X.-L. (2013b). Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract. *PLoS One*, 8(10), e74957. doi:10.1371/journal.pone.0074957
- Gueimonde, M., Sánchez, B., G de Los Reyes-Gavilán, C., & Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4(7), 202–207. doi:10.3389/fmicb.2013.00202
- Guo, X., Xia, X., Tang, R., Zhou, J., Zhao, H., & Wang, K. (2008). Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify

- intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology*, 47(5), 367–73. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02408.x
- Hakansson, A., & Molin, G. (2011). Gut microbiota and inflammation. *Nutrients*, 3(6), 637–82. doi:10.3390/nu3060637
 - Hall, L. J., Faivre, E., Quinlan, A., Shanahan, F., Nally, K., & Melgar, S. (2011). Induction and activation of adaptive immune populations during acute and chronic phases of a murine model of experimental colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 56(1), 79–89. doi:10.1007/s10620-010-1240-3
 - Haller, D., Bode, C., Hammes, W. P., Pfeifer, A. M. A., Schi, E. J. V, Blum, S., & Schiffrin, E. J. (2000). Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut*, 47(1), 79–87. doi:10.1136/gut.47.1.79
 - Hardy, H., Harris, J., Lyon, E., Beal, J., & Foey, A. D. (2013). Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients*, 5(6), 1869–912. doi:10.3390/nu5061869
 - Harley, I. T. W., Giles, D. A., Pfluger, P. T., Burgess, S. L., Walters, S., Hembree, J., Tscho, M. H. (2013). Differential colonization with segmented filamentous bacteria and *Lactobacillus murinus* do not drive divergent development of diet-induced obesity in C57BL / 6 mice. *Molecular Metabolism*, 2(5), 171–183. doi:10.1016/j.molmet.2013.04.004
 - Hashimoto, K., Shimizu, M., & Sciences, N. (1993). Epithelial properties of human intestinal Caco-2 cells cultured in a serum-free medium. *Cytotechnology*, 13(3), 175–184. doi:10.1007/BF00749813
 - Helwig, U., Lammers, K. M., Rizzello, F., Brigidi, P., Rohleder, V., Caramelli, E., Campieri, M. (2006). Lactobacilli, bifidobacteria and *E. coli* nissle induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. *World Journal of Gastroenterology*, 12(37), 5978–86.
 - Hemarajata, P., & Versalovic, J. (2013). Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6(1), 39–51. doi:10.1177/1756283X12459294

- Henriksson, A., & Conway, P. L. (1996). Adhesion of *Lactobacillus fermentum* 104-S to porcine stomach mucus. *Current Microbiology*, 33(1), 31–4.
- Hessle, C., Hanson, L. A., & Wold, A. E. (1999). Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clinical and Experimental Immunology*, 116(2), 276–82.
- Heunis, T., Deane, S., Smit, S., & Dicks, L. M. T. (2014). Proteomic Profiling of the Acid Stress Response in *Lactobacillus plantarum* 423. *Journal of Proteome Research*, 13(9), 4028–39. doi:10.1021/pr500353x
- Hoebler, C., Gaudier, E., De Coppet, P., Rival, M., & Cherbut, C. (2006). MUC genes are differently expressed during onset and maintenance of inflammation in dextran sodium sulfate-treated mice. *Digestive Diseases and Sciences*, 51(2), 381–9. doi:10.1007/s10620-006-3142-y
- Hold, G. L., Smith, M., Grange, C., Watt, E. R., El-Omar, E. M., & Mukhopadhy, I. (2014). Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years? *World Journal of Gastroenterology*, 20(5), 1192–1210. doi:10.3748/wjg.v20.i5.1192
- Honda K. & Littman D. R. (2012). The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annual Review of Immunology*, m, 759–95. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074937
- Hong, W.-S., Chen, H.-C., Chen, Y.-P., & Chen, M.-J. (2009). Effects of kefir supernatant and lactic acid bacteria isolated from kefir grain on cytokine production by macrophage. *International Dairy Journal*, 19(4), 244–251. doi:10.1016/j.idairyj.2008.10.010
- Hooper, L. V, & Macpherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews. Immunology*, 10(3), 159–69. doi:10.1038/nri2710
- Hove, T. ten, Blink, B. van den, Pronk, I., Drillenburger, P., Peppelenbosch, M. P., & van Deventer, S. J. H. (2002). Dichotomal role of inhibition of p38 MAPK with SB 203580 in experimental colitis. *Gut*, 50, 507–513.
- Howarth, G. S., & Wang, H. (2013). Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. *Nutrients*, 5(1), 58–81. doi:10.3390/nu5010058

- Hugo, 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), 613–9. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02363.x
- Huijsdens, X. W., Linskens, R. K., Meuwissen, S. G. M., Vandenbroucke-graels, C. M. J. E., & Savelkoul, P. H. M. (2002). Quantification of Bacteria Adherent to Gastrointestinal Mucosa by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12), 4423–4427. doi:10.1128/JCM.40.12.4423
- Humen, M., de Antoni, G., Benyacoub, J., Costas, M., Cardozo, M., Kozubsky, L., Perez, P. (2005). *Lactobacillus johnsonii* La1 antagonizes *Giardia intestinalis* in vivo. *Infection and Immunity*, 73(2), 1265–1269. doi:10.1128/IAI.73.2.1265
- Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. A. P. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 730–9. doi:10.1128/AEM.02105-06
- Hynönen, U., & Westerlund-Wikström, B. (2002). Identification by flagellum display of an epithelial cell-and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *Journal of Bacteriology*, 184(12), 3360–3367. doi:10.1128/JB.184.12.3360
- International Organization for Standardization. (2010). *ISO 10932:2010 - Milk and milk products - Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB). ISO 10932/IDF 233 standard* (Vol. 2010, p. 38).
- Ivanov, I. I., & Honda, K. (2012). Intestinal commensal microbes as immune modulators. *Cell Host & Microbe*, 12(4), 496–508. doi:10.1016/j.chom.2012.09.009
- Jack, R. W., Tagg, J. R., & Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59(2), 171–200.
- Jäger A. & Kuchroo V. K. (2010). Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scandinavian Journal of Immunology*, 72(3), 173–84. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02432.x
- Jakava-Viljanen, M., & Palva, A. (2007). Isolation of surface (S) layer protein carrying *Lactobacillus* species from porcine intestine and faeces and characterization of their adhesion

- properties to different host tissues. *Veterinary Microbiology*, 124, 264–273.
doi:10.1016/j.vetmic.2007.04.029
- Jeon S. G., Kayama, H., Ueda, Y., Takahashi, T., Asahara, T., Tsuji, H., Takeda, K. (2012). Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathogens*, 8(5), e1002714.. doi: 10.1371/journal.ppat.1002714
 - Jiang, H., Przybyszewski, J., Mitra, D., Becker, C., Brehm-stecher, B., Tentinger, A., & Macdonald, R. S. (2011). Soy Protein Diet, but Not *Lactobacillus rhamnosus* GG, Decreases Mucin-1, Trefoil Factor-3, and Tumor Necrosis Factor- α in Colon of Dextran Sodium Sulfate-Treated C57BL/6 mice. *The Journal of Nutrition*, 141(7), 1239–1246.
doi:10.3945/jn.110.137414.alterations
 - Johansson, M., Molin, G., Pettersson, B., Uhlén, M., & Ahrné, S. (1995). Characterization and species recognition of *Lactobacillus plantarum* strains by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the 16S rRNA gene. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 536–541.
 - Johansson, M. E. V, Gustafsson, J. K., Sjöberg, K. E., Petersson, J., Holm, L., Sjövall, H., & Hansson, G. C. (2010). Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PLoS One*, 5(8), e12238. doi:10.1371/journal.pone.0012238
 - Johnson-Henry, K. C., Hagen, K. E., Gordonpour, M., Tompkins, T. A., & Sherman, P. M. (2007). Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 9(2), 356–67.
doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00791.x
 - Kaji, R., Kiyoshima-Shibata, J., Nagaoka, M., Nanno, M., & Shida, K. (2010). Bacterial teichoic acids reverse predominant IL-12 production induced by certain *Lactobacillus* strains into predominant IL-10 production via TLR2-dependent ERK activation in macrophages. *Journal of Immunology*, 184(7), 3505–13. doi:10.4049/jimmunol.0901569
 - Kakisu, E., Abraham, A., Farinati, C. T., Ibarra, C., & De Antoni, G. L. (2013a). *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir protects vero cells from cytotoxicity by type-II shiga toxin from

- Escherichia coli* O157:H7. *The Journal of Dairy Research*, 80(1), 64–71.
doi:10.1017/S0022029912000659
- Kakisu, E., Bolla, P., Abraham, A., de Urraza, P., & De Antoni, G. L. (2013b). *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir: Protection of cultured Hep-2 cells against *Shigella* invasion. *International Dairy Journal*, 33(1), 22–26. doi:10.1016/j.idairyj.2013.06.004
 - Kakisu, E. J., Abraham, A., Pérez, P. F., & De Antoni, G. L. (2007). Inhibition of *Bacillus cereus* in milk fermented with kefir grains. *Journal of Food Protection*, 70(11), 2613–6.
 - Kaktcham, P. M., Zambou, N. F., Tchouanguep, F. M., El-Soda, M., & Choudhary, M. I. (2012). Antimicrobial and Safety Properties of Lactobacilli Isolated from two Cameroonian Traditional Fermented Foods. *Scientia Pharmaceutica*, 80(1), 189–203. doi:10.3797/scipharm.1107-12
 - Kamada, N., Chen, G. Y. Y., Inohara, N., & Núñez, G. (2013a). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature Immunology*, 14(7), 685–90. doi:10.1038/ni.2608
 - Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G. Y., & Núñez, G. (2013b). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews. Immunology*, 13(5), 321–35. doi:10.1038/nri3430
 - Karczewski, J., Troost, F. J. F., Konings, I., Dekker, J., Kleerebezem, M., Brummer, R.-J. M., & Wells, J. M. (2010). Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* *in vivo* and protective effects on the epithelial barrier. *American Journal of Physiology*, 298(6), G851–9. doi:10.1152/ajpgi.00327.2009
 - Kawashima, T., Hayashi, K., Kosaka, A., Kawashima, M., Igarashi, T., Tsutsui, H., Obata, A. (2011). *Lactobacillus plantarum* strain YU from fermented foods activates Th1 and protective immune responses. *International Immunopharmacology*, 11(12), 2017–24. doi:10.1016/j.intimp.2011.08.013
 - Kayama, H., & Takeda, K. (2012). Regulation of intestinal homeostasis by innate and adaptive immunity. *International Immunology*, 24(11), 673–80. doi:10.1093/intimm/dxs094

- Kekkonen, R.-A., Lummela, N., Karjalainen, H., Latvala, S., Tynkkynen, S., Jarvenpaa, S., Korpela, R. (2008). Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World Journal of Gastroenterology*, 14(13), 2029–36.
- Kelly, D., & Mulder, I. E. (2012). Microbiome and immunological interactions. *Nutrition Reviews*, 70(Suppl 1), S18–30. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00498.x
- Kesmen, Z., & Kacmaz, N. (2011). Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture-independent methods. *Journal of Food Science*, 76(5), M276–83. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02191.x
- Kim, J., Choi, Y., & Ji, G. (2008). Effect of oral probiotics (*Bifidobacterium lactis* AD011 and *Lactobacillus acidophilus* AD031) administration on ovalbumin-induced food allergy mouse model. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(8), 1393–1400.
- Kim, Y. S., & Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports*, 12(5), 319–30. doi:10.1007/s11894-010-0131-2
- Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R. J., & Bron, P. A. (2010). The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), 199–230. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00208.x
- Konstantinov, S. R., Smidt, H., de Vos, W. M., Bruijns, S. C. M., Singh, S. K., Valence, F., van Kooyk, Y. (2008). S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *PNAS*, 105(49), 19474–9. doi:10.1073/pnas.0810305105
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(8), 680–685.
- Land, M. H., Rouster-Stevens, K., Woods, C. R., Cannon, M. L., Cnota, J., & Shetty, A. K. (2005). *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics*, 115(1), 178–81. doi:10.1542/peds.2004-2137

- Langford, D. J., Bailey, A. L., Chanda, M. L., Clarke, S. E., Drummond, T. E., Echols, S., Mogil, J. S. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, 7(6), 447–9. doi:10.1038/nmeth.1455
- Larsen, N., Vogensen, F. K., van den Berg, F. W. J., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K., Jakobsen, M. (2010). Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PloS One*, 5(2), e9085. doi:10.1371/journal.pone.0009085
- 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), 728–64. doi:10.1128/MMBR.00017-08
- Lee, D. Y., Seo, Y.-S., Rayamajhi, N., Kang, M. L., Lee, S. I., & Yoo, H. S. (2009). Isolation, characterization, and evaluation of wild isolates of *Lactobacillus reuteri* from pig feces. *Journal of Microbiology*, 47(6), 663–72. doi:10.1007/s12275-009-0124-8
- Lee, Y. K., Lim, C. Y., Teng, W. L., Ouwehand, A.CC., Tuomola, E. M., & Salminen, S. (2000). Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3692–7.
- Lennon, G., Balfe, A., Earley, H., Devane, L. A., Lavelle, A., Winter, D. C., O’Connell, P. R. (2014). Influences of the colonic microbiome on the mucous gel layer in ulcerative colitis. *Gut Microbes*, 5(3), 277–285. doi:10.4161/gmic.28793
- Lindén, S. K., Florin, T. H. J., & McGuckin, M. A. (2008). Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. *PloS One*, 3(12), e3952. doi:10.1371/journal.pone.0003952
- Linden, S. K., Sutton, P., Karlsson, N. G., Korolik, V., & McGuckin, M. A. (2008). Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunology*, 1(3), 183–97. doi:10.1038/mi.2008.5
- Liu, C., Song, Y., McTeague, M., Vu, A. W., Wexler, H., & Finegold, S. M. (2003). Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers. *FEMS Microbiology Letters*, 222(1), 9–16. doi:10.1016/S0378-1097(03)00296-9

- Liu, H.-Y., Xu, W.-T., Yuan, Y.-F., Cao, S.-S., He, X.-Y., Li, S.-Y., Luo, Y.-B. (2012). The effect of genetically modified *Lactobacillus plantarum* 590 on the gut health of Sprague-Dawley rats. *IUBMB Life*, 64(7), 617–27. doi:10.1002/iub.1027
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Londero, A. (2012). *Alimentos funcionales: obtención de un producto probiótico para aves a partir de suero de quesería fermentado con microorganismos de kefir*. Universidad Nacional de La Plata.
- Londero, A., Abraham, A., Gomez Zavaglia, A., Illanes Frontaura, A., León Pelaez, A., Serna Cataño, C. A., Carasi, P. (2009). Aprovechamiento integral de efluentes de quesería para la elaboración y preservación de probióticos. In *Agroindustria para o MERCOSUL* (pp. 91–115). Brasilia.
- Londero, A., Quinta, R., Abraham, A., Sereno, R., De Antoni, G., & Garrote, G. L. (2011). Inhibitory activity of cheese whey fermented with kefir grains. *Journal of Food Protection*, 74(1), 94–100. doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-121
- López, P., González-Rodríguez, I., Gueimonde, M., Margolles, A., & Suárez, A. (2011). Immune response to *Bifidobacterium bifidum* strains support Treg/Th17 plasticity. *PLoS One*, 6(9), e24776. doi:10.1371/journal.pone.0024776
- Machado, A., Leite, D. O., Antonio, M., Miguel, L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Paschoalin, V. M. F. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 341–9. doi:10.1590/S1517-83822013000200001
- Macherey-Nagel. (2011). *Genomic DNA from soil - NucleoSpin Soil DNA Kit* (p. 25).
- Mack, D., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., Hollingsworth, M., & Ahrné, S. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*, 52, 827–833.

- Mack, D., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., & Hollingsworth, M. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. *American Journal of Physiology*, 276(4 Pt 1), G941–950.
- Mackenzie, D. A., Jeffers, F., Parker, M. L., Vibert-Vallet, A., Bongaerts, R. J., Roos, S., Juge, N. (2010). Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology*, 156(Pt 11), 3368–78. doi:10.1099/mic.0.043265-0
- Macpherson, A. J., Geuking, M. B., & McCoy, K. D. (2012). Homeland security: IgA immunity at the frontiers of the body. *Trends in Immunology*, 33(4), 160–7. doi:10.1016/j.it.2012.02.002
- Magalhães, K. T., de M Pereira, G. V, Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2010). Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 26(7), 1241–50. doi:10.1007/s11274-009-0294-x
- Magombedze, G., Reddy, P. B. J., Eda, S., & Ganusov, V. V. (2013). Cellular and population plasticity of helper CD4(+) T cell responses. *Frontiers in Physiology*, 4(8), 206. doi:10.3389/fphys.2013.00206
- Mainville, I., Arcand, Y., & Farnworth, E. R. (2005). A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 99(3), 287–96. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.020
- Mainville, I., Robert, N., Lee, B., & Farnworth, E. R. (2006). Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(1), 59–68. doi:10.1016/j.syapm.2005.07.001
- Malinen, E., Kassinen, A., Rinttilä, T., & Palva, A. (2003). Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*, 149(1), 269–277. doi:10.1099/mic.0.25975-0
- Manns, J. (2011). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of Proteins. *Current Protocols in Microbiology*, Appendix 3, 1–13. doi:10.1002/9780471729259.mca03ms22

- Mantis, N. J., Rol, N., & Corthésy, B. (2011). Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunology*, 4(6), 603–11. doi:10.1038/mi.2011.41
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus strains* isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16(3), 189–199. doi:10.1016/j.idairyj.2005.02.009
- Martín, R., Sánchez, B., Suárez, J. E., & Urdaci, M. C. (2012). Characterization of the adherence properties of human Lactobacilli strains to be used as vaginal probiotics. *FEMS Microbiology Letters*, 328(2), 166–73. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02495.x
- Matsuda, K., Tsuji, H., Asahara, T., Kado, Y., & Nomoto, K. (2007). Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 32–9. doi:10.1128/AEM.01224-06
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., & Takada, T. (2004). Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Human Feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7220–7228. doi:10.1128/AEM.70.12.7220
- Mattar, A. F., Teitelbaum, D. H., Drongowski, R. A., Yongyi, F., Harmon, C. M., & Coran, A. G. (2002). Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatric Surgery International*, 18(7), 586–90. doi:10.1007/s00383-002-0855-7
- Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489(7415), 231–41. doi:10.1038/nature11551
- McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P., & Florin, T. H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(4), 265–78. doi:10.1038/nrmicro2538
- Medrano, M., Pérez, P. F., & Abraham, A. (2008). Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2), 1–7. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.046

- Mennigen, R., Nolte, K., Rijcken, E., Utech, M., Loeffler, B., Senninger, N., & Bruewer, M. (2009). Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(5), G1140–9. doi:10.1152/ajpgi.90534.2008
- Miettinen, M., Vuopio-Varkila, J., & Varkila, K. (1996). Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infection and Immunity*, 64(12), 5403–5405.
- Mileti, E., Matteoli, G., Iliev, I. D., & Rescigno, M. (2009). Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of Lactobacilli using complex culture systems: prediction for *in vivo* efficacy. *PloS One*, 4(9), e7056. doi:10.1371/journal.pone.0007056
- Minnaard, J., Humen, M., & Pérez, P. F. (2001). Effect of *Bacillus cereus* Exocellular Factors on Human Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Food Protection*, 64(10), 1535–1541.
- Minnaard, J., Liévin-Le Moal, V., Coconnier, M.-H., Servin, A. L., & Pérez, P. F. (2004). Disassembly of F-actin cytoskeleton after interaction of *Bacillus cereus* with fully differentiated human intestinal Caco-2 cells. *Infection and Immunity*, 72(5), 3106–3112. doi:10.1128/IAI.72.5.3106
- Moal, V. L.-L., & Servin, A. (2006). The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), 315–337. doi:10.1128/CMR.19.2.315
- Mobili, P., Londero, A., Maria, T. M. R., Eusébio, M. E. S., De Antoni, G. L., Fausto, R., & Gómez-Zavaglia, A. (2009a). Characterization of S-layer proteins of *Lactobacillus* by FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Vibrational Spectroscopy*, 50(1), 68–77. doi:10.1016/j.vibspec.2008.07.016
- Mobili, P., Serradell, M. D. L. A., Trejo, S. A., Avilés Puigvert, F. X., Abraham, A., & De Antoni, G. L. (2009b). Heterogeneity of S-layer proteins from aggregating and non-aggregating *Lactobacillus kefir* strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 95(4), 363–72. doi:10.1007/s10482-009-9322-y

- Mourad, K., & Nour-Eddine, K. (2006). *In vitro* preselection criteria for probiotic *Lactobacillus plantarum* strains of fermented olives origin. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 1(1), 27–32.
- Mukai, T., Arihara, K., & Itoh, H. (1992). Lectin-like activity of *Lactobacillus acidophilus* strain JCM 1026. *FEMS Microbiology Letters*, 77(1-3), 71–4.
- Muñoz-Provencio, D., Llopis, M., Antolín, M., de Torres, I., Guarner, F., Pérez-Martínez, G., & Monedero, V. (2009). Adhesion properties of *Lactobacillus casei* strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix. *Archives of Microbiology*, 191(2), 153–61. doi:10.1007/s00203-008-0436-9
- Muyzer, G., de Waal, E., & Uitierlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700.
- Nanda Kumar, N. S., Balamurugan, R., Jayakanthan, K., Pulimood, A., Pugazhendhi, S., & Ramakrishna, B. S. (2008). Probiotic administration alters the gut flora and attenuates colitis in mice administered dextran sodium sulfate. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 23(12), 1834–1839. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05723.x
- Nawaz, M., Wang, J., Zhou, A., Ma, C., Wu, X., Moore, J. E., Xu, J. (2011). Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Current Microbiology*, 62(3), 1081–9. doi:10.1007/s00284-010-9856-2
- Neilson, J. W., Jordan, F. L., & Maier, R. M. (2013). Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 92(3), 256–63. doi:10.1016/j.mimet.2012.12.021
- Neish, A. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136(1), 65–80. doi:10.1053/j.gastro.2008.10.080.
- Nikolic, M., López, P., Strahinic, I., Suárez, A., Kojic, M., Fernández-García, M., Ruas-Madiedo, P. (2012). Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus*

- paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 158(2), 155–62. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.015
- Nitzan, O., Elias, M., Chazan, B., Raz, R., & Saliba, W. (2013). *Clostridium difficile* and inflammatory bowel disease: role in pathogenesis and implications in treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 19(43), 7577–85. doi:10.3748/wjg.v19.i43.7577
 - Ohkusa, T., Yoshida, T., Sato, N., Watanabe, S., Tajiri, H., & Okayasu, I. (2009). Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion: a possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis. *Journal of Medical Microbiology*, 58(Pt 5), 535–45. doi:10.1099/jmm.0.005801-0
 - Ohland, C. L., & Macnaughton, W. K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(6), G807–19. doi:10.1152/ajpgi.00243.2009
 - Olivares, M., Díaz-Ropero, M. P., Martín, R., Rodríguez, J. M., & Xaus, J. (2006). Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101(1), 72–9. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02981.x
 - Ouwehand, A. C., Tölkö, S., Kulmala, J., Salminen, S., & Salminen, E. (2000). Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*, 31(1), 82–6.
 - Ouwerkerk, J. P., de Vos, W. M., & Belzer, C. (2013). Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27(1), 25–38. doi:10.1016/j.bpg.2013.03.001
 - Pabst, O., & Mowat, A. M. (2012). Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunology*, 5(3), 232–9. doi:10.1038/mi.2012.4
 - Perše, M., & Cerar, A. (2012). Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, 718617. doi:10.1155/2012/718617
 - Peters, I. R., Calvert, E. L., Hall, E. J., & Day, M. J. (2004). Measurement of Immunoglobulin Concentrations in the Feces of Healthy Dogs. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(5), 841–848. doi:10.1128/CDLI.11.5.841

- Pochard, P., Gosset, P., Grangette, C., Andre, C., Tonnel, A.-B., Pestel, J., & Mercenier, A. (2002). Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110(4), 617–623. doi:10.1067/mai.2002.128528
- Polysciences Inc. (2007). Periodic Acid Schiff's Stain Kit (PAS). (p. 2).
- Ponder, A., & Long, M. D. (2013). A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. *Clinical Epidemiology*, 5, 237–47. doi:10.2147/CLEP.S33961
- Pretzer, G., Snel, J., Molenaar, D., Wiersma, A., Bron, P. A., Lambert, J., Kleerebezem, M. (2005). Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, 187(17), 6128–6136.
- Prophet, E., Mills, B., Arrington, J., & Sobin, L. (1995). *Métodos Histotecnológicos* (p. 279p). Washington, DC: Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP).
- Qiagen. (2006). *RNAlater Handbook* (p. 20p). <http://www.qiagen.com/>
- Qiagen. (2010). *RNeasy Mini Handbook* (Cuarta Edi., p. 78p). <http://www.qiagen.com/>
- Quigley, E. M. M. (2011). Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(6), 593–603. doi:10.1016/j.coph.2011.09.010
- Rescigno, M. (2011). The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends in Immunology*, 32(6), 256–64. doi:10.1016/j.it.2011.04.003
- Rescigno, M. (2013). Mucosal immunology and bacterial handling in the intestine. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27(1), 17–24. doi:10.1016/j.bpg.2013.03.004
- Rinttilä, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L., & Palva, A. (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 97(6), 1166–77. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x
- Roberts, L. M., McCahon, D., Holder, R., Wilson, S., & Hobbs, F. D. R. (2013). A randomised controlled trial of a probiotic “functional food” in the management of irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterology*, 13(1), 45. doi:10.1186/1471-230X-13-45

- Roda, G., Sartini, A., Zambon, E., Calafiore, A., Marocchi, M., Caponi, A., Roda, E. (2010). Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 16(34), 4264. doi:10.3748/wjg.v16.i34.4264
- Rojas, M., Ascencio, F., & Conway, P. (2002). Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2330–2336.
- Romanin, D., Serradell, M. D. L. A., 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), 102–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.014
- Rose, W. A., Sakamoto, K., & Leifer, C. A. (2012). Multifunctional role of dextran sulfate sodium for *in vivo* modeling of intestinal diseases. *BMC Immunology*, 13(1), 41. doi:10.1186/1471-2172-13-41
- Ruas-Madiedo, P., Medrano, M., Salazar, N., De Los Reyes-Gavilán, C. G., Pérez, P. F., & Abraham, A. (2010). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate *in vitro* the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells. *Journal of Applied Microbiology*, 109(6), 2079–86. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04839.x
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M. J., Casquete, R., Serradilla, M. J., & Córdoba, M. D. G. (2009). Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science*, 83(3), 460–7. doi:10.1016/j.meatsci.2009.06.027
- Rupa, P., & Mine, Y. (2012). Recent advances in the role of probiotics in human inflammation and gut health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(34), 8249–56. doi:10.1021/jf301903t
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., & Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 1–16. doi:10.1016/j.lwt.2012.05.014

- Sainte-Marie, G. (1962). a Paraffin Embedding Technique for Studies Employing Immunofluorescence. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 10(3), 250–256. doi:10.1177/10.3.250
- Saleh, M., & Elson, C. O. (2011). Experimental inflammatory bowel disease: insights into the host-microbiota dialog. *Immunity*, 34(3), 293–302. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.008
- Santarlasci, V., Cosmi, L., Maggi, L., Liotta, F., & Annunziato, F. (2013). IL-1 and T Helper Immune Responses. *Frontiers in Immunology*, 4(July), 182. doi:10.3389/fimmu.2013.00182
- Sára, M., & Sleytr, U. (2000). S-layer proteins. *Journal of Bacteriology*, 182(4), 859–868.
- Schär-Zammaretti, P., Dillmann, M., D'Amico, N. D., Affolter, M., & Ubbink, J. (2005). Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8165–8173. doi:10.1128/AEM.71.12.8165
- Schillinger, U., & Lücke, F. K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 1901–6.
- Schuster, B., & Sleytr, U. B. (2009). Composite S-layer lipid structures. *Journal of Structural Biology*, 168(1), 207–16. doi:10.1016/j.jsb.2009.03.004
- Schwab, C., Berry, D., Rauch, I., Rennisch, I., Ramesmayer, J., Hainzl, E., Urich, T. (2014). Longitudinal study of murine microbiota activity and interactions with the host during acute inflammation and recovery. *The ISME Journal*, 8(5), 1101–14. doi:10.1038/ismej.2013.223
- Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca. (2011). Artículo 1389.
- Sekirov, I., Russell, S., Antunes, caetano M., & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*, 90, 859–904. doi:10.1152/physrev.00045.2009.
- Sekot, G., Posch, G., Messner, P., Matejka, M., Rausch-Fan, X., Andrukhov, O., & Schäffer, C. (2011). Potential of the *Tannerella forsythia* S-layer to delay the immune response. *Journal of Dental Research*, 90(1), 109–14. doi:10.1177/0022034510384622

- Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., & Roy, N. C. (2013). The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators of Inflammation*, 2013, 237921. doi:10.1155/2013/237921
- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4), 405–40. doi:10.1016/j.femsre.2004.01.003
- Shazali, N., Foo, H. L., Loh, T. C., Choe, D. W., & Abdul Rahim, R. (2014). Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from the faeces of broiler chicken in Malaysia. *Gut Pathogens*, 6(1), 1. doi:10.1186/1757-4749-6-1
- Sheng, Y. H., Hasnain, S. Z., Florin, T. H. J., & McGuckin, M. A. (2012). Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27(1), 28–38. doi:10.1111/j.1440-1746.2011.06909.x
- Simrén, M., Barbara, G., Flint, H. J., Spiegel, B. M. R., Spiller, R. C., Vanner, S., Zoetendal, E. G. (2013). Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut*, 62(1), 159–76. doi:10.1136/gutjnl-2012-302167
- Singh, V., Singh, K., Amdekar, S., Singh, D. D., Tripathi, P., Sharma, G. L., & Yadav, H. (2009). Innate and specific gut-associated immunity and microbial interference. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 55(1), 6–12. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00497.x
- Sleytr, U. B., & Beveridge, T. J. (1999). Bacterial S-layers. *Trends in Microbiology*, 7(6), 253–60.
- Sleytr, U. B., Egelseer, E. M., Ilk, N., Pum, D., & Schuster, B. (2007). S-Layers as a basic building block in a molecular construction kit. *The FEBS Journal*, 274(2), 323–334. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05606.x
- Smelt, M. J., de Haan, B. J., Bron, P. A., van Swam, I., Meijerink, M., Wells, J. M., ... de Vos, P. (2013). Probiotics can generate FoxP3⁺ T-cell responses in the small intestine and simultaneously inducing CD4 and CD8 T cell activation in the large intestine. *PloS One*, 8(7), e68952. doi:10.1371/journal.pone.0068952
- Smelt, M. J., de Haan, B. J., Bron, P. A., van Swam, I., Meijerink, M., Wells, J. M., de Vos, P. (2013). The impact of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 teichoic acid D-alanylation on the generation

- of effector and regulatory T-cells in healthy mice. *PloS One*, 8(4), e63099. doi:10.1371/journal.pone.0063099
- Smith, A., & Hussey, M. (2005). Gram Stain Protocol.
 - Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., Langella, P. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43), 16731–6. doi:10.1073/pnas.0804812105
 - Suárez-García, I., Sánchez-García, A., Soler, L., Malmierca, E., & Gómez-Cerezo, J. (2012). *Lactobacillus jensenii* bacteremia and endocarditis after dilatation and curettage: case report and literature review. *Infection*, 40(2), 219–22. doi:10.1007/s15010-011-0182-9
 - Tallon, R., Arias, S., Bressollier, P., & Urdaci, M. C. (2007). Strain- and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), 442–51. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03086.x
 - Tarang, S., Kumar, S., & Batra, S. (2012). Mucins and Toll-like receptors: kith and kin in infection and cancer. *Cancer Letters*, 321(2), 110–119. doi:10.1016/j.canlet.2012.01.040
 - Thermo Scientific. (2012). Maxima Reverse Transcriptase.
 - Thirabunyanon, M., Boonprasom, P., & Niamsup, P. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnology Letters*, 31(4), 571–6. doi:10.1007/s10529-008-9902-3
 - Thomas, F., Hehemann, J.-H., Rebuffet, E., Czjzek, M., & Michel, G. (2011). Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. *Frontiers in Microbiology*, 2(May), 93. doi:10.3389/fmicb.2011.00093
 - Thoreux, K., & Schmucker, D. L. (2001). Nutrition and Aging Kefir Milk Enhances Intestinal Immunity in Young but Not Old Rats. *The Journal of Nutrition*, 131(3), 807–812.
 - Toh, Z. Q., Anzela, A., Tang, M. L. K., & Licciardi, P. V. (2012). Probiotic therapy as a novel approach for allergic disease. *Frontiers in Pharmacology*, 3(September), 171. doi:10.3389/fphar.2012.00171

- Trejo, F., Minnaard, J., Perez, P. F., & De Antoni, G. L. (2006). Inhibition of *Clostridium difficile* growth and adhesion to enterocytes by *Bifidobacterium* supernatants. *Anaerobe*, 12, 186–193. doi:10.1016/j.anaerobe.2006.03.004
- Trejo, F., Pérez, P., & Antoni, G. De. (2010). Co-culture with potentially probiotic microorganisms antagonises virulence factors of *Clostridium difficile* *in vitro*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98, 19–29. doi:10.1007/s10482-010-9424-6
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., & Salminen, S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 Suppl), 393S–398S.
- Turco, L., Catone, T., Caloni, F., Di Consiglio, E., Testai, E., & Stammati, A. (2011). Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: how reliable is this *in vitro* model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicology In Vitro*, 25(1), 13–20. doi:10.1016/j.tiv.2010.08.009
- Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(11), 799–809. doi:10.1038/nri2653
- Turpin, W., Humblot, C., Noordine, M.-L., Thomas, M., & Guyot, J.-P. (2012). *Lactobacillaceae* and cell adhesion: genomic and functional screening. *PloS One*, 7(5), e38034. doi:10.1371/journal.pone.0038034
- Turróni, F., Serafini, F., Foroni, E., Duranti, S., O'Connell Motherway, M., Taverniti, V., ... Ventura, M. (2013). Role of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in modulating bacterium-host interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(27), 11151–6. doi:10.1073/pnas.1303897110
- Valatas, V., Vakas, M., & Kolios, G. (2013). The value of experimental models of colitis in predicting efficacy of biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastrointestinal and Liver Physiology*, 305(11), G763–85. doi:10.1152/ajpgi.00004.2013
- Van Tassell, M. L., & Miller, M. J. (2011). *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients*, 3(5), 613–36. doi:10.3390/nu3050613

- Vanhooren, V., Vandenbroucke, R. E., Dewaele, S., Van Hamme, E., Haigh, J. J., Hocheplied, T., & Libert, C. (2013). Mice Overexpressing β -1,4-Galactosyltransferase I Are Resistant to TNF-Induced Inflammation and DSS-Induced Colitis. *PLoS One*, 8(12), e79883. doi:10.1371/journal.pone.0079883
- Vélez, M. P., De Keersmaecker, S. C. J., & Vanderleyden, J. (2007). Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters*, 276(2), 140–8. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00908.x
- Vesterlund, S., Vankerckhoven, V., Saxelin, M., Goossens, H., Salminen, S., & Ouwehand, A. C. (2007). Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 116(3), 325–31. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.002
- Vinderola, G., Duarte, J., Thangavel, D., Perdigón, G., Farnworth, E., & Matar, C. (2005). Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research*, 72(2), 195–202. doi:10.1017/S0022029905000828
- Vinderola, G., Matar, C., Palacios, J., & Perdigón, G. (2007). Mucosal immunomodulation by the non-bacterial fraction of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389. *International Journal of Food Microbiology*, 115(2), 180–6. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.020
- Vinderola, G., Perdigon, G., Duarte, J., Thangavel, D., Farnworth, E., & Matar, C. (2006). Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology*, 211(3), 149–56. doi:10.1016/j.imbio.2005.08.005
- Vitali, B., Minervini, G., Rizzello, C. G., Spisni, E., Maccaferri, S., Brigidi, P., ... Di Cagno, R. (2012). Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. *Food Microbiology*, 31(1), 116–25. doi:10.1016/j.fm.2011.12.027
- Vizoso Pinto, M. (2006). *Molecular and physiological studies on the functionality of probiotic lactobacilli*.
- Voskuil, M., & Chambliss, G. (1993). Rapid isolation and sequencing of purified plasmid DNA from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 1138–1142.

- Vuyst, L. De, & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194–199. doi:10.1159/000104752
- Walter, J., Tannock, G. W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D. M., Munro, K., & Alatossava, T. (2000). Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 297–303.
- Wang, B., Li, J., Li, Q., Zhang, H., & Li, N. (2009). Isolation of adhesive strains and evaluation of the colonization and immune response by *Lactobacillus plantarum* L2 in the rat gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 132(1), 59–66. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.016
- Wang, B., Wei, H., Yuan, J., Li, Q., Li, Y., Li, N., & Li, J. (2008). Identification of a surface protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 that adheres to porcine gastric mucin and human enterocyte-like HT-29 cells. *Current Microbiology*, 57, 33–38.
- Wang, R. F., Cao, W. W., & Cerniglia, C. E. (1996). Phylogenetic Analysis of *Fusobacterium prausnitzii* Based upon s rRNA Gene Sequence and PCR Confirmation. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1), 341–343.
- Wang, R.-Q., & Fang, D.-C. (2003). Alterations of MUC1 and MUC3 expression in gastric carcinoma: relevance to patient clinicopathological features. *Journal of Clinical Pathology*, 56(5), 378–385.
- Wang, X.-Q., Duan, X.-M., Liu, L.-H., Fang, Y.-Q., & Tan, Y. (2005). Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester Fluorescent Dye for Cell Labeling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(6), 379–385. doi:10.1111/j.1745-7270.2005.00051.x
- Wells, J. M. (2011). Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microbial Cell Factories*, 10(Suppl 1), S17. doi:10.1186/1475-2859-10-S1-S17
- Wu, C., He, G., & Zhang, J. (2014). Physiological and proteomic analysis of *Lactobacillus casei* in response to acid adaptation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(10), 1533–40. doi:10.1007/s10295-014-1487-3

- Xu, Y., Hunt, N. H., & Bao, S. (2008). The role of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor in acute intestinal inflammation. *Cell Research*, 18(12), 1220–9. doi:10.1038/cr.2008.310
- Ya, T., Zhang, Q., Chu, F., Merritt, J., Bilige, M., Sun, T., Zhang, H. (2008). Immunological evaluation of *Lactobacillus casei* Zhang: a newly isolated strain from koumiss in Inner Mongolia, China. *BMC Immunology*, 9, 68. doi:10.1186/1471-2172-9-68
- Yu, L. C.-H., Wang, J.-T., Wei, S.-C., & Ni, Y.-H. (2012). Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World Journal of Gastroenterology*, 3(1), 27–43. doi:10.4291/wjgp.v3.i1.27
- Zacharof, M. P., & Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia*, 2, 50–56. doi:10.1016/j.apcbee.2012.06.010
- Zakostelska, Z., Kverka, M., Klimesova, K., Rossmann, P., Mrazek, J., Kopečný, J., ... Tlaskalova-Hogenova, H. (2011). Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. *PloS One*, 6(11), e27961. doi:10.1371/journal.pone.0027961
- Zhang, L., Xu, Y.-Q., Liu, H.-Y., Lai, T., Ma, J.-L., Wang, J.-F., & Zhu, Y.-H. (2010). Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG using an *Escherichia coli* K88 model of piglet diarrhoea: Effects on diarrhoea incidence, faecal microflora and immune responses. *Veterinary Microbiology*, 141(1-2), 142–8. doi:10.1016/j.vetmic.2009.09.003
- Zheng, Y., Lu, Y., Wang, J., Yang, L., Pan, C., & Huang, Y. (2013). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan kefir grains. *PloS One*, 8(7), e69868. doi:10.1371/journal.pone.0069868
- Zhou, F.-X., Chen, L., Liu, X.-W., Ouyang, C.-H., Wu, X.-P., Wang, X.-H., Lu, F.-G. (2012). *Lactobacillus crispatus* M206119 exacerbates murine DSS-colitis by interfering with inflammatory responses. *World Journal of Gastroenterology*, 18(19), 2344–56. doi:10.3748/wjg.v18.i19.2344
- Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Dewulf, J., Pot, B., & Grangette, C. (2009). Differential crosstalk between epithelial cells, dendritic cells and bacteria in a co-culture model. *International Journal of Food Microbiology*, 131(1), 40–51. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.037

- Zygmunt, B., & Veldhoen, M. (2011). T helper cell differentiation more than just cytokines. In *Advances in Immunology* (1st ed., Vol. 109, pp. 159–96). Elsevier inc. doi:10.1016/B978-0-12-387664-5.00005-4

ANEXO

Secuenciación del gen de capa S de

L. kefiri: estudios *in silico* e *in vitro*

Secuenciación del gen de capa S de *L. kefir*

estudios *in silico* e *in vitro*

En general, las propiedades funcionales que los microorganismos ejercen, dependen de la interacción de moléculas de la superficie microbiana con el epitelio del tracto digestivo, incluyendo la espesa capa de mucus que lo recubre. La capacidad de los lactobacilos de adherirse al epitelio y tejidos subepiteliales, es clave para la colonización y persistencia en el tracto gastrointestinal (TGI). Si bien se han caracterizado una gran variedad de moléculas capaces de mediar la adhesión específica para bacterias patógenas, el conocimiento en este campo para el caso de *Lactobacillus* es aún limitado. Una de las estructuras superficiales proteicas cuya participación en los procesos de adhesión ha sido descrita, es la que se denomina capa S (Sára and Sleytr 2000; Hynönen and Palva 2013).

En los últimos años nuestro grupo de investigación ha trabajado en la caracterización de las propiedades probióticas y potencialidad tecnológica de bacterias lácticas y levaduras aisladas a partir de leche fermentada con gránulos de kefir. En particular, en este trabajo de tesis, se estudiaron cepas de *Lactobacillus kefir*. La caracterización estructural y funcional de proteínas de capa S de *L. kefir*, glicoproteínas de superficie descritas por primera vez en esta especie por Garrote y col. (2004), constituye un pilar fundamental para profundizar el conocimiento acerca de los mecanismos de acción probiótica de *L. kefir*.

La capa-S es una estructura cristalina macromolecular bidimensional formada por subunidades (glico)-proteicas cuya presencia se ha descrito en numerosas especies de *Bacteria* y *Archaea* (Sára and Sleytr 2000; Pavkov-Keller et al 2011). Su estructura está formada por subunidades proteicas unidas entre sí mediante uniones no covalentes y por tal motivo éstas pueden ser fácilmente liberadas y solubilizadas mediante tratamientos con agentes que rompen uniones de hidrógeno y agentes quelantes, o por cambios de pH y fuerza iónica. El análisis electroforético ha demostrado que las subunidades poseen un peso molecular aparente de 40 a

200 kDa, siendo las del género *Lactobacillus*, relativamente pequeñas (entre 25 y 71 kDa) (Pavkov-Keller et al 2011).

Diversos estudios han demostrado que existe una gran heterogeneidad en la secuencia aminoacídica entre proteínas de capa S de diferentes especies bacterianas, incluso dentro del mismo género (Hynönen and Palva 2013). Se han clonado y secuenciado los genes que codifican para las proteínas de capa S de diferentes especies de lactobacilos (*L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. crispatus*) (Waśko et al 2014). Asimismo, si bien la presencia de dos genes codificantes en la misma cepa parece ser una característica frecuente dentro del género *Lactobacillus*, dichas proteínas no son expresadas simultáneamente de manera eficiente (Sun et al 2013). Dentro de la secuencia primaria de las proteínas de capa S de lactobacilos, se ha demostrado la presencia de al menos dos dominios estructurales. Uno de ellos media el autoensamblado y la adherencia del microorganismo a diferentes superficies, mientras que el otro sería el responsable de anclar las subunidades de capa S a la envoltura celular (Åvall-Jääskeläinen et al 2003). Hasta el momento, estas regiones han sido caracterizadas en cepas de *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. brevis* y *L. hilgardii* (Hynönen and Palva 2013).

Estudios recientes revelan la importancia de la glicosilación en la superficie bacteriana para la adhesión y formación de biofilms, y la persistencia y adaptación en el TGI (Denou et al 2008; Lebeer et al 2008). La glicosilación es una de las modificaciones post-traduccionales más frecuentes en estas proteínas, aunque la mayoría de las proteínas de capa-S de lactobacilos se han reportado como no glicosiladas. En este sentido, hasta el presente se ha descrito únicamente la estructura de azúcares de proteínas de capa S de cepas de *L. buchneri* (Anzengruber et al 2014), y se ha demostrado que las proteínas de capa S de *L. kefir* también están glicosiladas (Mobili et al 2009).

Dado que la capa S constituye la estructura superficial más externa de los microorganismos que la poseen, representa una importante interfase entre la bacteria y su entorno. Si bien las funciones más importantes de la capa S se han relacionado con el mantenimiento de la forma celular y su participación en la adhesión microbiana a diferentes superficies (mucus, células

intestinales, colágeno, fibronectina, etc) (Vélez et al 2007; Sengupta et al 2013), se le han atribuido otras funciones biológicas relevantes tales como: la participación en la interacción con otros microorganismos (Golowcycz et al 2009; Beganović et al 2011); la protección contra patógenos (Martínez et al 2012; Xue et al 2013); la modulación de la expresión de mediadores del sistema inmune por células dendríticas y linfocitos T (Konstantinov et al 2008; Sekot et al 2011); y el secuestro de metales (Mobili et al 2013).

El hecho de que las proteínas de capa S comúnmente representen entre el 10 y el 15% de las proteínas total de la célula bacteriana, implica que su expresión y secreción es altamente eficiente. El aumento en la expresión de proteínas de capa S en diferentes condiciones de estrés, tales como bajo suministro proteico, presencia de sales biliares o antibióticos, ha sido reportado en cepas de *L. acidophilus* (Schär-Zammaretti et al 2005; Khaleghi et al 2010; Khaleghi et al 2011). Asimismo, en ensayos llevados a cabo con diferentes especies de lactobacilos, se ha descrito que la presencia de capa S disminuye la susceptibilidad frente a jugos gástricos y pancreáticos (Frece et al 2005). Estas observaciones sugieren que la presencia de capa S podría resultar en una ventaja, desde el punto de vista tecnológico, para aquellos microorganismos que la poseen.

Por otro lado, las propiedades estructurales y fisicoquímicas particulares, en combinación con la capacidad de auto-ensamblado, convierten a las proteínas de capa S en una estructura orgánica única con altísimo potencial de aplicación en diferentes áreas de la nanobiotecnología. Entre ellas se pueden mencionar la generación de vehículos GRAS para la administración de antígenos y otras moléculas de importancia biomédica, el desarrollo de reactivos en fase sólida como biocatalizadores, dispositivos diagnósticos, biosensores, etc (Sleytr et al 2007). El constante aumento en el conocimiento sobre la estructura y la biología de las proteínas de capa S de *Lactobacillus*, así como el desarrollo de herramientas para manipular genéticamente estos microorganismos, allanará el camino hacia la aplicación nanobiotecnológica de las proteínas de capa S de estas bacterias con propiedades benéficas para la salud.

Las proteínas de capa S de *L. kefir* están glicosiladas, presentan diferentes PM relativos por SDS-PAGE (66, 69 y 71 kDa), y han mostrado una gran heterogeneidad entre ellas mediante

estudios de espectrometría de masas (MALDI-TOF) (Mobili et al 2009). Desde el punto de vista funcional, se ha demostrado que las proteínas de capa S de *L. kefir* son capaces de inhibir la adhesión e invasión de *Salmonella* Enteritidis a células Caco-2 (Golowczyc et al 2007) y de antagonizar la acción citotóxica de las toxinas de *Clostridium difficile* sobre células Vero (Carasi et al 2012). Por otro lado, mediante una actividad tipo lectina, median la co-agregación de *L. kefir* con levaduras del género *Saccharomyces* aisladas de kefir (Golowczyc et al 2009), y modulan la adhesión de los lactobacilos al mucus gástrico, intestinal y colónico (Carasi et al 2014). Se ha observado que las proteínas de capa S se adhieren también a colágeno tipo I y actualmente, se encuentran en desarrollo estudios sobre su capacidad adyuvante (empleando OVA como antígeno modelo), con algunos resultados que sugieren una actividad inmunomoduladora a nivel de la secreción de citoquinas relevantes en la respuesta inmune adaptativa.

Por todo lo expuesto, y con el objetivo de conocer y caracterizar la estructura de las proteínas de capa S, se decidió intentar secuenciar el o los genes que codifican para las proteínas de capa S de *L. kefir*.

El primer intento consistió en utilizar cebadores capaces de amplificar genes de capa S de distintos lactobacilos, como *L. brevis* y *L. gallinarum* (Hagen et al 2005). Sin embargo, no se obtuvieron productos de amplificación utilizando el ADN de cepas de *L. kefir*. Esto puede relacionarse con el hecho de que, como ya se mencionó, existe una gran heterogeneidad en las secuencias aminoacídicas de proteínas capa S provenientes de especies de un mismo género bacteriano (Hynönen and Palva 2013), y todas las especies que amplifican con los cebadores utilizados por Hagen y col. (2005) son filogenéticamente cercanas mientras que *L. kefir* no lo es.

Se decidió cambiar el enfoque del estudio y se tomaron como punto de partida los análisis de espectrometría de masas realizados por Mobili y col. (2009). Frente a la hipótesis de que podría haber homología con alguna proteína de capa S ya descrita, se realizó una búsqueda en la base de datos de proteínas de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) utilizando los términos "S-layer" y "Surface layer" y restringiendo los resultados a las proteínas provenientes de *Lactobacillus*. Se obtuvo la secuencia de 202 y 1448 proteínas, respectivamente. A partir de las

mismas, se realizaron digestiones tripticas teóricas ajustando las condiciones de clivado *in silico* a las condiciones en las que se realizaron nuestros experimentos mediante el software correspondiente del portal ExPASy (http://web.expasy.org/peptide_mass/). A continuación, se compararon los fragmentos obtenidos experimentalmente para las proteínas de *L. kefir* con las fragmentaciones teóricas de proteínas de otros lactobacilos. Para realizar las comparaciones, se agruparon los datos de espectroscopía de masas MALDI-TOF obtenidos a partir de la digestión triptica de las proteínas de capa-S de diferentes cepas de *L. kefir*, según la capacidad de agregación de las cepas de las que fueron extraídas. Para considerar que dos fragmentos poseen una relación masa/carga (m/z) similar, se toleró una variación máxima de 0,5.

En la tabla A.1 se muestran los resultados obtenidos. El mayor número de fragmentos de relación masa carga (m/z) similar se encontró con proteínas provenientes de los siguientes microorganismos: *L. parafarraginis* y *L. buchneri*. En particular, con la cepa de *Lactobacillus parafarraginis* F0439 se encontraron nueve fragmentos, con *L. buchneri* NRRL B-30929 seis péptidos y con *L. buchneri* CD034, 19 fragmentos distribuidos en tres proteínas distintas. Estos resultados comenzaron a adquirir mayor relevancia cuando se comprobó, mediante búsqueda bibliográfica, la estrecha relación filogenética entre *L. kefir*, *L. buchneri*, *L. parafarraginis* y otros lactobacilos, que también presentaron fragmentos de proteínas de superficie con una relación m/z similar, como *L. kisonensis*, *L. otakiensis* y *L. hilgardii* (Felis and Dellaglio 2007; Endo and Okada 2007; Oki et al 2012; Heintl et al 2012).

Tabla A.1. Datos de espectroscopía de masas MALDI-TOF para los conjuntos de péptidos obtenidos a partir de la digestión triptica de las proteínas de capa S de diferentes cepas de *L. kefir*, agrupados según la capacidad de agregación de las cepas. Los valores corresponden a la relación m/z de los iones.

Capa S de cepas de <i>L. kefir</i> , resultados experimentales		Capa S de otros lactobacilos, digestiones tripticas teóricas		
Características de las cepas	Relación m/z	Cepa con fragmento de relación m/z similar a <i>L. kefir</i>	Relación m/z	Secuencia del fragmento
Agregantes y no agregantes	949,48	<i>L. buchneri</i> CD034	949,51	ALTDDATTR
Agregantes y no agregantes	1103,56	<i>L. kisonensis</i> F0435	1103,58	TREGDLWVK
		<i>L. buchneri</i> CD034	1103,58	TREGDLWVK
		<i>L. parafarraginis</i> F0439	1103,58	TREGDLWVK
Agregantes y no agregantes	1114,61	<i>L. parafarraginis</i> F0439	1114,62	VVSFDKTYR
		<i>L. buchneri</i> CD034	1114,62	VVSFDKTYR
Agregantes y no agregantes	1200,64	<i>L. parafarraginis</i> F0439	1200,64	TYRGWIYGGK
		<i>L. buchneri</i> CD034	1200,64	TYRGWIYGGK
		<i>L. kisonensis</i> F0435	1200,64	TYRGWIYGGK
No agregantes	1351,72	<i>L. buchneri</i> CD034	1351,72	WRGWIYGGKTK
		<i>L. buchneri</i> CD034	1351,76	NTSKQLVITGYK
No agregantes	1459,69	<i>L. amylovorus</i> GRL1118	1459,67	KNSYIYDENG EK
		<i>L. acidophilus</i> 30SC	1459,67	KNSYIYDENG EK
		<i>L. buchneri</i> CD034	1459,88	GAKTVATKSTLAALK
		<i>L. crispatus</i> ST1	1459,67	HNAYIYWSSYR
No agregantes	1510,81	<i>L. rhamnosus</i> LMS2-1	1510,80	NSDLHASIKVDVGR
		<i>L. buchneri</i> CD034	1510,84	AKQTNRPKANAPK
No agregantes	1543,76	<i>L. kisonensis</i> F0435	1543,72	TVTDATPYANDTFK
		<i>L. hilgardii</i>	1543,81	GSTVYVYVTKNGQK
Agregantes	1585,80	<i>L. parafarraginis</i> F0439	1585,81	VITDSTPYKDATEFK
		<i>L. buchneri</i> CD034	1585,81	VITDSTPYKDATEFK
No agregantes	1632,87	No se encontraron péptidos de m/z similar		
Agregantes	1633,74	<i>L. parafarraginis</i> F0439	1633,91	SYAKVTRNSNKPLR
Agregantes	1638,84	<i>L. amylovorus</i> GRL 1112	1638,82	SFMIAGHQMYRIGK
		<i>L. buchneri</i> NRRL B-30929	1638,88	VKVTFTD GKATVNMK
		<i>L. helveticus</i> H10	1638,85	GKKYIYIGDGAYIK
Agregantes	1649,74	<i>L. brevis</i> ATCC 27305	1649,84	NSLWVNPKWSQYK
		<i>L. buchneri</i> ATCC 11577	1649,84	NSLWVNPKWSQYK
		<i>L. hilgardii</i> ATCC 8290	1649,84	NSLWVNPKWSQYK
Agregantes	1680,91	<i>L. helveticus</i>	1680,88	KQLTNVTFD TDTAVK
		<i>L. crispatus</i> ST1	1680,81	KGEEVTTYGGTYTFK
		<i>L. parafarraginis</i> F0439	1680,89	VATPAPTITPVADNAVR
Agregantes	1784,91	<i>L. ultunensis</i> DSM 16047	1784,96	IEVAEKGGKYMVYAVK
		<i>L. crispatus</i>	1784,92	YESVNVAMSTKKIGNK
Agregantes	1838,89	<i>L. buchneri</i> ATCC 11577	1838,94	GSVYYKVV SFDKQYR
		<i>L. buchneri</i> CD034	1838,89	AGDSL IYYSFYANNLK
		<i>L. buchneri</i> NRRL B-30929	1838,89	AGDSL IYYSFYANNLK
		<i>L. hilgardii</i>	1838,94	GSVYYKVV SFDKQYR
Agregantes	1868,97	<i>L. buchneri</i> CD034	1868,98	GWYGGKTKADYQGGIR
Agregantes	1869,96	<i>L. buchneri</i> CD034	1869,96	VVSFEGKWRGWIYGGK
Agregantes	1876,00	<i>L. parafarraginis</i> F0439	1876,01	VVSFDKTYRGWIYGGK
		<i>L. buchneri</i> CD034	1876,01	VVSFDKTYRGWIYGGK
		<i>L. kisonensis</i> F0435	1876,01	VVSFDKTYRGWIYGGK

Continuación en la siguiente página

Tabla A.1. Continuación. Datos de espectroscopía de masas MALDI-TOF para los péptidos obtenidos a partir de la digestión triptica de las proteínas de capa S de cepas de *L. kefir*, agrupados según la capacidad de agregación de las cepas. Los valores corresponden a la relación m/z de los iones.

Capa S de cepas de <i>L. kefir</i> , resultados experimentales		Capa S de otros lactobacilos, digestiones tripticas teóricas		
Características de las cepas	Relación m/z	Cepa con fragmento de relación m/z similar a <i>L. kefir</i>	Relación m/z	Secuencia del fragmento
No agregantes	1901,94	<i>L. crispatus</i> ST1 <i>L. acidophilus</i> 30SC <i>L. hilgardii</i>	1885,92 1901,90 1901,98	FMSSTEKDSPVTTTTNK MGQTAFYVNVNGEKVDTK DASVPSTLSITGGYKLAKE
No agregantes	1918,95	<i>L. parafarraginis</i> F0439 <i>L. buchneri</i> CD034	1918,99 1918,99	ITDQTTRTREGDLWVK ITDQTTRTREGDLWVK
No agregantes	1931,96	<i>L. hilgardii</i> ATCC 8290 <i>L. amylolyticus</i> DSM 11664	1931,97 1931,94	QENANAPSMEILLSSSIK WDAADVLTGHTYNIDIK
Agregantes	1985,98	No se encontraron péptidos de m/z similar		
No agregantes	2054,07	<i>L. helveticus</i> H10 <i>L. parafarraginis</i> F0439 <i>L. buchneri</i> CD034	2054,12 2054,06 2054,06	TLTLIHNAYVYNYKGGKR SVTAFAGGIASFNTTAPAAAK SVTAFAGGIASFNTTAPAAAK
No agregantes	2266,02	<i>L. buchneri</i> ATCC 11577	2266,11	GWVYGGKSTSAFAGGVASYATTK
Agregantes	2270,09	<i>L. parafarraginis</i> F0439 <i>L. parafarraginis</i> F0439 <i>L. buchneri</i> NRRL B-30929	2270,16 2270,10 2270,20	IVATKATLSTLANSSSSSDNFR DLVEPFQYDQSMALATVSQK GDPKIDGQTLTVEFADVIVPR
No agregantes	2310,04	<i>L. helveticus</i>	2294,05	AGDDYTMITLSGVGFSFGKAN AGK
No agregantes	2345,14	<i>L. kisonensis</i> F0435	2345,13	TVTDATPYANDTFKVTDQTR
No agregantes	2413,2	<i>L. buchneri</i> CD034 <i>L. buchneri</i> NRRL B-30929	2413,23 2413,20	VNGTFAGGLNPANTMANANLPLQ K YQSKVLNFKADEEATYEHK
No agregantes	2438,13	No se encontraron péptidos similares		
Agregantes	2468,16	<i>L. acidophilus</i> 30SC	2468,23	YRLDNWVNRSLYDQAIENAK
No agregantes	2518,29	No se encontraron péptidos de m/z similar		
No agregantes	2542,39	No se encontraron péptidos de m/z similar		
Agregantes	2632,3	<i>L. crispatus</i> ST1 <i>L. buchneri</i> NRRL B-30929	2632,37 2632,35	KQNIPVNAAGNFTAPDTFTVTLNA K ENEGSKVYKFSYIIKPTADVTDK
Agregantes	2652,23	<i>L. parafarraginis</i> F0439 <i>L. buchneri</i> CD034	2652,24 2652,24	IATTGTANDGTQVITYTPAWTEY K IATTGTANDGTQVITYTPAWTEY K
Agregantes	2780,32	<i>L. buchneri</i> CD034 <i>L. parafarraginis</i> F0439	2780,30 2780,34	IATTGTANDGTQVITYTPAWTEYKK IATTGTANDGTQVITYTPAWTEYKK
No agregantes	2803,39	<i>L. buchneri</i> CD034	2803,40	VFIHGNGKVQYIMNCSTGIPSSPTP R
No agregantes	2909,49	No se encontraron péptidos de m/z similar		
No agregantes	2965,51	<i>L. acidophilus</i> <i>L. buchneri</i> CD034	2965,53 2965,47	AGIKVNAAGDFEAPASFTATLTAK SEVNGK ITSNQVMQTAPQNRNVTTNGTNA LYTK
Agregantes	3106,61	<i>L. buchneri</i> CD034	3106,56	ISATQSPTNQPANVTVGSEDYLVY VDPIK
Agregantes	3127,51	<i>L. crispatus</i> ST1 <i>L. buchneri</i> CD034	3127,46 3127,49	DGSSLDYVFSADAYKEGAGSLEFG NVMGK DLGDGQTLKSNTPMNYAS
Agregantes	3406,56	<i>L. buchneri</i> CD034	3406,75	LDSNKPLFDKQGNATIGDTGNQV LKYDEVK

Se complementaron estos resultados realizando la secuenciación *de novo* de fragmentos obtenidos por digestión trípica de proteínas de capa S de cepas de *L. kefir*. Para ello, se realizaron nuevos espectros de MALDI-TOF, en colaboración con el Dr. Trejo del SePBioEs (IBB, UAB), y se seleccionaron picos para realizar refragmentaciones. Se obtuvieron espectros de los péptidos que pueden ser analizados para intentar dilucidar su secuencia aminoacídica.

La secuenciación *de novo* se realizó utilizando la metodología descrita por el Prof. Donald F. Hunt y col., de la Universidad de Virginia, Estados Unidos, que se encuentra disponible en online: <http://www.ionsource.com/tutorial/DeNovo/DeNovoTOC.htm>. En la tabla A.2 se muestra la secuencia de los péptidos cuya secuencia pudo ser confirmada. La fragmentación de los péptidos de relación m/z 1459,68, 1583,82, 1649,86, 1868,97, 1869,96 y 2468,32, no permitió obtener su secuencia mediante la técnica implementada.

Tabla A.2. Secuencia de péptidos obtenidos a partir de la digestión trípica de las proteínas de capa S de *L. kefir*, confirmada mediante secuenciación *de novo*.

Péptido presente en cepas de <i>L. kefir</i>	Relación m/z	Secuencia obtenida mediante secuenciación <i>de novo</i>	Péptido coincidente en proteínas de otros lactobacilos
Agregantes y no agregantes	949,5088	ALTTDATTR	<i>L. buchneri</i> CD034 <i>L. kisonensis</i> F0435
Agregantes y no agregantes	1.103,6046	TREGDLWVK	<i>L. buchneri</i> CD034 <i>L. parafarraginis</i> F0439 <i>L. otakiensis</i> JCM 15040 <i>L. kisonensis</i> F0435
Agregantes y no agregantes	1.114,6103	VVSFDKTYR	<i>L. buchneri</i> CD034 <i>L. parafarraginis</i> F0439
Agregantes y no agregantes	1.200,6381	TYRGWIYGGK	<i>L. buchneri</i> CD034 <i>L. parafarraginis</i> F0439 <i>L. kisonensis</i> F0435
No agregantes	1.543,7388	TVTDATPYANDTFK	<i>L. kisonensis</i> F0435
Agregantes	1.585,7982	VITDSTPYKDATFK	<i>L. parafarraginis</i> F0439 <i>L. buchneri</i> CD034 <i>L. otakiensis</i> JCM 15040
Agregantes	1.680,9104	VATPAPTTTPVADNAVR	<i>L. parafarraginis</i> F0439
Agregantes	1.876,0002	VVSFDKTYRGWIYGGK	<i>L. parafarraginis</i> F0439 <i>L. buchneri</i> CD034 <i>L. kisonensis</i> F0435
Agregantes	2780,3722	IATTGTANDGTQVITYTYPATWTEYKK	<i>L. parafarraginis</i> F0439 <i>L. buchneri</i> CD034

Se alinearon las secuencias aminoacídicas de las proteínas de los lactobacilos indicados en la tabla A.2 para analizar la localización de los péptidos. Como puede observarse en la figura A.1, todos los fragmentos se encuentran localizados en la región N-terminal de las proteínas. Estos resultados correlacionan con lo descrito en bibliografía ya que, en general, la mayor homología entre proteínas de capa S se encuentra en dicha región (Sára and Sleytr 2000). Resultados similares se obtuvieron al evaluar los genes correspondientes (figura A.2).

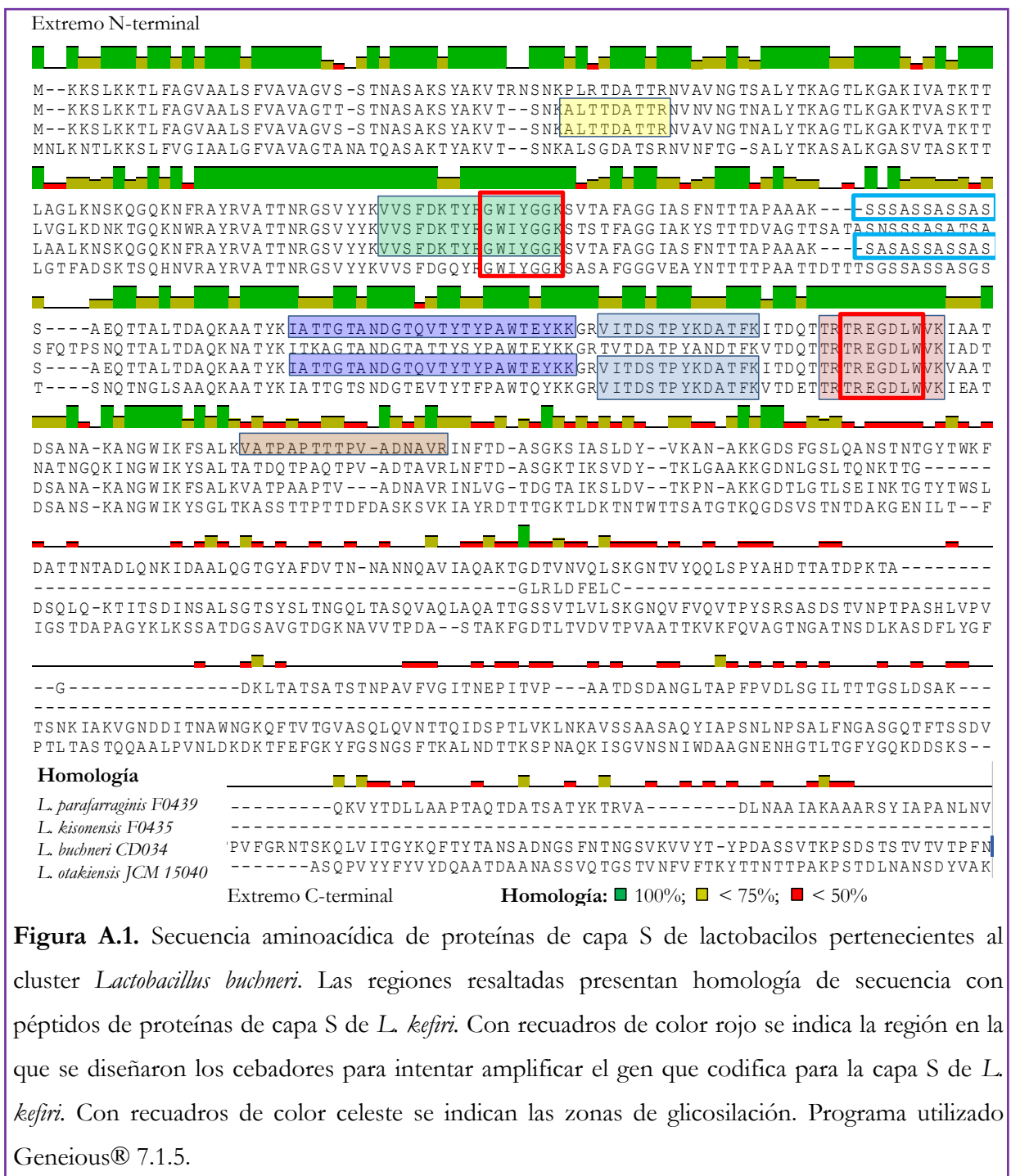
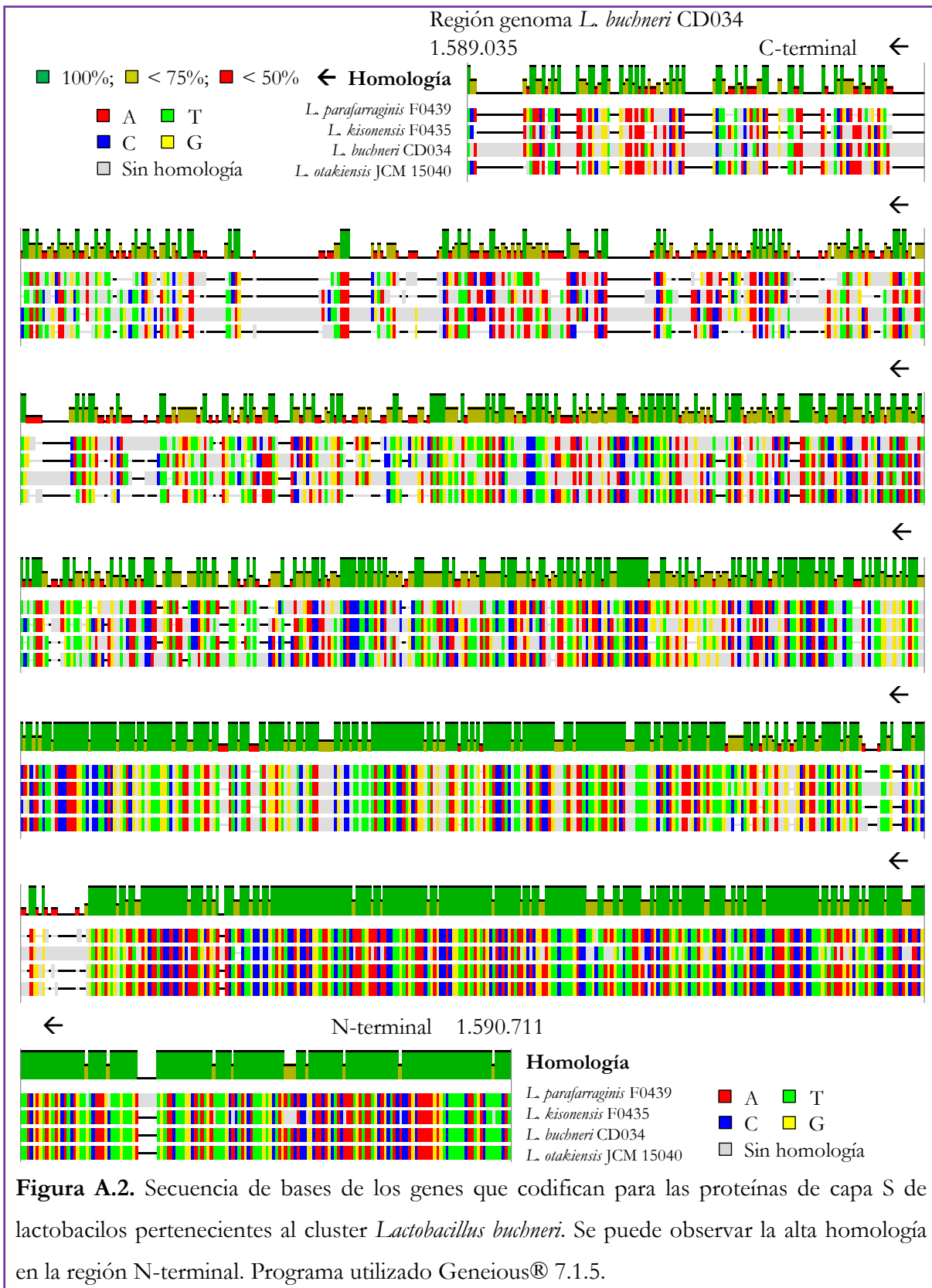


Figura A.1. Secuencia aminoacídica de proteínas de capa S de lactobacilos pertenecientes al cluster *Lactobacillus buchneri*. Las regiones resaltadas presentan homología de secuencia con péptidos de proteínas de capa S de *L. kefir*. Con recuadros de color rojo se indica la región en la que se diseñaron los cebadores para intentar amplificar el gen que codifica para la capa S de *L. kefir*. Con recuadros de color celeste se indican las zonas de glicosilación. Programa utilizado Geneious® 7.1.5.



Se utilizó toda esta información para sintetizar cebadores que permitieran amplificar el gen que codifica para las proteínas de capa S de *L. kefir*. Dado que es escaso el número de genes, y

sus correspondientes proteínas, que se encuentran disponibles en la base de datos para cepas de *L. kefir*, se decidió utilizar el usaje de codones de *L. buchneri* CD034, cepa cuyo genoma se encuentra completamente secuenciado, para el diseño de los mismos. Entre los posibles fragmentos a utilizar, se eligieron los que se indican con un recuadro rojo en la figura A.1. Éstos fueron seleccionados debido a que, al parecer, estas regiones están conservadas en las proteínas de las cuatro especies y en *L. kefir*.

Con los cebadores diseñados (TREG reverso: 3'-AACCCAAAGGTCGCCITTCAC-5', GWIT directo: 3'-GGCTGGATCTACGGTGGCAA-5'), se obtuvo un fragmento de amplificación de 340 pb para todas las cepas de *L. kefir* estudiadas (MyM, tabla M.1). Hasta el momento sólo hemos secuenciado el fragmento de la cepa *L. kefir* CIDCA 8348. En la figura A.3 se comparan la secuencia obtenida para *L. kefir* CIDCA 8348 con las regiones correspondientes en las otras especies. Se puede observar que la mayor homología se obtiene con las secuencias de las proteínas de *L. buchneri* CD034 y *L. parafarraginis* F0439.

Los resultados obtenidos a nivel génico correlacionaron perfectamente con lo obtenido al analizar los perfiles peptídicos mediante MALDI-TOF. La secuencia de aminoácidos obtenida a partir del fragmento secuenciado, contiene los péptidos identificados por esta técnica. Además, otra información importante obtenida, fue la identificación de una región de glicosilación (figura A.1).

Dado que el objetivo es obtener el gen que codifica para la capa S de *L. kefir*, se realizaron alineaciones de secuencia de las regiones que flanquean al gen SlpB de *L. buchneri* CD034, cuyo genoma se encuentra secuenciado, con contigs de *L. parafarraginis* F0439, *L. kisonensis* F0435 y *L. otakiensis* JCM 15040. En la figura A.4 se encuentran las alineaciones realizadas. Se utilizaron las regiones con alta homología que se encontraron por fuera del gen de capa S de *L. buchneri* para diseñar nuevos cebadores que se utilizarían para amplificar toda la región en la que se encontraría contenido nuestro gen de interés.

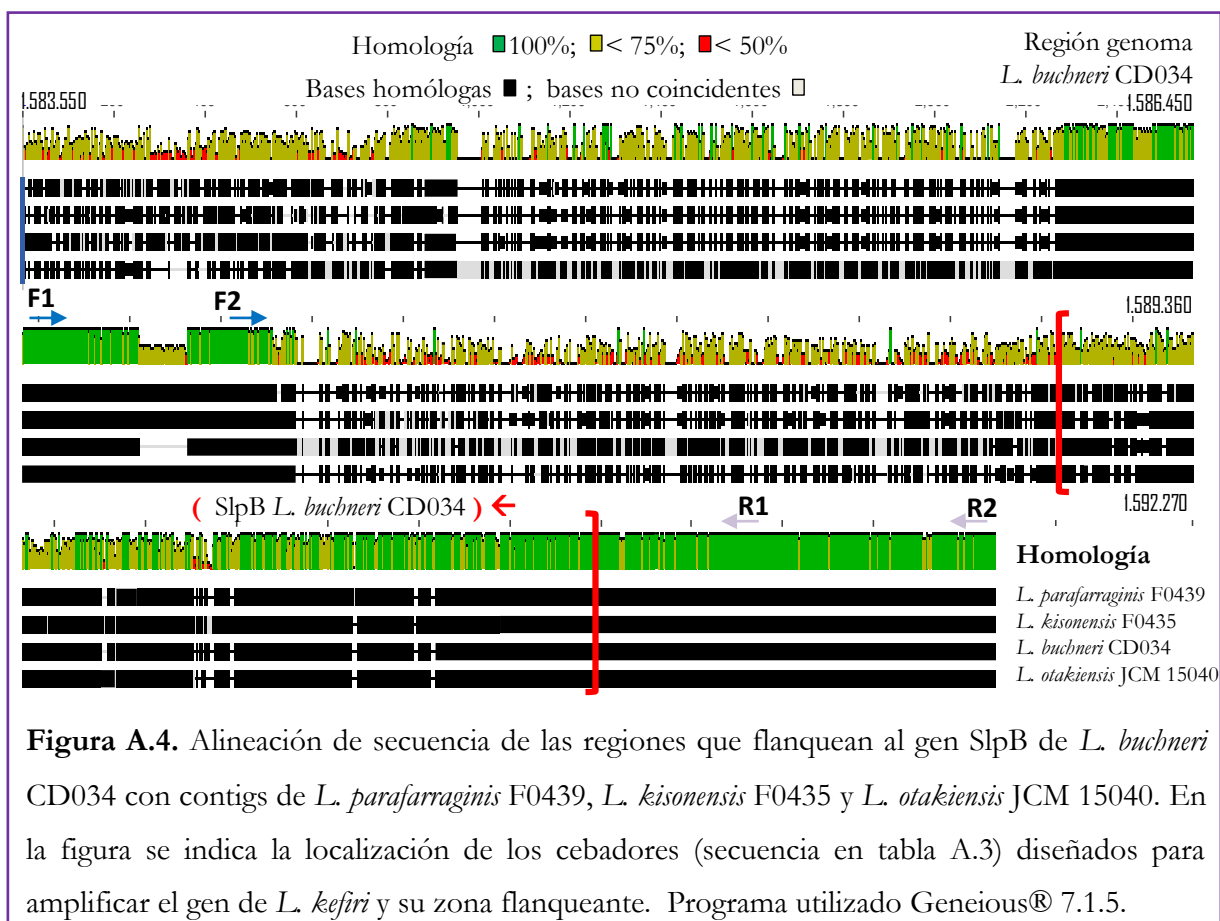


Tabla A.3. Secuencia de cebadores utilizados para intentar amplificar la región que contiene al gen de capa S de *L. kefir*.

Cebador	Secuencia 3' - 5'	Posición en el genoma de <i>L. buchneri</i> CD034
Reverso R1	CTCCTGTTT*TTCTT*TTGCAT*TCAACC	1590.808 a 1590.832
Reverso R2	AATCCACCGCCT*TCGGATG	1591.641 a 1591.659
Directo F1	ACGTTGGCCACAGGAAAGAA	1587.794 a 1587.813
Directo F2	GACCAT*ATCGAACTAGTGT*CAAA	1587.794 a 1587.813
Tamaño de fragmento esperado para <i>L. buchneri</i> CD034		
F1-R1: 3060 pb F1-R2: 3900 pb F2-R1: 2000 pb F2-R2: 2800 pb		

En la figura A.5 se muestran los resultados obtenidos al utilizar los cebadores indicados en la tabla A.3 con ADN de cepas de *L. kefir* agregantes (CIDCA 8321, 8348 y 83115) y no agregantes (CIDCA 83111, 83113 y JCM 5818). Las cinco cepas aisladas por nuestro laboratorio a partir de distintos gránulos de kefir (Garrote et al 2001), amplificaron con el cebador directo F1

y ambos reversos, pero no se detectó ningún producto de amplificación con el cebador directo F2. En el caso de la cepa JCM 5818, presentó amplificación con el cebador directo F2, pero no con F1. Otro dato interesante es que el fragmento obtenido con el DNA de la cepa JCM 5818 se encuentran cercanas al tamaño esperado, mientras que en las pertenecientes a la colección del CIDCA se observó una migración correspondiente a fragmentos de unos 500 pb menos de lo esperado. Esto último podría explicar la ausencia de la región de complementaria al cebador F2. Por otro lado, se observaron ligeras variaciones en el tamaño de los fragmentos amplificados utilizando F1. Al momento de la presentación de este trabajo de tesis, los resultados de la secuenciación de estos fragmentos no han sido recibidos.

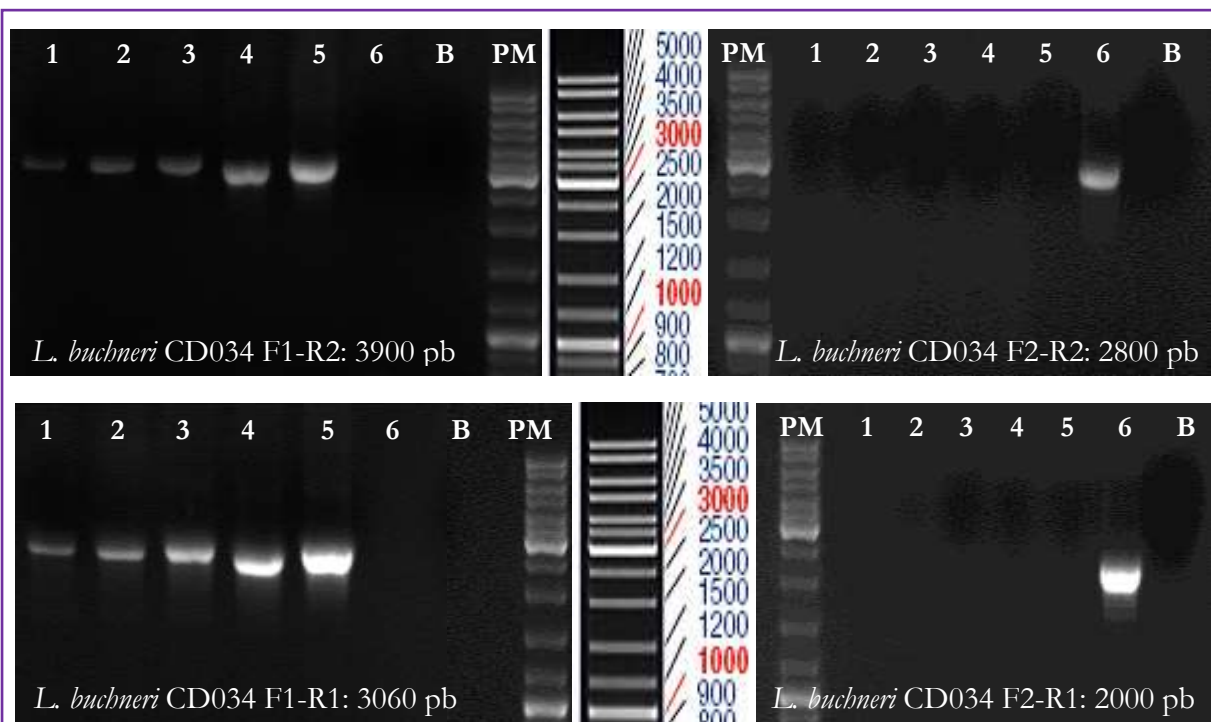


Figura A.5. Productos de amplificación de ADN de distintas cepas de *L. kefir* utilizando los cebadores indicados en la tabla A.3. La extracción de ADN y la PCR se realizaron según lo descrito en Materiales y Métodos, secciones 5.2 y 5.4, respectivamente. Los productos se separaron en geles de agarosa 1,2 % p/v. Referencias: *L. kefir* CIDCA 8321 (1), 8348 (2), 83111 (3), 83113 (4), 83115 (5), JCM 5818 (6), control negativo de PCR (B), marcado de peso molecular (PM).

Mobili y col. (2009) demostraron que existe una mayor heterogeneidad entre las proteínas de capa S de cepas no agregantes que entre las provenientes de cepas agregantes, mediante el análisis de los datos de espectroscopía de masas MALDI-TOF de los péptidos obtenidos a partir de la digestión trípica de estas proteínas. Para analizar si estas diferencias se encuentran también a nivel génico, se utilizaron enzimas de restricción para fragmentar los productos de PCR en los que se encontraría contenido el gen de dichas proteínas. En la figura A.6 se muestra los perfiles obtenidos luego del tratamiento con *HinfI* y *Sau3AI*.

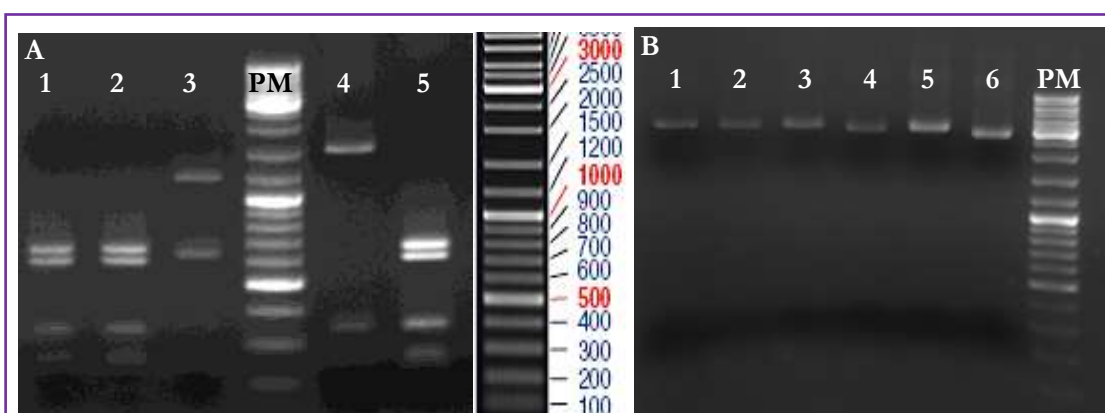


Figura A.6. Tratamiento con enzimas de restricción de productos de amplificación de ADN de distintas cepas de *L. kefir* utilizando los cebadores F1 y R2. Tratamiento con *HinfI* (A) y *Sau3AI* (B). La extracción de ADN y la PCR se realizaron según lo descrito en Materiales y Métodos, secciones 5.2 y 5.4, respectivamente. El tratamiento con enzimas de restricción se realizó según lo descrito por el proveedor (Promega 2007). Los productos se separaron en geles de agarosa 1,5 % p/v. Referencias: *L. kefir* CIDCA 8321 (1), 8348 (2), 83111 (3), 83113 (4), 83115 (5), JCM 5818 (6), marcado de peso molecular (PM).

Nuestros resultados correlacionan con lo descrito por Mobili y col. (2009): los productos de amplificación de cepas agregantes mostraron el mismo perfil luego del tratamiento con *HinfI*, estos resultados se obtuvieron también al utilizar las enzimas *HindIII*, *CfoI*, *PvuI* y *RsaI*. Por otro lado, para las cepas no agregantes 83111 y 83113, se observaron perfiles diferenciales. Por último, ninguno de los fragmentos posee los sitios reconocidos por la enzima *Sau3AI*.

Referencias bibliográficas

- Anzengruber, J., Pabst, M., Neumann, L., Sekot, G., Heintl, S., Grabherr, R., Schäffer, C. (2014). Protein O-glycosylation in *Lactobacillus buchneri*. *Glycoconjugate Journal*, 31(2), 117–31. doi:10.1007/s10719-013-9505-7
- Ávall-Jääskeläinen, S., Lindholm, A., & Palva, A. (2003). Surface Display of the Receptor-Binding Region of the *Lactobacillus brevis* S-Layer Protein in *Lactococcus lactis* Provides Nonadhesive Lactococci with the Ability To Adhere to Intestinal Epithelial Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2230–2236. doi:10.1128/AEM.69.4.2230
- Beganović, J., Frece, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., & Sušković, J. (2011). Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(1), 43–53. doi:10.1007/s10482-011-9563-4
- Carasi, P., Ambrosio, N. M., De Antoni, G., Bressollier, P., Urdaci, M. C., & Serradell, M. (2014). Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus. *Journal of Dairy Research*, 81(1), 16–23. doi:10.1017/S0022029913000526
- Carasi, P., Trejo, F. M., Pérez, P. F., De Antoni, G. L., & Serradell, M. D. L. A. (2012). Surface proteins from *Lactobacillus kefir* antagonize *in vitro* cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxins. *Anaerobe*, 18(1), 135–42. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.11.002
- Denou, E., Pridmore, R. D., Berger, B., Panoff, J.-M., Arigoni, F., & Brüssow, H. (2008). Identification of genes associated with the long-gut-persistence phenotype of the probiotic *Lactobacillus johnsonii* strain NCC533 using a combination of genomics and transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology*, 190(9), 3161–8. doi:10.1128/JB.01637-07
- Endo, A., & Okada, S. (2007). *Lactobacillus farraginis* sp. nov. and *Lactobacillus parafarraginis* sp. nov., heterofermentative lactobacilli isolated from a compost of distilled shochu residue. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 4), 708–12. doi:10.1099/ijs.0.64618-0

- Felis, G., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues In Intestinal Microbiology*, 8(2), 44–61.
- Frece, J., Kos, B., Svetec, I. K., Zgaga, Z., Mrsa, V., & Susković, J. (2005). Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 98(2), 285–92. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02473.x
- Garrote, G., Abraham, A., & De Antoni, G. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 68(4), 639–52. doi:10.1017/S0022029901005210
- Garrote, G., Delfederico, L., Bibiloni, R., Abraham, A., Fernando Perez, P., Semorile, L., & De Antoni, G. (2004). Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins. *Journal of Dairy Research*, 71(2), 222–230. doi:10.1017/S0022029904000160
- Golowczyc, M., Mobili, P., Garrote, G. L., Abraham, A., & De Antoni, G. L. (2007). Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 118(3), 264–73. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.042
- Golowczyc, M., Mobili, P., Garrote, G. L., de Los Angeles Serradell, M., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2009). Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins. *Journal of Dairy Research*, 76(1), 111–6. doi:10.1017/S0022029908003749
- Hagen, K., Guan, L., Tannock, G., Korver, D., & Allison, G. (2005). Detection, characterization, and *in vitro* and *in vivo* expression of genes encoding S-proteins in *Lactobacillus gallinarum* strains isolated from chicken crops. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6633–6643. doi:10.1128/AEM.71.11.6633
- Heinl, S., Wibberg, D., Eikmeyer, F., Szczepanowski, R., Blom, J., Linke, B., Schlüter, A. (2012). Insights into the completely annotated genome of *Lactobacillus buchneri* CD034, a strain isolated from stable grass silage. *Journal of Biotechnology*, 161(2), 153–66. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.03.007

- Hynönen, U., & Palva, A. (2013). Lactobacillus surface layer proteins: structure, function and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(12), 5225–43. doi:10.1007/s00253-013-4962-2
- Khaleghi, M., Kasra, K., & Zarkesh-Esfahani, S. (2011). Effects of penicillin G on morphology and certain physiological parameters of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8), 822–9.
- Khaleghi, M., Kermanshahi, H., Yaghoobi, M., Zarkesh-Esfahani, S., & Baghizadeh, A. (2010). Assessment of bile salt effects on s-layer production, slp gene expression and some physicochemical properties of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(4), 749–56.
- Konstantinov, S. R., Smidt, H., de Vos, W. M., Bruijns, S. C. M., Singh, S. K., Valence, F., van Kooyk, Y. (2008). S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *PNAS*, 105(49), 19474–9. doi:10.1073/pnas.0810305105
- 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), 728–64. doi:10.1128/MMBR.00017-08
- Martínez, M. G., Prado Acosta, M., Candurra, N. a, & Ruzal, S. M. (2012). S-layer proteins of *Lactobacillus acidophilus* inhibits JUNV infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 422(4), 590–5. doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.031
- Mobili, P., Serradell, M., Mayer, C., Arluison, V., & Gomez-zavaglia, A. (2013). Biophysical Methods for the Elucidation of the S-Layer Proteins / Metal Interaction. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 3(1), 39–62.
- Mobili, P., Serradell, M., Trejo, S., Avilés Puigvert, F. X., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2009). Heterogeneity of S-layer proteins from aggregating and non-aggregating *Lactobacillus kefir* strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 95(4), 363–72. doi:10.1007/s10482-009-9322-y

- Oki, K., Kudo, Y., & Watanabe, K. (2012). *Lactobacillus saniviri* sp. nov. and *Lactobacillus senioris* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 3), 601–7. doi:10.1099/ij.s.0.031658-0
- Pavkov-Keller, T., Howorka, S., & Keller, W. (2011). The Structure of Bacterial S-Layer Proteins. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 103, 73–130.
- Promega. (2007). Assembly of Restriction Enzyme Digestions. *Promega*.
www.promega.com/resources/articles/pubhub/enotes/rapid-dna-digestion-using-promega-restriction-enzymes
- Sára, M., & Sleytr, U. (2000). S-layer proteins. *Journal of Bacteriology*, 182(4), 859–868.
- Schär-Zammaretti, P., Dillmann, M., D'Amico, N. D., Affolter, M., & Ubbink, J. (2005). Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8165–8173. doi:10.1128/AEM.71.12.8165
- Sekot, G., Posch, G., Messner, P., Matejka, M., Rausch-Fan, X., Andrukhov, O., & Schäffer, C. (2011). Potential of the *Tannerella forsythia* S-layer to delay the immune response. *Journal of Dental Research*, 90(1), 109–14. doi:10.1177/0022034510384622
- Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., & Roy, N. C. (2013). The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators of Inflammation*, 2013, 237921. doi:10.1155/2013/237921
- Sleytr, U. B., Egelseer, E. M., Ilk, N., Pum, D., & Schuster, B. (2007). S-Layers as a basic building block in a molecular construction kit. *The FEBS Journal*, 274(2), 323–334. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05606.x
- Sun, Z., Kong, J., Hu, S., Kong, W., Lu, W., & Liu, W. (2013). Characterization of a S-layer protein from *Lactobacillus crispatus* K313 and the domains responsible for binding to cell wall and adherence to collagen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(5), 1941–52. doi:10.1007/s00253-012-4044-x

- Vélez, M. P., De Keersmaecker, S. C. J., & Vanderleyden, J. (2007). Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters*, 276(2), 140–8. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00908.x
- Waśko, A., Polak-Berecka, M., Kuzdrałiński, A., & Skrzypek, T. (2014). Variability of S-layer proteins in *Lactobacillus helveticus* strains. *Anaerobe*, 25, 53–60. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.11.004
- Xue, C., Zhang, L., Li, H., Wang, S., Li, Q., Luo, X., Han, X. (2013). Functionality of the S-layer proteins from *Lactobacillus* in the competitive against enteropathogens infection. *European Food Research and Technology*, 236(2), 249–255.