

Verón, Daiana Micaela

Obtención de anticuerpos policlonales específicos para proteínas de capa-S de *Clostridium difficile*

2020

Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



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

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

Cita recomendada:

Verón, D.M. (2020) *Obtención de anticuerpos policlonales específicos para proteínas de capa-S de Clostridium difficile* [tesis de grado Universidad Nacional Arturo Jauretche]

Disponible en RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital UNAJ <https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj>



INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA

*Obtención de anticuerpos policlonales específicos para proteínas de capa-S
de Clostridium difficile*



6 DE MARZO DE 2020

Alumna: Verón Daiana Micaela

Directora: Dra. María de los Ángeles Serradell Co-Director: Dr. Fernando Trejo

El presente trabajo se realizó con el fin de obtener el título de Bioquímica de la Universidad Nacional Arturo Jauretche. El mismo fue desarrollado en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de María de los Ángeles Serradell y Fernando Trejo.

Agradecimientos:

Quiero agradecer a todas las personas que me ayudaron para la realización del trabajo, a los que me enseñaron todo y me tuvieron mucha paciencia y a los que me bancaron desde afuera.

A mi directora y profesora querida María Serradell por dejarme ser parte de su equipo, confiar en mí y abrirme las puertas de su lugar de trabajo. Gracias por la paciencia, el apoyo y la buena onda de siempre. Hice el trabajo con mucha alegría ya que tener a María como directora fue lo mejor, porque además de ser una profesional apasionada por lo que hace, te contagia esa pasión y amor por la bioquímica y la inmunología que no cualquiera lo hace. ¡Gracias Mari!

A mi co-director Fernando Trejo y a Mariano Malamud por la paciencia, buena onda y ayuda en todo momento.

A todos mis profesores de la carrera, ya que me llevo de ellos un pedacito y les agradezco de corazón todo lo que aprendí. Los últimos años fueron muy duros y estuvieron conmigo siempre para apoyarme y confiar en mí, les debo todo. ¡Gracias!

A todos mis compañeros que me bancaron e hicieron que este camino tan hermoso sea más llevadero.

A mi familia y amigos, que me apoyan, me dan su amor incondicional y me aguantan en todas siempre pero por sobre todo creen en mí, que si no fuera por ellos esto no hubiese sido posible. ¡Gracias!

A mis padres y hermanos, gracias por aguantarme nerviosa, triste o feliz en época de exámenes durante estos 6 años. Los amo.

Este trabajo y todo el esfuerzo que hice durante la carrera se lo dedico a una persona en especial, que siempre me dio fuerzas para seguir y poner todo de mí, el que siempre confió en mí más que nadie, porque es mi ejemplo a seguir y mi maestro en esta vida, gracias Gon, hermano, por darme día a día ese empujón para poder estar donde estoy hoy. La profesional que algún día seré va a ser gracias a vos. Te amo.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	9
3. Materiales y métodos.....	10
3.1 Microorganismos, características principales y condiciones de cultivo	
3.1.1 Cultivo de <i>Clostridium difficile</i>	
3.1.1 Cultivo de <i>Lactobacillus kefir</i>	
3.2 Extracción de proteínas superficiales de <i>Clostridium difficile</i> y <i>Lactobacillus kefir</i>	
3.2.1 Extracción de proteínas de capa-S de <i>L. kefir</i> con LiCl 5M	
3.2.2 Extracción de proteínas de capa-S de <i>C. difficile</i> con GnCl 5M	
3.2.3 Extracción de proteínas de capa-S de <i>C. difficile</i> con LiCl 5M	
3.3 Separación electroforética de proteínas	
3.3.1 Separación mediante SDS-PAGE	
3.3.2 Revelado con Coomassie Coloidal	
3.4 Cuantificación de proteínas	
3.5 Plan de inmunización	
3.6 Seguimiento de plan de inmunización	
3.7 Caracterización de los anticuerpos policlonales frente a bacterias enteras de diferentes cepas de <i>Clostridium difficile</i> por Dot blot	
4. Resultados y discusión.....	20
4.1 Cultivo de <i>C. difficile</i>	
4.2 Extracción de proteínas de capa-S	
4.3 Cuantificación de proteínas totales por método de Bradford	
4.4 Caracterización de los extractos por SDS-PAGE	
4.5 Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales anti SLP-10463	
4.6 Reactividad de anticuerpos anti SLP-10463 frente a otras cepas de <i>C. difficile</i>	
5. Conclusiones.....	33
6. Anexos.....	34
6.1 Inoculación de ratones mediante ruta intraperitoneal	
6.2 Sangría de ratón mediante punción de seno venoso submandibular	
6.3 Soluciones y buffers utilizados	
7. Fuentes de información y referencias bibliográficas.....	38

Glosario

Abs: absorbancia

BHI: Brain Heart Infusion

BSA: seroalbúmina bovina

CLR: Receptores de leptinas

DACD: diarrea asociada a *C. difficile*

GnCl: cloruro de Guanidinio

HMW-SLP: Proteínas de capa-S de *Clostridium difficile* de alto peso molecular

IFN: interferón

IgA: inmunoglobulina A

IgG: inmunoglobulina G

IgM: inmunoglobulina M

IL: interleuquina

LB: linfocitos B

LiCl: cloruro de Litio

LMW-SLP: Proteínas de capa-S de *Clostridium difficile* de bajo peso molecular

LPS: lipopolisacárido

LT: linfocitos T

MHC: (Major Hystocompatibility Complex) Complejo mayor de histocompatibilidad

MRS: Man Rogosa Sharpe

PaLoc: Locus de patogenicidad

PBS: Buffer fosfato salino

PM: Peso molecular

SDS: dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SLP: proteínas de capa-S

SLP-10463: proteínas de capa-S de *C. difficile* cepa VPI 10463

SLP- 8348: proteínas de capa-S de *L. kefir* cepa CIDCA 8348

SN: sobrenadantes

TEMED: tetrametilendiamina

TLR: receptor tipo Toll

TBS: Buffer tris

TcdA: toxina A de *Clostridium difficile*

TcdB: toxina B de *Clostridium difficile*

Resumen

La presencia de capa-S es una estructura proteica bidimensional auto-ensamblada que recubre completamente la superficie de los microorganismos que la poseen. En las bacterias patógenas, las proteínas de capa-S (SLP) representan un factor de virulencia importante, ya que pueden mediar la adhesión del patógeno a las células del huésped y contribuir a la formación de biofilms, así como interactuar con células del sistema inmune. En *Clostridium difficile* se ha descrito la expresión de dos SLP, derivadas del clivaje de un precursor: una de alto peso molecular (HMW), conservada entre cepas, y otra de bajo peso molecular (LMW), altamente variable. *C. difficile* es un patógeno esporulado Gram positivo oportunista, cuya infección está asociada al tratamiento con antibióticos, y que puede desencadenar desde leves diarreas hasta cuadros graves de colitis pseudomembranosa y complicaciones que pueden causar la muerte. En Argentina, se ha reportado un aumento de alrededor del 20 % en la prevalencia de las infecciones por *C. difficile*, así como un cambio en la patogénesis del microorganismo, lo que revela la necesidad de desarrollar nuevas terapias de prevención y tratamiento. En ese sentido, se han propuesto estrategias inmunoterapéuticas que tienen como blanco a superficiales de *C. difficile*, entre los que se encuentran las SLP. Por lo tanto, en el marco de este Trabajo Final, nos propusimos obtener herramientas inmunoquímicas específicas que nos permitan tanto detectar las SLP de *C. difficile*. Se realizaron tres inmunizaciones a ratones BALB/c, por ruta intraperitoneal, con la SLP de *C. difficile* cepa VPI 10463 (SLP-10463) como antígeno, y se evaluaron dos formulaciones adyuvantes: adyuvante de Freund incompleto (IFA) y la SLP de *L. kefir* CIDCA 8348 (SLP-8348). Si bien se observó respuesta de anticuerpos IgG específicos en ambos grupos de animales, los títulos alcanzados (determinados mediante ELISA indirecto) en los ratones inoculados con IFA, fueron mayores. Por otro lado, los anticuerpos obtenidos por inmunización con SLP-VPI 10463 son capaces de reconocer al antígeno sobre la bacteria entera en un ensayo de Dot-Blot, además de mostrar reactividad cruzada con otras cepas de aislados clínicos de *C. difficile*. Estos resultados sugieren que los antisueros obtenidos tendrían aplicación en diferentes ensayos para la detección o bloqueo de las SLP o de las bacterias enteras.

1. Introducción

En la actualidad, las enfermedades nosocomiales son la mayor causa de mortalidad en el mundo, y contribuyen al aumento de los costos hospitalarios. El principal factor predisponente es el uso de antibióticos, que provoca una gran alteración de la microbiota intestinal, favoreciendo la colonización de microorganismos oportunistas (Slimings y Riley 2014). Esto depende principalmente de las condiciones del huésped (edad, inmunocompromiso, comorbilidades, etc.) (Martínez *et al.* 2019).

La diarrea causada por *Clostridium difficile* (actualmente *Clostridioides difficile*) (Oren y Garrity 2016; Lawson 2016) es un ejemplo de enfermedad intrahospitalaria y se asocia con alta mortalidad. *C. difficile* es un microorganismo Gram positivo (Figura 1) anaerobio estricto esporulado productor de toxinas con capacidad patógena no solo en humanos sino también otras especies como gato, perros, caballo, cerdos etc. (Alcalá Hernández *et al.* 2015). Es el agente causal de la colitis pseudomembranosa, que se manifiesta como una infección en el colon con un cuadro diarreico, que aparece frecuentemente tras el uso de antimicrobianos y la consiguiente alteración de la microbiota de este órgano. La infección por esta bacteria ocurre mediante la ingestión de esporas de *C. difficile* toxigénico que resisten la acción del ácido gástrico, germinan en el intestino delgado y colonizan el colon. Ya en forma vegetativa, producen toxinas cuyas principales células blanco son los enterocitos, sobre los cuales se inducen una serie de fenómenos que culminan con la pérdida de la función de barrera del epitelio intestinal, con la aparición de diarrea y la formación de pseudomembranas. (Rodríguez Pardo *et al.* 2012).



Figura 1. Tinción de Gram de *C. difficile* (Walter *et al.* 2015)

Actualmente, *C. difficile* es una de las principales causas de diarrea en pacientes adultos hospitalizados. *C. difficile* forma parte de la flora fecal normal en el 1-3% de los residentes sanos de la comunidad y en más del 20% de los adultos hospitalizados. Se encuentra en las heces de pacientes sintomáticos y asintomáticos, y el contagio se produce, casi siempre, dentro del hospital en un ambiente contaminado por esporas, por lo que el riesgo aumenta en proporción a la duración de la hospitalización (Rodríguez Pardo *et al.* 2012).

En Argentina, un reporte elaborado en el año 2016 por el Ministerio de Salud de la Nación, la ANLIS y el Instituto Nacional de Epidemiología “Dr. Juan H. Jara”, en el marco del Programa Nacional de Vigilancia de Infecciones Hospitalarias de Argentina (VIHDA) y del cual participaron 157 instituciones de diferentes regiones del país, da cuenta de que la infección por *C. difficile* constituye un porcentaje considerable de las infecciones gastrointestinales en pacientes adultos del Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA) (Informe 2016). A nivel mundial, se han reportado cambios en la patogénesis de *C. difficile*, incluyendo cambios en las poblaciones de riesgo, aumento de la incidencia y severidad de las infecciones (Goudharzi *et al.* 2014), aumento de la tasa de recurrencia, y la aparición de cepas altamente virulentas (He *et al.* 2013) y resistentes a antibióticos (He *et al.* 2010). Los principales factores de virulencia son dos toxinas, TcdA (308 kDa) y TcdB (269,9 kDa), que ejercen un efecto citopático y citotóxico respectivamente sobre la célula blanco (Kuehne *et al.* 2010). También se conoce una tercera toxina, denominada binaria (CDT), la cual, además de su efecto tóxico específico, podría incrementar la adherencia del bacilo a la mucosa (Schwan *et al.* 2009). La capacidad de producción de estas toxinas varía ampliamente entre las cepas siendo TcdA⁺/TcdB⁺ y TcdA⁻/TcdB⁺ los principales toxinotipos asociados a la patología desarrollada por *C. difficile*. La síntesis de las toxinas es máxima al entrar la bacteria en la fase estacionaria de crecimiento y está controlada por la temperatura de crecimiento. La producción de toxinas se ve influenciada por los nutrientes en el medio de crecimiento de *C. difficile*, ya que la presencia de ciertos aminoácidos como cisteína y ciertos compuestos orgánicos como el ácido butírico y el butanol disminuyen la producción de las toxinas. Contrariamente el crecimiento de las bacterias en condiciones con limitación de biotina o fuentes de carbono rápidamente metabolizables, como la glucosa, favorecen la producción de toxinas (Trejo 2009). Los genes que codifican para la síntesis de estas toxinas se hallan en un elemento cromosomal denominado locus de patogenicidad (PaLoc) o elemento de patogenicidad. El mismo presenta un tamaño de 19,6 kpb y contiene además tres genes accesorios denominados *tcdC*, *tcdE* y *tcdC*, los cuales se hallan involucrados en la síntesis, liberación y regulación de las toxinas luego de su síntesis. A continuación, se muestra el esquema del PaLoc de *C. difficile*. (Figura 2)

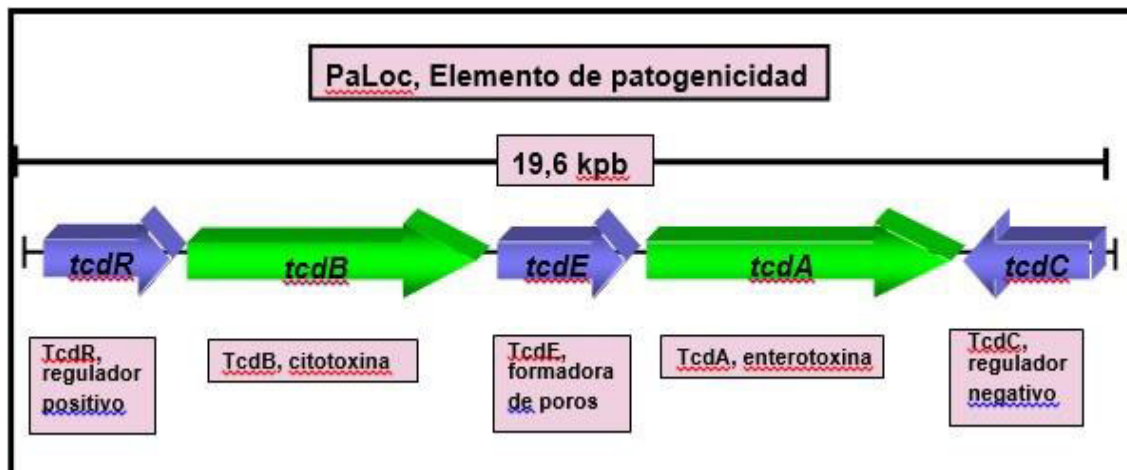


Figura 2. PaLoc de *C. difficile* (Trejo 2009)

El producto de la expresión del gen *tcdR* es un factor de regulación positiva que actúa sobre la expresión de *tcdA* y *tcdB* y también interviene en su propia regulación. TcdA es una enterotoxina debido a que la administración intragástrica en animales produce secreción de fluidos hemorrágicos. Asimismo, da lugar a la inflamación de la mucosa, necrosis del epitelio intestinal y muerte del animal. Ambas toxinas presentan actividad citotóxica, siendo TcdB 500-1000 veces más potente respecto de TcdA en modelos *in vitro*, motivo por el cual se la considera como citotoxina. Ambas toxinas poseen una actividad sinérgica, lo que permite que la acción primaria de TcdA genere un daño en el epitelio intestinal permitiendo que TcdB alcance los sitios de unión a las células blanco y desencadene su actividad citotóxica. Tanto TcdA como TcdB presentan actividad glicosil transferasa sobre las GTPasa de la familia Rho en la célula blanco, conduciendo a la disrupción del citoesqueleto, muerte celular y una fuerte respuesta inflamatoria (Just et al., 1995). Estos procesos se resumen en el siguiente esquema (Figura 3) (Trejo 2009).

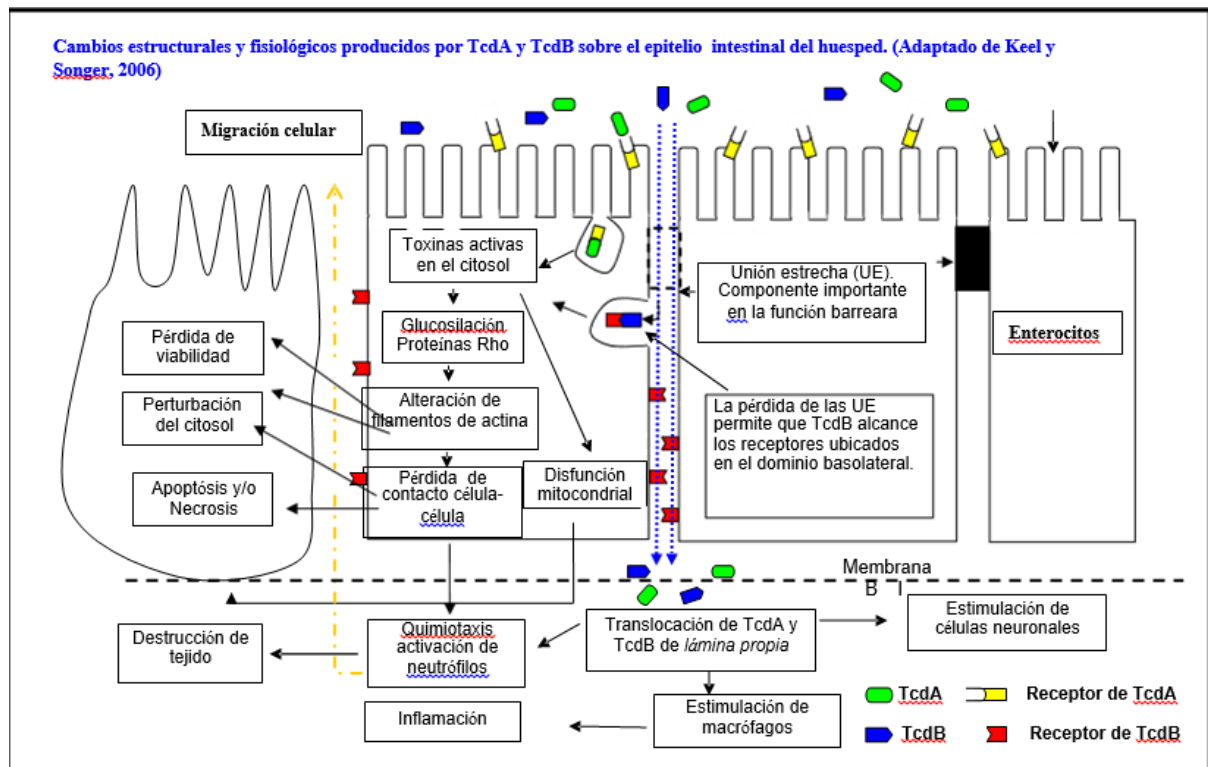


Figura 3. Cambios estructurales y fisiológicos producidos por TcdA y TcdB sobre el epitelio intestinal del huésped (Trejo 2009).

C. difficile presenta, además, muchos otros factores de patogenicidad, como algunas proteínas de superficie implicadas en su adhesión y estimulación del proceso inflamatorio, y otras implicadas en la unión a las células epiteliales intestinales y cuya expresión se ve afectada por determinados antibióticos como la ampicilina y la clindamicina (Rodríguez Pardo *et al.* 2012). Inicialmente se creía que los individuos colonizados por *C. difficile* estaban expuestos a un mayor riesgo de presentar diarrea, pero, el resultado de diferentes estudios prospectivos ha demostrado que los pacientes colonizados en realidad tienen un riesgo menor de presentar la enfermedad (Rodríguez Pardo *et al.* 2012).

Debido a que *C. difficile* es capaz de adquirir y transferir resistencia a antibióticos, es necesario apuntar al desarrollo de estrategias de prevención de la infección. En este sentido, varios estudios han demostrado que la intensidad de la respuesta inmune específica es clave en la evolución de la infección por *C. difficile* (Kelly 2012). En particular, los bajos niveles de anticuerpos anti-toxinas correlacionan con la severidad, la duración y la tasa de recurrencia. Sin embargo, a pesar de que los resultados son prometedores, las inmunoterapias activas y pasivas dirigidas contra las toxinas

(Navalkele y Chopra 2018) no contribuyen a la prevención de la colonización intestinal por *C. difficile* ni a la diseminación de los esporos.

Además de las toxinas, algunos componentes de la superficie de *C. difficile*, particularmente una estructura proteica conocida como capa-S, pueden representar factores de virulencia importantes.

La capa-S (Figura 4) es una cubierta proteica rígida, considerada la membrana biológica más antigua, y que se ha mantenido a lo largo de la evolución tanto en Bacteria como en Archaea (Claus *et al.* 2005). Esta red macromolecular bidimensional es una estructura proteica similar a un cristal descubierta por Houwink en 1953 en *Spirillum serpens* (Houwink, 1953), pero no fue hasta los años 70 que comenzó a atraer la atención de la comunidad científica.

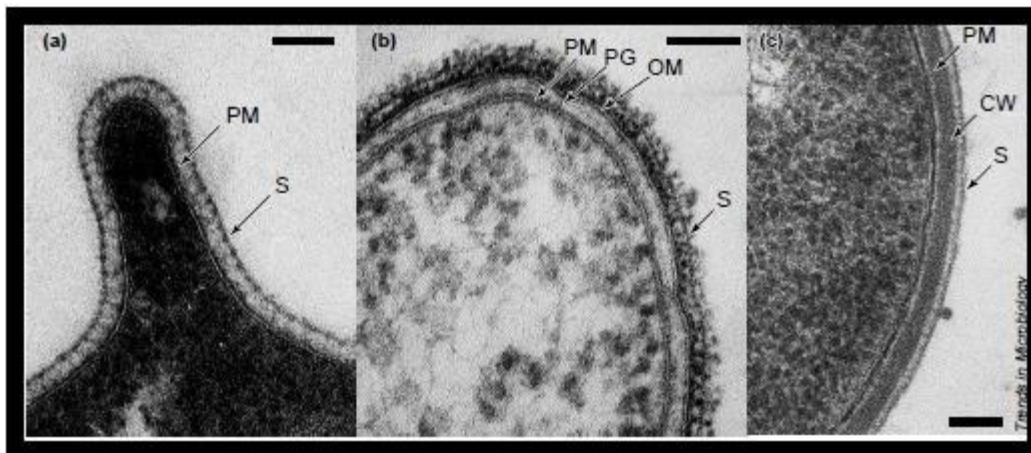


Figura 4. Micrografía electrónica que muestra las proteínas de capa-S en (a) Archaea (b) bacteria Gram-negativa y (c) bacteria Gram-positiva (Sleytr *et al.* 1999). PM: membrana plasmática. S: capa-S. PG: péptidoglucano. OM: membrana externa. CW: pared celular.

El estudio de las aplicaciones biotecnológicas de las proteínas de capa-S, considerada como uno de los biopolímeros más abundantes en nuestro planeta (Sleytr *et al.* 2014) ha ido aumentando en los últimos años. Dado que la capa-S constituye la estructura superficial más externa en aquellos microorganismos donde está presente, puede mediar la interacción de las células bacterianas con el hospedador. Esto, sumado a la habilidad de auto-ensamblaje y sus propiedades fisicoquímicas únicas, genera que las proteínas de capa-S sean una herramienta muy atractiva para su uso como carrier de antígenos, como adyuvantes o como parte de vehículos vacunales (Sleytr *et al.* 2014). La atención especial que estas proteínas han captado por parte de los investigadores en los últimos

años se debe a sus excepcionales propiedades fisicoquímicas, que las convierten en una estructura organizativa única con un alto potencial de aplicación en el campo de la Nanobiotecnología moderna. La mayoría de las técnicas para el aislamiento y la purificación de proteínas de capa-S implican el uso de detergentes (Triton X100 o dodecilsulfato de sodio) o agentes caotrópicos (como urea, clorhidrato de guanidinio o cloruro de litio) (Pum *et al.* 2013). Después de la extracción de la superficie bacteriana, las proteínas de capa-S tienen la capacidad intrínseca de formar productos auto-ensamblados flotantes en solución (por ejemplo, láminas planas, tubos, vesículas), de reensamblarse en capas simples y dobles en soportes sólidos, en la interfase aire-agua, en películas lipídicas, y de cubrir liposomas, nanocápsulas y nanopartículas por completo. Esta extraordinaria propiedad es una de las características clave de las proteínas de capa-S y, en combinación con la exposición repetitiva y precisa de determinados grupos funcionales, estableció las bases para el desarrollo de carriers para biomoléculas, dispositivos de diagnóstico, biosensores, biocatalizadores, etc. Por lo tanto, esta capacidad única puede ser explotada en diferentes áreas tales como medicina, farmacología, bioingeniería, industria alimentaria, entre otras.

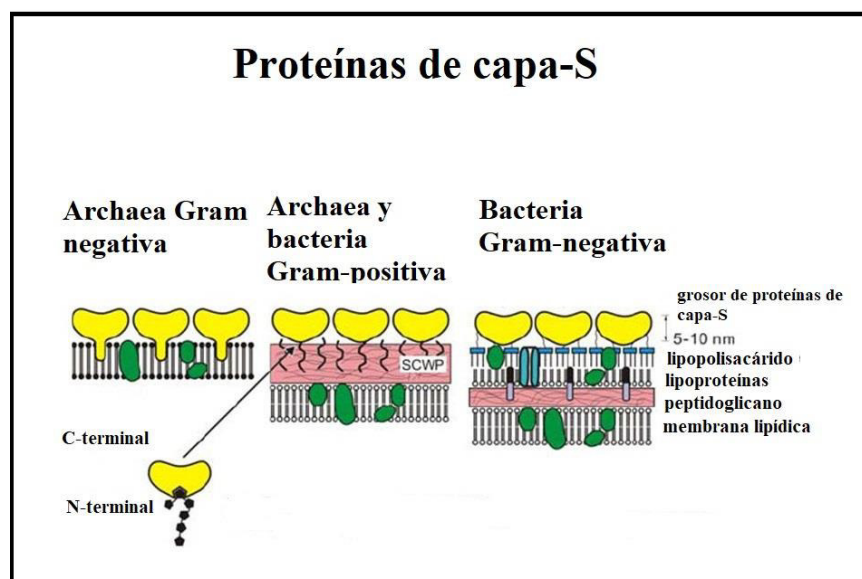


Figura 5. Esquema que muestra a las proteínas de capa-S en la membrana plasmática de Archaea y bacterias Gram negativas y Gram positivas (Sleytr *et al.* 2014)

Si bien no ha surgido una función común para todas las capas S, se han propuesto muchas propiedades funcionales diferentes para este tipo de proteínas. Hasta ahora, estas incluyen, por

ejemplo, la determinación o el mantenimiento de la forma celular, el funcionamiento como un tamiz molecular, como un sitio de unión para moléculas grandes, iones o fagos, y como un mediador de la adhesión microbiana (Sára y Sleytr 2000); protegen a los microorganismos a condiciones ambientales adversas, contra la presencia de péptidos antimicrobianos (de la Fuente-Núñez *et al.* 2012), de la exposición a la radiación (Kotiranta *et al.* 1999), cambios en el pH ambiental, bacteriófagos (Howard y Tipper 1973), depredadores microbianos bacterianos o eucariotas (Koval y Hynes 1991) o enzimas bacteriolíticas. Por otro lado, también participan en la modulación de la respuesta inmune (Konstantinov *et al.* 2008, Sekot *et al.* 2011, Taverniti *et al.* 2013)

El grupo de trabajo en el cual se desarrolló este Trabajo Final viene desarrollando líneas de investigación orientadas al estudio de las propiedades probióticas de diferentes cepas de *Lactobacillus kefir* aisladas del kéfir, y a la caracterización estructural y funcional de sus glicoproteínas de capa-S (SLP), cuya presencia en esta especie fue descrita por primera vez hace aproximadamente 15 años en el laboratorio (Garrote *et al.* 2004, Malamud *et al.* 2017). En estudios recientes, el grupo de trabajo ha demostrado que la SLP de *L. kefir* CIDCA 8348 (SLP-8348) es internalizada por macrófagos murinos (Raw264.7) y potencia su respuesta frente al lipopolisacárido (LPS), observándose un incremento en la expresión de MHC-II, CD86 y CD40 en comparación con las células estimuladas con LPS solo. Se observaron efectos similares para la expresión y secreción de IL-6, IL-10 y TNF- α . Este efecto sinérgico fue inhibido por la presencia de EGTA, lo que sugiere fuertemente la participación de los glicanos y de iones Ca^{+2} en el reconocimiento de SLP-8348 (proteínas de capa-S de *L. kefir* cepa 8348) por los receptores celulares (Malamud *et al.* 2018). Recientemente, estudios realizados en colaboración con otros investigadores, empleando células presentadoras de antígeno (BMDCs) de ratones salvajes y *knock-out* para diferentes receptores de lectinas tipo C (CLR), han permitido identificar a Mincle (*macrophage inducible Ca^{2+} -dependent lectin receptor*) como uno de los receptores clave en el reconocimiento de la SLP-8348 (Malamud *et al.* 2019). Más aún, se pudo demostrar que SLP-8348 potencia la respuesta celular antígeno-específica, aumentando la proliferación de LT-CD4 y la producción de IFN- γ frente a ovoalbúmina inoculada en dosis única por vía subcutánea a ratones BALB/c y que dicha capacidad depende de la integridad de sus glicanos (Malamud *et al.* 2019).

En las bacterias patógenas, la capa-S podría contribuir a la virulencia a través de varios mecanismos que incluyen la adhesión, la coagregación (Shimotahira *et al.* 2013), la variación antigénica (Spigaglia *et al.* 2011), la protección contra la lisis por el sistema del complemento o

fagocitosis o inmunomodulación (Sekot *et al.* 2011). Por otro lado, algunas proteínas de capa-S han demostrado el potencial de actuar como enzimas (Calabi *et al.* 2001), o incluso estar involucradas en la motilidad del microorganismo (McCarren *et al.* 2005).

En el caso de *C. difficile*, se ha descrito la expresión de dos SLP no glicosiladas, derivadas del clivaje del precursor denominado SlpA por la proteasa Cwp84: una de alto peso molecular (HMW-SLP; 42-50 kDa), conservada entre cepas y anclada a la pared celular, y otra de bajo peso molecular (LMW-SLP; 22-38 kDa), expuesta y altamente variable. Ambas SLP forman un heterodímero que se auto-ensambla para formar la capa-S madura (Fagan *et al.* 2009). Sin embargo, recientemente se ha reportado que ciertas cepas, algunas de ellas altamente virulentas, poseen en su genoma un locus que contiene genes para la síntesis y ensamblado de glicanos y expresan un resto glicosídico complejo sobre la LMW-SLP, el cual estaría implicado en los procesos de esporulación y en la formación de biofilms. A su vez, se ha demostrado que la SLP intacta (LMW-SLP + HMW-SLP) de *C. difficile* interactúa con el receptor tipo Toll4 (TLR4) activando células dendríticas, con la subsecuente generación de una respuesta de LT-CD4 necesaria para la eliminación de la bacteria.

Por otro lado, se han detectado anticuerpos anti-SLP de *C. difficile* en el suero de los pacientes, lo que sugiere que son proteínas inmunodominantes (Wright *et al.* 2008). Por lo tanto, se han propuesto otras estrategias inmunoterapéuticas que tienen como blanco diferentes componentes superficiales de *C. difficile*, entre los que se encuentran las SLP, obteniéndose niveles de protección dispares de acuerdo con el antígeno seleccionado, el adyuvante empleado y la vía de inoculación utilizada (Pechiné *et al.* 2018). Este cuadro de situación revela claramente la necesidad de desarrollar nuevas terapias de prevención y tratamiento de la infección por *C. difficile*.

En ese contexto, las proteínas de capa-S de *C. difficile* emergen como potenciales candidatos vacunales, por lo que resulta relevante contar con herramientas inmunoquímicas que nos permitan tanto detectarlas como bloquear su actividad biológica en ensayos funcionales.

2. Objetivos:

A: Obtener un antisuero en ratón, específico para proteínas de capa-S de *C. difficile*, empleando la formulación de Freund y las proteínas de capa-S de *L. kefir* como adyuvantes.

B: Caracterizar la reactividad de los anticuerpos policlonales obtenidos frente a proteínas de capa-S y bacterias enteras de distintas cepas de *C. difficile*.

3. Materiales y métodos

En esta sección se describirán los materiales y las técnicas empleadas durante el desarrollo de este trabajo final.

3.1 Microorganismos, características principales y condiciones de cultivo

3.1.1 Cultivo de *Clostridium difficile*

En el presente trabajo se utilizó la cepa colección de *C. difficile* VPI 10463 (hiperproductora de toxinas TcdA y TcdB), cultivada a partir de un stock congelado a -80°C. Los bacilos de *C. difficile* se cultivaron en caldo BHI (Brain Heart Infusion, Biokar) en condiciones de anaerobiosis durante 24 horas, a 37°C. El medio de cultivo utilizado fue previamente esterilizado por calor húmedo, en autoclave, a 1 atmósfera de sobrepresión durante 15 minutos.

Dentro de la cámara de anaerobiosis se debe agregar en un tubo una solución de bicarbonato de sodio (1 g) y ácido cítrico (1 g), además un vaso con lana de acero (Virulana) y una solución que contiene: agua (4 L), ácido sulfúrico (2 mL), Tween 80 (10 gs), sulfato de cobre pentahidratado (20 gs). Antes de cerrar la tapa de la cámara, se agrega agua.

3.1.2 Cultivo de *Lactobacillus kefir*

Se utilizó la cepa *L. kefir* CIDCA 8348, perteneciente a la colección de cepas del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, CONICET-CIC-UNLP), la cual fue cultivada a partir de un stock conservado en leche a -80°C. Los lactobacilos se cultivaron en caldo MRS (Difco, BD, USA) en condiciones aeróbicas, durante 48 horas, a 37°C. La pureza de los cultivos se verificó mediante observación microscópica de preparados, fijados y teñidos mediante la técnica descrita por Gram (Gram 1884). El medio de cultivo utilizado fue esterilizado por calor húmedo, en autoclave a 1 atmósfera de sobrepresión durante 15 minutos.

3.2 Extracción de proteínas superficiales de *C. difficile* y *L. kefir*.

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

3.2.1 Extracción de proteínas de capa-S de *L. kefir* con cloruro de litio 5 M.

Se utilizó la técnica descrita por Malamud y colaboradores (2017).

Protocolo

1. Se centrifugaron tubos con 10 mL de cultivo de *L. kefir* en fase estacionaria durante 12 minutos a 10.000 g.
2. Se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con PBS.
3. Se resuspendió el pellet del último lavado en LiCl (JT Baker) 5 M, en una proporción de 1/10 con respecto al volumen original de cultivo.
4. Se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos.
5. El sobrenadante se dializó usando una membrana de celulosa (SpectraPor membrane tube, MWCO 10000-14000, Spectrum Medical Industries, California, USA) con agitación suave durante 24 horas contra 2 L de agua destilada a temperatura ambiente.
6. Se centrifugó el dializado a 10.000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente.

3.2.2 Extracción de proteínas de capa-S de *C. difficile* con cloruro de guanidinio 5M.

Protocolo

1. Se centrifugaron 50 mL de cultivo de *C. difficile* en fase estacionaria durante 15 minutos a 17400 g.
2. Se descartó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con 10 mL de PBS cada uno.
3. Se resuspendió el pellet del último lavado en 5 mL de GnCl 5 M.
4. Se incubó en agitación orbital durante 20 minutos a 37°C (Environ shaker, Lab-line instruments Inc. Melrose Park, IL, USA)
5. Se centrifugó a 17400 g durante 15 minutos.
6. Se filtraron 5 µL de sobrenadante con filtro de 0,45 µm; se dializó usando una membrana de celulosa (SpectraPor membrane tube, MWCO 10000-14000, Spectrum Medical Industries, California, USA) con agitación suave durante 24 hs contra una solución de Tris- HCl 0,05 M a temperatura ambiente.
7. Se centrifugó el dializado a 17400 g durante 15 minutos a temperatura ambiente.

3.2.3 Extracción de proteínas de capa-S de *C. difficile* con cloruro de litio 5M.

Para la extracción de proteínas de capa-S de *C. difficile* usando como agente caotrópico LiCl se utilizó el mismo protocolo que para la cepa de *L. kefir* CIDCA 8348 (Materiales y métodos 3.2.1).

3.3 Separación electroforética de proteínas

3.3.1 Separación mediante SDS-PAGE

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

Protocolo

1. Se preparó el gel separador a pH 8,8 con 2,2 mL de acril amida/bis acrilamida, 3,3mL de buffer separador, 83 μ L de dodecilsulfato sódico (SDS), 2,96 mL de agua, 210 μ L de persulfato de amonio (catalizador) y 2 μ L de TEMED.
2. Se preparó el gel de apilamiento a pH 6,8 con 330 μ L de acrilamida, 40 μ L de SDS, 1,4 mL de buffer de apilamiento, 2,1 mL de agua, 1,7 μ L de TEMED y por último 330 μ L de persulfato de amonio.
3. Se esperó a que gelifique el gel separador para poder agregar el gel de apilamiento y se introdujo el peine de 1,5 mm de espesor.
4. Se prepararon soluciones con sobrenadantes y con el pellet de los productos de las diálisis en buffer de siembra. Se calentaron las soluciones en agua hirviendo durante 5 minutos para que el SDS interactúe mejor con las proteínas.
5. Se llenó el compartimento interno con buffer de corrida 1X.
6. Se sembraron las muestras de sobrenadantes (25 μ L) y de pellets (15 μ L) de los productos de las diálisis, así como marcadores de peso molecular (Blue Plus IV Protein Marker, 10-180 kDa, Transgen) (5 μ L).
7. Se conectaron los cables de la cubeta a una fuente de corriente continua y se le aplicó una corriente de 30 mA hasta que el frente entró en el gel separador; después se aumentó a 60 mA y se mantuvo durante toda la corrida. Cuando el frente se acercó al extremo inferior del gel, se

desconectó la corriente, se separaron las placas de vidrio con ayuda de una espátula y se sacó el gel con cuidado para no invertir su orientación.

3.3.2 Revelado con Coomasie coloidal.

Protocolo

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

Tabla 1. Soluciones para el revelado con Colloidal Blue.

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

3.4 Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas de capa-S se utilizó el método de Bradford (Bradford 1976; Ernst and Zor 2010). Se realizó una curva patrón utilizando un stock comercial de albúmina bovina de 10 mg/mL (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit).

Tabla 2. Composición del reactivo de Bradford.

Componentes	Cantidad
Azul de Coomassie G-250	10 mg
Etanol 95%	5 mL
Ácido fosfórico al 5 % p/v	10 mL
H ₂ O	Hasta 100 mL

Protocolo:

1. A partir de la solución madre de seroalbúmina bovina (BSA) (10mg/ml), se prepararon las diferentes diluciones para la confección de la curva de calibración (1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125; 0,05 y 0,025 mg/mL).
2. Se centrifugaron 50µL de muestra proteica de cada extracción de proteínas de capa-S realizada a velocidad máxima durante 5 minutos, reservando los sobrenadantes.
3. En una placa transparente, de poliestireno, fondo plano, de 96 pocillos (Jetbiofil, China) se colocaron 20 µL de cada dilución para la curva de calibración en cada fosa por duplicado, 20µL del extracto proteico sin centrifugar de las diversas muestras de proteínas de capa-S, y 20 µL del sobrenadante obtenido en el paso anterior, todo por duplicado. En cada fosa se agregaron 200 µl de reactivo de Bradford 1X, previa dilución a partir del frasco comercial (5X). Se dejó incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Se realizó la lectura espectrofotométrica en un lector de microplacas (Tecan Infinite F50, Suiza) a 620 nm.

3.5 Plan de inmunización:

Para la obtención del antisuero anti proteínas de capa-S de *Clostridium difficile* se trabajó con 2 lotes de 3 ratones BALB/c de 8 semanas de edad cada uno, siguiendo el protocolo experimental indicado en la Tabla 3. Los ratones fueron inoculados en forma intraperitoneal con 200 μ L de la preparación correspondiente a cada lote, indicada más adelante en la Tabla 4.

Tabla 3. Plan de inmunización.

Fecha	Actividad
Día 1	Primera inoculación
Día 7	Primera sangría parcial
Día 14	Segunda inoculación
Día 21	Segunda sangría parcial
Día 28	Tercera inoculación
Día 35	Tercera sangría, final.
Día 64	Sacrificio de los animales. Extracción de sangre mediante punción cardíaca.

Inoculación y sangría de ratones:

Antes de inmunizar a los animales, la solución de antígeno (proteínas de capa-S de *C. difficile* VPI 10463 extraídas con GnCl 5M) se calentó a 65°C por 20 minutos, con el fin de inactivar posibles trazas de toxinas de *C. difficile* que pudiesen estar contaminando la muestra.

Sobre los dos lotes de ratones se evaluaron los tratamientos de inmunización mostrados en la Tabla 4. Se analizó la producción de anticuerpos específicos contra la capa-S de *C. difficile* VPI 10463 (SLP- 10463), tanto en los animales que recibieron adyuvante de Freund incompleto (IFA), como en los que se utilizaron las proteínas de capa-S de *L. kefir* CIDCA 8348 (SLP-8348) como potencial adyuvante. Asimismo, se analizó la presencia de anticuerpos específicos anti- proteínas de capa-S de *L. kefir* CIDCA 8348 en ambos grupos de animales.

Los ratones fueron inoculados mediante ruta intraperitoneal y la sangría para la obtención del antisuero se realizó mediante extracción submandibular. Ambas técnicas se muestran en la sección Anexos.

Tabla 4. Tratamiento recibido por cada lote experimental.

Lote de ratones	Solución	Total
1	100 µL de Adyuvante de Freund incompleto (IFA) 100 µL Ag (SLP- <i>C. difficile</i> VPI 10463), 500 µg/mL	200 µL
2	100 µL de SLP- <i>L. kefir</i> i CIDCA 8348 (50 µg/mL) 100 µL Ag (SLP- <i>C. difficile</i> VPI 10463), 500 µg/mL	200 µL

3.6 Seguimiento de plan de inmunización.

El seguimiento del plan de inmunización se realizó mediante la titulación de los sueros de los ratones inmunizados por ELISA indirecto.

Protocolo

1. Se sensibilizó una placa de ELISA de 96 pocillos (Microlon 600, GBO. Alemania) con 5 µg/mL de proteína de capa-S de *C. difficile* o de *L. kefir*i (100 µL) durante 16 horas a 4°C.
2. Se lavó tres veces con PBS + Tween 20 al 0,05%.
3. Se bloqueó la placa con leche descremada al 3%p/v durante 1 hora a 37°C (200 µL)
4. Se lavó tres veces con PBS + Tween 20 al 0,05%.
5. Se agregaron los sueros provenientes de los ratones inmunizados en diluciones seriadas (en leche descremada al 1%p/v) durante 1 hora a 37°C (100 µL).
6. Se lavó tres veces con PBS + Tween 20 al 0,05% v/v

7. Se agregó una dilución 1/2000 en leche descremada al 1%p/v de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, USA) durante 1 hora a 37°C (100 µL).
8. Se reveló utilizando o-fenilendiamina (OPD, Sigma-Aldrich, EEUU) como sustrato cromogénico. La reacción enzimática se frenó por el agregado de H₂SO₄ 2N y se leyó la absorbancia en un lector de placas (Tecan Infinite F50, Suiza) a 492 nm.

Se definió título de anticuerpos específicos como la dilución a la cual se obtiene la mitad de absorbancia máxima a 492 nm.

3.7. Caracterización de los anticuerpos policlonales frente a bacterias enteras de distintas cepas de *C. difficile* por Dot-blot.

En este ensayo se evaluó la reactividad de uno de los antisueros obtenidos frente a suspensiones de bacterias enteras de diferentes cepas de *C. difficile*.

Protocolo

1. Aplicación de la muestra al soporte. Se sembraron 2, 4 y 6 µL de suspensiones de aproximadamente 10⁸ ufc/mL de 4 cepas diferentes de *C. difficile* (VPI 10463, G2, G4 y A3), sobre una membrana de nitrocelulosa (MSI, Osmomics), y se dejó secar durante unos 5-10 minutos.
2. Bloqueo. Se bloquearon los sitios libres del soporte con 20 mL de una suspensión de leche descremada 3% en PBS, durante 45 minutos a 37°C.
3. Anticuerpo primario. Se preparó una dilución 1/500 del antisuero seleccionado (3ra sangría, ratón IFA3) en 5 mL de diluyente (suspensión de leche descremada 1% en PBS) y se incubó la membrana durante 1 hora en estufa a 37°C.
4. Se lavó tres veces con PBS + Tween 20 0,05%.

5. Anticuerpo secundario. Se preparó una dilución 1/1000 de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Santa Cruz Biotech, USA) en 5 mL de diluyente (suspensión de leche descremada 1% en PBS) y se incubó la membrana durante 1 hora en estufa a 37°C.
6. Se lavó tres veces con PBS + Tween 20 0,05%.
7. Revelado. Para visualizar la formación de los complejos antígeno-anticuerpo, se utilizó como sustrato una solución de 4-cloronaftol (2mg) en 2 mL de metanol, 1 mL de Buffer Tris salino (TBS) y 15 µL de peróxido de hidrógeno.
8. Lectura de la prueba. Se observó la aparición de las manchas de color violáceo, correspondientes al producto coloreado insoluble que se deposita sobre la membrana en caso de que haya reacción antígeno-anticuerpo.

4. Resultados y discusión

4.1 Cultivo de *C. difficile*

La cepa *C. difficile* VPI 10463 se cultivó en caldo BHI con cisteína, en condiciones anaeróbicas. En el primer intento no se obtuvo crecimiento, ya que la cámara de anaerobiosis no fue cerrada correctamente. *C. difficile* es un anaerobio estricto y por eso mismo necesita que las condiciones de crecimiento sean rigurosamente cumplidas.

A continuación se muestran algunos de los cultivos de 24 hs obtenidos (Figura 6)

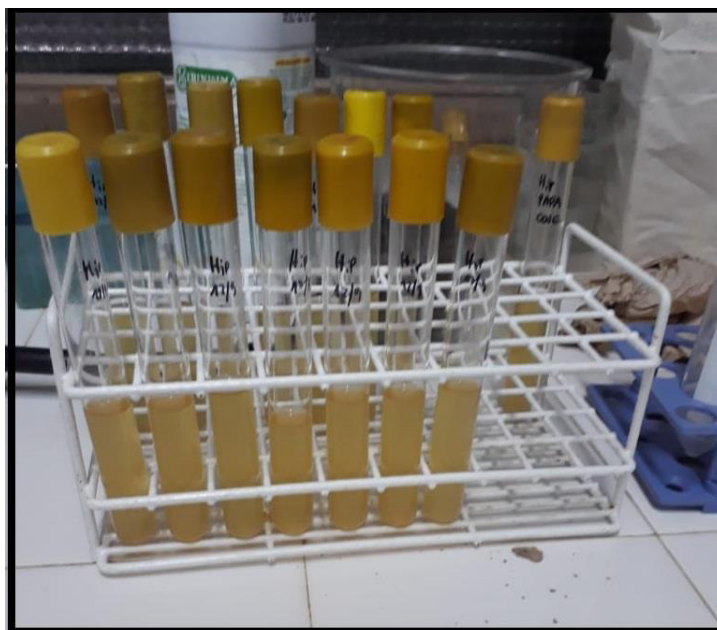


Figura 6. Tubos de cultivo en caldo BHI de *Clostridium difficile* VPI 10463 cultivados en condiciones de anaerobiosis durante 24 horas, a 37°C.

4.2 Extracción de proteínas de capa-S.

Como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos, para la obtención de las proteínas de capa-S de la cepa *C. difficile* VPI 10463 se siguieron dos protocolos experimentales diferentes.

En cuanto a la extracción con GnCl 5 M, el pellet de bacterias obtenido post extracción quedó con un color más intenso (casi negro) que el pellet correspondiente al extracto con LiCl 5 M (amarronado). Por otro lado, el producto de la diálisis del sobrenadante en GnCl 5 M quedó de color amarillo comparado con el del LiCl 5M que quedó casi incoloro, como se puede visualizar en la Figura 7.

En el caso del producto de diálisis de las proteínas de capa-S de *L. kefir* obtenida con LiCl 5M, se obtuvo una solución translúcida que no presentaba ninguna particularidad.

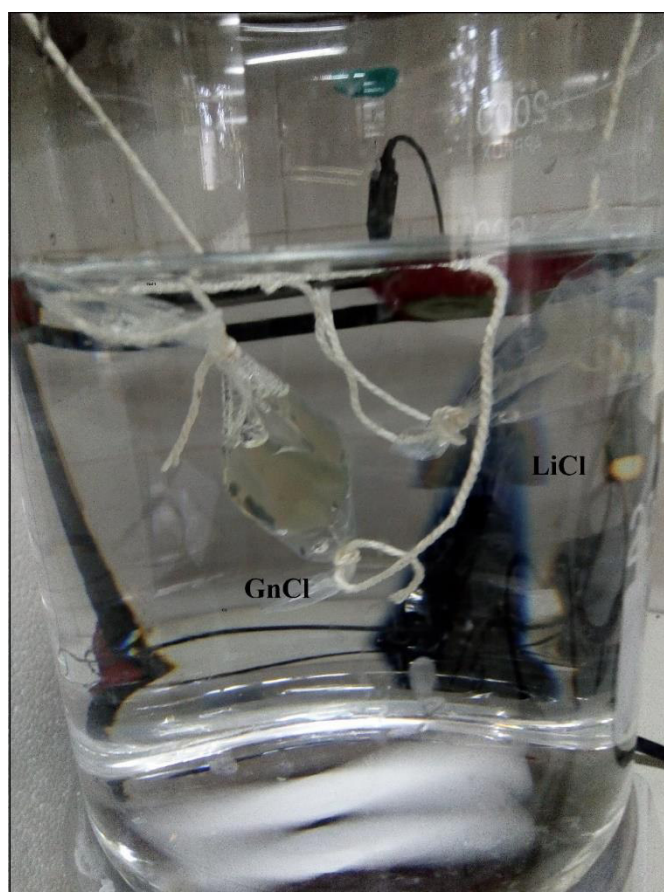


Figura 7. Diálisis de proteínas de capa-S de *C. difficile* con GnCl 5M y LiCl 5M.

4.3 Cuantificación de proteínas totales por el Método de Bradford.

Para la cuantificación de proteínas totales se utilizó el método de Bradford. Se realizó una curva de calibración con una proteína patrón.

Dado que las proteínas de capa-S tienen una tendencia intrínseca a agregarse en solución una vez que se extrae el agente caotrópico (GnCl y LiCl), la cuantificación de proteínas totales se llevó a cabo sobre los extractos sin centrifugar (extracto total) y luego de una centrifugación (sobrenadante).

La curva de calibración obtenida se muestra en la Figura 8, y los resultados obtenidos para las diferentes muestras procesadas se detallan en la Tabla 5.

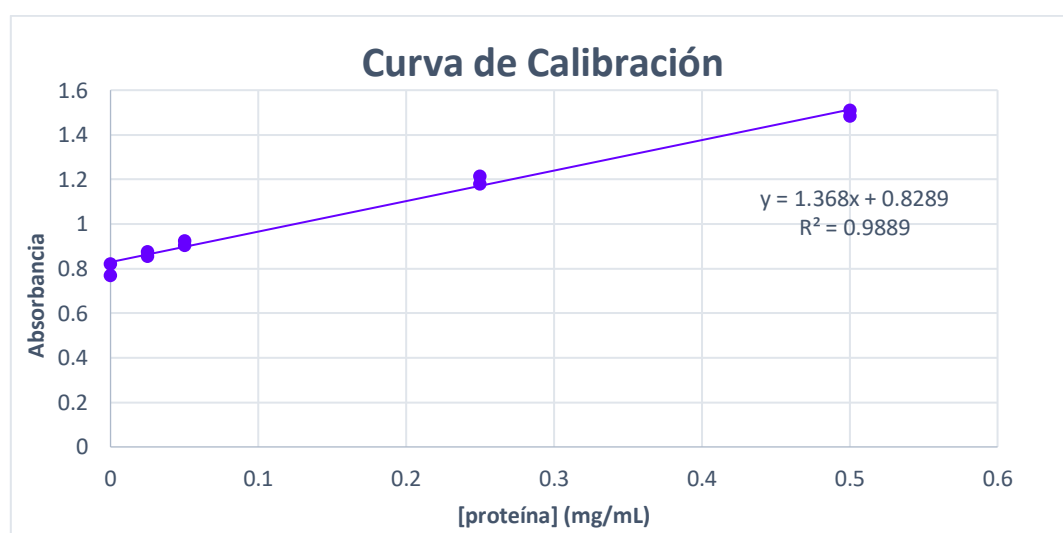


Figura 8. Curva de calibración de Bradford.

Tabla 5. Medidas de absorbancia a 620 nm y concentración de proteínas obtenidas mediante método de Bradford. Extracto completo y sobrenadante post centrifugación.

Muestra	Concentración $\pm$ DS (mg/mL)
SLP-10463 LiCl (extracto total)	0,016 $\pm$ 0,003
SLP-10463 GnCl(extracto total)	0,66 $\pm$ 0,22
SLP-8348 (extracto total)	0,084 $\pm$ 0,001
SLP-10463 LiCl(sobrenadante)	0,003 $\pm$ 0,007
SLP-10463 GnCl(sobrenadante)	0,48 $\pm$ 0,02
SLP-8348 (sobrenadante)	0,03 $\pm$ 0,02

Referencias: SLP-10463: proteína de capa-S de la cepa *C. difficile* VPI 10463

SLP-8348: proteína de capa-S de la cepa *L. kefir* CIDCA 8348

En los resultados mostrados en la Tabla 5 podemos observar que la concentración de proteínas de capa-S de *C. difficile* VPI 10463 obtenida luego de la extracción con GnCl 5 M es mucho mayor, tanto en el extracto total como en el sobrenadante, en comparación con la concentración de proteínas obtenida con la extracción con LiCl 5 M. Esto podría deberse a que el GnCl es un mejor agente caotrópico que el LiCl, pero en comparación de costes económicos, el GnCl es mucho más costoso. No hay grandes diferencias en cuanto a la concentración de proteínas obtenidas en la extracción con GnCl 5 M, entre el extracto total y el sobrenadante. Sí se observan mayores diferencias en la concentración de proteínas del extracto total y del sobrenadante cuando se usa LiCl 5 M. Algo similar ocurrió con las proteínas de capa-S de *L. kefir* CIDCA 8348, ya que se observó una diferencia entre la concentración obtenida en el extracto total y en el sobrenadante.

4.4 Caracterización de los extractos por SDS-PAGE

Se realizó una electroforesis de proteínas mediante SDS-PAGE para observar la presencia y separación de las proteínas de capa-S de *C. difficile* usando los diferentes agentes caotrópicos.

Definimos pellet o precipitado al sedimento que se forma luego de la centrifugación del extracto total y sobrenadante a la solución que resulta luego de remover el pellet.

La separación fue exitosa y en la Figura 9 pueden observarse las proteínas de alto peso molecular (HMW-SLP) de aproximadamente 44 kDa y las de bajo peso molecular (LMW-SLP) de aproximadamente 38 kDa.

También podemos apreciar en la imagen las proteínas de capa-S de *L. kefir* de aproximadamente 60 kDa, que luego se utilizaron como potencial adyuvante en las inmunizaciones.

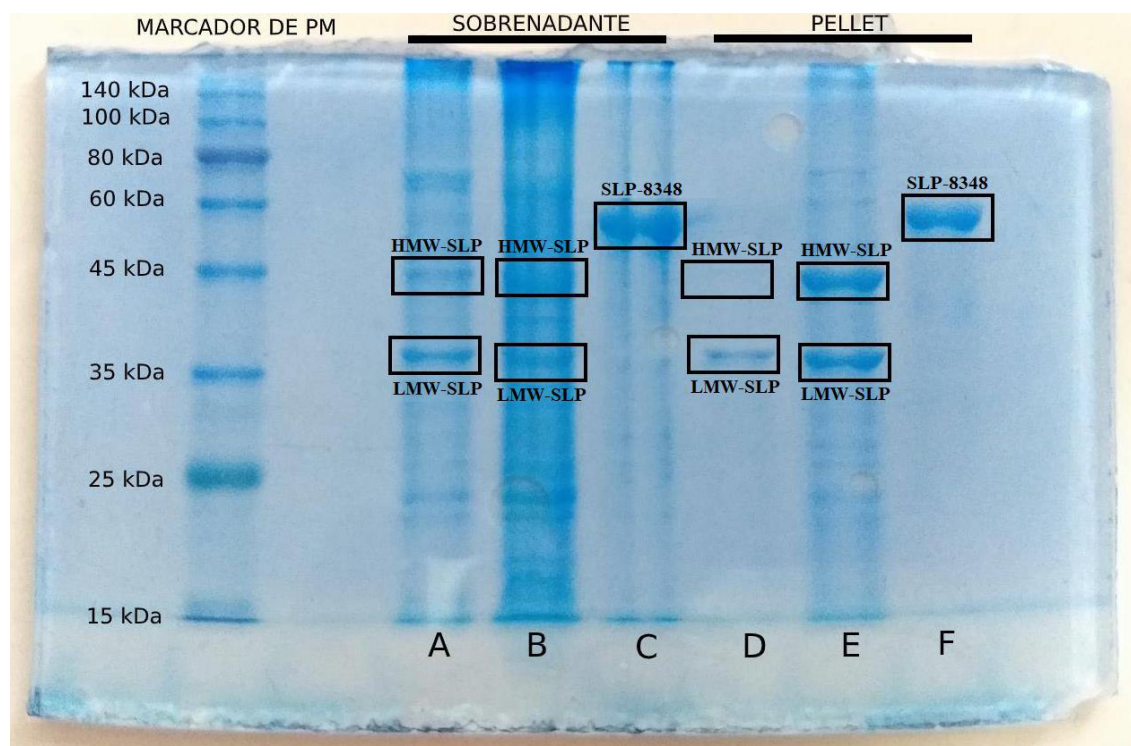


Figura 9. SDS-PAGE de los extractos de proteínas de capa-S de *C. difficile* y *L. kefir*. **A y D:** *C. difficile* cepa VPI 10463 extraídas con LiCl 5M; **B y E:** *C. difficile* cepa VPI 10463 extraídas con GnCl 5M; **C y F:** *L. kefir* cepa 8348 extraídas con LiCl 5M.

En base a estos resultados, se seleccionó el extracto de proteínas de capa-S obtenido por tratamiento con GnCl 5M como antígeno para la obtención de anticuerpos policlonales en ratón.

4.5 Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales anti-SLP 10463

Se sabe que, una vez que los linfocitos B reconocen el antígeno específico a través de su inmunoglobulina de superficie y son activadas por la acción de los linfocitos T, se produce la expansión clonal de los linfocitos B encargados de secretar anticuerpos, principalmente IgM. Luego de producirse este tipo de respuesta inmunitaria primaria, quedarán como remanentes los linfocitos B de memoria, que son los que facilitarán que la respuesta secundaria sea más rápida, con anticuerpos mayoritariamente de tipo IgG. Generalmente, durante el curso de una respuesta inmunitaria, los linfocitos B producen anticuerpos con una afinidad cada vez mayor, lo que se llama “*maduración de la afinidad*”. Con las sucesivas inmunizaciones del mismo antígeno (en este caso la SLP de *C. difficile*), el hospedador produce anticuerpos con afinidades superiores a las de la primera inmunización. En la respuesta secundaria, los anticuerpos aumentan la afinidad respecto a la respuesta primaria. El proceso de maduración de la afinidad de los linfocitos B ocurre en los centros germinales de los órganos linfoides secundarios. En la hipermutación somática se producen mutaciones al azar en las regiones variables que codifican la región de unión a antígeno, lo que genera nuevas especificidades en el repertorio de la respuesta inmunológica. El número de mutaciones va incrementando durante la respuesta inmune, pero por sobre todo en la respuesta secundaria. La selección clonal, por su parte, selecciona solo las progenies de linfocitos B que presentan mayores afinidades por el antígeno; los linfocitos B que no cumplen con este requerimiento son eliminados. Así, los anticuerpos secretados poseen un incremento de la afinidad promedio por el antígeno. La hipermutación somática va ligada de alguna manera al cambio de clase, ya que no afecta a la IgM, pero sí a IgG e IgA (Fainboim-Geffner, 2017).

Por eso, se espera que, a medida que se avanza con las inmunizaciones (inoculaciones sucesivas de antígeno, en este caso las proteínas de capa-S de *C. difficile*), el título de anticuerpos sea mayor y más específico con el fin de mejorar la respuesta.

La respuesta de anticuerpos específicos se evaluó mediante titulación de muestras de suero obtenidas a partir de sangrías de ratón luego de cada inoculación, por ELISA indirecto contra el

antígeno. La cronología de inoculaciones y sangrías se muestra en la Tabla 3 en la sección de Materiales y métodos.

Decidimos utilizar, además del IFA, la capa-S de *L. kefir* CIDCA 8348 (SLP-8348) como potencial adyuvante, ya que se ha demostrado que en otros casos potencia la activación de macrófagos *in vitro* y es capaz de potenciar la respuesta inmune celular cuando es inoculada por vía subcutánea junto con ovalbúmina (Malamud *et al.* 2018, Malamud *et al.* 2019).

Los ratones fueron diferenciados según el adyuvante que se utilizó en cada caso (Tabla 6).

Tabla 6. Nombre de los ratones con sus respectivas inmunizaciones.

Lote	Nombre de ratón	Recibieron inmunización con:
1	IFA 1	IFA + SLP-10463
1	IFA 2	IFA + SLP-10463
1	IFA 3	IFA + SLP-10463
2	SLP 1	SLP-8348 + SLP-10463
2	SLP 2	SLP-8348 + SLP-10463
2	SLP 3	SLP-8348 + SLP-10463

En la segunda sangría (Tabla 6) no se pudo sangrar al ratón IFA1, por lo que no se obtuvo el antisuero.

Como puede observarse en la Figura 10, en las fosas correspondientes a los ratones IFA1, IFA2 e IFA3 se ve mayor intensidad de reacción antígeno-anticuerpo que en las fosas correspondientes a las muestras de suero de los ratones SLP1, SLP2 y SLP3.

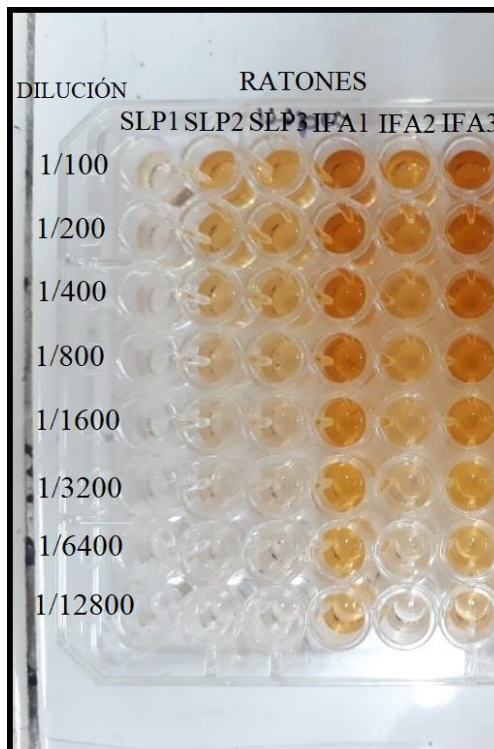


Figura 10. ELISA de titulación vs proteínas de capa-S de *C. difficile* (SLP-10463). Resultados correspondientes a la tercera sangría.

En las curvas de titulación representadas en las Figuras 11 y 12 se puede apreciar un aumento de la respuesta de anticuerpos IgG específicos a medida que avanza el plan de inmunización, en ambos grupos de animales. En el lote de ratones que recibieron IFA, el ratón IFA3 es el mayor productor de anticuerpos, junto con el IFA1, mientras que el ratón IFA2 no parece generar una buena respuesta. Dentro del grupo de animales que recibieron SLP-8348 como adyuvante, el ratón SLP1 no respondió adecuadamente al desafío con el antígeno.

Los títulos de anticuerpos específicos alcanzados luego de tres inmunizaciones se muestran en la Tabla 7.

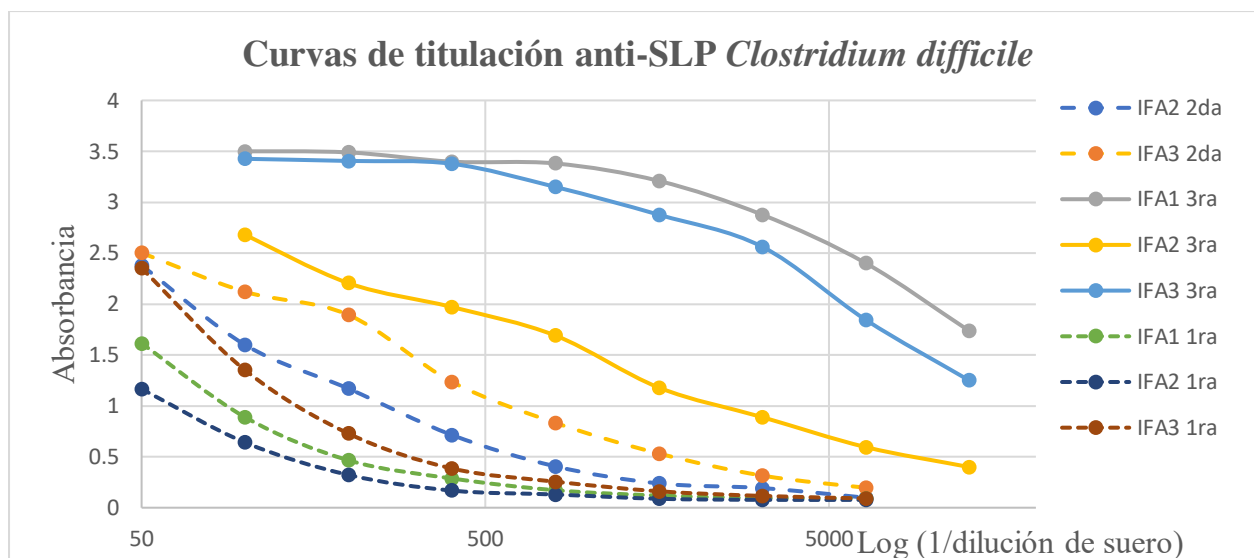


Figura 11. Curvas de titulación anti-SLP-10463 de ratones inmunizados con IFA. Curvas de titulación correspondientes a las tres sangrías.

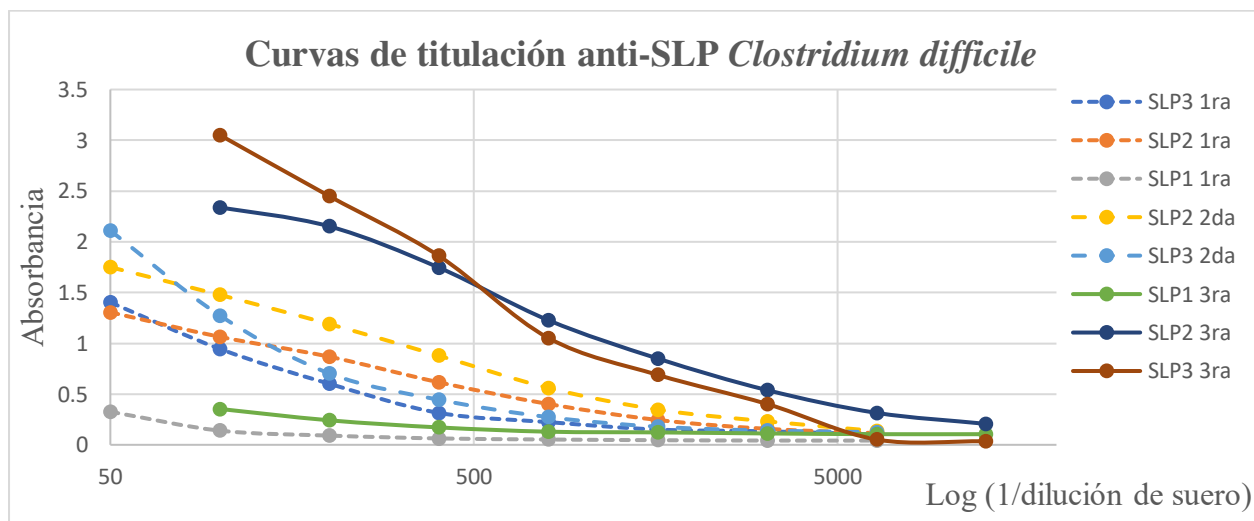


Figura 12. Curvas de titulación anti-SLP-10463 de ratones inmunizados con SLP-8348. Curvas de titulación correspondientes a las tres sangrías.

Tabla 7. Título máximo de anticuerpos anti-SLP-10463 obtenidos por ELISA de los ratones en la tercera sangría.

Ratón	Título de anticuerpos en la tercera sangría
SLP1	<1/50
SLP2	~ 1/500
SLP3	~ 1/500
IFA1	>1/5000
IFA2	~ 1/500
IFA3	>1/5000

En comparación con los títulos obtenidos con el adyuvante de Freund incompleto (IFA), los títulos de anticuerpos obtenidos empleando la SLP-8348 como adyuvante, fueron menores (Figura 13 y Tabla 7). Si bien no se inmunizó un grupo de ratones con la SLP de *C. difficile* sin ningún adyuvante, los resultados obtenidos sugieren que, a pesar de que, en estudios previos, la SLP-8348 mostró capacidad de potenciar la inmunidad celular antígeno-específica al ser inoculada por vía subcutánea (Malamud *et al.* 2019), no necesariamente debe tener buena capacidad adyuvante por vía intraperitoneal ni sobre la respuesta inmune humoral, que es lo que evaluamos en este trabajo.

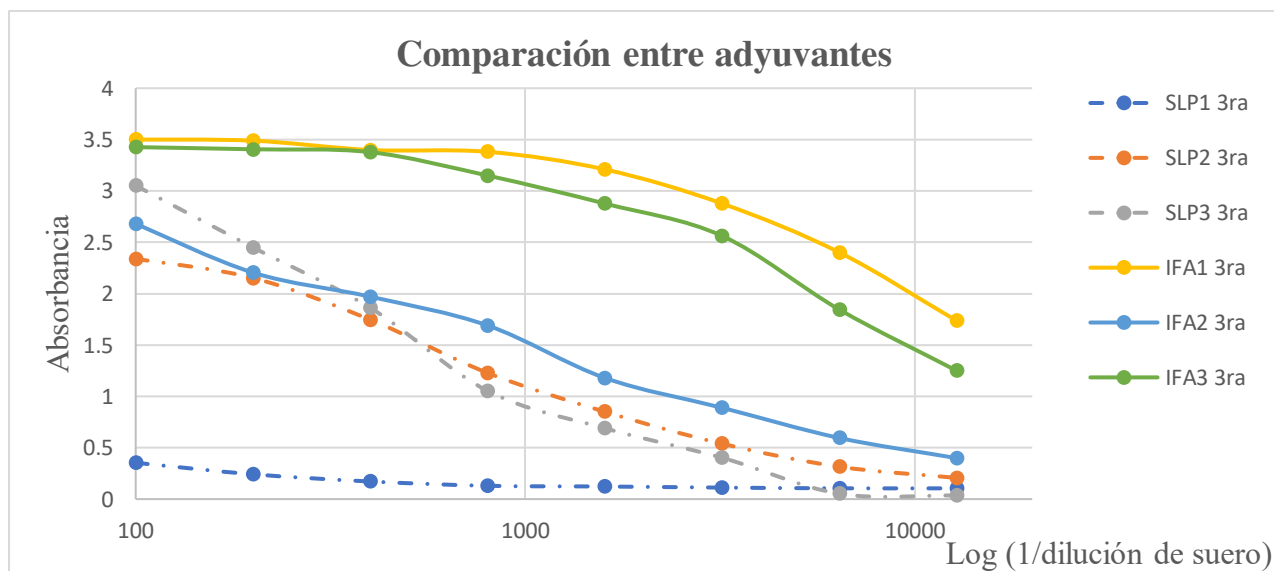


Figura 13. Comparación entre adyuvantes IFA vs SLP-*L. kefir*. Curvas de titulación correspondientes a la tercera sangría.

Por otro lado, al analizar la presencia de anticuerpos específicos anti-SLP 8348 en el suero de los ratones inmunizados, solo se observó reactividad para las proteínas de capa-S de *L. kefir* en los ratones que fueron inmunizados con la SLP-8348 como adyuvante, mientras que no se detectaron anticuerpos específicos para estas proteínas en los sueros de los ratones que recibieron IFA como adyuvante (Figura 14). De acuerdo a estos resultados, podemos decir que no hay reactividad cruzada entre ambas proteínas de capa-S.

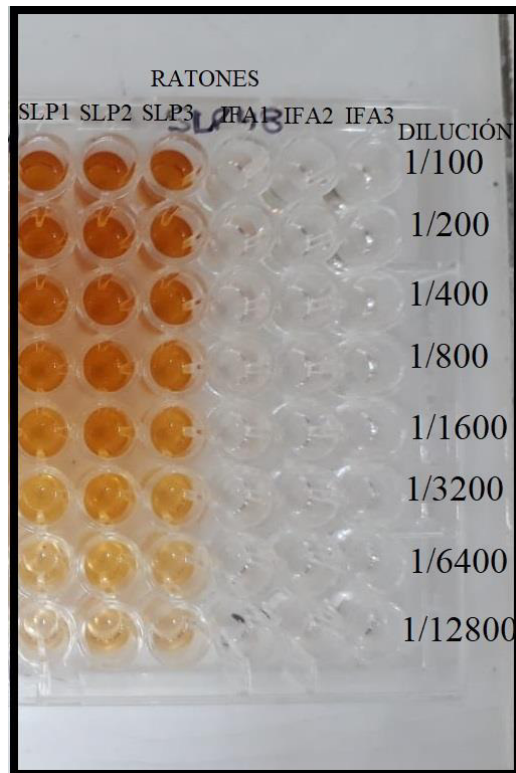


Figura 14. ELISA de titulación vs proteínas de capa-S de *L. kefir* (SLP-8348). Resultados correspondientes a la tercera sangría.

Se podría haber realizado otro ELISA luego de poco más de un mes desde la última inoculación, con el suero obtenido por punción cardíaca, luego del sacrificio de los animales. Teniendo en cuenta el tiempo transcurrido desde la última inoculación, se podría esperar que el título disminuya levemente o que no cambie demasiado, lo que indicaría que hay una mejor memoria inmunológica. La vida media aproximada de los anticuerpos IgG es de aproximadamente 20 días (Fainboim-Geffner, 2017). La exposición del antígeno con las células B de memoria induce una potente y rápida expansión clonal que determina una generación de plasmocitos entre 10 veces mayor respecto a lo acontecido en la respuesta primaria (Fainboim-Geffner, 2017).

4.6 Reactividad de anticuerpos anti-SLP 10463 frente a otras cepas de *C. difficile*

El ensayo de dot-blot nos permitió hacer una primera evaluación de la utilidad de los anticuerpos policlonales obtenidos, analizando su capacidad de reconocimiento frente a las bacterias enteras. Para el ensayo se seleccionó la muestra de suero de la 3ª sangría del ratón IFA3, ya que fue uno de los ratones que alcanzó un mayor título de anticuerpos.

Tal como se muestra en la Figura 15, se observó reactividad frente a todas las cepas ensayadas, aunque la mayor reactividad se obtuvo frente a la cepa VPI 10463, lo cual es esperable ya que es la que se utilizó como inmunógeno. Estos resultados indican que, por un lado, los anticuerpos obtenidos por inmunización con el extracto de SLP-VPI 10463 son capaces de reconocer al antígeno sobre la bacteria entera. A su vez, también reconocen las proteínas superficiales expresadas en otras cepas de *C. difficile*, que son aislados clínicos (cepas A3, G2 y G4). Por lo tanto, podemos decir que se podría utilizar en ensayos para la detección de la bacteria, por ejemplo, en técnicas de detección rápida, ensayos de actividad biológica, etc.

Como se mencionó en la introducción, en el caso de *C. difficile* se ha descrito la expresión de dos SLP no glicosiladas, una de alto peso molecular, conservada entre cepas y anclada a la pared celular (HMW-SLP) y la otra SLP de bajo peso molecular (LMW-SLP) que se encuentra más expuesta y es altamente variable. Podríamos pensar entonces que la HMW-SLP es la reconocida por los anticuerpos, ya que está conservada entre cepas, y es la responsable de la reactividad cruzada observada. Para confirmar esta hipótesis y poder caracterizar mejor el sistema, el próximo paso sería la realización de un inmunoblotting con las SLP extraídas de las diferentes cepas de *C. difficile*.

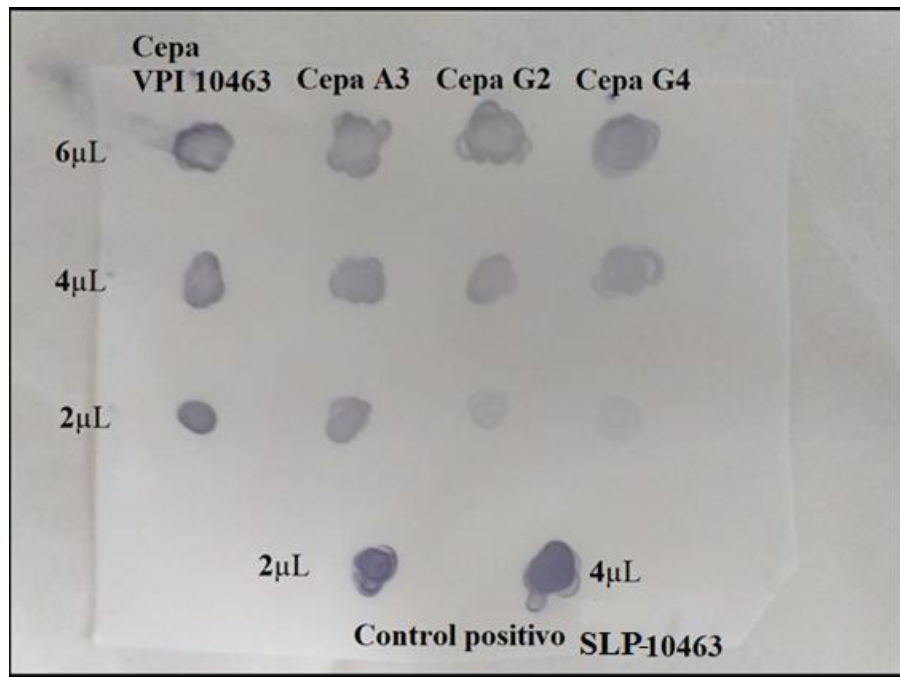


Figura 15. Resultado del ensayo de Dot-Blot.

Referencias: Control positivo: SLP-10463. Cepa A3: cepa de *C. difficile* proveniente del Hospital Alemán. Cepas G2 y G4: cepas de *C. difficile* proveniente del Hospital Gandulfo.

5. Conclusiones

Se pudo obtener satisfactoriamente las proteínas de capa-S de *C. difficile* mediante la extracción con GnCl como agente caotrópico, logrando una mayor concentración de proteínas que con el método ya puesto a punto en el laboratorio (LiCl 5M).

Empleando IFA como adyuvante y el extracto de GnCl como antígeno, se obtuvo una buena respuesta de anticuerpos específicos anti-SLP de *C. difficile*.

Las proteínas de capa-S de *L. kefir* inoculadas por vía intraperitoneal no mostraron una buena capacidad adyuvante sobre la respuesta humoral.

En cuanto a los resultados obtenidos por el Dot-Blot podemos decir que:

- los anticuerpos obtenidos por inmunización con el extracto de SLP de *C. difficile* son capaces de reconocer al antígeno sobre la bacteria entera.
- los anticuerpos reconocen las proteínas superficiales expresadas en otras cepas de aislados clínicos de *C. difficile*.

6. Anexos

6.1 Inoculación de ratones mediante ruta intraperitoneal

Técnica

1. Colocar al animal amarrado del cuello inmovilizado con las manos, boca arriba, ligeramente inclinado cabeza hacia abajo (Figura 16).
2. Trazar una línea imaginaria en el centro del abdomen.
3. Mojar y cepillar el pelo del cuadrante inferior izquierdo para exponer la piel y posteriormente limpiar con alcohol.
4. Introducir la aguja hasta que cese la resistencia.

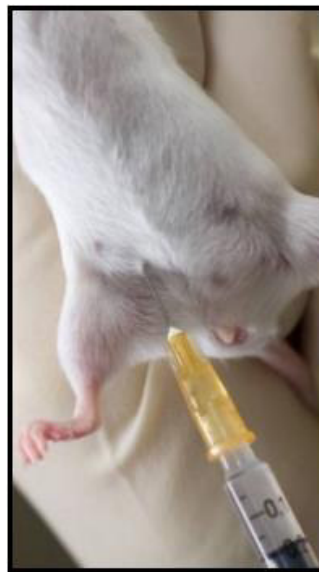


Figura 16. Inoculación de ratón, vía intraperitoneal.

(Fuente: <https://es.slideshare.net/manuelgug/inoculacin-en-animales-va-intraperitoneal-subcutnea-e-intracutnea>)

Consideraciones

- La inclinación debe mantenerse lo suficiente como para evitar pinchar los intestinos.
- La entrada de la aguja tiene que ser a una inclinación de 30° del vientre.

6.2 Sangría de ratón mediante punción del seno venoso submandibular

- Se realiza en animal consciente.
- Se inmoviliza al animal con un pellizco de piel lo más amplio posible de la región dorsocervical y estirando la piel del cuello para practicar éstasis venoso en la región cefálica durante un corto periodo de tiempo (Figura 17)
- Punzar con lanceta o aguja de 18-21 G junto al ángulo caudal mandibular y recoger la sangre con un eppendorf.
- Aplicar algo de presión con una gasa estéril.
- Devolver al animal a su jaula.



Figura 17. Sangría de ratón por punción del seno submandibular.

(Fuente: <https://nucleus.usal.es/sites/default/files/servicios/sea/formularios/PNSEA1.pdf>)

6.3 Soluciones y buffers utilizados

- **Solución madre de acrilamida-bisacrilamida (SDS-PAGE):**

Acrilamida 30%

Bisacrilamida 0,8%

- **Buffer gel de apilamiento 4X:**

Tris-hidroximetil-aminometano	0,5 M
SDS	0,4%
pH = 6,8	

- **Buffer separador 4X:**

Tris-hidroximetil-aminometano	1,5 M
SDS	0,4%
pH = 8,8	

- **Buffer de corrida 10X:**

Tris-hidroximetil-aminometano	0,025 M
Glicina	0,192 M
SDS	0,1%
pH = 8	

- **Buffer muestra 4X:**

Buffer de apilamiento	2,5 mL
SDS	1 g
Sacarosa	5 g
Azul de bromofenol	pizca
Llevar a 10 mL con agua desionizada	

- **Buffer fosfato salino (PBS)**

NaCl	9,00 g
NaH ₂ PO ₄	0,144 g
K ₂ HPO ₄	0,795 g
pH = 7,2 ± 0,1	

- **Buffer Tris salino (TBS)**

Tris-Base	6,00 g
-----------	--------

NaCl

5,90 g

pH = $7,4 \pm 0,1$

7. Fuentes de información y referencias bibliográficas.

- Alcalá Hernández, L., Marín Arriaza, M., Mena Ribas, A., Niubó Bosh, J. (2015). Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R. (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).
- Bouza, E., Muñoz, P., Alonso, R. (2005). Clinical manifestations, treatment and control of infections with *Clostridium difficile*. *Microbiology and Infection*, 11 Suppl 4, 57-64.
- Bradshaw, W.J., Roberts, A.K., Shone, C.C., Acharya, K.R. (2018). The structure of S-layer of *Clostridium difficile*. *Journal of Cell Communication and Signalling*, 12, 319-331.
- Calabi, E., Ward, S., Wren, B., Paxton, T., Panico, M., Morris, H., Dell, A., Dougan, G., Fairweather, N. (2001). Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. *Molecular Microbiology*, 40(5), 1187-1199.
- Claus, H., Akça, E., Debaerdemaeker, T., Evrard, C., Declercq, J.P., Robin Harris, J., Schlott, B., König, H. (2005). Molecular organization of selected prokaryotic S-layer proteins. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(9), 731-743.
- de la Fuente-Núñez, C., Mertens, J., Smit, J., Hancock, R.E. (2012). The bacterial surface layer provides protection against antimicrobial peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5452-5456.
- Fagan, R.P., Albesa-Jové, D., Qazi, O., Svergun, D.I., Brown, K.A., Fairweather, N.F. (2009). Structural insights into the molecular organization of the S-layer from *Clostridium difficile*. *Molecular Microbiology*, 71(5), 1308-1322.
- Fainboim, L., Geffner, J. (2017). Introducción a la Inmunología Humana. 6ª Ed. 3ª reimp. Editorial Médica Panamericana.
- Garrote, G.L., Delfederico, L., Bibiloni, R., Abraham, A.G., Pérez, P.F., Semorile, L., De Antoni, G.L. (2004). Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins. *Journal of Dairy Research*, 71(2), 223-230.

- Gerbino, E., Carasi, P., Mobili, P., Serradell, M.A., Gómez-Zavaglia, A. (2015). Role of S-layer proteins in bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(12), 1877-1887.
- Goudarzi, M., Seyedjavadi, S.S., Goudarzi, H., Mehdizadeh Aghdam, E., Nazeri, S. (2014). *Clostridium difficile* Infection: Epidemiology, Pathogenesis, Risk Factors, and Therapeutic Options. *Scientifica (Cairo)*, 2014:916826.
- He, M., Miyajima, F., Roberts, P., Ellison, L., Pickard, D.J., Martin, M.J., Connor, T.R., Harris, S.R., Fairley, D., Bamford, K.B., *et al.* (2013). Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nature Genetics*, 45, 109–113.
- He, M., Sebaihia, M., Lawley, T.D., Stabler, R.A., Dawson, L.F., Martin, M.J., Holt, K.E., Seth-Smith, H.M., Quail, M.A., Rance, R., *et al.* (2010). Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long-time scales. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)*, 107, 7527–7532.
- Houwink, A.L. (1953). A macromolecular monolayer in the cell wall of *Spirillum spec.* *Biochimica et Biophysica Acta*, 10, 360-366.
- Howard, L., Tipper, D.J. (1973). A polypeptide bacteriophage receptor: modified cell wall protein subunits in bacteriophage-resistant mutants of *Bacillus sphaericus* strain P-1. *Journal of Bacteriology*, 113(3), 1491-504.
- Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M., Aktories, K. (1995). Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature*, 375, 500–503.
- Kelly CP. (2012). Can we identify patients at high risk of recurrent *Clostridium difficile* infection? *Clinical Microbiology and Infections*, 18, 21–27.
- Konstantinov, S.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Bruijns, S.C., Singh, S.K., Valence, F., Molle, D., Lortal, S., Altermann, E., Klaenhammer, T.R., van Kooyk, Y. (2008). S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proceedings of National Academy of Sciences (USA)*, 105, 19474–19479.
- Kotiranta, A.K., Ito, H., Haapasalo, M.P., Lounatmaa, K. (1999). Radiation sensitivity of *Bacillus cereus* with and without a crystalline surface protein layer. *FEMS Microbiology Letters*, 179(2), 275-80.

- Koval, S.F., Hynes, S.H. (1991). Effect of paracrystalline protein surface layers on predation by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*, 173(7), 2244-2249.
- Kuehne, S.A., Cartman, S.T., Heap, J.T., Kelly, M.L., Cockayne, A., Minton, N.P. (2010). The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature*, 467, 711-713.
- Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrell, K. L., & Finegold, S. M. (2016). Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, 40, 95-99.
- Malamud, M., Carasi, P., Assandri, M.H., Freire, T., Lepenies, B., Serradell, M.A. (2019). S-layer glycoprotein from *Lactobacillus kefir* exerts its immunostimulatory activity through glycan recognition by Mincle. *Frontiers in Immunology*, 10:1422.
- Malamud, M., Carasi, P., Bronsoms, S., Trejo, S.A., Serradell, M.A. (2017). *Lactobacillus kefir* shows inter-strains variations in the amino acid sequence of the S-layer proteins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110, 515-530.
- Malamud, M., Carasi, P., Freire, T., Serradell, M.A. (2018). S-layer glycoprotein from *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 enhances macrophages response to LPS in a Ca⁺²-dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495, 1227-1232.
- Navalkele, B.D., Chopra, T. (2018). Bezlotoxumab: an emerging monoclonal antibody therapy for prevention of recurrent *Clostridium difficile* infection. *Biologics*, 12, 11–21.
- Oren, A., Garrity, G. M. (2016). Notification that new names of prokaryotes, new combinations, and new taxonomic opinions have appeared in volume 66, part 9, of the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(2), 705-707.
- Pechiné, S., Bruxelles, J.F., Janoir, C., Collignon, A. (2018). Targeting *Clostridium difficile* surface components to develop immunotherapeutic strategies against *Clostridium difficile* infection. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1009.
- Rodríguez Pardo, D., Mirelis, B., Navarro, F. (2013) Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(4), 254-263.
- Sára, M., Sleytr, U.B. (2000). S-layer proteins. *Journal of Bacteriology*, 182, 859-868.

- Schwan, C., Stecher, B., Tzivelekidis, T., van Ham, M., Rohde, M., Hardt, W.D., Wehland, J., Aktories, K. (2009). *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathogens*, 5(10): e1000626.
- Sekot, G., Posch, G., Messner, P., Matejka, M., Rausch-Fan, X., Andrukhov, O., Schäffer, C. (2011). Potential of the *Tannerella forsythia* S-layer to delay the immune response. *Journal of Dental Research*, 90(1), 109-114.
- Shimotahira, N., Oogai, Y., Kawada-Matsuo, M., Yamada, S., Fukutsuji, K., Nagano, K., Yoshimura, F., Noguchi, K., Komatsuzawa, H. (2013). The surface layer of *Tannerella forsythia* contributes to serum resistance and oral bacterial coaggregation. *Infection and Immunity*, 81(4), 1198-1206.
- Sleytr, U.B., Beveridge, T.J. (1999). Bacterial S-layers. *Trends in Microbiology*, 7(6), 253-260.
- Sleytr, U.B., Schuster, B., Egelseer, E.M., Pum, D. (2014). S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 823-864.
- Sleytr, U.B., Schuster, B., Egelseer, E.M., Pum, D., Horejs, C.M., Tscheliessnig, R., Ilk, N. (2011). Nanobiotechnology with S-Layer Proteins as Building Blocks. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 103, 277-352.
- Slimings, C., Riley, T.V. (2014). Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: update of systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapy*, 69(4), 881-891.
- Spigaglia, P., Galeotti, C.L., Barbanti, F., Scarselli, M., Van Broeck, J., Mastrantonio, P.J. (2011) The LMW surface-layer proteins of *Clostridium difficile* PCR ribotypes 027 and 001 share common immunogenic properties. *Medical Microbiology*, 60(Pt 8), 1168-1173.
- Taverniti, V., Stuknyte, M., Minuzzo, M., Arioli, S., De Noni, I., Scabiosi, C., Cordova, Z.M., Junttila, I., Hämäläinen, S., Turpeinen, H., Mora, D., Karp, M., Pesu, M., Guglielmetti, S. (2013). S-layer protein mediates the stimulatory effect of *Lactobacillus helveticus* MIMLh5 on innate immunity. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 1221–1231.
- Trejo, F.M. (2009). Interacción entre *Clostridium difficile*, lactobacilos y bifidobacterias, Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.

- Walter, B.M., Cartman, S.T., Minton, N.P., Butala, M., Rupnik, M. (2015) The SOS response master regulator LexA is associated with sporulation, motility and biofilm formation in *Clostridium difficile*. *PLoS One*, 10(12), e0144763.
- Wright, A., Drudy, D., Kyne, L., Brown, K., Fairweather, N.F. (2008). Immunoreactive cell wall proteins of *Clostridium difficile* identified by human sera. *Journal of Medical Microbiology*, 57, 750–756.