

**EVALUACIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DE PROTEÍNAS PEGILADAS
PROBIÓTICAS EN CÉLULAS INTESTINALES HUMANAS Y SU EFECTO EN
LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN CELULAR OCLUDINA**



MARÍA CAMILA MARTÍNEZ LUNA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar por el título de:

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS – DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C
2021**

**EVALUACIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DE PROTEÍNAS PEGILADAS
PROBIÓTICAS EN CÉLULAS INTESTINALES HUMANAS Y SU EFECTO EN
LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN CELULAR OCLUDINA**

MARÍA CAMILA MARTÍNEZ LUNA

Juan Carlos Ulloa Rubiano, PhD

Director

Claudia Patricia Urueña Garzón

Jurado

Alba Alicia Trespalacios, Ph.D

Decana - Facultad de Ciencias

Marcela Franco, Ph.D

Directora de Programa

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la mora católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo 23 de la Resolución N°13 de Julio de 1996

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Carlos Ulloa por darme la oportunidad y confianza para realizar este trabajo de investigación.

A mi familia por siempre estar conmigo y apoyarme sin importar que.

A mis amigas por estar conmigo durante todos estos años apoyándome y ayudándome cuando más lo necesite.

A mis compañeras del Laboratorio de Virología por su apoyo y paciencia.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	8
1. PROBLEMA	9
2. JUSTIFICACIÓN	11
3. MARCO TEÓRICO	12
3.1 ROTAVIRUS	12
3.2 BACTERIAS PROBIÓTICAS PARA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE EDA	13
3.3 OCLUDINA	13
3.4 PEGILACIÓN	14
3.5 ANTECEDENTES	14
4. OBJETIVOS.....	16
5. METODOLOGÍA	17
5.1 DETERMINACIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DE PPEGBA EN CÉLULAS INTESTINALES HUMANAS POLARIZADAS - C2BBE1.....	17
5.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO PRODUCIDO POR LAS PPEGBA EN LA SOBREPDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA OCLUDINA PRESENTE EN LAS UNIONES ESTRECHAS CELULARES EN CÉLULAS INTESTINALES HUMANAS POLARIZADAS - C2BBE1	16
6. RESULTADOS	19
6.1 Determinación de la internalización de PPEGBa en células intestinales humanas polarizadas - C2BBel	19
6.2 Determinación del efecto producido por las PPEGBa en la sobreproducción de la proteína ocludina presente en las uniones estrechas celulares en células intestinales humanas polarizadas - C2BBel.....	20
7. DISCUSIÓN.....	22
8. CONCLUSIONES.....	24
9. REFERENCIAS.....	25

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia de fluorescencia de células epiteliales C2BBel previamente polarizadas en laminillas, con 0.98 ug de metabolitos PEGilados de interés.....	19
Figura 2. Efecto de la administración de PPEGBa sobre la cantidad de la proteína de unión intercelular ocludina producida por células intestinales humanas polarizadas - C2BBel.....	20
Figura 3. Efecto de la administración de PPEGBa sobre la cantidad de la proteína de unión intercelular ocludina producida por células intestinales humanas polarizadas - C2BBel.....	21

RESUMEN

En los últimos años, el estudio de probióticos para el tratamiento de la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) en niños ha sido de gran interés debido a múltiples estudios que sugieren que estos poseen actividad anti-rotavirus y poseen la capacidad de reducir el tiempo de la diarrea. El grupo de investigación en virología de la Pontificia Universidad Javeriana ha realizado estudios de la actividad anti-rotavirus y del efecto citotóxico en células intestinales C2BBe1 ejercidos por proteínas PEGiladas procedentes del secretoma de *Bifidobacterium adolescentis* a partir de los cuales se obtuvo una reducción de la infección viral, no se observó efecto citotóxico y particularmente, se observó que podrían producir un aumento de la proteína de unión celular ocludina. Así, a partir de lo anterior surgió la pregunta de si estas proteínas pueden internalizarse en las células para producir el efecto de aumento de ocludina, al igual que la necesidad de cuantificar este efecto, recordando además, que están recubiertas de polietilenglicol de alta densidad y por tanto, teóricamente no deberían entrar. A partir de lo anterior, en este trabajo se buscó evaluar la capacidad de internalización de las proteínas PEGiladas del secretoma de *B. adolescentis* (PPEGBa) en las células intestinales polarizadas C2BBe1, por medio del marcaje fluorescente y observación de las proteínas, además de su efecto en la expresión de la proteína ocludina por medio de la cuantificación de ocludina total por fluorometría. Se determinó que las PPEGBa se acumulan en la periferia celular y además promueven la expresión de la proteína de unión celular ocludina. Estos resultados sugieren que las PPEGBa podrían tener la capacidad de fortalecer la barrera intestinal.

1. PROBLEMA

Cada año se reportan alrededor de 1.7 billones de casos asociados a la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) en infantes y se reporta la muerte de alrededor de 525.000 niños menores de cinco años anualmente debido a esta [1]. El principal agente causal de esta enfermedad es el rotavirus, al cual se le asocia con alrededor del 29.5% de los reportes de EDA [2].

Para la prevención de la infección por rotavirus, se han desarrollado dos vacunas que son distribuidas a nivel mundial, Rotarix y Rotateq sin embargo, estas han demostrado no ser 100% efectivas, en especial en países de bajo desarrollo económico pertenecientes al continente africano, donde se da alrededor del 80% de los casos mortales por rotavirus a nivel mundial y la efectividad de las vacunas no es mayor al 64.2%, debido a las condiciones de la microbiota del hospedero, su nutrición y genética, además del reordenamiento genético de las cepas vacunales con cepas silvestres [3-5]. Además, los tratamientos usados para contrarrestar la infección no específicos contra el virus, se trata en cambio de la reposición de electrolitos con sales de hidratación oral y en algunos casos además inhibidores de la motilidad intestinal como la loperamida [6].

Debido a esto, en los últimos años, las bacterias probióticas han sido de gran interés para el tratamiento de la EDA debido a múltiples estudios que sugieren que estas poseen la capacidad de reducir el tiempo de la diarrea, modular la microbiota intestinal y la respuesta inmune, y sus metabolitos poseen actividad antirotaviral y probablemente capacidad de fortalecer las uniones estrechas celulares [7-10]. A pesar de los beneficios que se sugiere que poseen los probióticos, los resultados de su uso pueden variar debido a las condiciones del microbioma del hospedero y su nutrición, e incluso pueden generar infecciones bacterianas y disbiosis en neonatos de bajo peso, pacientes enfermos, hospitalizados o inmunocomprometidos, por lo que las autoridades médicas como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos, no han aprobado su uso bajo la modalidad de terapéutico [11].

El uso de metabolitos previene los posibles riesgos de usar bacterias probióticas, algunos metabolitos proteicos secretados por probióticos poseen la capacidad de proteger las células al atenuar efectivamente la adherencia de patógenos o prevenir la disrupción de las uniones estrechas celulares [12]. Por otra parte, la PEGilación de proteínas (Adición de PoliEtilen Glicol - PEG) es un proceso ampliamente usado para mejorar las

propiedades fisicoquímicas de las proteínas, mejorar su estabilidad, disminuir la proteólisis, entre otras características, que se definen además de acuerdo al peso molecular del PEG utilizado y por tanto, su comportamiento bioquímico y funcionalidad deben ser estudiadas. Ha sido reportado, que el PEG de alto peso molecular como el PEG 8.000 utilizado en este trabajo, otorga propiedades bioquímicas importantes como mayor hidrofiliidad pero también hidrofobicidad (anfiliidad), lo que significa que sus interacciones pueden ser variables de acuerdo a las características del medio en el que se encuentren [15,44]. Asimismo, se ha deducido que el PEG de alto peso molecular , no es absorbido fácilmente por el intestino por lo que su adición puede no permitir la internalización de las proteínas PEGilada con este. No obstante, y de ser así, el mecanismo de actividad antirotaviral podría incluir el bloqueo de receptores celulares ubicados en la cara externa de las membranas celulares y, por otra parte, este mismo mecanismo podría ser utilizado para aumentar la expresión de proteínas como la ocluida, aunque también, se ha reportado que el PEG tiene la capacidad de aumentar la proliferación de células intestinales in vitro, aspectos que deben ser analizados igualmente [42].

2. JUSTIFICACIÓN

El grupo de virología de la Pontificia Universidad Javeriana ha realizado ensayos *in vitro* donde se ha evaluado la actividad anti-rotavirus de metabolitos proteicos de bacterias probióticas como *Lactobacillus* sp y *Bifidobacterium* sp., a partir de los cuales se ha observado la inhibición del ciclo replicativo viral, así como la reducción de la proteína viral NSP4 y de la liberación de Ca^{2+} [13].

Adicionalmente, se realizaron estudios *in vitro* donde se determinó que las proteínas PEGiladas producidas por *Bifidobacterium adolescentis* (PPEGBa) no generan un efecto citotóxico en la línea celular intestinal C2BBE1 por medio de la evaluación de la actividad mitocondrial, ni producen alteraciones estructurales que disminuyan la resistencia eléctrica transepitelial y alteren la estabilidad de su citoesqueleto y uniones estrechas celulares; adicionalmente, los resultados de estos estudios sugieren que las PPEGBa podrían tener un efecto sobre la expresión de la proteína de unión celular ocludina debido a una valoración cualitativa en la que aparentemente se observa una mayor intensidad de fluorescencia por parte de la ocludina en las células tratadas con las PPEGBa [14]. A partir de lo anterior, para el presente trabajo se planteó la necesidad de evaluar la capacidad de internalización que pueden tener las proteínas PEGiladas en las células C2BBE1 y también, verificar el efecto de estas proteínas en el aumento de la producción de la proteína ocludina a través de su cuantificación después de realizar diferentes tratamientos.

Es conocido que las bacterias probióticas pueden fortalecer el intestino por medio de diferentes mecanismos como el aumento de la producción de mucinas [17], y por esto, es probable que las PPEGBa puedan estar involucradas en la sobreexpresión de la ocludina.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Rotavirus

El rotavirus es un virus desnudo perteneciente a la familia *Reoviridae* con una arquitectura compleja de tres cápsides concéntricas y con un genoma de 11 segmentos de ARN de cadena doble que codifican para seis proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7), que determinan la especificidad del hospedero, entrada celular y funciones enzimáticas necesarias para la transcripción y contienen epítopes que generan respuestas inmunes. Asimismo, codifica seis proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6), que se encuentran involucradas en la replicación del genoma y el antagonismo de la respuesta inmune innata (un papel particular para NSP1) e incluyen la enterotoxina viral NSP4 [18].

Es un virus de interés a nivel mundial al ser el principal causante de la EDA, enfermedad responsable de alrededor de 525.000 muertes de niños menores de cinco años anualmente, y aunque no posee un tratamiento contra su infección, se han desarrollado dos vacunas vivas orales para la prevención de su infección que son distribuidas a nivel mundial, rotarix y rotateq [1,2,18]. Debido a daño a la barrera mucosa, la diarrea provocada por el rotavirus puede ser una diarrea osmótica o una diarrea secretoria [18].

Las células epiteliales del intestino son las células blanco de la infección por rotavirus, estos se unen a los distintos receptores de las células del hospedero a través de la interacción con la proteína VP4; después de la unión inicial, VP7 y el dominio VP5 de la proteína VP4 pueden interactuar con varios co-receptores, que se concentran en balsas de lípidos para mediar la entrada viral. Dependiendo de la cepa de rotavirus, el virus se internaliza en las células por vías endocíticas dependientes o independiente de clatrina e independientes de caveolina. Los bajos niveles de calcio dentro del endosoma desencadenan la eliminación de la capa de la cápside externa, que libera la partícula de doble capa (DLP) transcripcionalmente activa en el citoplasma [18]. El ARNm viral se usa para la traducción o como molde para la síntesis de ARN durante la replicación del genoma; el ARN luego se empaqueta en nuevos DLP dentro de viroplasmos. El ensamblaje de partículas de triple capa implica la unión de las DLP recién formadas a la proteína no estructural 4 (NSP4), que sirve como receptor intracelular, seguida de la gemación de las DLP en el retículo endoplásmico (RE). En el RE, las partículas transitorias envueltas y las proteínas de la cápside externa VP4 y VP7 se agregan a las

DLP. Finalmente, se pierde la envoltura, las partículas de virus maduran y los viriones de la progenie se liberan de las células a través de la lisis celular principalmente [18].

3.2 Bacterias probióticas para prevención y tratamiento de EDA

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) definen a los probióticos como “microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas pueden traer beneficios a la salud del hospedero”. Los probióticos han demostrado ser efectivos contra enfermedades inflamatorias y diarreas, tener un efecto en la modulación y establecimiento de la microbiota intestinal y mejorar la maduración de los sistemas inmunológicos innatos y adaptativos [8]. Los principales mecanismos de acción de las bacterias probióticas reportados contra los patógenos son la producción de compuestos como peróxido de hidrogeno y bacteriocinas, disminución de pH, incremento de la producción de IgA y la inhibición de la adherencia de patógenos a la mucosa intestinal al bloquear los puntos de unión de los patógenos [19].

Bacterias probióticas como *Lactobacillus* sp. y *Bifidobacterium* sp. han sido ampliamente estudiadas por su capacidad de fortalecer la barrera intestinal y modular la microbiota intestinal como métodos de prevención de actividad de virus enteropatógenos como el rotavirus y su posible uso como tratamiento en contra de estos al reducir el tiempo de síntomas como la diarrea aguda, el vómito y fiebre, y reducir [20 - 22].

3.3 Ocludina

La ocludina es una de las principales proteínas de las uniones estrechas celulares, un complejo multi proteico intramembranal que proporciona conexiones intercelulares entre células adyacentes del epitelio y endotelio [23]. La ocludina es fundamental para el adecuado funcionamiento de estas uniones ya que se ha sugerido que posee un papel importante en la estabilidad de las uniones estrechas celulares y en la permeabilidad paracelular selectiva; su sobre expresión mejora la resistencia eléctrica transepitelial y su baja concentración aumenta la permeabilidad endotelial [23, 24].

Se ha observado que durante la infección por enteropatógenos se da la disrupción y aumento de permeabilidad de las uniones estrechas celulares, lo cual puede llevar a una eventual bacteriemia al entrar estas a través de la barrera mucosa epitelial [25, 26].

Asimismo, durante la infección por rotavirus, se disminuye de manera significativa la presencia de la ocludina en comparación con otras proteínas de unión celular como la zona occludens, posiblemente debido a la interferencia de su transcripción; sumado a esto, el exceso de nutrientes y electrolitos por las células lisadas provocará una diarrea osmótica [18, 27].

3.4 PEGilación de proteínas

El PoliEtilenGlicol (PEG) es un poliéter lineal o ramificado y tiene en sus extremos grupos hidroxilo. Es sintetizado a partir de la polimerización de óxido aniónico; es anfipático, no tóxico, no inmunogénico y altamente soluble en agua y otros solventes orgánicos, el cual es comúnmente usado en la industria de alimentos y farmacéutica como emulsionante, espesante, agente de glaseado o antiespumante en productos como suplementos alimenticios o cápsulas [15, 16, 29, 30].

Una proteína PEGilada es una proteína que ha sido conjugada con una o más moléculas de PEG por medio de sus regiones N-terminal y/o regiones aminas del aminoácido lisina [15, 31]. Mediante este proceso se busca la mejora de propiedades fisicoquímicas de la proteína para prolongar su tiempo de residencia en el cuerpo, mejorar la estabilidad, aumentar la solubilidad, disminuir la proteólisis y excreción renal sin perder actividad biológica [15].

3.5 Antecedentes

Los probióticos han demostrado tener un potencial efecto en la prevención de la colonización de patógenos, inhibiendo su crecimiento y mejorando la inmunidad de los pacientes, por lo que se consideran alternativas para el tratamiento y/o disminución de la severidad de enfermedades infecciosas, incluyendo la infección por rotavirus [2].

El grupo de virología de la Pontificia Universidad Javeriana ha realizado estudios de la actividad anti-rotavirus por parte del secretoma proteico de *Bifidobacterium adolescentis* monitoreando la inhibición de ciclo viral por disminución de la expresión de proteínas de cápside y de la proteína viral NSP4, demostrando que reducen significativamente la infección *in vitro* por rotavirus [13]. También se han realizado estudios en los que se evaluó un posible efecto citotóxico por las proteínas PEGiladas del secretoma de *Bifidobacterium adolescentis* en la línea celular intestinal C2BBel1 por medio de la

evaluación de la actividad mitocondrial, la resistencia eléctrica transepitelial y de la estabilidad de su citoesqueleto y uniones estrechas celulares; en esta última se observó que las PPEGBa podrían tener un efecto sobre la expresión de la proteína de unión celular ocludina debido a una valoración cualitativa en la que aparentemente se observa una mayor intensidad de fluorescencia por parte de la ocludina de las células tratadas con las proteínas [14]

4. OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la capacidad de internalización de proteínas PEGiladas obtenidas del secretoma de *B. adolescentis* (PPEGBa) y su efecto sobre la expresión de la proteína de unión celular ocludina, en células intestinales humanas polarizadas - C2BBE1.

Objetivos Específicos

- Evaluar *in vitro* la capacidad de internalización de las PPEGBa en el citoplasma y/o núcleo celular de células intestinales humanas polarizadas - C2BBE1.
- Evaluar *in vitro* el efecto producido por las PPEGBa en la expresión de la proteína ocludina presente en las uniones estrechas celulares en células intestinales humanas polarizadas - C2BBE1.

5. METODOLOGÍA

5.1. Determinación de la internalización de PPEGBa en células intestinales humanas polarizadas - C2BBel.

Para conocer si las PPEGBa pueden internalizarse en células epiteliales intestinales humanas polarizadas (C2BBel-ATCC® 2102™: Adenocarcinoma de colon humano – subclon Caco2), estas fueron cultivadas sobre laminillas de vidrio de 6 mm con medio de cultivo Advanced DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium Gibco®/Cat # 12491-023) y suplementado con suero fetal bovino (SFB), L-glutamina y antibiótico/antimicótico durante 14 días en atmosfera húmeda y 5% de CO₂. Después de 14 días se adicionaron 0.98 µg de PPEGBa una única vez, previamente marcadas con Alexa Fluor® 647 Microscale Protein Labeling Kit (Thermo-Scientific) y se realizó una cinética de evaluación de la internalización a los 15, 30 y 60 minutos post administración, tiempo en el cual los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 2% durante a 15 min a temperatura ambiente (TA). Luego de 3 lavados con FACSFlow®, se adiciono ProLong™ Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher /Cat# P36930) para tener además co-tinción nuclear con DAPI y las laminillas se montaron en láminas portaobjetos para observación por microscopía de epifluorescencia utilizando un microscopio Zeiss HAL 100, con un objetivo 40X. Las fotografías fueron tomadas con el programa Zen 2.3 lite y analizadas con el programa Image J 1.53 para determinar la presencia de las PPEGBa dentro de las células intestinales tratadas, con respecto a las no tratadas. Como control negativo se usó medio de cultivo sin SFB, ni PPEGBa. Los experimentos fueron realizados 3 veces por duplicado.

5.2. Determinación del efecto producido por las PPEGBa en la sobreproducción de la proteína ocludina presente en las uniones estrechas celulares en células intestinales humanas polarizadas - C2BBel.

Mediante inmunotinción con anticuerpos fluorescentes contra ocludina (Occludin Antibody, Alexa Fluor® 594 conjugate - OC-3F10) en una concentración 1:2000, se evaluó el efecto que ejercen las PPEGBa sobre la sobreproducción de esta proteína. Se pusieron en contacto dos concentraciones de PPEGBa (250µg/mL y 125 µg/mL) por una única vez y a dosis repetidas 3 veces cada 24 horas, sobre células epiteliales intestinales humanas polarizadas (C2BBel-ATCC® 2102™: Adenocarcinoma de colon humano –

subclon Caco2) cultivadas en placas de 96 pozos negras, fondo claro, bajo las mismas condiciones indicadas para el objetivo anterior. Como control negativo se usó medio de cultivo sin SFB, ni PPEGBa. Finalmente se realizó la medición por fluorometría utilizando el fluorómetro FLUOstar omega, utilizando una longitud de onda de: 580 nm de excitación y 590 nm de emisión. Los experimentos fueron realizados 3 veces por duplicado.

Para el análisis estadístico los datos fueron procesados utilizando la prueba no paramétrica de u de Mann-Whitney, empleando un nivel de confianza del 95% (significancia <0.05). Estos análisis se realizaron por medio del programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).

6. RESULTADOS

6.1 Determinación de la internalización de PPEGBa en células intestinales humanas polarizadas - C2BBel.

Tras el procedimiento y observación de las imágenes tomadas de los distintos tiempos mostradas en la Figura 1., se observa, señalado con flechas amarillas, que las proteínas marcadas de rojo se acumularon en la periferia celular y el DAPI no ingresó a las células, sino que se acumuló junto con las proteínas PEGiladas alrededor de la periferia celular. Los controles negativos por otra parte presentan una tinción nuclear DAPI normal.

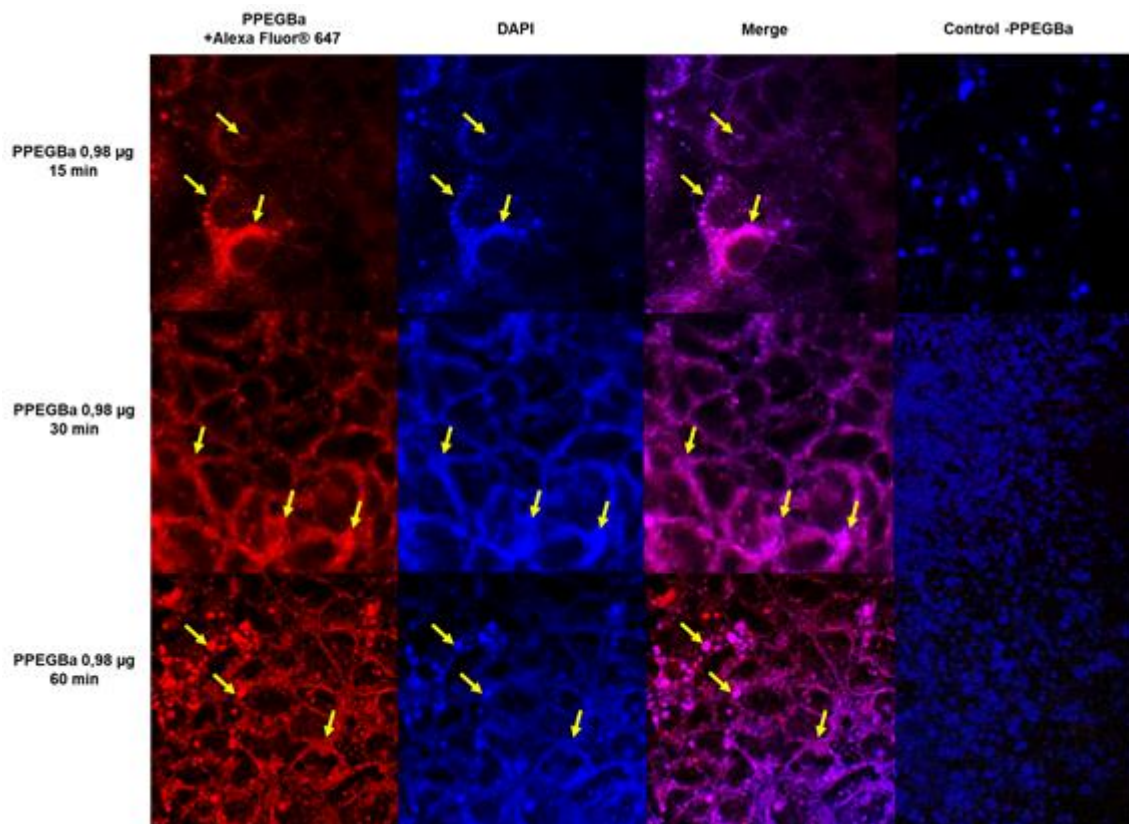


Figura 1. Microscopia de fluorescencia de células epiteliales C2BBel previamente polarizadas, tratadas con 0.98µg de proteínas PEGiladas del secretoma de *Bifidobacterium adolescentis*; el MOCK son células sin tratamiento. En la primera columna, en color rojo se observan las proteínas marcadas con Alexa Fluor® 647, en la segunda columna se observa en color azul una tinción con DAPI y en la tercera columna se observa un merge de las dos columnas anteriores

6.2 Determinación del efecto producido por las PPEGBa sobre la proteína ocludina en células intestinales humanas polarizadas - C2BBE1.

Finalmente, para la evaluación del efecto producido por las proteínas PEGiladas del secretoma de *B. adolescentis* (PPEGBa) en la expresión de la ocludina se realizaron dos tratamientos, tratamiento a dosis única (Figura 2) y tratamiento a dosis repetidas (Figura 3) por tres días utilizando dos concentraciones de 125µg/mL y 250µg/mL. Tras el tratamiento y análisis estadístico con la prueba U de Mann-Whitney, se observó un aumento no significativo de la cantidad de ocludina con un comportamiento dosis dependiente con el tratamiento a dosis única y, por otra parte, se observó una diferencia significativa entre el control negativo (MOCK) y el tratamiento a dosis repetidas a una concentración de 250µg/mL al presentar en promedio 222.183 Unidades de fluorescencia relativa (UFR) y 227.190 UFR, respectivamente.

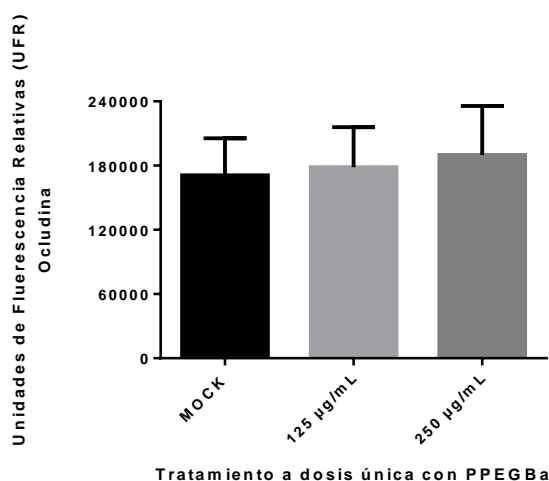


Figura 2. Efecto de la administración de PPEGBa sobre la cantidad de la proteína de unión intercelular ocludina producida por células intestinales humanas polarizadas - C2BBE1. Las PPEGBa fueron administradas por una única vez y a las 72 horas se cuantificó por fluorimetría la cantidad de ocludina marcada con Occludin Antibody, Alexa Fluor® 594. Los resultados se expresan en Unidades Relativas de Fluorescencia (URF). MOCK: Control celular basal, medio de cultivo sin suero fetal bovino, ni PPEGBa. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado. * $p < 0.05$ prueba U de Mann-Whitney por medio del programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).

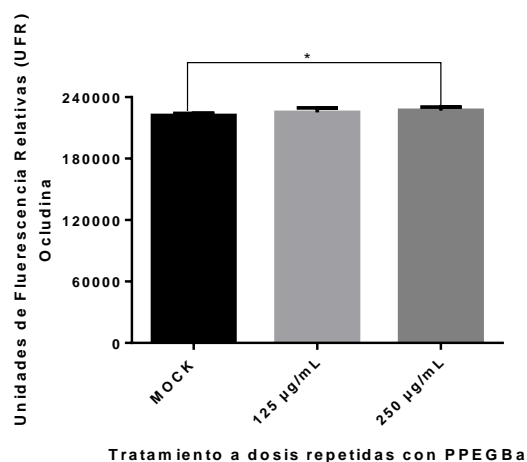


Figura 3. Efecto de la administración de PPEGBa sobre la cantidad de la proteína de unión intercelular ocludina producida por células intestinales humanas polarizadas - C2BBE1. Las PPEGBa fueron administradas a dosis repetida cada 24 horas y al tercer día se cuantificó por fluorimetría la cantidad de ocludina marcada con Occludin Antibody, Alexa Fluor® 594. Los resultados se expresan en Unidades Relativas de Fluorescencia (URF). MOCK: Control celular basal, medio de cultivo sin suero fetal bovino, ni PPEGBa. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado. * $p < 0.05$ prueba U de Mann-Whitney por medio del programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).

7. DISCUSIÓN

Estudios realizados en los últimos años, demuestran que proteínas de distinta naturaleza son capaces de internalizarse en células epiteliales intestinales por procesos de endocitosis por medio de la membrana apical [32-34]. Según lo observado en la Figura 1, las proteínas PEGiladas obtenidas del secretoma de *B. adolescentis* (PPEGBa) se adhieren a la periferia de las células intestinales C2BBE1; es posible que esta adhesión se de a la membrana debido a que el PEG, al ser de alto peso molecular y ser un compuesto anfipático, no es absorbido por el intestino sino que se adhiere a la membrana por su extremo hidrofílico, y por lo tanto, no puede internalizarse en las células intestinales humanas; esta alta densidad del PEG también podría ser la razón por la cual la tinción nuclear DAPI no logro entrar a la célula [16, 44].

Esta adhesión a la membrana celular no afecta de manera negativa a las células, ya que se ha demostrado que las proteínas PEGiladas obtenidas del secretoma de *B. adolescentis* no generan ningún efecto citotóxico por medio de la evaluación a la actividad mitocondrial y la resistencia eléctrica transepitelial a células tratadas con varias concentraciones de las PPEGBa [14]. A pesar de que no se han realizado ensayos diferentes de citotoxicidad como lo son la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y glutatión-s-transferasa, al estar la succinato deshidrogenasa ligada a la mitocondria, organelo celular encargado de funciones vitales como la producción de energía y la iniciación de la apoptosis celular, y no hay reducción de la proliferación celular, por lo que no hay un efecto negativo en el metabolismo celular [14, 35].

El epitelio intestinal es una capa intestinal con dos funciones esenciales para la salud humana, actúa como barrera para prevenir el paso de antígenos extraños, microorganismos y sus toxinas, y como filtro selectivo permitiendo la translocación de nutrientes esenciales, electrolitos y agua del lumen intestinal hacia el torrente sanguíneo [12, 36]. La permeabilidad paracelular es regulada por complejos intercelulares localizados a lo largo de la membrana lateral; entre estos se destacan las uniones estrechas celulares, complejos también de gran importancia para la integridad estructural de los tejidos [13,14].

El estudio del efecto de bacterias probióticas sobre las uniones estrechas celulares ha demostrado que la presencia de probióticos aumenta o regulan la expresión de algunas proteínas pertenecientes a este complejo, en especial la ocludina, tanto en experimentos

in vivo como *in vitro*, por lo que los resultados obtenidos y mostrados en la Figura 2 y la Figura 3 son coherentes con lo reportado en la literatura al presentar un aumento en la expresión de la ocludina e indican que los metabolitos producidos por estas bacterias pueden ser una de las principales causas de este efecto [10,37-40]. Este incremento puede deberse por una parte, debido a la presencia de los grupos aminos presentes en las proteínas, ya que compuestos orgánicos como las poliaminas han demostrado ser de importancia para la expresión de la ocludina, aunque estas se encuentren en una baja cantidad debido a la presencia del PEG; o debido a la presencia del PEG, ya que este promueve la proliferación celular y por lo tanto de su metabolismo y el de sus proteínas estructurales [31, 41-43].

8. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, se puede afirmar que las proteínas PEGiladas obtenidas del secretoma de *B. adolescentis* (PPEGBa) se adhieren mayoritariamente a la periferia celular y este efecto a su vez, no permite la entrada de algunas moléculas de acuerdo a lo observado con el DAPI. Asimismo, el tratamiento de las células C2BBel con las PPEGBa promueve la mayor expresión de la proteína de unión celular ocludina.

9. REFERENCIAS

- [1] WHO, Diarrhoeal disease. Fact Sheet. 2017
- [2] Yang Y, Pei J, Qin Z, Wei L. Efficacy of probiotics to prevent and/or alleviate childhood rotavirus infections. *Journal of functional foods*, 52:90-99, 2019.
- [3] Gruber J, Hille D, Liu G, Kaplan S, Nelson M, Goveia M, Mast C. Heterogeneity of rotavirus vaccine efficacy among infants in developing countries, *The pediatric Infectious Disease Journal*, 36: 72-78, 2017.
- [4] Steele A, Groome M. Measuring rotavirus vaccine impact in sub-saharan Africa, *Clinical Infectious Disease*, 70: 2314-2316, 2020.
- [5] Matthijnssens J, Rahman M, Ciarlet M, Zeller M, Heylen E, Nakagomi T, Uchida R, Hassan Z, Azim T, Nakagomi O, Van Ranst M. Reassortment of Human Rotavirus Gene Segments into G11 Rotavirus Strains. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 16(4): 625–630, 2010.
- [6] Nutrition Committee. Treatment of diarrhoeal disease, *Pediatrics & Child Health*, 8: 455-458, 2003
- [7] Matthijnssens J, Rahman M, Ciarlet M, Zeller M, Heylen E, Nakagomi T, Uchida R, Hassan Z, Azim T, Nakagomi O, Van Ranst M. Reassortment of Human Rotavirus Gene Segments into G11 Rotavirus Strains. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 16(4): 625–630, 2010.
- [8] Chenoll E, Casinos B, Bataller E, Buesa J, Ramón D, Genovés S, Fábrega J, Rivero M, Moreno J. A. Identification of a peptide produced by *Bifidobacterium longum* CECT 7210 with antirotaviral activity, *Frontiers in Microbiology*, 7:655, 2016.
- [9] Halloran K, Underwood M. Probiotic mechanisms of action, *Early Human Development*, 135: 58-65, 2019.
- [10] Anderson R, Cookson A, McNabb W, Park Z, McCann M, Kelly W, Roy N. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation, *BMC Microbiology*, 10: 316, 2010.
- [11] Suez J, Zmora N, Segal E, Elinav E. The pros, cons, and many unknowns of probiotics, *Nature Medicine*, 25: 716-729, 2019.
- [12] Liu Q, Yu Z, Tian F, Zhao J, Zhang H, Zhai Q, Chen W. Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier, *Microbial Cell Factories*, 19:23, 2020.
- [13] Olaya N., Ulloa J., Velez F., Fernandez K., Salas S., Gutierrez M. *In vitro* antiviral activity of *Lactobacillus caesi* and *Bifidobacterium adolescentis* against rotavirus infection monitored by NSP4 protein production, *Journal of Applied Microbiology*, 120: 1041-1051, 2016.
- [14] Sieger et al. *In vitro* effect of antirotaviral probiotic proteins of *B. adolescentis* on human intestinal cells (C2BBel). En preparación.

- [15] Mayolo-Deloaisa K., Rito-Palomares M. Proteínas PEGiladas: producción, purificación y aplicaciones, *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 9:17-27, 2010.
- [16] European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to an application on the use of polyethylene glycol (PEG) as a film coating agent for use in food supplement products, *The EFSA Journal*, 414: 1-22, 2006.
- [17] Mattar A, Teitelbaum D, Drongowski R, Yongyi F, Harmon C, Coran A. Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in Caco-2 cell culture model, *Pediatric Surgery International*, 18: 596-590, 2002.
- [18] Crawford S., Ramani S., Tate J., Prashar U., Svensson L., Hagbom M., Franco M., Greenberg H., O’Ryan M., Kang G., Desselberger U., Estes M. Rotavirus Infection, *Nature Review Disease Primers*, 3:17083, 2017.
- [19] Sousa e Silva J, Freitas A. Probiotic bacteria fundamentals, therapy and technological aspects, *Pan Stanford Publishing*, 2014
- [20] Lee D. Park J., Kim M., Seo J., Lee J., Ha N. Probiotic bacteria, *B. longum* and *L. acidophilus* inhibit infection by rotavirus in vitro and decrease the duration of diarrhea in pediatric patients, *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 39: 237.244, 2015.
- [21] Rodríguez-Díaz J, Monedero V. Bioactive food as dietary interventions for liver and gastrointestinal disease, *Academic Press*, 2013.
- [22] Grandy G, Medina M, Soria R, Terán C, Araya M. Probiotics in the treatment of acute rotavirus diarrhea. A randomized, double-blind, controlled trial using two different probiotic preparations in Bolivian children, *BMC Infectious Diseases*, 10: 253, 2010.
- [23] Cummins P. Occludin: One protein many forms, *Molecular and Cellular Biology*, 32(2): 242-250, 2012.
- [24] Groschwitz K, Hogan S. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124: 3-24, 2009.
- [25] Shukla P, Gangwar R, Manda B, Meena A, Yadav N, Szabo E, Balogh A, Lee S, Tigyi G, Rao R. Rapid disruption of intestinal epithelial tight junction and barrier dysfunction by ionizing radiation in mouse colon *in vivo*: protection by N-acetyl-L-cysteine, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 310: G705-G715, 2016.
- [26] Ugalde-Silva P, Gonzalez-Lugo O, Navarro-Garcia F. Tight junction disruption induced by type 3 secretion system effectors injected by enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6: 87, 2016.
- [27] Beau I, Cotte-Laffitte J, Amsellem R. A protein kinase a-dependent mechanism by which rotavirus affects the distribution and mRNA level of the functional tight junction-associated protein, occludin, in human differentiated intestinal Caco-2 cells, *Journal of Virology*, 81(16): 8579-8586, 2007

- [28] Obert G, Peiffer I, Servin A. Rotavirus-induced structural and functional alterations in tight junctions of polarized intestinal Caco-2 monolayers, *Journal of Virology*, 74(10): 4645-4651, 2000.
- [29] FAO, WHO. Norma general para los aditivos alimentarios, *Codex Alimentarius*, 2019.
- [30] Roberts M, Bentley M, Harris J. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64:116-127, 2012.
- [31] Hakem I, Leech A, Bohn J, Walker J, Bockstaller M. Analysis of heterogeneity in nonspecific PEGylation reactions of biomolecules, *Biopolymers*, 99: 427-435, 2013.
- [32] Rankin C, Hilgarth R, Leoni G, Kwon M, Den Beste K, Parkos C, Nusrat A. Annexin A2 regulates B1 integrin internalization and intestinal epithelial cell migration, *Journal of Biological Chemistry*, 288: 15229-15239, 2013.
- [33] San Martin C, Garri C, Pizarro F, Walter T, Theil E, Núñez M. Caco-2 intestinal epithelial cells absorb soybean ferritin by μ_2 (AP2) – dependent endocytosis, *The Journal of Nutrition*, 138: 659-666, 2008.
- [34] Akiyama Y, Oshima K, Shin K, Wakabayashi H, Abe F, Nadano D, Matsuda T. Intracellular retention and subsequent release of bovine milk lactoferrin taken up by human enterocyte-like cell lines caco-2, C2BBE1 and HT-29. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77: 1023-1029, 2013
- [35] Wallace D. Mitochondria and cancer, *Nature Reviews Cancer*, 12: 685-698, 2012.
- [36] Camilleri M, Madsen K, Spiller R, Van Meerveld BG, Verne GN. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease, *Neurogastroenterology and Motility*, 24: 503-512, 2012.
- [37] Huang J, Lin Z, Zeng Y, Lin X, Zhang Y. Probiotic and glutamine treatments attenuate alcoholic liver disease in a rat model, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18: 4733-4739, 2019.
- [38] Song J, Xiao K, Ke Y, Jiao L, Hu C, Diao Q, Shi B, Zou X. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress, *Poultry Science*, 93: 581-588, 2014.
- [39] Yan T, Zhang F, He Y, Wang X, Jin X, Zhang P, Bi D. *Enterococcus faecium* HDRsEf1 elevates the intestinal barrier defense against enterotoxigenic *Escherichia coli* and regulates occludin expression via activation of TLR-2 and PI3K signalling pathways, *Letters in Applied Microbiology*, 67: 520-527, 2018.
- [40] Zhao H, Zhao C, Dong Y, Zhang M, Wang Y, Li F, Li X, McClain C, Yang S, Feng W. Inhibition of miR122a by *Lactobacillus rhamnosus* GG culture supernatant increases intestinal occludin expression and protects mice from alcoholic liver disease, *Toxicology Letters*, 234: 194-200, 2015
- [41] Guo X, Rao J, Liu L, Zou T, Keledjian K, Boneva D, Marasa B, Wang J. Polyamines are necessary for synthesis and stability of occludin protein in intestinal epithelial cells,

American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology, 288: G1159-G1169, 2005

[42] Bharadwaj S, Vishnubhotla R, Shan S, Chauhan C, Cho M, Glover S. Higher Molecular Weight Polyethylene Glycol Increases Cell Proliferation While Improving Barrier Function in an In Vitro Colon Cancer Model, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011: 587470. 2011

[43] Kasalkova N, Makajova Z, Parizek M, Slepicka P, Kolarova K, Bacakova L, Hnatowicz V, Svorcik V. Cell Adhesion and Proliferation on Plasma-Treated and Poly(ethylene glycol)-Grafted Polyethylene, *Journal of Adhesion Science and Technology*, 24: 743-754, 2010.

[44] Klibanov A, Maruyama K, Becklerg S, Torchilin V, Huang L. Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1062: 142-148.