



RIDUNAJ
Repositorio Institucional
Digital UNAJ



Universidad Nacional
ARTURO JAURETCHE

Tesinas de Grado

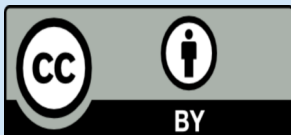
Vera, Estela Maris

Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales anti-proteínas de capa-s de *Lentilactobacillus Kefiri*

2023

Instituto de Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.

Atribución 4.0

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

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

Cita recomendada:

Vera, E. M. (2023). *Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales anti-proteínas de capa-s de Lentilactobacillus Kefiri* [Trabajo final de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche].

<https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/2958>



TRABAJO FINAL DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
UNIVERSIDAD NACIONAL ARTURO JAURETCHE

**“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES ANTI-PROTEÍNAS DE CAPA-S DE
LENTILACTOBACILLUS KEFIRI”**

ALUMNA: Estela Maris Vera

DIRECTORA: Dra. María de los Ángeles Serradell

CO-DIRECTOR: Lic. Matías H. Assandri

El presente trabajo ha sido realizado en la Cátedra de Microbiología del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. María de los Ángeles Serradell, Profesor Asociado SD, Inmunología para la Carrera de Bioquímica, ICS, UNAJ; Investigador Independiente CONICET, y la codirección del Lic. Matías H. Assandri, Becario Doctoral CONICET, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Agradecimientos:

Lograr un objetivo tan deseado como este, a esta altura de la vida, requiere de mucho esfuerzo y dedicación. Pero sin duda, este esfuerzo fue posible con el apoyo de todos ustedes. No puedo dejar de agradecerles infinitamente y decirles lo importantes que son para mí.

A mis directores de tesis María y Maty, gracias por haberme brindado la oportunidad de realizar mi tesina en su lugar de trabajo y por explicarme con mucha paciencia y detalle cada paso que dábamos. Gracias por haber dado respuestas a mis preguntas, por corregirme, por dedicarme su tiempo y buen humor.

A la “Universidad Nacional Arturo Jauretche” y a cada uno de los profesores que la conforman, por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de dar un paso más en mi formación académica y así lograr una carrera profesional.

A todas/os mis compañeras/os de la facu, que estuvieron conmigo en los momentos de estrés y alegría durante este largo y retador camino. Su apoyo, confianza, soporte y cariño han sido invaluable. Cada uno de ustedes ha contribuido a mi fortaleza y animo de una manera u otra, gracias por ser mi punto de apoyo y mi equipo de aliento.

Gracias a mis amigas, hermanas de la vida, que me comprenden, me apoyan, me distraen, me divierten, me aconsejan, me escuchan, y sobre todo me esperan!!!

Gracias a mi familia, que es mi cable a tierra. Mis hijos, Yan, Eze, Xime y Maty, que aguantaron con paciencia los periodos de cursada y examen (a veces sin tanta paciencia). A ellos les dedico este trabajo, sepan que con esfuerzo y dedicación se logran los objetivos. Y transmitirles que el camino del conocimiento es el mejor camino.

A mi hermosa nieta Ailen, por ser mi luz y mi sonrisa.

A Jose, mi compañero y soporte, gracias por bancarme incondicionalmente en este proyecto, por valorar mi esfuerzo, por cubrirme, por acompañarme y por estar siempre brindándome tu apoyo y comprensión.

A todos, infinitas GRACIAS!

Índice

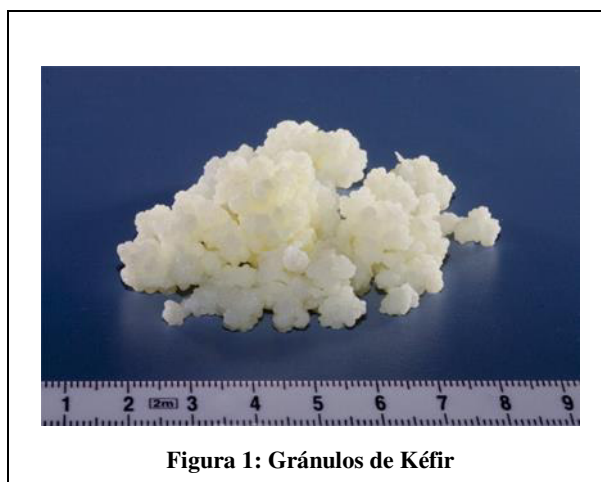
1. Introducción.....	8
1.1 Kefir.....	8
1.2 Lactobacilos.....	9
1.3 <i>Lentilactobacillus kefir</i>	9
1.4 Capa-S.....	10
1.5 Proteína de capa-S en <i>L. kefir</i>	13
1.6 Anticuerpos Policlonales y Monoclonales.....	16
2. Objetivos.....	18
3. Materiales y Métodos.....	19
3.1 Material biológico.....	19
3.1.1 Animales.....	19
3.1.2 Microorganismos.....	19
3.1.3 Células eucariotas.....	20
3.2 Obtención de proteínas de capa-S.....	21
3.2.1 Extracción.....	21
3.2.2 Separación electroforética de proteínas mediante SDS-PAGE.....	22
3.2.3 Revelado con Coomassie Blue Coloidal.....	22
3.2.4 Cuantificación de proteínas.....	23
3.3 Desarrollo del plan de inmunización.....	24
3.3.1 Inmunógeno, adyuvante y vía de inoculación.....	24
3.3.2 Seguimiento del plan de inmunización.....	25
3.4 Obtención de Anticuerpos Monoclonales.....	26
3.4.1 Fusión.....	26

3.4.2 Seguimiento de hibridomas y clones.....	27
3.4.3 Selección de hibridomas de Anticuerpos Monoclonales (AcMo) anti SLP-83111.....	28
3.4.4 Clonación por dilución limite.....	29
3.4.5 Criopreservación de hibridomas.....	30
3.5 Caracterización de los Anticuerpos Monoclonales.....	30
3.5.1 ELISA indirecto.....	31
3.5.2 Inmunoblotting.....	31
3.5.3 Dot-Blot.....	32
4. Resultados y Discusión.....	33
4.1 Extracción de proteínas de capa-S de <i>L. kefir</i>	33
4.1.1 Cuantificación de proteína soluble.....	34
4.2 Obtención de Anticuerpos Monoclonales.....	36
4.2.1 Seguimiento del plan de inmunización.....	36
4.2.2 Primera fusión.....	37
4.2.3 Segunda fusión.....	38
4.3 Caracterización de la reactividad de los Anticuerpos Monoclonales.....	40
4.3.1 Reactividad Cruzada entre proteínas de capa-S de <i>L. kefir</i>	40
4.3.2 Reactividad contra proteínas de capa-S y bacterias enteras.....	41
4.3.3 Reactividad por Inmunoblotting.....	45
5. Conclusiones.....	46
6. Bibliografía.....	47

1. Introducción

1.1 Kéfir

Los gránulos de kéfir son pequeños bulbos insolubles en agua y de forma irregular, su tamaño varía entre pocos milímetros y algunos centímetros de diámetro (Figura 1). Están conformados por una comunidad compleja de levaduras, bacterias ácido-acéticas (BAA) y ácido-lácticas (BAL), confinadas en una matriz de polisacáridos y proteínas (Garrote *et al.* 2001). El producto obtenido por la fermentación de la leche utilizando estos gránulos se llama “kéfir” y se han asociado a su consumo varias propiedades promotoras de la salud (Guzel-Seydim *et al.* 2011). Durante la fermentación, los granos aumentan de peso y la biomasa adicional se cosecha para nuevas fermentaciones. La composición de la microbiota del kéfir puede variar dependiendo de su procedencia, pero diferentes estudios han demostrado la presencia principalmente de diferentes especies de lactobacilos, lactococos y levaduras (Leite *et al.* 2013).



Como es sabido, los probióticos son “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso para la salud del huésped” (FAO/OMS, 2001). Las propiedades deseables de un microorganismo probiótico incluyen un género, especie y cepa bien definidos, seguridad demostrada, resistencia comprobada al ácido gástrico y a las secreciones biliares, capacidad para adherirse al tejido epitelial intestinal, producción de sustancias antimicrobianas y actividades antagonistas contra patógenos, modulación de las respuestas inmunitarias y permanecer activos y viables durante los procesos tecnológicos y en los productos finales (Cunningham *et al.*

2021). En este sentido, diferentes cepas de microorganismos aislados del kéfir han mostrado diferentes propiedades, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Bengoia *et al.* 2019, Carasi *et al.* 2015).

1.2 Lactobacilos

Los lactobacilos (LB) son un grupo predominante dentro de las llamadas bacterias lácticas (Hynönen y Palva, 2013). Son bacterias facultativas Gram positivas, no formadoras de esporas y con forma de bastón que fermentan los carbohidratos en ácido láctico como criterio de valoración principal, están ampliamente distribuidos en la naturaleza y tienen múltiples usos comerciales, especialmente en la fermentación de queso y otros productos lácteos (Malamud *et al.* 2019a). Muchos LB son flora comensal que se encuentra en el tracto gastrointestinal y genital de humanos como de animales (Malamud *et al.* 2019a). Debido a su larga historia de utilización en la producción de alimentos, así como también debido a que habitualmente no presentan factores de virulencia, se los reconoce como microorganismos seguros (GRAS, por su sigla en inglés de *Generally Recognized As Safe*).

Cepas específicas de bacterias ácido-lácticas, en particular algunas dentro del grupo de los lactobacilos, se utilizan ampliamente como probióticos ya que se ha demostrado su capacidad para modular el sistema inmunológico (Corthesy *et al.* 2007, Wells 2011), así como su capacidad para inhibir el crecimiento o la invasión de bacterias y parásitos patógenos (Mei *et al.* 2022, Turpin *et al.* 2010).

1.3 *Lentilactobacillus kefir*

La especie anteriormente denominada como *Lactobacillus kefir* es ahora conocida como *Lentilactobacillus kefir*, como parte de una reclasificación completa del género *Lactobacillus* en 25 nuevos géneros bacterianos (Zheng *et al.* 2020). En el grupo de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA; CCT La Plata, CONICET-UNLP-CIC) y la Cátedra de Microbiología del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad

de Ciencias Exactas de la UNLP, se han aislado y caracterizado numerosas especies de BAL y levaduras del kéfir, incluidas varias cepas de *Lentilactobacillus kefir* (Bosch *et al.* 2006, Hamet *et al.* 2013). En particular, la especie *L. kefir* es una de las mayoritarias en la leche fermentada con kéfir, con recuentos que oscilan entre 2×10^8 y 1×10^9 células de *L. kefir* ml⁻¹ (Garrote *et al.* 2005).

Se ha demostrado el potencial de diferentes cepas *L. kefir* como microorganismo probiótico empleando tanto modelos experimentales *in vitro* como *in vivo* (Carasi *et al.* 2021). En particular, estudios *in vivo* han demostrado que la administración de la cepa de *L. kefir* CIDCA 8348 por vía oral induce una respuesta predominantemente anti-inflamatoria a nivel de la mucosa intestinal y cambios en la microbiota fecal (Carasi *et al.* 2015). Asimismo, fue posible demostrar en modelos experimentales en ratón, que el consumo de esta cepa previene el desarrollo de parto prematuro inducido por un estímulo proinflamatorio agudo (Ventimiglia *et al.* 2021) y los efectos deletéreos a nivel metabólico inducidos por una dieta rica en fructosa (Zubiría *et al.* 2017). Por otro lado, se ha demostrado que las cepas de *L. kefir* son capaces de mantener un alto porcentaje de viabilidad después de los procedimientos de secado spray (Golowczyc *et al.* 2011) y liofilización (Bolla *et al.* 2011). Algunas de estas propiedades, tanto las probióticas como las tecnológicas podrían atribuirse a la presencia en estos lactobacilos de una estructura macromolecular superficial de naturaleza proteica conocida como capa-S.

1.4 Capa-S

La capa S es una envoltura proteica nanoestructurada constituida por subunidades de proteínas o glicoproteínas idénticas de 40 a 200 kDa en peso molecular, que se autoensamblan para formar una red bidimensional, regular y altamente porosa (con tamaños de celdas unitarias en el rango de 3 a 30 nm y grosores de aproximadamente 10 nm), con simetría oblicua, cuadrada o hexagonal, que cubre la superficie de diferentes especies de Bacterias y Archaea (Sára & Sleyter *et al.* 2000, Sleytr *et al.* 2014). Dada su presencia ubicua, las capas-S se consideran el resultado de cambios evolutivos de los microorganismos para sobrevivir en ambientes hostiles (Claus *et al.* 2005). La presencia de la capa-S se ha encontrado tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas, incluidas especies patógenas y no patógenas (Assandri *et al.* 2023).

Las técnicas basadas en microscopía electrónica son los métodos de elección para detectar la presencia de una capa-S en la superficie de la célula bacteriana (Figura 2) (Pavkov-Keller *et al.* 2011). Para obtener información sobre la estructura 3D y la topología superficial de los conjuntos de la capa S, se han aplicado métodos como la microscopía de fuerza atómica (AFM) y la dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS). Sin embargo, dado que los métodos convencionales para el análisis estructural de alta resolución, como la cristalografía de rayos X, no se pueden aplicar fácilmente a las proteínas de capa S debido a su dificultad para ser cristalizadas, hay poca información disponible sobre la estructura atómica de las proteínas de capa S, la disposición espacial de los dominios y los elementos de la estructura secundaria dentro de la capa S (Pavkov-Keller *et al.* 2011).

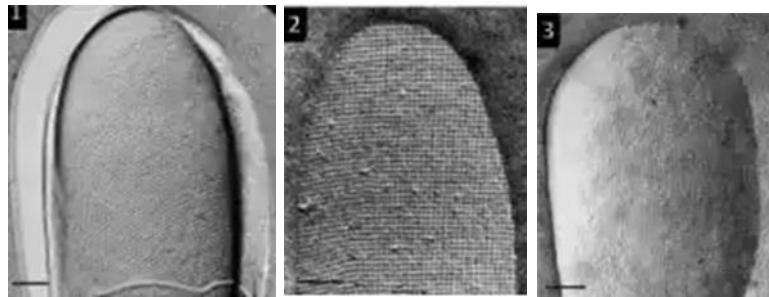


Figura 2: Esquema de los distintos tipos de entramados de la Capa S. Imagen extraída de 40 B Microscopía electrónica de transmisión de (1) *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* L111-69 la cual presenta una simetría hexagonal p6 (2) *Desulfotomaculum nigrificans* B200-71 con simetría cuadrada p4 (3) *Geobacillus* con simetría oblicua p2. Barras = 100 nm. Extraída de Pavkov-Keller *et al.* 2011.

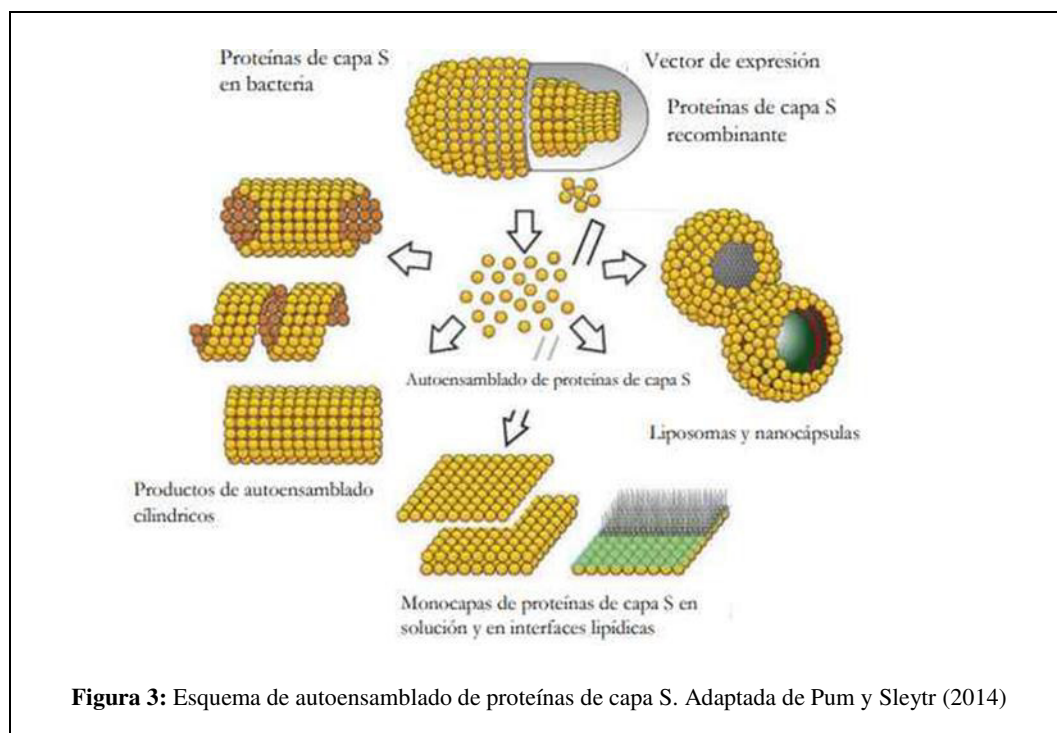
Las proteínas de capa S fueron las primeras glicoproteínas detectadas en procariontas y aún se encuentran entre los ejemplos mejor estudiados de proteínas procariontas glicosiladas. De hecho, la glicosilación es la modificación postraduccional más frecuente de estas proteínas (Ristl *et al.* 2011). En las bacterias, la N-glicosilación es un evento raro, por lo que las SLP bacterianas se caracterizaron generalmente como O- glicosiladas y el grado de glicosilación varía generalmente entre el 2% y el 10% (p/p) (Messner *et al.* 2013).

La información sobre las funciones biológicas de las proteínas de capa-S se ha incrementado en las últimas décadas. 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 la determinación o el mantenimiento de la forma celular, el funcionamiento como tamiz molecular, como

sitio de unión para moléculas grandes, iones o fagos, como mediador de la adhesión microbiana, protección frente a los microorganismos a condiciones ambientales adversas, contra la presencia de péptidos antimicrobianos, de la exposición a la radiación, cambios en el pH ambiental, bacteriófagos o enzimas bacteriolíticas (Gerbino *et al.* 2015). Por otro lado, también participan en la modulación de la respuesta inmune (Konstantinov *et al.* 2008, Prado Acosta *et al.* 2021, Taverniti *et al.* 2013, Assandri *et al.* 2023). Además, en las bacterias patógenas, la capa-S podría contribuir a la virulencia a través de varios mecanismos que incluyen la adhesión, la coagregación, la variación antigénica, la protección contra la lisis por el sistema del complemento o fagocitosis, o inmunomodulación (Assandri *et al.* 2023, Ravi y Fioravanti 2021). Por otro lado, algunas proteínas de capa S han demostrado el potencial de actuar como enzimas, o incluso estar involucradas en la motilidad del microorganismo (Gerbino *et al.* 2015).

La atención especial que estas proteínas han captado por parte de los investigadores en los últimos años se debe a sus excepcionales propiedades físicoquímicas, que las convierten en una estructura organizativa única con un alto potencial de aplicación en el campo de la nanobiotecnología moderna, la biomimética y la biomedicina. De hecho, diferentes investigadores han llevado a cabo experimentos centrados en la aplicación de proteínas de la capa-S para el desarrollo de nuevos portadores de antígenos/haptenos, adyuvantes o vesículas (Malamud *et al.* 2019a, Ilk *et al.* 2011).

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 guanidina o cloruro de litio) (Schuster y Sleytr 2020). 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 (Figura 3) (Bolla *et al.* 2022, Pum y Sleytr 2014). 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. (Bolla *et al.* 2022, Raff *et al.* 2016). Por lo tanto, esta capacidad única puede ser explotada en diferentes áreas tales como medicina, farmacología, bioingeniería, industria alimentaria, entre otras.



1.5 Proteínas de capa-S en *Lentilactobacillus kefir*

La presencia de la capa-S se ha descrito en muchas especies bacterianas, incluyendo algunas del anteriormente denominado género *Lactobacillus* (Hynönen y Palva, 2013). Para estas bacterias ácido-lácticas, que se encuentran con frecuencia en diferentes ecosistemas naturales como plantas, alimentos, ensilajes, aguas residuales y el tracto gastrointestinal y genital de humanos y animales (Malamud *et al.* 2019a), la presencia de capa-S se convierte en una característica adaptativa relevante para hacer frente a las condiciones adversas de esos ambientes. Además, como la capa-S constituye la estructura superficial más externa de estas células bacterianas, podría mediar la interacción de los microorganismos con diferentes células eucariotas (es decir, células epiteliales intestinales, células presentadoras de antígenos), así como con la matriz extracelular y los componentes del mucus, hecho que se ha estudiado particularmente para las cepas de lactobacilos caracterizadas como probióticos (Hynönen y Palva, 2013, Malamud *et al.* 2019a).

La presencia de proteínas de capa-S (SLP) en cepas de *L. kefir* fue descrita por primera vez por el grupo de Microbiología del CIDCA (Garrote *et al.* 2004). De los estudios realizados hasta el momento surge que cada cepa de *L. kefir* expresa una única SLP de entre 66 y 71 kDa que es positiva para la

reacción de PAS (“periodic acid Schiff”), lo que indica la presencia de restos glicosídicos (Malamud *et al.* 2017, Mobili *et al.* 2009). Los análisis de composición de restos glicosídicos realizados en 4 cepas de *L. kefir* revelan que la glucosa es el monosacárido mayoritario en todos los casos, aunque existen diferencias entre cepas (Cavallero *et al.* 2017, Malamud *et al.* 2020). En la cepa *L. kefir* CIDCA 83111, se detectaron cadenas que portan en promedio 8 unidades de glucosa y están decoradas con ácido galacturónico. A su vez, fue posible detectar 2 péptidos sustituidos por cadenas cortas de N-glicanos (estructuras fucosiladas, con residuos de manosa y N-acetilglucosamina), siendo esta la primera descripción de la estructura del N-glicanos en glicoproteínas de capa-S de una especie por ese entonces considerada dentro del género *Lactobacillus* (Cavallero *et al.* 2017). Posteriormente, los estudios realizados sobre la SLP de *L. kefir* JCM 5818 indicaron que la misma presenta O-glicanos neutros que contienen en promedio 8 unidades de glucosa, y un sitio de N-glicosilación sustituido con una estructura compleja que podría contener un resto ácido aún no identificado. Sorprendentemente, en otras 2 cepas estudiadas (CIDCA 8321 y CIDCA 8348) no se detectaron N-glicanos, y los O-glicanos están constituidos por restos neutros con un promedio de 5 unidades de glucosa (Malamud *et al.* 2020).

Con respecto a la composición y secuencia de aminoácidos, los estudios realizados demostraron que, a pesar de provenir de cepas de la misma especie, las SLP de *L. kefir* son heterogéneas (Malamud *et al.* 2017, Mobili *et al.* 2009). La información obtenida mediante secuenciación de ADN fue corroborada con los datos espectrales obtenidos por MALDI-TOF, por lo que el gen amplificado y secuenciado corresponde a la SLP expresada en cada una de las cepas estudiadas (Malamud *et al.* 2017). Las proteínas maduras tienen entre 492 y 576 aminoácidos, no poseen residuos de cisteína y los puntos isoeléctricos calculados elevados (entre 9.37 y 9.67), tal como se ha reportado para otras SLP de lactobacilos. La región N-terminal es relativamente conservada y posee un alto porcentaje de restos positivamente cargados. Por el contrario, la región C-terminal muestra las mayores diferencias en la secuencia de aminoácidos entre cepas (Malamud *et al.* 2017). Sin embargo, las SLP de las 6 cepas que fueron oportunamente caracterizadas como auto-agregantes (Mobili *et al.* 2009) son idénticas entre sí, a pesar de que dichas cepas fueron aisladas de diferentes gránulos de kefir. Por otro lado, en base a la secuencia de aminoácidos de sus SLP, las 16 cepas estudiadas pudieron ser clasificadas en 5 grupos: uno en el que agrupan las cepas agregantes, y otros 4 que contienen a las cepas no agregantes (Malamud *et al.* 2017). Estos hallazgos sugieren que las características estructurales de las SLP contribuyen a determinar algunas de las propiedades superficiales de las bacterias, lo que a su vez puede tener un impacto significativo en su potencialidad probiótica.

Desde el punto de vista funcional, se ha demostrado que las proteínas de capa-S de *L. kefir* median la inhibición de la invasión de *Salmonella* Enteritidis a células Caco-2 (Golowczyc *et al* 2007), el antagonismo de las toxinas de *Clostridium difficile* sobre células Vero (Carasi *et al* 2012) y la interacción de *L. kefir* con levaduras (Golowczyc *et al.* 2009). Además, participan de la adhesión de los lactobacilos al mucus gástrico, intestinal y colónico (Carasi *et al.* 2014) y protegen a las bacterias contra el efecto deletéreo del ión Pb⁺² (Germino *et al.* 2015). Por otro lado, más recientemente, se han empleado proteínas de capa-S de *L. kefir* como plantillas en la obtención de nanopartículas de Pt y Ag con alta capacidad catalítica (Bolla *et al.* 2020a,b, Huggias *et al.* 2020, 2021).

Por otra parte, se han realizado estudios acerca del efecto inmuno-estimulador de diferentes SLP provenientes de cepas de *L. kefir* sobre células presentadoras de antígeno. Se ha demostrado que la SLP de la cepa *L. kefir* CIDCA 8348 es internalizada por macrófagos murinos (línea celular RAW264.7) y dicho proceso potencia la respuesta celular frente al 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 por los receptores celulares (Malamud *et al.* 2018). Este sinergismo con el LPS sobre las células RAW264.7 también se corroboró con otras 3 SLP (CIDCA 8321, CIDCA 83111 y JCM 5818) (Malamud *et al.* 2020). Estudios realizados con células presentadoras de antígeno (BMDCs) de ratones salvajes y knock-out para diferentes receptores de lectinas tipo C (CLR), nos han permitido identificar a Mincle (macrophage inducible Ca²⁺ - dependent lectin receptor) como uno de los receptores clave tanto en el reconocimiento de la SLP-8348 como de la SLP-8321, y en la consecuente activación celular (Malamud *et al.* 2019b, 2020). Asimismo, el receptor SignR3 (ortólogo murino de DC-SIGN) sería responsable de la internalización y actividad inmuno-estimuladora de la SLP-5818 (Malamud *et al.* 2020). Empleando LT CD4 de ratones OT-II y BMDCs de ratones salvajes y knock-out para Mincle o SignR3, fue posible comprobar que la activación T es potenciada por las SLP que son reconocidas a través de sus glicanos (Malamud *et al.* 2020). Más aún, mediante estudios *in vivo*, 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.* 2019b).

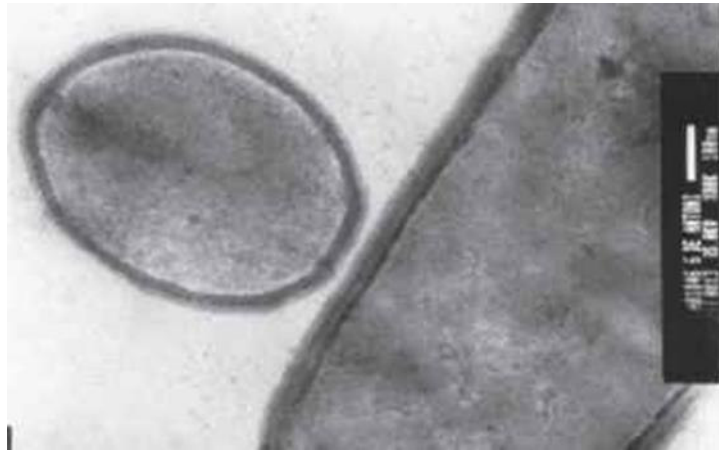


Figura 4: Micrografías obtenidas por transmisión electrónica de una sección delgada de *L. kefir* CIDCA 8321.
Adaptada de Garrote y col. (2004).

1.6 Anticuerpos policlonales y monoclonales

Hasta la década del 80 la producción de inmunoglobulinas estaba limitada técnicamente a inmunizar animales con un antígeno determinado y obtener el antisuero para utilizar como fuente de anticuerpos, directamente o después de una purificación parcial. La utilización de antisueros como parte de ensayos inmunoquímicos posee algunas desventajas. En primer lugar, porque cada antisuero es distinto de cualquier otro, incluso si fueran obtenidos en animales genéticamente idénticos, utilizando preparaciones idénticas del antígeno y el mismo protocolo de inmunización. En segundo lugar, porque los antisueros pueden ser producidos sólo en volúmenes limitados y por lo tanto es imposible utilizar el mismo reactivo inmunológico durante largos períodos de tiempo.

En la respuesta inmune natural, raramente se produce una respuesta monoclonal. Los mielomas representan ejemplos patológicos de la producción de anticuerpos monoclonales como consecuencia del desarrollo descontrolado y desregulado de una célula cancerosa de origen linfoide. Aunque la preparación de mielomas con una especificidad antigénica determinada es bastante costosa, durante algunos años representó la única fuente de obtención de anticuerpos monoclonales.

A mediados de la década del 70, Köhler y Milstein demostraron que es posible establecer una línea celular productora de anticuerpos monoclonales mediante una técnica de hibridación de células somáticas (Köhler y Milstein 1975). Esta técnica permitió superar el factor limitante más importante

que se encontraba a la hora de intentar obtener anticuerpos monoclonales, que era la imposibilidad de establecer un cultivo estable de Linfocitos B. Las células obtenidas mantenían la capacidad de producir y liberar inmunoglobulinas provenientes de los Linfocitos B y además eran capaces de crecer indefinidamente (propiedad proveniente de células de mieloma). En su trabajo demostraron que la fusión de células de bazo de un ratón previamente inmunizado, con células de un mieloma murino, generaba células híbridas que secretaban anticuerpos cuya especificidad venía determinada por el antígeno utilizado durante la inmunización. A partir de esta técnica es posible obtener una línea celular que produzca sólo una de las inmunoglobulinas que están presentes en el suero policlonal del animal inmunizado (Figura 4). Asimismo, esta línea celular es capaz de ser congelada y almacenada y, cuando sea requerido, reactivar el cultivo celular para inocular esas células en ratones donde formará un tumor que mantendrá la capacidad de sintetizar y secretar anticuerpos. De esta manera se obtiene una fuente permanente de anticuerpos de especificidad definida (Yelton y Scharff 1981).

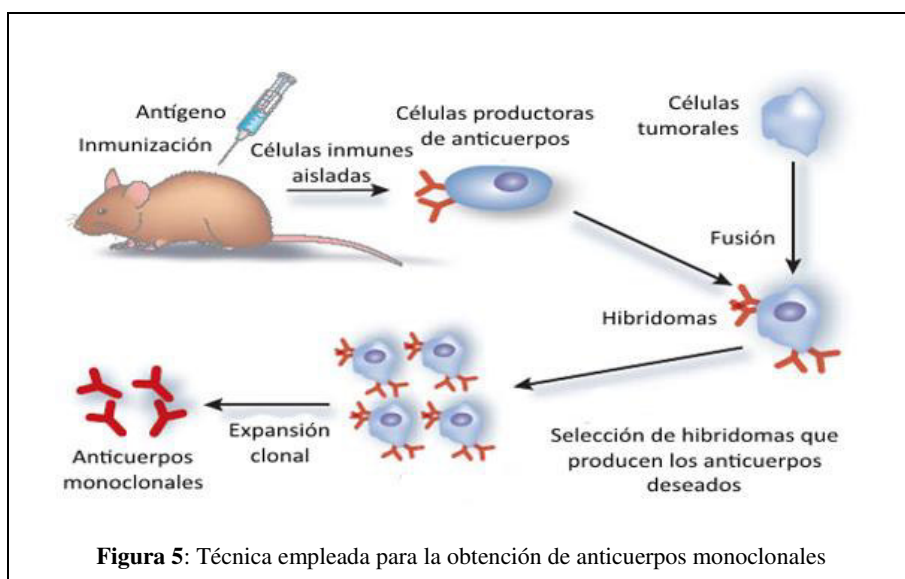


Figura 5: Técnica empleada para la obtención de anticuerpos monoclonales

Desde su aparición hasta el presente, los anticuerpos monoclonales son herramientas inmunoquímicas muy valiosas para la detección, cuantificación y caracterización de antígenos de distinta naturaleza, a la vez que, con el paso de los años, se han transformado en herramientas terapéuticas fundamentales para el avance de la medicina y las ciencias biomédicas para el tratamiento y prevención de un gran número de enfermedades tumorales e inmunopatológicas.

2. Objetivos:

El presente trabajo tiene como objetivos:

- Obtener hibridomas productores de anticuerpos monoclonales específicos contra proteínas de capa-S de *Lentilactobacillus kékiri*.
- Evaluar la reactividad de los anticuerpos monoclonales obtenidos frente a proteínas de capa-S y bacterias enteras de distintas cepas de *L. kefir*.

3. Materiales y métodos

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

3.1 Material biológico

3.1.1 Animales

Como parte del protocolo de obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales se utilizaron ratones macho BALB/c de 6 semanas de edad adquiridos en el Servicio de Animales de Laboratorio la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata.

3.1.2 Microorganismos

El trabajo se realizó empleando cepas de la especie *Lentilactobacillus kefir*. Estas cepas pertenecen a la colección del Centro de Investigación y Desarrollo de Criotecnología de Alimentos (CIDCA-UNLP-CONICET). Los cultivos de estas cepas se realizaron a partir del Banco de Trabajo que se encuentra almacenado en la Catedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata. Se trabajó con las cepas de *L. kefir* CIDCA 8335, CIDCA 8343, CIDCA 8348, CIDCA 83111 y JCM 5818.

Condiciones de cultivo: Los lactobacilos se cultivaron en caldo MRS (Difco, BD Bioscience, USA), (Tabla 1) en condiciones aeróbicas, durante 48 horas, a 37 °C. La pureza de los cultivos se verificó a través de la observación microscópica de preparados fijados y teñidos mediante la técnica de Gram.

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

Tabla 1. Composición del medio MRS

Componentes	gramos/litro
Peptona	10,0
Extracto de carne	8,0
Extracto de levadura	4,0
Glucosa	20,0
Fosfato monoácido de potasio (K_2HPO_4)	2,0
Acetato de sodio ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$)	5,0
Citrato de amonio ($(NH_3)_3C_6H_5O_7$)	2,0
Sulfato de Magnesio ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0,2
pH= 6,20	

3.1.3 Células eucariotas

Para la obtención de anticuerpos monoclonales, se utilizó la línea celular de mieloma NS0 originada en ratones BALB/c, disponible en el CIDCA. Esta línea celular de linaje B no produce inmunoglobulinas y es deficiente en la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (HPGRT).

Las células NS0 fueron mantenidas en cultivo en medio RPMI suplementado con bicarbonato de sodio, antibióticos (penicilina y estreptomycin) y suero fetal bovino (Gibco, Invitrogen, USA) al 10% en estufa a 37°C, en una atmósfera con 5% de dióxido de carbono (Tabla 2).

Tabla 2. Medio de cultivo para la línea celular NS0

Componentes	RPMI completo
RPMI 1640 (Invitrogen, USA)	1 sobre
Penicilina/Estreptomycin (1000 UI, 1000µg/mL)	13 mL
Aminoácidos no esenciales	13 mL
L-glutamina	
NaHCO ₃	2.0 g
Suero fetal bovino inactivado	120 mL
Agua MiliQ	1000 mL
pH	7.5 +/-0.1

Por otro lado, las células híbridas son capaces de proliferar en un medio de cultivo selectivo que contiene aminopterina (antagonista del ácido fólico) como inhibidor de la síntesis *de novo* de ácidos nucleicos, en el cual las células NS0 no fusionadas no pueden dividirse y mueren. Por lo tanto, los

hibridomas fueron obtenidos y cultivados en medio selectivo RPMI-HAT (Hipoxantina-Aminopterina-Timidina) (Sigma, USA) (Tabla 3). La hipoxantina y la timidina sirven como precursores de bases púricas y pirimidínicas, respectivamente.

Tabla 3. Medio de cultivo selectivo para hibridomas (RPMI-HAT)

Componentes	Cantidad
Hipoxantina-Aminopterina-Timidina (HAT) 50X	2 ml
Suero fetal bovino inactivado	20 ml
Medio RPMI 1640 (con antibióticos y NaHCO ₃)	Csp 100 ml

3.2 Obtención de proteínas de capa-S

3.2.1 Extracción

Se partió de 50 ml de cultivo de 48 hs a 37°C en caldo MRS en aerobiosis, de cada una de las cepas de *L. kefir* seleccionadas. Los cultivos en fase estacionaria fueron centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos, los pellets bacterianos obtenidos se lavaron 2 veces con buffer fosfato-salino (PBS) y fueron posteriormente resuspendidos en el agente de extracción.

Protocolo

- 1) Se centrifugaron durante 10 minutos a 3500 rpm y 10°C, 50 mL de cultivo de *L. kefir* CIDCA 8335, 8343, 8348, 83111 y JCM 5818 en fase estacionaria.
- 2) Se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 10 mL de PBS.
- 3) Se resuspendió el pellet del último lavado en 5 mL de LiCl (JT Baker) 5 M, y se agitó en vórtex durante 7 minutos.
- 4) Se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Se filtró el sobrenadante con filtro de 0,45 µm Steritop (Millipore), y se dializó usando una membrana de celulosa (SpectraPor membrane tube, MWCO 10000- 14000, Spectrum Medical

Industries, California, USA) con agitación suave durante 36 hs contra 6 litros de PBS (2 cambios de 3 L cada uno) a temperatura ambiente.

6) Se determinó la concentración de proteínas en los extractos dializados mediante el método de Bradford (1976).

3.2.2 Separación electroforética de proteínas mediante SDS-PAGE

Se utilizó la técnica desarrollada por Laemmli (1970). Los geles se prepararon con una concentración de acrilamida 12 % p/v en el gel separador y 4% p/v en el gel apilador (Tabla 4). Las corridas electroforéticas se realizaron a voltaje constante (90 V) 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.).

Tabla 4. Preparación de los geles para la separación electroforética por SDS-PAGE

Solución	Gel Separador (12%)	Gel de apilamiento (4%)
Acrilamida/Bis 50% (buffer separador)	2.2 mL	330 µl
SDS 10%	8.3 µl	125 µl
Tris/HCl 0,375M, pH 6,8 (buffer apilador)	-	1.4 ml
H ₂ O	2.96 ml	2.1 ml
TEMED	2 µl	1.7 µl
Persulfato de amonio (catalizador)*	100 mg/ml	330 µl

*El catalizador se agregó al final antes de la siembra.

3.2.3 Revelado con Coomassie Blue Coloidal

1) Se colocó el gel en agitación durante 30 minutos en la solución de fijación 1 (Tabla 5).

2) Se colocó el gel en agitación durante 20 minutos con 100 mL de la solución de fijación 2 (Tabla 5).

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 Coomassie G250 2 % p/v (Tabla 5). Se mantuvo en agitación toda la noche.

4) Al día siguiente, se lavó con agua destilada y se visualizaron las bandas.

Tabla 5. Soluciones para el revelado con Colloidal Blue.

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

3.2.4 Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas de capa S en el dializado de la extracción con LiCl 5M, se utilizó el método de Bradford (Bradford 1976). Este ensayo emplea el colorante hidrofóbico Coomassie Brilliant Blue G-250 cuyas disoluciones acuosas, en presencia de ácido fosfórico, tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente (Tabla 6). El coeficiente de extinción del complejo proteína-colorante a 620 nm es muy elevado, lo cual le da al método una gran sensibilidad. Para determinar la concentración de proteína en una muestra es necesario comparar la absorbancia de dicha muestra, a la longitud de onda mencionada, con una curva patrón.

La curva patrón se realizó a partir de un stock comercial de albúmina bovina de 2 mg/ml (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit).

Tabla 6. 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

3.3 Desarrollo del plan de inmunización

3.3.1 Inmunógeno, adyuvante y vía de inoculación

Para la inmunización se inocularon 3 ratones macho BALB/c, de seis semanas de edad, por vía intraperitoneal. Para la obtención de anticuerpos monoclonales, se utilizaron proteínas de capa-S de la cepa *L. kefiri* CIDCA 83111 (SLP-83111).

A cada ratón se le inyectaron 20 µg del antígeno (SLP-83111) y para potenciar la respuesta inmunológica se utilizó adyuvante de Freund. En la primera inoculación se utilizó adyuvante de Freund completo, mientras que para las siguientes dos inoculaciones se utilizó adyuvante de Freund incompleto (Tabla 7). Cada ratón fue inoculado con una mezcla 1:1 de adyuvante/inmunógeno a razón de 200 µl/ratón en cada oportunidad. Las inoculaciones se realizaron cada 15 días, y luego de 7 días de cada inoculación, se extrajo sangre por punción del plexo submaxilar (sangrías parciales).

Tabla 7. Composición de adyuvantes de Freund completo e incompleto

Adyuvante de Freund incompleto	Adyuvante de Freund completo
Aceite mineral. Agente dispersante.	Aceite mineral. Agente dispersante. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> inactivado por calor

Con el fin de reactivar las células T y B de memoria, se realizó una cuarta inoculación con la misma concentración de proteína (20 µg) pero sin ningún adyuvante, tres días antes de realizar el sacrificio. El animal seleccionado para realizar la fusión fue sacrificado por inhalación de CO₂.

3.3.2 Seguimiento del plan de inmunización

La respuesta de anticuerpos específicos se evaluó mediante titulación por ELISA indirecto contra el antígeno de muestras de suero obtenidas a partir de las sangrías parciales que se fueron realizando luego de 7 días de cada inoculación, las cuales se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos establecidos en el Protocolo 004-00-16 oportunamente presentado ante el CICUAL de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

La titulación de las muestras de suero de los animales inmunizados se realizó siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

- 1) **Sensibilización:** Las placas de ELISA (Greiner-BioOne, Alemania) fueron sensibilizadas con 100 µl de solución de 10 µg/ml de SLP-83111 en PBS. La incubación de las placas se realizó durante una hora a 37°C en cámara húmeda, una vez transcurrido este tiempo se descartó el volumen contenido en cada una de las fosas.
- 2) **Bloqueo:** Para bloquear los sitios de unión a proteínas que hubieran quedado accesibles en las fosas de la microplaca, se eligió una proteína que no presentara reactividad frente a los anticuerpos anti-capas. Se utilizó una suspensión de leche descremada en polvo 3%p/v. El bloqueo se realizó durante una hora a 37°C o bien durante toda la noche a 4°C, en ambos casos en cámara húmeda.
- 3) **Lavado:** Se realizaron 3 lavados con 150 µl de solución de Lavado (PBS + Tween 20 0.05%v/v) por fosa.
- 4) **Anticuerpo primario (antisuero):** se partió de una dilución 1/20 de los sueros a titular y se realizaron diluciones seriadas 1/3 *in situ* (volumen final: 100 µl por fosa). La microplaca se incubó durante una hora a 37°C en cámara húmeda.
- 5) **Lavado:** se realizaron 3 lavados con 150µl de Solución de Lavado por fosa.
- 6) **Anticuerpo secundario:** se utilizó una dilución 1/2000 del anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante (anti-IgG-HRP) (Santa Cruz Biotech, USA) en Solución Diluyente (100 µl por fosa). Se incubó durante una hora a 37°C en cámara húmeda.
- 7) **Revelado:** se utilizó como sustrato una solución de TMB comercial (Wiener Lab) (100 µl por fosa). La reacción enzimática se detuvo con el agregado de 50 µl de H₂SO₄ 1N

en cada fosa. La lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 450nm en un lector de microplacas Infinite F50 (Tecan Trading AG, Suiza).

3.4 Obtención de anticuerpos monoclonales

Para la obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra proteínas de capa-S de *L. kefir*, se utilizó la técnica de hibridación de células somáticas descrita por Galfre y Milstein (1981). Para ello se cultivaron y amplificaron células de una línea de mieloma murino (NS0), las cuales fueron fusionadas con esplenocitos de uno de los ratones inmunizados.

El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con los lineamientos establecidos en el Protocolo 004-00-16 oportunamente presentado ante el CICUAL de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

3.4.1 Fusión

Aquel ratón cuyo suero presentaba el título más elevado de anticuerpos específicos contra el antígeno inoculado fue sacrificado. Se extrajo el bazo en condiciones asépticas y se disgregó en un homogeneizador Potter con solución de lavado RPMI 1640 sin suplementos (ver Tabla 2). La suspensión obtenida fue filtrada con malla plástica de poros 70 micras, y se realizó el recuento de glóbulos blancos totales con líquido de Turk en cámara de Neubauer.

Paralelamente al plan de inmunización, se cultivaron células de la línea NS0 en medio RPMI suplementado con antibióticos y suero fetal bovino (ver Tabla 2) hasta alcanzar un recuento total de aproximadamente 5×10^7 células. El recuento de células NS0 se realizó por coloración vital con azul Tripan en cámara de Neubauer. El sobrenadante de cultivo de estas células (denominado spent) se conservó para su posterior utilización como suplemento del medio de cultivo de los hibridomas ya que contiene gran cantidad de factores de crecimiento y otros compuestos que favorecen el desarrollo celular (Spens y Håggström 2005).

Posteriormente 1.28×10^8 células de bazo se mezclaron con 5.6×10^7 células de la línea NS0 en un tubo cónico tipo falcón de 50 ml y se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante de esta centrifugación fue descartado.

A continuación, se agregó polietilenglicol (PEG) (PM 3500 Dalton) al 50% para favorecer la interacción entre las células y se realizaron lavados respetando el protocolo que se describe a continuación:

- 1) Se agregó 1 ml de PEG durante un minuto.
- 2) Se agitó la suspensión celular durante un minuto.
- 3) Se agregaron 2 ml de RPMI 1640 sin suplementos, lentamente, durante 2 minutos.
- 4) Se agregaron 5 ml de RPMI 1640 sin suplementos, durante 2-3 minutos.
- 5) Se agregaron 10 ml de RPMI 1640 sin suplementos, rápidamente.

Nota: todas las etapas se realizaron con agitación continua sobre un baño de agua a 37°C.

Una vez completado el protocolo de fusión se adicionó medio RPMI 1640 sin suplementos hasta completar un volumen final de 50 ml y se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el paquete celular obtenido fue resuspendido en 50 ml de medio RPMI-HAT (ver Tabla 3) y distribuido en 5 placas de 96 fosas (Jet Biofil, China) a razón de 100 µl por fosa. Las placas de cultivo fueron mantenidas en estufa a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

3.4.2 Seguimiento de hibridomas y clones

A los 7 días de realizada la fusión, las fosas fueron alimentadas con 100 µl de medio RPMI-HAT fresco. Mediante observaciones microscópicas se evaluó el crecimiento celular.

A los 15 días de realizada la fusión se inició la etapa de screening en busca de hibridomas productores de anticuerpos específicos. Mediante observación microscópica se seleccionaron aquellas fosas que presentaban desarrollo celular (células viables). El sobrenadante de cultivo de estas fosas fue analizado mediante ELISA indirecto contra proteínas de capa-S de la cepa CIDCA 83111.

Aquellos hibridomas cuyos sobrenadantes de cultivo presentaron reactividad frente a la proteína de capa-S fueron amplificados y clonados por dilución límite.

3.4.3 Selección de hibridomas productores de Anticuerpos monoclonales (AcMo) anti-SLP 83111

Para realizar el screening o selección de los hibridomas productores de AcMo específicos, se utilizó la técnica de ELISA indirecto.

Fueron seleccionadas aquellas fosas que presentaron crecimiento celular mediante observación microscópica y se utilizó como control positivo el suero del ratón inmunizado.

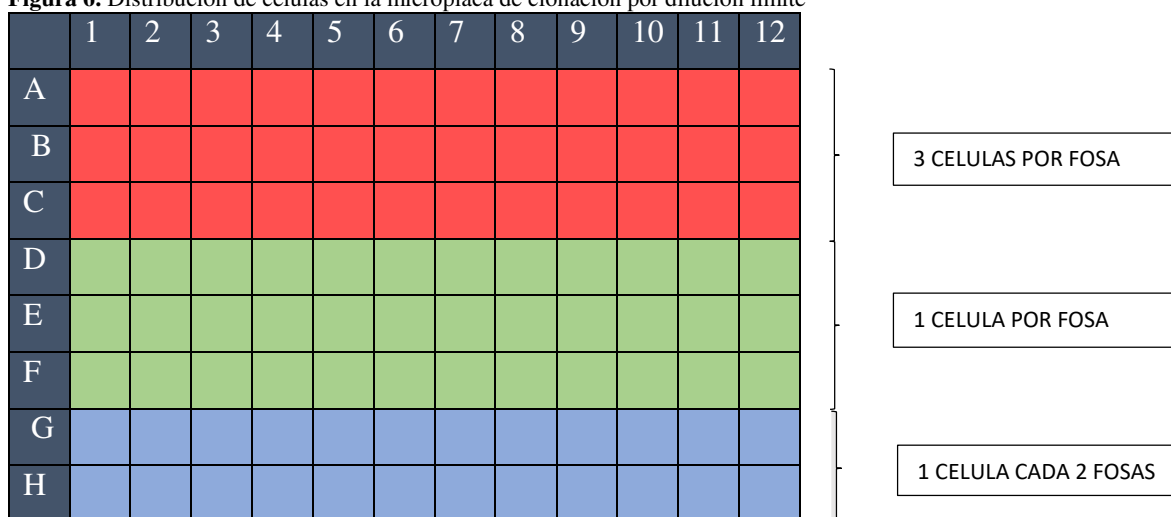
Protocolo:

- 1) **Sensibilización:** Las microplacas Microlon 600 (GBO, Alemania) fueron sensibilizadas con 100 µl de soluciones de 10 µg/ml de la proteína SLP-83111 en PBS. La incubación de estas placas se realizó durante una hora a 37 °C en cámara húmeda. Una vez transcurrido ese tiempo, se descartó el volumen contenido en cada una de las fosas.
- 2) **Bloqueo:** Se utilizó una suspensión de leche descremada en polvo 3% p/p en PBS (200 µl por fosa). El bloqueo se realizó durante una hora a 37°C o bien durante toda la noche a 4°C, en ambos casos en cámara húmeda.
- 3) **Lavado:** Se realizaron 3 lavados con 150 µl de Solución de Lavado por fosa.
- 4) **Anticuerpo primario:** Se ensayaron los sobrenadantes de cultivo a razón de 100 µl por pocillo de las fosas seleccionadas mediante observación microscópica. La incubación se realizó durante una hora a 37 °C en cámara húmeda.
- 5) **Lavado:** Se realizaron 3 lavados con 150 µl de Solución de Lavado por fosa.
- 6) **Anticuerpo secundario:** Se utilizó una dilución 1/2000 del anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante (anti-IgG-HRP) (Santa Cruz Biotech, USA) en Solución Diluyente (leche descremada en polvo 1%p/v) a razón de 100 µl por fosa. Se incubó durante una hora a 37°C.
- 7) **Revelado:** Se utilizó como sustrato OPD. La lectura de los resultados se realizó a una longitud de onda de 492 nm.

3.4.4 Clonación por dilución límite

Para realizar la clonación por dilución límite de los hibridomas cuyo sobrenadante de cultivo presentó reactividad frente a la proteína de capa-S de la cepa *L. kefir* CIDCA 83111, se procedió como se describe a continuación. Se realizó el recuento de células viables por coloración vital con azul Tripan y se efectuó la dilución adecuada de forma tal de obtener una suspensión celular de 5 células/ μ l. Cincuenta μ l de esta suspensión, conteniendo aproximadamente 250 células, fueron diluidos con 4,6 ml de medio fresco para células RPMI-HAT suplementado con el sobrenadante de cultivo Spent al 10%. Posteriormente, 3,6 ml de esta suspensión se distribuyeron a razón de 100 μ l por fosa en las primeras 3 filas (filas A, B y C) de una placa de cultivo de 96 wells. De acuerdo a las diluciones realizadas era de esperar que en esas fosas desarrollarán alrededor de 5 células por fosa (Figura 6).

Figura 6. Distribución de células en la microplaca de clonación por dilución límite



Un ml de la suspensión celular remanente fue diluido con 4 ml (dilución 1:5) de medio RPMI-HAT fresco suplementado con Spent. Nuevamente 3,6 ml de esta suspensión fueron distribuidos en las filas D, E y F de la placa de cultivo de 96 wells a razón de 100 μ l por fosa. Teniendo en cuenta las diluciones realizadas se esperaba obtener un desarrollo de un hibridoma por fosa. Finalmente, el volumen remanente (1,4 ml) fue diluido a la mitad y la suspensión fue distribuida en las filas G y H a razón de 100 μ l por fosa, por lo que se espera el desarrollo de 1 célula cada 2 fosas.

3.4.5 Criopreservación de hibridomas

Aquellos hibridomas cuyos sobrenadantes de cultivo presentaron reactividad frente a las proteínas de capa-S fueron conservados empleando dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector.

Para ello $1-2 \times 10^6$ células fueron cosechadas y resuspendidas en Suero fetal bovino en DMSO al 10% y almacenadas en tanque con N₂ líquido a -196°C.

3.5 Caracterización de anticuerpos monoclonales

Se analizó la reactividad de los AcMo obtenidos frente a SLP de diferentes cepas de *L. kefir* disponibles en el laboratorio. La elección de las cepas se realizó considerando las diferencias encontradas en la secuencia de aminoácidos de sus SLP, por lo que se seleccionó una cepa de cada uno de los grupos previamente identificados (Malamud *et al.* 2017): SLP-5818, SLP-8335, SLP-8343, SLP-8348 y SLP-83111.

La reactividad se analizó mediante ELISA indirecto, Dot-Blot e Inmunoblotting.

3.5.1 ELISA indirecto

Para realizar el seguimiento de la reactividad de los clones, el ELISA se realizó con el mismo protocolo descrito en el ELISA de screening (Punto 3.4.3), a excepción del paso 1, donde las microplacas fueron sensibilizadas con las diferentes SLPs (SLP-5818, SLP-8335, SLP-8343, SLP-8348 y SLP-83111).

3.5.2 Inmunoblotting

Los geles de poliacrilamida sembrados con 5 a 10 μg de proteína/calle fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa (NitroME, MSI) en una celda Transblot System (BioRad, USA) con buffer de transferencia (Towbin, 1979). La transferencia se llevó a cabo a 250 mA durante 45 minutos. Posteriormente se colorearon las membranas con una solución de Ponceau S al 0.2% en TCA 3% durante 5 minutos, y fueron luego decoloradas con sucesivos lavados con agua destilada.

Las membranas fueron incubadas con solución de bloqueo (suspensión de leche descremada en polvo 3% p/p en PBS) durante 1 hora a 37°C. Luego de un ciclo de lavado, se realizó la incubación con los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas 1B9 y 3A12 durante 2 horas a 37°C.

Después de un nuevo ciclo de lavado, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante (anti-IgG-HRP) (Santa Cruz Biotech, USA) diluido 1/2000 durante 1h a 37°C.

El revelado se llevó a cabo utilizando 4-cloronaftol como sustrato (ver Tablas 8 y 9).

Tabla 8. Solución de sustrato de peroxidasa para IB.

Componentes	Cantidad
TBS	15 ml
4-cloronaftol	9 mg
Metanol	3 ml
H ₂ O ₂ 100 volúmenes	12 μl

Tabla 9. Composición del buffer TBS 5X

Componentes	Concentración
NaCl	0.14M
KCl	0.1 M
Tris-hidroximetil-aminometano	2 mg/ml
pH= 8.4	1 $\mu\text{l/ml}$

3.5.3 Dot-Blot

Esta técnica es una simplificación de la técnica de Inmunoblotting (o Western blotting) que permite detectar la presencia de una determinada proteína en una muestra compleja. A diferencia del Inmunoblotting, esta técnica no brinda información acerca del tamaño de los antígenos, sin embargo, ofrece la ventaja de ser más simple y ahorrar una gran cantidad de tiempo.

Esta técnica fue utilizada en el presente trabajo para caracterizar la reactividad de los anticuerpos monoclonales obtenidos contra bacterias enteras y proteínas de capa-S extraídas de las diferentes cepas de *L. kefir*.

Protocolo

Se sensibilizaron membranas de nitrocelulosa (NitroME, MSI) con 1 aplicación de 3 μ l de extracto antigénico (SLP) o de la suspensión bacteriana, dejando secar las membranas en la estufa a 37°C luego de la aplicación.

Las etapas siguientes (bloqueo, incubación con los sobrenadantes de los hibridomas, incubación con anticuerpo conjugado y revelado) se llevaron a cabo siguiendo el protocolo oportunamente descrito para el ensayo de inmunoblotting (Punto 3.5.2).

4. Resultados y Discusión

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

La obtención de proteínas de capa-S en forma soluble se realizó mediante un tratamiento con LiCl 5M (Punto 3.2) a partir de los cultivos en medio líquido de las cepas *L. kefir* CIDCA 8335, 8343 y 83111 (cepas no agregantes), CIDCA 8348 (cepa agregante) y JCM 5818 (cepa no agregante) (Figura 7).

Figura 7. Tubos de cultivo en caldo MRS de distintas cepas de *L. kefir*.



La eficacia del tratamiento elegido fue evaluada mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Como se observa en la Figura 8, a partir de este tratamiento se obtiene una solución en la cual la proteína mayoritaria es la capa-S con un PM aparente coincidente con los previamente reportados por el grupo de trabajo (Mobili *et al.* 2009, Malamud *et al.* 2017).

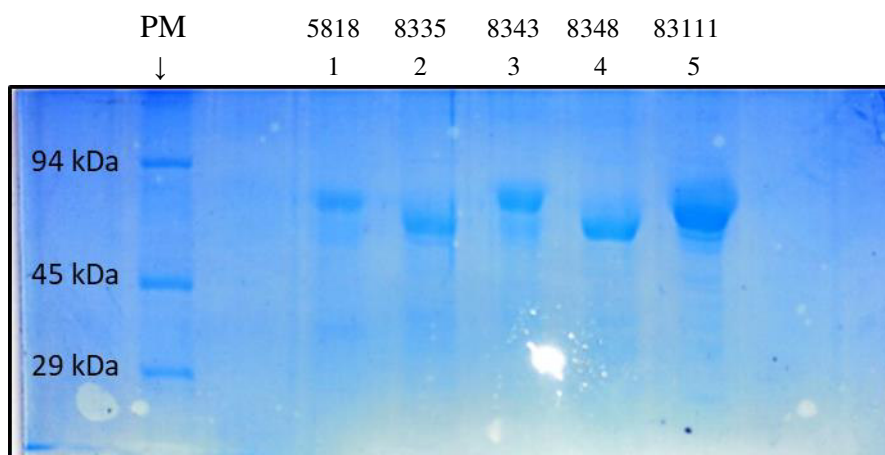


Figura 8=SDS-PAGE. Extracción de proteínas de capa-S por tratamiento con LiCl 5M. Perfil electroforético de la cepa *L. kefír* 8335, 8343, 8348, 83111 y JCM 5818.

4.1.1 Cuantificación de proteína soluble

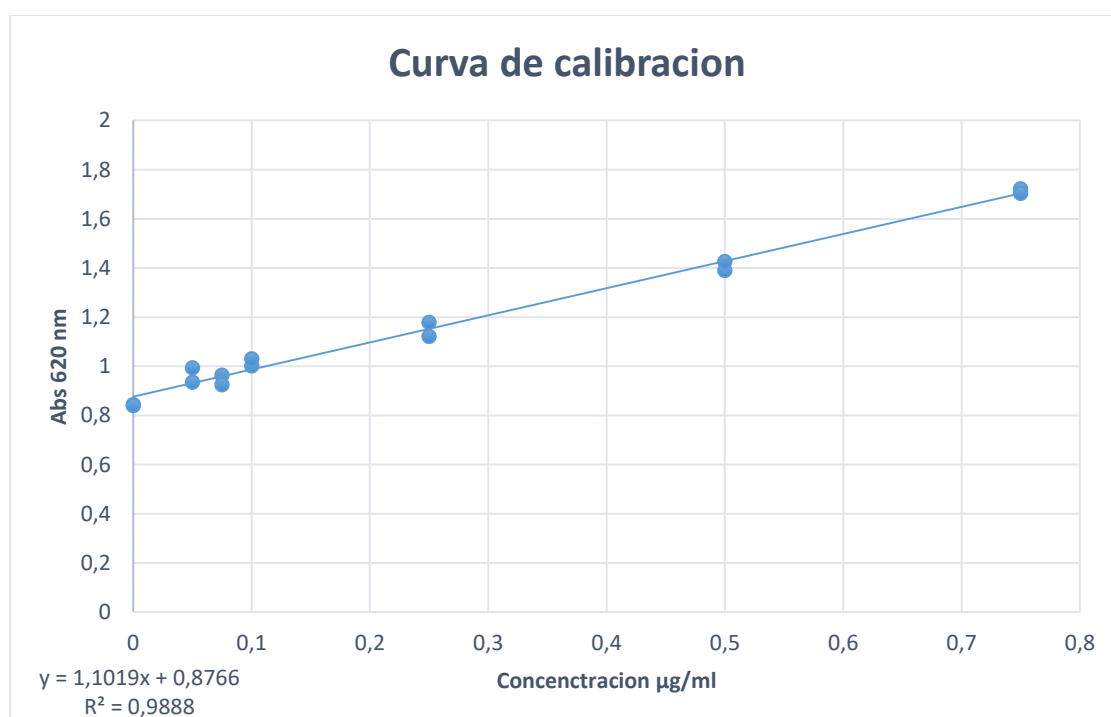
La determinación de la concentración de proteína total en los extractos de capa-S dializados contra PBS se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford. Se cuantificaron muestras de capa-S extraídas de las cepas mencionadas anteriormente, de las cuales la cepa CIDCA 83111 fue la que se empleó como inmunógeno.

Se realizó una curva de calibración a partir de una solución patrón de albúmina comercial. En la Tabla 10 y en la Figura 9, se muestran los resultados obtenidos para esta curva de calibración.

Tabla 10. Cuantificación de proteína por Bradford

Curva de calibración ($\mu\text{g/ml}$)	Abs-1	Abs-2
0	0,8445	0,8403
0,05	0,9354	0,9933
0,075	0,9634	0,9247
0,1	1,0015	1,0302
0,25	1,1216	1,1787
0,5	1,3892	1,4258
0,75	1,7216	1,7032

Figura 9. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas por Bradford.



Para determinar la concentración de proteína total en los extractos de capa-S se midió la absorbancia de las muestras en las mismas condiciones que fue realizada la curva de calibración. En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos para las cepas de *L. kefir* CIDCA 8335, 8343, 8348, 83111 y JCM 5818. La concentración de proteína total varía desde aproximadamente 20 $\mu\text{g/ml}$ en la cepa JCM 5818

hasta aproximadamente 270 µg/ml en la cepa CIDCA 83111. Estas diferencias en la concentración de SLP extraída entre las diferentes cepas ya han sido observadas previamente en el grupo de trabajo.

Tabla 11. Determinación de la concentración de proteína total en los extractos.

SLP	5818	8335	8343	8348	83111
Abs-1	0.9003	0.9326	0.9457	0.9655	1.1943
Abs-2	ND*	0.9493	0.9949	1.0199	1.1521
µg/ml	21	58±5	85±7	105±12	269±10

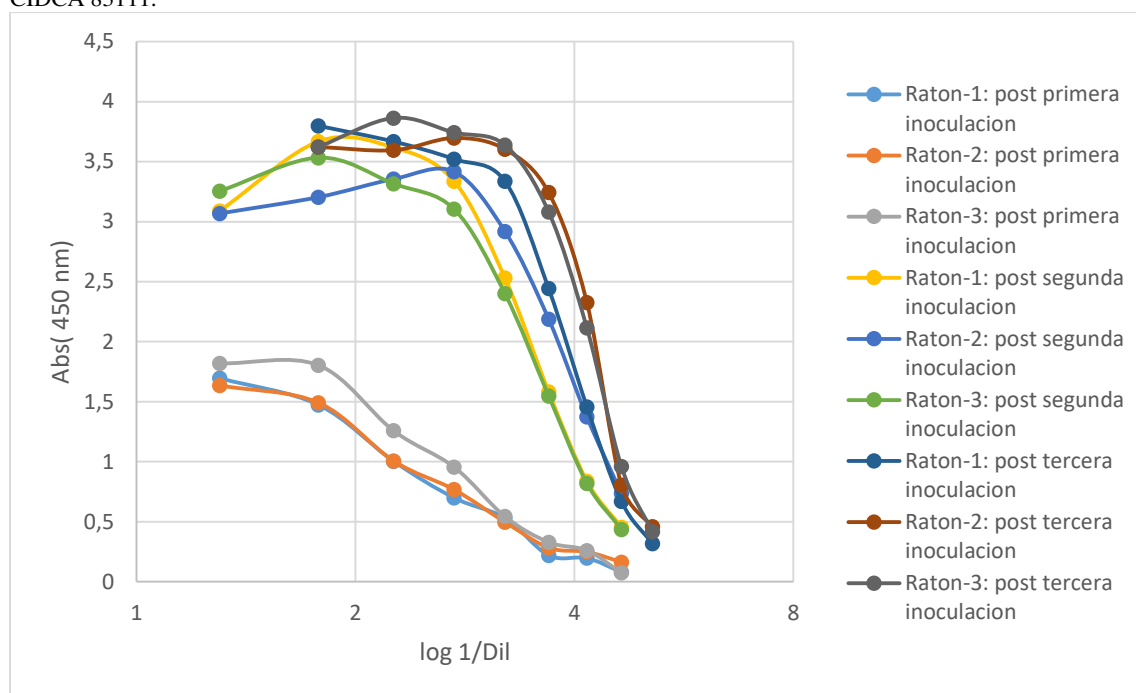
*ND: no detectable.

4.2 Obtención de anticuerpos monoclonales

4.2.1 Seguimiento del plan de inmunización

El plan de inmunización se inició con tres ratones macho BALB/c de seis semanas de edad. La titulación de los sueros contra proteína de capa-S de la cepa *L. kefir* CIDCA 83111 se siguió mediante ELISA indirecto. Las curvas de titulación correspondientes a las diferentes sangrías post-inoculación se muestran en la Figura 10. En ellas se puede apreciar un aumento de la respuesta de anticuerpos IgG específicos a medida que avanza el plan de inmunización, en todos los ratones.

Figura 10. Seguimiento plan de inmunización de los 3 ratones. Titulación de antisueros. Antígeno: proteína de capa-S de la cepa CIDCA 83111.



A partir de los resultados obtenidos, el ratón 2 fue seleccionado para continuar el protocolo de obtención de anticuerpos monoclonales debido a que presentaba un título mayor de anticuerpos específicos contra el antígeno luego de la tercera inoculación.

4.2.2 Primera fusión

Luego de realizadas las tres inmunizaciones y en base a la titulación de anticuerpos anti-capa-S de la cepa elegida, se procedió al sacrificio y posterior extracción del bazo del ratón 2 en condiciones asépticas. Los esplenocitos fueron fusionados con células de mieloma NS0, distribuidos en 5 placas de 96 pocillos e incubados tal cómo se describe en la sección 3.4.1 de materiales y métodos.

Como resultado de la fusión, se observó mediante el uso de un microscopio óptico invertido, desarrollo celular en aproximadamente el 1,45% de las fosas de cultivo.

La etapa de screening arrojó como resultado que siete de los sobrenadantes de cultivo presentaban reactividad contra proteínas de capa-S de las cepas *L. kefir* CIDCA 83111. En base a estos resultados se seleccionaron los hibridomas de las fosas 2C9, 2F6, 4B8, 4E3, 4F10, 4F11 y 5D5. Esta elección se basó en el hecho de que los sobrenadantes de cultivo de estas fosas presentaban una mayor reactividad

(mayor absorbancia) frente a la proteína de capa-S elegida. A continuación, se procedió a realizar la amplificación de los hibridomas seleccionados anteriormente.

En la figura 11 se muestra una fotografía tomada a través del microscopio óptico invertido de uno de los hibridomas obtenidos.



Desafortunadamente, una vez amplificados los sobrenadantes de cultivo, los mismos no arrojaron resultados positivos en los ensayos de ELISA indirecto, por lo que se decidió hacer una nueva fusión con el bazo del ratón 3 en las mismas condiciones que el ratón 2.

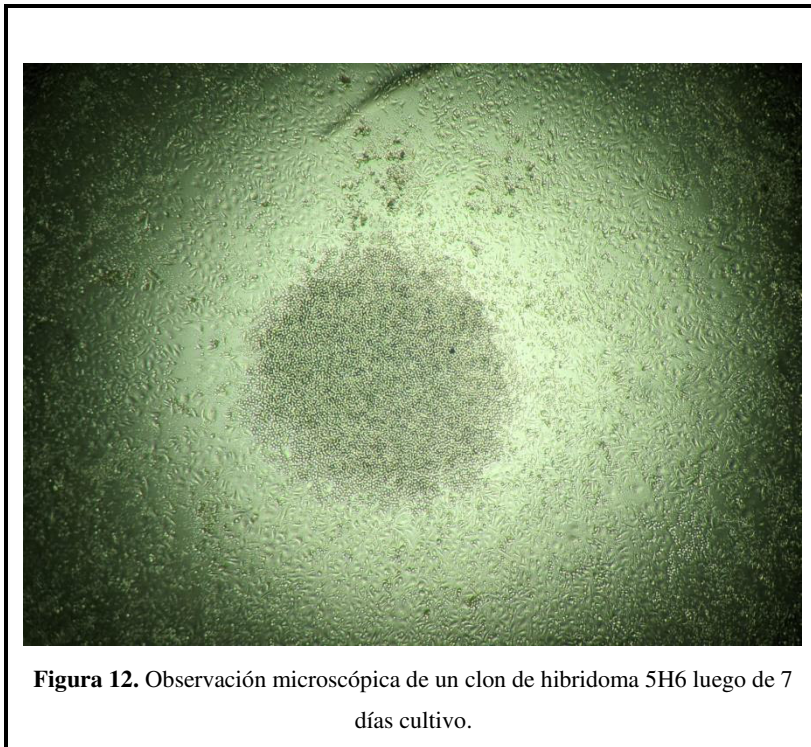
4.2.3 Segunda fusión

Como resultado de la segunda fusión, se observó desarrollo celular en aproximadamente el 95% de las fosas de cultivo.

En este caso, el primer screening arrojó como resultado una gran cantidad de sobrenadantes positivos, por lo que se decidió continuar con aquellos que presentaron una DO $>2,7$ los que sumaban un total de 52 hibridomas. Las fosas seleccionadas fueron: 1B9, 1C6, 1E1, 1F2, 2A2, 2B11, 2C11, 2D5, 2E2, 2F11, 2H4, 2H9, 2H12, 3A11, 3A12, 3B7, 3B9, 3B10, 3C2, 3C7, 3C8, 3C10, 3D8, 3E3, 3E4, 3E11, 3F6, 3G1, 3G7, 3H2, 3H4, 4A2, 4A4, 4B1, 4B4, 4B7, 4B8, 4B10, 4C7, 4E12, 4F2, 4F4, 4H4, 5B10, 5C12, 5D3, 5E1, 5E3, 5E6, 5E10, 5F10, 5G8, 5H5 y 5H6.

Además, estas fosas presentaban un mejor crecimiento celular comparado con otras que también habían presentado reactividad frente al antígeno mencionado. A continuación se procedió a realizar la amplificación.

En la Figura 12 se muestra una fotografía tomada a través del microscopio óptico invertido de uno de los hibridomas de la segunda fusión.



Pasados los 7 días se procedió a realizar un nuevo screening mediante ELISA indirecto, el cual arrojó como resultado que doce (12) de los sobrenadantes de cultivo presentan reactividad contra SLP-83111. En base a los resultados obtenidos se seleccionaron los hibridomas de las fosas 1B9, 1C6, 1E1, 1F2, 2D5, 3A12, 5E6, 5E10, 5F10, 5G8, 5H5 y 5H6. Esta selección se basó en el hecho de que los sobrenadantes de cultivo de estas fosas presentaban una mayor reactividad (mayor absorbancia) frente a SLP-83111. A continuación, se seleccionaron los hibridomas 1B9, 3A12 y 5H6 para realizar la clonación por dilución límite.

4.3 Caracterización de la reactividad de los Ac. Monoclonales.

El perfil de reactividad de los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas 1B9, 1C6, 1E1, 1F2, 3A12, 5E6, 5E10 y 5H6 fueron analizados mediante Inmunoblotting, Dot-Blot y ELISA indirecto, con el fin de evaluar la reactividad frente a proteínas de capa-S de cepas diferentes a las empleadas en la inmunización.

4.3.1 Reactividad cruzada entre proteínas de capa-S de *L. kefir*

Se evaluó la reactividad de los sobrenadantes de los hibridomas seleccionados frente a las SLP de las cepas de *L. kefir* CIDCA 8335, 8343, 8348, 83111 y JCM 5818. Los anticuerpos monoclonales 1B9, 1C6, 1E1, 1F2, 3A12, 5E6, 5E10 y 5H6 presentaron reactividad contra SLP-5818 y SLP-83111. Por otro lado, los anticuerpos 1F2, 3A12 y 5H6 presentaron reactividad contra las cinco cepas de *L. kefir* utilizadas en este ensayo, aunque se observaron algunas diferencias entre ellos, tal como se muestra en la Figura 13. En particular, el sobrenadante del hibridoma 3A12 mostró una muy buena reactividad contra todas las SLP ensayadas, lo que sugiere que el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal producido está conservado en las SLP de las cepas analizadas. En el caso de los hibridomas 1F2 y 5H6, se observó una menor reactividad frente a la SLP-8348 con respecto al resto de las proteínas estudiadas, lo que podría deberse, o bien a diferencias estructurales (de secuencia o conformacionales) en el epítipo reconocido por dichos anticuerpos, o a una menor accesibilidad al mismo en la SLP-8348.

El hecho de que todos los anticuerpos monoclonales seleccionados muestren reactividad frente a la SLP-83111 y la SLP-5818, sugiere la presencia de una o más regiones conservadas entre ambas proteínas, por lo que podría llegar a identificarse el epítipo específico comparando las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas. De todas maneras, no podría descartarse la posibilidad de que hubiese epítipos conformacionales muy similares entre ambas proteínas, que pudiesen explicar el reconocimiento de ambos antígenos por alguno o algunos de los anticuerpos monoclonales estudiados.

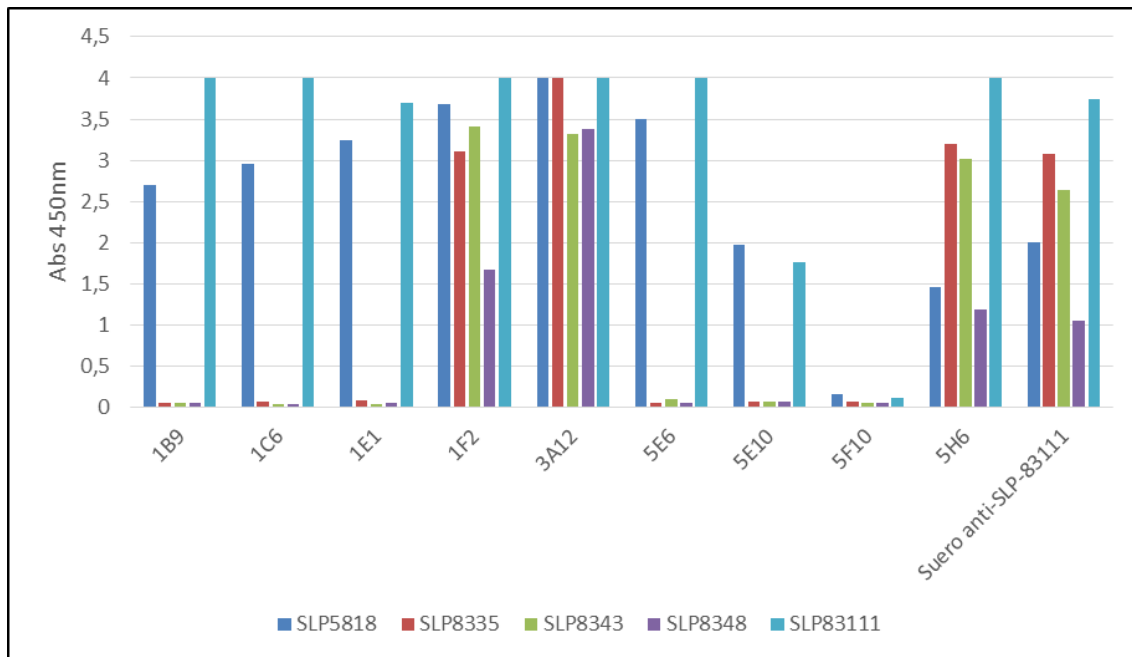


Figura 13. Ensayo de reactividad cruzada mediante ELISA indirecto.

El trabajo previamente publicado por Mobili et al. (2009), muestra, entre otros resultados, la reactividad mediante ELISA indirecto de 2 anticuerpos monoclonales (designados como 1F8 y 5F8) por inmunización con la proteína de capa S de la cepa *L. kefir* CIDCA 8348. Allí se observa que el AcMo 1F8 es capaz de reconocer las SLP de 11 cepas de *L. kefir*, provenientes tanto de cepas agregantes (CIDCA 8321, 8325, 8345, 8347, 8348 y 83115) como no agregantes (CIDCA 8335, 8344, 83113, JCM 5818 y ATCC 8007), mientras que el AcMo 5F8 solo presenta reactividad frente a las SLP provenientes de las cepas agregantes. En base a este antecedente, sería interesante analizar la reactividad los AcMo obtenidos en este trabajo frente a las SLP extraídas a partir de todas las cepas de *L. kefir* disponibles en el laboratorio.

4.3.2. Reactividad contra proteínas de capa-S y bacterias enteras

Con el objetivo de analizar los perfiles de reactividad frente a las SLP y a las bacterias enteras, se realizó un ensayo de Dot-Blot. Los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas 1B9, 1C6, 1E1, 1F2, 3A12, 5E6 y 5H6 se incubaron con las bacterias enteras de las cepas *L. kefir* CIDCA

8335, 8343, 8348, 83111 y JCM 5818, y con las distintas proteínas de capa-S (SLP-8335, SLP-8343, SLP-8348, SLP-83111 y SLP-5818).

Asimismo, se incluyó una muestra de SLP 83111 recombinante (83111R*) expresada en la bacteria *E. coli*. Los resultados de estos ensayos se muestran en las Figuras 14 a 19.

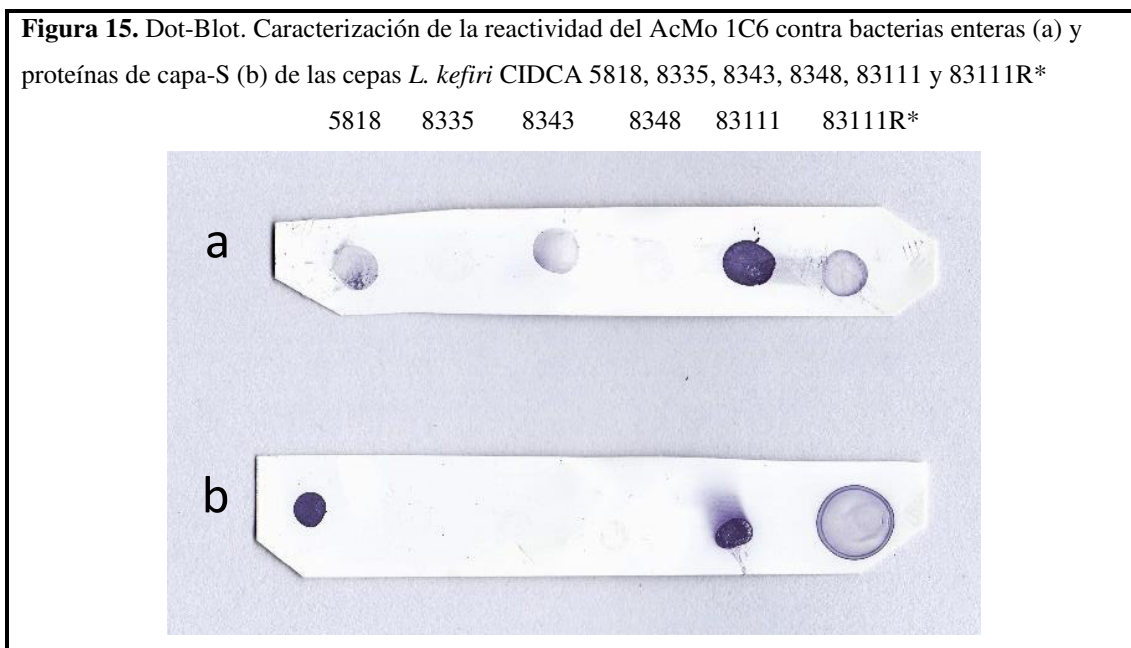
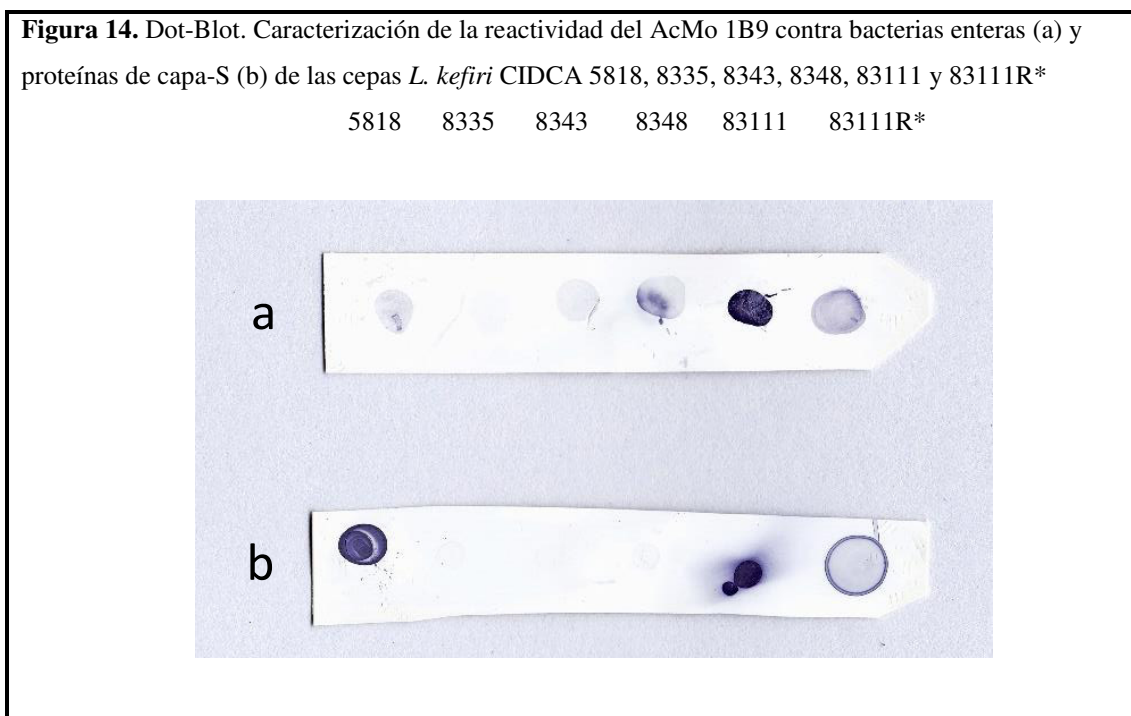


Figura 16. Dot-Blot. Caracterización de la reactividad del AcMo 1E1 contra bacterias enteras (a) y proteínas de capa-S (b) de las cepas *L. kefir* CIDCA 5818, 8335, 8343, 8348, 83111 y 83111R*

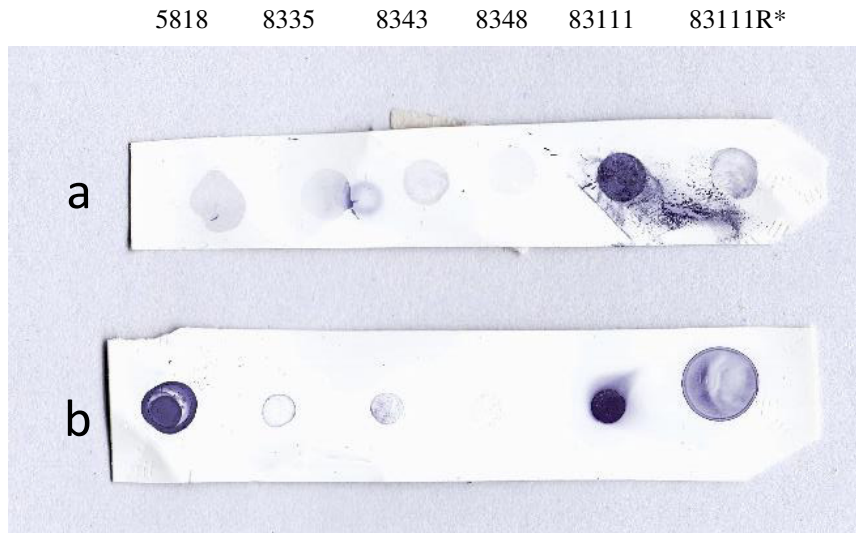


Figura 17. Dot-Blot. Caracterización de la reactividad del AcMo 3A12 contra bacterias enteras (a) y proteínas de capa-S (b) de las cepas *L. kefir* CIDCA 5818, 8335, 8343, 8348, 83111 y 83111R*

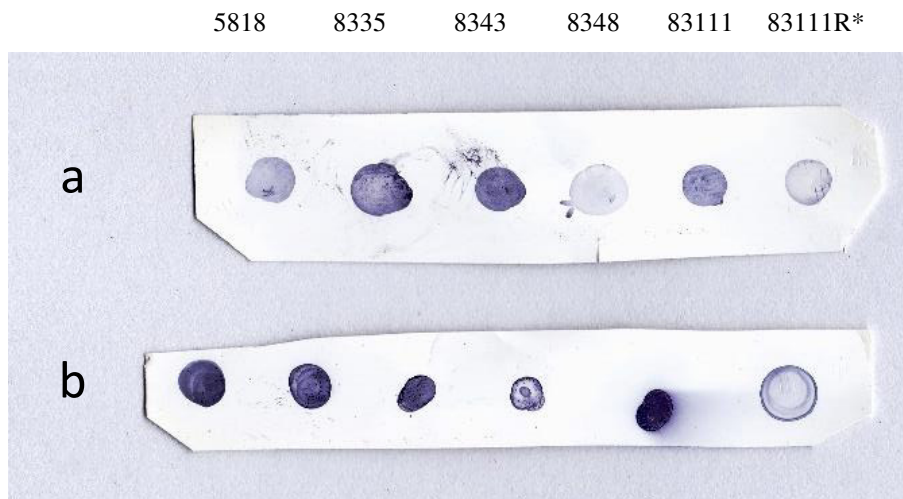


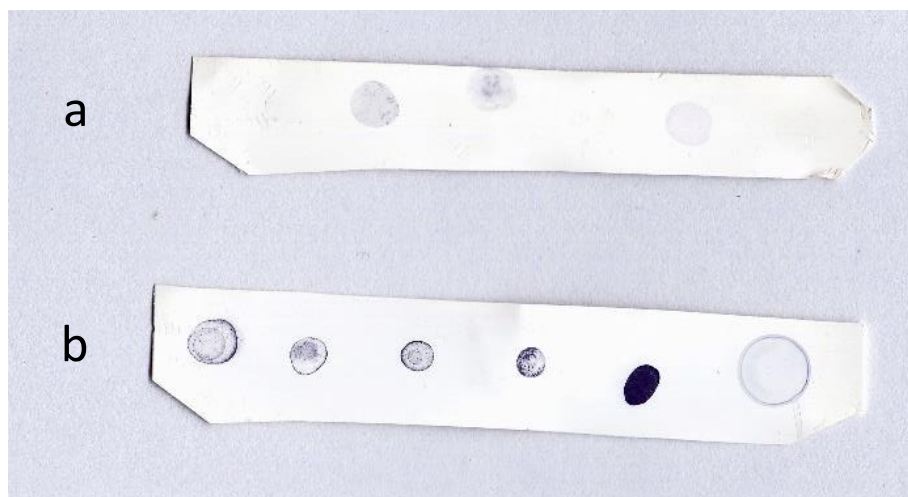
Figura 18. Dot-Blot. Caracterización de la reactividad del AcMo 5E6 contra bacterias enteras (a) y proteínas de capa-S (b) de las cepas *L. kefir* CIDCA 5818, 8335, 8343, 8348, 83111 y 83111R*

5818 8335 8343 8348 83111 83111R*



Figura 19. Dot-Blot. Caracterización de la reactividad del AcMo 5H6 contra bacterias enteras (a) y proteínas de capa-S (b) de las cepas *L. kefir* CIDCA 5818, 8335, 8343, 8348, 83111 y 83111R*

5818 8335 8343 8348 83111 83111R*



El ensayo de Dot-Blot nos permitió hacer una segunda evaluación de la reactividad de los anticuerpos monoclonales obtenidos, analizando su capacidad de reconocimiento frente a las bacterias enteras y frente a las diferentes SLPs.

Los perfiles de reactividad que presentaron los distintos hibridomas frente a las SLP son coincidentes a los que se obtuvieron al realizar el ensayo de ELISA indirecto, mientras que en el ensayo frente a las bacterias enteras, se observaron algunas diferencias, como es el caso de los anticuerpos monoclonales 5E6 y 5H6. Estos AcMo no presentan reactividad frente a todas las bacterias enteras, pero sí frente a las SLP extraídas, lo que podría deberse a que no esté accesible o expuesto el epítipo de reconocimiento cuando las SLP están ensambladas en la superficie bacteriana. Por otro lado, el anticuerpo monoclonal 3A12 presenta reactividad tanto frente a las bacterias enteras como frente a los extractos de proteínas de capa-S utilizados en este ensayo.

De todas formas, y a pesar de las diferencias encontradas, estos resultados indican que por un lado, la mayoría de los anticuerpos monoclonales obtenidos a partir de la inmunización con la proteína de capa-S de la cepa *L. kefir* CIDCA 83111 son capaces de reconocer a las proteínas superficiales expresadas en las diferentes cepas de *L. kefir*, y a su vez también reconocen al antígeno sobre la bacteria entera, lo que los transforma en herramientas de gran utilidad para la detección inmunoquímica de estos lactobacilos en diferentes entornos.

4.3.3 Reactividad por Immunoblotting

Al análisis de la reactividad de los anticuerpos monoclonales obtenidos mediante ELISA indirecto y Dot-Blot, se le sumó un ensayo de Immunoblotting empleando los sobrenadantes de los hibridomas 1B9 y 3A12. En las figuras 20 y 21 se muestran los resultados obtenidos.

Figura 20. Inmunoblotting. Caracterización de la reactividad del AcMo 1B9 contra proteínas de capa-S de las cepas *L. kefir* CIDCA 8335, 8343,8348, 83111 y JCM 5818

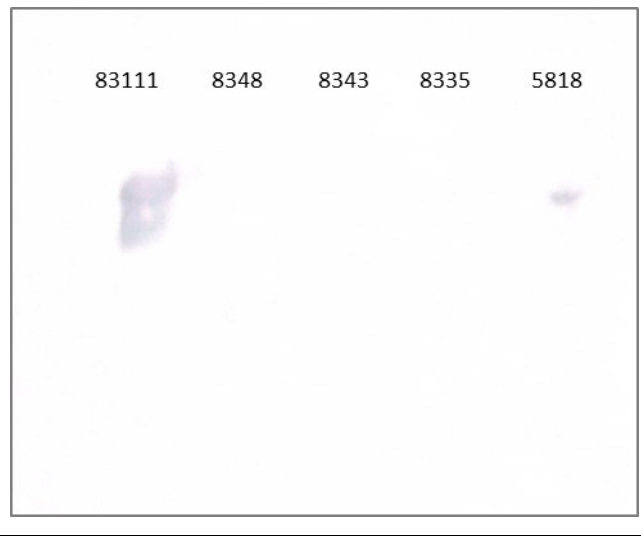
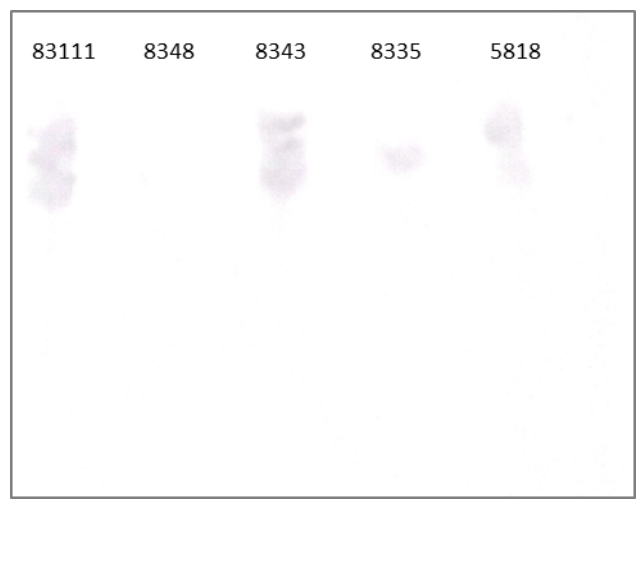


Figura 21. Inmunoblotting. Caracterización de la reactividad del AcMo 3A12 contra proteínas de capa-S de las cepas *L. kefir* CIDCA 8335, 8343,8348, 83111 y JCM 5818



En coincidencia con los resultados obtenidos en el ELISA indirecto y el Dot-Blot, el anticuerpo monoclonal 1B9 presentó reactividad contra las SLP-83111 y SLP-5818, mientras que el anticuerpo monoclonal 3A12 presentó reactividad frente a las SLP de las cepas CIDCA 8335, 8343, 83111 y JCM 5818. En este último ensayo no pudo detectarse reactividad frente a la SLP-8348, lo cual podría deberse a una menor cantidad de proteína total en ese extracto o a la desnaturalización del epítipo debido al tratamiento con SDS. Para el resto de las SLP ensayadas, los resultados del Inmunoblotting permiten

concluir que los epítopes reconocidos por los anticuerpos monoclonales estudiados (1B9 y 3A12) se mantienen conservados a pesar del tratamiento de desnaturalización proteica con SDS.

5. Conclusiones

- ✚ Durante el desarrollo del presente trabajo final se alcanzaron los objetivos propuestos inicialmente. Se logró la obtención de 6 hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra proteína de capa-S de *L. kefir*.

Los anticuerpos monoclonales presentan reactividad mediante ELISA indirecto, Dot-Blot e Immunoblotting. Asimismo, los anticuerpos obtenidos son capaces de reconocer tanto a las proteínas de capa-S aisladas como a las bacterias enteras de diversas cepas de la especie *L. kefir*. Estos resultados indican que los anticuerpos monoclonales obtenidos podrán ser utilizados en futuros ensayos para detectar o cuantificar bacterias o proteínas de capa-S de las distintas cepas utilizadas en el presente trabajo. Además, considerando la diversidad estructural reportada previamente para las proteínas de capa-S, la obtención de anticuerpos monoclonales con capacidad de reconocer diferentes epítopes, implica que podrían utilizarse como herramientas de detección y/o caracterización en distintos tipos de ensayos.

Bibliografia

Assandri MH, Malamud M, Trejo FM, Serradell MA. S-layer proteins as immune players: tales from pathogenic and non-pathogenic bacteria (2023) *Current Research in Microbial Sciences*, 4:100187.

Bengoa AA, Iraporda C, Garrote GL, Abraham AG. Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk (2019) *Journal of Applied Microbiology*, 126, 686-700.

Bolla PA, Huggias S, Serradell MA, Ruggera JF, Casella ML. Synthesis and catalytic application of silver nanoparticles supported on *Lactobacillus kefir* S-layer proteins (2020a) *Nanomaterials (Basel)*, 10, 2322.

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

Bolla PA, Serradell MA, Casella ML, Peruzzo PJ. Nanoarchitectonics based on S-layer proteins: design of noble metal nanoparticles arrangements and nanostructured materials, chapter 4 in *Concepts and Design of Materials Nanoarchitectonics* (2022) Ed. Omar Azzaroni & Katsuhiko Ariga, Royal Society of Chemistry, UK, 82-105.

Bolla PA, Serradell MA, De Urza PJ, De Antoni GL. Effect of freeze-drying on viability and probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir (2011) *Journal of Dairy Research*, 78, 15-22.

Bosch A, Golowczyc MA, Abraham AG, Garrote GL, De Antoni GL, Yantorno O. Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy (2006) *International Journal of Food Microbiology*, 111, 280-287.

Bradford MM. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding (1976) *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Carasi P, Ambrosio NM, De Antoni GL, Bressollier P, Urdaci MC, Serradell MA. Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus (2014) *Journal of Dairy Research*, 81, 16-23.

Carasi P, Malamud M, Serradell MA. Potentiality of food-isolated *Lentilactobacillus kefir* strains as Probiotics: state-of-art and perspectives (2021) *Current Microbiology*, 79, 21.

Carasi P, Racedo SM, Jacquot C, Romanin DE, Serradell MA, Urdaci MC. Impact of kefir derived *Lactobacillus kefir* on the mucosal immune response and gut microbiota (2015) *Journal of Immunological Research*, 361604.

Carasi P, Trejo FM, Pérez PF., De Antoni GL. Serradell MA Surface proteins of *Lactobacillus kefir* antagonize in vitro cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxins (2012) *Anaerobe*, 18, 135-142.

Cavallero G, Malamud M, Casabuono AC, Serradell MA, Couto AS. A glycoproteomic approach reveals that a S-layer glycoprotein of *Lactobacillus kefir* CIDCA 83111 is O- and N-glycosylated (2017) *Journal of Proteomics*, 162, 20-29.

Claus H, Akça E, Debaerdemaeker T, Evrard C, Declercq JP, Robin Harris J, Schlott B, König H. Molecular organization of selected prokaryotic S-layer proteins (2005) *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 731-743.

- Corthésy B, Gaskins HR, Mercenier A. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system (2007) *Journal of Nutrition*, 137, 781S-790S.
- Cunningham M, Azcarate-Peril MA, Barnard A, Benoit V, Grimaldi R, Guyonnet D, Holscher HD, Hunter K, Manurung S, Obis D, Petrova MI, Steinert RE, Swanson KS, van Sinderen D, Vulevic J, Gibson GR. Shaping the future of probiotics and prebiotics (2021) *Trends in Microbiology*, 29, 667-685.
- FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk and live lactic acid bacteria (2001) Report of a joint FAO/ WHO expert consultation. [Online.] <http://www.fao.org/es/ESN/Probio/report.pdf>
- Galfré GA, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures (1981) *Methods in Enzymology*, 73, 3-46.
- Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains (2001) *Journal of Dairy Research*, 68, 639–652.
- Garrote GL, Delfederico L, Bibiloni R, Abraham AG, Pérez PF, Semorile L, De Antoni GL. Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins (2004) *Journal of Dairy Research*, 71, 222-230.
- Garrote GL, Serradell MA, Abraham AG, Añón MC, Fossati CA, De Antoni GL. Development of an immunochemical method to detect *Lactobacillus kefir* (2005) *Food and Agricultural Immunology*, 16, 221-233.
- Gerbino E, Carasi P, Mobili P, Serradell M.A, Gómez-Zavaglia A. Role of S-layer proteins in bacteria (2015) *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 1877-1887.
- Golowczyc MA, Mobili P, Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (2007) *International Journal of Food Microbiology*, 118, 264–273.
- Golowczyc MA, Mobili P, Garrote GL, de Los Angeles Serradell M, Abraham AG, De Antoni GL. Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins (2009) *Journal of Dairy Research*, 76, 111-116.
- Golowczyc MA, Silva J, Teixeira P, De Antoni GL, Abraham AG. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties (2011) *International Journal of Food Microbiology*, 144, 556–560.
- Guzel-Seydim ZB, Kok-Tas T, Greene AK, Seydim AC. Review: functional properties of kefir (2011) *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 261-268.
- Hamet MF, Londero A, Medrano M, Vercammen E, Van Hoorde K, Garrote GL, Huys G, Vandamme P, Abraham AG. Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirianofaciens* in microbial consortia present in kefir grains (2013) *Food Microbiology*, 36, 327-334.
- Huggias S, Bolla PA, Azcárate J, Serradell MA, Casella ML, Peruzzo PJ. Nobel metal nanoparticles-based heterogeneous bionanocatalysts supported on S-layer protein/polyurethane system (2021) *Catalysis Today*, 372, 98-106.
- Huggias S, Bolla PA, Serradell MA, Casella M, Peruzzo PJ. Platinum nanoparticles obtained at mild conditions on S-layer protein/polymer particle supports (2020) *Langmuir*, 36, 1201-1211.

- Hynönen U, Palva A. *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications (2013) *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 5225–5243.
- Ilk N, Egelseer EM, Sleytr UB. S-layer fusion proteins--construction principles and applications (2011) *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 824-831.
- Köhler G, Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion (1975) *European Journal of Immunology*, 6, 511-519.
- Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM, Bruijns SC, Singh SK, Valence F, Molle D, Lortal S, Altermann E, Klaenhammer TR, van Kooyk Y. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions (2008) *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105, 19474-19479.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 (1970) *Nature*, 227, 680-685.
- Leite AM, Leite DC, Del Aguila EM, Alvares TS, Peixoto RS, Miguel MA, Silva JT, Paschoalin VM. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes (2013) *Journal of Dairy Science*, 96, 4149-4159.
- Malamud M, Bolla PA, Carasi P, Gerbino E, Gómez-Zavaglia A, Mobili P, Serradell MA. S-layer proteins from lactobacilli: biogenesis, structure, functionality and biotechnological applications. In: *Lactobacillus Genomics and Metabolic Engineering* (2019a) Caister Academic Press, UK, 105-130.
- Malamud M, Carasi P, Assandri MH, Freire T, Lepenies B, Serradell MLÁ. S-layer glycoprotein from *Lactobacillus kefir* exerts its immunostimulatory activity through glycan recognition by Mincle (2019b) *Frontiers in Immunology*, 10:1422.
- Malamud M, Carasi P, Bronsoms S, Trejo SA, Serradell ML. *Lactobacillus kefir* shows inter-strain variations in the amino acid sequence of the S-layer proteins (2017) *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110, 515-530.
- Malamud M, Carasi P, Freire T, Serradell MLA. S-layer glycoprotein from *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 enhances macrophages response to LPS in a Ca⁺²-dependent manner (2018) *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 495, 1227-1232.
- Malamud M, Cavallero GJ, Casabuono AC, Lepenies B, Serradell MLÁ, Couto AS. Immunostimulation by *Lactobacillus kefir* S-layer proteins with distinct glycosylation patterns requires different lectin partners (2020) *Journal of Biological Chemistry*, 295, 14430-14444.
- Mei Z, Li D. The role of probiotics in vaginal health (2022) *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12:963868.
- Messner P, Schäffer C, Kosma P. Bacterial cell-envelope glycoconjugates (2013) *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 69, 209-272.
- Mobili P, Serradell MA, Trejo SA, Avilés Puigvert FX, Abraham AG, De Antoni GL. Heterogeneity of S-layer proteins from aggregating and non-aggregating *Lactobacillus kefir* strains (2009) *Antonie Van Leeuwenhoek*, 95, 363-372.
- Pavkov-Keller T, Howorka S, Keller W. The structure of bacterial S-layer proteins (2011) *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 103, 73-130.

- Prado Acosta M, Goyette-Desjardins G, Scheffel J, Dudeck A, Ruland J, Lepenies B. S-Layer from *Lactobacillus brevis* modulates antigen-presenting cell functions via the Mincle-Syk-Card9 axis. *Frontiers in Immunology*, 12:602067.
- Pum D, Sleytr UB. Reassembly of S-layer proteins (2014) *Nanotechnology*, 25, 312001.
- Raff J, Matys S, Suhr M, Vogel M, Günther T, Pollmann K. S-layer based nanocomposites for industrial applications, in *Protein-based Engineered Nanostructures, Advances in Experimental Medicine and Biology 940* (2016) Ed. A.L. Cortajarena & T.Z. Grove, Springer International Publishing Switzerland; pp 245-279.
- Ravi J, Fioravanti A. S-layers: the proteinaceous multifunctional armors of Gram-positive pathogens (2012) *Frontiers in Microbiology*, 12:663468.
- Ristl R, Steiner K, Zarschler K, Zayni S, Messner P, Schäffer C. The s-layer glycome-adding to the sugar coat of bacteria (2011) *International Journal of Microbiology*, 2011:127870.
- Sára M, Sleytr UB. Bacterial S-layers (2000) *Journal of Bacteriology*, 182, 859-868.
- Schuster B, Sleytr UB. Nanotechnology with S-layer proteins (2020) *Methods in Molecular Biology*, 2073, 195-218.
- Sleytr UB, Schuster B, Egelseer EM, Pum D. S-layers: principles and applications (2014) *FEMS Microbiology Reviews*, 38, 823–864.
- Spens E, Häggström L. Defined protein-free NS0 myeloma cell cultures: stimulation of proliferation by conditioned medium factors (2005) *Biotechnology Progress*, 21, 87-95.
- Taverniti V, Stuknyte M, Minuzzo M, Arioli S, De Noni I, Scabiosi C, Cordova ZM, Junttila I, Hämäläinen S, Turpeinen H, Mora D, Karp M, Pesu M, Guglielmetti S. S-layer protein mediates the stimulatory effect of *Lactobacillus helveticus* MIMLh5 on innate immunity (2013) *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 1221-1231.
- Turpin W, Humblot C, Thomas M, Guyot JP. Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms (2010) *International Journal of Food Microbiology*, 143, 87-102.
- Ventimiglia MS, Valeff NJ, Pozo Albán M, Paturlanne MJ, Juriol L, et al. Probiotic *Lactobacillus kefir* prevents endotoxin-induced preterm birth and stillbirth in mice (2021) *Reproduction*, 161, 657-667.
- Wells JM. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli (2011) *Microbial Cell Factories*, 10 (Suppl 1) S17.
- Yelton DE, Scharff MD. Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine (1981) *Annual Review of Biochemistry*, 50, 657-680.
- Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, O'Toole PW, Pot B, Vandamme P, Walter J, Watanabe K, Wuyts S, Felis GE, Gänzle MG, Lebeer S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae* (2020) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 2782-2858.

“Sé firme en tus actitudes y perseverante en tu ideal. Pero sé paciente, no pretendiendo que todo te llegue de inmediato. Haz tiempo para todo, y todo lo que es tuyo, vendrá a tus manos en el momento oportuno.”

M. Gandhi

