

Riquelme, Analia Giselle

# Estudio de la actividad inmunoestimuladora de proteínas de capas-S de Clostridium difficile y de lactobacillus kefir sobre las células presentadoras de antígeno

2020

*Instituto: Ciencias de la Salud*

*Carrera: Bioquímica*



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.  
Atribución - No Comercial - Compartir Igual 4.0  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

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

*Cita recomendada:*

Riquelme, A. (2020) Estudio de la actividad inmunoestimuladora de proteínas de capas-S de Clostridium difficile y de lactobacillus kefir sobre las células presentadoras de antígeno [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: Bioquímica*

*“Estudio de la actividad inmunoestimuladora de proteínas de capa-S de Clostridium difficile y de Lactobacillus kefir sobre células presentadoras de antígeno”*

Alumna: Analía Riquelme

Directora: Dra. María de los Ángeles Serradell

Co-director: Dr. Mariano Malamud

Fecha de entrega: Marzo de 2020

## **RESUMEN**

El uso de componentes bacterianos para el desarrollo de vacunas en el ser humano es de continuo estudio. Las proteínas de capa S presentes en la mayoría de arqueas y bacterias son la estructura más superficial de las células procariotas, por lo que este componente es esencial para el reconocimiento que realizan las células presentadoras de antígeno del sistema inmune innato. Las proteínas superficiales de *Clostridium difficile* son reconocidas por receptores de superficie de tipo Toll-4, y las proteínas superficiales de *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 son reconocidas por Mincle, un receptor de lectinas de tipo C. En trabajos previos se ha reportado que la estimulación simultánea de macrófagos murinos con LPS (reconocido por TLR-4) y, proteínas de capa S de *L. kefir* producen un efecto sinérgico con un aumento de la respuesta de activación celular. Ambos estímulos activan en un principio, diversas vías de señalización intracelular que convergen en un punto donde comparten la misma vía para activar al factor de transcripción NF-Kb, aumentando la respuesta final de activación al estimular a las células por dos receptores diferentes. En este trabajo, se evaluó la respuesta de células presentadoras de antígeno murinas de la línea celular RAW 264.7, a través de la medición de la concentración de IL-6 en los sobrenadantes de cultivo celular, luego de ser expuestas durante 24 hs a extractos de proteínas de capa S de *C. difficile* cepa VPI 10463 (SLP-Cd) a diferentes concentraciones y, combinadas con proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 (SLP-Lk) a concentración única. En diferentes condiciones experimentales (distintas concentraciones de SLP-Cd extraídas con Cloruro de Guanidinio) se puso en evidencia el efecto sinérgico con la SLP-Lk, a pesar de que, en ausencia de SLP-Lk, la respuesta celular frente a SLP-Cd solo se pudo observar a la máxima concentración ensayada. Estos resultados sugieren que las SLP-Lk podrían actuar como potenciales adyuvantes vacunales en el desarrollo nuevas terapias inmunológicas para la prevención de infecciones causadas por *C. difficile*.

## ÍNDICE

Introducción e importancia del tema.....	1
Proteínas de capa S en bacterias: aspectos estructurales y funcionales.....	3
Proteínas de capa S de <i>Clostridium difficile</i> .....	7
Proteínas de capa S de <i>Lactobacillus kefir</i> .....	9
Objetivos .....	12
Materiales y Métodos.....	13
1. Microorganismos utilizados y condiciones de cultivo.....	13
2. Extracción de proteínas de capa S de <i>Lactobacillus kefir</i> .....	14
3. Extracción de proteínas de capa S de <i>Clostridium difficile</i> .....	15
3.1 Extracción de capa S con Cloruro de Litio.....	15
3.2 Extracción de capa S con Cloruro de Guanidinio.....	15
4. Separación electroforética de proteínas mediante SDS-PAGE.....	16
5. Cuantificación de proteínas por el método colorimétrico de Bradford.....	19
6. Ensayo de activación celular.....	20
6.1 Línea celular utilizada y condiciones de cultivo.....	20
6.2 Ensayo de estimulación celular.....	22
7. Cuantificación de IL-6 mediante ELISA de captura.....	22
8. Análisis estadístico.....	24
Resultados y Discusión.....	25
1. Obtención y caracterización de los extractos de proteínas de capa S.....	25
1.1 SDS-PAGE.....	26
1.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	27
2. Ensayo celular y medición de IL-6 por la técnica ELISA.....	28

Conclusiones.....	34
Anexos.....	35
Bibliografía.....	37

## **INTRODUCCIÓN E IMPORTANCIA DEL TEMA**

La prevención de enfermedades infecciosas sigue siendo una de las preocupaciones principales en el ámbito de la Salud Pública. El aumento de la aparición de cepas bacterianas patógenas resistentes a los antibióticos ha impulsado el interés y la necesidad de ampliar y profundizar la búsqueda de nuevas estrategias preventivas. En este contexto, la generación de adyuvantes seguros y eficaces, es uno de los ejes principales en el desarrollo de nuevas vacunas.

Se define como adyuvante a aquellas sustancias o preparados químicos que administrados con el antígeno o incorporados a él, aceleran, prolongan o potencian la respuesta inmune celular o humoral (deriva del latín *adjuvare* que significa ayudar). Con su uso se logra la reducción de la cantidad de antígeno, el número de inmunizaciones, así como un mayor nivel de anticuerpos específicos (Roitt *et al.*, 2017).

La generación de una respuesta inmune celular y/o humoral frente a un inmunógeno es precedida por la activación del sistema inmune innato. Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados a daño tisular (DAMP) son reconocidos a través de diferentes receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas y los macrófagos. A partir de allí, se inicia una cascada de transducción de señales que conduce a la maduración celular, con aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras y producción de diferentes quimoquinas y citoquinas (Fainboim & Geffner, 2011).

Existen diferentes clases de familias de PRR, incluidas las proteínas transmembrana, como los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores de lectina de tipo C (CLR) (Takeuchi *et al.* 2010). Los TLR son una familia de proteínas transmembrana que reconocen principalmente componentes microbianos altamente conservados y que cumplen funciones esenciales en los microorganismos. (Kawasaki *et al.*, 2014). En humanos, existen 10 receptores caracterizados (TLR1-TLR10) mientras que en ratones se conocen 12 receptores (TLR1-TLR9, TLR-11, TLR-13). La clasificación principal de estos receptores se basa en la localización celular: pueden estar en la superficie de la célula (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR10) o ser intracelulares, ubicándose en la superficie de los endosomas (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12, y TLR13)

(Kawai & Akira 2010; 2010, Celhar *et al.* 2012). Los TLRs de superficie celular presentan un dominio extracelular que les permite el reconocimiento de ligandos, principalmente moléculas derivadas de la superficie de microorganismos, y otro dominio intracelular que se conecta a diferentes estructuras para iniciar la cascada de señales (Kawai & Akira 2010; Kumar *et al.* 2009). Los TLRs intracelulares reconocen mayoritariamente ácidos nucleicos derivados de bacterias y virus presentes dentro de los endosomas (Blasius & Bleutler, 2010). Luego del reconocimiento antigénico, se inicia el reclutamiento de proteínas adaptadoras que contienen dominios TIR, al igual que la porción citosólica del TLR, como MyD88 (proteína de respuesta primaria a la diferenciación mieloide) y TRIF (proteína que contiene dominios TIR inductora de IFN- $\beta$ ), lo que inicia una cadena de transducción de señales que culmina con la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, y la regulación de la expresión de genes que codifican receptores celulares, además de citoquinas y quimoquinas proinflamatorias (Kawasaki *et al.* 2014).

El término Receptores de lectina tipo C (CLRs) se introdujo inicialmente para distinguir un grupo de proteínas que reconocían carbohidratos (lectinas) de manera dependiente de  $Ca^{+2}$ . Los CLRs pueden ser proteínas transmembrana o secretarse como proteínas solubles (colectinas). Los receptores CLRs transmembrana pueden reconocer motivos de carbohidratos presentes en los microorganismos internalizándolos y algunos, además, pueden promover la expresión de genes proinflamatorios a través de la activación de una cascada de señales intracelular o modular la expresión de estos genes inducida por otros receptores, como los TLRs. (Fainboim & Geffner, 2011).

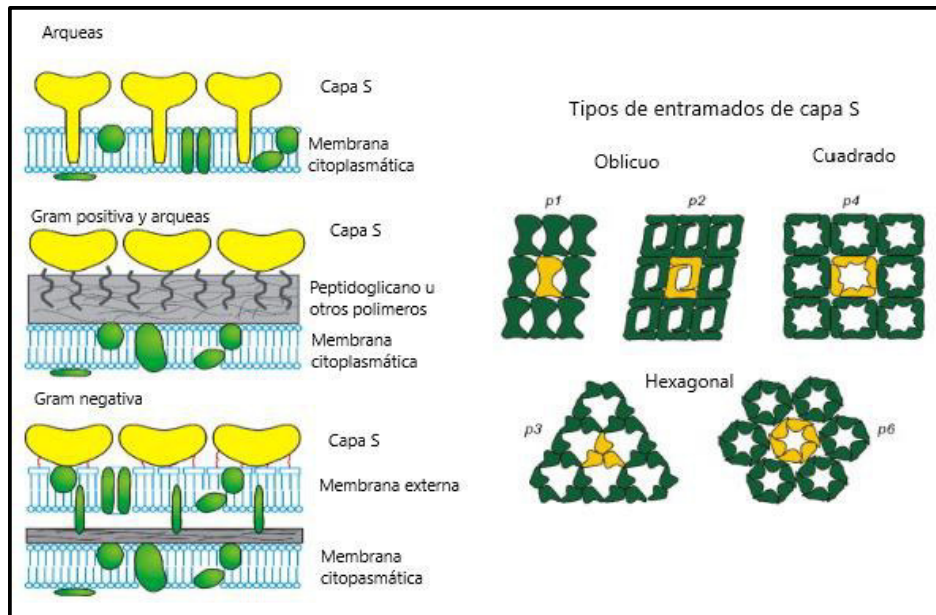
Estos receptores comparten al menos un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que contiene motivos de residuos conservados y determina la especificidad del carbohidrato (Sancho y Reis e Sousa 2012). La vía de señalización de los CLRs luego de la activación de Syk culmina, al igual que la vía de los TLRs, en la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Dado que tanto los TLRs como los CLRs comparten la vía de señalización intracelular, el reconocimiento de ligandos por ambos tipos de receptores puede potenciar, inhibir o modular la respuesta inmune generada (Thaiss *et al.* 2016). Es por ello, que en función de cuáles son los receptores involucrados en el reconocimiento de los antígenos a los cuales se enfrentan, las células presentadoras de antígeno, muestran diferentes estados de maduración y producen diferentes mediadores inflamatorios que impactan en las respuestas celulares y humorales (Gornati *et al.* 2018, Itano *et al.* 2013).

En los últimos años, el diseño de nuevos sistemas con capacidad adyuvante y de vehiculización de antígenos se ha visto en gran parte impulsado por la revolución de la “nanotecnología”. El desarrollo de las nanociencias ha contribuido especialmente y de manera significativa en distintas áreas de la biotecnología y la biomedicina, entre otras áreas de la ciencia, y ha abierto una gran variedad de oportunidades para la innovación. En este contexto, la utilización de una estructura cristalina macromolecular bidimensional como la capa S, que recubre la superficie de la célula microbiana que la posee, constituye un área de investigación en constante expansión.

### **Proteínas de capa S en bacterias: aspectos estructurales y funcionales**

La capa S es la estructura más superficial que tapiza la mayoría de las bacterias y arqueas. Fue descrita por primera vez en 1953 por Houwink A.L. en la pared celular de *Spirillum sp* (Houwink, 1953). Forma una capa bidimensional y cristalina, compuesta por proteínas o glicoproteínas idénticas. Según su disposición, puede formar redes de diferente simetría, oblicua, cuadrada o hexagonal (*Figura 1*) y, presentan un peso molecular de entre 40 a 200 kD y un espesor de entre 5 y 25 nm. formando una matriz regular y altamente porosa a escala nanométrica (Sleytr *et al.*, 2000).

Al ser estos organismos unicelulares los que habitan en mayor proporción nuestro medio, y las proteínas de capa S (SLP) representar entre 10 y 15% de las proteínas celulares totales, podrían considerarse uno de los biopolímeros más abundantes del planeta. Además, es considerada la membrana biológica más ancestral, ya que, se ha mantenido en los procariotas a lo largo de la evolución, y se encuentra presente cubriendo totalmente la célula durante todas las etapas de crecimiento y división celular (Sleytr *et al.*, 2014). En bacterias Gram positivas y arqueas, se encuentran unidas a la capa de peptidoglicano o pseudomureína, en bacterias Gram negativas, a porciones de la membrana externa, como el lipopolisacárido, y en arqueas sin pared celular rígida, se encuentran unidas a la membrana plasmática directamente (*Figura 1*). Se ha encontrado que los enlaces que unen las subunidades proteicas entre sí en la red cristalina son más fuertes que aquellas que las unen a la envoltura soporte (Sleytr *et al.*, 2000).



**Figura 1:** Disposición de las proteínas de capa S en arqueas y bacterias. Adaptado de “Nanobiotechnology with S-Layer Proteins as Building Blocks”. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Sleytr et al., 2011.

Al ser la capa S la estructura más superficial de los organismos procariontas, y estar en relación directa con su entorno, se han realizado numerosos estudios sobre su estructura y funciones.

Los genes que codifican para estas proteínas están altamente expresados. Se han estudiado los genes de capa S de muchos géneros y especies bacterianas, y si bien su composición aminoacídica es similar en general, al haber baja similitud en su secuencia, la confirmación de su presencia se realiza todavía en gran medida mediante la observación por microscopía electrónica. El gran gasto energético que implica su síntesis infiere que su existencia es esencial para la célula y para su relación/ adaptación con el medio (Hynönen *et al.*, 2013). Una característica en común entre las capa S de muchos microorganismos estudiados es la organización estructural con una región propia de unión a la pared celular y otra responsable del autoensamblado; además, la mayoría de las SLP bacterianas contienen entre 40 – 60% de aminoácidos hidrofóbicos y poseen pocos o ningún aminoácido sulfurado (Engelhardt *et al.*, 2007).

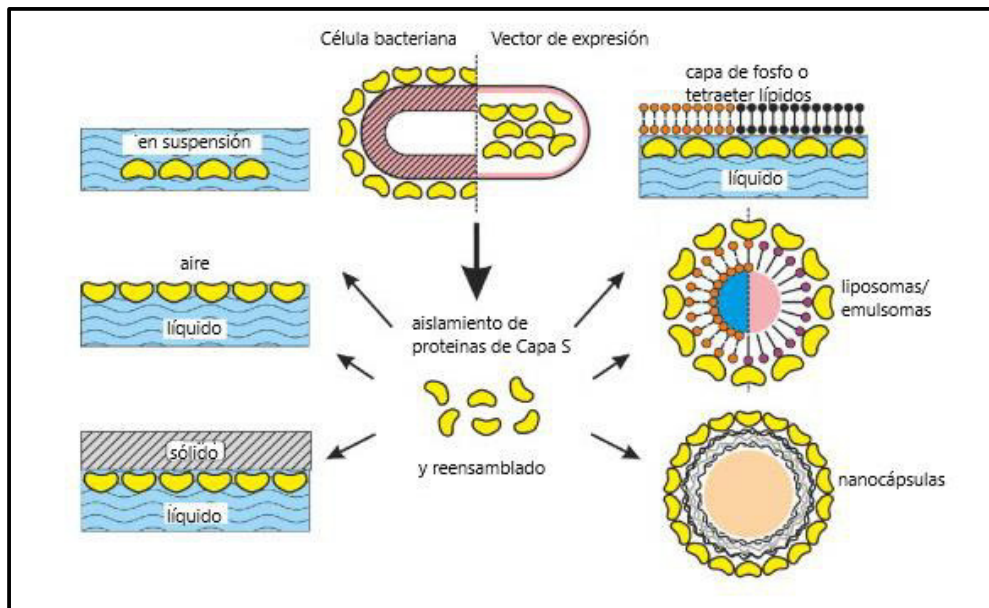
La modificación postraduccional más frecuente de estas proteínas es la glicosilación, si bien no todos los microorganismos con capa S la presentan, es típica en arqueas y algunas

especies bacterianas. La unión a las estructuras proteicas se da mediante O-glicosilaciones con treonina, serina y tirosina, mientras que las N-glicosilaciones son mucho más típicas de arqueas. La presencia de estas glicosilaciones le aporta mayor variabilidad a la estructura de la superficie y son clave para la funcionalidad de la proteína. Las cadenas de glicanos bacterianas pueden ser homo o heterosacáridos, lineales o ramificadas, formadas por secuencias de entre 15 a 50 moléculas idénticas y repetitivas. Por otro lado, los monosacáridos que conforman las cadenas son por lo general hexosas neutras, 6- desoxihexosas y aminoazúcares. Además, en algunas ocasiones pueden aparecer azúcares raros, como componentes típicos presentes en los antígenos O del lipopolisacárido de bacterias Gram negativas. El grado de glicosilación de las proteínas de la capa S generalmente varía entre 2 y 10% (p / p) (Schäffer *et al.*, 2004).

Las principales funciones atribuidas a las proteínas de capa S tienen que ver con el mantenimiento de la forma celular, funcionar como un tamiz molecular, brindar protección a la célula al estrés mecánico y osmótico, participar en el reconocimiento celular, unión a grandes moléculas, iones y fagos, adherencia a diferentes sustratos y superficies, la capacidad de autoagregación y coagregación con otros microorganismos, formación de biofilms, aportar a la resistencia frente a condiciones adversas como altas temperaturas, bajo pH, radiación, fuerza iónica alta, metales pesados, enzimas líticas, etc. (Dapa *et al.*, 2013).

Se ha estudiado que la capa S puede interactuar con células del sistema inmune modulando la respuesta con cambios en el patrón de citoquinas liberadas. Con respecto a las bacterias patógenas, la capa S en algunos microorganismos sirve para evadir los mecanismos de defensa del sistema inmune del huésped, como por ejemplo impidiendo la unión de proteínas del complemento a la superficie celular y/o presentando variabilidad antigénica de alta frecuencia en su superficie para evitar la fagocitosis (Gerbino *et al.*, 2015). Otras formas de aportar a la patogenicidad son la regulación negativa de la liberación de citoquinas proinflamatorias (Wang *et al.*, 2000), disminución de la repuesta de células efectoras, o la regulación positiva para la activación y maduración de células del sistema inmune innato y adaptativo, como en el caso de *Clostridium difficile* (Ausiello *et al.*, 2006). En las bacterias no patógenas, algunas de las cuales presentan características probióticas, las proteínas de capa S son estudiadas continuamente para conocer su funcionalidad y evaluar sus potencial aplicaciones (Gerbino *et al.*, 2015).

Los monómeros de SLP se unen entre sí y a la envoltura celular subyacente bacteriana mediante uniones no covalentes y pueden ser liberados mediante tratamientos con agentes caotrópicos (urea, clorhidrato de guanidinio, cloruro de litio) o quelantes (EDTA, EGTA), o por cambios de pH y fuerza iónica. Las subunidades aisladas de SLP son capaces de auto-ensamblarse, impulsada por la entropía, formando arreglos en solución y/o sobre soportes sólidos in vitro a escala nanométrica (Schuster *et al.*, 2013). Esta propiedad, junto con su regularidad estructural y su estabilidad mecánica, las convierte en una estructura orgánica única con altísimo potencial de aplicación en nanobiotecnología, como es la generación de carriers para la administración de antígenos y moléculas de importancia biomédica, el desarrollo de reactivos en fase sólida usando la capa s como soporte de biocatalizadores, biosensores, etc (Farjadian *et al.*, 2018; Ilk *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015).



**Figura 2:** Rearreglos de proteínas de capa S. Adaptado de "Nanobiotechnology with S- Layer Proteins as Building Blocks". *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Sleytr *et al.*, 2011.

## **Proteínas de capa S de *Clostridium difficile***

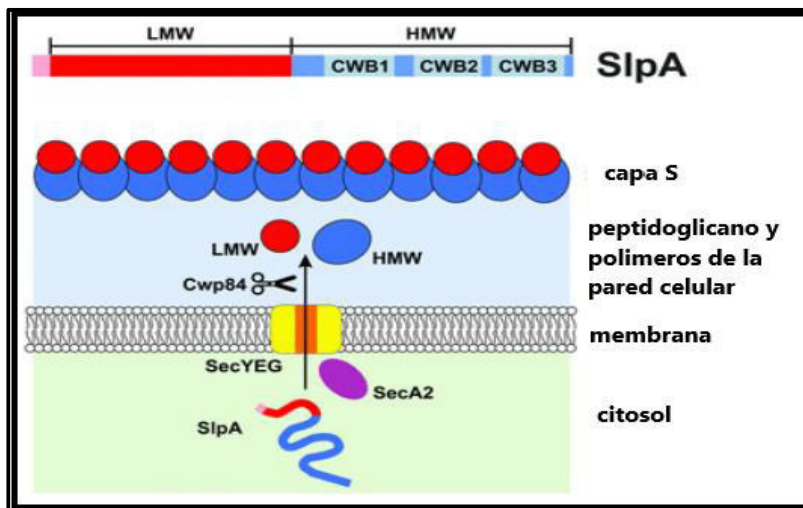
*Clostridium difficile*, actualmente *Clostridioides difficile* (Lawson *et al.*, 2016) es un bacilo Gram positivo, anaerobio estricto, productor de toxinas, y se comporta como patógeno oportunista. Se lo puede hallar en el suelo, aguas y ambientes hospitalarios, donde puede sobrevivir por años debido a la formación de esporas (Zea *et al.*, 2012). La infección que puede producir es a nivel intestinal y está asociada al tratamiento prolongado con antibióticos, generalmente en pacientes hospitalizados. La disbiosis provocada por el tratamiento antimicrobiano puede desencadenar desde leves diarreas hasta cuadros graves de colitis pseudomembranosa y complicaciones que pueden causar la muerte (Bouza *et al.*, 2005). *C. difficile* forma parte de la microbiota intestinal normal en 1-3% de los adultos y del 15-20 % de niños sanos (McFarland *et al.*, 2016), pero estos valores aumentan en la población de pacientes internados en centros de salud (Owens *et al.*, 2008). Los principales factores de virulencia son dos toxinas, TcdA y TcdB, y el tratamiento convencional consiste en la administración de metronidazol, vancomicina o una combinación de ambos de forma enteral. En Argentina, se ha encontrado un aumento de alrededor del 20 % en la prevalencia de las infecciones ocasionadas por *C. difficile* en los últimos años, así como un cambio en la patogénesis del microorganismo (Legaria *et al.*, 2003, 2017), lo que revela claramente la necesidad de desarrollar nuevas terapias para la prevención y el tratamiento de la infección por este patógeno. En este sentido, a pesar de que existen reportes con resultados prometedores, las inmunoterapias activas y pasivas dirigidas contra las toxinas, como el Bezlotoxumab por ejemplo, que es un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra TcdB (Navalkele *et al.*, 2018), no parecen contribuir a la prevención de la colonización intestinal por *C. difficile* y a la diseminación de los esporas.

Si bien el principal factor de virulencia de *C. difficile* son las toxinas que libera, se ha encontrado que la SLP presente en este patógeno también induce respuesta inflamatoria y aporta a la patogenicidad aumentando la adhesión y colonización de la mucosa intestinal (Ausiello *et al.*, 2006).

Para los microorganismos patógenos, la capa-S representa un factor de virulencia importante, ya que puede 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, ya sea para desencadenar una respuesta inflamatoria o para contribuir a la evasión de los mecanismos de inmunidad adaptativa (Gerbino *et al.*, 2015).

Las SLP de *C. difficile* están compuestas por una subunidad de bajo (LMW-SLP) y otra de alto peso molecular (HMW-SLP), formadas a partir de una escisión postraduccional (William *et al.*, 2018). La proteína precursora SlpA es sintetizada en el citosol, luego es transportada por la proteína de exportación SecA2 hacia la membrana plasmática, y secretada probablemente por una proteína transmembrana (SecYEG). Una proteasa (Cwp84) cliva este precursor en las dos subunidades, que se ensamblan formando un heterodímero para unirse a la capa S en formación, con dominios hacia la pared celular en la HMW-SLP (CWB1-3), la LMW-SLP se orienta hacia el exterior (Oatley *et al.*, 2018), tal como se muestra en la *Figura 3*.



**Figura 3:** Síntesis y estructura de capa S de *Clostridium difficile*. Adaptado de “Spatial organization of *Clostridium difficile* S-layer biogenesis”. *Biorxiv*. Oatley *et al.*, 2018.

En estudios hechos 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). Las SLP de esta especie son capaces de generar respuesta inflamatoria *in vitro* en modelos murinos, como son la producción de citoquinas proinflamatorias en monocitos, y maduración y activación de células dendríticas derivadas de monocitos (Bianco *et al.*, 2011). Las SLP de *C. difficile* son reconocidas por receptores de tipo Toll (TLR 4) en las células del sistema inmune innato y estimula la activación y maduración de las mismas,

generando respuesta inflamatoria y aumento de moléculas presentadoras de antígenos (del complejo mayor de histocompatibilidad) y de moléculas coestimuladoras de superficie (CD80, CD86, CD40), activando células Th1 y Th17 del sistema inmune adaptativo (Ryan *et al.*, 2011).

Los tratamientos que involucran terapias inmunológicas están basados en la administración de anticuerpos contra las toxinas para neutralizarlas, pero no hay a disposición herramientas para la prevención de la infección o colonización bacteriana. 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 (Péchiné *et al.*, 2018).

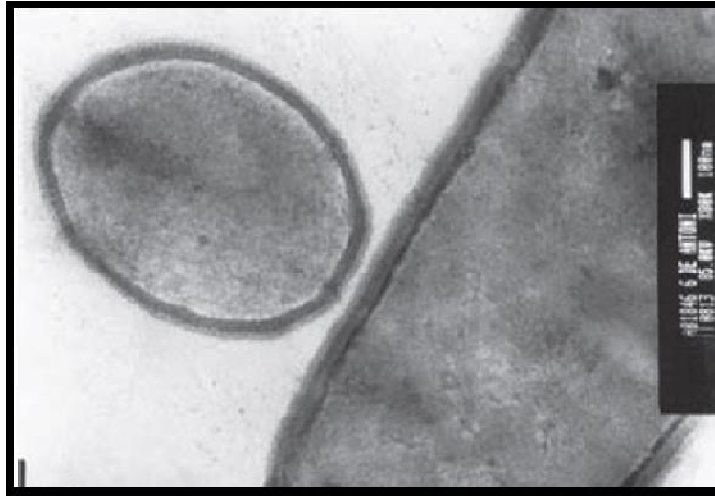
### **Proteínas de capa S de *Lactobacillus kefir***

Como se mencionó anteriormente, la presencia de capa S ha sido descrita en numerosas especies bacterianas, entre las que se encuentran los lactobacilos. El género *Lactobacillus* está formado por bacilos Gram positivos, no esporulados, anaerobios o microaerófilos, no patógenos, que generan como principal producto final de su metabolismo ácido láctico y tienen requerimientos nutricionales complejos. Se los puede encontrar en diversos entornos como alimentos, plantas, aguas residuales, algunas especies se encuentran formando parte de la microbiota intestinal y genital, aportando a la protección, digestibilidad, y desarrollo del sistema inmune. Su aplicación en alimentos como probióticos es otra característica de este género (Hynönen *et al.*, 2013).

El laboratorio donde se realizó el presente trabajo cuenta con diferentes cepas de *Lactobacillus kefir*, potencialmente probióticas, en las cuales se ha demostrado la presencia de capa S (Garrote *et al.*, 2004).

Las SLP de *L. kefir* estudiadas están glicosiladas y presentan una alta heterogeneidad en la secuencia de aminoácidos entre ellas, particularmente en la región C-terminal. La longitud de las proteínas maduras varía entre 492 y 576 aminoácidos, con un peso molecular de 66-71 kDa, no poseen residuos de cisteína, y la cantidad de aminoácidos con carga positiva supera a la de restos cargados negativamente, por lo que presentan

puntos isoeléctricos elevados (entre 9.37 y 9.60), 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).



**Figura 4:** Micrografía obtenida por transmisión electrónica de una sección delgada de *L. kefir* CIDCA 8321. Adaptada de “*Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins*”. *J Dairy Res*, Garrote *et al.*, 2004.

Si bien por si misma las SLP de *L. kefir* no producen activación celular en macrófagos murinos, se ha demostrado que las SLP de la cepa *L. kefir* CIDCA 8348 (SLP-8348) potencia la respuesta de los mismos al LPS reconocido a través de receptores de tipo Toll (TLR-4), 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- $\alpha$  (Malamud *et al.*, 2018). Se pudo observar este mismo sinergismo al estimular macrófagos humanos de la línea THP-1 con otros ligandos de TLR como flagelina y poly IC, mostrando el mismo perfil de activación que con LPS (Malamud, 2019).

Se ha comprobado que estas células mieloides murinas captan e internalizan las SLP de *L. kefir* de forma activa mediante el reconocimiento de los restos de carbohidratos presentes. El efecto sinérgico con el LPS fue inhibido por la presencia de EGTA, lo que

sugiere fuertemente la participación de los iones  $\text{Ca}^{+2}$  en el reconocimiento de SLP-8348 por receptores celulares dependientes de este ion. (Malamud *et al.*, 2018, 2019).

Estudios más recientes han permitido identificar al receptor que reconoce a las SLP de *L. kefir* CIDCA 8348 a través de su porción glicosilada. Un receptor de lectinas de tipo C (CLR), más precisamente Mincle (“Macrophage inducible  $\text{Ca}^{+2}$ -dependent lectin receptor”), es uno de los receptores CLR clave en el reconocimiento de la SLP-8348 por células presentadoras de antígeno (BMDCs) y la consecuente activación celular. Asimismo, los ensayos *in vivo* muestran que SLP-8348 potencia la respuesta inmune antígeno-específica frente a ovalbúmina inoculada por vía subcutánea y que dicha capacidad depende de la integridad de sus glicanos (Malamud *et al.*, 2019). Estos hallazgos adquieren especial relevancia en vistas del desarrollo de nuevos sistemas a escala nanométrica con capacidad adyuvante. La búsqueda de adyuvantes se basa en el estudio de novedosos compuestos que incrementen la efectividad de la respuesta inmune, y que sean inocuos para el huésped, de preferencia derivado de fuentes naturales.

Considerando entonces que se ha reportado que la SLP de *C. difficile* es reconocida por TLR-4, y que previamente fue demostrado el efecto sinérgico entre las SLP de *L. kefir* y agonistas de diferentes TLRs sobre células presentadores de antígenos, en el marco de este Trabajo Final de la Carrera de Bioquímica, se propone estudiar la capacidad inmunoestimuladora de proteínas de capa S de *C. difficile* (SLP-Cd) y *L. kefir* (SLP-Lk) sobre macrófagos murinos, con el fin de evaluar la potencialidad de estas proteínas superficiales en el desarrollo de una nueva formulación vacunal basada en la utilización de las SLP-Cd como antígeno y de las SLP-Lk como adyuvante.

## **OBJETIVOS**

A.- Obtener proteínas de capa S de cepas patógenas de *C. difficile* y de cepas probióticas de *L. kefir*.

B.- Estudiar la actividad inmunomoduladora de las proteínas de capa S obtenidas sobre la activación de macrófagos murinos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Microorganismos utilizados y condiciones de cultivo**

Para los ensayos se utilizaron las proteínas de capa S extraídas de la cepa CIDCA 8348 de *Lactobacillus kefir* almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , perteneciente a la colección de cepas de aisladas de granos de kéfir del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, CONICET-CIC-UNLP) y del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

El medio de cultivo utilizado para el desarrollo de *L. kefir* fue el caldo MRS Difco (BD, USA). Es un medio selectivo y se basa en las formulaciones de Man, Rogosa y Sharpe para el adecuado crecimiento y desarrollo del género *Lactobacillus* y otras bacterias ácido-lácticas. La composición del caldo MRS para lactobacilos consta de peptona, extracto de carne, extracto de levadura y dextrosa como fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales; polisorbato 80, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, fosfato dipotásico, como cofactores de crecimiento y citrato de amonio como inhibidor del desarrollo de bacterias Gram negativas, con un pH final de  $6,5 \pm 0,2$ .

El medio de cultivo se preparó según las indicaciones del fabricante, se fraccionó en tubos de a 10 ml y se esterilizó en autoclave a  $120^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos y 1 atmósfera de sobrepresión. Cien microlitros de un cultivo de *L. kefir* CIDCA 8348 se inoculó en el medio y se incubó en condiciones de aerobiosis a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48hs, hasta su fase estacionaria.

Por otro lado, se utilizaron las proteínas de capa S extraídas de la cepa VPI 10463 de *Clostridium difficile*, también perteneciente a la colección de cepas del CIDCA (CONICET-CIC-UNLP) y del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

Para el crecimiento y desarrollo de *C. difficile* se utilizó el Caldo BHB (brain-heart-broth) de la marca Biokar Diagnostics. Se lo preparó según las indicaciones del fabricante, se lo fraccionó en alícuotas de 10 ml y se lo esterilizó en iguales condiciones que el caldo usado para las bacterias lácticas. Su composición consta de infusión cerebro- corazón de cerdo, digestión pancreática de gelatina y glucosa como fuentes de carbono, nitrógeno,

aminoácidos, péptidos y vitaminas, cloruro de sodio para el mantenimiento del balance osmótico, y fosfato disódico para otorgarle capacidad buffer. Este medio sirve para microorganismos fastidiosos y variados aerobios y anaerobios. Al caldo BHB estéril se lo complementó con 100 µl de cisteína al 5% en cada tubo.

Cien microlitros de un cultivo de *C. difficile* VPI 10463 se inocularon en el medio y se incubaron por 24hs en anaerobiosis a 37°C y 1 atm. Para crear la atmósfera anaeróbica, se colocaron los tubos inoculados en una jarra contenedora cerrada, acompañados por un frasco abierto con una mezcla de ácido sulfúrico, sulfato de cobre, Tween 80 y lana de acero, y por otro lado un tubo abierto con ácido cítrico y bicarbonato, al cual se agrega una alícuota de agua para la generación de CO<sub>2</sub> *in situ*.

La inoculación de los microorganismos se realizó en condiciones de esterilidad con mechero. La pureza de los cultivos se verificó mediante observación microscópica de preparados, fijados y teñidos mediante la técnica descrita por Gram (Gram, 1884).

## **2. Extracción de proteínas de capa S de *Lactobacillus kefir***

Como se describió anteriormente las proteínas de capa S se encuentran unidas entre ellas y con la estructura subyacente bacteriana a través de uniones no covalentes, tales como uniones de puente de hidrógeno, interacciones de Van der Waals, dipolo- dipolo, interacciones hidrofóbicas, etc. Para la extracción de estas proteínas se utilizó como agente caotrópico una solución de Cloruro de Litio 5 M.

### Procedimiento:

1. Se centrifugaron los tubos Falcon con los cultivos durante 12 minutos a 2900 rpm, se descartó el sobrenadante y se realizaron lavados (x2) con PBS (buffer fosfato sódico) para extraer el medio de cultivo y las proteínas presentes en el medio, y solo quedarnos con la suspensión bacteriana.
2. El pellet obtenido se resuspendió con una solución de LiCl 5 M, en una proporción de 1/10 con respecto al volumen de cultivo original y se agitó en vórtex durante 10 minutos.

3. Se centrifugó la suspensión a 2900 rpm por 12 minutos, se reservó el sobrenadante con las proteínas de capa S en solución de LiCl, y se descartó el pellet conteniendo las bacterias con y sin capa S.
4. La solución obtenida se dializó contra 2 L de H<sub>2</sub>O, utilizando una membrana de celulosa (SpectraPor membrane tube, MWCO 10000-14000, Spectrum Medical Industries, California, USA), y se mantuvo en agitación toda la noche para extraer el agente caotrópico.
5. El contenido de la membrana se almacenó a -20 °C hasta la realización del ensayo con células.

### **3. Extracción de proteínas de capa S de *Clostridium difficile***

Para la separación de las proteínas superficiales de *C. difficile* se dividió el cultivo en dos tubos Falcon de 50 ml y se centrifugaron ambos tubos durante 15 minutos a 2900rpm.

El pellet resultante fue resuspendido con 10ml de PBS en cada tubo y centrifugado en iguales condiciones. Este paso se realizó en 3 oportunidades para eliminar el medio de cultivo y posibles toxinas presentes.

La extracción de proteínas se realizó con dos agentes caotrópicos diferentes.

#### **3.1 Extracción de capa S con LiCl**

La extracción de proteínas superficiales de *C. difficile* con LiCl 5 M se realizó en iguales condiciones a la extracción de proteínas de capa S de *L. kefir* (ver punto 2).

#### **3.2 Extracción de capa S con Cloruro de Guanidinio**

La extracción de SLP se realizó utilizando el agente caotrópico Cloruro de Guanidinio (GnCl) 5 M. El pellet obtenido luego del último lavado con PBS (proveniente de un volumen inicial de cultivo de 70 ml), se resuspendió en 5 ml de GnCl y se incubó en agitación orbital a 37°C durante 20 minutos.

Luego se centrifugó la suspensión a 2900 rpm por 15 minutos, se separó el sobrenadante y se dializó la solución obtenida frente a una solución de Tris- HCl 0,05 M, utilizando una membrana de celulosa (SpectraPor membrane tube, MWCO 10000-14000, Spectrum Medical Industries, California, USA), y se mantuvo en agitación toda la noche para extraer el agente caotrópico.

#### **4. Separación electroforética de proteínas mediante SDS-PAGE**

##### Fundamento:

Para evaluar la presencia y de manera indirecta el rendimiento de la extracción de proteínas de capa S se realizó una corrida electroforética mediante la técnica SDS- PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) desarrollada por Laemmli en 1970.

La electroforesis de proteínas se basa en la migración de estas moléculas por los poros de un gel de poliacrilamida debido a la aplicación de un campo eléctrico. La corrida por el gel se encuentra condicionada por su tamaño y carga, donde las moléculas más pequeñas corren más rápido que las más grandes con igual densidad de cargas. Para que ocurra esto, las proteínas se someten previamente a una solución con dodecilsulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico que las desnaturaliza a través de la interferencia en las interacciones hidrofóbicas presentes en la estructura proteica y le otorga una carga neta negativa, por lo que presentan luego de este tratamiento una forma y una relación carga/masa similares. En consecuencia, el complejo proteína-SDS migra hacia el ánodo y se separa según su tamaño.

El gel de poliacrilamida está compuesto por acrilamida-bisacrilamida en diferentes proporciones, y según la concentración de ambos polímeros, varía el tamaño del poro. La concentración de poliacrilamida utilizada es inversamente proporcional al tamaño del poro. El gel presenta dos porciones, un gel apilador y un gel de corrida con diferentes concentraciones de polímero. El gel elaborado sobre un soporte se coloca en una cubeta inmerso en un buffer de corrida.

Para la visualización de las bandas se siembran las muestras en el gel apilador junto con un colorante.

Para determinar el peso de cada banda, se siembran, además, marcadores de peso molecular en paralelo.

Para la lectura final se realiza una tinción del gel con Commassie blue.

El equipo utilizado para llevar a cabo la electroforesis fue el sistema vertical Bio-Rad Mini Protean III (BioRad Lab, C.A.).

Procedimiento:

- 1) El sistema presenta un soporte desarmable para la confección del gel y la corrida electroforética. El gel de separación se preparó con una concentración de acrilamida de 12% p/v (Tabla 1), y se colocó en el soporte hasta solidificar. Se preparó el gel apilador con una concentración de acrilamida del 4%p/v (Tabla 1) y se lo colocó con micropipeta sobre el gel separador. Posteriormente se colocó el peine para la formación de las calles hasta solidificar.

Tabla 1: Composición de geles de SDS-PAGE

<b>Solución</b>	<b>Gel Separador (12 %)</b>	<b>Gel de apilamiento (4%)</b>
Acrilamida / BIS 50%	2,2 ml	330 µl
Tris / HCl 1M, Ph 8,8 (buffer separador)	3,13 ml	-
SDS 10%	8,3 µl	125 µl
Tris / HCl 0,375 M, pH 6,8 (buffer apilador)	-	1,4 ml
H <sub>2</sub> O	2,96 ml	2,1 ml
TEMED	2 µl	1,7 µl
Persulfato de amonio (catalizador)*	210 µl	330 µl

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

- 2) El cassette con el gel armado se colocó en la cubeta del sistema y se llenó con el buffer de corrida (ver la composición en Anexos).
- 3) Las muestras se centrifugaron a máxima velocidad durante 5 minutos. Se tomaron 20 µl del sobrenadante y se le agregaron 20 µl de buffer muestra (ver la composición en Anexos). Por otro lado, el pellet fue resuspendido con 30 µl de buffer muestra. Todas

- las muestras fueron incubadas durante 5 minutos en baño de agua caliente para mejorar el contacto de las proteínas con el SDS.
- 4) Se sembraron 25  $\mu$ l de las muestras de sobrenadante y 15  $\mu$ l de las muestras de pellet.
- Además, se sembraron 5  $\mu$ l de los marcadores de peso molecular (Blue Plus IV Protein Marker 10-180 kD- Transgen).
- 5) Una vez sembradas las muestras, se conectaron los cables a la cuba y se inició la corrida con una corriente inicial de 30mA durante 30 minutos aproximadamente (migración por el gel de apilamiento). Una vez llegado al gel de separación, se aumentó la corriente a 60 mA y se mantuvo constante hasta alcanzar el límite inferior del gel (2- 3 hs aproximadamente).
- 6) Para poder visualizar las bandas en el gel, se realizó una tinción con Azul de Coomassie:
- Se colocó el gel en agitación durante 30 minutos en la solución de fijación 1.
  - 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.
  - 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 (0,25% Trypsin- EDTA. GIBCO). Se mantuvo en agitación toda la noche.
  - Al día siguiente, se lavó con agua destilada y se visualizaron las bandas.

Tabla 2: Soluciones para el revelado con Azul de Coomassie:

Denominación	Ingredientes	Volumen final
Solución de fijación 1	30 ml de etanol absoluto 2 ml de ácido fosfórico 85 % p/p 68 ml H <sub>2</sub> O	100 ml
Solución de fijación 2	2 ml de ácido fosfórico 85 % p/p 98 ml H <sub>2</sub> O	100 ml
Solución de coloración	18 ml de etanol absoluto 7 ml de ácido fosfórico 85 % p/p 15 g de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 ml
Solución de Coomassie G250	1 g de Coomassie G250	50 $\mu$ L

## 5. Cuantificación de proteínas por el método colorimétrico Bradford

### Fundamento:

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método Bradford, en el cual se mide la densidad óptica (DO) de la solución que contiene la proteína en estudio con el agregado del reactivo de Bradford (Tabla 3), que contiene Azul brillante de Coomassie G-250, el cual forma un complejo con las proteínas detectable a 592 nm en un espectrofotómetro. El colorante se une a restos de aminoácidos básicos como arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina. El colorante en medio ácido puede presentar un color pardo o verdoso, y al unirse a las proteínas, el color pardo cambia a azul. Esta unión se mantiene estable por una hora aproximadamente.

Para la cuantificación, se realiza una curva de calibración con una proteína patrón. Solo puede interferir en el método el uso de algunos detergentes (Bradford M., 1976).

Tabla 3: 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 <sub>2</sub> O	Hasta 100 ml

### Procedimiento:

- 1) A partir de una 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 SLP realizada a velocidad máxima durante 5 minutos, reservando los sobrenadantes.
- 3) En la placa de medición 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  $\mu$ l de reactivo de Bradford 1x, previa dilución a partir del frasco comercial (5x).

- 4) Se realizó la lectura espectrofotométrica en un lector de microplacas (Tecan Infinite F50, Suiza) a 620 nm luego de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente.

## 6. Ensayo de activación celular

### 6.1 Línea celular utilizada y condiciones de cultivo

Para los ensayos con células eucariotas se utilizó la línea celular RAW 264.7 (ATCC TIB-71) de tipo monocito-macrófago, generada a partir de ratones BALB/c por transformación con el virus de la leucemia murina de Abelson. Fueron adquiridas del banco de células del IMBICE (Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, CIC-CONICET, La Plata). Para su desarrollo se utilizó el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO, Grand Island N.Y., USA) completo. La composición del medio DMEM incluye además de los componentes básicos como aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, glucosa, piruvato de sodio, rojo de fenol (indicador de pH), el agregado de antibióticos, aminoácidos no esenciales, suero fetal bovino inactivado (SFBI) y bicarbonato de sodio (Tabla 4).

Tabla 4: Composición de medio de cultivo DMEM

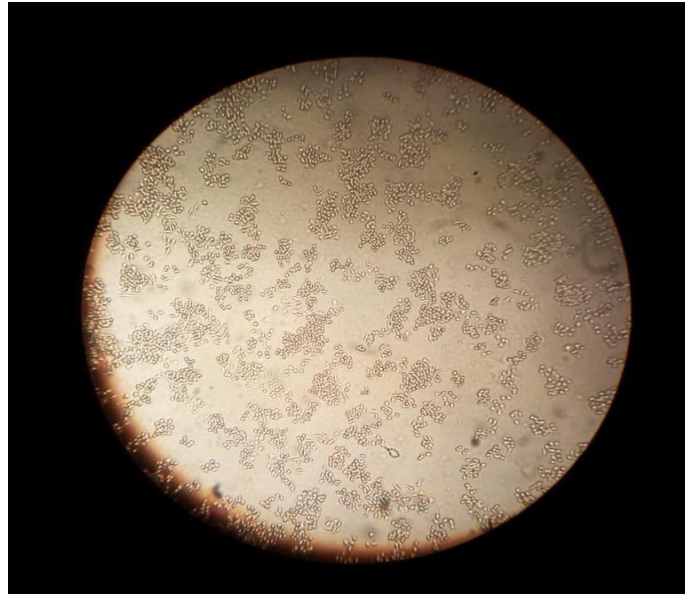
Suplemento	DMEM (1 sobre)
Aminoácidos no esenciales <sup>a</sup>	13 ml
NaHCO <sub>3</sub>	2,0 gr
SFBI <sup>b</sup>	120 ml
Penicilina/ estreptomina <sup>c</sup> (1000 UI, 1000 $\mu$ g/ml)	13 ml
Agua miliQ	1000 ml
Ph	7,5 $\pm$ 0,1

<sup>a</sup>Non-essential amino acids solution (100X), GIBCO, Grand Island N.Y., USA.

<sup>b</sup>GIBCO, Grand Island N.Y., USA. El suero fue inactivado térmicamente, incubándolo 30 minutos a 65 °C.

<sup>c</sup>GIBCO, Grand Island N.Y., USA.

Las células RAW 264.7 se incubaron en estufa gaseada a 37° C, en ambiente con 5% de CO<sub>2</sub>.



***Figura 5:*** Fotografía de imagen microscópica de células RAW 264.7 (250X).

## 6.2 Ensayo de estimulación celular

Los ensayos se llevaron a cabo en placas para cultivo celular de 24 fosas (JET BIOFIL, China); el volumen final ajustado por fosa fue de 0,5 ml. A partir de una botella con crecimiento celular, se realizó el conteo de células en cámara de Neubauer, y se calculó la cantidad de suspensión celular necesaria para dispensar en cada fosa  $4.10^4$  células/ml. Posteriormente, se realizó la dilución correspondiente y se preparó la placa, ajustando el volumen final con DMEM. Se incubaron las células durante 48 hs para su adaptación y desarrollo.

La estimulación de las células RAW 264.7 consistió en la incubación de las mismas con diferentes concentraciones de SLP de *C. difficile* extraídas con GnCl 5 M (100; 50; 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05 µg/ml) o con LiCl 5 M (100 µg/ml). Las SLP de *L. kefir* se colocaron en una concentración fija de 10 µg/ml. Las células se incubaron y estimularon durante 24 hs. con una combinación de SLP de *C. difficile* y de *L. kefir* por un lado y, por otro, con las SLP de ambos por separado, ajustando el volumen final con DMEM. Cada condición se

incubo por duplicado. Para el control de células no estimuladas se utilizó DMEM. Las proteínas de capa S utilizadas en los ensayos fueron previamente esterilizadas por filtración, mediante un filtro de acetato de nitrocelulosa con poros de 0,22 micrones de diámetro.

## **7. Cuantificación de IL-6 mediante ELISA de captura**

### Fundamento:

La técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), desarrollada por Engvall y Perlmann en 1971, es un método inmunológico, en el cual, mediante el uso de anticuerpos monoclonales/antígenos unidos a una enzima que produce una reacción colorimétrica o quimioluminiscente cuando se le agrega el sustrato, permite la detección de antígenos o anticuerpos. Es una técnica de alta sensibilidad y especificidad.

El tipo de ELISA utilizado en este trabajo es el ensayo de captura de antígeno (“sándwich”). Este sistema incluye el uso de anticuerpos de captura, adheridos a una placa de microtitulación, que se unen con las citoquinas de manera específica. Un segundo anticuerpo conjugado con una enzima se une a la proteína en un epítipo diferente al primer anticuerpo, y produce una reacción colorimétrica cuando se le agrega el sustrato, midiéndose la absorbancia por espectrofotometría.

Para medir la activación celular en las células de ratón RAW 264.7 se midió la concentración de IL-6 de manera indirecta en los sobrenadantes del cultivo celular luego de la estimulación con las SLP durante 24 hs, extrapolar los datos utilizando una curva de calibración. La medición de IL-6 se realizó con el kit comercial de BD OptEIA (EEUU).

### Procedimiento:

1. Se extrajeron los sobrenadantes de las fosas de la placa de células luego de 24 hs de estimulación.
2. Se sensibilizó la placa de microtitulación de 96 fosas Nunc-Immuno (Sigma-Aldrich, EEUU) con el anticuerpo de captura (anticuerpos monoclonales de ratón anti IL-6, solución A) 50 µl durante toda la noche a 4° C (*Tabla 5*).

3. Al otro día, se realizaron 3 lavados con 150µl de PBS- Tween (PBS suplementado con 0,05 % de Tween 20. SIGMA, St. Louis, MO USA), luego el bloqueo se realizó con 100 µl de una solución de suero fetal bovino (SFB) al 10% en PBS durante una hora a temperatura ambiente.
4. Se realizaron 3 lavados con PBS -Tween (150µl). Posteriormente, se colocaron 50µl de cada sobrenadante, y la dilución seriada del estándar de la citoquina patrón para la obtención de la curva de calibración (según el fabricante) durante 2 hs. a temperatura ambiente.
5. Se realizaron 3 lavados con 150µl de PBS- Tween, y se colocaron 50 µl del anticuerpo monoclonal murino anti IL- 6 biotinilado (Solución B) y el conjugado de estreptavidina- horsedarish peroxidasa (Solución C) durante 1 hora a temperatura ambiente (*Tabla 5*).
6. Luego de 3 lavados con PBS-Tween (150µl), se colocaron 50 µl por fosa de la solución D con el sustrato o-fenilendiamina (OPD) (*Tabla 5*), y se incubó por 30 minutos aproximadamente al abrigo de la luz.
7. La reacción se frenó con 25µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M.
8. Se colocó la placa en el lector de microplacas (Tecan Infinite F50, Suiza) y se midió la absorbancia a 492 nm.

Tabla 5: Dilución de los componentes para la realización del ELISA IL- 6

<b>Soluciones</b>	<b>Composición</b>
A (Anticuerpo de captura)	Dilución 1:250 con Carbonato de sodio 0,1 M pH 9,5 (Buffer de captura, ver la composición en Anexos)
B (Anticuerpo secundario biotinilado)	Dilución 1:500 con PBS con 10% de SFB
C (Enzima peroxidasa conjugada con estreptavidina)	Dilución 1:250 en la solución B
D (sustrato)	OPD 2 mg/ml Buffer Citrato pH 5 (ver la composición en Anexos) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 100% 1µl/ml

## **8. Análisis estadístico**

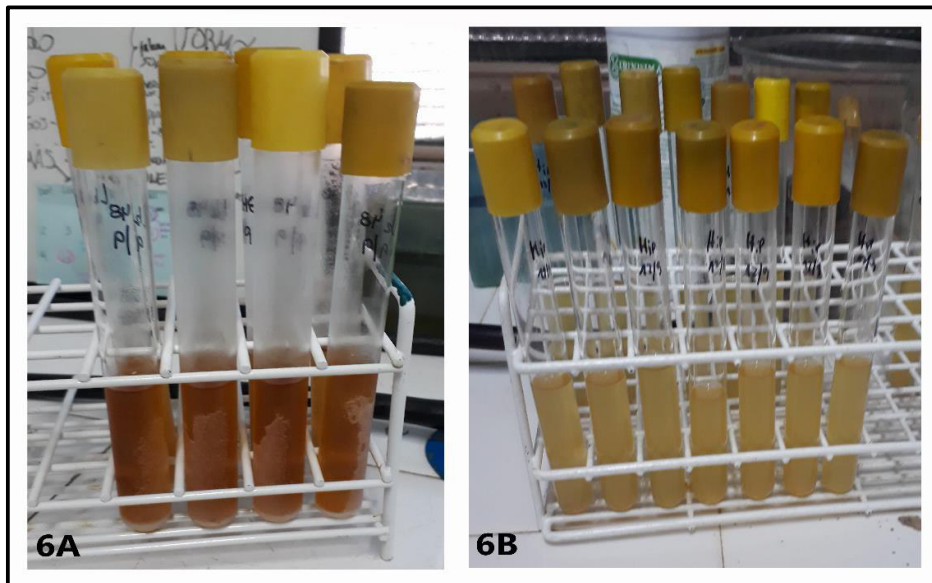
Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar, y para la evaluación estadística se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un post-test de Tukey de comparaciones múltiples ( $\alpha=0,05$ ). Todos los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism, version 7.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1. Obtención y caracterización de los extractos de proteínas de capa S**

Para la obtención de las proteínas de capa S, se partió de cultivos líquidos de ambas cepas:

*L. kefir* CIDCA 8348 (Figura 6A) y *C. difficile* VPI 10463 (Figura 6B).

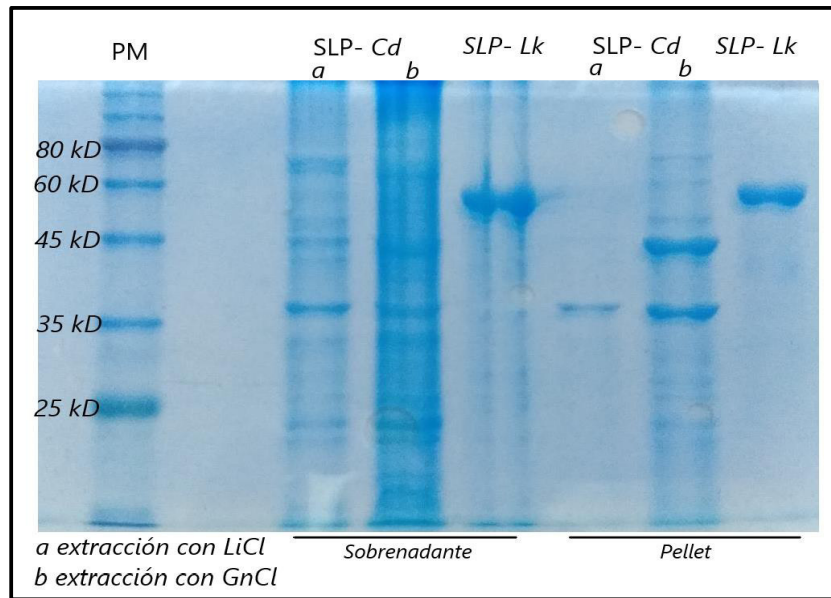


**Figura 6:** Fotografía de tubos con cultivos celulares de *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 (6A) y *Clostridium difficile* VPI 10463 (6B).

En la *Figura 6A*, se puede observar como el crecimiento celular de *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 presenta la particularidad de producirse con agregación de las bacterias en las paredes y el fondo del tubo. La capacidad de agregación de esta cepa ya había sido reportada por el grupo de trabajo (Garrote *et al.*, 2004). En cambio, el crecimiento de *C. difficile* se evidenció con un medio de cultivo turbio sin observarse sedimento en ningún momento.

## 1.1. SDS-PAGE

La presencia de las proteínas de capa S extraídas de *C. difficile* VPI 10463 (SLP-Cd) y *L. kefir* CIDCA 8348 (SLP-Lk) se puso en evidencia mediante la corrida electroforética SDS PAGE.



**Figura 7:** SDS-PAGE de proteínas de capa S de *C. difficile* y *L. kefir*.

En la *Figura 7*, se puede observar importantes diferencias entre las corridas electroforéticas de los sobrenadantes y el pellet luego de la centrifugación de los productos de diálisis, con extractos más limpios a partir del pellet. Ello se debe a que luego de eliminar el agente caotrópico durante la diálisis, parte de las SLP se agregan y pueden separarse de la solución mediante centrifugación. Se puede visualizar las bandas bien definidas con la presencia de las dos subunidades proteicas (de 36 y 47 kDa.) que conforman el heterodímero de la SLP de *C. difficile* extraído con Cloruro de Guanidinio (GnCl) en el pellet (*Figura 7, SLP-Cd b pellet*), en comparación con el sobrenadante que muestra un escurrido sin posibilidad de diferenciar precisamente las bandas, probablemente debido a la presencia de abundantes residuos proteicos (*Figura 7, SLP- Cd b sobrenadante*). Con respecto a la extracción de SLP de *C. difficile* con Cloruro de Litio (LiCl) presenta menor rendimiento aparentemente con respecto a la extracción con GnCl, observándose bandas de mayor intensidad en la extracción con este último. Con

respecto a las SLP de *L. kefir* tanto el pellet como el sobrenadante presenta un extracto más limpio, sin revelado de otras proteínas, con una única banda que coincide con el tamaño previamente reportado (entre 66- 71 kDa) por el grupo de trabajo (Carasi *et al.* 2012, Malamud *et al.* 2017).

## 1.2. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La cuantificación de proteínas realizada por el método de Bradford arrojó los siguientes resultados:

Tabla 6: Concentraciones de proteínas de capa S

SLP	Concentración (mg/ ml)
SLP- Cd LiCl (extracto total)	0,016 ± 0,003
SLP- Cd GnCl (extracto total)	0,66 ± * 0,22
SLP- Lk 8348 (extracto total)	0,084 ± 0,001
SLP- Cd LiCl (sobrenadante)	0,003 ± 0,007
SLP- Cd GnCl (sobrenadante)	0,48 ± 0,02
SLP- Lk 8348 (sobrenadante)	0,03 ± 0,02

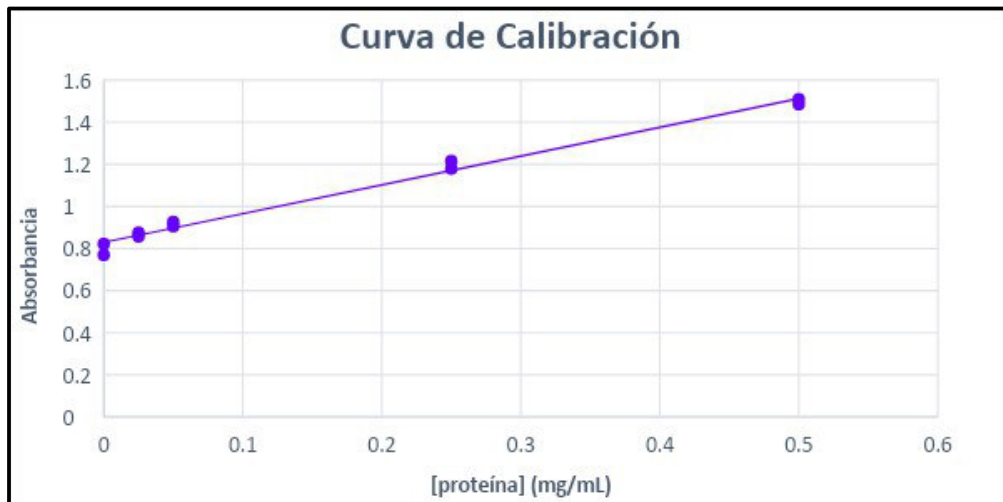
\*por encima del rango lineal de la curva de calibración

La *Tabla 6* muestra las concentraciones de proteínas de capa S calculadas a partir de la curva de calibración de las diferentes extracciones realizadas (*Figura 8*). Se puede observar que la separación de las SLP-Cd con GnCl 5 M presenta un mayor rendimiento que la extracción con LiCl 5M, como se esperaba luego de realizado el SDS-PAGE. La concentración de las SLP- Lk es la esperada según el protocolo de extracción utilizado, de acuerdo a los resultados previos obtenidos en el laboratorio (Malamud *et al.*, 2018).

La extracción de capa S de *C. difficile* con GnCl fue probado en este trabajo para evaluar el rendimiento de extracción comparado con LiCl. Como particularidad, una vez hecha la separación y centrifugación de capa S con GnCl, previa diálisis, se pudo observar el pellet

obtenido de color gris-negruzco y el sobrenadante translúcido amarillento, en comparación con el extracto translúcido blanquecino obtenido con LiCl.

Por otro lado, se observan diferencias en la concentración de proteínas de los extractos totales y de los sobrenadantes cuando se usa LiCl, mientras que dicha diferencia es menor cuando la extracción se realiza con GnCl. Esto podría estar relacionado a diferencias en el grado de agregación de las SLP extraídas con ambos agentes caotrópicos debido a la presencia de distintos componentes que se extraen junto con las SLP en cada caso.



**Figura 8:** Curva de Calibración a partir de diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina (proteína patrón).

Considerando los resultados de la cuantificación de proteínas totales y los perfiles de SDS-PAGE de los distintos extractos de SLP-Cd, se seleccionó el extracto de SLP-Cd con GnCl para la realización de los ensayos de activación celular.

## 2. Ensayo celular y medición de IL-6 por la técnica ELISA

Uno de los productos secretados por las células presentadoras de antígeno, en forma transitoria, son las citoquinas, proteínas de bajo peso molecular que median la comunicación intercelular. Algunas de ellas intervienen en la respuesta inflamatoria y sistémica. Entre ellas, la IL-6 es una citoquina secretada producto de la activación de estas

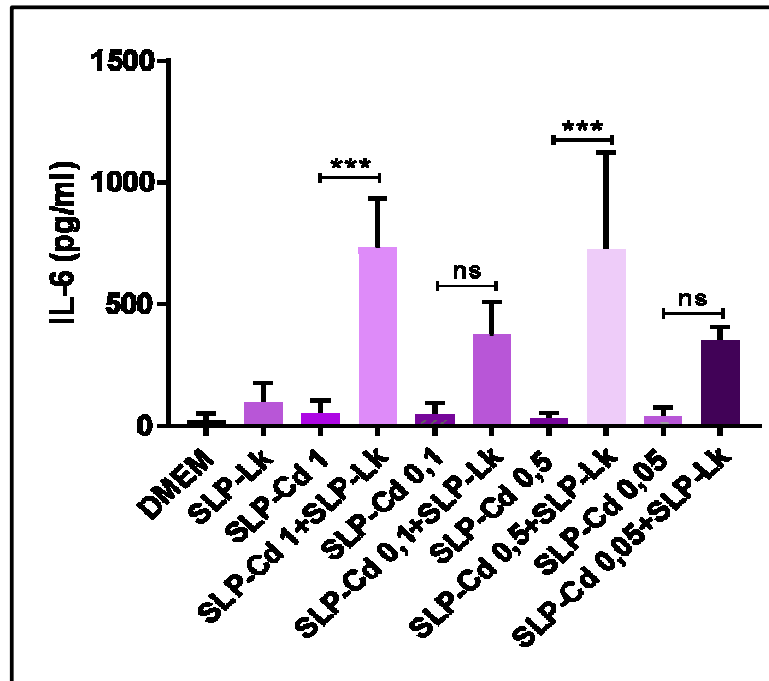
células del sistema inmune innato que participa a nivel local junto a otros mediadores (IL-1, TNF- $\alpha$ ) en el incremento de la permeabilidad vascular, el reclutamiento de células *natural killer*, mastocitos y neutrófilos, maduración y migración a órganos linfáticos de células dendríticas, etc. A nivel sistémico, las principales acciones inflamatorias de la IL-6 involucran la producción de proteínas de fase aguda por los hepatocitos, el incremento de la temperatura corporal y neutrofilia (Fainboim & Geffner, 2017). Por lo tanto, la IL-6 es un buen marcador de activación de diferentes poblaciones de células presentadoras de antígeno, entre las que se encuentran los macrófagos.

En resultados previos reportados por Malamud y col. (2018) sobre ensayos de estimulación de células RAW 264.7, las proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 (SLP-Lk), captados por el receptor CLR-Mincle, no han mostrado capacidad de activar dichas células. Sin embargo, al combinar el estímulo de LPS (agonista TLR-4) con SLP-Lk, ha mostrado un aumento de la señal de activación con concentraciones de IL-6 mayores que incubando los macrófagos con el LPS solo, mostrando el sinergismo de ambos estímulos, a pesar de los diferentes perfiles de estimulación de la SLP-Lk y el LPS por separado. Teniendo en cuenta que la SLP-Cd señala a través de TLR-4 (Ryan *et al.*, 2011), decidimos analizar el efecto estimulador sobre macrófagos murinos en presencia o ausencia de SLP-Lk.

En este trabajo, en los dos primeros ensayos de estimulación se incubaron los macrófagos de la línea celular RAW 264.7 con las SLP-Cd extraídas con GnCl a concentraciones de 1; 0,5; 0,1 y 0,05  $\mu\text{g/ml}$  por un lado, y por otro, las mismas concentraciones de SLP-Cd combinadas con las SLP-Lk a 10 $\mu\text{g/ml}$ . Los controles se realizaron con DMEM y SLP-Lk 10 $\mu\text{g/ml}$ . La respuesta a la estimulación celular con las diferentes concentraciones de proteínas de capa S se evaluó midiendo la concentración de IL-6 en el sobrenadante del cultivo celular a las 24 hs. del inicio de la incubación con los estímulos.

En la *Figura 9*, se puede observar una muy baja respuesta celular al estímulo solo con las SLP-Cd, observándose el mismo patrón frente a la estimulación con las SLP-Lk sola y sin registrarse diferencias significativas frente al control negativo ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, se observa un aumento significativo de la concentración de IL-6 y, por lo tanto, de la respuesta celular, en las condiciones donde las células se estimularon con SLP-Cd 0,5 y 1  $\mu\text{g/ml}$  y SLP-Lk simultáneamente ( $p < 0,001$ ). Cuando se incubó con SLP-Cd a menor concentración (0,05 y 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) en presencia de SLP-Lk, se observa una tendencia en el

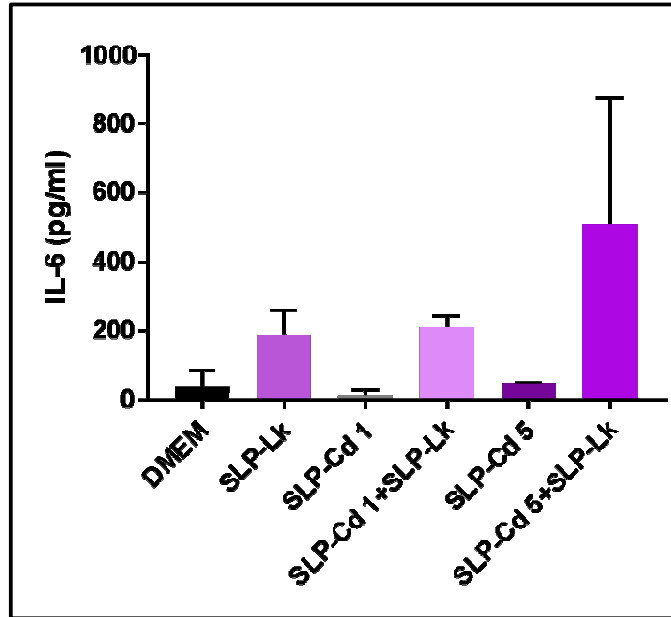
incremento de secreción de IL-6 pero las diferencias no son estadísticamente significativas.



**Figura 9:** Concentración de IL-6 en sobrenadantes de cultivo celular de la línea RAW 264.7 incubadas con SLP- Cd a diferentes concentraciones (0,05; 0,1; 0,5 y 1  $\mu\text{g/ml}$ ) y en combinación con SLP-Lk 10  $\mu\text{g/ml}$ . \*\*\* $p < 0,001$ ; ns: no significativo.

Estos resultados ponen en evidencia el efecto sinérgico que se produjo al exponer a los macrófagos a ambos estímulos.

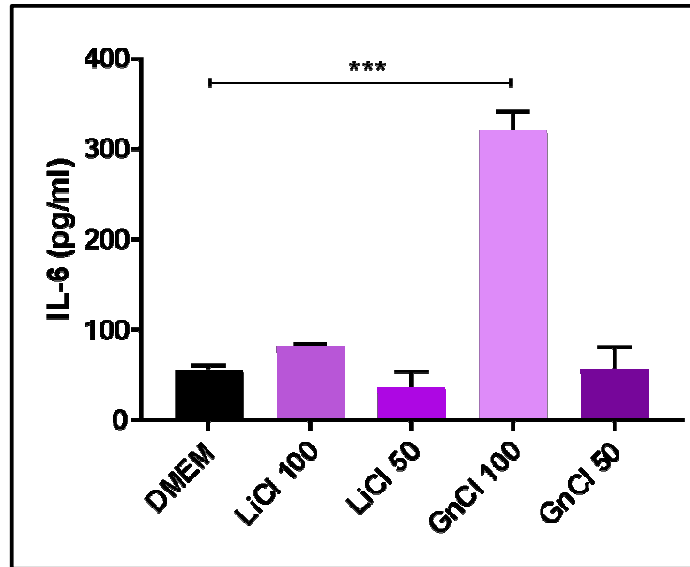
Dado que no pudimos observar activación al estimular con SLP-Cd sola, en una segunda tanda de ensayos se aumentó la concentración de SLP- Cd a 5  $\mu\text{g/ml}$ , mostrando el mismo perfil de respuesta que en los primeros ensayos. Es decir, al incubar las células con las SLP-Cd no se observó activación, mientras que con la combinación de las SLP de *C. difficile* y *L. kefir*, pareciera observarse un aumento de la secreción de IL-6, aunque dada la gran dispersión de los datos experimentales obtenidos en este caso, no se observan diferencias estadísticamente significativas (Figura 10).



**Figura 10:** Concentración de IL-6 en sobrenadantes de cultivo celular de la línea RAW 264.7 estimuladas con SLP- Cd a 1 y 5  $\mu\text{g/ml}$ , y combinadas con SLP-Lk 10  $\mu\text{g/ml}$ .

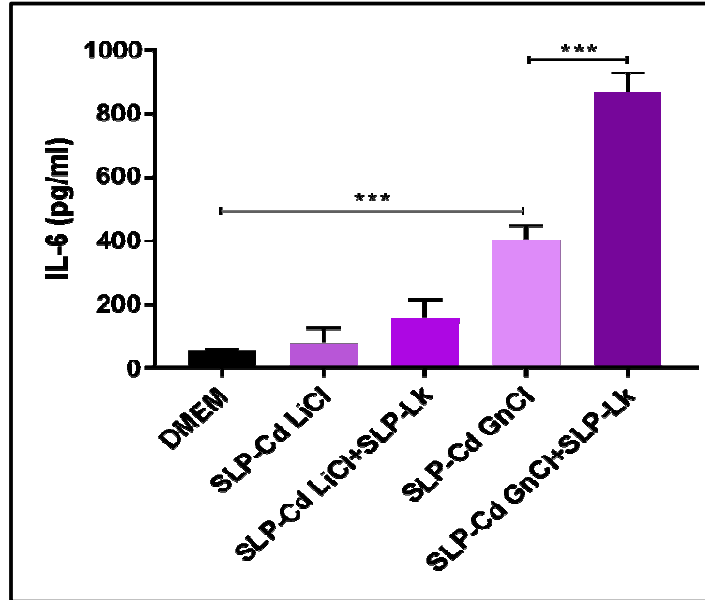
Si bien se evidenció el efecto sinérgico entre ambas proteínas de capa S, hasta aquí no se pudo observar estimulación de las células RAW 264.7 con SLP-Cd en forma individual, lo cual podría deberse en principio, a que la cantidad de SLP-Cd no fue suficiente para generar una respuesta, o bien el tipo de protocolo de extracción utilizado influyó en la actividad de la SLP-Cd. Por lo tanto, se realizó un tercer ensayo que incluyó además de las proteínas de capa S de *C. difficile* extraídas con GnCl, las SLP-Cd extraídas con LiCl 5 M (M&M 3.1) en este trabajo. Además, se probaron concentraciones aún mayores de SLP-Cd.

De acuerdo a lo que se muestra en la *Figura 11*, solo se observó un aumento significativo de la IL-6 secretada ( $p < 0,001$ ) cuando las células fueron estimuladas con 100  $\mu\text{g/ml}$  de la SLP-Cd extraída con GnCl 5M, lo que sugiere que tanto la concentración como la calidad del extracto obtenido podrían influir en la actividad inmunoestimuladora observada sobre los macrófagos.



**Figura 11:** Concentración de IL-6 en sobrenadantes de cultivo celular de la línea RAW 264.7 estimuladas con SLP- Cd extraídas con LiCl 5M y GnCl 5M, a 50 y 100 µg/ml. \*\*\* $p < 0,001$ .

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se llevó a cabo un último ensayo en el que se incluyeron los estímulos simultáneos con la SLP-Lk a 10 µg/ml y con la SLP-Cd a 100 µg/ml. En este caso, se pudo evidenciar un aumento estadísticamente significativo de IL-6 cuando se incubaron las células murinas con SLP-Cd separadas con GnCl 5M en comparación con la extracción con LiCl 5M y, además, se puede ver un aumento en la respuesta de activación cuando se expusieron a las células a ambos estímulos en forma simultánea con un  $p$  valor  $< 0,001$  con respecto a la activación por SLP-Cd de manera individual.



**Figura 12:** Concentración de IL-6 en sobrenadantes de cultivo celular de la línea RAW 264.7 estimuladas con SLP- Cd extraídas con LiCl 5M y GmCl 5M a 100 µg/ml, y combinadas con SLP-Lk 10 µg/ml. \*\*\* $p < 0,001$ .

A partir de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos, habiendo logrado encontrar una condición de estimulación de las células RAW 264.7 con la cual, se produce una respuesta estadísticamente significativa al exponerlas por un lado con proteínas de capa S de *C. difficile* y por otro, con la incubación en simultáneo con proteínas de capa S de *L. kefir* mostrando el efecto sinérgico a ambos estímulos, se pretende continuar con el estudio de otros marcadores de activación secretadas, como la citoquina TNF- $\alpha$  por ejemplo, o la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40- CD86) y moléculas MHC II en la superficie de los macrófagos mediante citometría de flujo.

## **CONCLUSIONES**

- Durante la realización del presente trabajo, se ha obtenido una mejor performance de extracción de proteínas de capa S de *C. difficile* con GnCl 5M, respecto a la extracción con LiCl 5M tanto en el rendimiento en cantidad de proteínas (Bradford), como en la calidad de las mismas (SDS-PAGE).
- A pesar de haber presentado un buen rendimiento de proteínas en la extracción, las SLP-Cd extraídas con GnCl no mostraron actividad inmunoestimuladora sobre las células presentadoras de antígeno utilizadas (RAW), a concentraciones entre 0,05 y 50 µg/ml, ya que no se observó aumento significativo de la secreción de IL-6. La respuesta celular frente a SLP-Cd solo se pudo observar a una concentración máxima de 100 µg/ml.
- En diferentes condiciones experimentales (diferentes concentraciones de SLP-Cd extraídas con GnCl) se puso en evidencia el efecto sinérgico con la SLP-Lk, tal como había sido reportado previamente por el grupo de trabajo con distintos agonistas de TLRs.
- La capacidad sinérgica de SLP-Lk junto a SLP-Cd de activar macrófagos murinos evidenciada por un aumento en la concentración de IL-6 secretada con respecto a la condición de estimulación con SLP-Cd sola, nos brinda herramientas para pensar en las SLP-Lk como potenciales adyuvantes vacunales provenientes de un microorganismo no patógeno.
- Además de evaluar la capacidad adyuvante de las SLP-Lk, la activación celular lograda a partir de las proteínas superficiales de *C. difficile* nos alienta a pensar que podría ser un buen candidato como antígeno para posibles terapias profilácticas inmunológicas para la prevención de infecciones causadas por este patógeno, aunque habría que optimizar la extracción de proteínas de capa S y realizar ensayos *in vivo* para evaluar respuesta humoral y celular antígeno-específica.

## ANEXOS

### 1. Soluciones Buffer: composición

#### 1.1 Soluciones utilizadas en la electroforesis:

##### ✓ *Buffer 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= 8,8

##### ✓ *Buffer muestra 4x:*

Buffer de apilamiento.....2,5 ml

SDS..... 1 g

Glicerol..... 2 ml

Azul de bromofenol..... pizca

En un volumen final de 10 ml con agua desionizada.

## ***1.2 Soluciones Buffer utilizadas en el ensayo de captura:***

### ***✓ Buffer de captura:***

NaHCO<sub>3</sub>..... 0,3565 g

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>..... 0,0795 g

pH= 9,5

En un volumen final de 50 ml con agua destilada.

### ***✓ Buffer Citrato:***

Ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) .....0,1 M

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 0,1 M

### ***✓ Buffer fosfato salino (PBS):***

NaCl.....9,0 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,144 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0,795 g

Dilución en agua destilada hasta volumen final de 1000ml.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Ausiello, C.M., Cerquetti, M., Fedele, G., Spensieri, F., Palazzo, R., Nasso, ... Mastrantonio, P. (2006) Surface layer proteins from *Clostridium difficile* induce inflammatory and regulatory cytokines in human monocytes and dendritic cells. *Microbes and Infection*, 8, 2640–2646. DOI: 10.1016/j.micinf.2006.07.009
- Bianco, M., Fedele, G., Quattrini, A., Spigaglia, P., Barbanti, F., Mastrantonio, P. y Ausiello, C.M. (2011) Immunomodulatory activities of surface-layer proteins obtained from epidemic and hypervirulent *Clostridium difficile* strains. *Journal of Medical Microbiology*, 60(8), 1162-1167. DOI: 10.1099/jmm.0.029694-0
- Blasius, A.L. and Beutler, B. (2010) Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, 32(3), 305-315. doi:10.1016/j.immuni.2010.03.012
- Bouza, E., Muñoz, P. y Alonso, R. (2005) Clinical manifestations, treatment and control of infections caused by *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(4), 57-64. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2005.01165.x
- Bradshaw, W.J., Roberts, A.K., Shone, C.C. and Acharya, K. R. (2018). The structure of the S-layer of *Clostridium difficile*. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 12(1), 319-331. doi: 10.1007/s12079-017-0429-z
- Carasi, P. (2014). Potencialidad probiótica de lactobacilos con capa S. Estudios sobre la inocuidad, efecto antimicrobiano y capacidad inmunomodulatoria de *Lactobacillus kefir*. Tesis Doctoral. UNLP. DOI: <https://doi.org/10.35537/10915/43573>
- Celhar, T., Magalhaes, R. and Fairhurst, A.M. (2012) TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong. *Immunology Research*, 53, 58–77. doi:10.1007/s12026-012-8270-1
- Dapa, T., Leuzzi, R., Ng Y.K., Baban, S.T., Adamo, R., Kuehne, S, A.,... Unnikrishnan M. (2013). Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology*, 195(3), 545–555. DOI: 10.1128/JB.01980-12

- Engelhardt, H. (2007). Are S-layers exoskeletons? The basic function of protein surface layers revisited. *Journal of Structural Biology*, 160 (2), 115-124. DOI: 10.1016/j.jsb.2007.08.003
- Fainboim, L. and Geffner, J. (2017). *Introducción a la Inmunología Humana*. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana.
- Farjadian, F., Moghoofei, M., Mirkiani, S., Ghasemi, A., Rabiee, N., Hadifar S., ... Hamblin M.R. (2018). Bacterial components as naturally inspired nano-carriers for drug/gene delivery and immunization: Set the bugs to work?. *Biotechnology Advances*, 36(4), 968-985. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.02.016
- Garrote, G.L., Delfederico, L., Bibiloni, R., Abraham, A.G., Pérez, P.F., Semorile, L. y De Antoni, G.L. (2004) Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins. *Journal of Dairy Research*, 71, 222–30. DOI: 10.1017/s0022029904000160
- Gerbino, E., Carasi, P., Mobili, P., Serradell, M.A. y Gómez-Zavaglia, A.(2015). Role of S-layer proteins in bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(12), 583-92. DOI: 10.1007/s11274-015-1952-9
- Gornati, L., Zanoni, I. and Granucci, F. (2018) Dendritic Cells in the Cross Hair for the Generation of Tailored Vaccines. *Frontiers in Immunology*. 9,1484. doi:10.3389/fimmu.2018.01484
- Gram, H. (1884). Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten: in Schnitt-und Trockenpräparaten. *Fortschritte Der Medicin*, 2, 185–189.
- Hynönen, U. and Palva, A. (2013). Lactobacillus surface layer proteins: structure, function and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(12), 5225–43. DOI: 10.1007/s00253-013-4962-2
- Houwink, A.L. (1953). A macromolecular mono-layer in the cell wall of *Spirillum* spec. *Biochimica et Biophysica Acta*, 10, 360-366.
- Ilk, N., Egelseer, E.M. and Sleytr, U.B. (2011). S-layer fusion proteins — construction principles and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 824-31. DOI 10.1016/j.copbio.2011.05.510

- Itano, A.A., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Ehst, B.D., Ingulli E., Rudensky, A.Y. and Jenkins, M.K. (2003). Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity*, 19(1), 47–57. doi:10.1016/S1074-7613(03)00175-4
- Kawai, T. and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11, 373-384. doi:10.1038/ni.1863
- Kawasaki, T. and Kawai, T. (2014) Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*. 5,461. doi:10.3389/fimmu.2014.00461
- Kumar, H., Kawai, T. and Akira S. (2009) Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(4), 621-625. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.08.062
- Legaria, M.C., Lumelsky, G. y Rosetti S. (2003). Clostridium difficile-associated diarrhea from a general hospital in Argentina. *Anaerobe*, 9(3), 113-116. DOI: 10.1016/S1075-9964(03)00088-X
- Legaria, M.C., Rollet, R., Di Martino, A., Castello, L., Barberis, C., Rosetti, M.A., ... Predari, S. (2017). Detección de Clostridioides [Clostridium] difficile toxigénico: utilidad de dos métodos de enzimoimmunoensayo comerciales y una PCR en las muestras de materia fecal y en los respectivos aislamientos. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1), 36-44. doi:10.1016/j.ram.2017.01.002
- 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. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.06.008.
- Malamud, M. (2019) “Proteínas superficiales de bacterias lácticas con potencialidad biotecnológica: estudios estructurales y funcionales de las proteínas de capa S de *Lactobacillus kefir*”. Tesis doctoral. UNLP. DOI: <https://doi.org/10.35537/10915/77909>
- Malamud, M., Carasi, P., Bronsoms, S., Trejo, S.A. y Serradell, M.A. (2017). *Lactobacillus kefir* shows inter-strain variations in the amino acid sequence of the S-layer proteins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110 (4), 515-530.

- Malamud, M., Carasi, P., Freire, T. y Serradell, M.A. (2018). S-layer glycoprotein from *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 enhances macrophages response to LPS in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495, 1227-1232. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.127
- 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. doi: 10.3389/fimmu.2019.01422
- McFarland, L.V., Ozen, M., Dinleyici, E.C. and Goh, S. (2016). Comparison of pediatric and adult antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *World Journal Gastroenterology*, 22(11), 3078-3104. doi: 10.3748/wjg.v22.i11.3078
- Navalkele, B.D. and Chopra, T. (2018). Bezlotoxumab: an emerging monoclonal antibody therapy for prevention of recurrent *Clostridium difficile* infection. *Biologics*, 12, 11–21. doi: 10.2147/BTT.S127099.
- Oatley, P., Kirk, J.A., Ma, S., Jones S. and Fagan, R.P. (2018). Spatial organization of *Clostridium difficile* S-layer biogenesis. *Biorxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/405993>
- Owens, R.C., Donskey, C.J., Gaynes, R.P., Loo, V.G. and Muto, C.A. (2008) Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases*, 46 (1), S19-31. doi: 10.1086/521859.
- Péchiné, S., Bruxelles, J.F., Janoir, C. and Collignon, A. (2018) Targeting *Clostridium difficile* Surface Components to Develop Immunotherapeutic Strategies Against *Clostridium difficile* Infection. *Frontiers in Microbiology*, 9,1009. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01009
- Roitt, I.M., Delves, P., Martin, S., Burton, D. (2017). *Essential Immunology*. Chichester, West Sussex, England. Panamericana. 13<sup>o</sup>ed.
- Ryan, A., Lynch, M., Smith, S.M., Amu, S., Nel, H.J., McCoy, C.E., ...Loscher, C.E. (2011) A Role for TLR4 in *Clostridium difficile* Infection and the Recognition of Surface Layer Proteins. *PLOS Pathogens*, 7(6), e1002076. doi:10.1371/journal.ppat.1002076.

- Sancho, D. and Reis e Sousa, C. (2012) Signaling by Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Homeostasis. *Annual Review of Immunology*. 30, 491-529. DOI: 10.1146/annurev-immunol-031210-101352
- Sára, M. and Sleytr, U. B. (2000). S-Layer proteins. *Journal of bacteriology*, 182(4), 859– 868. DOI: 10.1128/JB.182.4.859-868.2000
- Schäffer, C. and Messner, P. (2004). Surface-layer glycoproteins: an example for the diversity of bacterial glycosylation with promising impacts on nanobiotechnology. *Glycobiology*, 14(8), 31R–42R. DOI: 10.1093/glycob/cwh064
- Schuster, B. and Sleytr, U.B. (2013). Nanotechnology with S-Layer Proteins. *Methods in Molecular Biology*, 996, 153-75. DOI: 10.1007/978-1-62703-354-1\_9
- Sleytr, U.B., Schuster, B., Egelseer, E.M. and Pum, D. (2014). S- layers: principles and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 823–864. DOI: 10.1111/1574-6976.12063
- Takeuchi, O. and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140, 805-820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
- Thaiss, C.A., Levy, M., Itav, S. and Elinav, E. (2016) Integration of Innate Immune Signaling. *Trends in Immunology*, 37(2), P84-101. DOI:https://doi.org/10.1016/j.it.2015.12.003
- Wang, B., Kraig, E. and Kolodrubetz, D. (2000) Use of defined mutants to assess the role of the *Campylobacter rectus* S-layer in bacterium epithelial cell interactions. *Infection and Immunity*, 68, 1465–1473.
- Wang, X.Y., Wang, D.B., Zhang, Z.P., Bi, L.J., Zhang, J.B., Ding, W. and Zhang, X.E. (2015). A S-Layer Protein of *Bacillus anthracis* as a Building Block for Functional Protein Arrays by In Vitro Self-Assembly. *Small*, 11(48), 5826-5832. DOI: 10.1002/smll.201501413
- Wright, A., Drudy, D., Kyne, L., Brown, K. y Fairweather, N.F. (2008). Immunoreactive cell wall proteins of *Clostridium difficile* identified by human sera. *Journal of Medical Microbiology*, 57(6), 750–756. DOI: 10.1099/jmm.0.47532-0
- Zea, J. W. y Salazar, C.L. (2012). Enfermedad asociada a *Clostridium difficile*:

prevalencia y diagnóstico por laboratorio. *Infection*, 16(4), 211-222