

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica



Tesis de Maestría en Biología Molecular Médica

**Propiedades de la proteína de capa S (S-layer) de cepas
probióticas de *Lactobacillus*: Efecto Antiviral y
antibacteriano**

Autor: Génesis Daniela García

Directora: Dra. Sandra M. Ruzal

Director Asistente: Dr. Mariano Prado A.

Laboratorio de Bacterias Gram positivas, sus fagos y estrés. Departamento de
Química Biológica.

FCEyN UBA

Agosto 2016

Agradecimientos

En primer lugar un agradecimiento infinito a Sandra por permitirme trabajar en QB40, por ayudarme siempre con el desarrollo de este trabajo de tesis y ser tan buena persona con todos quienes trabajamos con ella.

Un agradecimiento especial a Andre por ayudarme en todo y compartir siempre sus conocimientos conmigo, y a Mariano por haberme enseñado todo sobre el laboratorio y haberme ayudado a pesar de estar lejos.

A Mer, Marianita, Joaquí, Pablo y Lula por ayudarme siempre en cada duda, por la compañía y por ser tan buenas personas conmigo el tiempo que compartí con ellos.

A todo QB43, Estefy, Lili, Lacho, Euge, Mariana por compartir conmigo este tiempo y hacer llevadero el trabajo en el laboratorio, a los vecinos Manu, José, Gaby, Marie y Esme por las excelentes personas que fueron conmigo desde el inicio.

A mis amigos que fueron mi familia en todo este tiempo, que supieron darme fuerza cuando lo necesite y que compartieron conmigo estos dos años tantas aventuras, Guada, Milimum, mis compañeros de viaje Clau y omar, y a Andrés por el inmenso apoyo.

A mi Mamá que desde lejos estuvo siempre cada segundo pendiente de mí, mi hermano y mi abue por preocuparse y darme fuerzas, sin ustedes no lograría nada.

A Edu, siempre de la mano.

Contenido

1	RESUMEN	7
2	OBJETIVOS	11
3	INTRODUCCIÓN.....	13
3.1	Introducción parte 1.....	13
3.1.1	Microbiota intestinal	13
3.1.2	Género <i>Lactobacillus</i>	15
3.1.3	Proteína S-layer.....	17
3.1.4	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	19
3.1.5	<i>Lactobacillus brevis</i>	21
3.1.6	<i>Lactobacillus helveticus</i>	22
3.1.7	<i>Lactobacillus kefir</i>	23
3.2	Introducción parte 2.....	25
3.2.1	Efectos beneficiosos de <i>Lactobacillus</i>	25
3.2.2	Efecto antimicrobiano de S-layer.....	26
3.2.3	Efecto antiviral de S-layer.....	26
3.2.4	Efecto inmunomodulador.....	27
3.3	Introducción parte 3.....	29
3.3.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
3.3.2	Interacción <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con células del tracto respiratorio	30
3.3.3	Herpes simplex virus tipo I	32
4	MATERIALES Y MÉTODOS	36
4.1	Cepas utilizadas	36
4.2	Cultivos celulares	36
4.3	Virus	36
4.4	Plásmido	37
4.5	Medios de cultivo	37
4.6	Manipulación proteínas de <i>Lactobacillus</i>	38
4.6.1	Aislamiento y purificación de la proteína S-layer de <i>Lactobacillus</i>	38
4.6.2	Determinación de la concentración de proteínas	39
4.6.3	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS_PAGE)	39

4.6.4 Tinción de geles de poliacrilamida con Coomassie Blue R_250.	39
4.7 Métodos para crear <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con gen reportero <i>GFP</i>	40
4.7.1 Extracción de ADN plasmídico	40
4.7.2 Preparación de células <i>Pseudomonas aeruginosa</i> electrocompetentes.....	41
4.7.3 Electroporación de células <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
4.8 Técnicas moleculares.....	41
4.8.1 Geles de agarosa.....	41
4.8.2 Recuperación y purificación de ADN a partir de geles de agarosa.....	42
4.8.3 Digestión con enzimas de restricción.....	43
4.9 Técnicas para observación de biofilm en superficies biótica y abiótica	43
4.10Técnicas de cuantificación de biofilm en contacto con S-layer	44
4.11Técnicas de adhesión a células eucariotas.....	44
4.11.1Microscopía	44
4.11.2Recuento celular de UFC en placa	45
4.11.3Citometría.....	45
4.12Técnicas de inhibición viral.....	46
4.12.1Ensayo de citotoxicidad de S-layer en células eucariotas A549	46
4.12.2Ensayo de reducción de la acción citopática viral (ACP)	46
4.12.3Ensayo de inhibición del rendimiento viral.....	46
4.12.4Titulación por el método de formación de placas en medio semisólido	47
5 RESULTADOS	51
5.1 Purificación de proteínas	51
5.2 efecto en formación de biofilm	55
5.2.1 Crecimiento del patógeno junto con la proteína durante 24h	55
5.2.2 Crecimiento patógeno junto con la proteína durante 48h	57
5.2.3 Contacto con S-layer 2h después del crecimiento del patógeno durante 48h.....	58
5.3 Construcción de cepa de <i>P. aeruginosa</i> con gen reportero fluorescente para el seguimiento post-infección.....	61
5.3.1 Transformación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61
5.3.2 Extracción de ADN plasmídico	62
5.3.3 Transformación <i>Pseudomonas</i> mediante electroporación	63
5.4 Observación de biofilm en superficies biótica y abiótica, en contacto con S-layer	65

5.5 Efecto de S-layer en la adhesión de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a células a549.....	67
5.5.1 Microscopia.....	67
5.5.2 Recuento en placa	71
5.5.3 Por citometría de flujo.....	72
5.6 efecto antiviral en Herpes simplex	76
5.6.1 Citotoxicidad de S-layer en células eucariotas A549.....	76
5.6.2 Ensayo de reducción de la acción citopática viral (ACP).....	78
5.6.3 Ensayo de inhibición del rendimiento viral	79
6 DISCUSIONES	83
6.1 Efecto antimicrobiano de S-layer	84
6.2 efecto antiviral de S-layer.....	89
7 Conclusiones	92
Bibliografía.....	94

Abreviaturas

ATP	adenosina trifosfato
cDNA	ácido desoxiribonucleico copia
Cm/CmR	cloranfenicol/cloranfenicol resistente
DNA	ácido desoxiribonucleico
DO	densidad óptica
EDTA	ácido etileno diamino tetracetico
g	gramos
GRAS	generalmente reconocidas como seguras (generally recongnise as safe)
GFP	Green fluorescent protein
Hs	horas
Kb	kilo bases
kDa	kilo Dalton
L	litros
Min	minutos
ml	mililitros
N	normal
Nm	nanómetros
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RNA	ácido ribonucleico
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
rRNA	ácido ribonucleico ribosomal
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
μl	microlitros
Mmax	velocidad máxima especifica de crecimiento
UV	ultravioleta
vol	volumen

Resumen

1 RESUMEN

Propiedades de la proteína de capa S (S-layer) de cepas probióticas de *Lactobacillus*: Efecto Antiviral y antibacteriano

Las S-layers (surface layer) o capa S cumplen un rol en las propiedades probióticas de las cepas que la poseen siendo capaz de influir en la respuesta inmune y en muchos casos favoreciendo la adhesión a células.

La proteína S-layer pura de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 tiene propiedades antimicrobianas y antivirales que podrían ser explotadas. Con un objetivo similar se buscará verificarlo en las cepas de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus kefir*, frente a diferentes patógenos.

Se buscó determinar cómo puede influir esta estructura de la superficie bacteriana en las características probióticas como son capacidad de adhesión a células epiteliales, y el efecto barrera contra patógenos (bacterianos y virales).

A través de construcciones de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con genes reporteros fluorescentes se verificó la capacidad de la proteína S-layer pura de proteger a cultivos de células eucariotas frente a agentes patógenos bacterianos y virales y su efecto sobre la formación de biofilm en superficies bióticas y abióticas.

Hemos obtenido una disminución considerable en la formación de biofilm de *P. aeruginosa* al tratarla con S-layer de *L. acidophilus*, *L. brevis* y *L. helveticus*. Además se encontró una disminución en la adhesión del patógeno a células A549 en células pretratadas con las proteínas. También se observó disminución de la infección viral de HSV-1 al tratar previamente células A549 con las proteínas S-layer estudiadas a excepción de la S-layer de *L. acidophilus*.

Abstract

2 ABSTRACT

Properties the S layer proteins (S -layer) of probiotic *Lactobacillus* strains: Antiviral and antibacterial effects

The S-layers (surface layer proteins) play a role in the probiotic properties of the strains that influence the immune response and in many cases promoting cell adhesion.

Purified S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 has antimicrobial and antiviral properties that could be exploited. With a similar objective will seek for these properties in the S-layer proteins of strains of *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus kefir*, against different pathogens.

We studied how this bacterial surface structure can influence in the probiotic characteristics such as binding to epithelial cells, and the barrier effect against pathogens (bacteria and virus).

Through construction of *Pseudomonas aeruginosa* strains with fluorescent reporter gene we verified the ability of the purified S-layer protein to protect eukaryotic cell cultures against bacterial and viral pathogens and their effect on biofilm formation on biotic and abiotic surfaces.

A considerable decrease in biofilm formation of *P. aeruginosa* was obtained when this was treated with S-layer of *L. acidophilus*, *L. brevis* and *L. helveticus*. Also we found a decrease in the adhesion of the pathogen to A549 cells pretreated with S-layer proteins. A decrease was observed for viral infection of HSV-1 to A549 cells pretreated with S-layers proteins studied, except that of *L. kefir*.

Objetivos

3 OBJETIVOS

- 1.** Evaluar la capacidad de la proteína S-layer pura de interferir en la formación de biofilms (biopelículas) en superficies bióticas y abióticas (poliestireno) y en la capacidad de adhesión a células epiteliales respiratorias
- 2.** Se analizará la capacidad de la proteína S-layer pura de proteger a cultivos de células frente a diferentes agentes patógenos virales y bacterianos.
- 3.** Se usarán de genes reporteros fluorescentes para el seguimiento postinfección

Introducción

4 INTRODUCCIÓN

4.1 INTRODUCCIÓN PARTE 1

4.1.1 Microbiota intestinal

El intestino humano es el hábitat natural de una población numerosa, diversa y dinámica de microorganismos, principalmente bacterias, que se han adaptado a la vida en las superficies mucosas o en la luz del intestino. El término "microflora" o "microbiota" hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos reunidos en un nicho ecológico determinado. El ecosistema microbiano del intestino incluye especies nativas que colonizan permanentemente el tracto gastrointestinal y una serie variable de microorganismos vivos que transitan temporalmente por el tubo digestivo. Las bacterias nativas se adquieren al nacer y durante el primer año de vida, mientras que las bacterias en tránsito se ingieren continuamente a través alimentos, bebidas, etc.

La población microbiana del intestino humano incluye unos 100 billones de bacterias de unas 500 a 1.000 especies distintas. El estómago y el duodeno albergan un reducido número de microorganismos que se adhieren a la superficie mucosa o en tránsito, típicamente menos de 10^3 células bacterianas por g de contenido. Las secreciones ácidas, biliares y pancreáticas destruyen la mayor parte de microorganismos ingeridos, y la actividad motora propulsiva impide una colonización estable de la luz. El número de bacterias a lo largo del yeyuno y el íleon aumenta progresivamente, desde alrededor de 10^4 unidades en el yeyuno hasta 10^7 unidades formadoras de colonias por g de contenido en el extremo ileal, con un predominio de aerobios Gram negativos y algunos anaerobios obligados. En comparación, el intestino grueso está densamente poblado de anaerobios y los recuentos de bacterias alcanzan densidades de alrededor de 10^{11} unidades formadoras de colonias por g de contenido luminal (concentraciones 10.000 veces mayores que en la luz ileal). En el colon el tiempo de tránsito es lento lo que brinda a los microorganismos la oportunidad de proliferar fermentando los

sustratos disponibles derivados de la dieta o de las secreciones endógenas (Fig. 1) (Guarner, 2007).

La microbiota gastrointestinal es un complejo ecosistema compuesto por microorganismos capaces de promover efectos beneficiosos para la salud y otros, considerados patógenos por su capacidad de afectar al hospedero. El análisis bacteriológico convencional de la flora fecal por aislamiento de bacterias en medios de crecimiento selectivo demuestra que las bacterias anaeróbicas estrictas superan en número a las aeróbicas por un factor de 100 a 1.000. Los géneros predominantes son *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium* y diversos cocos gram positivos anaeróbicos (Guarner, 2007). Entre sus funciones destacan: 1) fermentación de residuos de la dieta y mucinas endógenas; 2) recuperación de energía por generación de ácidos grasos de cadena corta; 3) protección contra colonización e invasión de patógenos y 4) desarrollo, estimulación y modulación del sistema inmune (García, 2009). La supresión de la flora normal claramente genera un vacío local parcial que tiende a llenarse por microorganismos del ambiente o de otras partes del cuerpo. Estos microorganismos se comportan como oportunistas y pueden convertirse en patógenos (Brooks, Butel, & Morse, 2005).

Los lactobacilos, están constituidos por bacterias ácido-lácticas, que crecen en diversidad de condiciones y forman parte de la microbiota normal de la boca, tracto gastrointestinal y genitourinario humano. Sus características ácido-resistentes, le ayudan a persistir en el estómago más tiempo que otras bacterias. . Algunas cepas de *Lactobacillus* spp, se utilizan como bacteria probiótica, término que se refiere a microorganismos no patogénicos que, ingeridos en cantidad adecuada, producen beneficios para la salud más allá de su valor nutricional sin afectar características de la microbiota normal del hospedero. Este microorganismo puede ayudar a prevenir o tratar diversas enfermedades gastrointestinales, ya sea, impidiendo la ocupación de sitios específicos, produciendo sustancias antagónicas o modulando la respuesta inmune. Producen metabolitos conocidos como sustancias antagónicas, entre ellos, ácidos grasos de cadena corta (AGCCs) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Uno de los AGCCs es el ácido láctico, que disminuye el pH impidiendo el desarrollo de diversos microorganismos (García, 2009).

La flora microbiana normal de la vagina juega un papel importante en la prevención de infecciones en el tracto genital y urinario en mujeres. Las bacterias ácido lácticas son dominantes del tracto vaginal en mujeres saludables, específicamente los lactobacilos. Estos forman una barrera que protege la colonización de patógenos por distintos mecanismos y han sido enfocados para tratar pacientes con infecciones del tracto urogenital (UTI), vaginosis bacteriana (BV) y otro grupo de infecciones genitales, excluyendo candidiasis (Pérez, 2004).

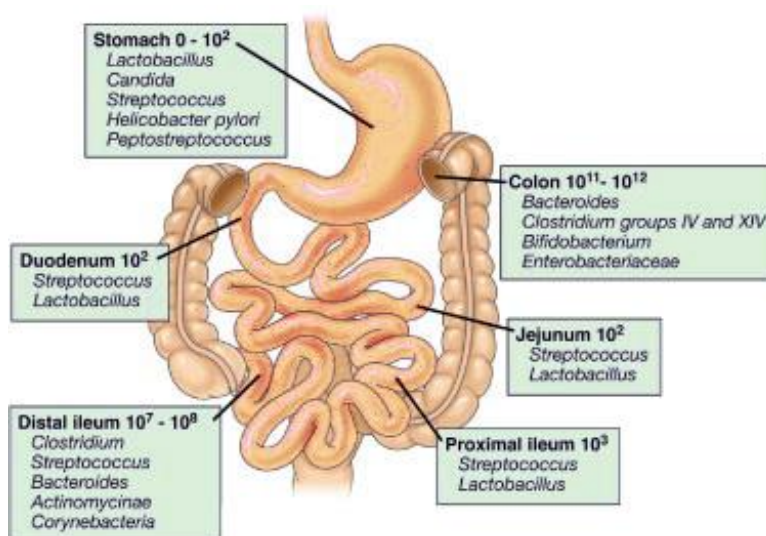


Figura 1: Diferentes microorganismos que componen la microflora intestinal adaptado de Flora microbiana intestinal (Vilca, 2012)

4.1.2 Género *Lactobacillus*

Taxonómicamente, género *Lactobacillus* pertenece al Phylum *Firmicutes*, Clase *Bacilli*, Orden *Lactobacillales*, Familia *Lactobacillaceae*. Ellos son nutricionalmente exigentes, ya que requiere medios ricos para crecer (hidratos de carbono, aminoácidos, péptidos, ésteres de ácidos grasos, sales, derivados de ácidos nucleicos, y vitaminas) (Lebeer, 2008).

Los lactobacilos son bacilos gram positivos que forman parte de la flora normal de la vagina, el tubo digestivo y la orofaringe humanos. Están ampliamente distribuidos en diversos ámbitos (agua de fuentes naturales, aguas servidas, silos) y comprenden parte de la flora

normal de muchas otras especies animales. También se encuentran en distintos alimentos en gran parte debido a su amplia gama de capacidades fermentativas. Algunas especies de *Lactobacillus* se agregan ahora a alimentos como probióticos, por sus efectos beneficiosos para la salud. Las células individuales de especies de *Lactobacillus* a menudo son largas y delgadas, aunque pueden observarse bacilos “corineformes” o “cocobacilos” más pequeños. Algunas especies pueden formar cadenas largas de bacilos. La mayoría de las especies son inmóviles, pero cuando tienen motilidad es por la presencia de flagelación peritrica, son anaeróbicos aunque algunos pueden crecer en condiciones microaerófilas. Son Gram positivos y sólo las células muertas pueden dar resultados variables a la tinción de Gram. Además, no esporulan y algunas cepas presentan cuerpos bipolares que probablemente contengan polifosfato. Los grandes bacilos homofermentativos presentan gránulos internos revelados por tinción de Gram o por tinción con azul de metileno (Winn & col., 2006).

Los lactobacilos se denominan así porque más del 50% de los productos terminales de la fermentación de la glucosa es ácido láctico; algunas especies pueden también producir ácido acético, fórmico y succínico, junto con CO₂. Son uniformemente catalasa negativos y oxidasa negativos, no reducen nitrato, no producen indol ni H₂O, no licuan la gelatina y no forman esporas. Las paredes celulares de las especies de *Lactobacillus* contienen un peptidoglicano grueso y ácidos teicóicos ligados a la membrana (Winn & col., 2006).

Otra característica importante de estos microorganismos es que dada su falta de patogenicidad y su alto perfil de seguridad son considerados como organismos seguros o GRAS (*generally regarded as safe*) en la industria alimenticia; a esto deben su larga historia en la fermentación de distintos productos de consumo humano.

Es difícil distinguir la verdadera cantidad de lactobacilos procedentes de los alimentos fermentados o de la cavidad oral, que es el hogar de una considerable cantidad de lactobacilos, parecen formar solamente una proporción menor de la microbiota fecal humano adulto, es decir, alrededor de 0,01% a 0,6% de los recuentos bacterianos totales. Aunque es menos accesible, los lactobacilos también se identifican comúnmente en muestras de biopsia de estómago, intestino delgado y colon, pero en números variables y por lo general bastante bajos (Lebeer, 2008).

4.1.3 Proteína S-layer

En las bacterias gram-positivas, la pared celular se compone de varias estructuras características: una, peptidoglicano de espesor de capas múltiples (PG), una capa cubierta con proteínas, ácidos teicoicos, y polisacáridos y, en algunas especies, rodeado por una corteza exterior de proteínas cubierto por una capa paracristalina (S-layer). Estas estructuras moleculares proporcionan a las bacterias propiedades características de especies y cepa específicas (Fig 2) (Lebeer, 2008).

En aquellas especies que se envuelven de S-layer, esta constituye el primer nivel de interacción con el medio externo. En algunas especies se ha podido determinar que más de un gen interviene en su síntesis y que estos no se expresan simultáneamente, indicando que responden a diferentes estados o condiciones ambientales.

Las proteínas S-layers son arreglos mono-moleculares cristalinos de una única proteína que se auto ensambla formando multímetros y proveyendo a la bacteria de una capa adicional o S-layer. Estas cubren la superficie externa de la célula representando hasta el 15% de la proteína total. Son una estructura común de la superficie de bacterias y arqueas. Se piensa que en lactobacilos esta estructura tendría un rol en las propiedades probióticas de estas especies. (Prado-Acosta, 2010)

Muchas especies de lactobacilos poseen en sus envolturas una capa adicional de S-layer. Dentro de este género se encuentran especies como *L. acidophilus*, *L. kripatus*, *L. brevis*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. kefir* entre otros. Estas proteínas poseen un rango de masa molecular entre 25 y 71 KDa, siendo de las más pequeñas, ya que en otras especies estas proteínas pueden alcanzar tamaños de hasta 200KDa.

Algunas de las características de las S-layer del género es su alto punto isoeléctrico los cuales están entre 9 y 10, lo que indica la alta basicidad de estas. La composición de aminoácidos característica de S-layer de *Lactobacillus* es de aproximadamente un 35% de residuos básicos. También se observa un bajo contenido en aminoácidos que contienen grupos sulfhídricos, encontrándose en menos de un 2% en la proteína. (Prado-Acosta M. , 2010)

En el género *Lactobacillus*, la proteína S-layer se ha encontrado en varias, pero no todas las especies. Los datos bioquímicos o funcionales han sido publicados sobre las proteínas S-layer de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus hilgardii* y organismos del grupo *Lactobacillus acidophilus*, que incluye *L. acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus gallinarum*.

Todas las proteínas S-layer de *Lactobacillus* caracterizadas hasta el momento están precedidos por un péptido señal de 25 a 32 aminoácidos, lo que indica la secreción a través de la vía secretora general. Las secuencias de aminoácidos de las S-layer varían considerablemente, incluso siendo proteínas de la misma cepa pueden ser marcadamente diferente en secuencia, una notable similitud entre las secuencias de aminoácidos deducidas sólo se puede encontrar entre especies relacionadas, por ejemplo, entre las proteínas S-layer de los antiguos organismos grupo *L. acidophilus* y algunas cepas *L. helveticus*.

Se han desarrollado métodos para la identificación de *L. crispatus* y *L. helveticus* basado en la presencia de los genes de la proteína S-layer, pero la aplicabilidad para *L. helveticus* fue posteriormente cuestionada debido a la heterogeneidad observada dentro de la secuencia de sus genes.

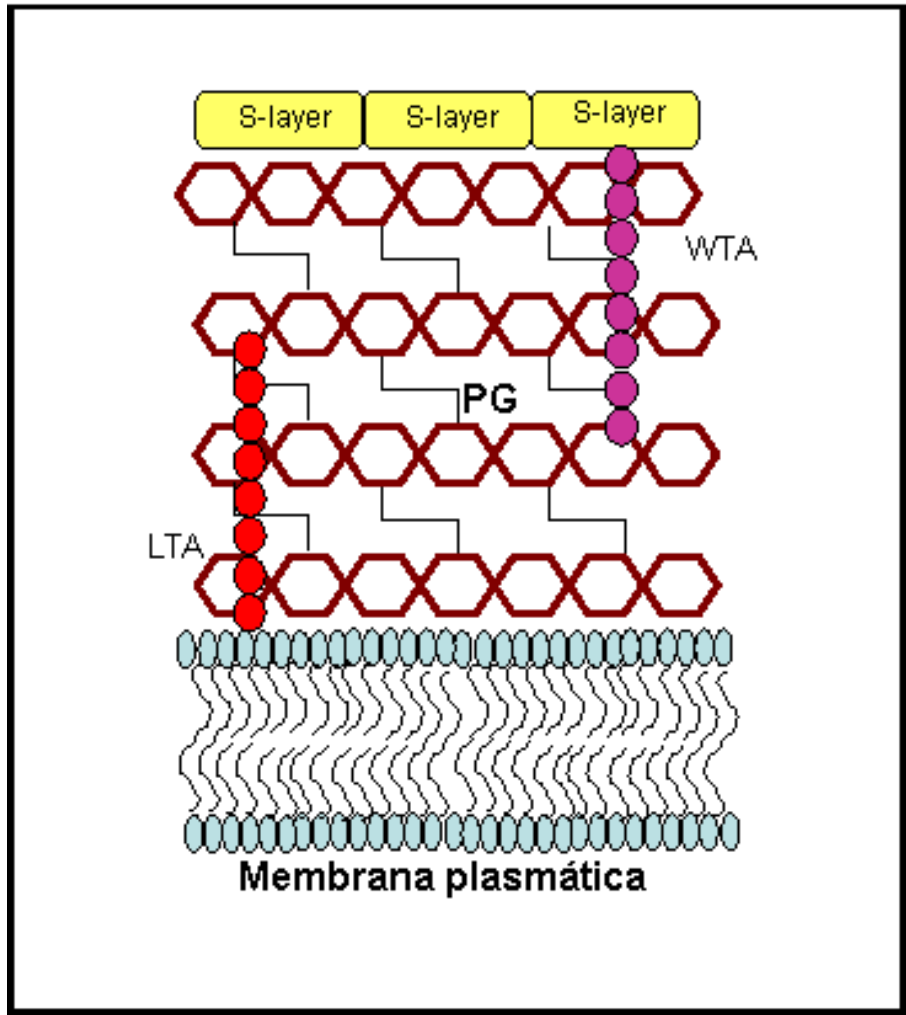


Figura 2 Pared celular de bacterias Gram positivas adaptado de (Prado-Acosta M. , 2010)

4.1.4 *Lactobacillus acidophilus*

La bacteria *Lactobacillus acidophilus* se encuentra de forma natural en el tracto gastrointestinal humano y en ciertas leches fermentadas tradicionales. Algunas cepas de *L. acidophilus* se consideran como probióticos debido a que su consumo en ciertas cantidades puede ejercer diversos beneficios sobre la salud (Estrada, 2007), es una bacteria Gram positiva dominante en el intestino delgado, donde se produce la mayor parte de la digestión. Absorbe la lactosa y la metaboliza formando ácido láctico. Los *Lactobacillus acidophilus* son usados también para producir lácteos fermentados, se usa junto con el *Streptococcus thermophilus* en la producción del yogur. Estos organismos generalmente resisten la acidez

gástrica y sales biliares. Su tasa de supervivencia en el tracto gastrointestinal se estima entre un 2 y 5% y logran concentraciones suficientes en el colon (10^6 - 10^8 UFC/ml). Dependiendo de la cepa varía su capacidad de adhesión intestinal, los efectos favorables sobre la digestibilidad de lactosa y su habilidad para prevenir diarrea (Guevara, 2011).

Por otro lado, *acidophilus* quiere decir con afinidad por los ácidos. Esta bacteria crece, fácilmente, en medios mucho más ácidos que los ideales para otros microorganismos (pH 4-5 o menores) y crece en condiciones óptimas entre 37°C y 45 °C. El *L. acidophilus* crece de manera natural en una gran variedad de alimentos, incluidos la leche, la carne, el pescado y los cereales. No solo está presente en los intestinos de los animales y en el del propio ser humano, sino también en la boca y la vagina. Ciertas variedades genéticamente similares (conocidas como heterofermentivas) también producen etanol, dióxido de carbono y ácido acético como subproductos (hay que reseñar que el *L. acidophilus* produce exclusivamente ácido láctico). En el tubo digestivo *L. acidophilus* comparte con los microorganismos que lo acompañan el uso de los mismos nutrientes entrando así en competencia con ellos. Durante la digestión, asiste al intestino humano con la producción de vitamina B3 (niacina), ácido fólico y vitamina B6 (piridoxina). Algunos estudios demostraron que *L. acidophilus* puede ayudar a la deconjugación y separación de ácidos grasos por los ácidos biliares, que posteriormente pueden ser reciclados por el cuerpo. Cepas de *L. acidophilus* son utilizadas como probióticos ya que mantienen un balance sano de la flora intestinal al producir compuestos orgánicos, como el ácido láctico, que aumentan la acidez intestinal e inhiben el desarrollo de muchas bacterias nocivas (Sanders & Klaenhammer, 2010).

4.1.4.1 Proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus*

El proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 se compone de una única proteína S (SA proteína) de alrededor de 45 kDa, que se ha caracterizado extensamente por H. Peter Pouwels y colaboradores. La función de las S-layer de estos organismos es desconocida, pero puede ser importante para la adhesión bacteriana a las células epiteliales intestinales y componentes de la matriz extracelular (Fina Martin y col., 2015 resultados no publicados)

Estudios realizados en nuestro laboratorio permitieron la caracterización de una nueva función biológica de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* que no había sido descrita previamente. La capacidad de murein-hidrolasa es una característica nueva que cumpliría un rol adaptativo en esta bacteria. La actividad lítica de la proteína S-layer se demostró sobre la pared celular y células enteras de *Salmonella entérica* serovar *newport* usada como patógeno modelo y también en condición de co-cultivo (Prado-Acosta, Tesis doctoral 2010).

La actividad hemaglutinante de *L. acidophilus* JCM 1034 y las actividades de unión a mucina de cepas relacionadas, mostraron estar vinculadas a sus proteínas S-layer, aunque no se puede descartar la participación de otros componentes con esta actividad tipo lectina, y/o el efecto de agregación de las proteínas S-layer (Hynönen & Palva, 2013).

4.1.5 *Lactobacillus brevis*

Lactobacillus brevis es una bacteria probiótica que consta de alrededor de 16 diferentes cepas, las cuales tienen efectos beneficiosos para la salud. Se puede encontrar como aditivo en algunos productos alimenticios, tales como yogur, pero es mejor cuando se toma en forma de suplemento, se utiliza para tratar la vaginitis, infecciones del tracto urinario, promover una mejor función inmune, y como una ayuda en la salud digestiva en general. *L. brevis* produce ácido láctico y es capaz de sobrevivir el ambiente ácido extremo del tracto gastrointestinal. Es un importante contaminante de cerveza en mal estado. Este puede crecer en la cerveza a pesar de la presencia de compuestos antibacterianos que dan a la cerveza un sabor amargo. La resistencia en *L. brevis*, al menos en parte, depende de la expresión del gen *horA*. La secuencia de aminoácidos deducida de *horA* es 53% idéntica a la de *LmrA*, un transportador de múltiples fármacos de unión a ATP en *Lactococcus lactis* (Sakamoto y col., 2001)

La proteína S-layer es la principal proteína de la célula, con una masa molecular aproximado de 46 kDa en electroforesis en gel de sodio dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) (Vidgren y col., 1992). La proteína S-layer de *L. brevis* ATCC 8287 actúa como una adhesina

con afinidad por las células epiteliales humanas y fibronectina (Hynönen, 2002), como se revela mediante la expresión de fragmentos de SlpA en un sistema de visualización de superficie basados en flagelos de *Escherichia coli* H7 81 aminoácidos de la Parte N-terminal de SlpA son suficientes para conferir unión a células epiteliales. (Hynönen & Palva, 2013)

La síntesis muy eficiente de las proteínas S-layer en lactobacilos es alcanzada por diversos medios: 1) Se ha determinado que las vidas medias de los transcritos de genes de esta proteína son excepcionalmente largos (14 a 15 min para los genes de la proteína S-layer de *L. brevis* ATCC 8287 y *L. acidophilus* ATCC 4356, respectivamente). 2) Se ha observado un uso sesgado de codones, en correlación con la expresión génica eficaz para los genes de la proteína S-layer de *L. brevis* ATCC y *L. acidophilus* ATCC 4356. 3) Los promotores de genes de la proteína S-layer son eficientes, tanto como promotores que se han utilizado en la expresión heteróloga y en sistemas de producción de proteínas. 4) La presencia de dos promotores, que pueden actuar mejorando y/o regulando la expresión génica, se identificó aguas arriba del gen de *L. brevis* SlpA ATCC 8287, SlpB de *L. brevis* ATCC 14869 y SlpA de *L. acidophilus* ATCC 4356. En *L. brevis* ATCC 8287, ambos promotores *slp* mostraron ser activos, mientras que en *L. acidophilus* ATCC 4356, sólo el promotor aguas abajo es funcional en las condiciones ensayadas (Hynönen & Palva, 2013)

4.1.6 *Lactobacillus helveticus*

Lactobacillus helveticus es una de las especies de bacterias ácido láctico más comúnmente utilizados en la producción de bebidas de leche fermentada y algunos tipos de queso. La naturaleza versátil de esta bacteria se basa en su sistema proteolítico altamente eficiente que consiste en proteasas de la superficie celular, sistema de transporte y peptidasas intracelulares. Además del uso de *L. helveticus* en aplicaciones industriales como en el procesamiento de queso, y la producción de preparaciones de leche fermentada, este se ha convertido además en un organismo con propiedades beneficiosas para la salud. Los estudios han demostrado que los productos lácteos fermentados son capaces de disminuir la presión arterial, estimular el sistema inmune, la promoción de la absorción de calcio, y ejercer un efecto anti-virulento contra los patógenos. Estos efectos beneficiosos son producidos por una

variedad de péptidos liberados durante la hidrólisis de proteínas de la leche por el sistema proteolítico de *L. helveticus*, que proporciona la bacteria con sus requerimientos nutricionales para el crecimiento. En los últimos años, los estudios se han centrado en la comprensión de los factores que afectan a la cinética de la hidrólisis de proteínas de la leche por cepas específicas y se han concentrado en el efecto del pH, la temperatura, la fase de crecimiento, y composición del sistema enzimático bacteriano (Griffiths & Tellez, 2013).

L. helveticus muestra una moderada capacidad de supervivencia en el entorno gastrointestinal sin embargo, se observa una excelente capacidad de unión a las células epiteliales intestinales humanas, junto con significativa autoagregación e hidrofobicidad de la superficie celular. La proteína S-layer es responsable de las propiedades de la superficie celular de esta cepa.

L. helveticus induce un aumento del nivel de secreción de citoquina antiinflamatoria IL-10 en células mononucleares de sangre periférica, y también es capaz de disminuir los efectos proinflamatorios de lipopolisacárido (LPS) en la línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7 mediante la inducción de niveles más altos de IL-10. La adición de la proteína S-layer purificada no influyó en la producción de IL-10. *L. helveticus* puede ser útil en el desarrollo de productos naturales para la prevención o tratamiento de enfermedades asociados con la inflamación (Rong & col, 2015).

4.1.7 *Lactobacillus kefir*

Lactobacillus kefir aisladas tiene la capacidad para antagonizar la interacción entre *Salmonella entérica serovar* (enteritidis) con células epiteliales. Las diferentes cepas de *L. kefir* mostraron diferentes capacidades de adhesión, seis cepas fueron capaces de autoagregación y coagregación con *Salmonella*.

En la coincubación de *Salmonella* con cepas de *L. kefir* coagregadas disminuyó significativamente su capacidad para adherirse y para invadir células Caco-2/TC-7. Esto no se observó con cepas de *L. kefir* no coagregadas (Golowczyc, 2007)

Se encontró una correlación entre las propiedades de las estructuras secundarias de las proteínas S-layer de las cepas de *Lactobacillus kefir*: se encontró un alto porcentaje de

contenido de β -hoja (40-50%) para cepas no coagregadas, mientras que este porcentaje se redujo a 25-30% para las cepas coagregadas (Mobili & col., 2009).

Salmonella previamente tratada con proteínas S-layer extraída de cepas de *L. kefir* coagregadas y no coagregadas fueron incapaces de invadir las células Caco-2/TC-7. Después del tratamiento, se detectó proteína S-layer de *L. kefir* asociado con *Salmonella*, lo que sugiere un papel protector de esta proteína ante la invasión de *Salmonella* (Golowczyc & col., 2007).

Se estudió in vitro la capacidad de las proteínas de la S-layer de las cepas *Lactobacillus kefir* para antagonizar los efectos citopáticos de las toxinas de *Clostridium difficile* (TcdA y tcdB) en células eucariotas, se ensayó mediante la observación de desprendimiento celular. Las proteínas S-layer de *L. kefir* fueron capaces de inhibir el daño inducido por *C. difficile* en las células Vero (Carasi, 2012).

La simetría de la estructura de las proteínas S-layer de *Lactobacillus* conocida es oblicua o hexagonal. Hasta la fecha solo se ha determinado una estructura de glicano para la proteína S-layer de *Lactobacillus* en *L. buchneri*, mientras que para *L. kefir* se han descrito proteínas de S-layer glicosiladas de aproximadamente 60.7KD (Hynönen & Palva, 2013).

4.2 INTRODUCCIÓN PARTE 2

4.2.1 Efectos beneficiosos de *Lactobacillus*

Cuando están presentes en número suficiente actúa como probiótico, se cree que los lactobacilos son capaces de crear un equilibrio entre la microflora beneficiosa y potencialmente perjudicial en el intestino. El potencial de cepa probiótica de *L. acidophilus* se ha demostrado por la capacidad de resistir los procesos de digestión en el tracto gastrointestinal y por ser resistente a la bilis (Frece & Kos, 2005).

Son la mejor evidencia para el tratamiento y prevención de las infecciones entéricas y síndromes posteriores a los antibióticos. Varios análisis han establecido la eficacia de algunos lactobacilos en la diarrea infecciosa aguda y la prevención de la diarrea asociada a antibióticos. Ciertos lactobacilos puede reducir la recurrencia de la diarrea asociada a *Clostridium difficile* y prevenir la enterocolitis necrotizante en recién nacidos prematuros. Algunos resultados prometedores se han obtenido también para la prevención y tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino, la prevención de cáncer colorrectal, y el tratamiento del síndrome del intestino irritable. Aunque el tracto gastrointestinal es el sitio donde se cree que los lactobacilos probióticos ejercen la mayoría de las actividades de salud de modulación, aplicaciones probióticas con algunas cepas de *Lactobacillus* en otros sitios del cuerpo han demostrado ser prometedores, como la prevención y tratamiento de las enfermedades urogenitales y vaginosis bacteriana en mujeres, la prevención de la enfermedad atópica y la hipersensibilidad alimentaria, y la prevención de la caries dental. Los lactobacilos probióticos tienen un alto perfil de seguridad, reconocido por un estado "generalmente considerados por uso seguro", y la tolerancia es generalmente excelente. Sin embargo, en casos raros, se han informado infecciones presumiblemente causadas por lactobacilos probióticos en pacientes inmunocomprometidos o pacientes con enfermedades subyacentes graves (Lebeer, 2008).

Uno de los mecanismos de acción de *Lactobacillus* es la inducción de un pH ácido por debajo de 4: En parte por la producción de AGCC, como acetatos, butiratos, etc. Estos AGCC pueden llegar a unas concentraciones que impidan el crecimiento de gérmenes. El pH ácido

favorece el crecimiento de las bacterias tolerantes del ácido. Algunos prebióticos, como los lactobacilos, generan peróxido de hidrógeno, que reduce el pH luminal y el potencial redox, y produce bactericinas que inhiben el crecimiento de las bacterias patógenas y, en ocasiones, mediante la presión baja de oxígeno favorecen el crecimiento de anaerobios. Otros actúan produciendo gran cantidad de ácido láctico, como *L. salivarius*, que ha demostrado su utilidad en el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* y en la reducción de la inflamación de la mucosa gástrica, ayudan al restablecimiento de la flora normal tras una gastroenteritis aguda, que disminuye la permeabilidad intestinal y potencia el efecto barrera inmunológico (Carnicé, 2006).

4.2.2 Efecto antimicrobiano de S-layer

La Mureína hidrolasa son importantes para una respuesta de adaptación a las condiciones ambientales que podrían resultar de una relación antagónica en el mismo nicho ecológico. El tracto gastrointestinal determina la coexistencia de especies gram-negativas y gram-positivas, con una alta resistencia osmótica, a gradientes de pH, a condiciones anaeróbicas, y a la variabilidad de nutrientes, lo que resulta en una competición por la supervivencia. La actividad hidrolasa mureína proporciona a S-layer de lactobacilos un medio adicional para tener éxito y sobrevivir. Debido a la actividad lítica contra las células enteras de *Salmonella serovar Newport* observada, podríamos preguntarnos si estas características de la S-layer puede ser quienes den las propiedades probióticas a *Lactobacillus acidophilus*. Serían necesarios ensayos in vivo para saber si la inhibición de la adhesión de las bacterias gram-negativas y la exclusión competitiva de patógenos que se han reportado para S-layer están asociados con la actividad antibacteriana informada. (Prado-Acosta M. , 2008)

4.2.3 Efecto antiviral de S-layer

Se sabe poco sobre el mecanismo de protección ejercido por lactobacilos vaginales hacia la infección por HSV-2. Recientemente se ha informado que filtrados de células de dos cultivos de *Lactobacillus* inhibieron la replicación de HSV-2. Trabajos previos han demostrado que

la presencia de células viables de *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus brevis* durante la replicación de HSV-2 en cultivo celular redujo el rendimiento del virus en más del 90%. El rendimiento de HSV-2 fue también significativamente reducido en las células infectadas en contacto con sobrenadantes libres de células de lactobacilos en medio de cultivo celular.

La proteína S-layer de *L. brevis* podría ser la responsable de la actividad antiviral. Se ha informado que un exopolisacárido de *Bacillus licheniformis* afecta la replicación de HSV-2 en cultivo celular. Entre las moléculas asociadas a la superficie, los polisacáridos son buenos candidatos como agentes antivirales (Mastromarino & col., 2011).

Se han descrito que los lactobacilos tienen actividad antiviral aunque, la naturaleza de este efecto no se ha establecido claramente. Se evaluó el efecto de la proteína S-layer de *L. acidophilus* purificada sobre la infección del virus Junín (JUNV) para aportar pruebas sobre el papel de esta proteína en la exclusión de patógenos y en la búsqueda de nuevos agentes antivirales con estatus GRAS. Los experimentos utilizando células 3T3 que expresan de forma estable DC-SIGN, mostraron una inhibición casi completa de la infección por JUNV cuando fueron pretratadas con S-layer. Como nueva característica se puede decir que esta proteína actúa como agente antiviral para inhibir varios tipos de virus (Martínez & col., 2012).

4.2.4 Efecto inmunomodulador

El sistema inmunitario consta de diferentes órganos, como los ganglios linfáticos, intestino, bazo, médula ósea, etc., así como de diferentes tipos celulares, linfocitos, macrófagos, células dendríticas etc. Las interacciones antigénicas entre dichas células inducen a una respuesta inmunitaria mediada por células activadas y a una respuesta humoral mediada por anticuerpos. Las interacciones celulares están aumentadas por moléculas "de adhesión" y las células activadas liberan diferentes citoquinas. Estas complejas interacciones celulares conducen a la respuesta inmunitaria sistémica. Si el antígeno penetra por vía oral, se obtiene sobre todo una respuesta inmunitaria mediada por la inmunoglobulina (Ig) A secretora (IgA

S). La determinación del número de células B o T, la producción cualitativa o cuantitativa de las citoquinas, el nivel de anticuerpos o el estudio de la función celular, tal como la actividad fagocítica, son usadas para evaluar el estado de la respuesta inmunitaria. Las bacterias probióticas productoras de ácido láctico y, en general, todas las probióticas, tienen mecanismos de acción que pueden influir y modular todas las respuestas inmunitarias, mediadas por el tejido linfoide asociado al intestino.

El estímulo de la inmunidad secretora, con el aumento de la producción de IgA S se lleva a cabo mediante interacciones complejas entre los diferentes constituyentes del ecosistema intestinal, como la microbiota, las células epiteliales y las células inmunes. Este aumento de la IgA S es interesante en la defensa contra infecciones de cualquier etiología; sabemos que la IgA S es un dímero que se une al antígeno e impide su interacción con la célula epitelial. Se demostró que ciertas bacterias productoras de ácido láctico como (*L. casei*, *L. delbrueckii* spp., *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *Lactococcus lactis* y *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus*) son capaces de inducir una inmunidad secretora específica, mientras que otras aumentaban la respuesta inflamatoria del intestino. La administración oral de estas bacterias induce a un aumento de las células B IgA+, además de inducir a la IgA a interactuar con las células M de las placas de Peyer. En otras ocasiones también podían estimular las células IgM+ (Carnicé, 2006).

Durante los últimos años, el número de aplicaciones desarrolladas o sugeridas para las proteínas S-layers de *Lactobacillus* ha ido aumentando gradualmente. Actualmente, uno de los campos ampliamente estudiados es la construcción de proteínas de unión S-layer como uso en la inmunización en el hombre o los animales. Especialmente el desarrollo de cepas vivas de *Lactobacillus* que llevan S-layer híbridas en su superficie, es de sumo interés, ya que dichas cepas tienen gran potencial como vacunas mucosas in vivo (Hynönen & Palva, 2013).

Con un adecuado conocimiento de la microbiota intestinal normal, y de las complejas interacciones de las bacterias productoras de ácido láctico con el sistema inmune, pueden realizarse estudios que impliquen la selección de una cepa determinada de probióticos con propiedades inmunoestimulantes, que podría usarse como vectores de vacunas orales. (Carnicé, 2006)

4.3 INTRODUCCIÓN PARTE 3

4.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram-negativa perteneciente a la rama de las proteobacterias. Dentro del género *Pseudomonas* se encuentran también algunas otras especies como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* y *P. alcaligenes*.

P. aeruginosa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, es un habitante común en agua, suelos y plantas. En los hospitales puede ser encontrada en respiradores, humidificadores, vertederos, duchas, piscinas de hidroterapia y ocasionalmente en las manos de los trabajadores de la salud. *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista, responsable de una amplia gama de infecciones, principalmente nosocomiales. Particularmente los pacientes con inmunosupresión, así como aquellos que han sufrido quemaduras severas, neutropenia inducida por quimioterapia o presentan enfermedades pulmonares subyacentes están propensos a desarrollar la infección. *P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a diversas clases de antibióticos que no guardan relación estructural entre sí, debido a la disminución de la permeabilidad de su membrana externa, a la expresión constitutiva de varias bombas de expulsión y a la producción de enzimas que inactivan a los antibióticos. Además, posee la capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia vía mutaciones.

Ocasionalmente *P. aeruginosa* puede colonizar partes del cuerpo humano, sin embargo, la prevalencia de esta colonización en personas saludables es baja. En los pacientes adultos con bronquiectasias *P. aeruginosa* es uno de los patógenos más frecuentemente aislados con efectos negativos en cuanto a la morbimortalidad y a la calidad de vida de los pacientes. La presencia de *P. aeruginosa* está asociada con una mayor producción de esputo, mayor extensión de la bronquiectasis y mayor frecuencia de hospitalizaciones. El deterioro de la función pulmonar en pacientes con bronquiectasis es más rápido en aquellos crónicamente colonizados por *P. aeruginosa* que en los colonizados por otros microorganismos. En la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la cual está asociada con una intensa

inflamación de las vías aéreas y un pobre pronóstico, *P. aeruginosa* es reconocida como un patógeno relevante. La identificación de *P. aeruginosa* en el curso de una EPOC es un factor predictivo mayor de la exacerbación de la enfermedad. Un reporte reciente respalda la hipótesis de que *P. aeruginosa* causa infecciones crónicas en la EPOC, con patrones de infección y evolución que se asemejan a las observadas en la fibrosis quística (Lujan, 2014).

4.3.2 Interacción *Pseudomonas aeruginosa* con células del tracto respiratorio

Las células epiteliales de la mucosa son un componente importante del sistema inmune innato que forma una barrera física e inmunológica a las bacterias inhaladas. Mientras que muchos productos de genes bacterianos activan las células de la mucosa de las vías respiratorias, son especialmente los flagelos los principales inmunoestimulantes.

La función de la motilidad proporcionada por flagelos es esencial para las etapas iniciales de la infección respiratoria ocasionadas por oportunistas tales como *Pseudomonas aeruginosa*. Estructuras de superficie de *P. aeruginosa*, tales como pili, lectinas y otras adhesinas pueden adherirse e interactuar con las células epiteliales de las vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística. En la parte apical de las células epiteliales están presentados los Toll-like receptors, que responden a componentes bacterianos conservados como el peptidoglicano y lipopolisacáridos, y facilitan el reconocimiento bacteriano y las respuestas inflamatorias subsiguientes. Se cree que los Toll-like receptor responden específicamente a la flagelina bacteriana produciendo una transducción de un sin número de cascadas de señalización de proteínas proinflamatorias, incluyendo la inducción de los flujos de Ca^{2+} , la activación de NF- κ B, IL-8, matrilisina, y la expresión de mucina (Prince, 2006). La adhesión de *P. aeruginosa* a los receptores celulares de la vía respiratoria es el evento inicial en el establecimiento de la colonización respiratoria e infección crónica posterior. La afinidad de *P. aeruginosa* para unirse a las células epiteliales inflamadas o lesionadas (Fibrosis quística o pacientes ventilados mecánicamente) es significativamente mayor que la afinidad para unirse a superficies de las células normales; la prevención de la adherencia

bacteriana podría minimizar la patología pulmonar en pacientes de alto riesgo (Ghada & col., 2014)

4.3.2.1 Factores de virulencia

P. aeruginosa produce una amplia variedad de factores de virulencia, por lo tanto, la patogénesis de esta bacteria puede ser descripta como multifactorial. Algunos de estos factores son el flagelo, fimbrias (pili), matriz exopolisacárida, toxinas, exoenzimas y biopelículas. Algunos muy estudiados son el alginato (polímero de polisacáridos), la exotoxina A y el sistema de secreción de tipo III. El alginato (producido por un subgrupo de cepas), que facilita la adherencia a la superficie epitelial pulmonar, y es una barrera para los fagocitos, para los antibióticos e inhibe a los anticuerpos y atenúa la respuesta del hospedador. La exotoxina A daña el epitelio alveolar y las células endoteliales pulmonares, inhibe la síntesis de proteínas de la célula hospedadora y afecta la respuesta del hospedero a la infección. El sistema de secreción de tipo III es el responsable de la secreción de las toxinas ExoS, ExoT, ExoU y ExoY; las primeras tres han sido vinculadas a la virulencia (Lujan, 2014).

4.3.3 Herpes simplex virus tipo I

Dentro del género Simplex virus debemos distinguir dos tipos virales: HSV-1 y HSV-2. Estos virus están asociados a infecciones y daño de tejidos superficiales, mucosas, epitelios, piel, córnea y, con menor frecuencia, producen daño encefálico, hepático y otras localizaciones, incluyendo infecciones generalizadas. Las más frecuentes son las infecciones faciales, genitales y oculares. En forma muy relativa se asoció el HSV-1 a las infecciones “del ombligo” hacia arriba y al HSV-2 a las de localización genital. En realidad, en la actualidad existe siempre un porcentaje importante y variable de infecciones genitales inducidas por el tipo 1 y faciales producidas por el tipo 2.

Desde muy temprana edad, la mayoría de los individuos toma contacto con estos agentes, generando una cantidad importante de infecciones asintomáticas. Un porcentaje de individuos desarrolla la clásica lesión vesicular y costra en la región facial, con mucho menos preponderancia en la localización ocular. Dicha lesión vesicular es también esporádica en la infección genital. La prevalencia de la infección por virus herpes simple, es prácticamente del 100% en la edad adulta. La infección herpética por HSV-1 y HSV-2 no tiene ningún reservorio fuera del humano. Las fuentes corrientes de infección son las secreciones provenientes de las vesículas (etapa de mayor capacidad infectiva) y de las úlceras: en la etapa de costra la concentración viral es mínima o nula. Es de importancia relevante el hecho de que existe liberación de virus infeccioso en mucosas y/o epitelios en los que no puede evidenciarse ningún tipo de lesión (recurrencia asintomática). Este puede transmitirse por contacto íntimo de las mucosas, epitelios y piel con secreciones de lesiones activas o, como antes se ha mencionado, con virus producido en tejidos no lesionados. La transmisión sexual de las infecciones genitales está comprobada. El virus se libera al exterior de las células epiteliales que infecta y está presente en alta concentración en el contenido de las vesículas. También el virus alcanza otras células (dentro del mismo individuo) a través de la fusión de las membranas de dos células contiguas, por lo cual en estas condiciones el virus no toma contacto con el medio externo y escapa así a la vigilancia mediada por anticuerpos.

4.3.3.1 Estructura del virus

La estructura de la partícula viral de HSV-1 es bastante compleja ya que posee 40 proteínas de origen viral y celular (fig 3). El core está compuesto por ADN doble cadena lineal envuelto como un toroide. El genoma de HSV-1 posee 152.261 pares de bases que codifican para al menos 84 proteínas. Muchas de ellas son enzimas esenciales para el metabolismo de nucleótidos (como por ejemplo la timidina quinasa), para la replicación del ADN (la ADN polimerasa entre otras), para la reparación del ADN y para las modificaciones post-transcripcionales. Rodeando el core se encuentra la cápside icosaédrica que está formada por 162 capsómeros, de los cuales 150 son hexaméricos y 12 son pentaméricos. Las proteínas principales que forman la cápside son: VP5 (proteína mayoritaria que forma los hexones y pentones), VP26, VP23 y VP19C. Alrededor de la cápside se encuentra un material amorfo fibroso dispuesto en capas, llamado tegumento, compuesto por 26 proteínas que participan en diferentes eventos como el transporte de la cápside al núcleo y en la activación de la transcripción de genes tempranos, entre otros. Por fuera del tegumento está la envoltura del virión, compuesta por una doble capa lipídica, once glicoproteínas y dos proteínas sin glicosilar. Las glicoproteínas median la adsorción y la entrada del virus a la célula, entre otras funciones (Kukhanova, Koroniva, & Kochetov, 2014)

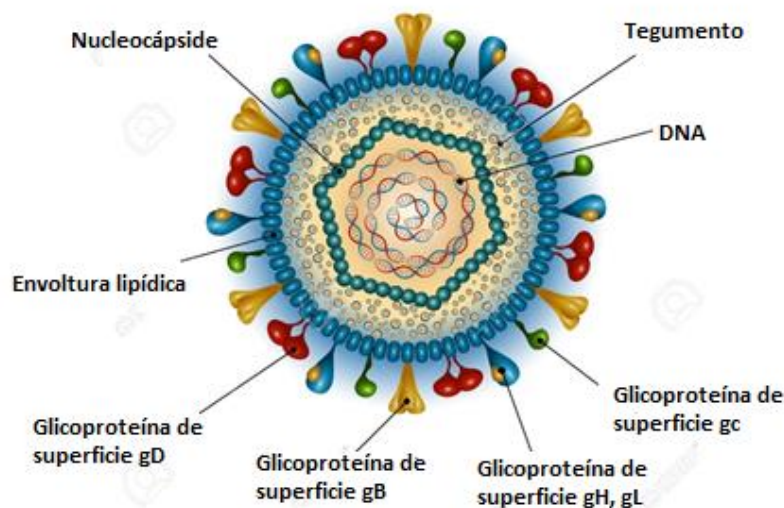


Figura 3 Estructura de Herpes simplex virus adaptado de (http://es.123rf.com/imagenes-de-archivo/herpes_simplex_virus.html)

4.3.3.2 Huéspedes susceptibles

Las características epiteliotropas de los herpesvirus HSV-1 y HSV-2 hacen posible que puedan infectar otras especies pero es epidemiológicamente irrelevante.

Cuando se inoculan cultivos celulares, todas las células ensayadas han resultado permisivas. Prácticamente todos los animales de laboratorio estudiados son también susceptibles a la infección experimental. En resumen y pese a la posibilidad biológica, no existe ningún huésped fuera del humano que tenga importancia epidemiológica en el mantenimiento de la endemia.

Los virus HSV pueden inducir infección en cualquier tipo de células de los tejidos humanos, pero evidentemente tienen una afinidad altamente significativa por las mucosas y epitelios de la cara y ojos, y por el de los genitales. En condiciones como las que presenta el recién nacido, al que se agregan problemas por otras patologías, el virus puede producir infección generalizada probablemente por ser transportado en macrófagos móviles infectados, con lo que puede generar neuropatías, atacar a los hepatocitos, células renales, pulmonares, etcétera. Exactamente lo mismo ocurre en los huéspedes inmunocomprometidos. Fuera del estado de latencia ya descrito, la infección por HSV termina con la desorganización de la estructura celular en la mayoría de los casos.

Materiales y métodos

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 CEPAS UTILIZADAS

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356, *Lactobacillus brevis* ATCC 14869, *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046, *Lactobacillus kefir* JCM 5818, propagadas en MRS a 37°C

Klebsiella pneumoniae, propagada en LB a 37°C

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Pseudomonas aeruginosa PAO-1 propagada en LB a 30°C

5.2 CULTIVOS CELULARES

La línea tumoral A549, derivada de epitelio alveolar humano tipo II fue crecida en medio mínimo esencial de Eagle (MEM, Gibco) en solución salina balanceada de Earle, suplementado con 5% de suero fetal bovino (MEM 5% SFB) y HEPES. Las monocapas fueron subcultivadas semanalmente y mantenidas a 37°C en estufa gaseada (5% CO₂).

5.3 VIRUS

Las cepas de HSV-1 que se emplearon fueron la cepa salvaje KOS la cepa fue propagadas en células Vero.

5.4 PLÁSMIDO

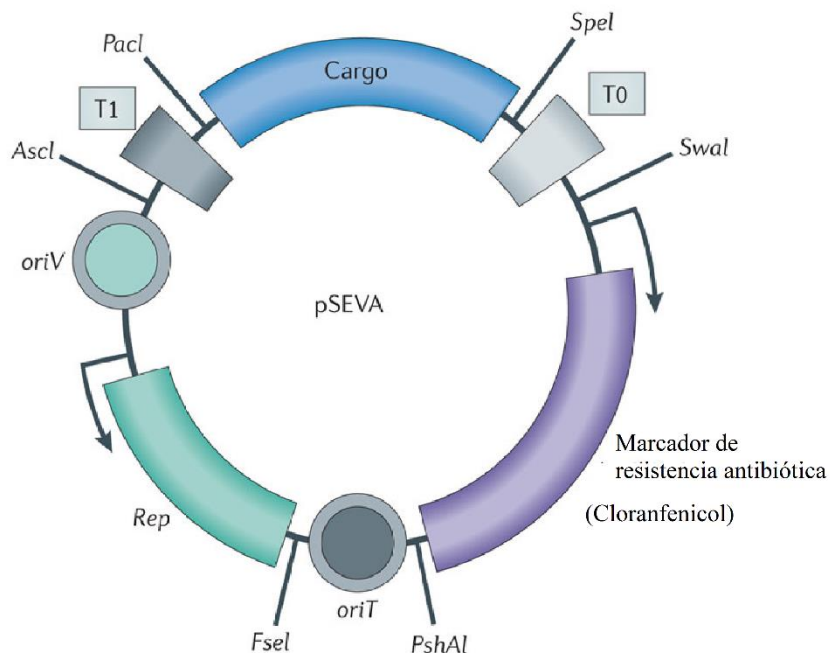


Figura 4 Representación esquemática estándar de la arquitectura del plásmido pSEVA. Modificado de (Silva & col., 2013)

5.5 MEDIOS DE CULTIVO

LB: Extracto de levadura 5 g/L, Triptona 10 g/L, Cloruro de sodio 5g/L.

LB Cloranfenicol: LB + 50mg/ml de cloranfenicol

LB agar: LB + 1,5% Agar

MRS: Peptona de caseína 19g/L, Extracto de levadura 4 g/L; Extracto de carne 8 g/L, D(+) Glucosa 20 g/L, Fosfato de Potasio di-básico 2 g/L, Citrato de Amonio 2 g/L, Acetato de sodio 5 g/L, Sulfato de magnesio 0,2 g/L, Sulfato de manganeso 0,04 g/L.

MRS agar: MRS + 1.5% Agar

Cetrimida agar base: Peptona de gelatina 20g/L, Cloruro de Magnesio 1.4g/L, Sulfato de Potasio 10g/L, Agar 13.6g/L, Cetrimida 0.3g/L

MEM 5% SFB: Medio esencial mínimo con 5% de Suero fetal bovino.

5.6 MANIPULACIÓN PROTEÍNAS DE *LACTOBACILLUS*

5.6.1 Aislamiento y purificación de la proteína S-layer de *Lactobacillus*

Diferentes métodos han sido desarrollados para el desprendimiento de la S-layer y para su desintegración en unidades protoméricas (Sleytr & Margit, 2000). Las proteínas S-layer no se encuentran covalentemente unidas entre sí, así como tampoco lo están a la pared celular que las sostiene, esto hace que se puedan desagregar fácilmente con agentes desnaturizantes, como el hidrocloreuro de guanidinio y sustitución catiónica con el cloruro de litio (LiCl) (Prado-Acosta M. , 2010).

Para esto cada una de las proteínas S-layer fue aislada de cultivos de 50ml de células de cada uno de los *Lactobacillus* crecido en MRS 24 horas a 37°C. Las células se cosecharon por centrifugación a 2500g por 15 min. a T. ambiente. El pellet obtenido fue lavado con 10 ml de PBS estéril y se vortexeó vigorosamente para lavar las células del medio de cultivo. Se centrifugó nuevamente obteniendo un pellet de células sin medio contaminante. A este se le agregaron 3 ml de 6 M LiCl estéril y se vortexeó por 1-2 min. para desprender la capa de proteína S-layer. Se dejó girando a T.amb por 30 min. y se centrifugó a 2500g por 15 min. Se tomó el sobrenadante (con precaución de no tocar el pellet con restos de componentes celulares) y se lo dializó contra agua destilada 24 horas en cámara fría. Una vez dializada la muestra se centrifugó a 20000g por 20 min. en frío. Se descartó el sobrenadante conteniendo sales y otros contaminantes y se dejó secar el pellet. Este último se resuspendió en 500 µl de H₂O destilada estéril y se conservó a -20°C.

5.6.2 Determinación de la concentración de proteínas

Se determinó la concentración de cada una de las S-layer en NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer, usando coeficiente de extinción y peso molecular de cada proteína.

Tabla 1 Coeficiente de extinción y peso molecular de cada una de las S-layers

	Coeficiente de extinción 1/m.cm	Peso molecular KDalton
<i>L. acidophilus</i>	31270	46569
<i>L. brevis</i>	66700	48159
<i>L. helveticus</i>	32780	46702
<i>L. kefir</i>	44810	60703

5.6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS_PAGE)

Las proteínas se corrieron en un gel SDS-PAGE al 12.5% y un gel concentrador al 4,5%, en buffer de corrida (Tris base 15 g/l, Glicina 72 g/l, SDS 5 g/l) con una cuba Mini-Protean® II Electrophoresis Cell (BioRad), a temperatura ambiente. Junto con las muestras se corrió un marcador de peso molecular preteñido (Fermentas), a fin de conocer el peso correspondiente a la proteínas de interés detectadas por Western blot.

La corrida electroforética se realizó a voltaje constante de 100 volts durante dos horas en buffer de corrida.

5.6.4 Tinción de geles de poliacrilamida con Coomasie Blue R_250.

Los geles se tiñeron en una solución de 0,2% de Coomasie Brilliant Blue R& 250 en 45% de metanol y 10% de ácido acético durante una hora. Para decolorar, se dejaron durante toda la noche en una solución de 45% de metanol y 10% de ácido acético y se calentó 3 minutos con agua doble osmosis en microondas a baño maría.

5.7 MÉTODOS PARA CREAR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CON GEN REPORTERO *GFP*

5.7.1 Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico lo hicimos mediante dos métodos a) método manual b) método por Kit Minipreps Promega.

- a) La extracción de plásmido para bacterias Gram- como *E.coli*, es esencialmente el protocolo de Birboim-Doly, donde se cosechan las células de un cultivo de 5 ml de LB en fase exponencial o se toma una ansada de células crecidas en placa como material de partida. Las células se resuspendieron en 200 µl de Solución I. Luego se agregaron 200 µl de Solución II y se mezcló por inversión. Se dejó 10 minutos en hielo. Se agregaron 200 µl de Solución III y se mezcló por inversión, se dejó reposar en hielo por 5 minutos. Se centrifugó a 20000g a 6°C por 20 minutos y se recuperó el sobrenadante para separarlo del ADN cromosómico. A este sobrenadante se le agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol y se dejó a -20°C por 30 minutos. Se centrifugó nuevamente y se descartó el sobrenadante. El pellet se dejó secar y se resuspendió en 30 µl de TE pH 8. Los ADN plasmídicos fueron visualizados mediante corrida electroforética en gel de agarosa 1%. (Soluciones ver en anexos materiales y métodos).

- b) El aislamiento de ADN plasmídico a partir de cepas de *E. coli* se realizó utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps ADN Purification System (Promega), donde se utilizó el siguiente protocolo rápido: Se resuspendió el pellet (de 2 ml de cultivo en LB con el antibiótico correspondiente) en 0,2 ml de Buffer 1. Se agregaron 0,2 ml de Buffer 2. Se mezcló por inversión de y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agregaron 0,2 ml de Buffer3 frío, y luego de mezclar por inversión, se incubo en hielo durante 5 minutos. Se centrifugo a 14000rpm en microcentrifuga durante 20 minutos y el sobrenadante se pasó a un tubo limpio. Para precipitar, se adicionaron 0,9 ml de etanol absoluto y se dejó una hora a -20 °C. Se volvió a centrifugar durante

20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar, para luego resuspenderlo en 0,02 ml de agua deionizada.

5.7.2 Preparación de células *Pseudomonas aeruginosa* electrocompetentes

Se realizó un cultivo de 20ml de *Pseudomonas aeruginosa* en medio LB a 30°C durante 24horas. Pasamos el cultivo a un tubo falcon con el fin de centrifugar a 2500g a temperatura ambiente, para obtener el pellet de células. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10mlde sacarosa 300mM. Se centrifugó 10minutos a 2500g y se descartó el sobrenadante para agregar nuevamente 1ml de sacarosa 300mM. Se resuspendió, se pasó a un tubo eppendorf y se centrifugó a 6200g por 2 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, se agregó 500µl de sacarosa 300mM y se resuspendió.

5.7.3 Electroporación de células *Pseudomonas aeruginosa*

Aproximadamente 200ng de ADN plasmídico fue añadido a1000µl de células *Pseudomonas aeruginosa* electrocompetentes y se dejó reposar en hielo por 2 minutos. Se llevó la mezcla a cubetas de electroporación estériles BIO-RAD de 0.2cm y se realizó un pulso con los siguientes parámetros: 200 Ohms, 25 µF y 2,5 kV. Una vez electroporadas fueron resuspendidas en 0,45 ml de LB y se llevaron a 37°C por 1 hora con agitación para su recuperación y expresión fenotípica. Las células fueron sembradas en placas de LB agar con cloranfenicol 50µg/ml. Las placas fueron crecidas a 30°C (o 30°C según el plásmido utilizado).

5.8 TÉCNICAS MOLECULARES

5.8.1 Geles de agarosa

Los geles de agarosa fueron preparados según las indicaciones de Sambrook *et al.*, 1989. La concentración de los geles de agarosa varió entre 1% y 1.5 %, según el tamaño del fragmento a analizar. Las electroforesis se realizaron utilizando *buffer* TAE 1X a voltaje constante de

100 V en cubas de Bio-Rad. Como marcador de peso molecular se utilizó la escalera de 1 kb de Fermentas. Los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio (0,3 µg/ml). El ADN se visualizó con un transiluminador de luz UV.

Para calcular concentraciones de fragmentos de ADN en los geles se utilizó el método de la isodensidad en el cual se compara la banda de interés del gel con las bandas del MK viendo cuál de estas posee la intensidad más similar a la de nuestra muestra. Las bandas de igual isodensidad poseen igual masa de DNA. El marker utilizado en las corridas electroforéticas presenta tanto marcadores de peso molecular como de masa.

5.8.2 Recuperación y purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA lineal y plásmidos digeridos corridos en geles de agarosa 1% se recuperaron desde geles teñidos con BrEt por escisión con bisturí y se purificaron utilizando el kit de extracción GenElute Gel Extraction kit de Sigma. Este método de purificación se basa en la adsorción y desadsorción a sílica de los ácidos nucleicos en presencia de sales caotrópicas. En condiciones nativas, los ácidos nucleicos están recubiertos de una capa hidratante. Con la adición de iones caotrópicos a los ácidos nucleicos, se destruye la capa de moléculas de agua que mantienen la solubilidad del DNA en soluciones acuosas, así las sales caotrópicas crean un entorno hidrofóbico alrededor del ADN. Bajo estas condiciones hidrofóbicas, los ácidos nucleicos se unen a la membrana de sílica de las columnas del kit, mientras que las proteínas, los metabolitos y otros contaminantes no se unen y, por lo tanto, son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado. Para producir el desprendimiento del DNA de la columna (elución) se utiliza una solución con baja concentración de sales (ligeramente alcalina) o simplemente agua, ya que permiten recuperar la capa hidratante de los ácidos nucleicos, liberándolos así de la membrana de sílica.

5.8.3 Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo fueron:

Nombre	Resultado de corte
EcoR I	5' G↓A A T T C 3' 3' C T T A A↑G 5'
Xho I	5' C↓T C G A G 3' 3' G A G C T ↑C 5'
Xba	5' T↓C T A G A 3' 3' A G A T C↑T 5'
KpnI	5' G G T A C↓C 3' 3' C↑C A T G G 5'
Bam HI	5' G↓G A T C C 3' 3' C C T A G↑G 5'

Cada enzima (Promega) fue utilizada tal como indica el fabricante con el buffer de reacción y condiciones de temperatura óptimas para su uso.

5.9 TÉCNICAS PARA OBSERVACIÓN DE BIOFILM EN SUPERFICIES BIÓTICA Y ABIÓTICA, EN CONTACTO CON S-LAYER

En una placa de 24 pocillos se cultivó *Pseudomonas aeruginosa* GFP sobre vidrio solo y sobre cultivos de células eucariotas A549, se dejó durante 24hs a 37°C y en condiciones de microaerofilia, para generar un ambiente adecuado para las células. Luego de este tiempo se sacó el vidrio y se lo fijó en un portaobjetos para observar al microscopio de fluorescencia con un aumento de 100 y 400X.

5.10 TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DE BIOFILM PRODUCIDO POR PATÓGENOS, EN CONTACTO CON S-LAYER

En una microplaca de 96 pocillos con cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* con y sin contacto con S-layer se retiró cuidadosamente sin topar las paredes y el fondo, el medio de cada pocillo. Se realizó 2 lavados con agua. Luego se agregó 150µl de Cristal violeta 0,1% y se dejó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se retiró el colorante. Se realizaron 2 lavados para retirar el exceso de colorante. Se dejó 15 minutos a temperatura ambiente para secar el agua que haya quedado. Luego se solubilizó el colorante con 200µl de etanol 95% y se dejó 15 minutos a temperatura ambiente. Se cuantificó midiendo absorbancias de cada pocillo utilizando un lector de ELISA (Biotek Elx808).

5.11 TÉCNICAS DE ADHESIÓN A CÉLULAS EUCARIOTAS

5.11.1 Microscopía

Células A549 crecidas sobre cubreobjetos colocados en placas de 24 pocillos, sin descartar el medio de cultivo se agregaron las distintas proteínas durante 1h a 37°C. Luego se descartó el sobrenadante, y se agregó el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* pSEVA GFP (1×10^7 UFC por pocillo en PBS) durante 1h a 37°C. Se descartaron las bacterias y se realizaron tres lavados con PBS para eliminar las bacterias no adheridas. Las células se fijaron con metanol frío durante 10 min a -20°C. Luego se tiñeron con cristal violeta durante 10 minutos, después de un lavado con agua corriente el vidrio fue montado sobre un porta objetos y observado al microscopio con un aumento de 400X y 1000X.

5.11.2 Recuento celular de UFC en placa

Células A549 crecidas en placas de 24 pocillos, sin descartar el medio de cultivo se agregaron las distintas proteínas durante 1h a 37°C. Luego se descartó el sobrenadante, y se agregó el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* pSEVA GFP (1×10^8 UFC por pocillo en PBS) durante 1h a 37°C. Se descartaron las bacterias y se realizaron tres lavados con PBS para eliminar las bacterias no adheridas. Después, se agregó 1ml PBS-0,05% tritón X-100 por pocillo para resuspender las células, y las bacterias adheridas se cuantificaron mediante recuento en placas de LB con Cloranfenicol 50 mg/ml, se realizó el recuento en aquellas placas en las que habían de 50 a 300 colonias.

5.11.3 Citometría

Células A549 crecidas en placas de 24 pocillos, sin descartar el medio de cultivo se agregaron las distintas proteínas durante 1h a 37°C. Luego se descartó el sobrenadante, y se agregó el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* pSEVA GFP (1×10^7 UFC por pocillo en PBS) durante 1h a 37°C. Se descartaron las bacterias y se realizaron tres lavados con PBS para eliminar las bacterias no adheridas. Después, se agregó 1ml PBS-0,05% tritón X-100 por pocillo para resuspender las células, y las bacterias adheridas se cuantificaron por citometría flujo, citómetro modelo FACS ARIA II cell sorter de la empresa BD Becton Dickinson, Software FACS DIVA 6.1, programa usado para el análisis de datos Flow Jo 7.6.2.

5.12 TÉCNICAS DE INHIBICIÓN VIRAL

5.12.1 Ensayo de citotoxicidad de S-layer en células eucariotas A549

En una microplaca de 96 pocillos se sembraron células A549, a las 24hs se retiró el sobrenadante de las cavidades de la microplaca y se agregó 0,1 ml por cavidad de cada dilución de la proteína por triplicado. Se incubó durante 48hs a 37°C en estufa de CO₂, luego se retiró el sobrenadante de las cavidades y las células se fijaron agregando 0,1 ml de formol 10% por cavidad. El sobrenadante se retiró por volcado, se tiñó con 0,1 ml por cavidad de Cristal violeta 0,01% durante 30 min. El colorante se eluyó con 0,1 ml por cavidad de la solución (alcohol 50%, y ácido acético 0,1% en agua) y se leyeron las absorbancia a 600 nm. El porcentaje de viabilidad celular se calculó en base al promedio de las absorbancias para cada concentración de proteína ensayada respecto al control de células sin tratar con proteína.

5.12.2 Ensayo de reducción de la acción citopática viral (ACP)

Células A549 crecidas a confluencia en microplaca de 96 pocillos se infectaron con 25 µl de la cepa KOS de HSV-1 en MEM 1,5% SFB (m.i. = 0,07 UFP/célula) y, luego de la hora de adsorción a 37°C, se agregaron 100 µl de diferentes concentraciones de las proteínas en MEM 1,5%, por triplicado. La microplaca se incubó a 37°C en atmósfera con 5% CO₂ y, tras 24 hs, cuando se observó 100% de muerte celular en el control de virus sin tratar (CV), se observó en microscopio invertido el grado de ACP respecto del CV.

5.12.3 Ensayo de inhibición del rendimiento viral

Células A549 crecidas a confluencia en microplaca de 96 pocillos se infectaron con 25 µl de HSV-1 cepa KOS en MEM 1,5% (m.i. = 0,07 UFP/célula). Luego de la hora de adsorción a 37°C, se agregaron 100 µl de diferentes concentraciones de proteínas, por triplicado. La microplaca se incubó a 37°C en atmósfera con 5% CO₂ hasta que se observó 100% de muerte celular en el CV. Luego, se cosechó virus total, realizando tres ciclos de congelado y descongelado a -80°C. Finalmente, se cuantificó el rendimiento viral por el método de

formación de placas en medio semisólido. El porcentaje de inhibición del rendimiento viral generado por el compuesto (% inhibición título viral) se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición título viral} = 100 - \left(\frac{\text{Título viral en presencia del compuesto}}{\text{Título viral del CV}} \times 100 \right)$$

5.12.4 Titulación por el método de formación de placas en medio semisólido

Monocapas confluentes de células A549 crecidas en placas de 24 pocillos se inocularon con 100 µl de diluciones seriadas al décimo de la muestra a titular por duplicado y se incubaron durante 1 h a 37°C. Luego de la hora de adsorción, se retiró el inóculo viral y las monocapas se cubrieron con 0,5 ml de medio de plaqueo. El medio de plaqueo semisólido se preparó con volúmenes iguales de MEM 1,5% en doble concentración (MEM 2X) y metil-celulosa 1,4 % (Sigma-Aldrich). La placa se incubó a 37°C en atmósfera con 5% CO₂ hasta observar la formación de las placas de lisis, entre 48 y 72hs. Luego del tiempo de incubación, se fijaron las células con formol 10% (0,5 ml por pocillo) y se tiñeron con una solución 1% de cristal violeta en 10% de etanol. Las placas de lisis formadas se contaron en aquellos pocillos donde se observaron entre 30 y 150 placas y se calculó el título viral (UFP/ml) con la siguiente ecuación:

$$\text{Título viral} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de placas promedio}}{\text{volúmen inóculo(ml)}} \times \text{Factor de dilución}$$

ANEXO MATERIALES Y MÉTODOS

Soluciones y buffer utilizados en los geles SDS-PAGE:

Stacking:

Solución A (30% acrilamida 0,8% bis acrilamida).....	0.85ml
H2O.....	3.5 ml
Solución C (Tris 0,5 M a pH 6,8 con HCl).....	0.6 ml
Solución D (20% SDS).....	25 µl
APS (10%).....	25 µl
TEMED.....	5 µl

Resolving	(12,5%)	(15%)
Solución A (30% acrilamida 0,8% bis acrilamida).....	4,16 ml.....	5ml
H2O.....	3,2 ml.....	2,4ml
Solución B (Tris 1,5 M a pH 8,8).....	2.5 ml.....	2,5ml
Solución D (20% SDS).....	50 µl.....	50 µl
APS (10%).....	50 µl.....	50 µl
TEMED.....	10 µl.....	10 µl

-Buffer de corrida:

Tris 0,025 M pH 8, 0,19 M Glicina, 0,1% (p/v)SDS

-Loading buffer 4X:

0.2M Tris HCl pH=6.8, 0,15% (p/v) Azul de bromofenol, 20% (p/v) β- mercaptoetanol, 40% (v/v) Glicerol, 8% (p/v) SDS

Buffer utilizado para electroforesis en geles de agarosa:

-TAE 1X:

40mM Tris acetato, 1mM EDTA pH 8,0

Soluciones para la extracción de ADN plasmídico

-Solución I:

1mM EDTA pH8, 10mM Tris-HCl pH8, 10µg/ml RNAsa

-Solución II:

0,2 N NaOH, 1%SDS

-Solución III:

5M AcoK pH 5

-TE pH8:

10mM Tris-Hcl pH 8, 1mM EDTA pH8

Filtros usados en el citómetro de flujo

Laser	Filtros	
488nm	530/30	→ GFP
	585/42	
	616/23	
	695/40	
	780/60	
633nm	660/20	
	780/60	

Resultados

6 RESULTADOS

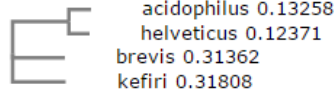
6.1 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Muchas especies de *Lactobacillus* poseen S-layer en sus envolturas más externas. El Laboratorio donde se desarrolló este trabajo de tesis ha descrito características antimicrobianas y antivirales para la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 (Prado Acosta 2008, 2010; Martínez & col. 2012). En vista que existe una alta heterogeneidad entre las proteínas S-layers de las diversas especies de lactobacilos resulta imposible presuponer *a priori* sin un análisis experimental cómo será el comportamiento antimicrobiano y antiviral de proteínas S-layers de otras especies y cómo estas características participan en las capacidades probióticas de dichas especies. Para esta tesis decidimos estudiar y purificar las proteínas S-layers de *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356; (Accession N° CAA61560.1), *Lactobacillus brevis* ATCC 14869; (Accession N° CAA78618), *Lactobacillus helveticus* ATCC12046; (Accession N° CAB46984.1) y *Lactobacillus kefir* JCM5818 (predicho del WGS, cepa JCM5818.contig00016). Hemos elegido a estos microorganismos debido a su status GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros), a las características probiótica que se le adjudican y a su gran importancia en la industria alimentaria.

El análisis bioinformático del alineamiento de secuencias de las cuatro proteínas para producir un árbol filogenético de las cepas utilizadas en este estudio correlaciona con su origen evolutivo. *L. helveticus* (CAB46984.1) y *L. acidophilus* (CAA61560.1) están más estrechamente relacionados dado que pertenece al grupo de homología *L. acidophilus*. Por otro lado *L. brevis* (CAA78618) y *L. kefir* (WGS cepa JCM5818.contig00016) mostraron una alta similitud en su dominio amino terminal.

Phylogram

Branch length: Cladogram Real



CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

acidophilus	MKKNLRIVSAAAAALL---AVAPVAASAVSTVSAATT-----INA---SSSAINTNTNAK	49
helveticus	MKKNLRIVSVAAAAALL---AVAPVAATAMPVN-AATT-----IN---ADSAINANTNAK	47
brevis	MQSSLKKSlyLGlaalsFAGVAAVST-TASAKSYATAGAYSTLkTDAATRNVeATGTNAL	59
kefiri	MKSLKkTLFAGVAALSfVAVAGVSSTNASAKSYAKVTSNKALTSdATTRNVAVNGTNAL	60
	:..: . * * .** *:: . *.. :. : .. ***	
acidophilus	YDVDVTPSVSVAVAANT-ANNTPAIAGNLT-----G-----TISASY--	84
helveticus	YDVDVTPSISAIAAVAKSDTMPAIPGSLT-----G-----SISASY--	83
brevis	YTKPGTVK--GAKVVASKATMAKLASSKKSADYFRAYGVKTTNRGSVYYRVVTMDGKYRG	117
kefiri	YTKAGTLK--GAKTVATKTTLASLkNSKQGGKnfRAYRVATNRGSVYYKVVsfDKTYRG	118
	* * . . . : . : . * : : . *	
acidophilus	---NGKTYTANLkADTENATIITAAGSTTAVKPAEL---AAG-----VAYTVTVND-	128
helveticus	---NGKSYTANLkPKDSGNATIITDSN-NNTVKPAEL---EAD-----KAYTVTVPD-	126
brevis	YVYGGKSDTAFAGG-----IKSA--ETTTKADMPARTTG-----FYLT---	153
kefiri	WIYGGKSVTAFAGG-----IASF--NTTAPAAAKSASASASSASSAEQTTALTDaQK	170
	** : ** * : : . : *	
acidophilus	-VSF-----NFGSENAGKTVTLGSANSNVKFTGTNSDNQETETNVST	168
helveticus	-VSF-----NFGSENAGKEITIGSANPNVTFTEKTGDQ----PAST	162
brevis	-----DTSKNTLWTAPKYTQYKASKVSLYG-VAKDKFTVDQAAT--KTREGS	198
kefiri	AATYKITKAGTANDGTATTYSYPAWTEYKKGRTVIDATPYANDTFKVTdQTT--RTREGD	228
	: . : : . : *	
acidophilus	LKVKLDQNGVASLTNVSIANVYAINTTDnsNVNFYDVTSGATVTNGAVSVNADNQGQVNV	228
helveticus	VKVTLDQDGVAKLSSVQIKNVYAIDTTYNSNVNFYDVTTGATVTTGAVSIDADNQGQLNI	222
brevis	LYYHVT-----ATNGSGISGWIYAGKGFSTTATGTQVL-----GGLST	236
kefiri	LWVKIADTN-----ATNGKINGIKWIKFSALTAQNPT-----	259
	: : * * :	
acidophilus	ANVVAAINSKYFAAQYADKK---LNTRTAN-----TE-----D	258
helveticus	TSVVAAINSKYFAAQYDKKQ---LTVNTFD-----TE-----T	252
brevis	DKSVTATNDNSVKIVYRTTDGTQVGSNTWVTST--DGTKAGSKVSDKAADQTAL-----	288
kefiri	-PAPAPIADNAVRLNFIDSQKTVKSIDYVKTGAKKGDTLGSLTGPKTGTQDNfSWTLTK	318
	: . : . : . : . :	
acidophilus	AIKAAKLDQKID-VNSVGyFKAPHTFTVNVKATSNtNGKSATLPVVVTVPNVAEPTVASV	317
helveticus	AVKDALKAQKIE-VSSVGyFKAPHTFTVNVKATSNKNGKSATLPVTVTVPNVADPVVPSQ	311
brevis	-----EAY-INANKPSGYTVTNPN-----AA-----DATY--GNTVYATV---	320
kefiri	VVADDLQSKIDNALSGTGYSFNVSQYPST--LAQAQTGSTVSLPVTk--GDVVYQTL---	371
	: : . ** : : . . : : . :	
acidophilus	SKRIMHNAYYYDKDAKRVGTDsvKR-----YNSVSVLPNTT-TINGKTYyQVVENgK---	368
helveticus	SKTIMHNAYFYDKDAKRVGTDKvTR-----YNTVTVAMNTTKLANGISyYVEIENgK---	363
brevis	-----SQAATSKVALKVSgTPVTTALTtADANDKVAANDT-TANGSSVAGSTVYAGTK	373
kefiri	-----KPYVATKDDVT-----STHSLTP-NS-KSAGAFFKGSFDEGEgPK	409
	. * . . : : * .	
acidophilus	AVDKY---INAANIDGtKRT-----LKHNAyVYA--SSKkRANKVVLK-----KGEVVTt	413
helveticus	ATGKY---INADNIDGtKRT-----LKHNAyVYK--TSKkRANKVVLK-----KGTEVVTt	408
brevis	L-----AQLT-TDLTG-----EKGVVtTLTAIDTDLedATFTGTTTYySDLGKA	416
kefiri	ATHIDISQLVHTDSdGKVTDHTNSLpTVKAYIDSVAAStDKDAALtSLNN-----TVKV	462
	: : * : : . . : : . :	
acidophilus	YGASyTFK-----N	422
helveticus	YGGSyKFK-----N	417
brevis	YHYTYTYNKDSaASSNASTQfGSNVtGTLtATLV----MGK-----STATAN	459
kefiri	YAANYyLAPA---NINPSDLfSGTRGSaFSSQDVLNylAKHStLNTLkSAIyPvFNADGT	519
	* . *	

acidophilus	GQKYYKIGDNTDKTYVKVANF-----R-----	444
helveticus	GQRYKIGANTEKTYVKVANF-----E-----	439
brevis	GTTWFN-----	465
kefiri	VKEWDQLNLNATS--ANSGTFGSSPVVVYTYGDGSAVSDPFQNGSSVNPLTPVPLTPL	577
	: :	
acidophilus	-	444
helveticus	-	439
brevis	-	465
kefiri	Q	578

Purificamos las diferentes S-layers de cultivos bacterianos mediante un agente desagregante, en este caso utilizamos Cloruro de Litio, agente que funcionó de manera correcta para purificar las proteínas y fueron verificadas por SDS-PAGE.

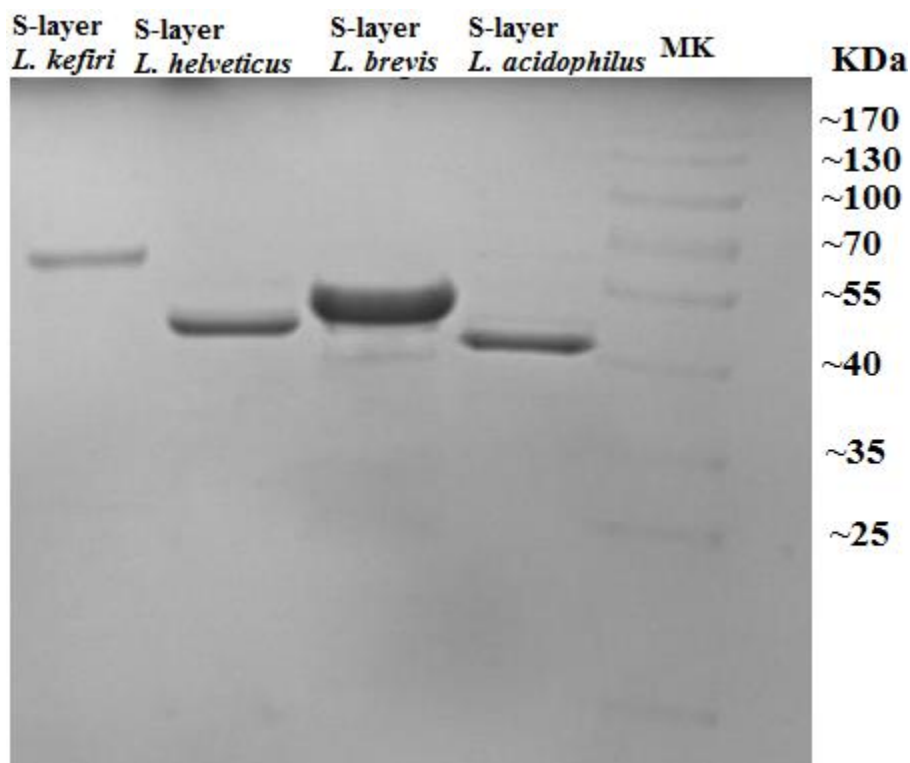


Figura 5 SDS-PAGE de las diferentes proteínas S-layers, (MK marcador de peso molecular)

Los pesos moleculares PM y puntos isoeléctricos estimados de la secuencia primaria se describen en la tabla 2. La estimación de PM se corresponden con la movilidad en el SDS-PAGE.

Tabla 2 Propiedades de las diferentes S-layers

Strain	Número de aminoácidos	Peso Molecular	Punto Isoeléctrico:
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC4356	444	46569	9.59
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC12046	439	46702	9.35
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869	465	48159	9.45
<i>Lactobacillus kefir</i> JCM5818	578	60703	9.48

6.2 Efecto en formación de biofilm

Con las cuatro proteínas purificadas se decidió evaluar la capacidad antimicrobiana en la habilidad de interferir con la formación de biofilm bacterianos empleando patógenos modelos, para ello realizamos ensayos con *Pseudomonas aeruginosa*, ya que esta produce un biofilm estable con al menos tres tipos de polisacáridos que son determinantes para la estructura del biofilm. La formación de biofilm es un ciclo sin fin, en el que comunidades organizadas de bacterias están encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que se sujetan a células microbianas junto a una superficie. Se cree que los biofilm son determinantes en el 65-80% de todas las infecciones microbianas (Rasamiravaka, 2015). Por lo que evaluar la capacidad de la S-layer de inhibir la formación de biofilm puede ayudar a disminuir un gran número de infecciones microbianas.

Se evaluaron tres condiciones de ensayo que se describen a continuación:

- 1) Crecimiento del patógeno junto con la proteína durante 24h,
- 2) Crecimiento del patógeno junto con la proteína durante 48h,
- 3) En contacto con S-layer 2h después del crecimiento del patógeno durante 48h

6.2.1 Crecimiento del patógeno junto con la proteína durante 24h

En una microplaca de 96 pocillos se inoculó en cada pocillo 150µl de un cultivo bacteriano del patógeno a analizar en una densidad óptica de 0.025. Junto con el inóculo de la bacteria se agregó la proteína a estudiar en la concentración que se describe en las figuras. Después de 24h de incubación a 37°C, se midió la absorbancia a 600nm de cada pocillo utilizando un lector de ELISA (Biotek Elx808) (ver detalles en materiales y métodos).

Los resultados en conjunto de las cuatro proteínas sobre la formación de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* cuando se co-incubaban con las bacterias 24hs se muestran en la Figura 6.

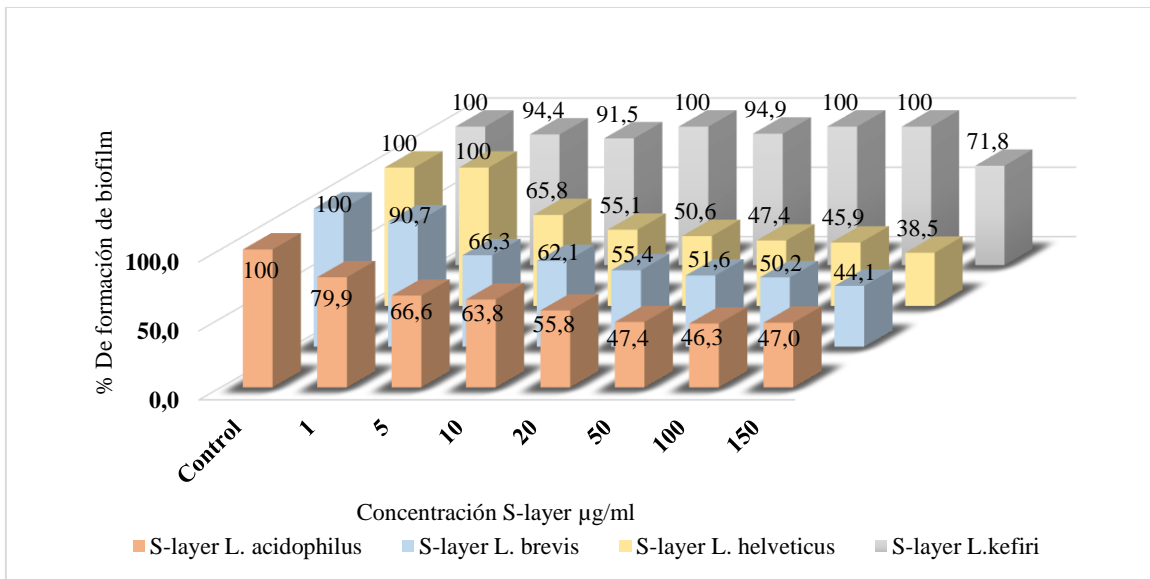


Figura 6 Efecto de inhibición de biofilm producido por cada una de las proteínas, cuando se incuba a *P. aeruginosa* junto a la proteína 24hs.

Se observa que *L. acidophilus*, *L. brevis* y *L. helveticus* tienen un efecto de 50% de inhibición de la formación de biofilm en concentraciones de entre 20 y 50 µg/ml. Como ejemplo se muestra en la Figura 7 el resultado de la inhibición de la formación de biofilm con concentraciones crecientes de S-layer para *L. brevis*. En cambio con la proteína S-layer de *L. kefirii*, recién con 150 µg/ml de la proteína se observa una mínima inhibición que no llega al 30%.

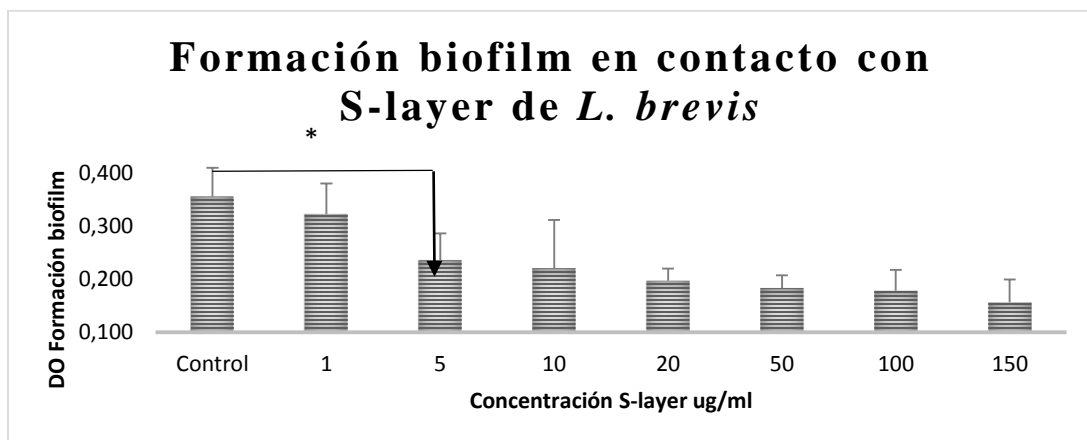


Figura 7 Inhibición de la formación de biofilm con el tratamiento de S-layer de *L. brevis*, al realizar el análisis estadístico mediante t-test comparando el control con cada una de las concentraciones, se observa diferencia significativa * ($p < 0.05$) a partir de la concentración de 5 µg/ml de la proteína.

6.2.2 Crecimiento patógeno junto con la proteína durante 48h

En forma similar al ensayo anterior se co-incubo la bacteria con la proteína S-layer por 48hs. La proteína S-layer de *L. kefir* no se incluyó en los ensayos con tratamientos de 48 horas de incubación porque no mostró ningún efecto en la formación de biofilm en 24h de incubación, por lo tanto se asume que tampoco actuará cuando el biofilm de *Pseudomonas* esté totalmente formado a 48h de incubación. Los resultados en conjunto de las tres proteínas sobre la formación de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* cuando se co-incuban con las bacterias 48hs se muestran en la Figura 8.

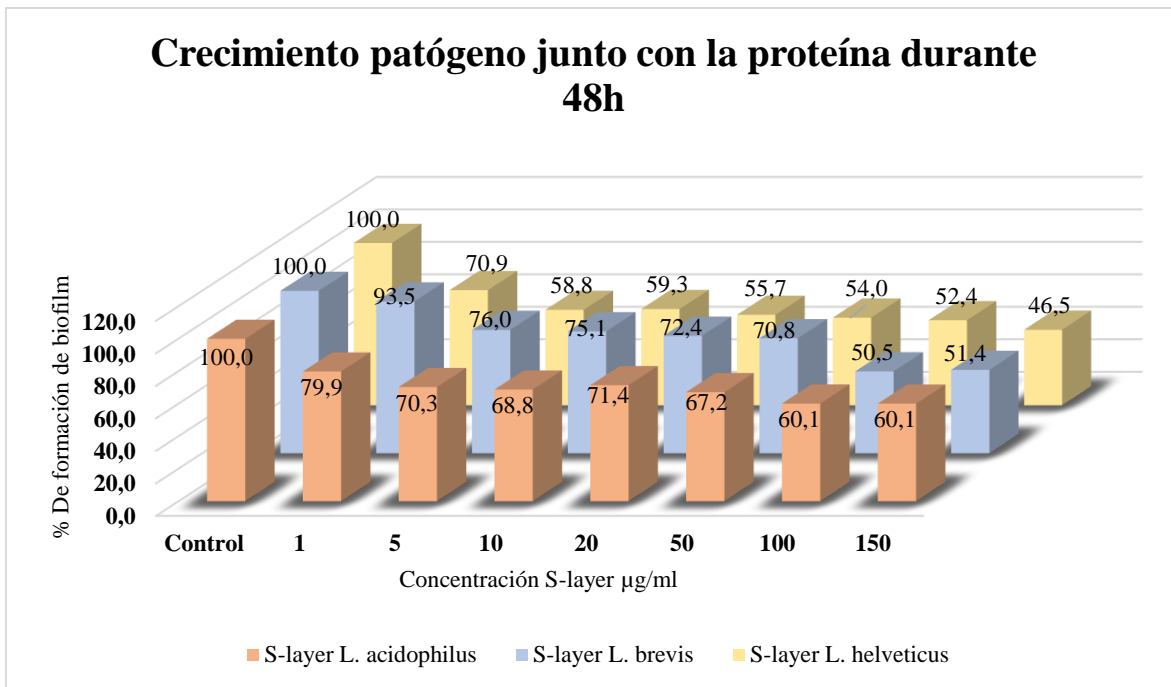


Figura 8 Efecto de inhibición de biofilm producido por cada una de las proteínas, cuando se incuba a *P. aeruginosa* junto a la proteína 48hs.

No se observa que el aumento en el tiempo de incubación incremente el efecto de inhibición de la formación de biofilm.

6.2.3 Contacto con S-layer 2h después del crecimiento del patógeno durante 48h

Luego, se evaluó el efecto de las proteínas S-layers sobre biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* previamente formados durante 48hs. Los resultados en conjunto de las tres S-layers cuando se incuban dos horas después del crecimiento del patógeno durante 48hs se muestran en la Figura 9.

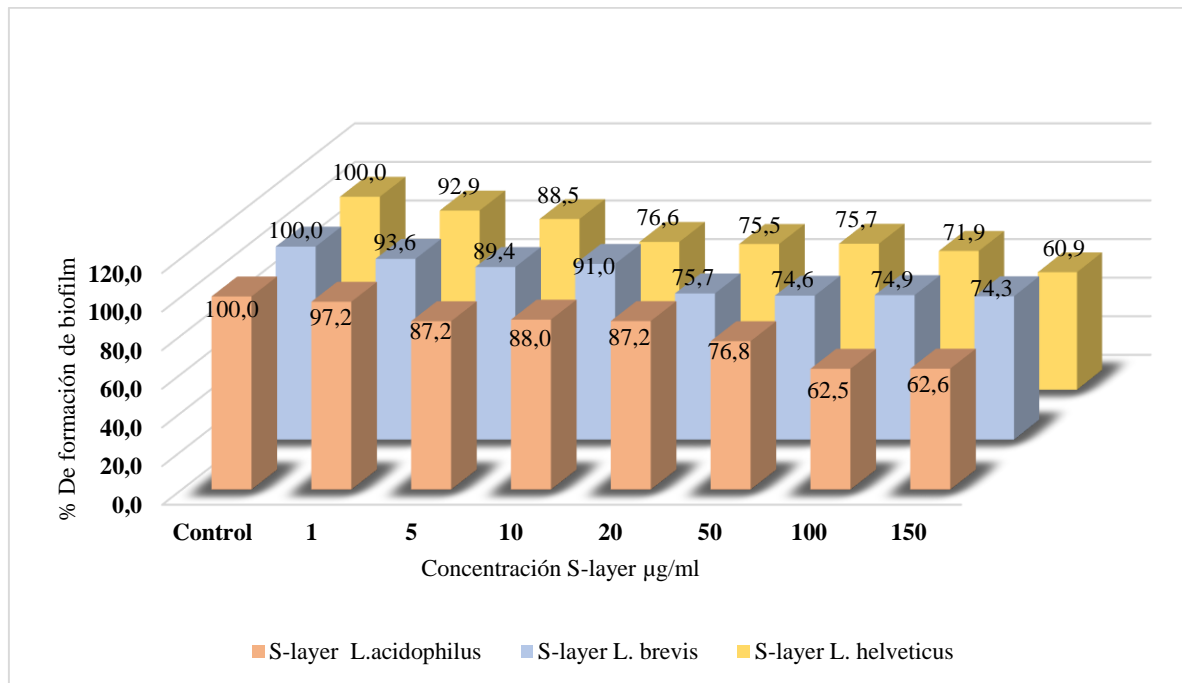


Figura 9 Efecto de inhibición de biofilm producido por cada una de las proteínas, cuando se incuban a *P. aeruginosa* junto a la proteína 2hs después de 48hs de crecimiento del patógeno.

Al realizar el análisis de datos de cada una de las S-layer se observa una inhibición de biofilm dependiente de la concentración, es decir a medida que aumentamos la concentración de S-layers las lecturas de D.O. disminuyen.

Luego, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) factorial en el cual se analizó la influencia de S-layer en la formación de biofilm en las diferentes condiciones ensayadas, comparando cada uno de los tratamientos, y a las diferentes proteínas. Si bien todos los tratamientos tienen efecto observamos una inhibición menor en el tratamiento 3 donde la S-layer se adiciona únicamente dos horas después de haber crecido el patógeno durante 48 horas.

También se realizaron los mismos ensayos con *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, pero no se obtuvieron buenas condiciones de formación de biofilm para esos géneros, y los resultados obtenidos no mostraron ninguna diferencia entre el control y los tratamientos con las S-layers.

Ensayos de viabilidad de *Pseudomonas aeruginosa*

Para verificar que la inhibición de la formación de biofilm no se debe a que la S-layer inhibe la multiplicación de *Pseudomonas aeruginosa*, o afecta su viabilidad, se hicieron los siguientes ensayos, con el objetivo de comprobar si existe una disminución de la densidad óptica o el número de UFC/ml.

Cuantificación de DO

En una microplaca de 96 pocillos se inoculó 150µl de un cultivo del patógeno a analizar de densidad óptica de 0,025 en cada pocillo. Junto con el inóculo de la bacteria se agregó la proteína S-layer de *L. acidophilus* en distintas concentraciones por triplicado. Luego de 24 horas a 37°C se cuantificó las absorbancias de cada pocillo mediante un lector de microplacas (Biotek Elx808). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 10.

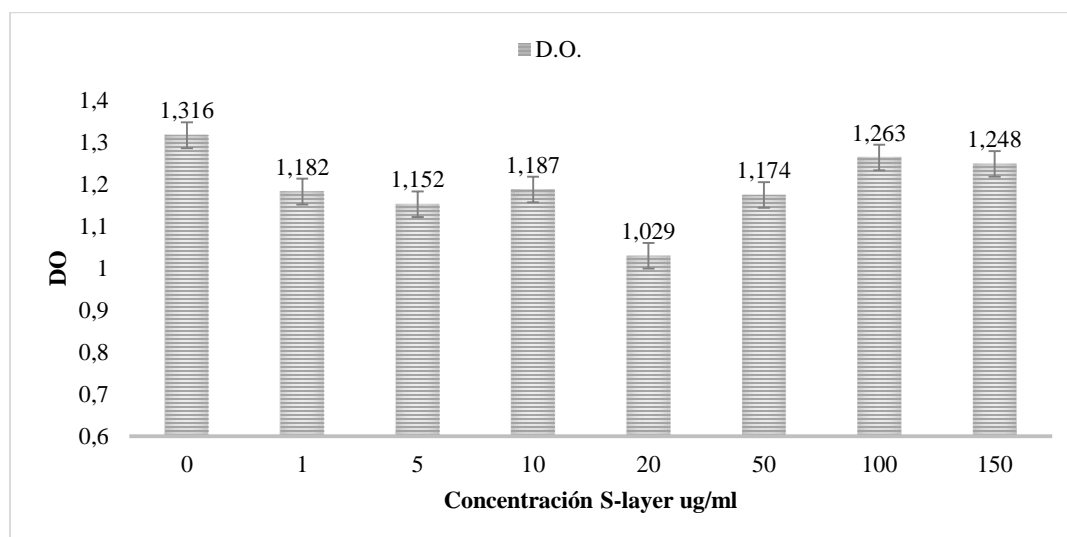


Figura 10 Ensayo de viabilidad. DO obtenidas con el tratamiento de S-layer de *L. acidophilus* a diferentes concentraciones.

Cuantificación por recuento en placa

Por un lado, se realizó un recuento en placa utilizando el mismo esquema de tratamiento descrito en el ítem anterior. Es decir, en una microplaca de 96 pocillos se inoculó 150µl de un cultivo del patógeno a analizar de densidad óptica de 0,025 en cada pocillo. Junto con el inóculo de la bacteria se agregó la proteína a estudiar en distintas concentraciones por triplicado. Luego de 24 horas a 37°C se cuantificó por recuento en placa las diferentes diluciones. Los resultados se muestran en la figura 11.

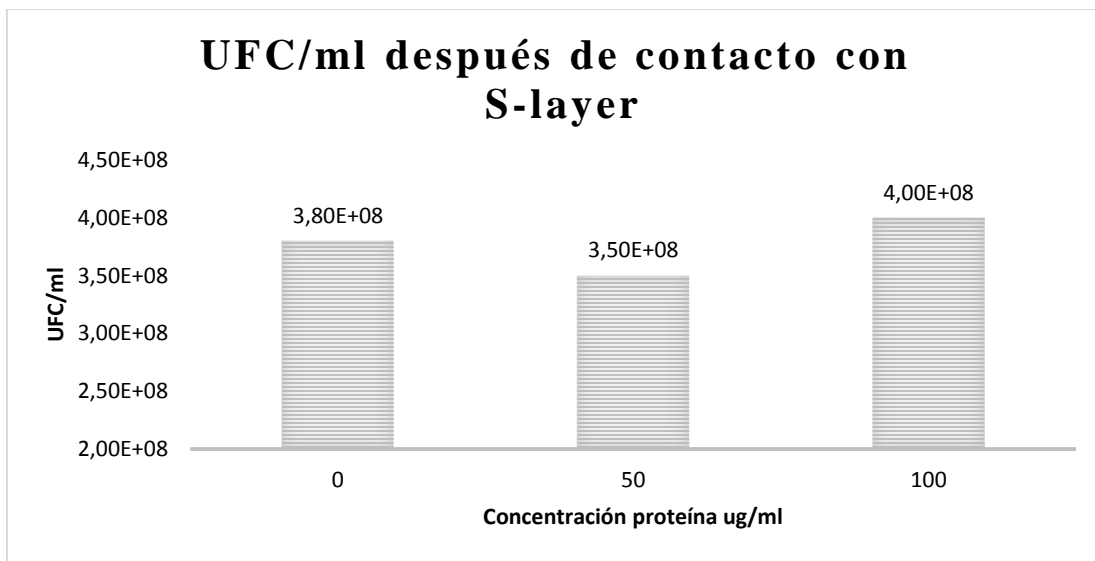


Figura 11 Disminución del número de UFC/ml de *P. aeruginosa* en contacto con S-layer durante 24h.

Por otro lado, a partir de una dilución de *Pseudomonas aeruginosa* en PBS en contacto con S-layer a una concentración de 50ug/ml se llevó a cabo un recuento en placa cada hora durante cuatro horas. Los resultados obtenidos con las tres proteínas se muestran en la figura 12, expresados en porcentaje respecto del control sin incubar con la S-layer.

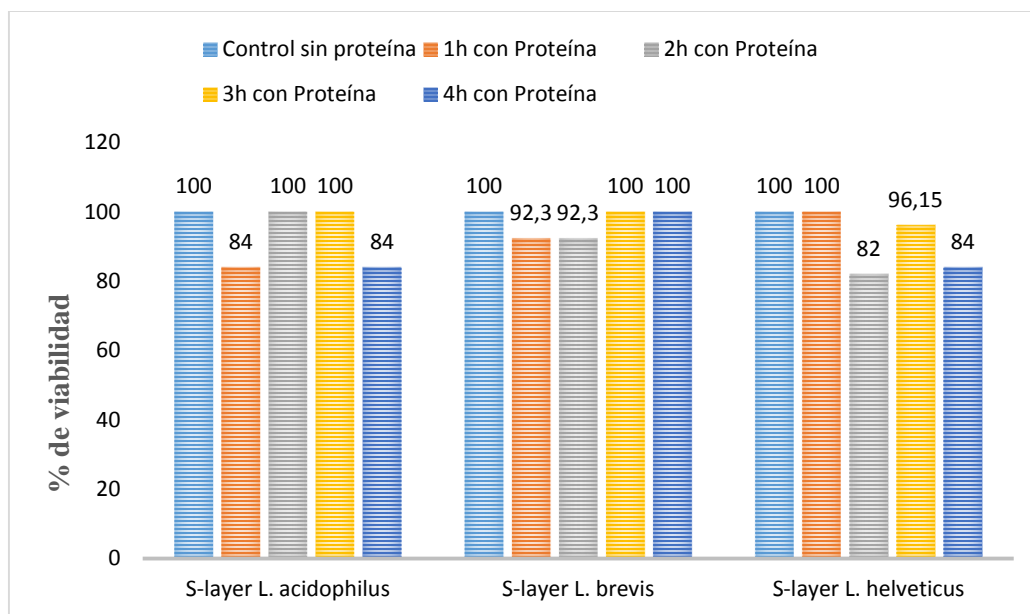


Figura 12 Crecimiento de *P. aeruginosa* cada hora durante 4 horas en contacto con las diferentes S-layers.

En los diferentes ensayos de viabilidad pudimos observar que tanto las lecturas de D.O. como los recuentos de UFC/ml del patógeno en contacto con S-layer se mantienen en cifras similares con respecto al control del patógeno sin la S-layer. Esto indica que el efecto de inhibición sobre la formación de biofilm no sería por un efecto sobre la viabilidad.

6.3 Construcción de cepa de *Pseudomonas aeruginosa* con gen reportero fluorescente para el seguimiento post-infección

6.3.1 Transformación de *Pseudomonas aeruginosa*

Diversos métodos han sido desarrollados para transferir DNA exógeno. Alternativamente a la transducción y conjugación, la electroporación también se puede utilizar para transferir moléculas de DNA exógeno en *Pseudomonas*. La electroporación utiliza un campo eléctrico que genera poros en membranas bacterianas que permiten la entrada de moléculas de DNA exógeno. A diferencia de la conjugación que se limita a la transferencia de DNA de una célula bacteriana a otra, la electroporación puede utilizarse para transferir todos los tipos de DNA

resuspendidos en agua. Este procedimiento consiste en la realización de dos pasos. El primer paso consiste en la preparación de células de *Pseudomonas aeruginosa* electrocompetentes usando un tratamiento de sacarosa para permeabilizar la membrana. El segundo paso es la electroporación en sí y consiste en mezclar células de *Pseudomonas aeruginosa* electrocompetentes con el DNA a ser transferido, seguido de la aplicación de un campo eléctrico en condiciones de baja fuerza iónica. A pesar que durante este proceso mueren muchas células, algunas sobreviven incorporando al DNA foráneo. (Cadoret, Soscia, & Voulhoux, 2014)

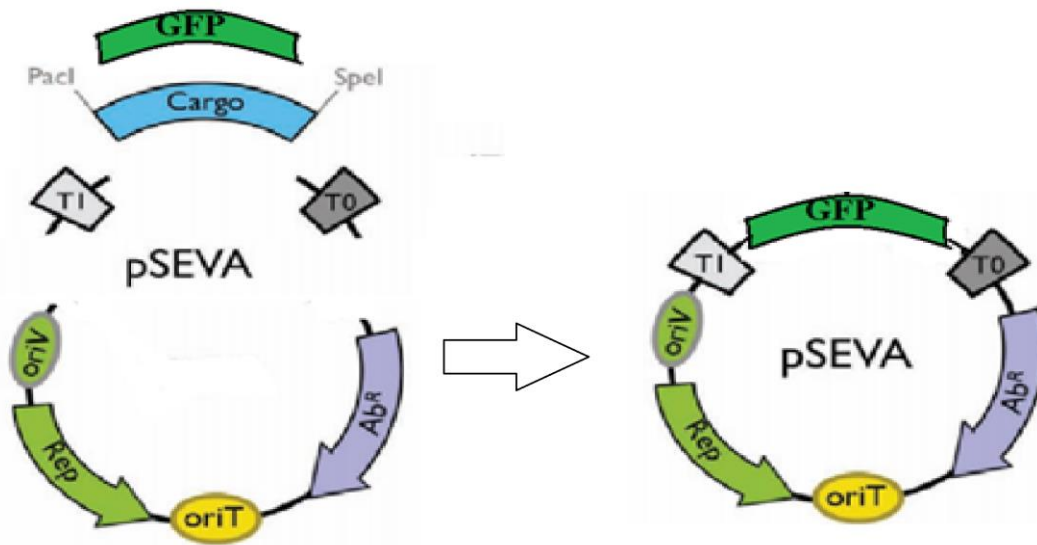


Figura 13 Construcción plásmido pSEVA con gen reportero GFP

6.3.2 Extracción de ADN plasmídico

La extracción de plásmido de *E.coli*, es esencialmente el protocolo de Birboim-Doly, de desnaturalización diferencial del DNA cromosómico respecto al plasmídico. Ver más detalles en materiales y métodos.

El ADN plasmídico obtenido fue visualizado mediante corrida electroforética en gel de agarosa 1%.

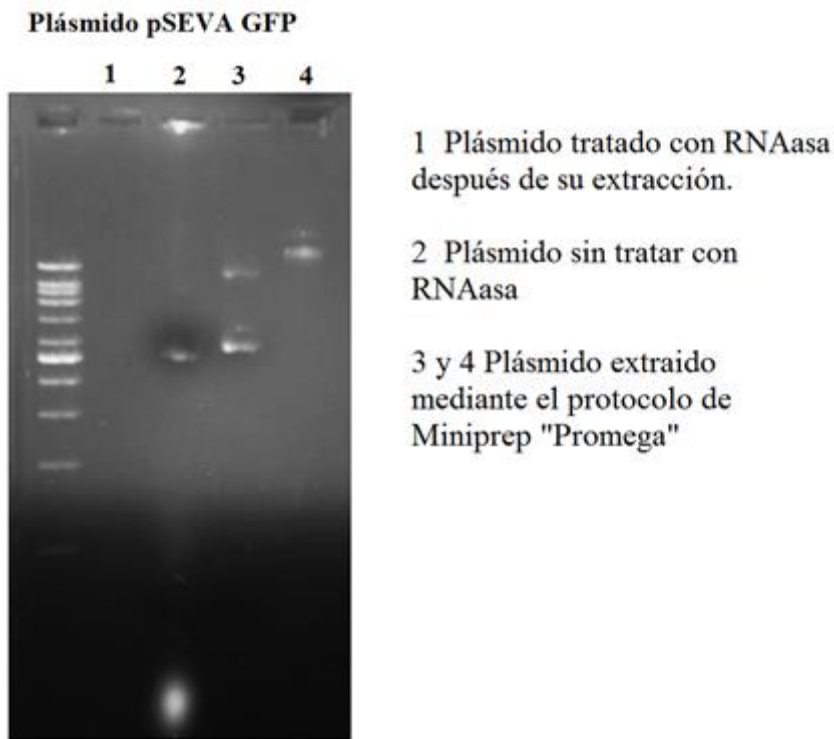


Figura 14 Corrida electroforética del plásmido extraído pSEVA GFP de *E. coli*, en gel de agarosa 1%

Al visualizar el plásmido obtenido por los diferentes métodos, observamos que al tratarlo con RNAasa después de su obtención perdimos todo el plásmido obtenido que puede deberse a la manipulación excesiva de este, por lo que para la transformación usamos el plásmido obtenido mediante el protocolo Miniprep “Promega”, el cual estaba en una mejor concentración y sin RNA interferente para la transformación de *Pseudomonas aeruginosa*.

6.3.3 Transformación *Pseudomonas* mediante electroporación

Células bacterianas competentes son esenciales para la clonación, la construcción de bibliotecas de ADN, y la mutagénesis en la mayoría laboratorio de biología molecular. Entre los diversos métodos de transformación, la electroporación se encuentra como la mejor en eficiencia de transformación (Zhang, 2016). Por lo que como primer paso se obtuvo *Pseudomonas* electrocompetentes mediante el protocolo con Sacarosa 300mM (ver más detalles en materiales y métodos). Después de realizada la electroporación en *Pseudomonas*

aeruginosa electrocompetente con aproximadamente 200ng de plásmido obtenido mediante el protocolo de Miniprep “Promega” y el cual fue cuantificado mediante Nanodrop 2000, se resuspendió rápidamente con 1ml de LB con cloranfenicol 50µg/ml y se dejó durante 2 horas a 37°C.

Se realizó un cultivo en LB caldo con cloranfenicol 50µg/ml y se dejó durante 24 horas a 37 °C. También se realizó un plaqueo de las bacterias transformadas en Agar Cetrimida con cloranfenicol 50µg/ml, para asegurarnos de tener un mejor aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* pSEVA GFP.

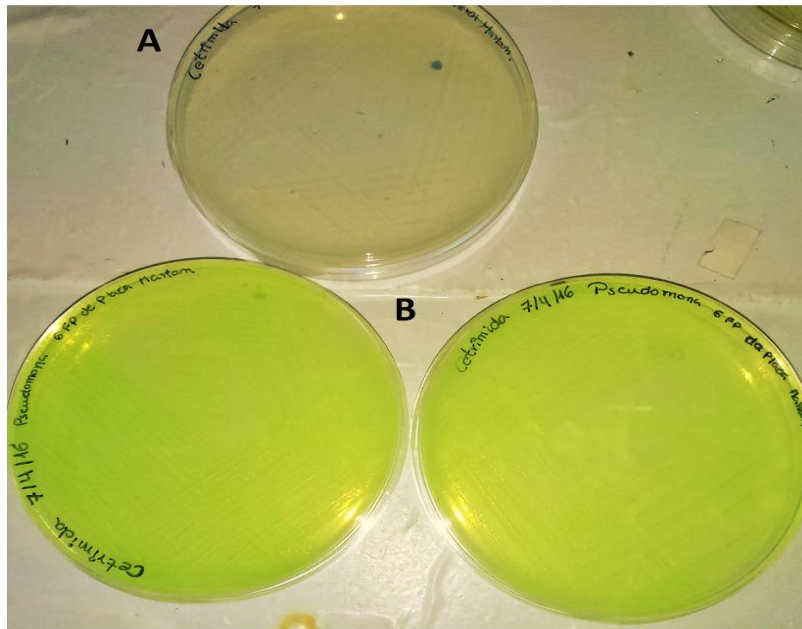


Figura 15 A) Cetrimida agar con cloranfenicol 50µg/ml sin crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* pSEVA GFP B) Crecimiento en Cetrimida agar con cloranfenicol 50µg/ml de *Pseudomonas aeruginosa* pSEVA GFP

Se realizó la transformación de *Pseudomonas aeruginosa* con los plásmidos obtenidos con los diferentes métodos logrando transformar a esta únicamente usando el plásmido obtenido por el método de Miniprep “Promega”. La diferencia entre placas de Cetrimida con cloranfenicol en las cuales creció *Pseudomonas aeruginosa* y las placas en las cuales no creció es muy notoria debido al color verde brillante que estas adquieren y se puede observar claramente en la imagen. Las células fueron observadas en microscopio de fluorescencia para verificar la expresión de la GFP como se observa en la Figura 16.

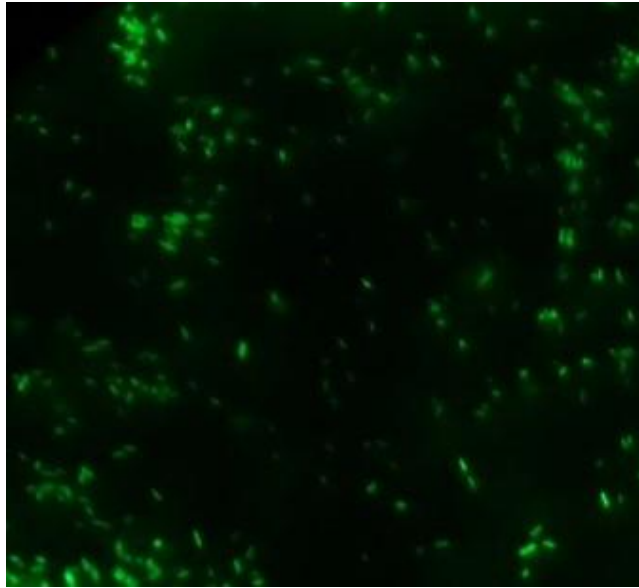


Figura 16 *Pseudomonas aeruginosa* pSEVA GFP vista al microscopio de fluorescencia con un aumento de 1000X

6.4 Observación de biofilm en superficies biótica y abiótica, en contacto con S-layer

Se sabe que los biofilm son comunidades complejas de bacterias que se adhieren a las superficies bióticas como células del propio organismo o abióticas como implantes, que causan enfermedades infecciosas crónicas, en este trabajo realizamos ensayos de adherencia y formación de biofilm en superficies bióticas y abióticas para observar la diferencia de formación de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* con y sin contacto con las distintas proteínas S-layer.

Superficie biótica Superficie abiótica

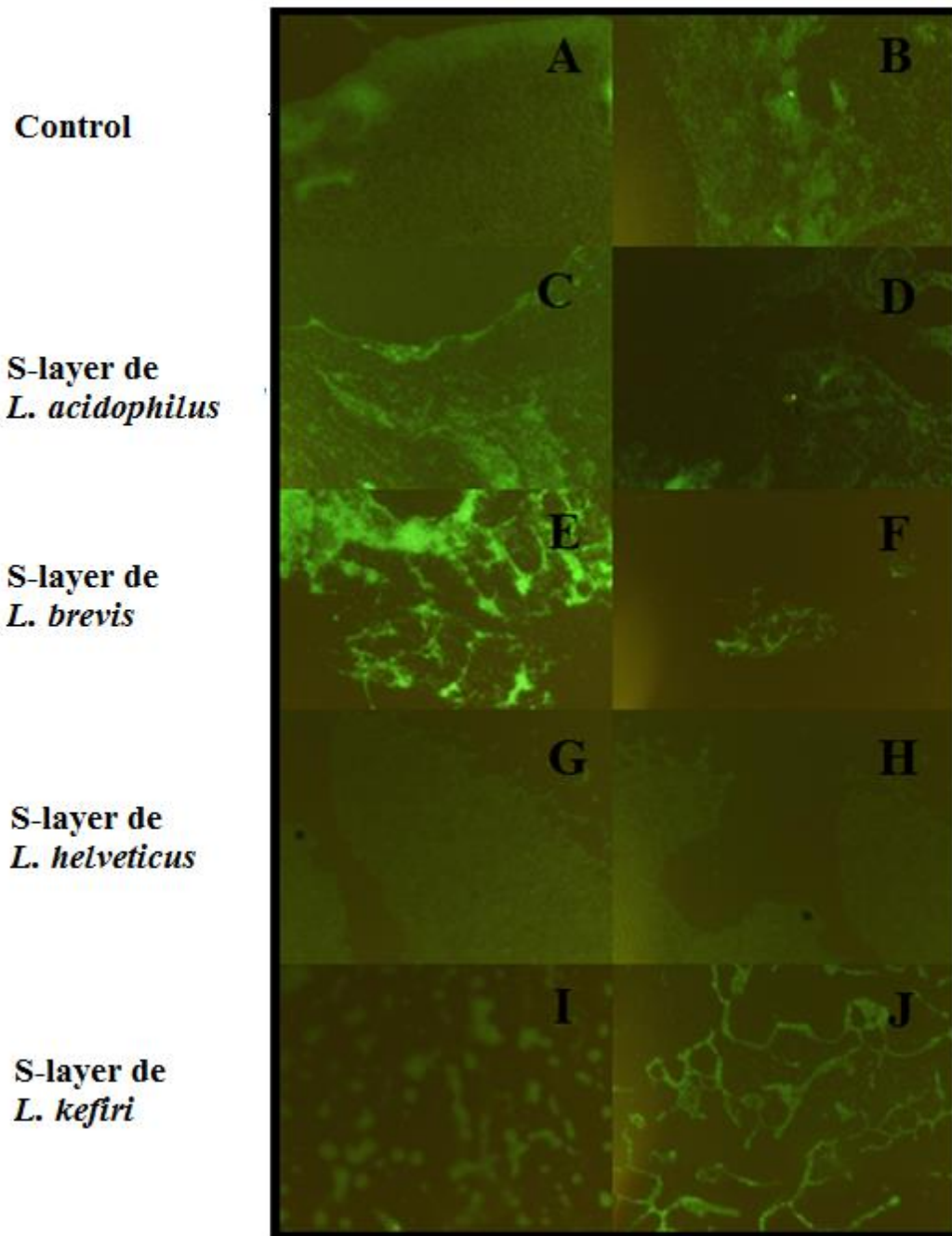


Figura 17 Formación de biofilm *P. aeruginosa GFP* en superficies biótica y abiótica en contacto con S-layer observadas con un aumento de 100X, Control biofilm patógeno sin tratamiento con S-layer (A y B), Biofilm del patógeno tratado con S-layer de *L. acidophilus* (C y D), Biofilm patógeno tratado con S-layer de *L. brevis* (E y F), Biofilm patógeno tratado con S-layer de *L. helveticus* (G y H), Biofilm patógeno tratado con S-layer de *L. kefir* (I y J).

La formación de biofilm tanto en superficie biótica como abiótica mostró una distribución diferente y reducida cuando se incubó el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* junto con las proteínas S-layer de los 4 *Lactobacillus*. Por otro lado también se observó que el biofilm formado era mayor en la superficie biótica que en la abiótica.

6.5 Efecto de S-layer en la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* a células A549

Como se mencionó en la introducción la adhesión de *P. aeruginosa* a los receptores celulares de la vía respiratoria es el evento inicial en el establecimiento de colonización respiratoria e infección crónica posterior. Para saber si la S-layer de los diferentes *Lactobacillus* disminuye en parte o en su totalidad la unión de *Pseudomonas aeruginosa* a células eucariotas del tracto respiratorio, se realizaron diferentes ensayos usando células A549 derivadas de epitelio alveolar humano. Se realizaron tres métodos diferentes para observar la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* a células A549: Microscopia, Recuento en placa, Citometría de Flujo

6.5.1 Microscopia

Una vez que transformamos *Pseudomonas aeruginosa* con el plásmido pSEVA GFP, realizamos un ensayo de adhesión de este patógeno a células eucariotas de tracto respiratorio A549 y las observamos al microscopio de fluorescencia. Para realizar este experimento células crecidas sobre un cubre objetos de vidrio dentro de cada pocillo en una microplaca de 24 pocillos, se dejaron en contacto con una dilución de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa GFP* en cada uno de los pocillos con las células eucariotas. Después de una hora se retiró el inóculo, se realizaron tres lavados con PBS y se fijaron con metanol las células que quedaron pegadas con las *Pseudomonas* en el vidrio dentro de cada pocillo. Luego fueron teñidas con Azul de Evans, los vidrios se montaron sobre portaobjetos y se observaron al microscopio en un aumento de 1000X.

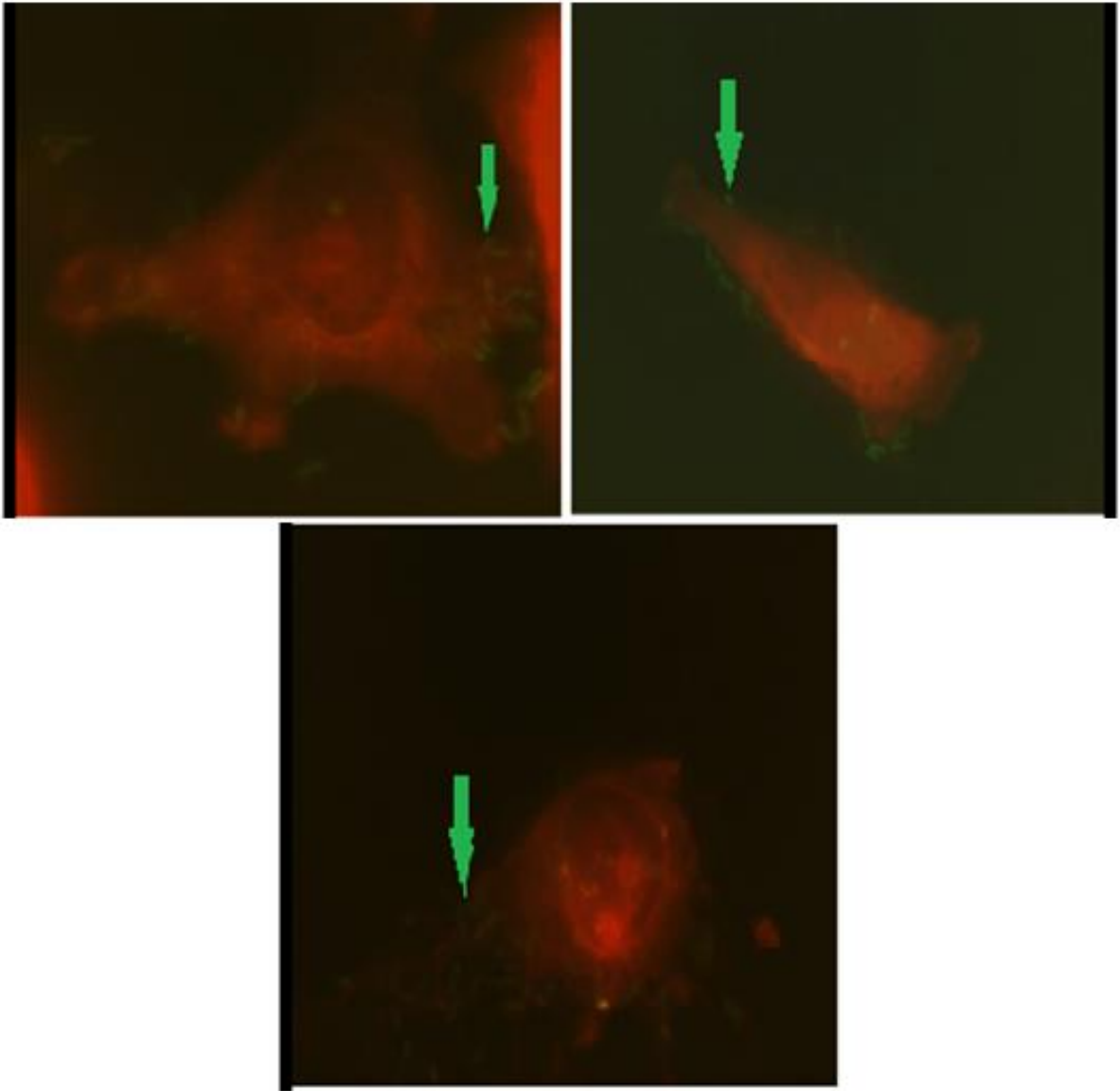


Figura 18 Adhesión de *P. aeruginosa* GFP a células A549, observadas por microscopía de fluorescencia con un aumento de 1000X.

Mediante la fluorescencia de *Pseudomonas* y la tinción de las células con azul de Evans se pudo observar la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* pSEVA GFP a las células A549, observándose al patógeno adherido a la periferia de la célula y no intracelularmente (marcadas con flecha en las figura 18).

Sin embargo para poder observar diferencias entre la adhesión de *Pseudomonas* a las células A549 y la adhesión de *Pseudomonas* a las células pretratadas con S-layer a una concentración de 50 µg/ml se realizó una tinción con Cristal violeta, ya que mediante esta técnica se pudo observar claramente la unión *Pseudomonas* a las células con un aumento de 100X y 400X permitiéndonos mirar el patrón de adherencia que por fluorescencia no se pudo observar, ya que la resolución y claridad de las imágenes fue notoriamente menos marcada que al hacer la coloración con cristal violeta.

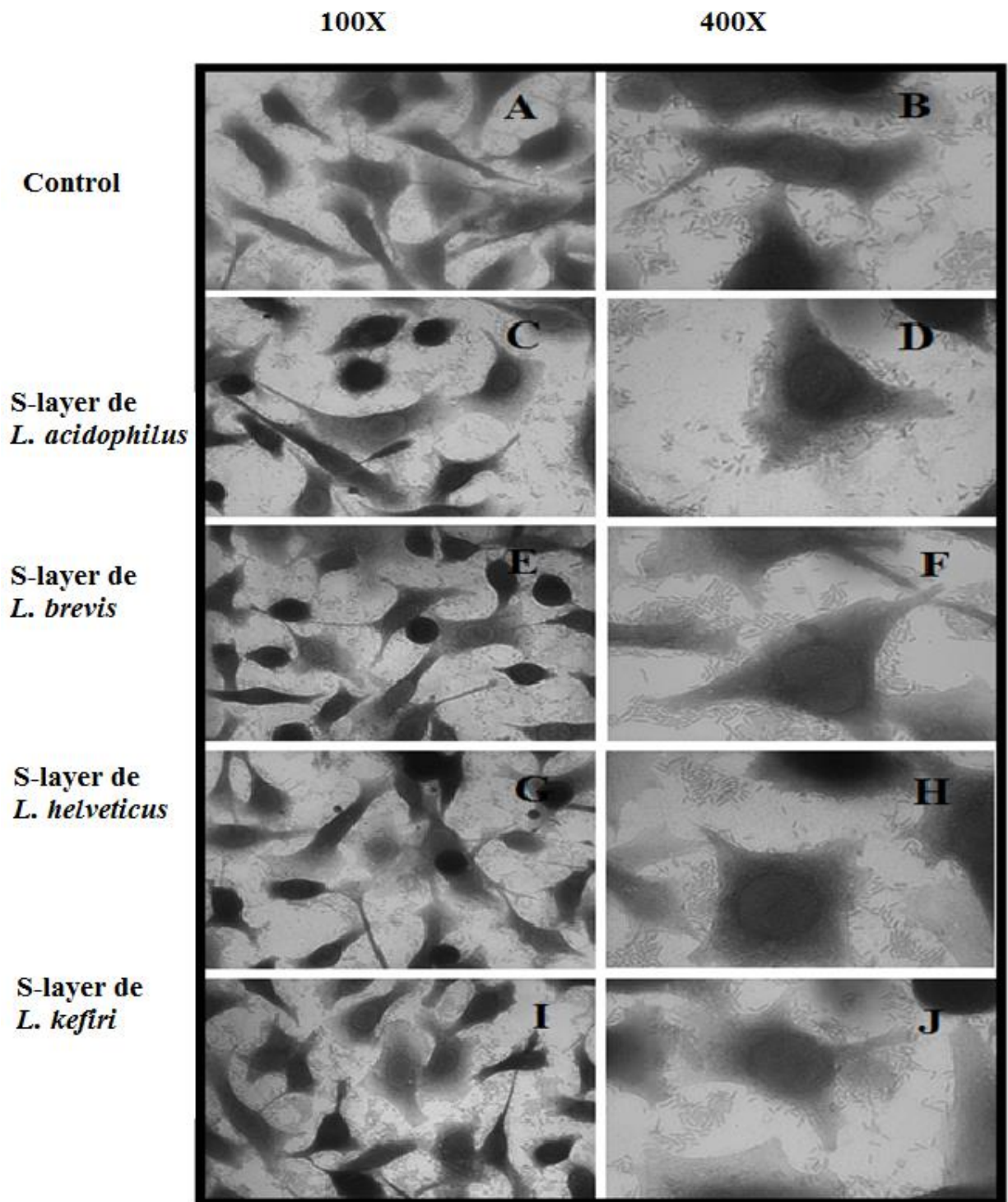


Figura 19 Tinción con Cristal violeta, adhesión de *P. aeruginosa* a células A549 en contacto con S-layer, observadas por microscopía con aumento de 100 y 400X, Control *P. aeruginosa* adherida a las células (A y B), *P. aeruginosa* adherida a las células pre-tratadas con S-layer de *L. acidophilus* (C y D), *P. aeruginosa* adherida a las células pre-tratadas con S-layer de *L. brevis* (E y F), *P. aeruginosa* adherida a las células pre-tratadas con S-layer de *L. helveticus* (G y H) *P. aeruginosa* adherida a las células pre-tratadas con S-layer de *L. kefiri* (I y J).

Mediante esta tinción se pudo observar diferencia en la disposición de las bacterias al comparar el control de pegado y las células con las diferentes S-layers. En el control de pegado sin S-layer se pudo observar que *Pseudomonas* se adhiere a las células de una manera más difusa, dispersándose incluso en el espacio intercelular. En contraste se observó que en las células que estuvieron en previo contacto con las proteínas de *L. brevis*, *L. helveticus* y *L. kefir*, *Pseudomonas* tuvo un patrón de adherencia agregativo, formando grupos y menos dispersa en el espacio intercelular. Mientras que en las células que estuvieron en contacto con S-layer de *L. acidophilus* se observó un patrón de adherencia localizado.

6.5.2 Recuento en placa

Para obtener datos cuantitativos que nos permita aclarar las diferencias de pegado de *Pseudomonas aeruginosa* pSEVA GFP a las células A549, el ensayo de adherencia se realizó también mediante recuento de UFC/ml en placas de LB agar. Para esto células A549 crecidas sobre una microplaca de 24 pocillos, se dejaron en contacto durante una hora a 37°C con cada una de las proteínas a una concentración de 100 µg/ml. Después de este tiempo se retiró el medio de cada uno de los pocillos y se inoculó 500µl de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa GFP* en cada uno de los pocillos con las células eucariotas que estuvieron previamente en contacto con las proteínas. Se realizó tres lavados con PBS y se levantaron las células junto con las *Pseudomonas* que quedaron pegadas a ellas con PBS tritón 0,05%. Se resuspendió vigorosamente para despegar todas las células y tener una mezcla homogénea de las células A549 y *Pseudomonas*. Luego de esto se realizó el recuento de las UFC en cada dilución y los resultados de UFC/ml se expresaron como porcentaje de adhesión respecto del control de *Pseudomonas* en contacto a células A549 sin tratar con S-layer.

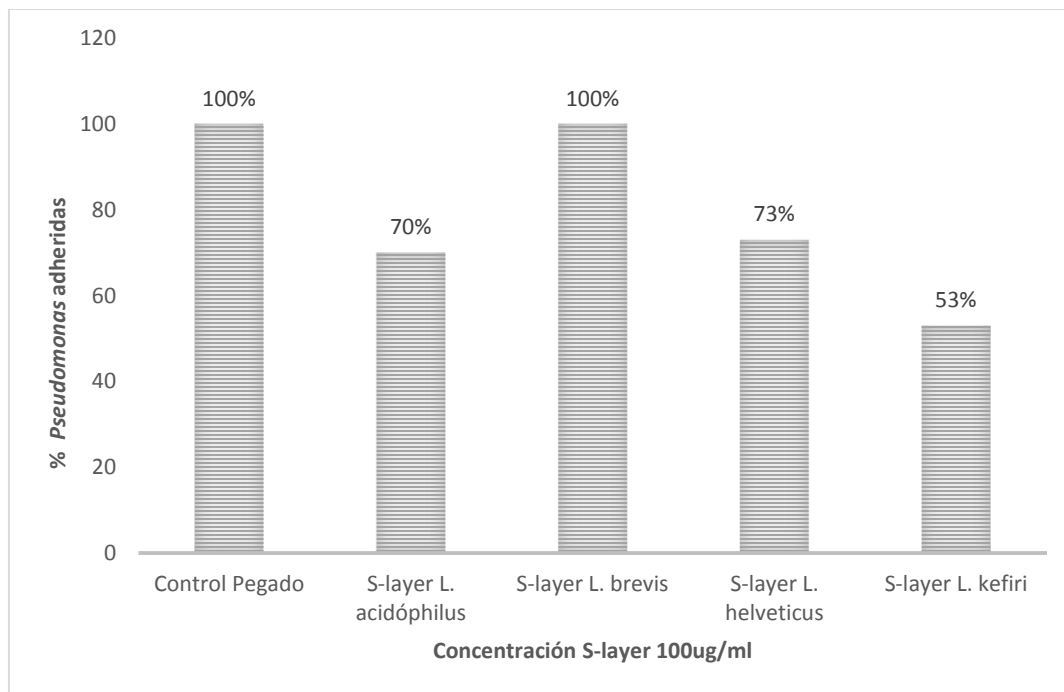


Figura 20 Adherencia de *P. aeruginosa* a células A549 tratadas con S-layer, expresadas en porcentaje con respecto a un control.

Al analizar los porcentajes de adhesión obtenidos después del tratamiento con cada una de las proteínas, se observó una disminución de pegado con las S-layers de *L. acidophilus*, *L. helveticus* y *L. kefir*. El pegado del patógeno a las células tratadas con estas proteínas disminuyó a 70%, 73% y 53% respectivamente, resultado que no se observó cuando las células se trataron con la proteína de *L. brevis* donde el pegado de *Pseudomonas* a las células no disminuyó.

6.5.3 Por citometría de flujo

Para tener resultados más certeros realizamos el mismo ensayo que en el ítem anterior pero luego lo cuantificamos por citometría de flujo, lo que nos permitió cuantificar a las *Pseudomonas* que quedaron adheridas a las células A549, hayan o no sobrevivido a las diferentes manipulaciones durante ensayo.

Para realizar el ensayo células A549 crecidas sobre una microplaca de 24 pocillos, se dejaron en contacto durante una hora a 37°C con cada una de las proteínas a una concentración de 50µg/ml y 100 µg/ml. Después de este tiempo se retiró el medio de cada uno de los pocillos y se inoculó 500µl de *Pseudomonas aeruginosa GFP* con una D.O. de 4 en cada uno de los pocillos con las células eucariotas que estuvieron previamente en contacto con las proteínas. Se realizó tres lavados con PBS y se levantaron las células junto con las *Pseudomonas* que quedaron pegadas a ellas con PBS tritón 0,05%. Se resuspendió vigorosamente para despegar todas las células y tener una mezcla homogénea de las células A549 y *Pseudomonas*. Las lecturas en el citómetro de flujo se realizaron por duplicado y los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de adhesión respecto al control de *Pseudomonas* adheridas a las células A549 sin tratar con las S-layers (Control pegado).

Tabla 3 Porcentaje de *Pseudomonas* pegadas a las células A549 previo tratamiento con las S-layer a una concentración de 50µ/ml.

Muestra	% de adhesión
Control pegado	100,00
S-layer <i>L. acidophilus</i>	29,79
S-layer <i>L. brevis</i>	31,06
S-layer <i>L. helveticus</i>	23,40
S-layer <i>L. kefir</i>	62,98

Tabla 4 Porcentaje de *Pseudomonas* pegadas a las células A549 previo tratamiento con las S-layer a una concentración de 100µ/ml.

Muestra	% de adhesión
Control pegado	100
S-layer <i>L. acidophilus</i>	25,96
S-layer <i>L. brevis</i>	37,45
S-layer <i>L. helveticus</i>	35,74
S-layer <i>L. kefir</i>	32,34

Al realizar el conteo de células fluorescentes mediante citometría de flujo se observó una disminución de la adhesión de *Pseudomonas* a las células epiteliales que estuvieron en contacto con las diferentes proteínas, respecto al control de células sin tratar con S-layer. En este caso las cuatro proteínas mostraron una marcada inhibición en la adhesión del patógeno. A modo de ejemplo en la figura 21 se muestran los gráficos de conteo analizados mediante el programa Flow Jo.

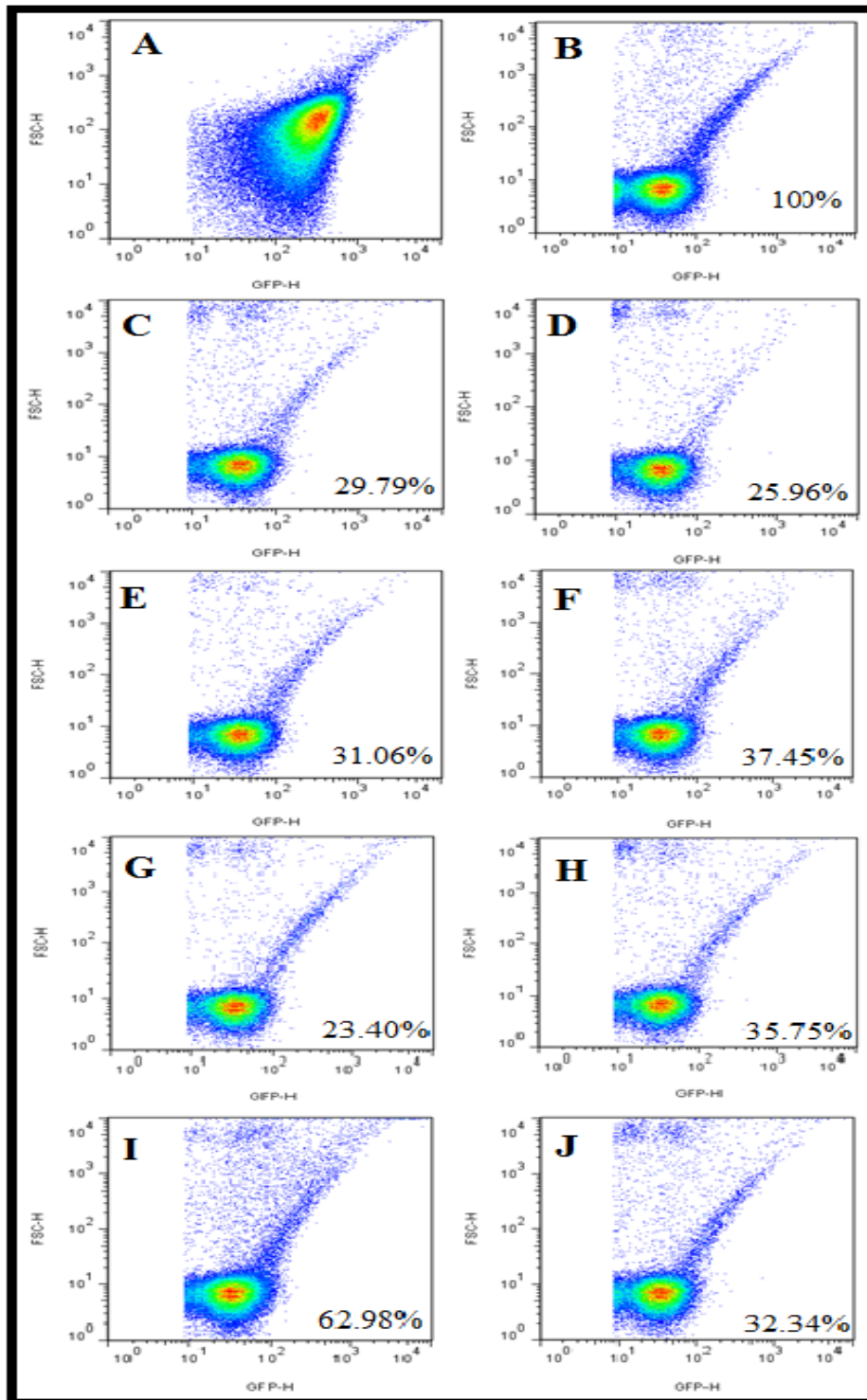


Figura 21 Gráficos de conteo de células de *Pseudomonas* adheridas a las células A549 pre-tratadas con 100ug/ml de S-layer, analizado mediante el programa Flow Jo, A) Conteo de inóculo inicial de *P. aeruginosa* B) Control de pegado sin tratamiento con S-layer que corresponde a 100%, C) y D) Conteo de *P. aeruginosa* adherida a las células pre-tratadas con S-layer de *L. acidophilus*, E) y F) Conteo de *P. aeruginosa* adherida a las células pre-tratadas con S-layer de *L. brevis*, G) y H) Conteo de *P. aeruginosa* adherida a las células pre-tratadas con S-layer de *L. helveticus*, I) y J) Conteo de *P. aeruginosa* adherida a las células pre-tratadas con S-layer de *L. kefir*.

6.6 Efecto antiviral en Herpes simplex

El HSV- 1 es un patógeno humano común asociado con las infecciones orofaciales y encefalitis. Los agentes antivirales actuales con licencia para el tratamiento de infecciones por el virus del herpes incluyen el aciclovir y sus derivados, foscarnet y cidofovir. Los efectos secundarios tóxicos y la aparición de cepas de virus que son resistentes a estos fármacos, conllevan a la necesidad de encontrar nuevos compuestos eficaces contra las enfermedades infecciosas virales. Se han realizado estudios tratando de buscar alternativas a los fármacos ya conocidos como un estudio donde evaluaron los efectos de extractos de plantas contra HSV-1, en la que los efectos del arbusto *Schinus terebinthifolius Raddi* eran notables, la actividad anti- HSV-1 del extracto resultó mejor que la de sus fracciones y compuestos aislados, y los resultados obtenidos sugieren que el proceso de la entrada del virus sería el paso afectado (Requena & col., 2016).

Encontrar a S-layer como agente anti-HSV sería beneficioso no solamente por ser una alternativa a los fármacos usados actualmente, sino también de encontrarse que produce la reducción de la multiplicación del virus podríamos ayudar a que las lesiones causadas por este virus en las personas sean menores y su tiempo de recuperación sea mucho más corto. Para poder averiguar si S-layer tiene un rol antiviral contra HSV-1 primero se evaluó si el efecto citopático de HSV-1 en células A549 tenía alguna variación al estar en contacto con S-layer después de la adsorción del virus a las células. Luego, para verificar estos resultados también se cuantificó el rendimiento viral mediante el método de formación de placas en medio semisólido.

6.6.1 Citotoxicidad de S-layer en células eucariotas A549

Una primera evaluación que debe realizarse a un posible compuesto antiviral es su inocuidad sobre células eucariotas. Para saber si las diferentes proteínas producen o no citotoxicidad en las células A549 utilizadas en los diferentes ensayos con los patógenos, se realizó el ensayo de citotoxicidad con Cristal violeta. Para ello, células crecidas en monocapa en una placa de

96 pocillos se trataron durante 48hs con distintas concentraciones de las diferentes S-layers. Luego, las células se fijaron, se tiñeron con el colorante y se realizaron lecturas de DO en un lector de microplacas. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de viabilidad en relación al control de células sin tratar con S-layer.

Tabla 5 Citotoxicidad de las S-layer en células A549. Las células fueron teñidas con cristal violeta 0.01%, después de 48hs de contacto con las S-layer, y su correspondencia expresada en porcentaje de viabilidad al compararla con el control de células.

Tratamiento	% Viabilidad
Control células	100
S-layer <i>L.acidophilus</i> 50µg/ml	100
S-layer <i>L.acidophilus</i> 100µg/ml	98
S-layer <i>L.acidophilus</i> 200µg/ml	94
S-layer <i>L. brevis</i> 50µg/ml	100
S-layer <i>L. brevis</i> 100µg/ml	100
S-layer <i>L. brevis</i> 200µg/ml	100
S-layer <i>L. helveticus</i> 50µg/ml	100
S-layer <i>L. helveticus</i> 100µg/ml	100
S-layer <i>L. helveticus</i> 200µg/ml	100
S-layer <i>L. kefir</i> 50µg/ml	100
S-layer <i>L. kefir</i> 100µg/ml	100
S-layer <i>L. kefir</i> 200µg/ml	97

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos y se puede concluir que ninguna de las cuatro proteínas ensayadas afecta la viabilidad celular aún a la máxima concentración ensayada de 200 µg/ml.

6.6.2 Ensayo de reducción de la acción citopática viral (ACP)

El efecto de las cuatro proteínas sobre la capacidad del virus de producir daño o acción citopática a las células se evaluó en forma cualitativa.

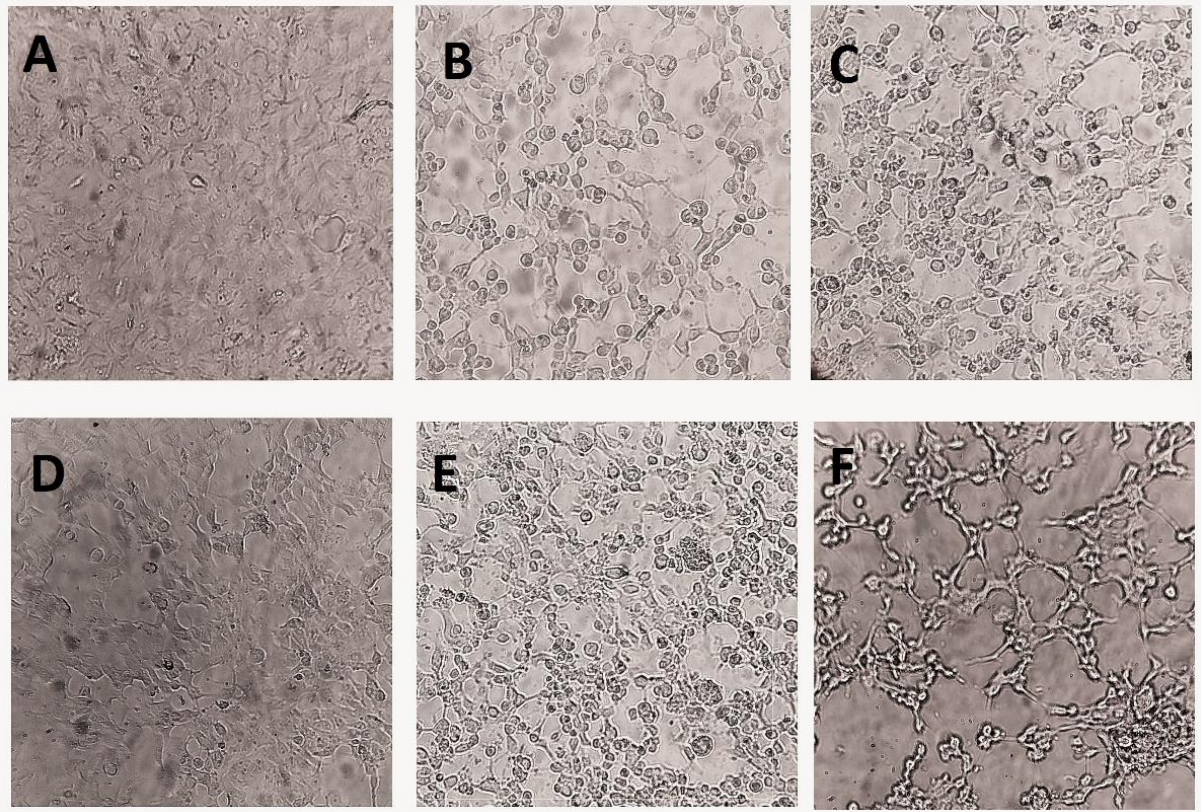


Figura 22 Acción citopática de HSV-1 en células A549: **A)** Control de células sin infectar (CC). **B)** Control de virus sin tratar con S-layer (CV). Células infectadas en contacto con S-layer de *L. acidophilus* (C), de *L. brevis* (D), de *L. helveticus* (E), o de *L. kefir* (F).

Para ello, se observaron las células A549 48 horas después de haber estado en contacto con el virus y con las diferentes proteínas S-layer, y se hizo una comparación con el control donde las células únicamente estuvieron en contacto con el virus y sin la S-layer. En la figura 22 se muestran, a modo de ejemplo, las imágenes obtenidas empleando 100 µg/ml de las distintas S-layers. En el CV (Fig. 22B) se puede observar el 100% de las células redondeadas, respecto del CC sin infectar (Fig. 22A).

En cambio, en las células infectadas y tratadas con S-layer de *L. brevis* (Fig. 22D) se puede observar una disminución del efecto citopático. Este efecto es menos marcado con S-layer de *L. acidophilus* (Fig. 22C) y de *L. helveticus* (Fig. 22E), y directamente no se observó en las células que estuvieron en contacto con la S-layer de *L. kefir* (Fig. 22F). Este ensayo cualitativo preliminar puso en evidencia la potencial actividad antiviral de las S-layers.

6.6.3 Ensayo de inhibición del rendimiento viral

A continuación, se estudió el efecto de las S-layers sobre la multiplicación de HSV-1 mediante el ensayo cuantitativo de inhibición del rendimiento viral. Para ello, células A549 crecidas a confluencia en microplaca de 96 pocillos se infectaron con 25 µl del virus. Luego de la hora de adsorción a 37°C, se agregaron 100 µl de diferentes concentraciones de proteínas, por triplicado. La microplaca se incubó durante 48hs, se cosechó virus total (intracelular y extracelular) y finalmente, se cuantificó el rendimiento viral por el método de formación de placas en una placa de 24 pocillos. Una vez realizado el conteo de placas formadas por el virus en las células, se obtuvo el número de UFC/ml (título viral) de cada una de las proteínas mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Título viral} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de placas promedio}}{\text{volúmen inóculo (ml)}} \times \text{Factor de dilución}$$

En la figura 23 se muestra a modo de ejemplo la titulación del control de virus y de las muestras tratadas con las distintas concentraciones de S-layer de *L. helveticus*.

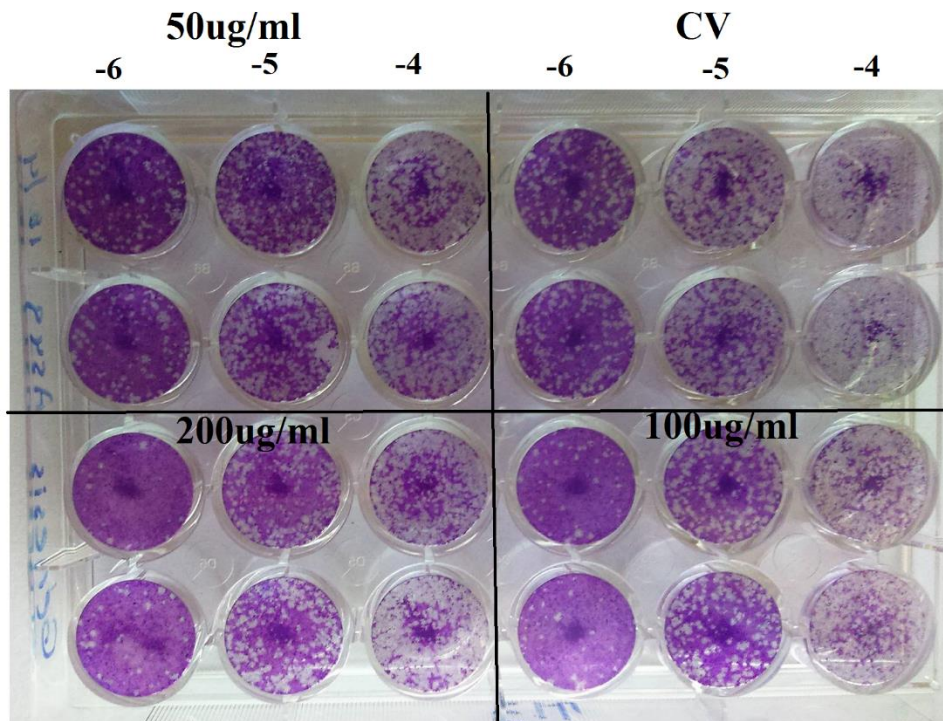


Figura 23 Titulación de las muestras de *L. helveticus*. De cada muestra se hicieron diluciones seriadas al décimo y se plaquearon las diluciones -4, -5 y -6. A las 48 hs se realizó el recuento del número de placas formadas que corresponden a una UFC. CV (control de virus sin proteína)

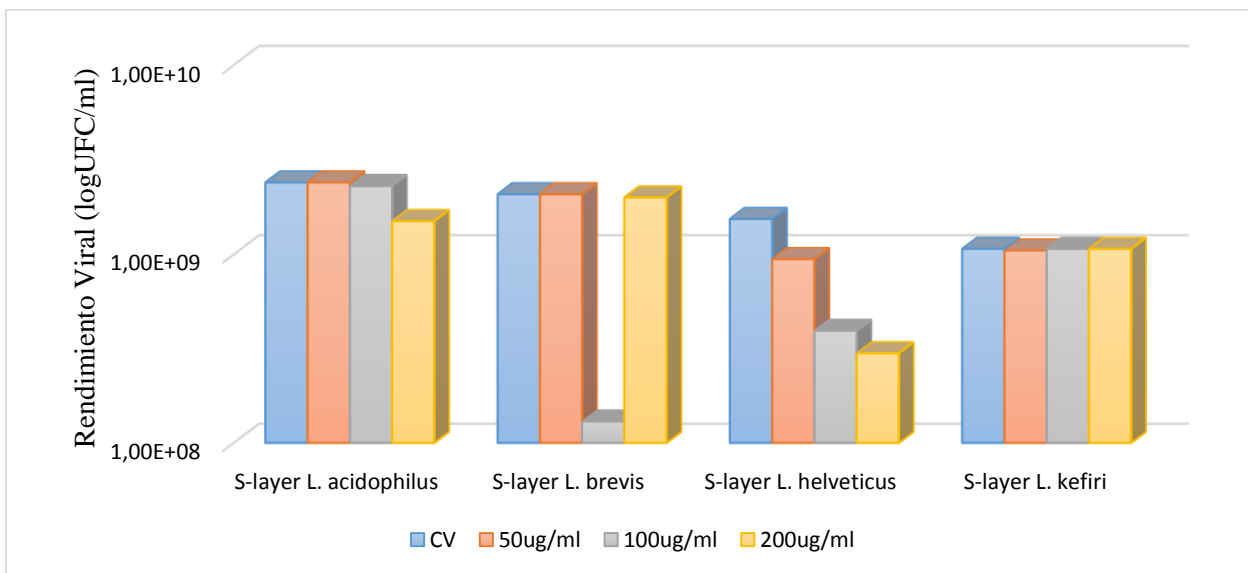


Figura 24 Efecto de las diferentes S-layers sobre la multiplicación de HSV-1. Las células A549 se infectaron con HSV-1 y se trataron o no (CV) con las diferentes S-layers. A las 48 hs se obtuvieron los títulos virales por el método de placas.

El título viral obtenido en este ensayo mostró resultados distintos para cada una de las proteínas (Figura 24). En el caso de la S-layer de *L. acidophilus*, se observó una disminución del título viral únicamente cuando la concentración de la proteína fue de 200µg/ml. Con el tratamiento de S-layer de *L. brevis* se observó una disminución del título viral a una concentración de 100µg/ml, disminución que no se observó al elevar la concentración de la proteína a 200µg/ml. Los resultados obtenidos en células tratadas con S-layer de *L. helveticus* muestran una disminución del título viral dependiente de la concentración de la proteína, observándose una mayor disminución cuando la proteína está a una concentración de 200 µg/ml. En el tratamiento con S-layer de *L. kefir* no se observó disminución del título viral en ninguna de las concentraciones estudiadas.

Una manera de expresar cuantitativamente el efecto de las proteínas estudiadas sobre la capacidad de multiplicación del virus es calcular el rendimiento viral. Para calcularlo se usó la siguiente ecuación.

$$\% \text{ inhibición título viral} = 100 - \left(\frac{\text{Título viral en presencia del compuesto}}{\text{Título viral del CV}} \times 100 \right)$$

Tabla 6 Inhibición del rendimiento viral después del tratamiento con las diferentes S-layers

Concentración de S-layer	% inhibición del rendimiento viral			
	S-layer <i>L. acidophilus</i>	S-layer <i>L. brevis</i>	S-layer <i>L. helveticus</i>	S-layer <i>L. kefir</i>
50	0	0	38	0
100	0	94	74	0
200	60	4	81	0

Al igual que los resultados obtenidos en el título viral, los resultados expresados como % de inhibición del rendimiento viral de HSV-1 muestran diferencias entre las proteínas. Con la proteína S-layer de *L. kefir* no se produce ningún efecto sobre el rendimiento del virus mientras que con las otras tres proteínas si se observa inhibición en una o varias de las concentraciones ensayadas.

DISCUSIONES y CONCLUSIONES

7 DISCUSIONES

Las enfermedades infecciosas necesitan del desarrollo de clases totalmente nuevas de agentes antimicrobianos, para combatir a las bacterias resistentes a los antibióticos y las estructuras de biofilm que estas generan. Los enzibióticos o antibióticos peptídicos, que actúan como agentes antimicrobianos enzimáticos son candidatos prometedores como nueva estrategias. En vista de que la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* cumple con la definición de antibióticos peptídicos, este trabajo de tesis tuvo como objetivo evaluarlo para proteínas S-layer de otras especies dada la alta heterogeneidad observada, a fin de postularlas o no como candidatos antivirales y antibacterianos.

Los patógenos agrupados bajo la sigla "Eskape" (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp*) son la causa principal de las infecciones intrahospitalarias en todo el mundo. La mayoría de ellas son cepas resistentes a múltiples fármacos, lo que constituye una de las principales amenazas para la salud pública a nivel mundial. Esto ha llevado a que se realicen varios estudios donde se buscan alternativas para para lograr que el tratamiento antibiótico usado en distintas infecciones no fracase por la formación de biofilm de los siguientes patógenos.

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista importante que causa infecciones crónicas de las vías respiratorias, especialmente en la fibrosis quística (FQ). La mayoría de los pacientes con FQ adquieren *P. aeruginosa* durante la primera infancia, y la mayoría de ellos desarrollan infecciones crónicas que resultan en enfermedades pulmonares graves, que rara vez son erradicadas a pesar del tratamiento intensivo con antibióticos. El conocimiento actual indica que las tres principales estrategias de adaptación de *P. aeruginosa* son, el desarrollo de biofilm, la diversificación fenotípica, y fenotipos mutantes que juegan un papel importante en las infecciones crónicas por *P. aeruginosa* (Luján, 2011).

Klebsiella pneumoniae es un patógeno Gram negativo oportunista que produce polisacáridos capsulares (K). Se han descrito 77 antígenos K diferentes, que son la base para la serotipificación. Estos polisacáridos capsulares son importantes factores de virulencia y tienen un papel relevante para la estructura del biofilm.

Staphylococcus aureus es la especie mayormente aislada en infecciones del pie que son una de las causas más importantes de morbilidad y la causa más frecuente de hospitalización relacionada con la diabetes y la amputación de miembros inferiores. La formación de biofilm es uno de los rasgos de virulencia más importantes de *S. aureus*, el crecimiento de biofilm juega un papel importante durante la infección, proporcionando defensa contra varios mecanismos antagonistas.

7.1 EFECTO ANTIMICROBIANO DE S-LAYER

En investigaciones realizadas anteriormente se demostró que la incubación de *E. coli* con S-layer de *L. acidophilus* reduce significativamente el número de células viables, daña la pared celular y lesiona subletalmente la mayoría de las células. Todos estos resultados sugerían que la S-layer de *L. acidophilus* poseía actividades de mureína hidrolasa, confirmado por (Prado Acosta 2008, 2010; Meng & col., 2015), es decir que esta proteína posee características antimicrobianas.

En este trabajo, se realizaron ensayos de inhibición de biofilm sobre diferentes patógenos con el fin de evaluar si proteínas S-layer de diferentes *Lactobacillus* poseen efecto antimicrobiano. Los microorganismos que se ensayaron fueron *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, y *Pseudomonas aeruginosa*, por su potencial patogénico en humanos.

La característica que mejor distingue las infecciones crónicas relacionadas con biofilms de las infecciones agudas es su respuesta a tratamientos antibióticos. Mientras que las infecciones agudas pueden ser eliminadas tras un breve tratamiento antibiótico, las infecciones por biofilms normalmente no consiguen ser completamente eliminadas y producen episodios recurrentes. Esto se debe a que las bacterias del biofilm pueden ser hasta 1.000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en medio líquido.

La actividad antibacteriana de distintos fármacos se enfrentan a grandes retos en la erradicación de biofilm producido por distintos patógenos. Los mecanismos de protección que se le atribuyen al biofilm en la resistencia a los antimicrobianos todavía no se entienden completamente, aunque se han propuesto varios mecanismos como las barreras físicas o

químicas que impiden la difusión y penetración de los antimicrobianos, resistencia a la fagocitosis por células de la respuesta inmune, crecimiento lento de bacterias debido a la escases de alimento, la expresión génica alterada de genes de resistencia debido a la activación de las respuestas generales de estrés y / o la adaptación al crecimiento en las superficies, y la aparición de un fenotipo de biofilm específica (Shen & col., 2016)

Los resultados mostraron que el tratamiento con las proteínas S-layer de *L. acidophilus*, *L. brevis* y *L. helveticus* provocaron una disminución muy importante en la formación de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*, disminución que resultó ser concentración dependiente. En cambio, el tratamiento del patógeno con S-layer de *L. kefir* no mostró disminución en la formación de biofilm en ninguno de los tratamientos ni en bajas concentraciones, recién se observó una disminución de aproximadamente el 20% de la formación de biofilm a una concentración de 150µg/ml. Estos resultados sugieren que la S-layer de *L. kefir* podría producir un efecto en la formación de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* sólo en concentraciones iguales o mayores a 150µg/ml, hipótesis que no pude comprobar ya que a concentraciones mayores a 150µg/ml hay agregación y precipitación de S-layer que interfiere con las determinación de biofilm. El menor efecto inhibitorio observado con esta proteína podría deberse a las diferencias estructurales que posee la S-layer de *L. kefir* respecto de las otras tres, como ya se mencionó en los resultados, es la de mayor PM y la única glicosilada.

Por otra parte, cuando se estudió la formación de biofilm de *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* en contacto con las diferentes S-layers, la formación de biofilm obtenida fue similar e incluso en algunos casos mayor al control, el cual está libre del contacto con la proteína. Por lo tanto, las proteínas S-layers ensayadas no reducen la formación de biofilm de estos patógenos, al menos no en las concentraciones y condiciones experimentales estudiadas.

La diferencia en el efecto que produce la S-layer en la formación de biofilm puede deberse a que los mecanismos moleculares que regulan este proceso varían entre las bacterias, aunque todos ellos culminen en la síntesis de una matriz extracelular, la composición de dicha matriz es compleja y variable, incluso dentro de la misma especie bacteriana cuando las condiciones ambientales son alteradas. Sin embargo, un principio común es que la matriz se construye a partir de exopolisacáridos o proteínas, que eventualmente puede ser entretejida con ADN genómico extracelular para la formación de biofilm (Taglialegna & col., 2016). La

interferencia de las S-layer podría ser por interacción directa con los azúcares impidiendo la conformación del entramado de la matriz extracelular de modo similar al descrito por Baker y col. (2016) donde la adición de enzimas glicosido hidrolasas participan en la destrucción de biofilm. En la secuencia de las proteínas S-layer se predice del análisis *in silico* la presencia de dominios de unión a carbohidratos (Carbohydrate binding domains o CBD) que presentan homología a las lectinas (Martínez 2012), indicando un posible reconocimiento de glicosilaciones, característica que podría explicar un posible mecanismo de interacción con la matriz polisacáridica de los biofilms.

Los resultados demuestran que cuando tratamos a *P. aeruginosa* con las diferentes proteínas S-layer, la formación de biofilm se ve disminuido, aportando conocimientos importantes de aplicación en cuanto a las características antimicrobianas de S-layer frente a patógenos gram-negativos. Resultados que pueden servir como pautas para la investigación de alternativas frente al tratamiento o profilaxis de infecciones producidas por *P. aeruginosa*.

Por otra parte, durante el desarrollo de la fibrosis quística (CF) o en pacientes con ventilación mecánica, *Pseudomonas aeruginosa* coloniza los pulmones mediante la unión a receptores celulares en la superficie del epitelio pulmonar.

Varios estudios han demostrado que el bloqueo de la interacción de *Pseudomonas* a células A549 se logra con concentraciones inhibitorias de antibióticos como la ciprofloxacina. El desarrollo de la resistencia bacteriana es un inconveniente probable de tal intervención. El uso de otra alternativa para interferir con la adhesión bacteriana y la invasión ha ganado recientemente atención con la hipótesis de que al inhibir la unión bacteriana se puede evitar o reducir la patogenicidad. (Ahmed,GF et.al, 2014). En este trabajo se construyó una cepa de *P. aeruginosa* que expresa el gen de la proteína fluorescente GFP que permitió realizar distintos ensayos para evaluar si esta se adhiere y de qué manera a la línea celular A549 cuando se pone en contacto con las diferentes S-layers. Los resultados que obtuvimos por microscopía mostraron que el pretratamiento de las células A549 con las S-layers altera el patrón de adhesión de las *Pseudomonas*, pasando de un tipo de adherencia difusa en el control a una forma localizada o agregativa, en las células tratadas. Este cambio estuvo acompañado por una reducción del número de bacterias pegadas a estas células, como se comprobó mediante citometría de flujo y recuento en placa. Un tema fundamental en microbiología es la capacidad de detectar células viables pero no cultivables y viables

cultivables por distintos métodos. Los métodos de cultivo son selectivos y subestiman la población real, además de que requieren mucho tiempo. La citometría de flujo es una técnica analítica sensible que puede controlar rápidamente estados fisiológicos de bacterias (Khan & Pyle, 2011). El porcentaje de bacterias pegadas a las células obtenidas mediante citometría de flujo fue considerablemente menor al porcentaje obtenido por recuento en placa, esta diferencia puede atribuirse a que el método de recuento en placa se realizó a partir de diluciones seriadas de las bacterias que quedaron adheridas a la células, tiene la limitación de que sólo permite el recuento de bacterias viables posterior a un tratamiento con detergente que puede generar error por subestimación, mientras que la citometría de flujo analiza directamente la muestra en el citómetro, e identifica todas las bacterias presentes en la muestra (resultado obtenido por citometría es en número de células, mientras que en recuento en placa es de UFC/ml), resultado que puede explicar las diferencias en los porcentajes de pegado obtenido. Nuevamente, la proteína S-layer que mostró menor efecto fue la obtenida de *L. kefir*, sugiriendo que esta diferencia podría deberse también a la glicosilación o simplemente su mayor PM.

El establecimiento de la infección está dado por la interacción entre las adhesinas microbianas y los respectivos receptores ubicados en la superficie de las células diana. En el caso de *P. aeruginosa* está reportado que las mucinas de las células epiteliales del sistema respiratorio actúan como receptores celulares, interactuando con la flagelina de la bacteria. Teniendo en cuenta que las S-layers reducen la adhesión de las *Pseudomonas* se podría pensar que están interfiriendo con dicha interacción, particularmente podrían estar uniéndose a las mucinas, dado que las células son pretratadas con las proteínas. Datos previos indican que *Pseudomonas aeruginosa* se une a mucinas de células respiratorias humanas por mecanismos que implican interacciones entre componentes de los receptores de flagelares. La adhesión de *P. aeruginosa* está mediado por la proteína flagelar cap (FliD), o por flagelina. Se han identificado dos tipos distintos de proteínas FliD, el tipo A que se encuentra en *P. aeruginosa* PAK, y el tipo B, que se encuentra en la cepa PAO1 (Scharfman & col, 2001).

El bloqueo de esta interacción es una estrategia que viene siendo muy estudiada debido a que es muy difícil erradicar la infección una vez que las bacterias colonizaron el epitelio pulmonar. Por ejemplo, se han probado diferentes extractos naturales solos o en combinación

con la ciprofloxacina para interferir con la adhesión e invasión bacteriana y por lo tanto evitar o reducir la patogenicidad (Ahmed, Elkhatib, & Noreddin, 2014).

Trabajos previos han descrito que la proteína S-layer de diferentes *Lactobacillus* entre ellos *L. acidophilus* y *L. kefir* (Carasi & col, 2014), se unen a mucinas u otras proteínas celulares como la fibronectina (Hymes & col, 2016), efecto que podría ser el responsable de la disminución de *Pseudomonas* unidas a las células A549, debido a esta unión proteína-mucina ocasionaría la disminución de receptores de mucina disponibles para el patógeno.

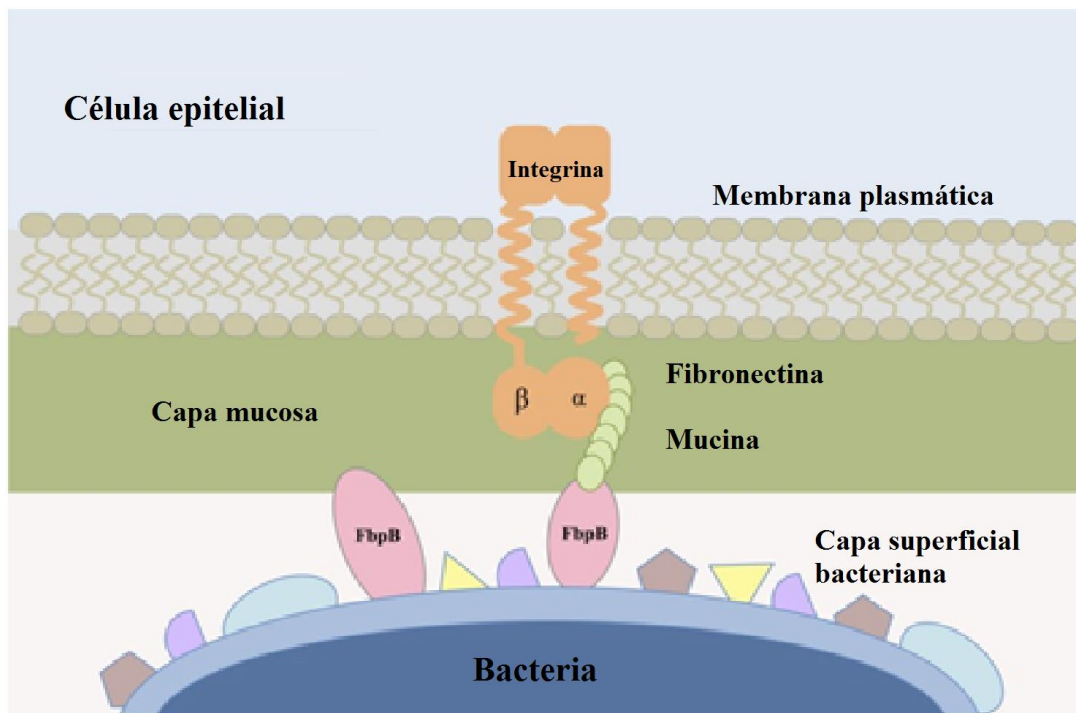


Figura 25 Esquema de unión a la fibronectina o mucina de células epiteliales, mediante receptores FbpB de *Lactobacillus* adaptado de (Hymes & col, 2016)

Por lo tanto, en este trabajo se pudo demostrar que diferentes proteínas S-layer ejercen una interesante actividad antimicrobiana sobre *P. aeruginosa* ya que, por un lado, pueden reducir la adhesión a las células epiteliales, y por otro lado, pueden evitar la colonización disminuyendo la formación de biofilm.

7.2 EFECTO ANTIVIRAL DE S-LAYER

En las últimas décadas se ha observado el incremento en la aparición de nuevas enfermedades virales (SIDA, Hepatitis C, fiebre del Ébola), y de otras infecciones que estaban bajo control, y que ahora se presentan con incidencias cada vez más altas (Fiebre amarilla), convirtiendo a los virus en una amenaza permanente. El HSV-1 es uno de los virus más comunes en el ser humano, capaz de establecer una infección latente que le permite evadir el sistema inmune generando una infección para toda la vida que hasta el presente se considera incurable. Las manifestaciones clínicas comunes incluyen ampollas o aftas en el lugar de la infección primaria, mientras que las complicaciones de una enfermedad herpética ocular o encefalitis neonatal evidencian el grado de severidad que llega a alcanzar la infección. En la actualidad, el tratamiento estándar contra HSV-1 incluye al Aciclovir y otros análogos de nucleósidos. Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos que reciben tratamientos prolongados con estos antivirales se desarrollan cepas resistentes a estas drogas. Por estas razones la búsqueda de nuevos compuestos que inhiban la multiplicación viral continúa siendo un desafío para la terapia antiviral.

En este sentido, trabajos realizados anteriormente en nuestro laboratorio permitieron demostrar que la S-layer purificada de *L. acidophilus* ATCC 4365 inhibe la infección por el virus Junín (JUNV) solamente en células que expresan de forma estable el receptor DC-SIGN y cuando se pretratan con la proteína (Martínez y col, 2012). Este antecedente nos muestra que S-layer interactúa de alguna manera con receptores de células dendríticas intermediarias de la inmunidad adaptativa, lo que haría que esta respuesta inmune sea más eficiente y contrarreste la infección viral, o que por competencia inhiba la unión del virus a receptores celulares.

En este estudio se analizó si S-layer de *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. helveticus* y *L. kefir* tienen efecto sobre la infección del virus HSV-1 en condiciones *in-vitro*. La mayor disminución del título viral se obtuvo en células tratadas con S-layer de *L. acidophilus*, *L. brevis* y *L. helveticus*, mientras que el tratamiento con S-layer de *L. kefir* no inhibió la multiplicación viral, en ninguna de las concentraciones ensayadas. La actividad antiviral fue dependiente de la concentración de S-layer, aunque las curvas de inhibición obtenidas fueron diferentes entre las distintas proteínas. Por ejemplo, las concentraciones de 200 µg/ml de S-layer de *L.*

acidophilus y 100 µg/ml de S-layer de *L. brevis* fueron las únicas que mostraron una marcada inhibición del título viral, que también se reflejó en una reducción de la acción citopática observada en las células infectadas y tratadas con la proteína. En cambio, la actividad inhibitoria de la S-layer de *L. helveticus* fue aumentando en función de la concentración en el rango de 50 a 200 µg/ml. La ausencia de actividad antiviral obtenida con la concentración de 200 µg/ml de S-layer de *L. brevis* podría deberse a un efecto de agregación de las proteínas, ya que se observan precipitados insolubles a partir de dicha concentración. En cuanto a la falta total de inhibición obtenida con 50 µg/ml de S-layer de *L. brevis*, respecto del casi 100% de inhibición observada con 100 µg/ml, es difícil especular una explicación más allá de la simple pérdida de actividad por disminución de la concentración.

Al observar las células al microscopio 48h después de la infección se observó en células tratadas con 100 µg/ml *L. kefir* un mayor efecto citopático respecto del control de virus, corroborando dicho resultado al no observar disminución del título viral, en ninguna de las concentraciones ensayadas. La diferencia de esta proteína en cuanto a la protección de las células ante el efecto viral, con respecto al resto de las proteínas ensayadas podría deberse como habíamos mencionado en resultados anteriores, a su diferencia tanto en su tamaño como en su glicosilación.

Otros autores han descrito la actividad antiviral contra HSV de diferentes lactobacilos por ejemplo Conti y col. (2009) observaron que algunas cepas vaginales (*L. brevis* CD2, *L. salivarius* FV2, *L. plantarum* FV9) protegen contra la infección de HSV-2 *in-vitro*. En este caso las células infectadas se trataron con bacterias vivas o con los sobrenadantes obtenidos a partir de los cultivos bacterianos. También se probaron los factores solubles producidos por los lactobacilos, ácido láctico y H₂O₂, todos los tratamientos inhibieron la multiplicación viral, algunos con efecto virucida. La cepa que mostró más actividad fue *L. brevis* CD2, que no produce H₂O₂ y la neutralización del ácido láctico no ejerce una pérdida de inhibición, indicando que hay otros componentes bacterianos que podrían ser responsables del efecto antiviral. (Zabihollahi & col., 2012) también estudiaron la actividad antiviral y virucida de cepas vaginales y no vaginales de lactobacilos (*L. gasseri*, *L. rhamnosus* y *L. crispatus*) sobre la infección de HSV en condiciones *in-vitro* e *in-vivo*. El trabajo describe la actividad de cada cepa pero no identifica los componentes bacterianos o factores solubles responsables de la inhibición observada. En cambio, Mastromarino y col. (2011) observaron que un componente

de la pared celular obtenido de *L. brevis* resistente al tratamiento con proteasas o calor tiene actividad contra HSV-2. Si bien no lograron identificar de qué componente se trata, descartan que la actividad se deba a la proteína S-layer y sugieren a los polisacáridos, presentes en la pared celular, como posibles agentes antivirales.

Por lo tanto en este trabajo de Tesis, a diferencia de lo sugerido por Mastromarino y col. (2011) se demostró que las proteínas S-layers purificadas a partir de las diferentes cepas de *Lactobacillus* tienen actividad antiviral contra HSV-1. Cabe aclarar que ellos descartan a la S-layer como el componente de la pared con efecto antiviral porque la actividad se mantiene luego del tratamiento con proteasas o calor, pero en ningún momento usan en el ensayo la proteína purificada. Una característica particular de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* es que por ejemplo, el tratamiento con tripsina deja intacto el dominio amino-terminal de la proteína de modo que no puede descartarse su acción por el mantenimiento de actividad luego de tratamiento con proteasas (Smith 2001).

El efecto antiviral que mostró la S-layer se puede atribuir a una inhibición de la unión del virus a receptores celulares, evitando así su infección y multiplicación. Otra razón por la cual el título viral disminuye podría ser que la proteína interfiera en la multiplicación viral por alteración o inhibición en alguna proteína o función celular necesaria para la replicación del virus.

8 CONCLUSIONES

En este trabajo se encontraron características antimicrobianas y antivirales de S-layer de *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. helveticus*, *L. kefir*, resaltando la concentración-dependencia de estos efectos, que son distintos para cada una de las proteínas. Los resultados de este trabajo aportan conocimientos de importante aplicación de S-layer en cuanto a su actividad probiótica o como tratamiento para diferentes patógenos.

El mecanismo exacto por el cual las S-layer reduce la infectividad de patógenos aún no se conoce. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, se buscará profundizar en los mecanismos moleculares involucrados a fin de postular posibles formas de acción.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, G., Elkhatib, W., & Noreddin, A. (2014). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adhesion to and invasion of A549 lung epithelial cells by natural extracts. *Journal Infect Public Health*, 436-444.
- Baker, P., & col. (2016). Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Science Advances* .
- Brooks, G., Butel, J., & Morse, S. (2005). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. México : Manual Moderno.
- Cadoret, F., Soccia, C., & Voulhoux, R. (2014). Gene Transfer: Transformation/Electroporation. *Methods in Molecular Biology*, 11-15.
- Carasi, P. (2012). Surface proteins from *Lactobacillus kefir* antagonize in vitro cytotoxic effect of Clostridium difficile toxins. *ANAEROBE*, 135-142.
- Carasi, P., & col. (2014). Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus. *Journal of Dairy Research*, 16-23.
- Carnicé, T. (2006). Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. *Anales de Pediatría*, 30-41.
- Conti, C., & col. (2009). Inhibition of herpes simplex virus type 2 by vaginal lactobacilli. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 16-26.
- Estrada, J. D. (Diciembre de 2007). *Biblioteca digital Repositorio Institucional Honduras* .
Obtenido de <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/591/1/T2404.pdf>
- Frece, J., & Kos, B. e. (2005). Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 285-292.
- García, A. (2009). Propiedades probióticas de *Lactobacillus spp* aislados de biopsias gástricas de pacientes con y sin infección por *Helicobacter pylori*. *Revista médica de Chile*, 369-376. Obtenido de http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0034-98872009000300007&script=sci_arttext
- Golowczyc, M. (2007). Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 264-273.
- Griffiths, M., & Tellez, A. (2013). *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. *Frontiers in Microbiology*, 4-30.

- Guarner, F. (2007). Role of intestinal flora in health and disease. *Scielo*.
- Guevara, J. (2011). Probióticos en nutrición animal. *Sirivs*.
- Hymes, J., & col. (2016). Functional Analysis of an S-Layer-Associated Fibronectin-Binding Protein in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology*, 2676-2685.
- Hynönen, U. (2002). Identification by Flagellum Display of an Epithelial Cell- and Fibronectin-Binding Function in the SlpA Surface Protein of *Lactobacillus brevis*. *Journal of bacteriology*, 3360-3367.
- Hynönen, U., & Palva, A. (2013). Lactobacillus surface layer proteins: structure, function. *Appl Microbiol Biotechnol*, 5225-5243.
- Khan, M., & Pyle, B. (2011). Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 5088-5096.
- Kukhanova, M., Koroniva, A., & Kochetov, S. (2014). Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. *BIOCHEMISTRY (Moscu)*, 1635-1652.
- Lebeer, S. (2008). Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 728-764.
- Luján, A. (2011). Evolution and adaptation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms driven by mismatch repair system-deficient mutators. *PLOS one*, 6-11.
- Lujan, D. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 565-574.
- Martínez, G., & col., y. (2012). S-layer proteins of *Lactobacillus acidophilus* inhibits JUNV infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 590-595.
- Pérez, H. (2004). Lactobacillus Probióticos: Sustancias Naturales Bioactivas para la Prevención de Infecciones Urogenitales. 450-469.
- Prado Acosta, M., & col. (2008). Murein hydrolase activity in the surface layer of *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356. *Appl Environmental Microbiology* , 7824-7827.
- Prado Acosta, M., Mercedes, P., Allievi, M., Sanches Rivas, C., & Ruzal, S. (2010). Synergistic effects of the *Lactobacillus acidophilus* surface layer and nisin on bacterial growth. *Appl Environmental Microbiology*, 974-977.
- Prado-Acosta, M. (2008). Murein Hydrolase Activity in the Surface Layer of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *American Society for Microbiology.*, 7824-7827.

- Prado-Acosta, M. (2010). S-layer de *Lactobacillus acidophilus*: caracterización y análisis funcional. 20-26.
- Prince, A. (2006). Flagellar Activation of Epithelial Signaling. *AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY*, 548-551.
- Rasamiravaka, T. (2015). The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Research International*.
- Rong, J., & col, y. (2015). Probiotic and anti-inflammatory attributes of an isolate *Lactobacillus helveticus* NS8 from Mongolian fermented koumiss. *BMC Microbiology*, 190-196.
- Sanders, M., & Klaenhammer, T. (2010). Invited Review: The Scientific Basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM Functionality as a Probiotic. *Journal of Dairy Science*, 319-331.
- Scharfman, A., & col, y. (2001). Recognition of Lewis x derivatives present on mucins by flagellar components of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 243-248.
- Shen, Y., & col., y. (2016). Experimental and Theoretical Investigation of Multispecies Oral Biofilm Resistance to Chlorhexidine Treatment. *SCIENTIFIC REPORTS*.
- Silva, R., & col., y. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *NUCLEIC ACID RESEARCH*, 666-675.
- Sleytr, U., & Margit, S. (2000). S-Layer Proteins. *Journal of Bacteriology*, 859-868.
- Smit, E., & col. (2001). The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: identification and characterisation of domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding. *Journal Molecular Biology*, 245-257.
- Taglialegna, A., & col., y. (2016). Staphylococcal Bap Proteins Build Amyloid Scaffold Biofilm Matrices in Response to Environmental Signals. *PLOS Pathogens*.
- Vilca, H. (2012). Flora microbiana intestinal. 75-78.
- Winn, W., & col., y. (2006). *Diagnóstico Microbiológico Koneman*. Madrid: Panamericana.
- Zhang, Y. (2016). Room temperature electrocompetent bacterial cells improve DNA transformation and recombineering efficiency. *SCIENTIFIC REPORTS*.