



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología
Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología

**Estudio de la Capacidad de
Internalización de *Lactobacillus casei*
BL23 y *Lactobacillus rhamnosus* GG *in*
vitro en Caco-2 y T84**

TESIS

Que presenta

Biol. Diana Aurora Ramírez Sánchez

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias con Orientación en
Biotecnología de Salud**

Director de Tesis

Dr Vicente Adrián Canizalez Román

Dr Samuel Campista León

Culiacán, SIN, MEX

Febrero de 2018

PRESENTACIÓN

La presente investigación, titulada *Estudio de la Capacidad de Internalización de Lactobacillus casei BL23 y Lactobacillus rhamnosus GG in vitro en Caco-2 y T84*, se llevó a cabo como parte del *Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa*, en los laboratorios de Biología molecular, Facultad de Biología y en los laboratorios de Biología Molecular, Unidad de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Sinaloa, en colaboración con el laboratorio de Bacterias Ácido Lácticas y Probióticos del Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) en Valencia, España. Como Asesores Académicos participaron: Dr. Gaspar Pérez Martínez, Dr. Héctor Manuel Flores Villaseñor, Dr. Jorge Adalberto Velázquez Román, Dr. Vicente Adrián Canizalez Román (Director de Tesis) y Dr. Samuel Campista León (Director de Tesis). Para la realización y conclusión de este proyecto se recibió financiamiento de la Universidad Autónoma de Sinaloa mediante su Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) con los proyectos PROFAPI-2015/056 y PROFAPI-2015/213. También apoyaron económicamente, el Instituto de Apoyo a la Investigación e Innovación del Estado de Sinaloa (INAPI-Sinaloa) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), este último, apoyando a través de *Beca de Tesis para Estudios de Maestría 2016-2018* y *Beca Mixta con Movilidad en el Extranjero*, permitiendo realizar una

estancia en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, en Valencia,
España para terminación del trabajo experimental.

DEDICATORIA

A mi madre, por su ayuda y apoyo a lo largo de toda mi vida, por escucharme y aconsejarme en cada decisión importante, ayudándome a superar cada obstáculo que se presente.

A mis abuelos, Alfonso y Luz del Carmen, por creer en mi y alentarme a seguir por este camino, continuar con mis estudios y motivarme para convertirme en una gran investigadora.

A mi gran amor, Daniel, por su comprensión y apoyo incondicional. Por motivarme e inspirarme para poder cumplir mis metas, aunque eso significara estar separados por un tiempo. Por ayudarme a crecer como persona y profesionalmente, estando a mi lado en cada paso. Gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

A mis Directores, el Dr. Samuel Campista León y Dr. Vicente Adrián Canizalez Román, por aceptarme y apoyarme para la realización de este proyecto de investigación, permitiéndome realizar una estancia de investigación en el extranjero, contribuyendo a mi formación académica y científica.

Al Dr. Gaspár Pérez Martínez e Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), por abrirme las puertas de su laboratorio y poner a mi disposición todo lo necesario para la realización de este proyecto durante mi estancia. Por guiarme al realizar el trabajo experimental, participando en mi formación académica y científica con su asesoría en el escrito, sus consejos, correcciones y alentarme a continuar en el ámbito científico, pero, sobre todo, por brindarme su confianza y amistad.

A la Dra. Christine Bäuerl, por brindarme su ayuda y conocimiento sobre métodos y técnicas de cultivos celulares utilizadas en laboratorio, por su paciencia, disposición y amistad.

Al Lic. Jose María Coll Marques, por su ayuda en los ensayos de Microscopía y Citometría de Flujo. Por su disposición para resolverme cualquier duda.

A mis compañeros, Roberto, Jocelyn, Maricarmen, Astrid, Francisco, Eslim, por su compañerismo, apoyo y sobre todo por su amistad.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por el financiamiento otorgado a este proyecto mediante el Programa de Fomento a Proyectos de Investigación

(PROFAPI-2015/056, PROFAPI-2015/213), así como también al INAPI Sinaloa por concederme su apoyo económico para realizar la Estancia en el IATA-CSIC, Valencia, España.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por financiar mis estudios durante la Maestría, y otorgarme la Beca Mixta al Extranjero para la realización de mi estancia en el IATA-CSIC, Valencia, España.

ÍNDICE GENERAL

	Pág
ÍNDICE DE FIGURAS	Viii
ÍNDICE DE CUADROS	Xiv
I RESUMEN	1
II INTRODUCCIÓN	5
III REVISIÓN DE LITERATURA	8
A TRACTO GASTROINTESTINAL	8
B ENDOCITOSIS	9
1 Tipos de endocitosis	9
2 Endocitosis bacteriana	10
3 Factores que intervienen en la endocitosis bacteriana	15
a Interferon gamma (IFN- γ)	15
b Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)	19
c Citocalasina D	20
d 5-(N-Etil-N-isopropil) amilorida (EIPA)	22
e Rapamicina	24
C INTERNALIZACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS	27
D <i>Lactobacillus</i>	30
1 <i>Lactobacillus casei</i> BL23	30
2 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	31
E INTERACCIÓN DE <i>Lactobacillus</i> CON EL EPITELIO	32
INTESTINAL	

1 Interacción de p40 y p75 con el epitelio intestinal	36
F INTERNALIZACIÓN DE <i>Lactobacillus</i> EN CELULAS EPITELIALES	39
IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
V JUSTIFICACIÓN	43
VI HIPÓTESIS	45
VII OBJETIVOS	46
A OBJETIVO GENERAL	46
B OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
VIII MATERIALES Y MÉTODOS	47
A ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	47
B CULTIVO DE LINEAS CELULARES Y BACTERIAS	49
1 Células epiteliales	49
2 Bacterias	51
C ENSAYOS DE PROTECCIÓN A LA GENTAMICINA	51
1 Determinación de sensibilidad a la gentamicina	52
2 Cultivo de células epiteliales	53
3 Preparación de bacterias	54
4 Ensayos de protección a la gentamicina	55
a Tratamientos	55
b Co-incubación bacterias-células epiteliales	58
D OBSERVACIONES AL MICROSCOPO DE EPIFLUORESCENCIA Y CONFOCAL	58

1 Ensayo de internalización	58
2 Tinción celular sobre cubreobjetos	59
a Tinción con WGA y DAPI	59
b Tinción con DAPI	59
c Tinción con DAPI y Faloidina-TRITC	60
3 Montaje de cubreobjetos, Equipos y Software	60
4 Ensayo a tiempos (“time-lapse”)	61
5 Ensayo con <i>L. casei</i> BL23 no viables	62
E ENSAYOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	62
F ANÁLISIS ESTADÍSTICO	63
IX RESULTADOS	64
A ENSAYO DE PROTECCIÓN A LA GENTAMICINA	64
1 Determinación de sensibilidad a la gentamicina	64
2 Ensayo de protección a la gentamicina: Recuento de bacterias supervivientes con diferentes tratamientos	64
a Comparación entre <i>L. casei</i> BL23 y <i>L. casei</i> BL23 portadora del plásmido pT1GRPC37	65
b Internalización de <i>L. casei</i> BL23 y <i>L. rhamnosus</i> GG en Caco-2 y T84 sin tratamiento	67
c Efecto del IFN- γ	69
d Efecto de p40/LC, p40/LGG, p75 y EGF	71
e Efecto de la 5-(N-Etil-N-isopropil) amilorida (EIPA)	73
f Efecto de rapamicina	75

g Efecto de citocalasina D	77
B OBSERVACIONES AL MICROSCOPIO DE EPIFLUORESCENCIA Y CONFOCAL	79
1 Visualización de la internalización de <i>L. casei</i> BL23	79
a Control negativo	80
b Sin tratamiento	83
c Tratamiento con IFN- γ	88
d Tratamiento con p40/LC, p40/LGG, p75 y EGF	91
e Tratamiento con EIPA	96
f Tratamiento con rapamicina	100
g Tratamiento con citocalasina D	105
2 Ensayo “time lapse” con <i>L. casei</i> BL23 en T84	110
3 Ensayo con <i>L. casei</i> BL23 no viables en T84	114
C ENSAYOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	116
1 Tratamiento con IFN- γ	116
2 Tratamiento con p40, p75 y EGF	121
3 Tratamiento con citocalasina D, EIPA y rapamicina	125
X DISCUSIÓN	129
XI CONCLUSIONES	143
XII PERSPECTIVAS	145
XIII BIBLIOGRAFÍA	146
XIV ABREVIATURAS	162
XV ANEXOS	166

A METODOLOGÍA	166
1 Transfección de Caco-2 con pCMV_GFP (Addgene)	166
a Cultivo de líneas celulares	166
b Transfección de células Caco-2	167
2 Construcción de plásmido portador del promotor CMV y GFP mediante Biobricks	167
a Obtención de pSB1K3, pCMV y GFP	168
b Ligación entre plásmido pSB1K3 y fragmentos pCMV y GFP	170
c Transformación de <i>E. coli</i> DH5α con la ligación pSB_pCMV_GFP	170
d Preparación de <i>E. coli</i> TOP 10 electrocompetentes	171
e Transformación de <i>E. coli</i> DH5α con la ligación pSB_pCMV_GFP	171
f Extracción de plásmido de colonias obtenidas y comprobación	172
3 Ensamblaje de Gibson	173
a Aislamiento de pT1GRPC37 de <i>L. casei</i> BL23	173
b Aislamiento de pT1GRPC37 de <i>L. lactis</i> MG1363	174
c Diseño de oligonucleótidos	175
d Amplificación de fragmentos por PCR	177
e Reacción de Gibson	178
f Transformación de <i>E. coli</i> DH5α por choque térmico	178

g	Alternativa: Digestión y ligación de fragmentos amplificados para reacción de Gibson	179
h	Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α por choque térmico y de <i>E. coli</i> TOP 10 por electroporación	179
4	Clonación del plásmido pCMV_GFP completo en pT1GRPC37	180
a	Digestión del plásmido pT1GRPC37 y formación de extremos romos	180
5	Clonación del fragmento pCMV_GFP_poliA en pIAV9	181
a	Obtención del fragmento codificante del pCMV, la GFP y el terminador Poli-A	181
b	Obtención el plásmido pIAV9	183
c	Ligación entre pIAV9 y el fragmento pCMV_GFP_poliA	184
d	Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α por choque térmico y de <i>E. coli</i> TOP 10 por electroporación	185
e	Comprobación de clonas positivas por PCR de colonia	185
6	Transformación de <i>L. rhamnosus</i> GG con pT1GRPC37	186
a	Preparación de electrocompetentes	186
b	Electroporación	186
B	RESULTADOS	187
1	Transfección de Caco-2 con pCMV_GFP (Addgene)	187
2	Construcción del plásmido portador del promotor CMV y GFP	189
a	Construcción del plásmido pSB1K3 con el pCMV y la GFP	189

b Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α con la ligación	192
pSB_pCMV_GFP	
3 Ensamblaje de Gibson	194
a Aislamiento de pT1GRPC37	194
b Diseño de oligonucleótidos	197
c Amplificación de plásmidos pT1GRPC37 y pCMV_GFP	201
d Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α por choque térmico	204
e Alternativa: Digestión y ligación de fragmentos	204
amplificados para reacción de Gibson	
4 Clonación del plásmido pCMV_GFP completo amplificado en	204
pT1GRPC37 digerido	
a Digestión del plásmido pT1GRPC37 y formación de	204
extremos romos	
5 Clonación del fragmento pCMV_GFP_poliA en pIAV9	205
a Obtención del módulo codificante del pCMV, la GFP y el	205
terminador Poli-A	
b Obtención del plásmido pIAV9	207
c Transformación de pIAV9_pCMV_GFP_poliA	209
6 Transformación de <i>L. rhamnosus</i> GG con pT1GRPC37.	209

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pág.
1	Vías de entrada de endocitosis por bacterias invasoras	13
2	Internalización bacteriana mediada por daño a la barrera epitelial	18
3	Mecanismo de mTORC1 asociado a autofagia y macropinocitosis	26
4	Adhesión de <i>Lactobacillus</i> a mucosa intestinal humana	35
5	Estrategia experimental	48
6	Internalización de <i>L. casei</i> BL23 con y sin plásmido pT1GRPC37 en Caco-2 y T84	66
7	Internalización de <i>L. casei</i> BL23 y <i>L. rhamnosus</i> GG en Caco-2 y T84	68
8	Internalización de <i>L. casei</i> BL23 y <i>L. rhamnosus</i> GG en Caco-2 y T84 bajo el tratamiento de IFN- γ	70
9	Internalización de <i>L. casei</i> BL23 y <i>L. rhamnosus</i> GG en Caco-2 y T84 bajo el tratamiento de EGF, p40LC, p40LGG y p75	72
10	Internalización de <i>L. casei</i> BL23 y <i>L. rhamnosus</i> GG en Caco-2 y T84 bajo el tratamiento de EIPA	74
11	Internalización de <i>L. casei</i> BL23 y <i>L. rhamnosus</i> GG en Caco-2 y T84 bajo el tratamiento de rapamicina	76
12	Internalización de <i>L. casei</i> BL23 y <i>L. rhamnosus</i> GG en T84 bajo el tratamiento de citocalasina D	78

13	Imagen de Microscopía de Epifluorescencia de células Caco-2	81
14	Imagen de Microscopía Confocal de células T84	82
15	Imágen de Microscopía de Epifluorescencia del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en Caco-2 sin tratamiento	84
16	Imagen de Microscopía Confocal del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en Caco-2 sin tratamiento	85
17	Imagen de Microscopía de Epifluorescencia del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en T84 sin tratamiento	86
18	Imagen de Microscopía Confocal del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en T84 sin tratamiento	87
19	Imágenes de Microscopía de Epifluorescencia con proyección máxima ortogonal del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con INF- γ	89
20	Imagen de Microscopía Confocal del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en T84 bajo el tratamiento con INF- γ 100 UI/mL	90
21	Imágenes de Microscopía de Epifluorescencia del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con p40/LC, p40/LGG, p75 y EGF	92
22	Imágenes de Microscopía Confocal del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con p40/LC y p75	93

23	Imágenes de Microscopía de Epifluorescencia del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en T84 bajo el tratamiento con p40/LC, p40/LGG, p75 y EGF	94
24	Imágenes de Microscopía Confocal del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en T84 bajo el tratamiento con p40/LC, p40/LGG, p75 y EGF	95
25	Imágenes de Microscopía de Fluorescencia del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con EIPA	97
26	Imagen de Microscopía Confocal del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con EIPA 50 μ M	98
27	Imágenes de Microscopía Confocal del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en T84 bajo el tratamiento con EIPA	99
28	Imágenes de Microscopía de Epifluorescencia del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con rapamicina	101
29	Imagen de Microscopía Confocal del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con rapamicina	102

30	Imágenes de Microscopía de Epifluorescencia del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en T84 bajo el tratamiento con rapamicina	103
31	Imagen de Microscopía Confocal del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en T84 bajo el tratamiento con rapamicina	104
32	Imágenes de Microscopía de Epifluorescencia del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con citocalasina D	106
33	Imagen de Microscopía Confocal del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con citocalasina D	107
34	Imágenes de Microscopía de Epifluorescencia del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en T84 bajo el tratamiento con citocalasina D	108
35	Imagen de Microscopía Confocal del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con citocalasina D	109
36	Imágenes de Microscopía Confocal del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en T84 sin tratamiento a diferentes tiempos	111

37	Imágenes de Microscopía Confocal del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 en T84 bajo el tratamiento de IFN- γ 100 UI/mL a diferentes tiempos.	113
38	Imágenes de Microscopía Confocal del proceso de internalización <i>L. casei</i> BL23 no viables en T84	115
39	Internalización de <i>L. casei</i> BL23 en Caco-2 con y sin IFN- γ	118
40	Internalización de <i>L. casei</i> BL23 en T84 con y sin IFN- γ	120
41	Internalización de <i>L. casei</i> BL23 en Caco-2 con y sin EGF, p40LC, p40LGG y p75	122
42	Internalización de <i>L. casei</i> BL23 en T84 con y sin EGF, p40LC, p40LGG y p75	124
43	Internalización de <i>L. casei</i> BL23 en Caco-2 con y sin citocalasina D, EIPA y rapamicina	126
44	Internalización de <i>L. casei</i> BL23 en T84 con y sin citocalasina D, EIPA y Rapamicina	128
45	Ensamblaje de Gibson	176
46	Transfección de Caco-2 con el plásmido pCMV_GFP (Addgene)	188
47	Biobricks utilizados para la obtención de un plásmido portador del promotor CMV y la GFP	190
48	Digestiones de Biobricks para la construcción de un plásmido portador de la GFP bajo el pCMV	191
49	Digestión del plásmido pSB_pCMV_GFP extraído	193

50	Plásmido extraído de <i>L. casei</i> BL23 portadora de pT1GRPC37	195
51	Plásmido extraído de <i>L. lactis</i> MG1363 portadora de pT1GRPC37	196
52	Ubicación de los oligonucleótidos diseñados en el plásmido pCMV_GFP de Addgene	198
53	Ubicación de los oligonucleótidos diseñados en el plásmido pT1GRPC37	199
54	Plásmido pT1GRPC37 amplificado (excluyendo GFP)	202
55	Plásmido pCMV_GFP de Addgene amplificado	203
56	Fragmento pCMV_GFP_poliA amplificado	206
57	Plásmido lanzadera pIAV9	208

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Oligonucleótidos para amplificación de fragmentos para reacción de Gibson	200
2	Oligonucleótidos diseñados para amplificar el módulo pCMV_GFP_poliA	205

I. RESUMEN

Lactobacillus casei BL23 y *Lactobacillus rhamnosus* GG son bacterias ácido lácticas (BAL), usadas comúnmente como probióticos por su estatus “generalmente reconocidas como seguras” o GRAS y por sus efectos benéficos en el tracto gastrointestinal (TGI). Recientemente, se ha visto que BAL son internalizadas por células epiteliales, bajo condiciones de estrés, procesos inflamatorios o infecciones por patógenos que afectan la permeabilidad de la barrera epitelial e incluso algunas han sido utilizadas con aplicaciones terapéuticas en la entrega de ADN. Sin embargo, los mecanismos por los cuales este tipo de bacterias penetran o son endocitadas no está definido. El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad de internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG *in vitro* utilizando las células intestinales Caco-2 y T84, en presencia y ausencia de IFN- γ , EGF, EIPA, rapamicina, citocalasina D y de las proteínas de pared celular p40 y p75, que podrían influir en la internalización de estas cepas. Para determinar la capacidad de internalización de estas cepas, se realizaron ensayos de protección a la gentamicina, co-incubando *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG con las células Caco-2 y T84, efectuando recuentos bacterianos de las bacterias internalizadas posterior a la lisis de las células epiteliales. Se validó el proceso de internalización mediante Microscopía de Epifluorescencia y Microscopía Confocal, así como mediante Citometría de flujo. Los datos fueron sujetos a un Análisis de Varianza Mixto y comparados mediante las pruebas Bonferroni o Tamhane, con significancia una $P \leq 0.05$. Como resultado, *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG aumentaron su internalización en presencia de IFN- γ , EGF, rapamicina y EIPA, con inhibición en presencia de citocalasina D. Las proteínas p40 y p75 aumentaron la internalización de *L. casei* BL23 e inhibieron la entrada de *L. rhamnosus* GG. La

visualización por Microscopía y cuantificación mediante Citometría de Flujo reforzaron los resultados obtenidos de los ensayos de protección a la gentamicina. Como conclusión, estas cepas se comportan de manera distinta, internalizadas por mecanismos de endocitosis asociados a autofagia, y con participación activa de estas bacterias, principalmente *L. casei* BL23, donde el estado de las células también influye en su entrada.

ABSTRACT

Lactobacillus casei BL23 and *Lactobacillus rhamnosus* GG are lactic acid bacteria (BAL), commonly used as probiotics because of their "Generally Recognized As Safe" or GRAS status and because of their beneficial effects on the gastrointestinal tract (GIT). Recently, it has been seen that BAL are internalized by epithelial cells, under conditions of stress, inflammatory processes or infections by pathogens that affect the permeability of the epithelial barrier and even some have been used with therapeutic applications in the delivery of DNA. However, the mechanisms by which these types of bacteria penetrate or are endocytosed is not defined. The objective of this work was to study the internalization capacity of *L. casei* BL23 and *L. rhamnosus* GG *in vitro* using intestinal Caco-2 and T84 cells, in the presence and absence of IFN- γ , EGF, EIPA, rapamycin, cytochalasin D and of cell wall proteins p40 and p75, which could influence the internalization of these strains. To determine the internalization capacity of these strains, gentamicin protection assays were performed, co-incubating *L. casei* BL23 and *L. rhamnosus* GG with Caco-2 and T84 cells, performing bacterial counts of the internalized bacteria after lysis of epithelial cells. The internalization process was validated by epifluorescence microscopy and confocal microscopy, as well as by flow cytometry. The data were subjected to a Mixed Analysis of Variance and compared using the Bonferroni or Tamhane tests, with a significance of $P \leq 0.05$. As a result, *L. casei* BL23 and *L. rhamnosus* GG increased their internalization in the presence of IFN- γ , EGF, rapamycin and EIPA, with inhibition in the presence of cytochalasin D. Proteins p40 and p75 increased the internalization of *L. casei* BL23 e inhibited the entry of *L. rhamnosus* GG. The visualization by microscopy and quantification by flow

cytometry reinforced the results obtained from the gentamicin protection assays. In conclusion, these strains behave differently, internalized by mechanisms of endocytosis associated with autophagy, and with active participation of these bacteria, mainly *L. casei* BL23, where the state of the cells also influences their entry.

II. INTRODUCCIÓN

Lactobacillus son bacterias lácticas, nativas del TGI, conocidas por su estatus GRAS y algunas utilizadas como probióticos, reconocidas por sus beneficios al hospedero y comercializadas principalmente en productos lácteos (Vargas-García y col. 2015). Hasta la fecha, han sido consideradas como no invasivas. Sin embargo, recientemente se ha observado que cepas de *Lactobacillus* además de inhibir la internalización de patógenos, también son internalizadas en células epiteliales (Botha y col. 2012; Bouchard y col. 2013; Chen y col. 2013; Solberg, 2013; Christophe y col. 2015; Souza y col. 2017). Las bacterias propias de la microbiota intestinal están localizadas en el lumen intestinal sin aparente contacto directo con el epitelio debido a la barrera de mucina, sin embargo, en diversos padecimientos inflamatorios, como la enfermedad de Crohn, enfermedad celiaca, estrés físico crónico e infecciones por patógenos se ha observado adherencia e internalización de bacterias comensales (Chen y col. 2013; Wu y col. 2014; Yu, 2015). A pesar de esto, aún no se ha determinado el mecanismo de internalización de este tipo de bacterias.

La internalización de bacterias patógenas ha sido ampliamente estudiada, determinando sus mecanismos de invasión. Por ejemplo, *Yersinia enterocolitica* expresa una invasina, *Staphylococcus* y *Streptococcus* utilizan la proteína de unión a fibronectina (FnBPA) y *Listeria monocytogenes* produce proteínas denominadas internalinas (InI), que interaccionan con las células epiteliales. Incluso, se ha aprovechado esta capacidad con ayuda de la ingeniería genética

eliminar genes de virulencia, utilizando bacterias patógenas atenuadas para la entrega de ADN terapéutico en células epiteliales (Guimarães y col. 2006; Innocentin y col. 2009; Bastos-Pereira y col. 2013). Sin embargo, su uso está limitado por el riesgo de reversión al tipo salvaje, lo cual ha llevado a buscar otras alternativas (Innocentin y col. 2009; Bastos-Pereira y col. 2013). De esta forma, las BAL, principales componentes de la microbiota intestinal, se han convertido en atractivos candidatos para la administración de ADN en células epiteliales intestinales, debido a su estatus GRAS. En este sentido, la mayoría de los estudios relacionados a la internalización de bacterias lácticas en células epiteliales, y sobre su capacidad para la entrega de ADN se han realizado con *Lactococcus* (Guimarães y col. 2006; Innocentin y col. 2009; De Azevedo y col. 2012; Santos-Pontes y col. 2011; Zurita-Turk y col. 2012), sin embargo, los mecanismos por los cuales bacterias no patógenas ni invasivas, y en este caso, probióticas, son internalizadas o endocitadas por células intestinales no está claro, así como tampoco bajo qué condiciones ocurre este proceso o el efecto que podría tener en el hospedero (Smyth y col. 2012; Wu y col. 2014).

Para mayor entendimiento de los mecanismos de internalización bacteriana se ha analizado la influencia de citoquinas como el Interferón Gama (IFN- γ), liberada durante procesos inflamatorios, favoreciendo la permeabilidad de la barrera epitelial; mientras que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) participa en procesos de división, diferenciación y proliferación, asociado a la inducción de eventos de macropinocitosis (Haigler y col. 1979; Koivusalo y col.

2010; Lim y Gleeson y col. 2011). También, se han estudiado inhibidores como la amilorida o citocalasina D, que inhiben la endocitosis bacteriana, bloqueando la macropinocitosis o al inhibir la síntesis de actina, respectivamente (Bruewer y col. 2005; Clark y col. 2005; Clark y col. 2009; Koivusalo y col. 2010; Lim y Gleeson y col. 2011; Smyth y col. 2012; Wu y col. 2014). Por otro lado, la rapamicina, la amilorida y el IFN- γ , se han asociado a la inducción de la autofagia, proceso caracterizado por la formación de vesículas y su fusión con lisosomas y, en algunos casos, asociado con la eliminación de patógenos intracelulares (Singh y col. 2006; Feng y col. 2009; Tu y col. 2011; Li y col. 2012; Togashi y col. 2013; Sung y col. 2015; Shi y col. 2017).

Finalmente, este trabajo propone estudiar la capacidad de internalización de bacterias lácticas probióticas como *Lactobacillus casei* BL23 y *Lactobacillus rhamnosus* GG *in vitro* en células intestinales Caco-2 y T84, observando el efecto de estimulantes de la endocitosis como el IFN- γ , el EGF y rapamicina y, el papel de proteínas como p40 y p75, presentes en la pared celular de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG e inhibidores como la citocalasina D y un derivado de la amilorida, el 5-(N-etil-N-isopropil)-amilorida (EIPA), en la internalización de estas bacterias, en un intento de esclarecer la interacción entre probióticos y células intestinales y, de esta manera, determinar el mecanismo por el cual estos probióticos son internalizados por células epiteliales intestinales.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

A TRACTO GASTROINTESTINAL

El tracto gastrointestinal (TGI) constituye el principal punto de entrada a patógenos, así como la primera barrera de defensa hacia estos. Presenta en su superficie una capa de células epiteliales cubierta por otra capa estratificada de moco, colonizado por trillones de microorganismos nativos que viven en relación simbiótica y mutualista con el epitelio del hospedero, constituyendo una de las comunidades microbianas más complejas de la tierra (Muniz y col. 2012; Navabi y col. 2013).

El epitelio intestinal regula fuertemente el movimiento bidireccional de iones, nutrientes y células entre el lumen intestinal y el espacio interno. Para asegurar estas funciones y para resistir al paso de microorganismos, las células epiteliales intestinales están conectadas entre sí con uniones estrechas, que se forman por la membrana integral y las proteínas de anclaje del citoesqueleto (Muniz y col. 2012). Sin embargo, numerosos agentes patógenos infecciosos tales como los protozoos, bacterias, virus y priones explotan de forma oportunista la endocitosis para evadir e invadir el sistema inmune del hospedero. De hecho, agentes patógenos han desarrollado una variedad de estrategias para modificar las vías de endocitosis normal del hospedero a su propio beneficio (Lim y Gleeson, 2011; Muniz y col. 2012).

B ENDOCITOSIS

La endocitosis es un proceso común de todos los tipos celulares, a excepción de los glóbulos rojos, por el cual las células logran la absorción de proteínas de membrana, lípidos, ligandos extracelulares y moléculas solubles, tales como nutrientes, a partir de la superficie celular al interior de la célula por vesículas endocíticas (Bonazzi y Cossart, 2006; Lim y Gleeson, 2011).

1 Tipos de endocitosis

Este proceso se divide en 4 o 5 clases de acuerdo a la maquinaria molecular utilizada en este proceso: 1) Endocitosis dependiente de clatrina; 2) endocitosis dependiente de caveolina; 3 y 4) endocitosis independiente de clatrina y caveolina, la cual puede ser dependiente o independiente de balsas lipídicas y 5) macropinocitosis.

La endocitosis dependiente de clatrina, también llamada endocitosis mediada por receptor, y la endocitosis mediada por caveolina son caracterizados por la formación de sus respectivas capas o cubiertas (complejos proteicos que se forman en el sitio donde la membrana plasmática comienza a invaginarse. Estos complejos se ensamblan en estrecha asociación con la membrana plasmática. Estos tipos de endocitosis son explotados para internalizar moléculas que se unen a un receptor expuesto en la cara externa de la membrana plasmática (Bonazzi y Cossart, 2006; Lim y Gleeson, 2011).

La endocitosis también puede ocurrir sin la formación de una capa proteica. Este tipo de endocitosis es llamado endocitosis independiente de clatrina y caveolina y se forma por brotes invaginados de la membrana plasmática, formados solamente por lípidos de la membrana. Estas estructuras no necesitan complejos proteicos en el exterior y en algunos casos están asociadas con balsas lipídicas. Dentro de este tipo de endocitosis existen dos sub-tipos de endocitosis mediada por balsas, una que requiere dinamina para la fisión del transportador endocítico y otro independiente de dinamina (Bonazzi y Cossart, 2006).

La macropinocitosis tiene similitudes con fagocitosis, principalmente por utilizar vías de señalización mediadas por GTPasas que estimulan la polimerización y despolimerización de actina. Los ondulamientos o arrugamientos de membrana se fusionan y forman macropinosomas, más grandes que las vesículas endocíticas normales. La separación de los macropinosomas de la membrana es independiente a la actividad de la proteína dinamina (Bonazzi y Cossart, 2006, Lim y Gleeson, 2011).

2 Endocitosis bacteriana

Bacterias patógenas y no patógenas, son capaces de internalizarse en células epiteliales o APCs (células presentadoras de antígenos), aprovechando y modificando el proceso de endocitosis. Existen dos mecanismos conocidos para este proceso, en el primer mecanismo, denominado "mecanismo de

cremallera" ("zipper mechanism"), ocurre la adhesión entre un ligando bacteriano y un receptor de superficie de la célula hospedera, dando lugar al cierre de la membrana plasmática alrededor de la bacteria y a una serie de señalizaciones que dan lugar a la entrada en la célula. Las proteínas bacterianas involucradas en el proceso de endocitosis, frecuentemente imitan a ligandos endógenos y explotan las propiedades de los receptores de la célula hospedera al máximo (Bonazzi y Cossart, 2006; Cossart y Helenius, 2014). De acuerdo a Clark y col. (2009) se ha observado que patógenos como *Staphylococcus* y *Streptococcus* utilizan la proteína de unión a fibronectina A, FnBPA, para unirse a la integrina $\beta 1$ de las células epiteliales de las vías respiratorias mientras que *Yersinia enterocolitica* expresa una invasina, un ligando oportunista para el receptor de la integrina $\alpha 5 \beta 1$. De la misma manera, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* enteropatógena expresan la proteína adhesina fimbrial tipo 1, FimH, la cual se une a un receptor de glicoproteína de las células M, llamado GP2 (Solberg, 2015).

También, se ha reportado que *Listeria* entra en células epiteliales al utilizar dos internalinas que se unen a cadherina E (componentes de las uniones adherentes célula-célula), permaneciendo temporalmente en una vacuola que se lisa permitiendo la replicación en el citosol y su movilidad basada en los filamentos de actina (Alonso y García-Del Portillo, 2004; Innocentin y col. 2009; Cossart y Helenius, 2014).

En general, la unión de la bacteria con la célula hospedera se lleva a cabo a través de proteínas llamadas "adhesinas" ubicadas en la superficie

bacteriana o en los “pili” o “fimbrias” (fibras que sobresalen de la superficie). Asimismo, la entrada también necesita la activación de receptores de factores de crecimiento, quinasas citoplasmáticas y de GTPasas pequeñas para el reajuste del citoesqueleto de actina. Por otro lado, otros factores como la clatrina y los microdominios ricos en colesterol o balsas lipídicas, pueden estar involucrados en la endocitosis bacteriana (Cossart y Helenius, 2014).

En el segundo mecanismo, denominado mecanismo desencadenante (“*the trigger mechanism*”), algunas bacterias entregan directamente al citosol efectores activos, como el sistema de secreción tipo III (T3SS), que desencadenan el reordenamiento del esqueleto y remodelamiento de la membrana, llevando a un evento de macropinocitosis. La característica principal de este mecanismo es la formación de proyecciones de la membrana ricas en actina debidos a la cascada de señalizaciones que generan cambios transitorios en la dinámica de la actina (Alonso y García-Del Portillo, 2004; Bonazzi y Cossart, 2006; Lim y Gleeson, 2011; Cossart y Helenius, 2014).

Dentro de algunos patógenos invasores se encuentran *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* enterohemorrágica o enteroinvasiva, utilizando sus sistemas de secreción de tipo aguja tipo III para inyectar proteínas efectoras en células epiteliales, y posteriormente manipular las acciones del citoesqueleto del hospedero (Alonso y García-Del Portillo, 2004; Yu, 2015). En la Fig. 1 se muestran diferentes vías de endocitosis utilizadas por bacterias para entrar en células de mamíferos.

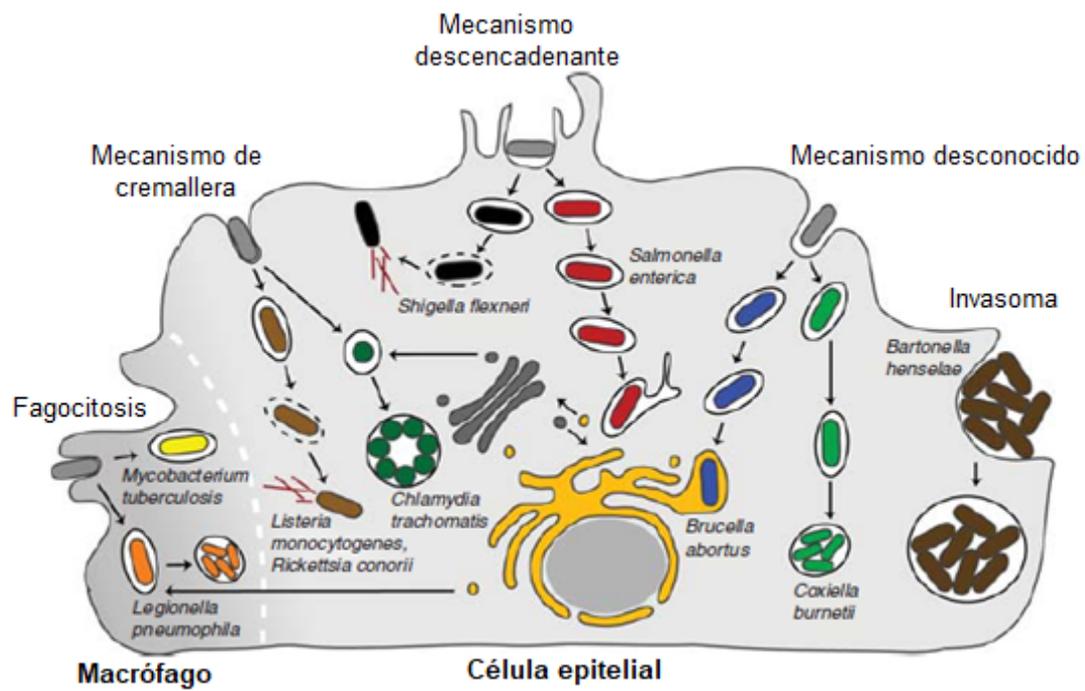


Figura 1. Vías de entrada endocíticas por bacterias invasoras (Cossart y Helenius, 2014).

Por otro lado, la endocitosis de bacterias comensales no patógenas y no invasivas por células epiteliales intestinales, puede deberse a alteraciones en la barrera epitelial consecuencia de procesos inflamatorios, tales como padecimientos intestinales, estrés o infecciones por patógenos, considerando que estas bacterias no invaden los enterocitos, si no que su entrada y traslocación se deben a defectos estructurales en la barrera epitelial (Chen y col. 2013; Wu y col. 2014). Por ejemplo, infección por *Campylobacter jejuni* y *Giardia lamblia*, en la enfermedad de Crohn y enfermedad celiaca (Chen y col. 2013; Yu y col. 2014). En este sentido, Chen y col. (2013) detectaron daño en la barrera epitelial y flujo bacteriano, posterior a la infección de *Giardia*, observando que las uniones estrechas son alteradas por *Giardia*, aumentando los conteos bacterianos e incluso el pasaje paracelular en intestino delgado y grueso. Dentro de las cepas bacterianas endocitadas se encontraron *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* y *Phenylobacterium*.

Se ha observado que bacterias comensales pueden entrar en la célula explotando las vías de endocitosis asociadas con las balsas ricas en lípidos-colesterol y caveolina-1 (proteína de unión al colesterol) situadas en invaginaciones de la membrana apical, adyacentes a las microvellosidades. Estudios realizados mostraron que la inducción de la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC) en la región de la red terminal, a través de la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), inducida por INF- γ , conduce a la

dispersión de los bordes de los cepillos en los enterocitos (Fig. 2; Yu y col. 2014; Wu y col. 2014; Yu, 2015).

3 Factores que intervienen en la endocitosis bacteriana

a Interferón gamma (INF- γ)

El INF- γ es una citoquina liberada por células del sistema inmune, elevándose en enfermedades inflamatorias intestinales y contribuyendo en la cascada inflamatoria, alterando la barrera epitelial. Estudios previos demostraron que células T84 tratadas con INF- γ muestran disminución en la función de barrera. De acuerdo con Youakim y Ahdieh (1999), el INF- γ disminuye los niveles de ZO-1, alterando el citoesqueleto de actina en la zona de uniones estrechas y causando redistribución de ZO-2 y ocludina, proteínas componentes de las uniones estrechas entre célula y célula, ubicadas en la zona subapical de las membranas laterales. Después, Bruewer y col. (2005), demostraron que el tratamiento con INF- γ durante 36 h (100 IU/mL) induce la internalización de proteínas componentes de las uniones estrechas, como ocludina, la molécula de adhesión de unión A (JAM-A) y la claudina-1 en células T84, mediante el mecanismo de macropinocitosis, proceso que la célula utiliza para internalizar grandes volúmenes de fluido externo o grandes partículas.

También, estudios han demostrado que el INF- γ solo o en combinación con otras citoquinas, como TNF- α , aumenta la permeabilidad de las monocapas de células epiteliales intestinales de T84, HT-29 y Caco-2, lo que puede resultar

en la entrada y la colonización por bacterias patógenas normalmente excluidas de la mucosa subepitelial (Bruewer y col. 2005; Clark y col. 2009; Almeida y col. 2014). Por ejemplo, Clark y col. (2005), describieron como el IFN- γ induce la internalización de bacterias no patógenas, no invasivas, como *E. coli* C25 en células Caco-2 humanas con un efecto máximo a la concentración de 100 UI/mL, con disminución en el nivel de expresión de las proteínas ocludinas de alto peso molecular (Smyth y col. 2012; Wu y col. 2014). También, Wu y col. (2014) observaron adherencia e internalización de *E. coli*-GFP al utilizar 100 UI/mL de IFN- γ en células Caco-2BBE (C2BBE).

En cuanto al mecanismo por el cual el IFN- γ aumenta la internalización bacteriana, de acuerdo con Clark y col. (2005) y Wu y col. (2014) la traslocación de *E. coli* mediada por IFN- γ en Caco-2 puede prevenirse por agentes desorganizadores de microdominios ricos en lípidos como la filipina y metil- β -ciclodextrina (MCD), los cuales secuestran el colesterol de membrana. Esto sugiere que las bacterias entéricas utilizan estas estructuras para invadir el epitelio en condiciones patológicas. Los microdominios de membrana o balsas (raft) son ricos en colesterol y glucoesfingolípidos y están implicados en diversas funciones celulares. La internalización mediada por balsas representa una ventaja significativa en la protección de *E. coli*, ya que los fagosomas derivados de las balsas lipídicas evitan la degradación por el sistema lisosomal del hospedero y facilita la traslocación transepitelial. En este sentido, Bacso y col. (2002) demostraron que bajas concentraciones de IFN- γ (5 UI/mL) incrementan

la densidad de moléculas asociadas a las balsas lipídicas, así como moléculas de adhesión intercelular en la membrana, así como también el área de los microdominios lipídicos presentes en la superficie. Por lo cual, es posible que IFN- γ participe en la internalización bacteriana en Caco-2 al incrementar el número y el tamaño de las balsas lipídicas presentes en la superficie apical.

Además, Wu y col. (2014) observaron que la fosforilación de la banda terminal de miosina (malla filamentosa) activada por la quinasa de cadena ligera de la miosina y la dispersión del “borde de cepillo” (conjunto de microvellosidades apicales densamente empaquetadas) por estimulación del IFN- γ permite la penetración bacteriana a través de las hendiduras entre microvellosidades por endocitosis, encontrando que la contracción de la banda terminal inducida por IFN- γ y la formación del arco precedieron a la endocitosis bacteriana mediada por caveolina a través de balsas lipídicas ricas en colesterol.

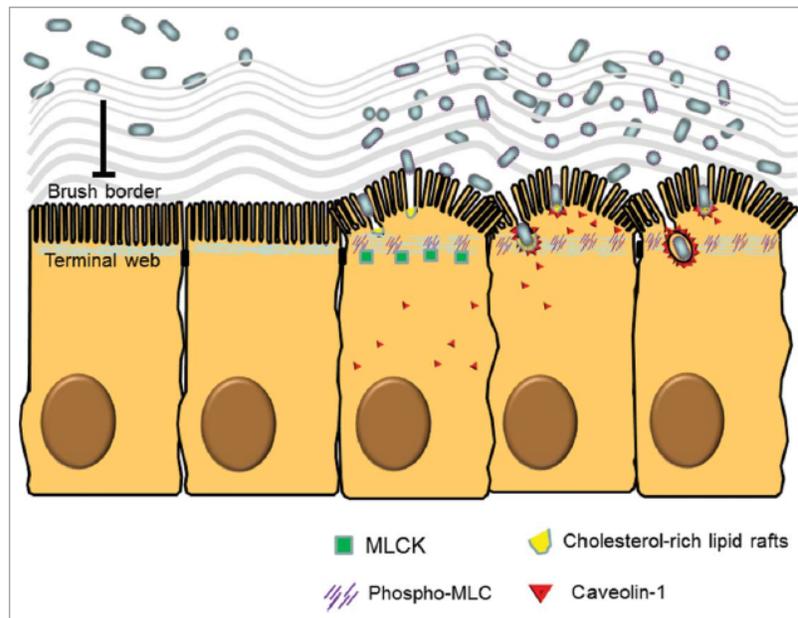


Figura 2. Internalización bacteriana mediada por daño a la barrera epitelial.

El borde de cepillo funciona como barrera para evitar contacto directo entre bacterias luminales y el cuerpo celular. El IFN- γ estimula la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC) dependiente de la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) en la región de la red terminal induciendo la contracción y formación de arco que lleva al abanico del borde de cepillo. Este proceso causa grietas entre microvellosidades exponiendo los microdominios lipídicos ricos en colesterol y permite a la bacteria ser internalizada, vía balsas lipídicas o endocitosis dependiente de caveolina-1 (Wu y col. 2014; Yu, 2015).

El IFN- γ también participa en la eliminación de patógenos al inducir el proceso de autofagia, proceso que es activado en condición de infección, escases de nutrientes o bien, para la degradación y reciclaje de organelos dañados. El IFN- γ se ha observado que induce la formación de autofagosomas que engloban a patógenos como *Helicobacter*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Ricksettia conorii* para su posterior degradación en autolisosomas (Singh y col. 2006; Feng y col. 2009; Tu y col. 2011; Li y col. 2012).

b Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)

El EGF es una citoquina involucrada en procesos de división, diferenciación y proliferación celular. Estudios anteriores indican que el EGF unido a la célula, junto con su receptor, son internalizados en vesículas endocíticas y degradados en los lisosomas, estimulando su propia internalización, teniendo un aumento de 10 veces en la velocidad inicial de la actividad de pinocitosis en células incubadas con EGF, relacionado a la gran cantidad de receptores de EGF en las células. La unión del EGF a su receptor induce la fosforilación de la membrana, el aumento de transporte y la macropinocitosis (Haigler y col. 1979). El EGF estimula el intercambio de Na^+/H^+ , principalmente estimulando el intercambiador Na^+/H^+ 1 (NHE1), elevando el pH citosólico. El resultado de la alcalinización es la iniciación de los efectos proliferativos del EGF, que pueden ser similarmente requeridos para la macropinocitosis (Koivusalo y col. 2010). Recientemente, se ha reportado que

numerosos microorganismos utilizan la macropinocitosis para invadir al hospedero (Lim y Gleeson, 2011).

En este aspecto, García-Del Portillo y col. (1994) observaron el proceso de internalización de *S. typhimurium* en células epiteliales HeLa, mostrando numerosas proyecciones o extensiones de la membrana plasmática distribuidos uniformemente, los cuales se sabe, son inducidos por factores de crecimiento celular, en los que es requerida la movilización de la actina para que la proyección se forme.

c Citocalasina D

Las citocalasinas son metabolitos fúngicos de bajo peso molecular que se unen a la actina. Estos metabolitos se asemejan a las proteínas de capping porque se unen a los extremos de polimerización rápida de los filamentos de actina, inhibiendo la asociación y disociación de las subunidades de actina en ese extremo evitando la escisión citoplásmica, inhibiendo la motilidad celular y provocando que las células se redondeen o aplanen, disminuyan las proyecciones de la membrana, así como la translocación de moléculas. Asimismo, cambian la organización de la actina de una red isotrópica a acumulaciones focales (Wells y col. 1998).

Los efectos de las citocalasinas dependen de la concentración, tipo de citocalasina y del tipo y densidad celular (Wells y col. 1998). Para estudiar la internalización bacteriana en células eucariotas se han utilizado principalmente

la citocalasina D, ya que se considera la más específica y potente. En este sentido, García-Del Portillo y col. (1994) utilizaron Citocalasina D para inhibir la internalización de *S. typhimurium*, observando la desorganización/interrupción de los filamentos de actina. También, Wells y col. (1998) utilizaron Citocalasina D en concentraciones de 0.1, 1 y 10 µg/mL, observando que 1 µg/mL es la concentración óptima para modular la internalización bacteriana.

De acuerdo con Wells y col. (1998), la citocalasina D disminuyó la internalización de *Listeria monocytogenes*, posiblemente debido a la interacción necesaria de esta especie con la E-cadherina y el citoesqueleto de actina. Sin embargo, puede aumentar la internalización de algunas cepas bacterianas entéricas en HT-29 y Caco-2 polarizados al redondear las células exponiendo la superficie lateral del enterocito, como observaron con *Salmonella typhimurium* y *Proteus mirabilis*, por lo cual se cree que el aumento en la internalización inducida por citocalasina, podría ser específico de la especie y de su propio mecanismo de internalización. Si la citocalasina D interfiere con la internalización bacteriana, se deduciría que la actina F es necesaria en el proceso de internalización, y que este proceso está dirigido por la célula hospedera y no por la propia bacteria. En adición, la mayoría de las observaciones realizadas indican que la internalización de la mayoría de las bacterias, en células eucariotas, puede ser bloqueada por citocalasinas.

La citocalasina también afecta a la fagocitosis, un tipo de endocitosis dependiente del citoesqueleto de actina. En este sentido, Boye y col. (2016) utilizaron este metabolito para disminuir la fagocitosis y de esta forma estudiar el efecto del INF- β en la internalización de *Lactobacillus acidophilus* en Células Dendríticas (DCs).

d 5-(N-Etil-N-isopropil) amilorida (EIPA)

La EIPA, es un derivado de la amilorida mas específico, que inhibe el intercambiador de Na^+/H^+ , presentando afinidad por la isoforma del intercambiador Na^+/H^+ 1 (NHE1) (Koivusalo y col. 2010; Lim y Gleeson, 2011).

En este aspecto, la macropinocitosis se diferencia de otros tipos de endocitosis por su única susceptibilidad a inhibidores del intercambiador de Na^+/H^+ . Se cree que la amilorida bloquea la macropinocitosis al disminuir el pH submembranoso (citosólico) lo cual afecta la activación de GTPasas involucradas en la polimerización de actina, además, inhibe la autofosforilación del receptor del EGF. Sin embargo, aún no se ha determinado como la amilorida inhibe la macropinocitosis, ya que no se ha visto relación entre el intercambio de iones y la formación de macropinosomas (Koivusalo y col. 2010; Lim y Gleeson, 2011).

En un estudio previo, Tian y col. (2014) estudiaron el efecto de EIPA en la captación de exosomas por células PC12, observando disminución en la eficiencia de captación dependiente de la dosis de EIPA, al utilizar concentraciones de 10, 25, 50 y 100 μM . De igual forma, Rasmussen y Vilhardt

(2015) observaron que la amilorida y citocalasina D inhibieron la entrada del Virus de la Leucemia Murina (MLV) en células NIH 3T3 y HeLa al bloquear la macropinocitosis.

Por otro lado, estudios recientes muestran que la EIPA interviene en procesos relacionados a la autofagia. La autofagia es un proceso con múltiples pasos que involucra nucleación, la formación de autofagosomas, la fusión de los autofagosomas con los lisosomas y la degradación en lisosomas, cada uno gobernado por múltiples factores. Togashi y col. (2013) observaron como el EIPA induce la autofagia incrementando significativamente la formación de autofagosomas en células Neuro-2a. De igual forma, Shi y col. (2017) demostraron que la EIPA también induce la autofagia en células IEC-18, una línea celular epitelial originada de intestino delgado de rata, incrementando el número de vacuolas autofágicas. En su estudio, indujeron autofagia en células IEC-18 mediante inanición de aminoácidos y observaron que EIPA, el inhibidor del intercambiador NHE3, puede revertir los efectos de la alanina y prolina, los cuales normalmente inhibirían la autofagia. Estos resultados sugieren que el intercambiador de Na^+/H^+ , NHE, participa en la regulación de autofagia en células epiteliales intestinales. Shi y col. (2017) sugieren la hipótesis de que la inhibición de NHE3 resulta en incremento de los niveles de H^+ intracelular y la disminución de la actividad del transportador de aminoácidos, resultando en absorción alterada de aminoácidos asociada con la regulación de autofagia en células epiteliales intestinales.

e Rapamicina

La rapamicina es un inhibidor de mTORC1 (*mammalian target of rapamicin complex 1*), una proteína quinasa serina/treonina que actúa como una molécula sensible a nutrientes que promueve el crecimiento y suprime la autofagia. La autofagia es un proceso de degradación mediado por lisosomas en el que orgánulos innecesarios y macromoléculas son secuestradas en vesículas autofágicas y entregadas a los lisosomas. La inactivación de mTORC1 induce la autofagia. Una vez activada, los lisosomas juegan un papel importante en la degradación de moléculas (Choi y col. 2017).

Sung y col. (2015) observaron el efecto de la activación de la autofagia en macropinocitosis por rapamicina, midiendo la absorción de BSA marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA) en células oncogénicas que expresan Ras, aumentando significativamente. También observaron que, al silenciar la expresión de Raptor, un componente esencial de mTORC1, aumentó el número de vesículas macropinocíticas que albergan dextrano marcado con tetrametilrodamina (TMR-Dextran). Asimismo, las células con crecimiento disminuido por la privación prolongada de glutamina, se restablecieron después del tratamiento con rapamicina.

Las proteínas mTORC1 se encuentran inactivas en el citoplasma en situación de privación de aminoácidos y nutrientes, lo cual intensifica la captación mediante macropinocitosis y el crecimiento celular. Posteriormente, las

moléculas producidas por degradación de proteínas extracelulares captadas vía macropinocitosis o autofagia re-activa mTORC1. Mientras que, en condiciones de abundancia de nutrientes, mTORC está localizado en los lisosomas, co-localizado con la proteína de membrana lisosomal, LAMP2, donde puede acceder a los productos de degradación lisosomal (Fig. 3; Sung y col. 2015).

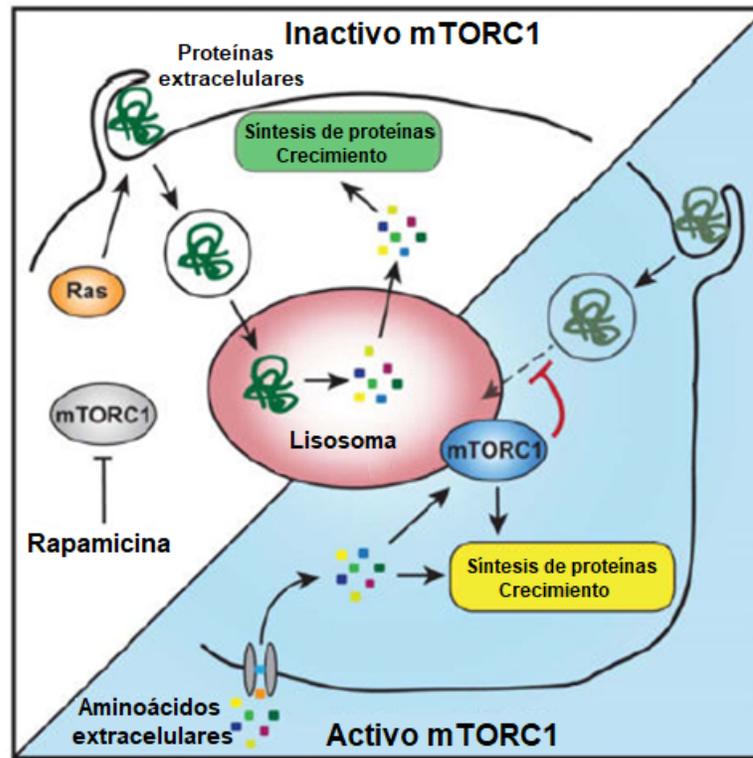


Figura 3. Mecanismo de mTORC1 asociado a autofagia y macropinocitosis.

En la imagen se observa mTORC1 activado, se encuentra localizado en la membrana lisosomal, bloqueando el proceso de captación de nutrientes mediante macropinocitosis y la autofagia. Mientras que la inactivación de mTORC1 por agentes como la rapamicina, lo ubica en el citoplasma y se induce la macropinocitosis y autofagia, lo cual, a su vez, conduce a la activación de mTORC1 (Sung y col. 2015).

Palm y col. (2015) obtuvieron resultados similares, donde la inhibición de mTORC1 aumenta la captación mediante macropinocitosis y degradación de proteínas extracelulares, lo cual favorece la protección y crecimiento celular, por lo que inhibidores de mTORC1 presentarían baja eficacia en el tratamiento contra el cáncer. En este sentido, sugieren combinar inhibidores de mTORC1 con inhibidores que bloqueen la captación o la degradación lisosomal de proteínas extracelulares para mayor eficacia.

C INTERNALIZACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son bacterias utilizadas como probióticos por su estatus GRAS y efecto benéfico en el tracto gastrointestinal, ya que presentan ciertas características como resistencia a la digestión por enzimas intestinales o pancreáticas, al ácido gástrico y biliar, tienen la capacidad para evitar la adherencia, establecimiento y/o la replicación de patógenos en el tracto gastrointestinal, además de ser capaces de sobrevivir y retener su actividad durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos y particularmente en el tracto gastrointestinal. Los probióticos colonizan temporalmente el intestino adhiriéndose a las superficies intestinales, por lo cual su capacidad adhesiva a las células intestinales ha sido considerada como uno de los criterios de selección para las cepas probióticas. Asimismo, algunas han sido utilizadas como vehículos para la entrega de proteínas en el tracto

gastrointestinal (Tuomola y Salminen, 1998; Chermesh y Eliakim, 2006; Bastos-Pereira y col. 2013).

En este sentido, también se ha estudiado la capacidad de bacterias patógenas atenuadas para entregar o transferir plásmidos recombinantes en células hospederas de mamíferos, convirtiéndolas en fábricas activas de plásmido. Por ejemplo, se ha reportado la inmunización con ADN de plásmido llevado por algunas bacterias, especialmente las especies enteroinvasivas como *Shigella flexneri*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli*, mostrando buenos resultados (Bastos-Pereira y col. 2013; Innocentin y col. 2009; Pontes y col. 2012). Sin embargo, su uso está limitado, ya que presentan riesgo potencial de reversión al fenotipo de tipo salvaje (virulentas), además del riesgo asociado de infección y la opinión pública al no ser seguros para su uso en humanos, especialmente en niños y adultos inmunocomprometidos (Innocentin y col. 2009; Bastos-Pereira y col. 2013). Por lo anterior, las bacterias lácticas representan una forma segura de entregar dosis altas, que generen una respuesta inmune mucosal y sistémica, no conteniendo endotoxinas como lipopolisacaridos (LPS) en su pared celular, además de ser fáciles de manipular para expresar múltiples proteínas y moléculas. Entre las BAL se encuentran especies de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Bastos-Pereira y col. 2013). Sin embargo, es escaso el conocimiento sobre la interacción entre probióticos y células hospederas, así como la capacidad de internalización de estas bacterias.

Hasta la fecha se han realizado estudios principalmente con *Lactococcus lactis*, esta es una BAL Gram-positiva de grado alimenticio considerada como no invasiva y no colonizadora, la cual puede entregar proteínas, antígenos y citoquinas, directamente en las superficies mucosas. Sin embargo, actualmente se ha utilizado para la entrega de ADN codificante de proteínas terapéuticas o antígenos como el antígeno de la β -lactoglobulina (BLG) conduciendo a su expresión en células epiteliales intestinales *in vitro* e *in vivo*, utilizando promotores humanos como el del Citomegalovirus (Guimarães y col. 2006; Chatel y col. 2008; Innocentin y col. 2009; Pontes y col. 2012). Asimismo, se ha optimizado el proceso de internalización de esta bacteria expresando proteínas en su superficie pertenecientes a *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* que permiten mayor eficiencia en la adherencia e penetración a la célula, como FnbPA e InIA, respectivamente, llevando a una entrega más eficaz de ADN (Innocentin y col. 2009; De Azevedo y col. 2012; Pontes y col. 2012; Zurita-Turk y col. 2012; Bastos-Pereira y col. 2013; Almeida y col. 2014).

A pesar de que la mayoría de los estudios son realizados con *Lactococcus lactis*, las bacterias que presentan mayor potencial de internalización y entrega de ADN por su capacidad de unión a las mucosas, al ser una bacteria colonizadora y nativa del tracto GI, así como por presentar proteínas en su superficie que podrían mediar su entrada en células epiteliales son las pertenecientes al genero *Lactobacillus* (Muñoz-Provencio y col. 2009).

D *Lactobacillus*

Las bacterias del género *Lactobacillus* pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL) que, además de ser utilizadas en la industria alimentaria en la fermentación de alimentos, son bacterias nativas del tracto gastrointestinal, ampliamente conocidas y aplicadas como probióticos, con múltiples efectos benéficos en la salud (Vargas-García y col. 2015).

1 *Lactobacillus casei* BL23

L. casei es una bacteria ácido láctica, Gram-positiva y heterofermentativa facultativa. Aunque el aislado que fue descrito por primera vez se encontró en el queso, *L. casei* se distribuye ampliamente en diversos hábitats, incluidos los productos fermentados, el tracto intestinal, la cavidad oral e incluso el suelo. En particular, *L. casei* IGM393, una subcultivo de ATCC 393 [pLZ15-], es considerado como sinónimo de *L. casei* BL23 (Acedo y Pérez-Martínez, 2003), se ha utilizado como un hospedero para la modificación genética y aplicada como agentes de suministro *in vivo* (Kajikawa y col. 2010), sobre todo al ser una cepa libre de plásmido, presentar propiedades probióticas y ser fácilmente transformable (Mazé y col. 2010). Además, presenta gran resistencia a las tensiones encontradas durante el paso por el TGI, como tolerancia de ácido y bilis (Douillard y col. 2013).

Actualmente, se han desarrollado sistemas de expresión de proteínas heterólogas basados en BAL como *Lactobacillus*, ya que por sus características se han convertido en los candidatos ideales para la entrega de proteínas

terapéuticas en las superficies mucosas. Entre las proteínas expresadas por *L. casei* se encuentra *gusA* de *E. coli* (Gosalbes y col. 2000), las proteínas de superficie *PsaA* y *PspA* de *Streptococcus pneumoniae* (Oliveira y col. 2003), la subunidad VP8* de la proteína de la cápside del rotavirus (Monedero y col. 2004), también *L1*, la proteína principal de la cápside del Virus del Papiloma Humano 16, así como un fragmento de β -Intimina de *Citrobacter rodentium* (Ferreira y col. 2011), estimulando el sistema inmune, induciendo respuestas mucosales y sistémicas.

2 *Lactobacillus rhamnosus* GG

L. rhamnosus GG (ATCC 53103) fue aislada originalmente a partir de muestras fecales de un adulto sano por Sherwood Gorbach y Barry Goldwin, explicando su típica GG por las letras del apellido (Yan y col. 2013; Segers y Lebeer, 2014; Wang y col. 2014). Es una de las cepas probióticas más estudiadas, incluida en productos lácteos, así como también, utilizada en el tratamiento y/o prevención de padecimientos gastrointestinales, por ejemplo, de rotavirus agudo, diarrea asociada a antibióticos, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerativa y en ciertas enfermedades autoinmunes. De esta forma, se ha demostrado que *L. rhamnosus* GG, una vez en el tracto gastrointestinal interviene en el equilibrio de la microbiota, activando el sistema inmune innato y adaptativo, sobre todo durante infecciones por patógenos (Sánchez y col. 2010; Yan y col. 2013; Wang y col. 2014; Vargas-García y col. 2015).

Asimismo, tanto *L. casei* como *L. rhamnosus*, presentan propiedades inmunomodulatorias, así como gran resistencia al estrés durante el paso gastrointestinal debido principalmente a su tolerancia al ácido y bilis (Muñoz-Provencio y col. 2009; Sánchez y col. 2010; Bäuer y col. 2013; Douillard y col. 2013; Segers y Lebeer, 2014). Asimismo, *L. rhamnosus* muestra alta capacidad de unión a las mucosas, persistiendo en el tracto GI, hasta una semana después de la interrupción de su administración por vía oral (Sánchez y col. 2010).

E INTERACCIÓN DE *Lactobacillus* CON EL EPITELIO INTESTINAL

Las cepas de *Lactobacillus* interactúan fuertemente con las superficies mucosas, uniéndose a la mucina, un componente de la capa epitelial mucosa, y a una variedad de proteínas presentes en la matriz extracelular, tales como fibronectina, colágeno y laminina, que son vertidos en la mucosa o puede estar expuesta en el lumen intestinal en caso de trauma, infección o inflamación (Muñoz-Provencio y col. 2009). En este sentido, se ha investigado la interacción entre *Lactobacillus* y el hospedero humano, encontrando varias proteínas de superficie como el factor de unión a la mucosa (MBF) y la proteína altamente repetida MabA que parecen contribuir a la formación de biopelículas (Segers y Lebeer, 2014).

En particular *L. rhamnosus* GG, es caracterizada por su fuerte capacidad adhesiva, que ha sido documentada no solo *in vitro* sino también *in vivo* en seres humanos. *L. rhamnosus* GG ha demostrado ser una cepa de *Lactobacillus* muy

buena para adherirse al moco en comparación con cepas relacionadas, tales como las cepas de *L. rhamnosus* LC705, *L. johnsonii* LJ1 y *L. casei* Shirota (Segers y Lebeer, 2014). Se sabe que la proteína codificada por el gen LGG 02337 de *L. rhamnosus*, es una proteína anclada a superficie bacteriana que posee actividad de unión a la mucosa. También, se ha identificado el cluster spaCBA relacionado a la adherencia de esta bacteria a las mucosas, describiéndose tres componentes estructurales de los pili codificados por este cluster, similares a los pili descritos en patógenos gram-positivos, que además de tener propiedades adhesivas, son esenciales para elicitar una respuesta moduladora celular, responsables del efecto probiótico de LGG (Kankainen y col. 2009; Douillard y col. 2013; Tripathi y col. 2013; Ardita y col. 2014; Vargas-García y col. 2015). Desafortunadamente, a pesar de que *L. casei* BL23 tiene en su genoma el grupo de genes que podrían codificar para las proteínas que los constituyen, no es capaz de formar los pili, posiblemente porque la sortasa asociada (enzima que participa en el ensamblaje de los pili) está interrumpida por un elemento de inserción (Mazé y col. 2010). Sin embargo, *L. casei* BL23 muestra capacidad de unirse a las proteínas de la matriz extracelular (fibronectina y colágeno), en parte debido a la proteína FnBPA en su superficie, caracterizada por Muñoz-Provencio y col. (2009), así como posiblemente, a otras proteínas que se conservan en parte en *L. rhamnosus* GG (Douillard y col. 2013).

La proteína de unión a la fibronectina (FnBP) presente en *L. casei* BL23, es una proteína homóloga a la reportada en otras bacterias como *Staphylococcus*

y *Streptococcus* en las cuales participa en la internalización de estas en células epiteliales (Clark y col. 2009; Almeida y col. 2014), utilizada anteriormente por Innocentin y col. (2009) al modificar *Lactococcus lactis* para expresar en su superficie la FnBPA de *S. aureus* mejorando su capacidad para internalizarse en células Caco-2. La presencia de esta proteína en la superficie de *L. casei* podría conferirle capacidad para internalizarse en células eucariotas (Bouchard y col. 2013).

Estudiar la adhesión *in vivo* es más complicado, por lo que se han utilizado modelos *in vitro* como la línea celular intestinal Caco-2. Anteriormente, Tuomola y Salminen (1998) estudiaron la adhesión de 12 diferentes cepas de *Lactobacillus* en células Caco-2. Observando mayor adhesión de *L. rhamnosus* GG que de *L. casei* Shirota (*L. casei* BL23), con 9.763 y 3.260 % de adhesión en Caco-2, respectivamente. La adhesión de todos los *Lactobacillus* fue dependiente de la concentración, lo que indica que la misma fracción de bacterias agregadas se adhirió a diferentes concentraciones bacterianas. Altas concentraciones utilizadas en este estudio no saturaron la capacidad de unión de Caco-2, lo que puede deberse a los racimos bacterianos formados a altas concentraciones.

De igual forma, Douillard y col. (2013) y Moussavi y Adams (2010) observaron que *L. rhamnosus* GG presenta mayor capacidad de adhesión a células epiteliales como Caco-2, en comparación a *L. casei* BL23 (Fig. 4).

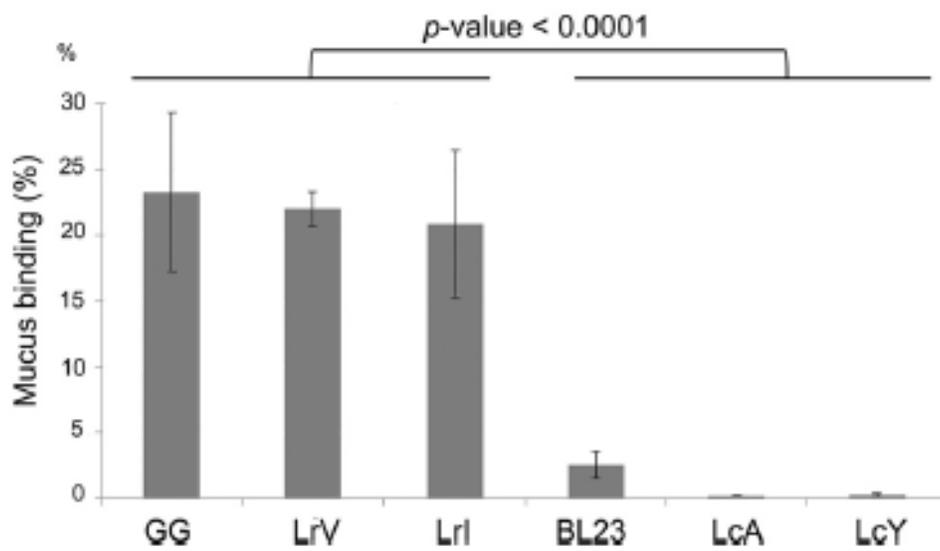


Figura 4. Adhesión de cepas de *Lactobacillus* a mucosa intestinal humana. *L. rhamnosus* GG muestra mayor capacidad de adherencia que *L. casei* BL23 a mucosa intestinal humana (Douillard y col. 2013).

1 Interacción de p40 y p75 con el epitelio intestinal

Las proteínas p40 y p75 son proteínas de 40 y 75 kDa, respectivamente, de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG, presentes en la superficie celular y secretadas al medio. Estas proteínas son conocidas ser capaces de hidrolizar muropéptidos de la pared celular propia y prevenir el daño a la barrera epitelial producido por citoquinas o peróxido de hidrogeno (H₂O₂). Asimismo, autolisinas asociadas a la pared celular de algunos patógenos se han asociado a procesos de invasión en patógenos como *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Listeria*, ya que juegan un papel en la fijación o adherencia a las células epiteliales como factores de virulencia (Seth y co. 2008; Bäuerl y col. 2010; Yan y col. 2013).

Bäuerl y col. (2010) encontraron que la p40 y p75 pueden unirse a mucina, un componente de la capa epitelial mucosa y al colágeno, así como también a células epiteliales T84 y Caco-2, con exception de la fibronectina y fibrinógeno.

Estas proteínas poseen actividad antiapoptótica y regeneradora del epitelio intestinal actuando a través de la ruta de trasduccion de señal de Akt/PI3K mediada por la activación del receptor del EGF (EGFR) (Seth y col. 2008; Yan y col. 2013; Wang y col. 2014). La activación de EGFR por fosforilación promueve la proliferación celular, la diferenciación, la migración, y la protección. En este aspecto, se ha reportado que la p40 transactiva el receptor de EGF (EGFR) en las células epiteliales intestinales y estimula la liberación de ligando de las células epiteliales intestinales para activar EGFR, lo cual podría favorecer la internalización bacteriana (Yan y col. 2013; Wang y col. 2014). Anteriormente, se

ha reportado que p40 no muestra homología en su secuencia con ninguno de los ligandos de EGFR, por lo que se cree que p40 no se une directamente y activa al EGFR (Yan y col. 2013). En este sentido, los ligandos del EGFR son sintetizados como precursores transmembrana, que son liberados por desintegrinas y metaloproteinasas (ADAMs), proteasas ancladas a la membrana, para producir ligandos activos y solubles. Yan y col. (2013) demostraron que p40 estimula la liberación del Factor de Crecimiento de Unión a la Heparina (HB-EGF) posiblemente por activación de ADAM17 *in vitro* y en ratón, conduciendo a la fosforilación del EGFR en células epiteliales intestinales. Otro efecto de la activación del EGFR mediado por p40 es la producción de mucina. Wang y col. (2014) observaron que la activación de EGFR esta correlacionada con la expresión del gen MUC2 en células LS174T, ya que estimular la expresión, síntesis y secreción de mucinas es un mecanismo por el cual los probióticos protegen al hospedero contra invasión de bacterias patógenas.

Por otro lado, Seth y col. (2008) estudiaron el efecto de p40 y p75 (de LGG) en células Caco-2 tratadas con H₂O₂, el cual desorganiza las uniones estrechas e incrementa la permeabilidad paracelular en este tipo celular. En su estudio demostraron que el pre-tratamiento de monocapas celulares con p40 de LGG o p75 atenúan de manera significativa, alteraciones inducidas por el tratamiento con H₂O₂, como la disminución de la resistencia transepitelial (TER) y la redistribución de la ocludina y ZO-1, proteínas de las uniones estrechas, hacia el compartimento intracelular, así como también de E-cadherina y β -catenina,

proteínas de las uniones adherentes. Aunque las uniones adherentes no forman una barrera física para la difusión de macromoléculas a través del epitelio, indirectamente influyen en la integridad de las uniones estrechas. Asimismo, los efectos de p75 también se observan T84 y HT29.

La p40 y p75 (purificadas de LGG) fueron efectivas incluso al ser administradas solo en la superficie apical o en la superficie basal, lo que indica que los receptores de membrana requeridos para su efecto protector están presentes en ambas membranas, apical y basolateral, de la monocapa de Caco-2 (Seth y col. 2008).

Por otro lado, de acuerdo con Bäuerl y col. (2010), genes homólogos codificantes de p40 y p75 son encontrados exclusivamente en genomas de cepas de *L. casei/paracasei* y *L. rhamnosus*. El alineamiento de la secuencia de p40, muestra que esta proteína exhibe más del 98% de identidad con cepas de *L. casei / paracasei* and *L. rhamnosus*, a excepción de una región rica en serina, correspondiente a los aminoácidos 256-286 en p40 de *L. casei* BL23.

En el caso de p75 tiene un peso molecular de 49 kDa, aunque se describió inicialmente en *L. rhamnosus* GG con un tamaño de 75 kDa, pero se asume que p75 muestra migración anormal en electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). El análisis de dominios de p75 mostró que el dominio N-terminal tiene función desconocida, sin embargo, el dominio NLPC/P60 (PF00877) esta presente en amidasas y metaloproteasas, por lo que se cree que es el dominio activo y es usualmente encontrado en la región C-

terminal de proteínas bacterianas que funcionan como hidrolasas de pared celular y como proteínas asociadas a la invasión de patógenos (Bäuerl y col. 2010).

Asimismo, p40 y p75 tienen una señal peptídica N-terminal, la cual es reconocida por la peptidasa señal I y, por lo tanto, son secretadas (Bäuerl y col. 2010).

F INTERNALIZACIÓN DE *Lactobacillus* EN CÉLULAS EPITELIALES

El primer estudio realizado sobre internalización de cepas de *Lactobacillus* lo realizaron Botha y col. (2012) obteniendo como resultado que la cepa de *Lactobacillus equigenerosi* Le1 se adhiere a células epiteliales bucales de caballo y entrando en ellas después de 20 min de estar en contacto. Las células bacterianas tratadas previamente con pronasa no se adhirieron ni invaden las células epiteliales, como se observa por la falta de agregados bacterianos en la membrana celular o dentro del citoplasma de las células epiteliales, lo cual sugiere que una proteína específica en la superficie de la cepa Le1 juega un papel importante en su capacidad de internalización.

Asimismo, Bouchard y col. (2013), reportaron la capacidad de cepas de *L. casei* para inhibir la adhesión e internalización de *S. aureus* en líneas celulares epiteliales mamarias bovinas (bMEC). En estos ensayos de internalización también se estableció la capacidad de *L. casei* para internalizarse, lo cual es fuertemente dependiente de la cepa, en este caso, *L. casei* 1542, aislada del canal del pezón de bovino, se internalizó más eficientemente en células MAC-T,

lo cual podría deberse a una adaptación de algunas cepas de *L. casei* al hospedero bovino.

La capacidad de internalización de las tres cepas de *L. casei* eran inferiores a los de *S. aureus* NB305 y, en menor medida, *S. aureus* RF122, sin embargo, la tasa de protección de *L. casei* en las células MAC-T era mejor que la de *S. aureus*, lo cual puede deberse a una mayor resistencia a los ácidos y oxidantes. En este estudio se observó por primera vez un tipo de competencia recíproca para internalización. *L. casei* era capaz de adherirse y hasta internalizarse en células MAC-T y evitar la internalización de *S. aureus*, y en menor medida, su adhesión, sin modificar la viabilidad celular y morfología, aunque la tasa de internalización de *L. casei* también se vio afectada por *S. aureus* (Bouchard y col. 2013).

Posteriormente, Souza y col. (2017) estudiaron la capacidad de *L. casei* BL23 para inhibir la internalización de *Staphylococcus aureus* en bMEC MAC-T encontrando una disminución significativa del 58%. También observaron que *L. casei* BL23 es capaz de internalizarse en células bMEC, pero esta capacidad se ve disminuida en cepas de *L. casei* BL23 con mutaciones en sortasas como la *srtA2*, las cuales son proteínas involucradas en el procesamiento de proteínas ancladas a la pared celular que participan en su interacción con el hospedero. En este caso, observaron mayor número de vesículas de degradación, así como una pared celular más delgada, lo cual podría deberse a una menor capacidad de invadir, así como menor capacidad de sobrevivir intracelularmente. En adición,

se observó pérdida de las propiedades para inhibir la internalización de patógenos.

Finalmente, también se ha modificado genéticamente cepas de *Lactobacillus* para promover su capacidad de internalización, por ejemplo, Solberg (2015) expresó la proteína FimH en la superficie de *Lactobacillus plantarum*, de *S. typhimurium* y *E. coli enteropatógena*, y la invasina, de *Y. enterocolitica*, con el propósito de establecer un modelo para la entrega de ADN codificante de antígenos, promoviendo la absorción y transitosis de *L. plantarum* en modelos *in vitro* de células M teniendo como objetivo alcanzar las placas de peyer. En este caso, las proteínas FimH e invasina mostraron participación en la internalización de *L. plantarum* en células Caco-2.

Por otro lado, Christophe y col. (2015) investigaron el potencial de DEC-205, un receptor de las células dendríticas (DCs) que participa en el reconocimiento de ligandos expresadas durante la apoptosis y necrosis celular, para inducir interacciones entre BAL y DCs, con la posterior entrega de ADN. En este estudio reportaron que la presencia del fragmento FV de cadena simple (ScFv) como ligando de DEC-205 en la superficie de *L. plantarum* aumentó su potencial de internalización y transferencia de ADN plasmídico en cultivos celulares y en ratones.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El TGI se encuentra colonizado por trillones de microorganismos que constituyen la microbiota que interactúa con el epitelio estableciendo una relación simbiótica. Sin embargo, recientemente se ha visto internalización de bacterias no patógenas ni invasivas en células epiteliales como consecuencia de alteraciones a la barrera epitelial. Entre estas bacterias, se encuentran cepas de *Lactobacillus*. Estas son bacterias ácido lácticas, caracterizadas por su estatus GRAS y su efecto benéfico en el TGI, siendo ampliamente utilizadas como probióticos. Anteriormente, se demostró que ciertas cepas de *Lactobacillus* pueden inhibir la adhesión e internalización de bacterias patógenas en células epiteliales mamarias bovinas e incluso internalizarse ellas mismas, sin afectar la viabilidad o morfología de éstas. Sin embargo, aún no se ha determinado el mecanismo de internalización, ni las condiciones que influyen en este proceso, y, sobre todo, no existe ningún estudio sobre si cepas probióticas como *L. casei* BL23 o *L. rhamnosus* GG pueden internalizarse en células epiteliales intestinales. Asimismo, se han estudiado y utilizado patógenos atenuados como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, para la entrega de ADN codificante de proteínas terapéuticas o antígenos en células de mamíferos, pero, debido al riesgo de reversión a su forma de tipo salvaje y virulenta, se han buscado otras alternativas, donde las BAL como *Lactobacillus*, se consideran los candidatos más atractivos.

V. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día se sabe que muchas bacterias son capaces de internalizarse en células de mamíferos, ya sea modificando las vías normales de endocitosis o bien, como resultado de procesos inflamatorios, estrés, u otros factores que afectan la permeabilidad de la barrera epitelial intestinal. Asimismo, se ha estudiado el proceso de internalización de ciertas bacterias patógenas y no patógenas, con el propósito de utilizar esta capacidad para la entrega de ADN en células de mamíferos y en última instancia, administrar proteínas terapéuticas/antígenos recombinantes. Las bacterias ácido lácticas utilizadas comúnmente como probióticos por su estatus GRAS y por su efecto inmunomodulador, se han convertido en atractivos candidatos para la entrega de ADN y moléculas terapéuticas. En este sentido, las bacterias lácticas más estudiadas con este fin, son *Lactococcus*, optimizando su capacidad de internalización y entrega de ADN. Sin embargo, poco se conoce sobre su capacidad de internalización o las condiciones que favorecen o inhiben su entrada en células epiteliales. Asimismo, las bacterias con mayor potencial para la entrega de ADN, son los *Lactobacillus*, bacterias nativas del TGI, comercializadas como probióticos, por sus efectos benéficos en la salud del hospedero. Anteriormente, se ha visto el paso de cepas de *Lactobacillus* en células epiteliales, principalmente como consecuencia del daño a la barrera epitelial o por infecciones por patógenos. Además, se han reportado proteínas presentes en su superficie que podrían estar mediando su adherencia e

internalización en células epiteliales. Por esto, es importante estudiar si bacterias probióticas como *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG son capaces de internalizarse en células intestinales, así como las condiciones que rigen y mejoran dicho proceso para dilucidar el mecanismo utilizado por estas bacterias y de esta manera, entender mejor la interacción entre bacterias probióticas y su hospedero.

Por todo lo anterior, este trabajo propuso estudiar la capacidad de internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en células epiteliales humanas (Caco-2, T84), en condiciones normales así como en presencia de citoquinas pro-inflamatorias como el IFN- γ , el EGF, proteínas purificadas como p40 o p75, presentes de manera natural en la pared celular de *L. casei* B23 y *L. rhamnosus* GG, así como secretadas al medio externo, que juegan un papel en la activación del receptor del EGF (EGFR), así como también, citocalasina D, EIPA, y la rapamicina los cuales se han asociado al proceso de endocitosis.

VI. HIPÓTESIS

L. casei BL23 y *L. rhamnosus* GG se internalizarán de manera natural en las líneas celulares intestinales Caco-2 y T84, por un posible mecanismo de endocitosis aún por determinar.

VII. OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

1. Estudiar la capacidad de internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG *in vitro* en células intestinales Caco-2 y T84.

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la capacidad de internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en células Caco-2 y T84 mediante Ensayos de Protección a la Gentamicina.
2. Evaluar el efecto del IFN- γ , EGF, p40, p75, rapamicina, EIPA y citocalasina D en el proceso de internalización *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en células Caco-2 y T84 mediante Ensayos de Protección a la Gentamicina.
3. Confirmar la internalización de *L. casei* BL23 en células Caco-2 y T84 mediante Microscopía de Epifluorescencia y Confocal y Citometría de Flujo, en presencia y ausencia de IFN- γ , EGF, p40, p75 , rapamicina, EIPA y citocalasina D.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

A ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En este trabajo se analizó la internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en líneas celulares epiteliales intestinales Caco-2 y T84, en ausencia y presencia de citoquinas o agentes que influyen en el proceso de endocitosis bacteriana, como IFN- γ , EGF, rapamicina, EIPA, citocalasina D, y las proteínas de superficie p40 y p75, de estas bacterias. Para esto, se llevaron a cabo ensayos de protección a la gentamicina con recuentos de bacterias internalizadas posterior a la lisis de las células epiteliales. También se realizaron ensayos de internalización para visualizar por Microscopía de Epifluorescencia y Confocal y cuantificar fluorescencia mediante Citometría de flujo, utilizando bacterias de *L. casei* BL23 portadoras de un plásmido que expresa la proteína roja fluorescente (RFP) y la proteína verde fluorescente (GFP), lo cual permitió la visualización y cuantificación de estas bacterias.

Estrategia experimental

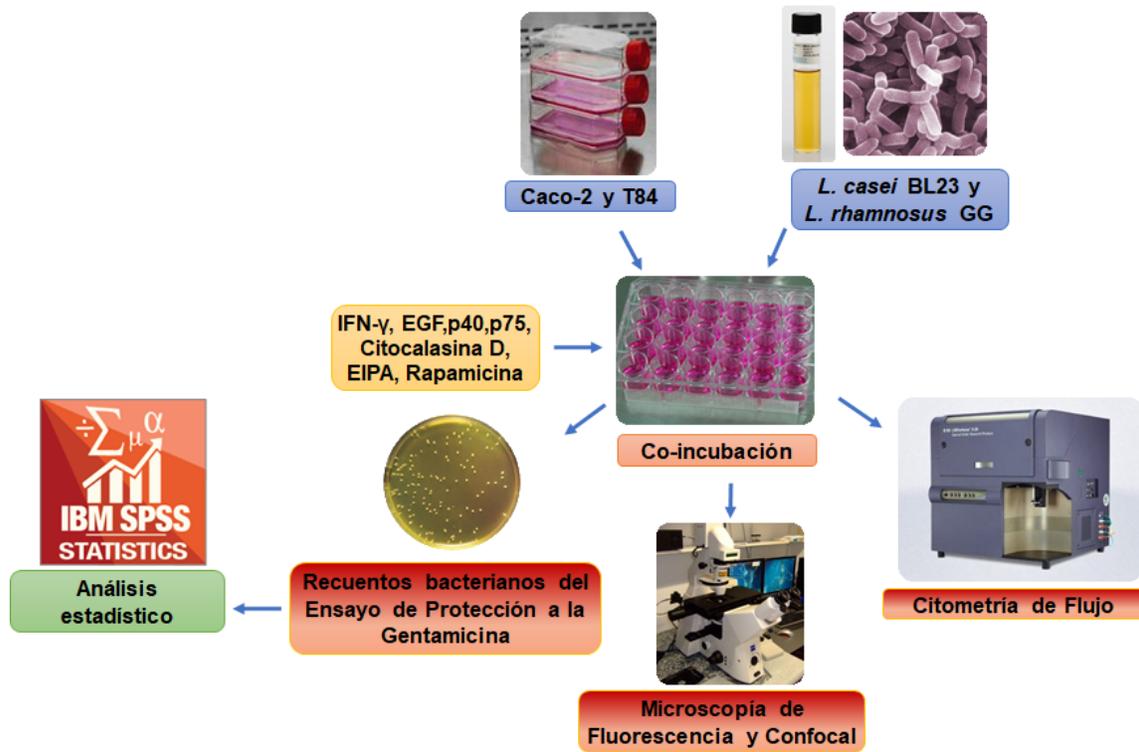


Figura 5. Estrategia experimental. Análisis de internalización bacteriana posterior a la co-incubación de bacterias con líneas celulares epiteliales, en presencia y ausencia de estimulantes e inhibidores, mediante diversas técnicas.

Para estudiar de la capacidad de estas bacterias para la entrega de ADN se intentaron diversas técnicas de clonación para la construcción de un vector portador de la GFP bajo un promotor humano (pCMV), sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos que nos permitieran continuar y cumplir con este objetivo (Ver sección de Anexos XV.A).

B CULTIVO DE LINEAS CELULARES Y BACTERIAS

1 Células epiteliales

Las líneas celulares epiteliales intestinales humanas Caco-2 y T84 fueron utilizadas para medir la capacidad de internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG.

Las células fueron obtenidas de crioviales almacenado en nitrógeno (N₂) líquido, se descongeló rápidamente a baño maría 37°C, se transfirió a 5 mL de medio de cultivo completo para Caco-2 o T84.

El medio completo para Caco-2 consistió en medio DMEM (High Glucose, -Na-Pyruvate; Biowest) suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor 30 min a 56 °C, 1% aminoácidos no esenciales (MEM non Essential Amino Acids 100 X; Biowest), 1% piruvato sódico (Sodium Pyruvate 100 Mm; Capricorn Scientific GmbH), 1% L-glutamina (L-Glutamine 100X,200 Mm; Biowest), 1% tampón HEPES (HEPES Buffer Solution, 1 M; Biowest) y 1% penicilina-estreptomicina (Cat. No. L0018-100, Biowest).

El medio completo para T84 consistió en medio DMEM F-12 (DMEM F-12 w/o L-Glutamine w/o Hepes, no. cat. L0090-500), suplementado con 10% FBS, 1% penicilina-estreptomicina, 1% tampón HEPES y 1% L-glutamina.

El cultivo se centrifugó a 1,400 rpm durante 5 min, se extrajo el sobrenadante, el pellet fue resuspendido en 13 mL de medio completo y se transfirió a un frasco T-75 (75 cm²). Las células se incubaron a 37 °C 5% CO₂ hasta confluencia del 90-95%. Posteriormente, para llevar a cabo un pase (subcultivo), primeramente, se aspiró el medio de cultivo del frasco T-75 con pipeta pasteur, se lavaron las células con 10 mL 1X PBS (DPBS/MODIFIED: calcio, magnesio; HyClone; GE Healthcare Life Science) y se aspiró el PBS. Posteriormente se añadió 1 mL de tripsina-EDTA 1X (Biowest) al cultivo y se cubrió con el líquido toda la superficie. Para facilitar que las células se desprendieran, se incubaron a 37°C durante 5 o 10 min, para Caco-2 o T84, respectivamente. Finalmente, se añadieron 9 mL de medio completo, se resuspendieron las células y se transfirió una alícuota de 1 mL a un nuevo frasco con 12 mL de medio fresco para un total de 13 mL. Por último, se incubó a 37 °C CO₂ 5% hasta una confluencia del 95-100% para Caco-2 (5 días aprox.) y una confluencia del 70-80% para T84 (7 días aprox.). Después de este periodo, se realizó de nuevo un pase de mantenimiento, tal y como se mencionó anteriormente.

2 Bacterias

Las cepas de *L. casei* BL23 (BL23) y *L. rhamnosus* GG (BL376) se sembraron en medio MRS (BD™ Difco™ Lactobacilli MRS Broth; Thermo Fisher Scientific) a 37 °C durante 24 h. La cepa de *L. casei* BL23 portadora del plásmido pT1GRPC37 (cepa C81) se sembró en medio MRS Erm⁵ durante 24 h a 37 °C. pT1GRPC37 es un plásmido de aprox. 6.5 kb, que contiene la proteína roja fluorescente (RFP o mCherry) y la proteína verde fluorescente (GFP), bajo un promotor bacteriano truncado de la PrtP (p127), el cual expresa la RFP y en baja intensidad la GFP, un casete de resistencia a eritromicina, y el origen de replicación pAMβ1 para Gram positivos.

La cepa de *L. casei* BL23 portadora del plásmido pT1GRPC37 se utilizará en ensayos de protección a la gentamicina para comparar su comportamiento con el de *L. casei* BL23 tipo salvaje y posteriormente, poder ser utilizada en los ensayos de Microscopía de Fluorescencia/Confocal y Citometría de Flujo aprovechando la expresión de fluorescencia roja o verde, según sea el caso.

C ENSAYOS DE PROTECCIÓN A LA GENTAMICINA

El ensayo de protección a la gentamicina se utilizó para estimar la protección bacteriana posterior a la internalización en células epiteliales. La metodología utilizada fue en base a lo realizado por Innocentin y col. (2009), Almeida y col. (2014) y Bouchard y col. (2012) con modificaciones.

1 Determinación de sensibilidad a la gentamicina

Antes de llevar a cabo el ensayo de protección a la gentamicina, se realizó un ensayo para confirmar la concentración de gentamicina adecuada para inhibir a *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG no internalizadas.

Para esto, se inocularon 10 mL de MRS con la cepa de *Lactobacillus* y se incubó a 37 °C durante 24 h. Se midió D.O.₅₅₀ y de acuerdo a la curva de crecimiento de estas cepas, se determinó el número de bacterias presentes en el cultivo (UFC/mL). El cultivo de cada cepa bacteriana, se centrifugó a 4,000 rpm 10 min y el pellet fue resuspendido en el volumen correspondiente para ajustar dos tubos, cada uno con 1×10^6 UFC/mL en 4 mL de MRS. Se probaron 2 concentraciones de gentamicina, 150 y 300 µg/mL y dos tiempos, 2 y 4 h, con ambas cepas. La solución stock de gentamicina sulfato (Cat. no. G1264, Sigma-Aldrich) fue preparada en H₂O MQ y esterilizada mediante filtración (filtros de 0.2 µm) a una concentración de 15 mg/mL. Para este ensayo se adicionaron 40 y 80 µL de la solución stock en los 4 mL de medio de cultivo MRS, para obtener 150 y 300 µg/mL, respectivamente. Los tubos se incubaron a 37 °C, a las 2 h de incubación se tomaron muestras y se sembraron 100 µL del cultivo en MRS agar. Los tubos siguieron incubándose a 37 °C 2 h más, para un total de 4 h. Finalmente, se sembró de nuevo 100 µL del cultivo en MRS agar y las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h.

El número de bacterias utilizado (1×10^6 CFU/mL) fue confirmado mediante diluciones seriadas, por triplicado.

2 Cultivo de células epiteliales

Para sembrar Caco-2 o T84 en placas de 24 pocillos, se utilizaron pases entre 3 al 25 para Caco-2 y del 60 al 75 para T84, estos cultivos fueron lavados con 10 mL de 1X PBS (P4417-100TAB; Sigma-Aldrich), triptinizados con 1 mL de tripsina-EDTA 1X y al cual se le adicionaron 9 mL medio de cultivo completo. Las células fueron cuantificadas mediante una cámara de Neubauer (Hirschmann EM Techcolor), utilizando una mezcla del cultivo con azul de tripano (relación 1:1) y visualizando al microscopio óptico utilizando el objetivo 10X (OLYMPUS CKX41). El número de células por mL fue calculado mediante la siguiente formula:

$$\text{Células/mL} = \frac{\text{Núm. de células contadas}}{\text{Núm. de cuadrados}} \times 2(\text{dilución}) \times 10\,000(\text{volumen cámara})$$

El cultivo de Caco-2 fue diluido en medio de cultivo completo para obtener 8×10^4 células/mL y a partir de esta dilución, se agregó 1 mL a cada pocillo. La placa de 24 pocillos se incubó a 37 °C 5% CO₂ hasta una confluencia del 95-100% (aproximadamente 350 000 células/pocillo).

El cultivo de T84 fue diluido en medio de cultivo completo para obtener 2.6×10^5 células/mL y a partir de esta dilución, se agregó 1 mL a cada pocillo. La

placa de 24 pocillos se incubó a 37 °C 5% CO₂ hasta una confluencia alrededor del 70-80% (aproximadamente 350 000-400 000 células/pocillo).

El día del experimento se realizó el conteo de células por pocillo, adicionando 200 µL de tripsina-EDTA a cada pocillo, incubando 5 min a 37 °C y CO₂ 5%, posteriormente se adicionó 800 µL de medio de cultivo y se realizó el conteo tal como se mencionó anteriormente, obteniendo directamente el número de células por mL y por pocillo. Se contaron dos pocillos y se obtuvo el promedio para posteriormente ajustar las suspensiones bacterianas a la multiplicidad de infección (MOI) utilizada.

3 Preparación de bacterias

Las bacterias *L. casei* BL23, *L. casei* BL23 portadora del plásmido pT1GRPC37, y *L. rhamnosus* GG fueron inoculadas en 10 mL MRS (con Erm⁵ para el caso de *L. casei* portadora de pT1GRPC37), se incubaron a 37 °C durante 24 h. Antes de realizar el ensayo de protección a la gentamicina, se midió densidad óptica de los cultivos a 550 nm (DO₅₅₀), teniendo como blanco el medio MRS y, de acuerdo a la curva de crecimiento calculada de estas cepas se determinó el número de bacterias presentes (UFC/mL). El cultivo se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se diluyó en medio suplementado para Caco-2 o T84 sin antibióticos, ajustando para obtener una MOI de 10³ bacterias/célula en solo 50 µL. Para esto último, una vez determinando el número de bacterias correspondiente a una MOI de 10³, se multiplicó por 20, para concentrar 20 veces el cultivo, teniendo como referencia

que 1000 μL (1 mL) dividido entre 50 es igual a 20, y a esto se ajustó el volumen del cultivo. Por ejemplo, para una MOI de 10^3 como 3.5×10^8 UFC/mL, el cultivo se ajustaría a 7×10^9 UFC/mL. Si la $\text{DO}_{.550}$ de BL23 es 0.656, de acuerdo a la curva de crecimiento esto correspondería a 4.6×10^9 UFC/mL. Finalmente, para llevar el cultivo de 4.6×10^9 UFC/mL a 7×10^9 UFC/mL, el pellet bacteriano se tendría que resuspender en 6.5 mL de medio de cultivo (Caco-2 o T84) sin antibióticos.

4 Ensayos de internalización

a Tratamientos

Antes de llevar a cabo la co-incubación, se reemplazó el medio de cultivo completo de las células epiteliales por uno sin antibióticos, según la línea celular utilizada. De acuerdo al experimento planteado, se adicionó el estimulante o inhibidor a probar.

El IFN- γ liofilizado (Cat n° 11343536, ImmunoTools, Germany) fue reconstituido en alícuotas en H_2O estéril a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en 25 μL , el cual posteriormente fue diluido para obtener alícuotas a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De estas alícuotas se adicionaron 10 μL para tener una concentración final de 1 000 IU/mL o IFN 100 IU/mL en cada pocillo 48 h antes de la incubación con las bacterias, teniendo como referencia que el IFN- γ tiene actividad específica de 20 000 UI/ μg . Las alícuotas fueron almacenadas a -80°C .

La citocalasina D (Cat no. PHZ1063, ThermoFisher Scientific) fue reconstituida en dimetil sulfoxido (DMSO) a una concentración de 5 mg/mL y almacenado en oscuridad o frasco ámbar a -20°C. Para el ensayo se utilizaron las concentraciones de 1 o 5 µg/mL. Para lo anterior, se preparó una solución de trabajo diluida 1:5 en medio de cultivo para la obtención de una concentración de 1 mg/mL a partir del stock de 5 mg/mL. Para obtener una concentración final de 1 o 5 µg/mL por pocillo se adicionó 1 µL de la solución de trabajo 1 mg/mL o del stock 5 mg/mL, respectivamente, en 1 mL de medio de cultivo sin antibióticos por pocillo, con 1 h de pre-incubación (Bruewer y col. 2005; Clark y col. 2005; Clark y col. 2009; Smyth y col. 2012; Wu y col. 2014).

Las proteínas p40/LC, p75 utilizadas en este trabajo fueron aisladas y purificadas de *L. casei* BL23 y p40/LGG de *L. rhamnosus* GG (Bäuerl y col. 2010) con colas de histidinas, obteniendo una molaridad de 53923.98 nM, 29650.59 nM y 48116.70 nM, respectivamente, y almacenadas a -80°C. La p40/LC y p40/LGG fueron diluidas a una molaridad de 250 nM en 500 µL para utilizar 1 µL por pocillo, teniendo una concentración final de 0.25 nM/mL (aprox. 10 ng), mientras que la p75 fue diluida a una molaridad de 25 nM en 500 µL para utilizar 1 µL por pocillo, teniendo una concentración final de 0.025 nM/mL (aprox. 1 ng). Ambas fueron pre-incubadas con las líneas celulares durante 1 h a 37 °C y 5% CO₂.

El EGF se utilizó a partir de la solución stock de 15 µg/mL reconstituido en H₂O destilada estéril y almacenada a -80°C, adicionando 3.3 o 6.7 µL a 1 mL de

medio de cultivo por pocillo, para una concentración final de 50 o 100 ng/mL, respectivamente, con un tiempo de pre-incubación de 1 h a 37 °C 5% CO₂.

El 5-(N-Etil-N-isopropil)-amilorida (EIPA) (Cat no. A3085, Sigma-Aldrich) fue reconstituido en DMSO a una concentración de 50 mM y almacenado en oscuridad o frasco ámbar a -20°C. Para los ensayos se utilizaron las concentraciones finales de 50 µM y 25 µM, para esto, se adicionó 1 µL de la solución stock 50 mM o de una dilución intermedia 1:1 en medio de cultivo sin antibiótico (25 mM), respectivamente, en cada pocillo (1 mL), con 1 h de pre-incubación a 37 °C y 5% CO₂.

La rapamicina proveniente de *Streptomyces hygroscopicus* (Cat no. R0395, Sigma-Aldrich) fue reconstituida en DMSO a una concentración de 1 mg/mL y almacenada a -20°C. Para los ensayos se utilizaron las concentraciones finales de 10 y 20 ng/mL, para esto, se preparó una solución intermedia de 5 µg/mL a partir de la cual se adicionaron 2 o 4 µL a 1 mL de medio de cultivo por pocillo para 10 o 20 ng/mL finales, respectivamente.

Todos los estimulantes o inhibidores utilizados se mantuvieron durante el experimento. En adición, en el caso de reactivos preparados en DMSO, la concentración final de DMSO en el medio de cultivo no fue mayor al 0.1%. Asimismo, se utilizó un control en presencia de 0.1% de DMSO en el medio de cultivo.

b Co-incubación bacterias-células epiteliales

Para la co-incubación con las células epiteliales, se agregaron las bacterias a cada pocillo, a una MOI 1000, de acuerdo al número aproximado de células epiteliales al momento del experimento y se incubaron a 37 °C y 5% CO₂ durante 2 h. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS pH 7.4 y se adicionaron 500 µL de gentamicina (300 µg/mL) en medio de cultivo sin antibióticos (para Caco-2 o T84, según sea el caso) a partir de la solución stock de 15 mg/mL, para eliminar bacterias no internalizadas. Después de 2 h de tratamiento con gentamicina a 37 °C y 5% CO₂, se lavaron las células con PBS pH 7.4 y se lisaron en 1 mL de Triton X-100 al 0.2% frío. A partir de este lisado se sembró en placas MRS Agar, o MRS agar Erm⁵ si se trata de la cepa con plásmido *L. casei* BL23 (pT1GRPC37), mediante diluciones. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h.

D OBSERVACIONES AL MICROSCOPIO DE EPIFLUORESCENCIA Y CONFOCAL

1 Ensayo de internalización

Las células Caco-2 o T84 se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio. Las células se sometieron a los mismos tratamientos, tal como se mencionó en la sección VIII.C.3, con un cubreobjetos como control positivo sin tratamiento y un control negativo sin bacterias ni tratamiento. Se realizó el ensayo de internalización con *L. casei* BL23 portadora de pT1GRPC37, que expresa la RFP

y la GFP. Después de 2 h a 37 °C y 5% CO₂ para permitir la internalización, las células se lavaron 2 veces con 1 mL PBS pH 7.4, se incubaron 2 h a 37 °C y 5 % CO₂ en presencia de gentamicina (300 µg/mL), se lavaron con 1 mL PBS pH 7.4, se fijaron con 200 µL de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 min y se lavaron tres veces con 1 mL de PBS pH 7.4. La tinción se realizó antes o después de la fijación.

2 Tinción celular sobre cubreobjetos

a Tinción con WGA y DAPI

En algunos casos, antes de la fijación con PFA 4% se agregó una mezcla 1:400 de WGA 594 (Wheat Germ Agglutinin Alexa Fluor 594; Cat no. W11262; ThermoFisher Scientific) e incubó durante 15 min en oscuridad, se lavó dos veces con 1 mL de PBS pH 7.4 y posteriormente, se llevó a cabo la fijación con 200 µL de PFA 4%, como se mencionó anteriormente, con tres lavados con 1 mL de PBS pH 7.4. Se llevó a cabo la tinción de núcleos en color azul con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol; no. cat D1306, ThermoFisher Scientific), incubándose una mezcla de 1:200 de DAPI y PBS pH 7.4 durante 15 min en oscuridad. Después de tres lavados con PBS pH 7.4, se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos para su visualización al microscopio.

b Tinción con DAPI

Para la tinción solo con DAPI, posterior a la fijación, se llevó a cabo la tinción de núcleos en color azul con DAPI, se incubaron los cubreobjetos con una

mezcla 1:200 de DAPI y PBS pH 7.4 durante 15 min en oscuridad. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS pH 7.4, y se montaron en portaobjetos para su visualización en microscopio o se almacenaron en PBS a 4 °C en oscuridad.

c Tinción con DAPI y Faloidina-TRITC

Posterior a la fijación, las células epiteliales se incubaron con 200 µL de Tritón 0.1% durante 5 min. Se lavaron tres veces con 1 mL de PBS, se adicionó una mezcla 1:200 del reactivo faloidina-TRITC (faloidina-tetrametilrodamina B isotiocianato; Cat no. P1951; Sigma-Aldrich) y PBS e incubó durante 2 min en oscuridad. Se lavaron tres veces con 1 mL de PBS y se adicionó una mezcla de 1:250 de DAPI (Diclorhidrato de 4',6-Diamino-2-Fenilindol; Cat no. D1306; ThermoFisher Scientific) durante 15 min en oscuridad. Se lavaron tres veces con 1 mL de PBS y se montaron los cubreobjetos en portaobjetos para su visualización.

3 Montaje de cubreobjetos, Equipos y Software

Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con aprox. 7 µL de ProLong™ Diamond Antifade Mountant (no. cat. P36965, ThermoFisher Scientific) para evitar la decoloración de las muestras y se visualizaron al Microscopio de Fluorescencia Nikon Eclipse E90i (Nikon Corporation, Japan). Las imágenes fueron capturadas y procesadas con el programa Nis Elements BR 3.2 (Nikon corporation, Japan) utilizando contraste de fase, el filtro DIC N2 (Nomarsky) y epifluorescencia (utilizando los filtros: para azul, DAPI 340-380/435-475; para verde, Fitc 465-495/515-555; para rojo; G-2a 510-560/565-615,

excitación y emisión, respectivamente). Posteriormente, fueron visualizados en el Microscopio Confocal Invertido Olympus FV1000 (Olympus Corporation, Japan) y procesadas con el software Olympus FluoView 4.2 (Olympus Corporation, Japan) utilizando los laser 405 nm (Azul) para detectar DAPI, 488 nm (Verde) para detectar la GFP y el 559 (Rojo; Alexa Fluor 568) para detectar faloidina-TRITC, utilizando una distancia de 0.5 μm para cada campo capturado en Z.

4 Ensayo a tiempos (“time-lapse”)

En este ensayo, las células T84 se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio. Las células se sometieron al tratamiento con IFN- γ 100 UI/mL durante 48 h antes del experimento y posteriormente se realizó el ensayo de internalización con *L. casei* BL23 portadora de pT1GRPC37, que expresa la RFP (y la GFP en menor intensidad). Las bacterias fueron retiradas a tiempo 0-3 minutos, a 1 h y 2 h de co-incubación a 37 °C y 5% CO₂. Los cubreobjetos a tiempo 0, 1 y 2 h se lavaron con 1 mL PBS pH 7.4, se fijaron con 200 μL de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 min y se lavaron tres veces con 1 mL de PBS pH 7.4. En el caso de los tiempos 4, 6, 8, 12 y 24 h, las bacterias se retiraron a las 2 h, las células se lavaron 2 veces con 1 mL PBS pH 7.4, y se incubaron 2, 4, 6, 10 y 22 h más, respectivamente, a 37 °C y CO₂ 5 % en presencia de 500 μL de gentamicina (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Finalmente se lavaron con 1 mL PBS pH 7.4, se fijaron con 200 μL de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 min y se lavaron tres veces con 1 mL de PBS pH 7.4. La tinción se realizó posteriormente a la fijación con DAPI y

Faloidina-TRITC, como se menciona en la sección VIII.D.2.c. y el montaje y visualización como se menciona en la sección VIII.D.3.

5 Ensayo con *L. casei* BL23 no viables

En este ensayo, las células T84 se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio. Después de 3 días para llegar a una confluencia del 70-80% (igual que en los ensayos anteriores), las células fueron pre-incubadas 1 h con gentamicina (300 µg/mL) y cloranfenicol (25 µg/mL) y posteriormente, se realizó el ensayo de internalización con *L. casei* BL23 [pT1GRPC37] durante 2 h. Los cubreobjetos se lavaron con 1 mL PBS pH 7.4, se fijaron con 200 µL de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 min y se lavaron tres veces con 1 mL de PBS pH 7.4. La tinción se realizó posteriormente a la fijación con DAPI y Faloidina-TRITC, como se menciona en la sección VIII.D.2.c. y el montaje y visualización como se menciona en la sección VIII.D.3.

E ENSAYOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

Utilizando la cepa de *L. casei* BL23 [pT1GRPC37] se llevaron a cabo ensayos de internalización bajo las mismas condiciones: MOI 10³ y 2 h de co-incubación con las células epiteliales Caco-2 o T84 (bajo los mismos tratamientos, tal como se mencionó anteriormente para los ensayos de protección a la gentamicina). También, con y sin tratamiento de IFN-γ se realizó el ensayo a diferentes tiempos de co-incubación con Caco-2 (0, 30, 60, 120 min). Posterior a la co-incubación se realizaron 2 lavados con 1 mL de PBS pH 7.4 y

se añadieron 100 μ L de tripsina-EDTA para desprender y separar las células epiteliales, incubándose durante 5 min a 37 °C. Finalmente, se fijaron con 300 μ L de paraformaldehído (PFA) al 4% para tener una concentración final de aprox. 3%. Las muestras se almacenaron a 4 °C en oscuridad hasta su uso.

Las muestras se filtraron con 50 μ m Cuo Filcons Non Sterile (Cat no. 340632, BD BIOSCIENCES, San José, USA), y se llevó a cabo la cuantificación células fluorescentes utilizando el Citómetro de flujo BD LSRFortesa™ cell analyzer (BD BIOSCIENCES), y los datos procesados mediante el software BD FACSDiva™ v6.2. Para cada experimento de interacción, se analizaron 50,000 eventos.

F ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos fueron realizados con cuatro replicas y tres repeticiones. Los datos fueron analizados con los softwares IBM SPSS Statistics versión 23 y GraphPad Prism7 mediante el Analisis de Varianza Mixto, con dos factores fijos (línea celular, bacteria) y dos aleatorios (día y pocillo). Los tratamientos fueron comparados con la prueba de comparación multiple Bonferroni o Tamhane, considerando significativa una $P \leq 0.05$.

IX. RESULTADOS

En esta sección se muestran los resultados obtenidos del estudio de la capacidad de internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG bajo distintos tratamientos que influyen en el proceso de endocitosis. Los resultados de los experimentos realizados para estudiar de la capacidad de estas bacterias para la entrega de ADN se muestran en la sección de Anexos XV.B.

A ENSAYOS DE PROTECCIÓN A LA GENTAMICINA

1 Determinación de sensibilidad a la gentamicina

En este ensayo se determinó que la concentración de 300 µg/mL e incubación durante 2 h son suficientes para eliminar a *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG.

2 Ensayo de protección a la gentamicina: Recuento de bacterias supervivientes con diferentes tratamientos

Una vez determinada la concentración de gentamina necesaria para inhibir a *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG, se llevaron a cabo los ensayos de internalización en presencia y ausencia de estimulantes e inhibidores. Siguiendo métodos previamente publicados (Ver Materiales y Métodos). INF-γ (100 y 1000 UI/mL) tuvo una pre-incubación de 48 h antes del experimento, mientras que el resto, citocalasina D (1 y 5 µg/mL), p40/LC (0.25 µM), p40/LGG (0.25 µM), p75

(0.025 μ M), EGF (50 y 100 ng/mL), EIPA (25 y 50 μ M) y rapamicina (10 y 20 ng/mL) tuvieron una pre-incubación de 1 h.

La línea Caco-2 se estandarizó para obtener un número de células por pocillo entre 350 000 y 400 000 cercanas al 100% de confluencia al día del experimento, formando una monocapa. Mientras que para los ensayos con T84, ésta se utilizarón entre 350 000 y 400 000 células por pocillo con un 70-80% de confluencia, y las bacterias se inocularon con una MOI de 1000.

a Comparación entre *L. casei* BL23 y *L. casei* BL23 [pT1GRPC37]

Este ensayo se realizó porque la cepa *L. casei* [pT1GRPC37] (C81) fue utilizada en los siguientes ensayos de Microscopía de Epifluorescencia y Confocal, así como en Citometría de flujo para observar el proceso de internalización de *L. casei* BL23 en las líneas celulares Caco-2 y T84. Como resultado obtuvimos que la cepa de *L. casei* BL23 tipo salvaje muestra diferencias significativas *L. casei* BL23 [pT1GRPC37] (Fig. 6). Estas cepas solo se diferencian por la presencia o ausencia de un plásmido, que además de los genes de las proteínas mencionadas, cuenta con una resistencia al antibiótico eritromicina, lo cual puede estar afectando el crecimiento de la bacteria y, por lo tanto, comportarse distinto en lo que se refiere a su capacidad de internalización. No obstante, se siguió adelante con los demás experimentos porque la cepa portadora es una buena herramienta para observar procesos mediante fluorescencia y es la más similar que tenemos a *L. casei* BL23 tipo salvaje.

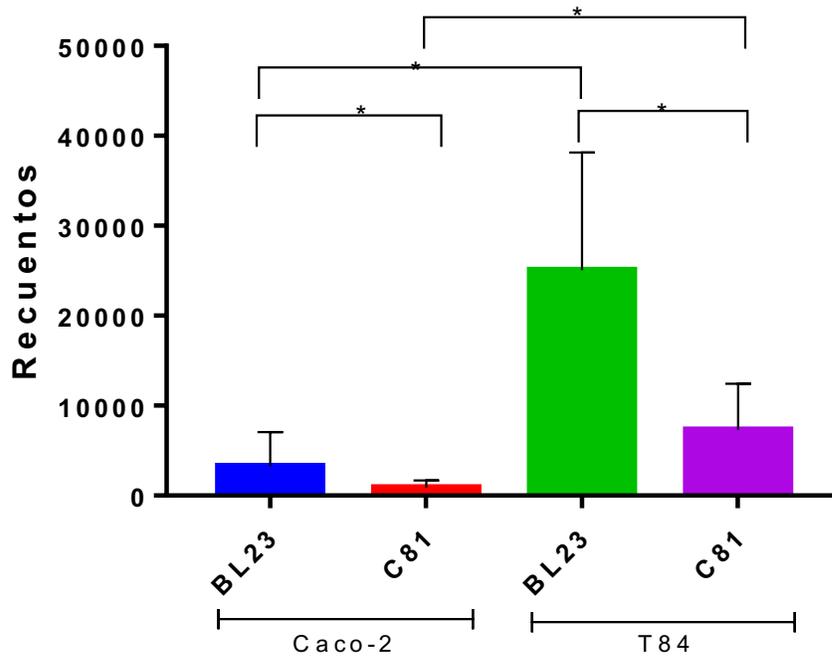


Fig. 6. Internalización de *L. casei* BL23 con y sin plásmido pT1GRPC37 en Caco-2 y T84. Los datos son presentados como las medias del número de bacterias internalizadas por pocillo con desviación estándar. Los experimentos fueron realizados con cuatro replicas por triplicado y las diferencias entre grupos comparadas con la prueba de Tamhane. * $P < 0.001$. C81: *L. casei* BL23 [pT1GRPC37].

b Internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en Caco-2 y T84 sin tratamiento

Al comparar *L. casei* BL23 en Caco-2 y T84, se observa mayor capacidad de internalización en T84 mostrando diferencias significativas ($P < 0.001$), mientras que *L. rhamnosus* GG se comporta de manera similar en ambas líneas celulares, no mostrando diferencias significativas.

Comparando de manera independiente por línea celular, en Caco-2, *L. rhamnosus* presenta mayor capacidad de internalización, sin embargo, en T84, *L. casei* BL23 supera de manera significativa a *L. rhamnosus* GG (Fig. 7).

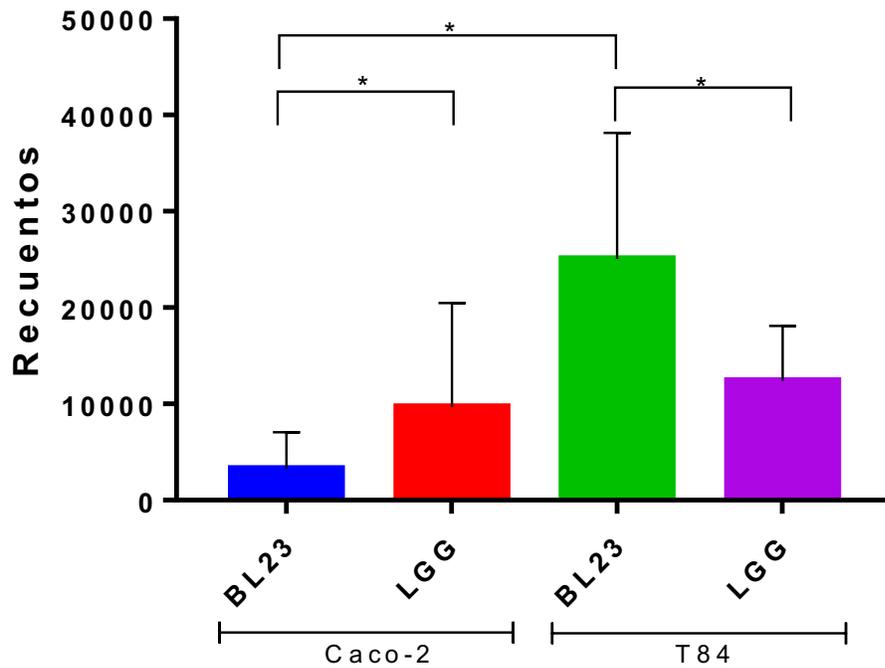


Fig. 7. Internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en Caco-2 y T84.

Los datos son presentados como las medias del número de bacterias internalizadas por pocillo con desviación estándar. Los experimentos fueron realizados con cuatro replicas por triplicado y las diferencias entre grupos comparadas con la prueba de Tamhane. * $P < 0.001$.

c Efecto del IFN- γ

El IFN- γ es una citoquina presente en distintos procesos celulares, principalmente en los inflamatorios, en los que altera las uniones estrechas, afectando la función de barrera. De manera general, se observan mayores recuentos en T84 en comparación con Caco-2.

En ambas líneas celulares, *L. rhamnosus* GG aumenta su internalización bajo los tratamientos de IFN- γ con respecto al control mostrando diferencias significativas con el tratamiento de IFN- γ 1000 UI/mL. En el caso de *L. casei* BL23 en Caco-2, las diferencias observadas no son significativas, si bien, en Caco-2 muestra tendencia a disminuir su capacidad de internalización bajo los tratamientos con IFN- γ y, al igual que *L. rhamnosus* GG tiende a aumentar en T84 (Fig. 8).

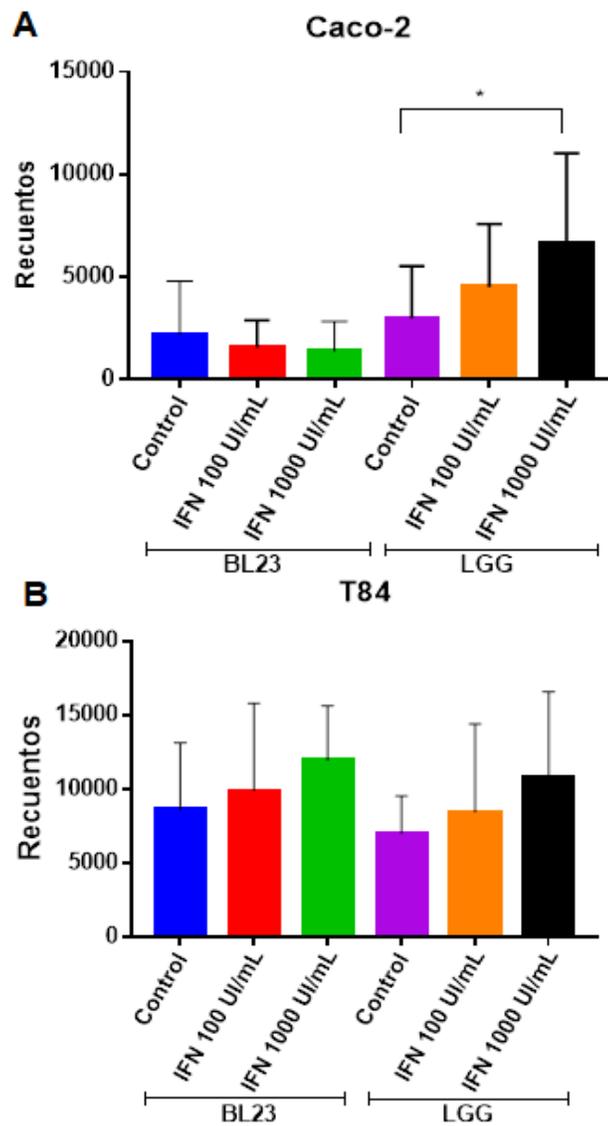


Fig. 8. Internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en Caco-2 y T84 bajo el tratamiento con IFN-γ. (A) Internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en Caco-2. (B) Internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en T84. Los datos son presentados como las medias del número de bacterias internalizadas por pocillo con desviación estándar. Los experimentos fueron realizados con cuatro replicas por triplicado y las diferencias entre grupos comparadas con la prueba de Tamhane. * $P < 0.05$.

d Efecto de p40/LC, p40/LGG, p75 y EGF

El tratamiento con EGF aumenta la internalización de *L. casei* BL23, de manera significativa en T84. Las proteínas p40LC, p40LGG (derivadas de *L. casei* B23 o *L. rhamnosus* GG, respectivamente) y la p75 también manifiestan tendencia a aumentar la internalización de esta bacteria en ambas líneas celulares, sin embargo, no de manera significativa.

De la misma manera, el tratamiento con EGF parece aumentar la internalización de *L. rhamnosus* GG en ambas líneas celulares, aunque no significativamente. Las proteínas p40LC, p40LGG y p75 en esta bacteria parecen tener un efecto contrario al observado en *L. casei* BL23, pero no significativo.

El efecto estimulante del EGF indica que el aumento en la actividad de macropinocitosis o su efecto en el crecimiento/proliferación de estas células favorece la internalización bacteriana. La p40 y p75, derivada de ambas bacterias, se ha mostrado que activan el receptor del EGF, lo cual, a su vez activaría los procesos de macropinocitosis mediante la vía de señalización PI3K/AKT, relacionada con procesos de crecimiento celular.

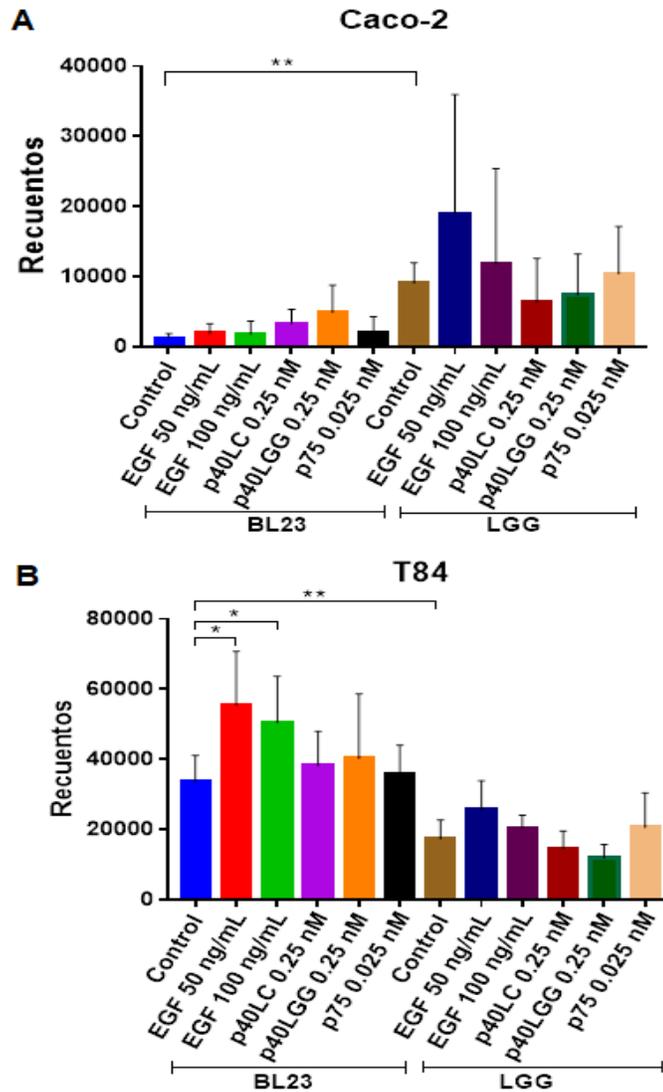


Fig. 9. Internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en Caco-2 y T84 bajo el tratamiento de EGF, p40LC, p40LGG y p75. (A) Internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en Caco-2. (B) Internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en T84. Los datos son presentados como las medias del número de bacterias internalizadas por pocillo con desviación estándar. Los experimentos fueron realizados con cuatro replicas por triplicado y las diferencias entre grupos comparadas con la prueba de Tamhane. * $P < 0.01$ ** $P < 0.001$.

e Efecto de la 5-(N-Etil-N-isopropil) amilorida (EIPA)

El derivado de la amilorida, 5-(N-Etil-N-isopropil) amilorida (EIPA) es conocido comúnmente como inhibidor de la macropinocitosis, al inhibir al intercambiador de Na^+ / H^+ de la membrana plasmática, sin embargo, actualmente se sabe que participa en la autofagia, induciendo la formación de vesículas. En ambas líneas celulares, *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG presentaron mayor internalización, sin embargo, esta diferencia con respecto al control, no es significativa. Esto sugiere que la inhibición de la macropinocitosis por EIPA, no afecta la internalización de estas cepas bacterianas.

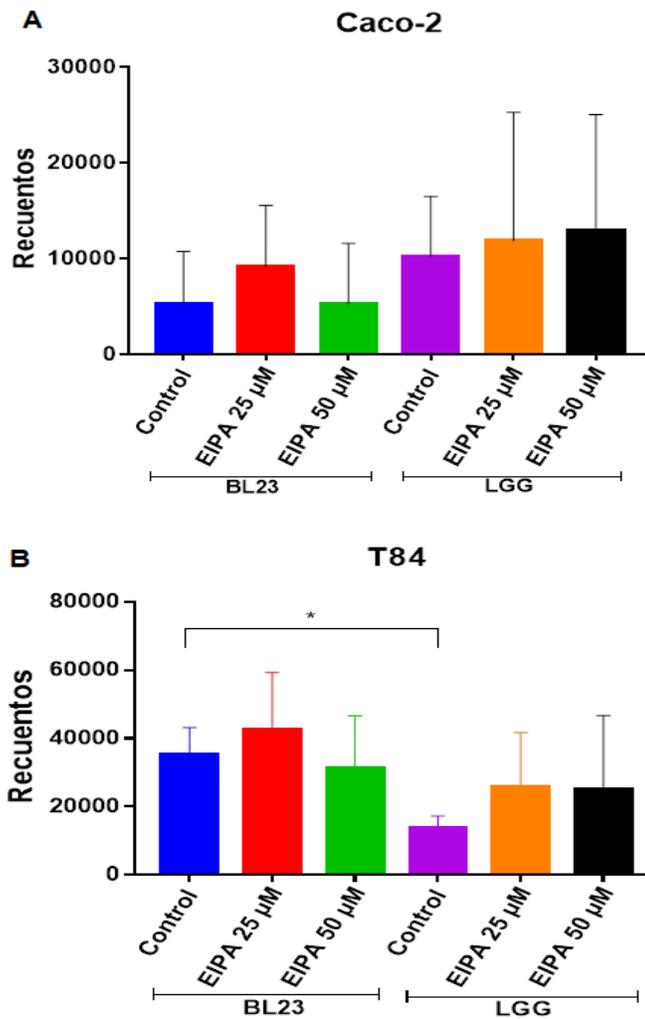


Fig. 10. Internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en Caco-2 y T84 bajo el tratamiento de EIPA. (A) Internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en Caco-2. (B) Internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en T84. Los datos son presentados como las medias del número de bacterias internalizadas por pocillo con desviación estándar. Los experimentos fueron realizados con cuatro replicas por triplicado y las diferencias entre grupos comparadas con la prueba de Bonferroni, para Caco-2 y T84, respectivamente. * $P < 0.001$.

f Efecto de rapamicina

La rapamicina es un agente inhibidor de mTORC1, lo que induce la autofagia y macropinocitosis. En los ensayos de internalización se observó un claro aumento en los recuentos de *L. rhamnosus* GG en T84, sin embargo, no es significativo (Fig. 11).

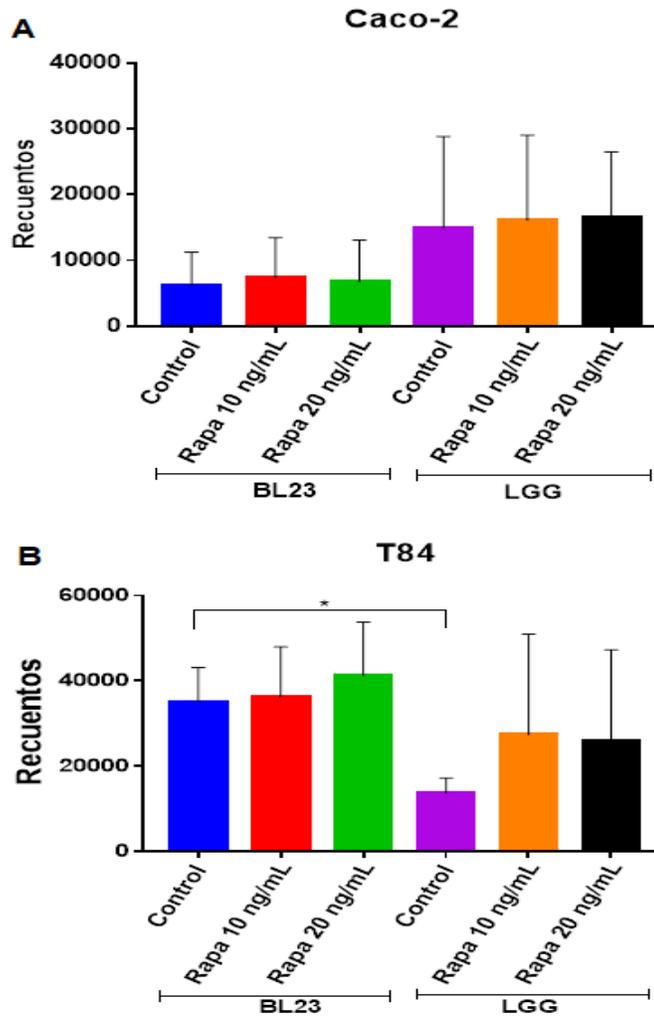


Fig. 11. Internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en Caco-2 y T84 bajo el tratamiento de rapamicina. (A) Internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en Caco-2. (B) Internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en T84. Los datos son presentados como las medias del número de bacterias internalizadas por pocillo con desviación estándar. Los experimentos fueron realizados con cuatro replicas por triplicado y las diferencias entre grupos comparadas con la prueba de Bonferroni o Tamhane, para Caco-2 y T84, respectivamente. * $P < 0.001$. Rapa:Rapamicina.

g Efecto de citocalasina D

El tratamiento con citocalasina D disminuyó significativamente la internalización de *L. casei* BL23 en T84, así como también, la internalización de *L. rhamnosus* GG al utilizar citocalasina D a 1 µg/mL. El tratamiento con citocalasina D a 5 µg/mL también disminuyó la internalización de *L. rhamnosus* GG, sin embargo, el efecto no fue significativo (Fig. 12).

El ensayo bajo el tratamiento con citocalasina D en Caco-2 no pudo ser realizado, ya que había gran desprendimiento de las células. El ensayo fue repetido, tanto con células confluentes como pre-confluentes, sin éxito.

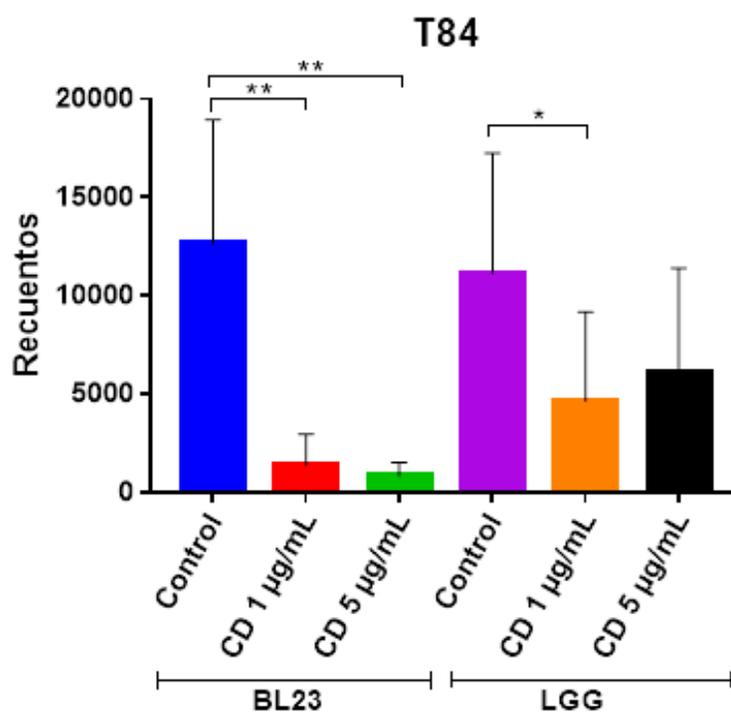


Fig. 12. Internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en T84 bajo el tratamiento de citocalasina D. Los datos son presentados como las medias del número de bacterias internalizadas por pocillo con desviación estándar. Los experimentos fueron realizados con cuatro replicas por triplicado y las diferencias entre grupos comparadas con la prueba de Bonferroni o Tamhane, para Caco-2 y T84, respectivamente. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$. CD: Citocalasina D.

B OBSERVACIONES AL MICROSCOPIO DE EPIFLUORESCENCIA Y CONFOCAL

Las células epiteliales Caco-2 y T84 fueron sembradas sobre cubreobjetos y el ensayo de internalización realizado de la misma manera, bajo las mismas condiciones y tratamientos que en el ensayo de protección a la gentamicina, con la diferencia de que, al finalizar las incubaciones, las células fueron fijadas, teñidas con DAPI, DAPI y WGA 594, o bien, con DAPI y Faloidina-TRITC y el cubreobjetos montado en portaobjetos para visualizar al Microscopio de Epifluorescencia o al Confocal. La cepa utilizada *L. casei* BL23 [pT1GRPC37] que, aunque muestra un comportamiento diferente a la de tipo salvaje en el ensayo de protección a la gentamicina y posterior recuento de bacterias supervivientes, resulta el modelo más próximo disponible.

1 Visualización de la internalización de *L. casei* BL23

Los ensayos de internalización se llevaron a cabo sobre cubreobjetos utilizando la cepa *L. casei* BL23 [pT1GRPC37] que expresa la RFP y GFP. Todos los tratamientos muestran gran cantidad de bacterias internalizadas. La mayoría de las bacterias internalizadas se encuentran en zonas periféricas de la monocapa o de baja confluencia donde se localizan células con crecimiento activo.

a Control negativo

Se llevó a cabo el mismo procedimiento del ensayo de internalización, sin embargo, no se aplicó ningún tratamiento ni se realizó la co-incubación de 2 h con bacterias, en su lugar, se utilizó medio de cultivo (Fig. 13 y 14).

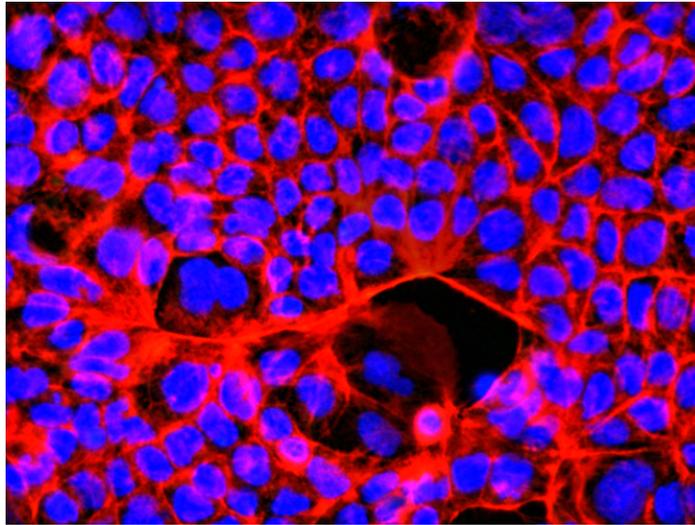


Figura 13. Imagen de Microscopía de Epifluorescencia de células Caco-2.

En la imagen se muestran los nucleos en azul teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que en verde se buscó la expresión de la GFP por *L. casei* BL23. Imagen capturada con el objetivo 32X. En la imagen no se observan bacterias.

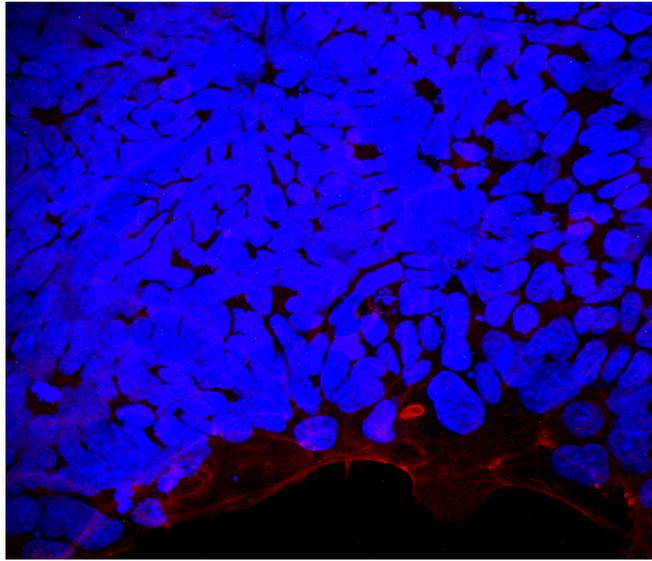


Figura 14. Imagen de Microscopía Confocal de células T84. En la imagen se muestran los núcleos en azul teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. Imagen capturada con el objetivo 60X. En la imagen no se observan bacterias.

b Sin tratamiento

El ensayo se llevó a cabo sin ningún tratamiento, con co-incubación de 2 h entre bacterias y células epiteliales y posteriormente, 2 h con gentamicina para inhibir bacterias no internalizadas. Se observan bacterias enteras, no degradadas, aparentemente libres en el citoplasma, localizadas principalmente en la periferia nuclear (Fig. 15). Su presencia en el interior celular se confirma mediante la imagen confocal de muestras similares (Fig. 16).

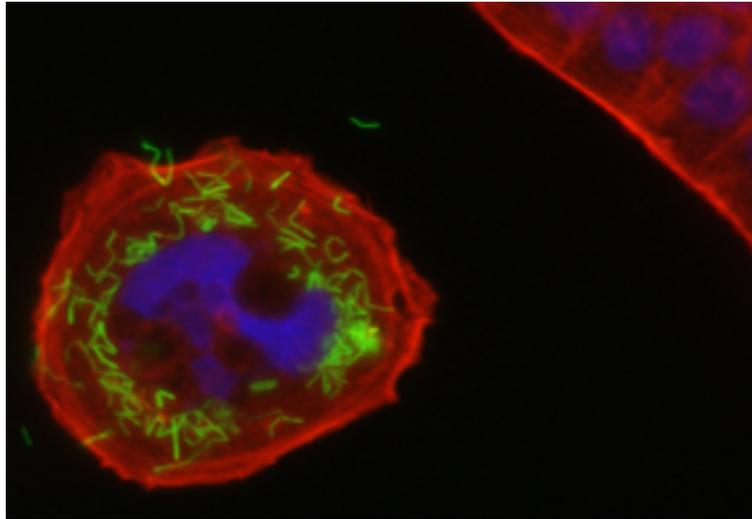


Figura 15. Imágen de Microscopía de Epifluorescencia del proceso de internalización *L. casei* BL23 en Caco-2 sin tratamiento. En la imagen se muestran los nucleos en azul teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. La imagen A) fue capturada con el objetivo 20X.

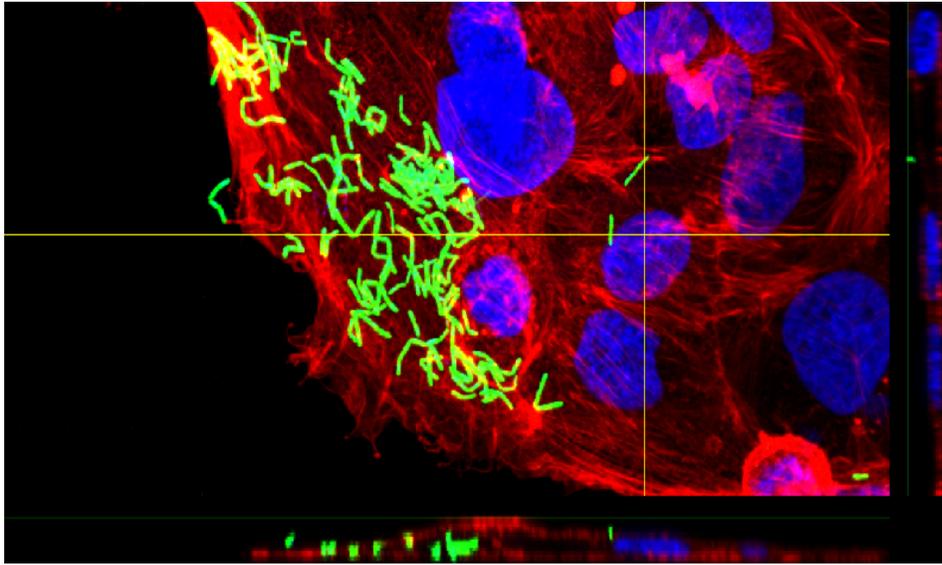


Figura 16. Imagen de Microscopía Confocal del proceso de internalización *L. casei* BL23 en Caco-2 sin tratamiento. En la imagen se muestran los núcleos azules teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. En la imagen se observa el proceso de internalización sin ningún tratamiento, con el objetivo 60X.

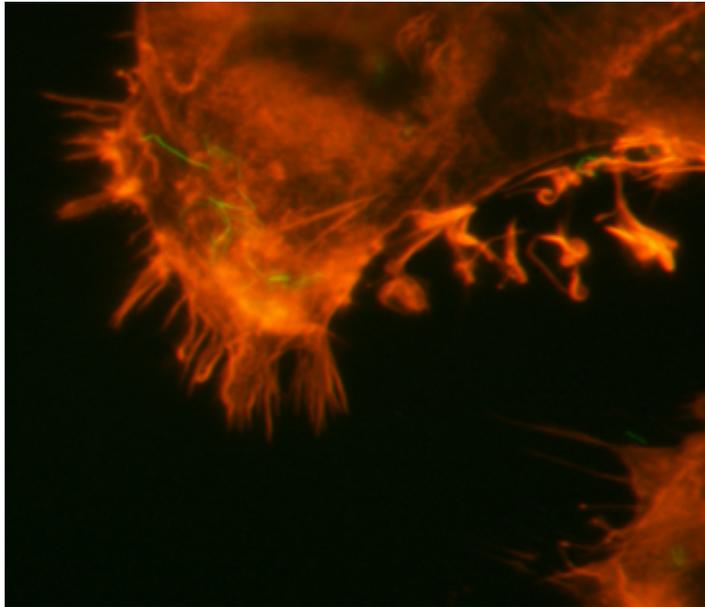


Figura 17. Imágen de Microscopía de Epifluorescencia del proceso de internalización *L. casei* BL23 en T84 sin tratamiento. En la imagen se muestra en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. Las imágenes fueron capturadas con el objetivo 40X.

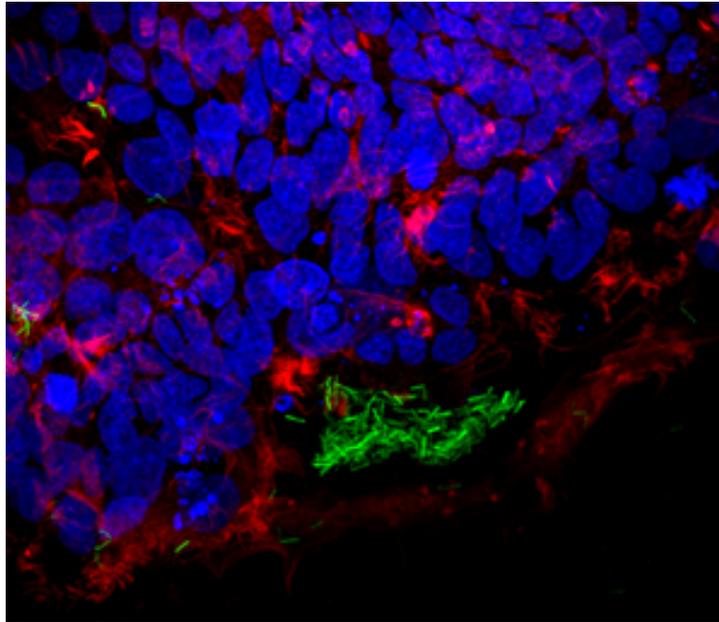


Figura 18. Imagen de Microscopía Confocal del proceso de internalización *L. casei* BL23 en T84 sin tratamiento. En la imagen se muestran los núcleos azules teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. En la imagen se observa el proceso de internalización sin ningún tratamiento, con el objetivo 60X.

c Tratamiento con IFN- γ

El tratamiento con IFN- γ muestra proteína RFP o GFP difuminada o englobada en lo que podrían ser vesículas con células bacterianas de *L. casei* BL23 en proceso de degradación. El IFN- γ induce la formación de vesículas en el proceso de autofagia, así como en el proceso de macropinocitosis para la internalización de ciertas proteínas provocando la desorganización de las uniones estrechas, causando daño a la barrera epitelial.

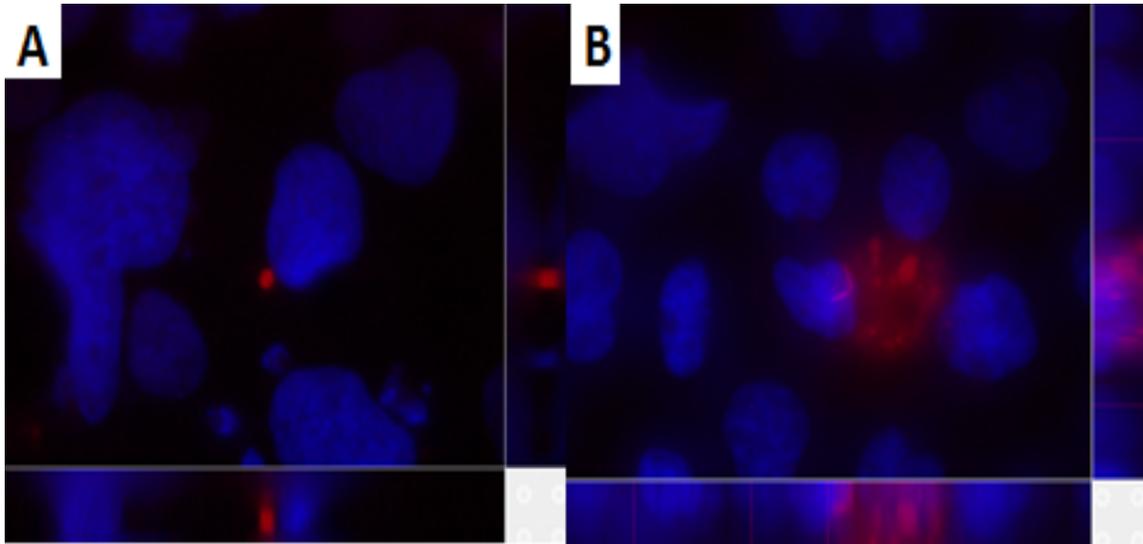


Figura 19. Imágenes de Microscopía de Epifluorescencia con proyección máxima ortogonal del proceso de internalización *L. casei* BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con INF- γ . En la imagen se muestran los núcleos en azul teñidos con DAPI, mientras que en rojo las bacterias de *L. casei* BL23 expresando la RFP. En la imagen A) se muestra el proceso de internalización bajo el efecto de una pre-incubación de 48 h con INF- γ 100 UI/mL; en la imagen B) se muestra el tratamiento con INF- γ 1000 UI/mL.

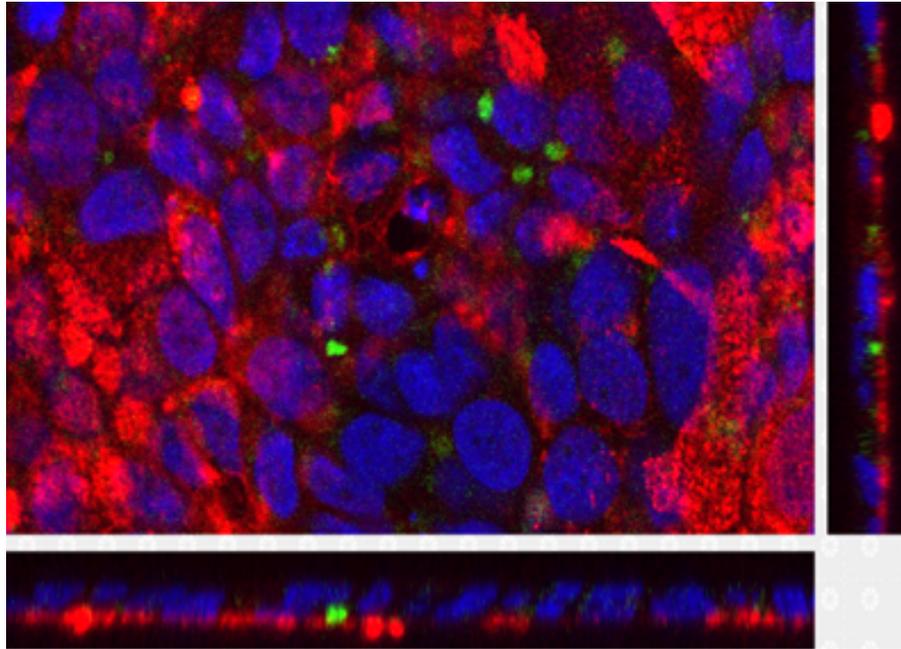


Figura 20. Imagen de Microscopía Confocal del proceso de internalización *L. casei* BL23 en T84 bajo el tratamiento con INF- γ 100 UI/mL. En la imagen A) se muestra una imagen de Microscopía de fluorescencia capturada con el objetivo 100X y en la imagen B) una imagen de Microscopía confocal capturada con el objetivo 60X. Los núcleos en azul teñidos con DAPI, las membranas teñidas con WGA 594 y en verde las bacterias de *L. casei* BL23 expresando la GFP.

d Tratamiento con p40/LC, p40/LGG, p75 y EGF

En términos generales, una de las mayores diferencias observadas es el aumento de células epiteliales con gran superficie y extensión citoplasmática, acompañado de intensos haces de actina, posiblemente por la estimulación del crecimiento activo, especialmente con el tratamiento de EGF. También, se puede determinar una asociación significativa de gran número de bacterias por célula, precisamente en las epiteliales que muestran mayor extensión citoplasmática (Fig. 21,22,23 y 24). La observación en microscopio confocal nos confirma precisamente que dichas bacterias se localizan en el citoplasma (Fig. 22 y 24).

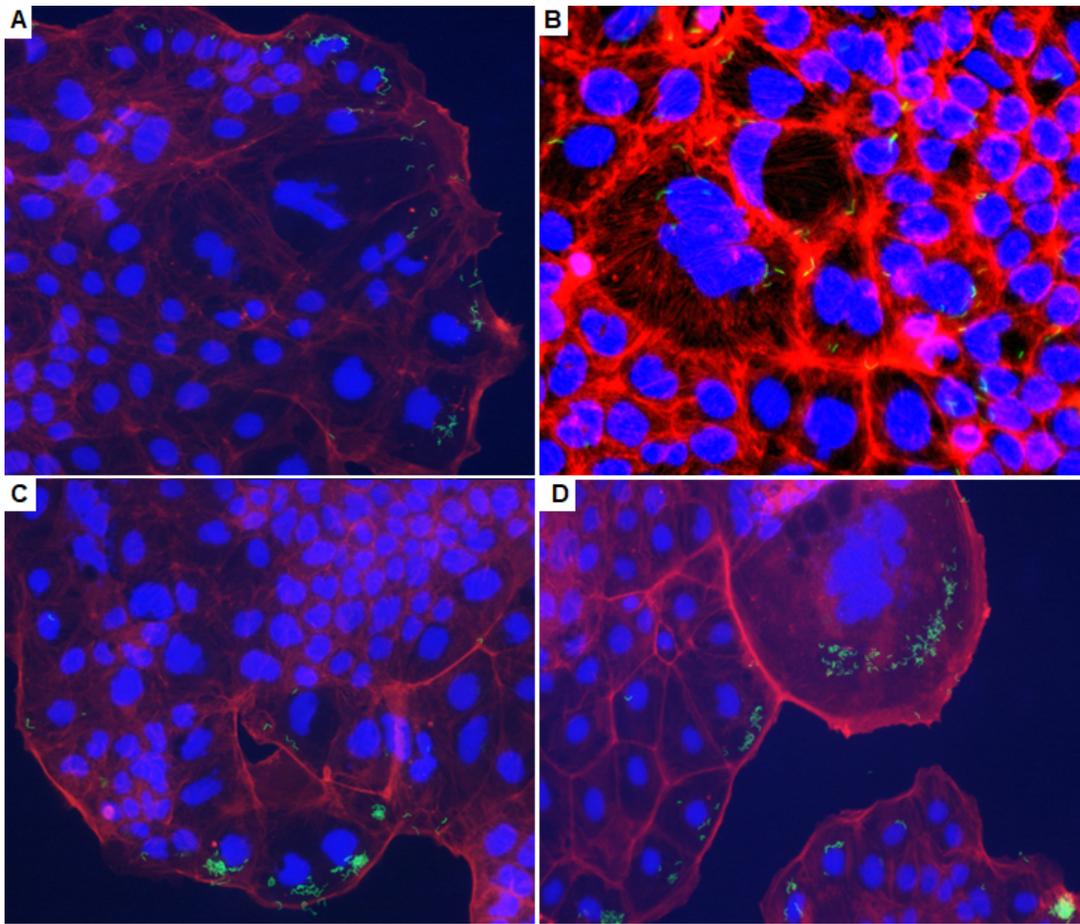


Figura 21. Imágenes de Microscopía de Epifluorescencia del proceso de internalización *L. casei* BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con p40/LC, p40/LGG, p75 y EGF. En la imagen se muestran los núcleos en azul teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. En la imagen A) se muestra el proceso de internalización bajo el tratamiento con la proteína p40LC a 20X; en la imagen B) con la proteína p40LGG a 32X; en la imagen C) y D) se muestra el tratamiento con la proteína p75 a 40X y en la imagen D) el tratamiento con EGF 100 ng/mL a 20X.

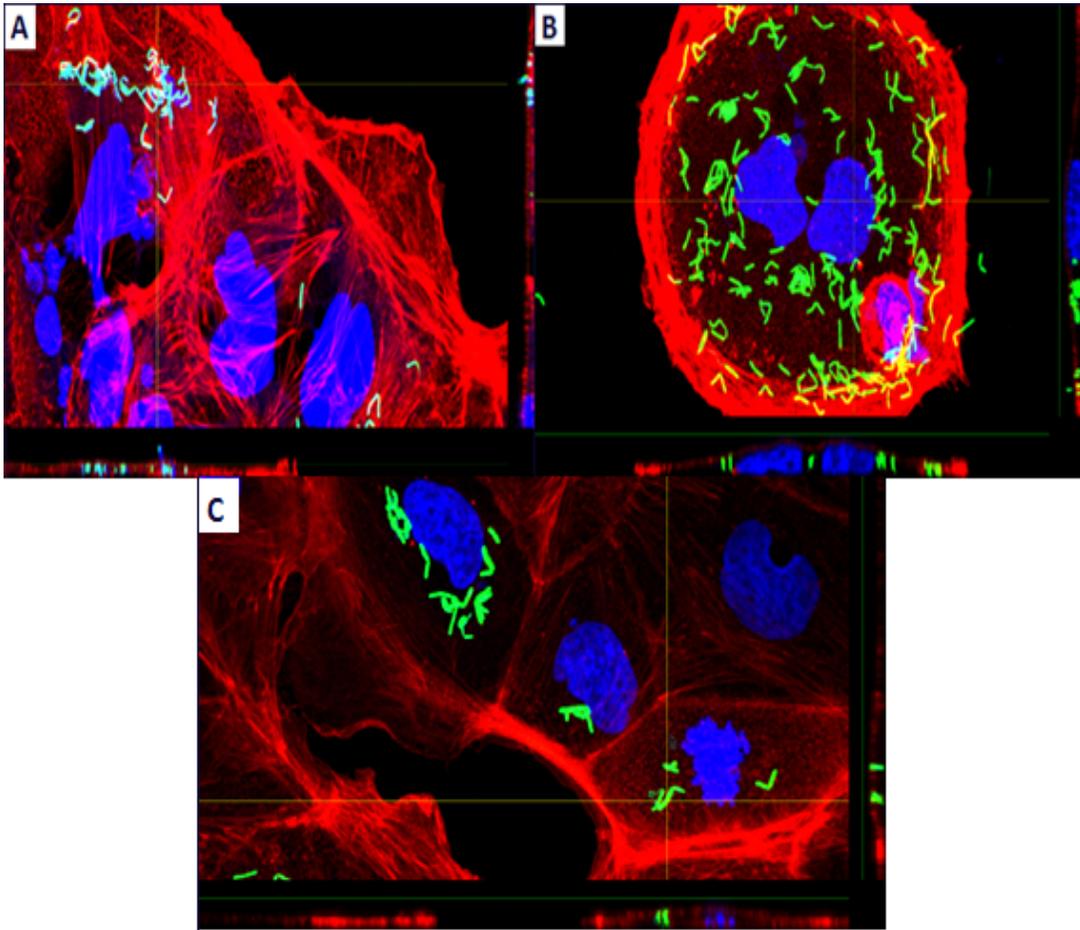


Figura 22. Imágenes de Microscopía Confocal del proceso de internalización *L. casei* BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con p40/LC y p75. En la imagen se muestran los núcleos en azul teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. Todas las imágenes fueron visualizadas y capturadas con el objetivo 60X. En la imagen A) se muestra el proceso de internalización bajo el tratamiento con p40/LC; en la imagen B) bajo el tratamiento con p75; y en la imagen C) el tratamiento con EGF 100 ng/mL.

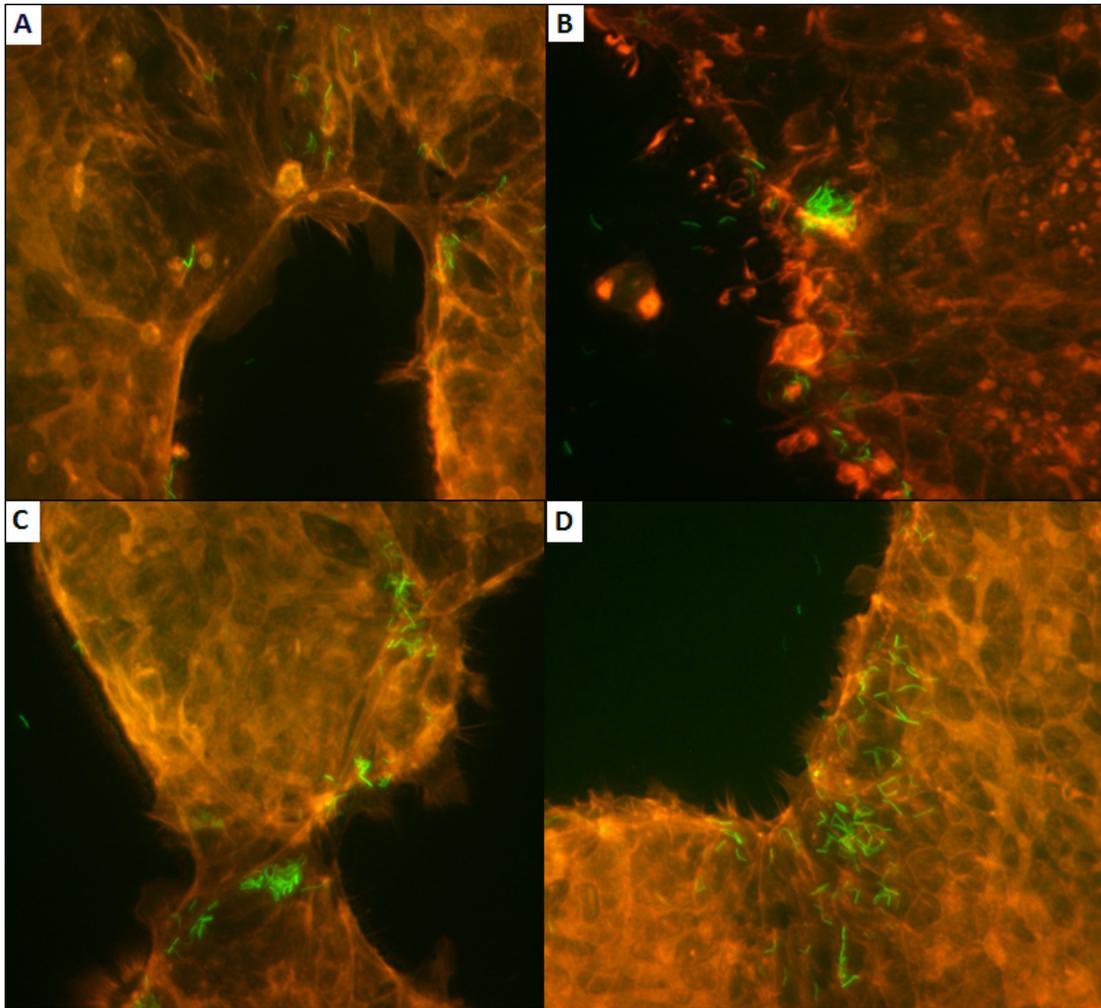


Figura 23. Imágenes de Microscopía de Epifluorescencia del proceso de internalización *L. casei* BL23 en T84 bajo el tratamiento con p40/LC, p40/LGG, p75 y EGF. Imágenes capturadas con el objetivo 32X. En la imagen se muestran en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. En la imagen A) se muestra el proceso de internalización bajo el tratamiento con la proteína p40LC; en la imagen B) con la proteína p40LGG; en la imagen C) con la proteína p75 y en la imagen D) el tratamiento con EGF 100 ng/mL.

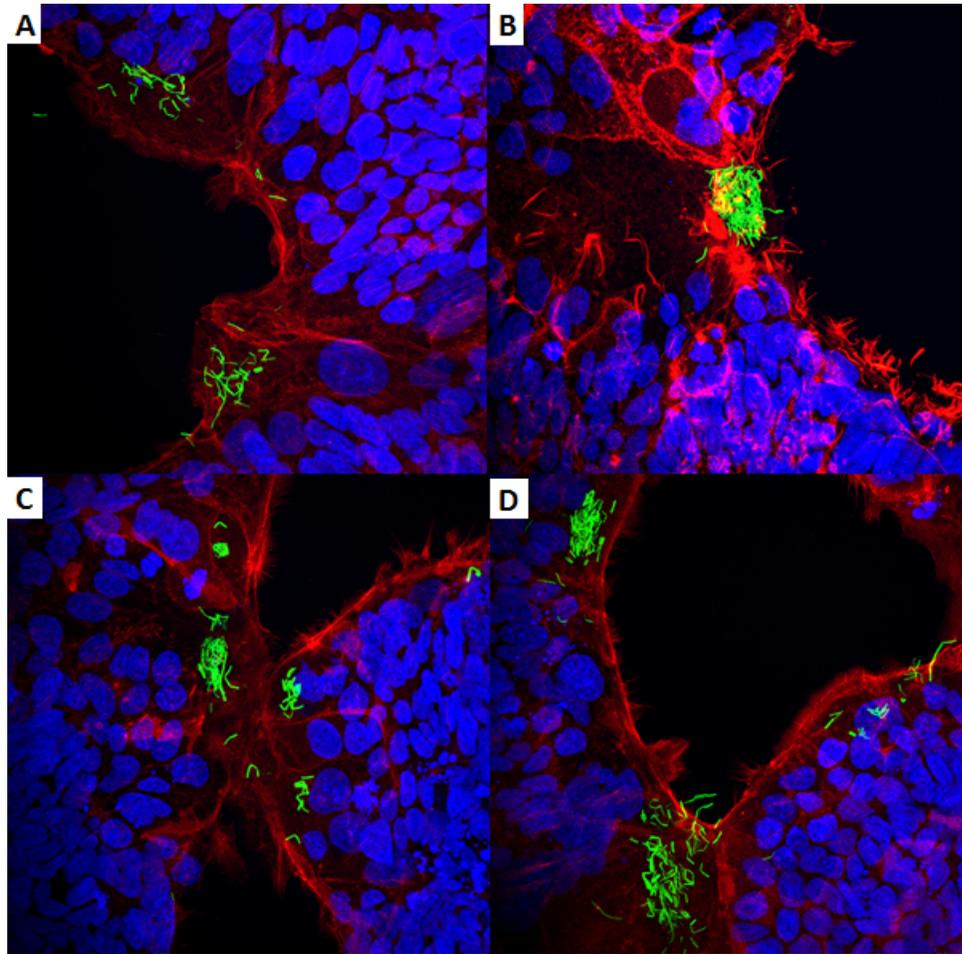


Figura 24. Imágenes de Microscopía Confocal del proceso de internalización *L. casei* BL23 en T84 bajo el tratamiento con p40/LC, p40/LGG, p75 y EGF. Imágenes capturadas con el objetivo 60X. En la imagen se muestran en azul los núcleos teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. En la imagen A) se muestra el proceso de internalización bajo el tratamiento con la proteína p40LC; en la imagen B) con la proteína p40LGG; en la imagen C) se muestra el tratamiento con la proteína p75 y en la imagen D) el tratamiento con EGF 100 ng/mL.

e Tratamiento con EIPA

Al aplicar el tratamiento con el derivado de amilorida, EIPA se muestran bacterias internalizadas, observando de manera subjetiva, mayor cantidad a una concentración de EIPA 25 μM , mientras que a una concentración mayor de 50 μM , la internalización se ve disminuida. Lo observado mediante Microscopía concuerda con los datos obtenidos de los ensayos de protección a la gentamicina, teniendo mayores recuentos bacterianos al utilizar la concentración 25 μM en comparación a 50 μM (Fig. 25 y 27). También, se observan agrupaciones bacterianas, que aparentan estar englobadas en vesículas, como correspondería a la estimulación de la formación de vesículas de autofagia por este reactivo. La Microscopía Confocal, muestra sin lugar a dudas que, tanto las células bacterianas agrupadas, como las vesículas tienen localización intracelular (Fig. 26).

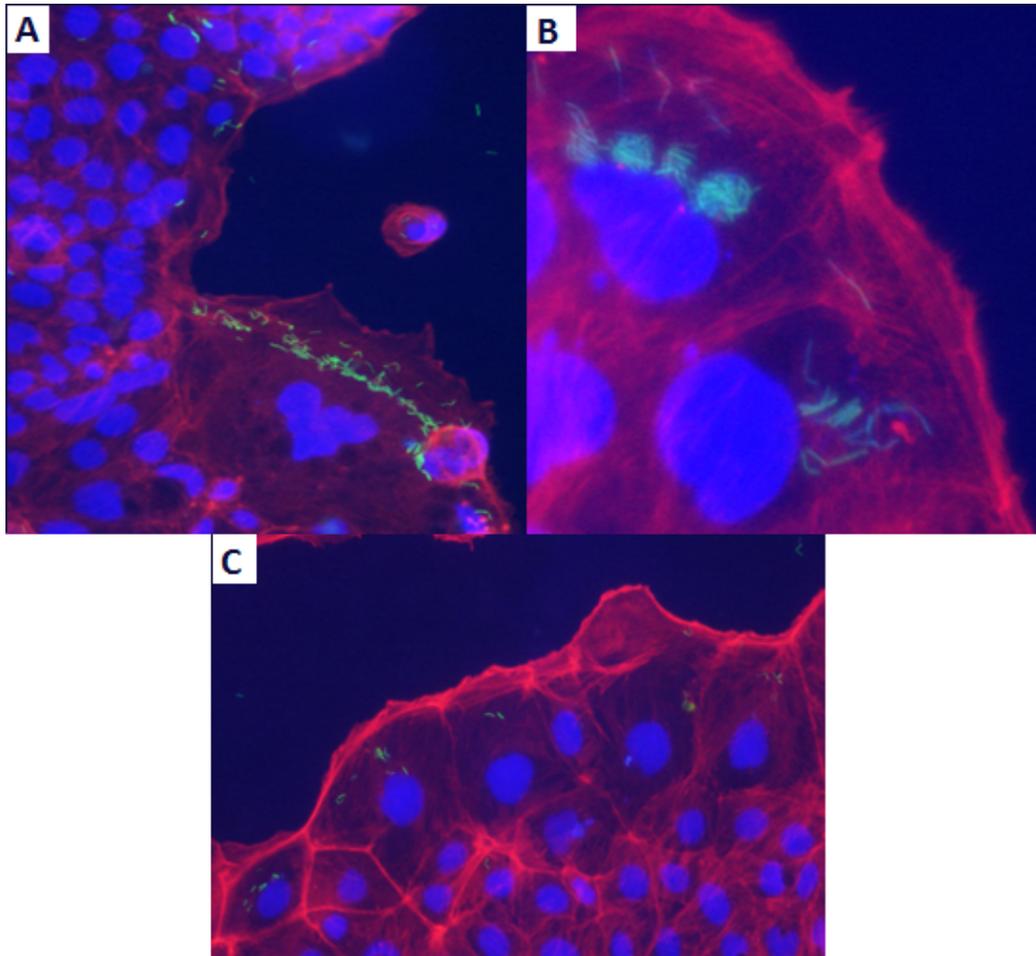


Figura 25. Imágenes de Microscopía de Fluorescencia del proceso de internalización *L. casei* BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con EIPA. En la imagen se muestran los núcleos en azul teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. En la imagen A) se muestra el proceso de internalización bajo el tratamiento con EIPA 25 μ M con el objetivo 20X, en la imagen B) se muestra mismo tratamiento con el objetivo 40X y en la imagen C) con EIPA 50 μ M con el objetivo 20X.

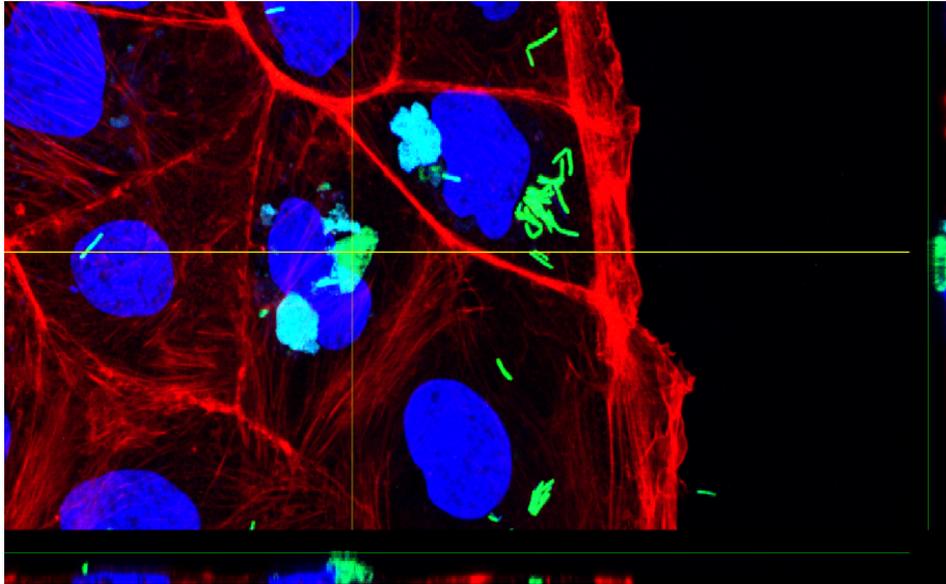


Figura 26. Imagen de Microscopía Confocal del proceso de internalización *L. casei* BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con EIPA 50 μ M. En la imagen se observa el proceso de internalización bajo el tratamiento con EIPA 50 μ M con el objetivo 60X. Se muestran los núcleos en azul teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP.

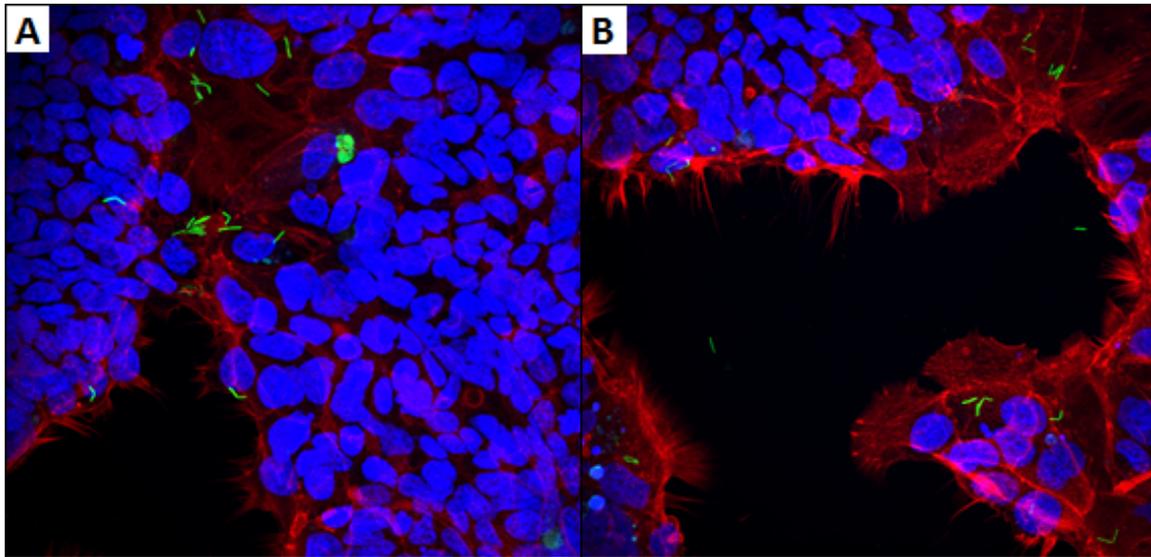


Figura 27. Imágenes de Microscopía Confocal del proceso de internalización *L. casei* BL23 en T84 bajo el tratamiento con EIPA. En la imagen se muestran los núcleos en azul teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. Ambas imágenes capturadas con el objetivo 60X. En la imagen A) se muestra el proceso de internalización bajo el tratamiento con EIPA 25 μ M y en la imagen B) con EIPA 50 μ M.

f Tratamiento con rapamicina

El tratamiento con rapamicina mostro una tendencia al aumento en la internalización de *L. casei* BL23 en ambas líneas celulares, aunque sin alcanzar significación. La observación mediante Microscopía nos reveló gran cantidad de bacterias internalizadas, en su mayoría formando agrupaciones, y en algunos casos, estas agrupaciones se observan en regiones con grandes extensiones de membrana citoplasmáticas. Además, en la monocapa de células, se pueden observar numerosos acúmulos de actina en forma circular, que podrían indicar la formación de vesículas rodeadas de actina, como producto de la inducción de la autofagia.

Tras el tratamiento con rapamicina, se observa una gran intensidad en la tinción con faloidina de fibras de actina, particularmente en las zonas periféricas que tienen, por lo general una mayor extensión que en el control. Precisamente estas son zonas con una alta densidad en bacterias como se observa en las Figuras 28, 29, 30 y 31.

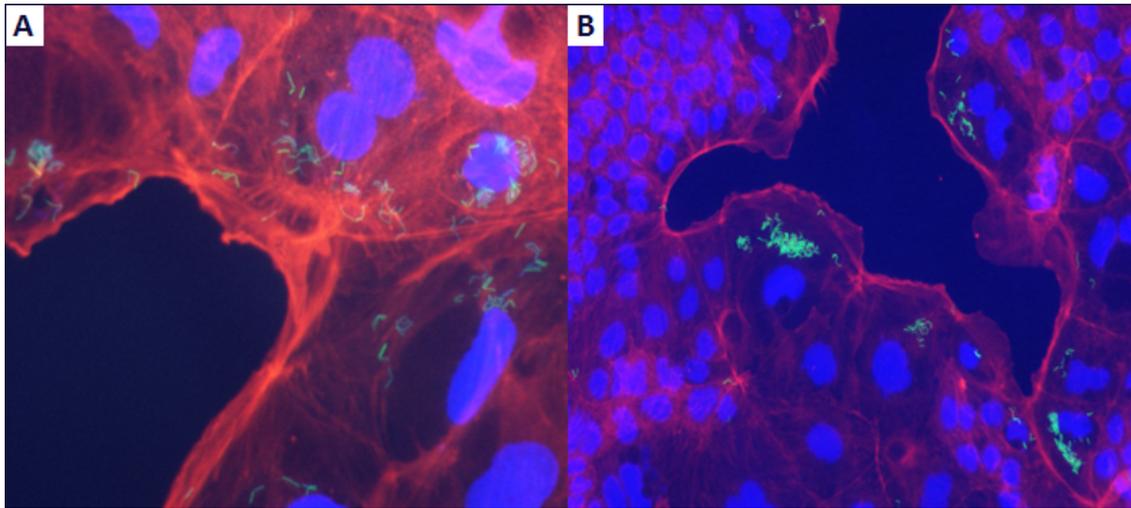


Figura 28. Imágenes de Microscopía de Epifluorescencia del proceso de internalización *L. casei* BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con rapamicina. En la imagen se muestran los núcleos en azul teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. En la imagen A) se muestra el proceso de internalización bajo el tratamiento con Rapamicina 10 ng/mL con el objetivo 40X y en la imagen B) se muestra el tratamiento con Rapamicina 20 ng/mL con el objetivo 20X.

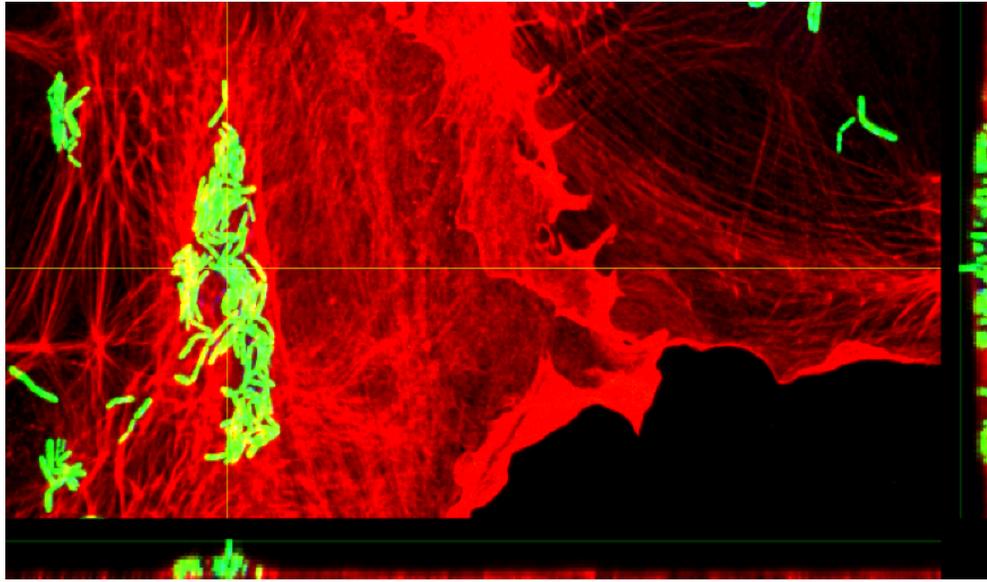


Figura 29. Imagen de Microscopía Confocal del proceso de internalización *L. casei* BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con rapamicina. En la imagen se muestra en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. En la imagen se observa el proceso de internalización bajo el tratamiento con Rapamicina 20 ng/mL con el objetivo 60X.

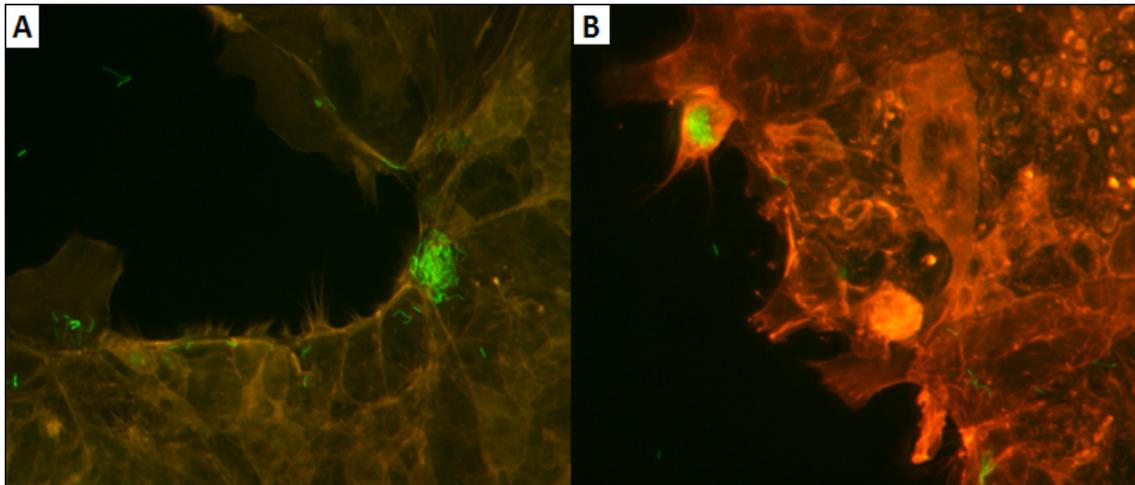


Figura 30. Imágenes de Microscopía de Epifluorescencia del proceso de internalización *L. casei* BL23 en T84 bajo el tratamiento con rapamicina. En la imagen se muestra en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. Ambas imágenes capturadas con el objetivo 32X. En la imagen A) se muestra el proceso de internalización bajo el tratamiento con Rapamicina 10 ng/mL y en la imagen B) se muestra el tratamiento con Rapamicina 20 ng/mL.

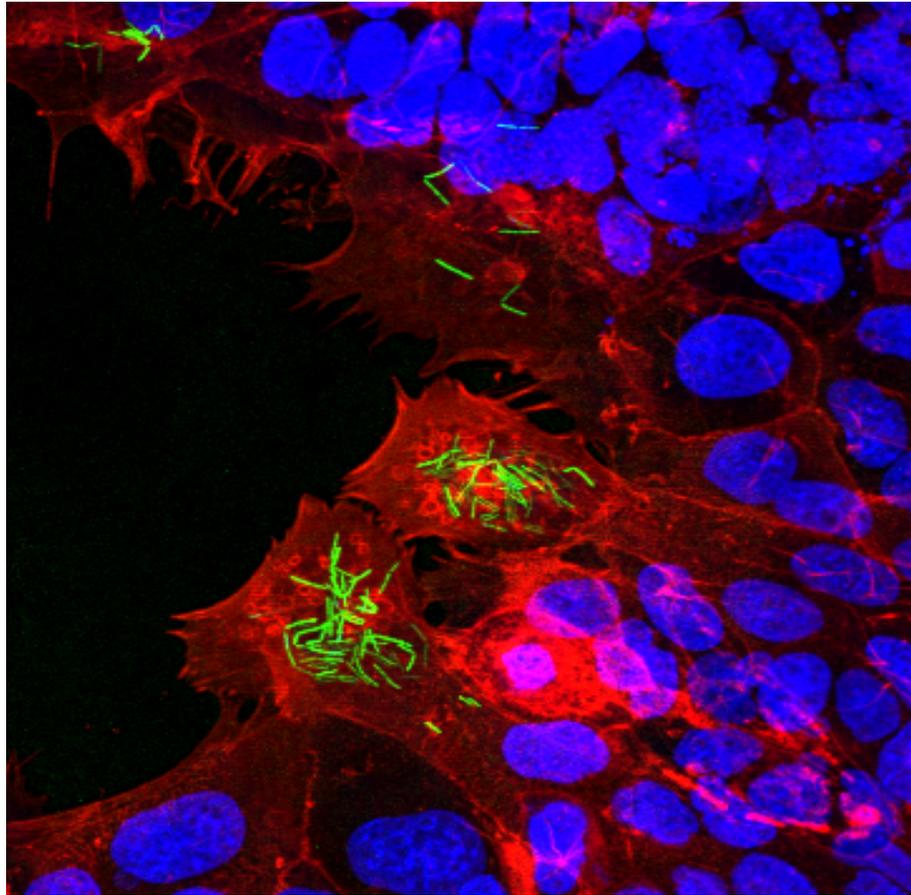


Figura 31. Imagen de Microscopía Confocal del proceso de internalización *L. casei* BL23 en T84 bajo el tratamiento con rapamicina. En la imagen se muestra en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. En la imagen se observa el proceso de internalización bajo el tratamiento con Rapamicina 20 ng/mL con el objetivo 60X.

g Tratamiento con citocalasina D

En este ensayo se observa gran cantidad de bacterias, la mayoría internalizadas. La citocalasina D inhibe la polimerización de actina, con lo cual, la mayoría de los procesos de endocitosis donde la actina juega un papel importante, como la macropinocitosis, se ven inhibidos.

La observación de numerosos campos nos indica un suavizado de las regiones periféricas (menor formación de extensiones citoplasmáticas) de los islotes de confluencia y cierta frecuencia de agrandamiento de algunas células epiteliales, con una mayor frecuencia de adhesión e internalización de células bacterianas en regiones más internas en la confluencia (Fig. 32,33,34,35).

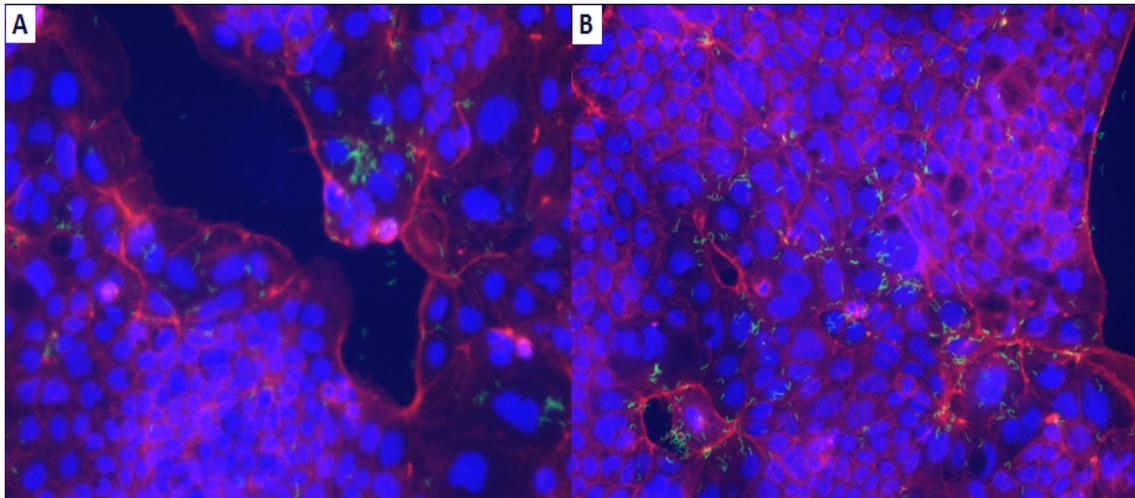


Figura 32. Imágenes de Microscopía de Epifluorescencia del proceso de internalización *L. casei* BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con citocalasina D. En la imagen se muestran los núcleos en azul teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. En la imagen A) se muestra el proceso de internalización bajo el tratamiento con Citocalasina D 1 µg/mL con el objetivo 40X y en la imagen B) se muestra el tratamiento con Citocalasina D 5 µg/mL con el objetivo 20X.

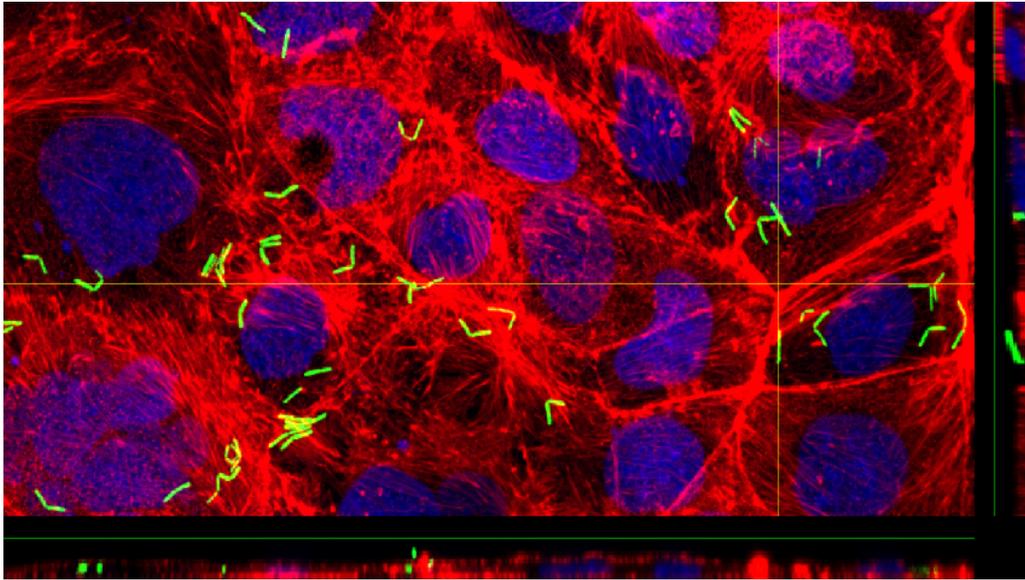


Figura 33. Imagen de Microscopía Confocal del proceso de internalización *L. casei* BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con citocalasina D. En la imagen se muestran los núcleos en azul teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. En la imagen se observa el proceso de internalización bajo el tratamiento con Citocalasina D 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con el objetivo 60X. Se observan bacterias internalizadas, y así como en otros tratamientos, se repite la forma de penetración haciendo contacto inicial con su zona apical e internalizándose.

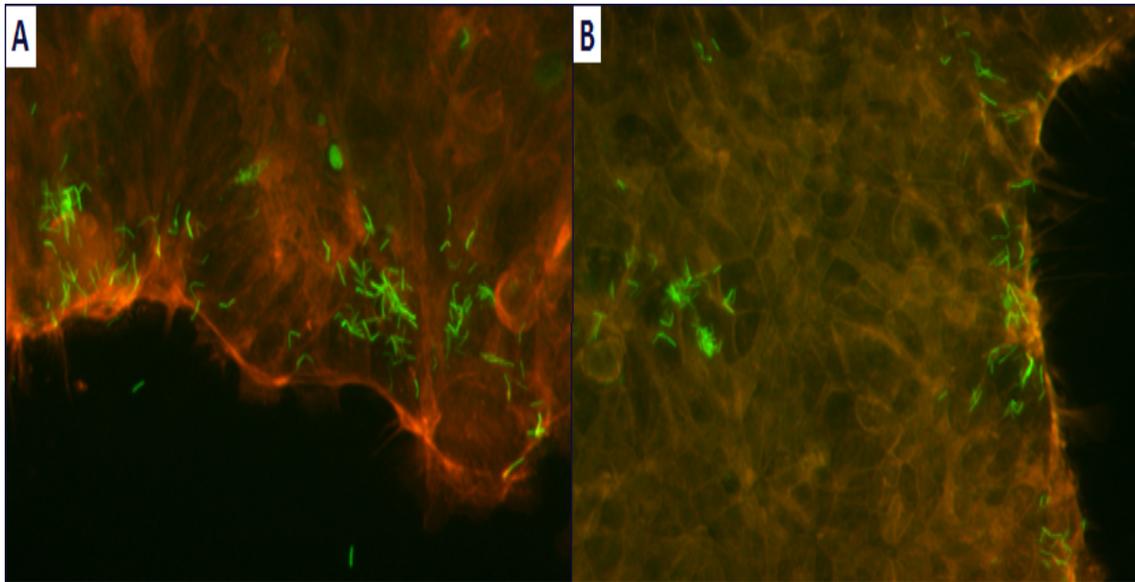


Figura 34. Imágenes de Microscopía de Epifluorescencia del proceso de internalización *L. casei* BL23 en T84 bajo el tratamiento con citocalasina D. En la imagen se muestra en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. Ambas imágenes capturadas con el objetivo 32X. En la imagen A) se muestra el proceso de internalización bajo el tratamiento con Citocalasina D 1 µg/mL y en la imagen B) el tratamiento con Citocalasina D 5 µg/mL.

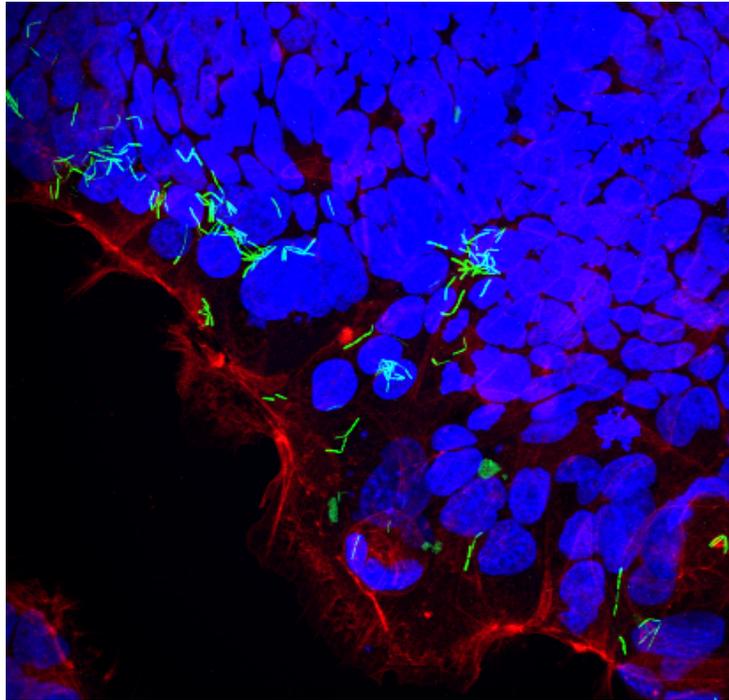


Figura 35. Imagen de Microscopía Confocal del proceso de internalización *L. casei* BL23 en Caco-2 bajo el tratamiento con citocalasina D. En la imagen se muestran los núcleos en azul teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. En la imagen se observa el proceso de internalización bajo el tratamiento con Citocalasina D 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con el objetivo 60X.

2 Ensayo “time lapse” con *L. casei* BL23 en T84

El ensayo de internalización se llevó a cabo con células T84 sembradas sobre cubreobjetos, con diferentes tiempos de incubación con bacterias y posteriormente, con gentamicina. Desde el tiempo 1-3 min de co-incubación, se observan bacterias adheridas e internalizadas. Conforme pasa el tiempo, las bacterias empiezan a tomar un aspecto de curvado a esférico, posiblemente por degradación. Sin embargo, a las 24 h, se muestra de manera general, en todos los campos observados, mayor cantidad de bacterias, en comparación a tiempos anteriores.

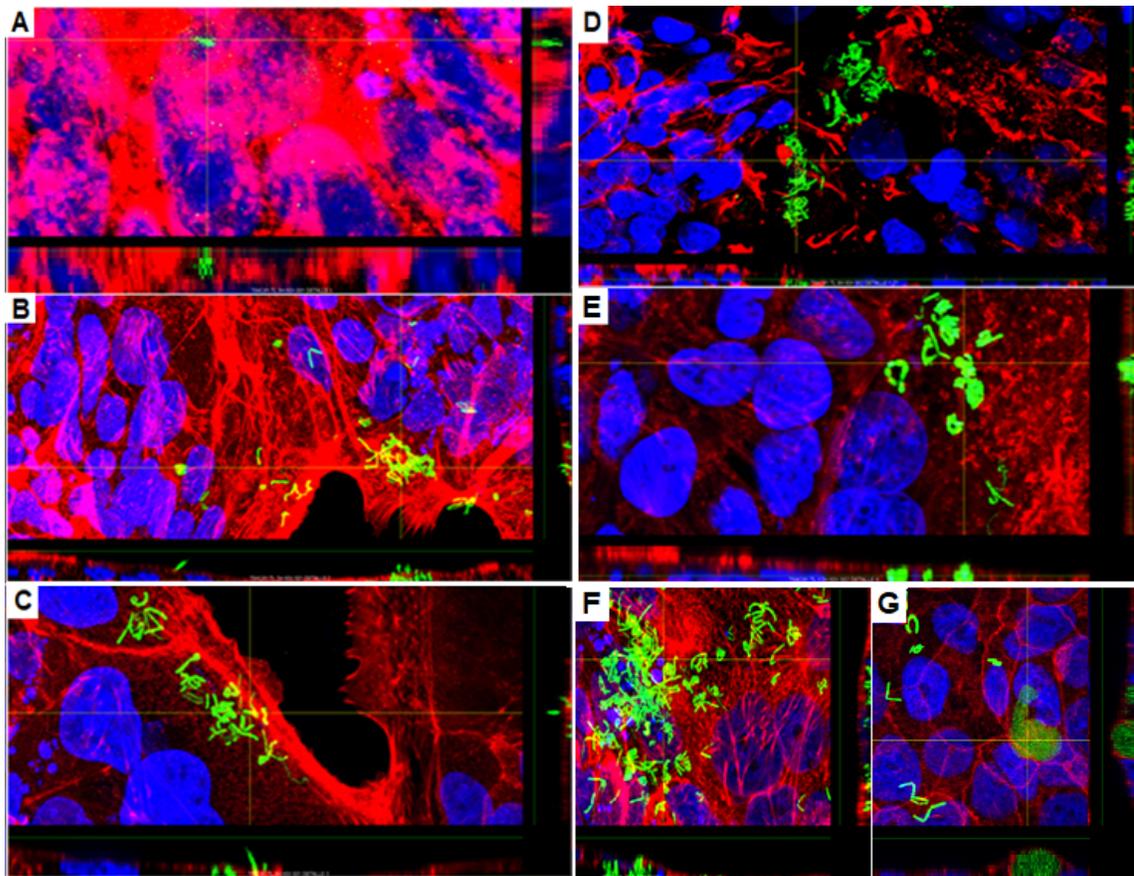


Figura 36. Imágenes de Microscopía Confocal del proceso de internalización *L. casei* BL23 en T84 sin tratamiento a diferentes tiempos. En la imagen se muestran los núcleos en azul teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. En A) 1-3 min de co-incubación con bacterias; B) 2 h de co-incubación con bacterias; C) 4 h totales: 2 h de co-incubación con bacterias más 2 h con gentamicina; D) 8 h totales: 2 h de co-incubación con bacterias más 6 h con gentamicina; E) 12 h totales: 2 h de co-incubación con bacterias más 10 h con gentamicina; F y G) 24 h totales: 2 h de co-incubación con bacterias más 22 h con gentamicina.

El ensayo de internalización a tiempos también se llevó a cabo bajo el tratamiento de IFN- γ , observando mayor cantidad de bacterias adheridas e internalizadas en comparación al ensayo sin tratamiento desde el tiempo 1-3 min, así como también, bacterias degradadas a partir de las 6 h (Fig. 37), mientras que, en el control, la degradación bacteriana se observa a partir de las 12-24 h.

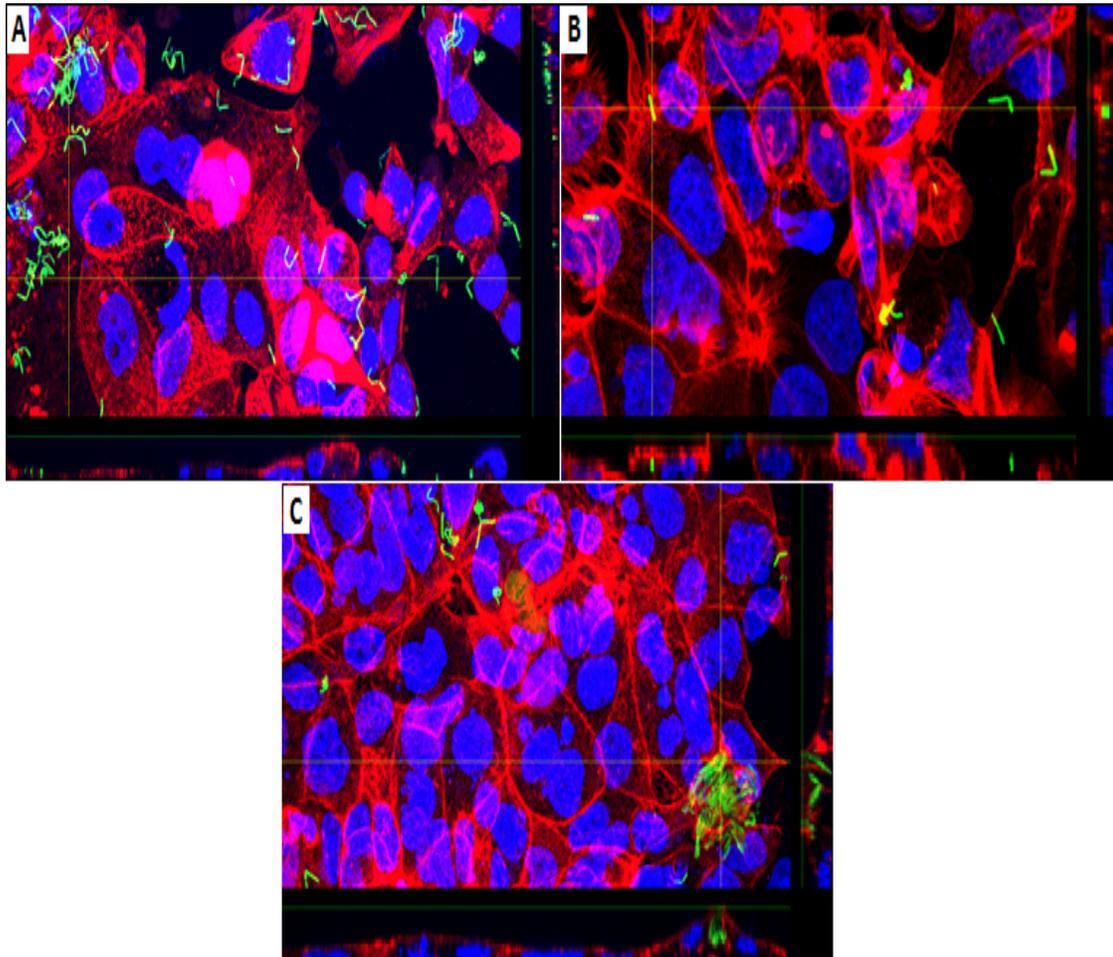


Figura 37. Imágenes de Microscopía Confocal del proceso de internalización *L. casei* BL23 en T84 bajo el tratamiento de IFN- γ 100 UI/mL a diferentes tiempos. En la imagen se muestran los núcleos en azul teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. En A) 1-3 min de co-incubación con bacterias; B) 1 h de co-incubación con bacterias; C) 6 h totales: 2 h de co-incubación con bacterias más 4 h con gentamicina.

3 Ensayo con *L. casei* BL23 no viables en T84

Para observar si las bacterias no viables son endocitadas, se llevó a cabo el ensayo de internalización con T84 sobre cubreobjetos de vidrio, pre-incubando 1 h con gentamicina y cloranfenicol y manteniendo los antibióticos durante la co-incubación de 2 h con *L. casei* BL23. En este ensayo se observa como las bacterias no viables también son internalizadas y degradadas (Fig. 38).

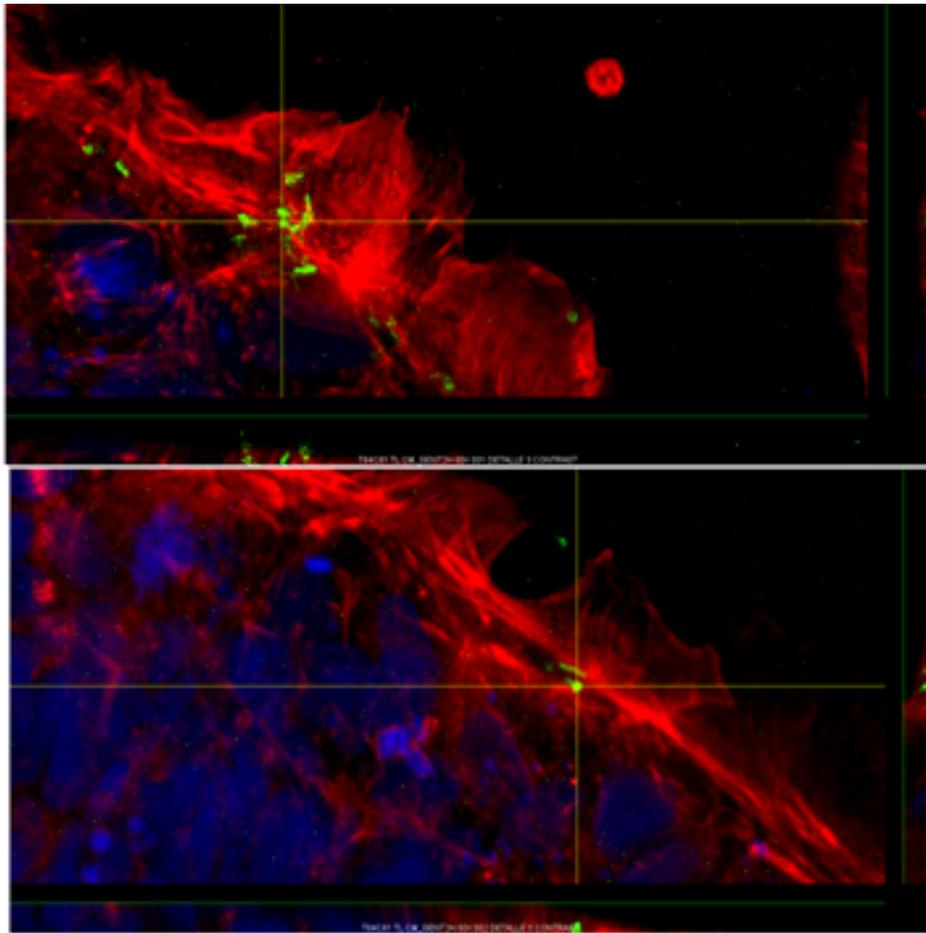


Figura 38. Imágenes de Microscopía Confocal del proceso de internalización *L. casei* BL23 no viables en T84. En la imagen se muestran los núcleos en azul teñidos con DAPI, en rojo el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina-TRITC, mientras que *L. casei* BL23 se detectó en color verde expresando la GFP. Para eliminar a *L. casei* BL23, se pre-incubó 1 h con gentamicina 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y cloranfenicol (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se mantuvo durante el experimento, 2 h.

C ENSAYOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

Para estudiar la internalización de *L. casei* BL23, la cepa utilizada fue *L. casei* BL23 portadora del plásmido pT1GRPC37 que expresa la RFP.

Se llevaron a cabo los ensayos de internalización de la misma manera que para los Ensayos de Protección a la Gentamicina y los análisis por Microscopía, sin embargo, aquí posterior a la co-incubación entre bacterias y células epiteliales, se pasó a la fijación con paraformaldehído al 4% y finalmente, a cuantificar la fluorescencia mediante Citometría de flujo.

Los gráficos de Citometría de flujo presentan varias regiones delimitadas: P11, correspondiente a células epiteliales de acuerdo al control, con menor fluorescencia, p5 corresponde a las bacterias *L. casei* BL23 fluorescentes de acuerdo al control (menor tamaño, mayor fluorescencia), P10 corresponde posiblemente a las células epiteliales con bacterias internalizadas (mayor tamaño, mayor fluorescencia) y finalmente, P8 engloba tanto a P5 como P10 como el total de células epiteliales con bacterias internalizadas y posibles bacterias que estuvieran adheridas y que fueron desprendidas con el tratamiento de tripsina, previo a la fijación. Para realizar las comparaciones entre tratamientos, se tomaron los datos obtenidos de la región P8 y se analizaron estadísticamente.

1 Tratamiento con IFN- γ

El ensayo de internalización bajo el tratamiento con IFN- γ se llevó a cabo a diferentes tiempos de co-incubación entre *L. casei* BL23 con Caco-2 (0, 30, 60,

120 min). Además, las células Caco-2 estuvieron expuestas de manera prolongada a la acción del IFN- γ (48 h).

Los resultados de Citometría de flujo muestran como el tratamiento con IFN- γ 100 UI/mL aumenta el número de eventos fluorescentes con respecto al control. Mientras que el tratamiento con IFN- γ 1000 UI/mL disminuye ligeramente en comparación al utilizar IFN- γ 100 UI/mL. El patrón observado a las 2 h es el mismo observado en ensayos de internalización con recuentos bacterianos posterior a la lisis de células epiteliales.

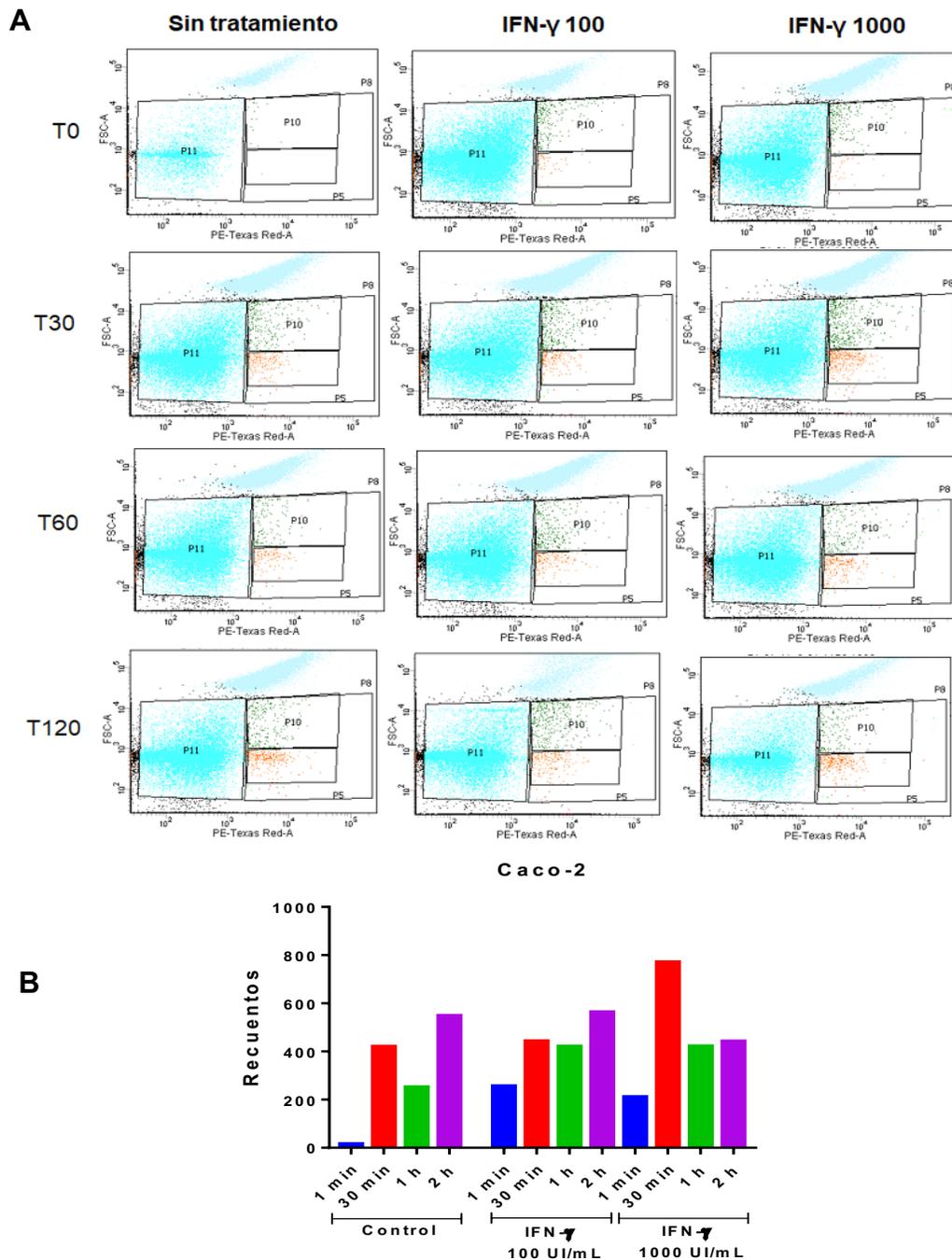
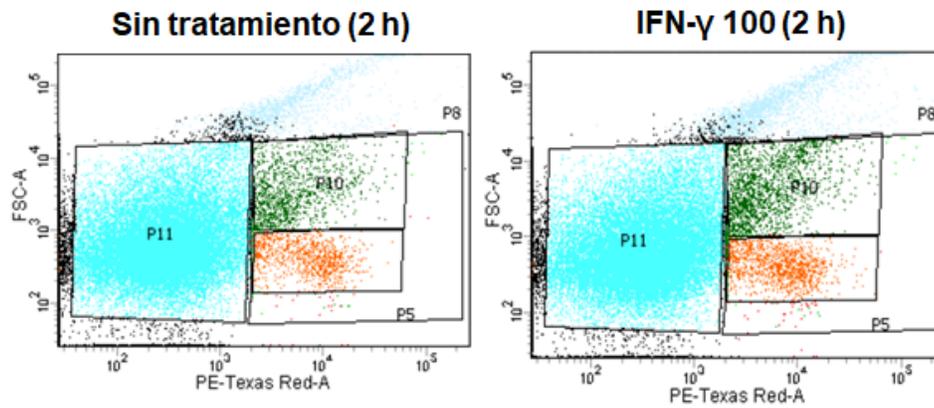


Fig. 39. Internalización de *L. casei* BL23 en Caco-2 con y sin IFN- γ . A) Diagrama de dispersión de Citometría de Flujo. B) Los datos son presentados como las medias del número de eventos fluorescentes de la región P8. Los experimentos fueron realizados con dos replicas.

En el caso de T84, se llevaron a cabo ensayos de internalización solo a las 2 h con y sin tratamiento de IFN- γ 100 UI/mL, observando que el tratamiento prolongado (48 h) con IFN- γ también aumentó el número de eventos fluorescentes.

A



B

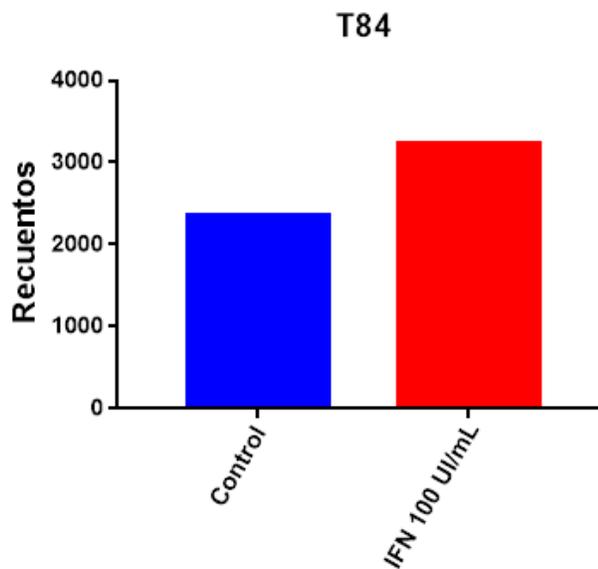


Fig. 40. Internalización de *L. casei* BL23 en T84 con y sin IFN- γ . A) Diagrama de dispersión de Citometría de Flujo. B) Los datos son presentados como las medias del número de eventos fluorescentes en la región P8. Los experimentos fueron realizados con dos replicas.

2 Tratamiento con p40, p75 y EGF

Los ensayos de internalización bajo los tratamientos de p40/LC, p40/LGG, p75 y EGF fueron realizados con 2 h de co-incubación con *L. casei* BL23.

En Caco-2 se puede observar que el número de eventos disminuye en todos los casos (excepto con el tratamiento p40/LGG) en comparación al control. Esto no coincide con los datos obtenidos de los recuentos bacterianos, que muestran estimulación del proceso de internalización de *L. casei* BL23. Sin embargo, tomando en cuenta lo observado en Microscopía, una minoría de las células epiteliales presentaban bacterias internalizadas, asimismo, las que presentaban bacterias internalizadas, presentaban más de una bacteria o bien, en ciertos casos, numerosas, con lo cual, no obtendríamos mayor número de eventos fluorescentes en este caso, sino un número menor.

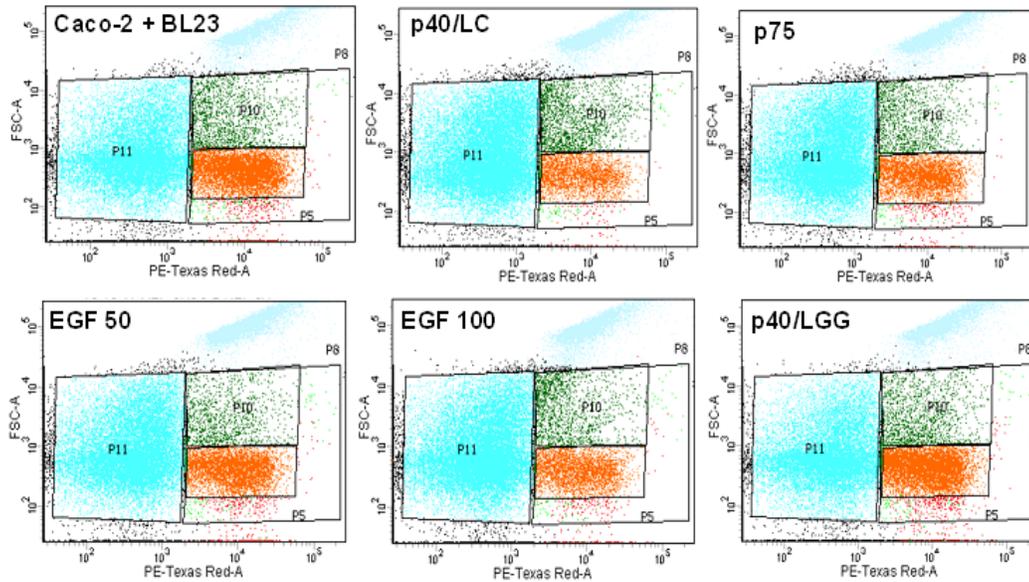
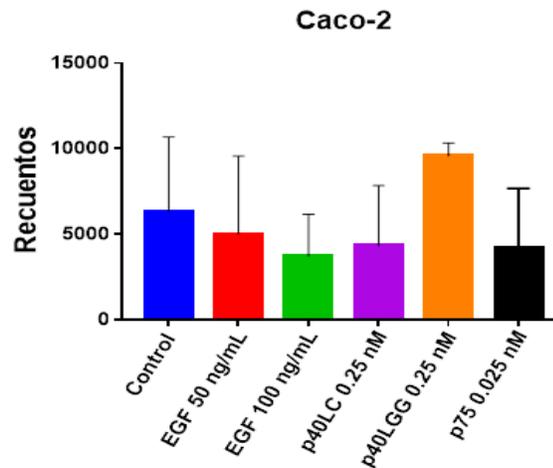
A**B**

Fig. 41. Internalización de *L. casei* BL23 en Caco-2 con y sin EGF, p40LC, p40LGG y p75. A) Diagrama de dispersión de Citometría de Flujo de un experimento representativo. B) Los datos son presentados como las medias del número de eventos fluorescentes en la región, con desviación estandar. Los experimentos fueron realizados con dos replicas por duplicado y las diferencias entre grupos comparadas con la prueba de Bonferroni.

En el caso de T84, los graficos obtenidos muestran algo similar a los recuentos bacterianos, con mayor número de eventos fluorescentes en comparación al control, lo cual podría indicar que un mayor número de células ha internalizado bacterias. También podríamos deducir que el tratamiento con las proteínas p40 y p75, así como con EGF, tuvo efecto en la mayoría de las células en comparación a Caco-2.

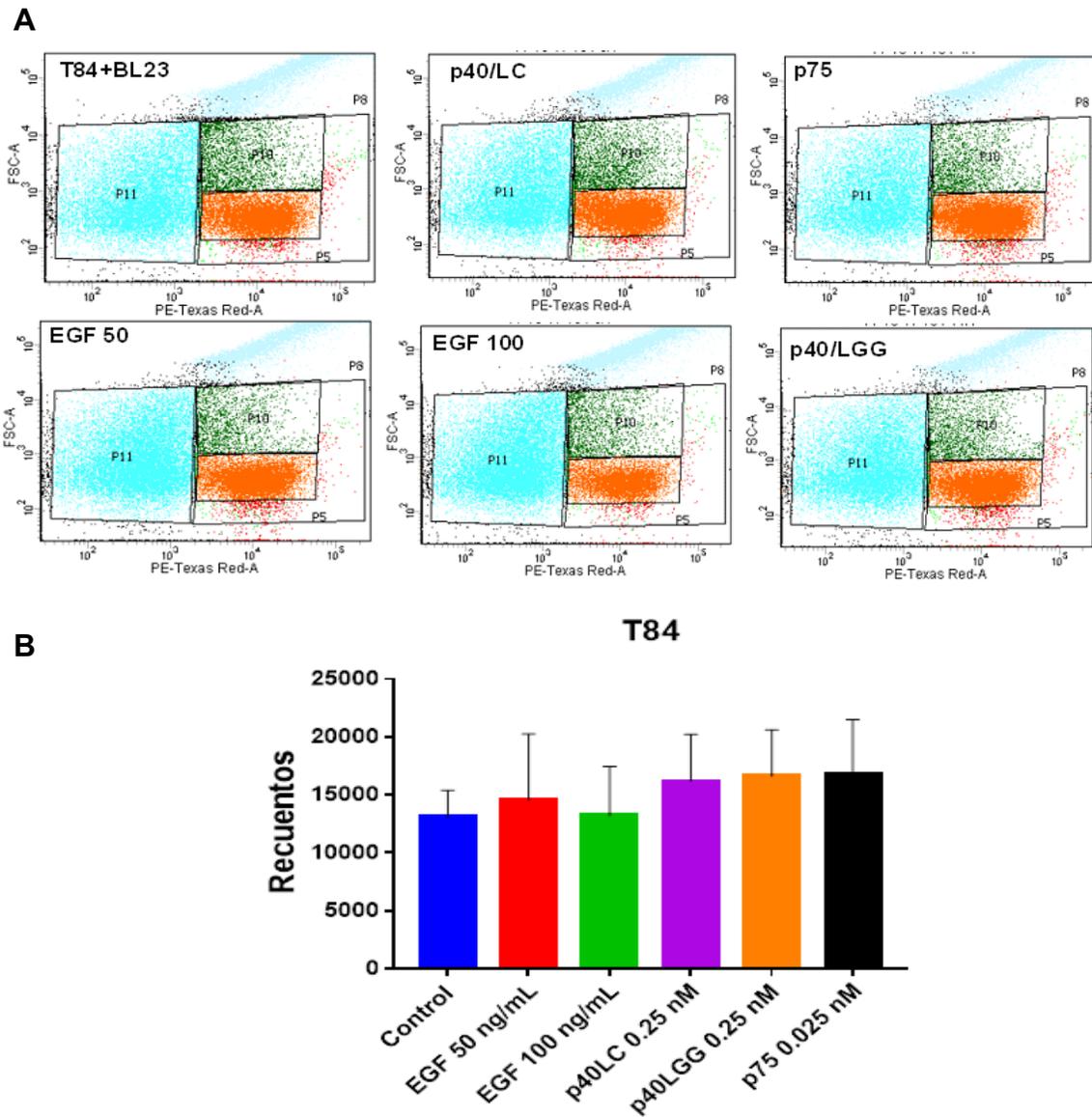


Fig. 42. Internalización de *L. casei* BL23 en T84 con y sin EGF, p40LC, p40LGG y p75. A) Diagrama de dispersión de Citometría de Flujo de un experimento representativo. B) Los datos son presentados como las medias del número de eventos fluorescentes en la región P8, con desviación estándar. Los experimentos fueron realizados con dos replicas por duplicado y las diferencias entre grupos comparadas con la prueba de Bonferroni.

3 Tratamiento con citocalasina D, EIPA y rapamicina

El tratamiento con EIPA, rapamicina y citocalasina D en Caco-2 dio como resultado menor número de eventos fluorescentes en comparación con el control e igual que con los tratamientos anteriores (EGF, p40, p75), aunque se trata solo de una tendencia ya que las diferencias no fueron significativas. Esto no coincide con los resultados obtenidos en los recuentos bacterianos. Sin embargo, podría indicar también un número menor de células epiteliales portadoras de fluorescencia roja, en realidad la carga bacteriana por unidad (evento), es decir, por célula epitelial fue mayor.

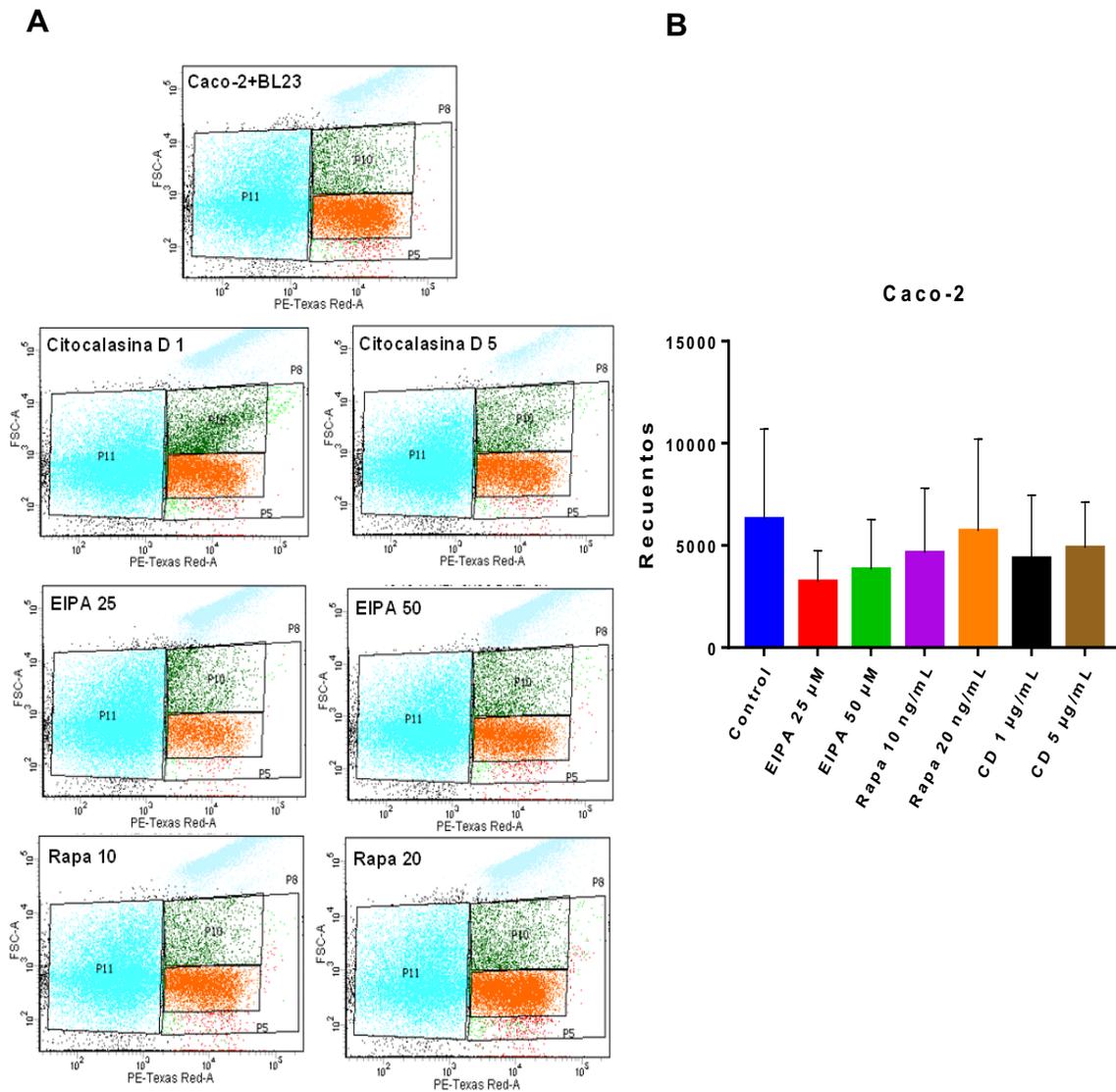


Fig. 43. Internalización de *L. casei* BL23 en Caco-2 con y sin citocalasina D, EIPA y rapamicina. A) Diagrama de dispersión de Citometría de Flujo de un experimento representativo. B) Los datos son presentados como las medias del número de eventos fluorescentes en la región P8, con desviación estándar. Los experimentos fueron realizados con dos replicas por duplicado y las diferencias entre grupos comparadas con la prueba de Bonferroni. Rapa: Rapamicina. CD: Citocalasina D.

El efecto de estos tratamientos se puede observar mejor en T84, donde se obtuvieron resultados similares a los obtenidos mediante recuentos bacterianos, mostrando aumento con EIPA y rapamicina, sin embargo, solo la concentración 10 ng/mL de rapamicina tuvo un efecto significativo. En el caso de citocalasina D, se observa disminución de la internalización al utilizar 1 μ g/mL, lo cual también se observó con recuentos bacterianos.

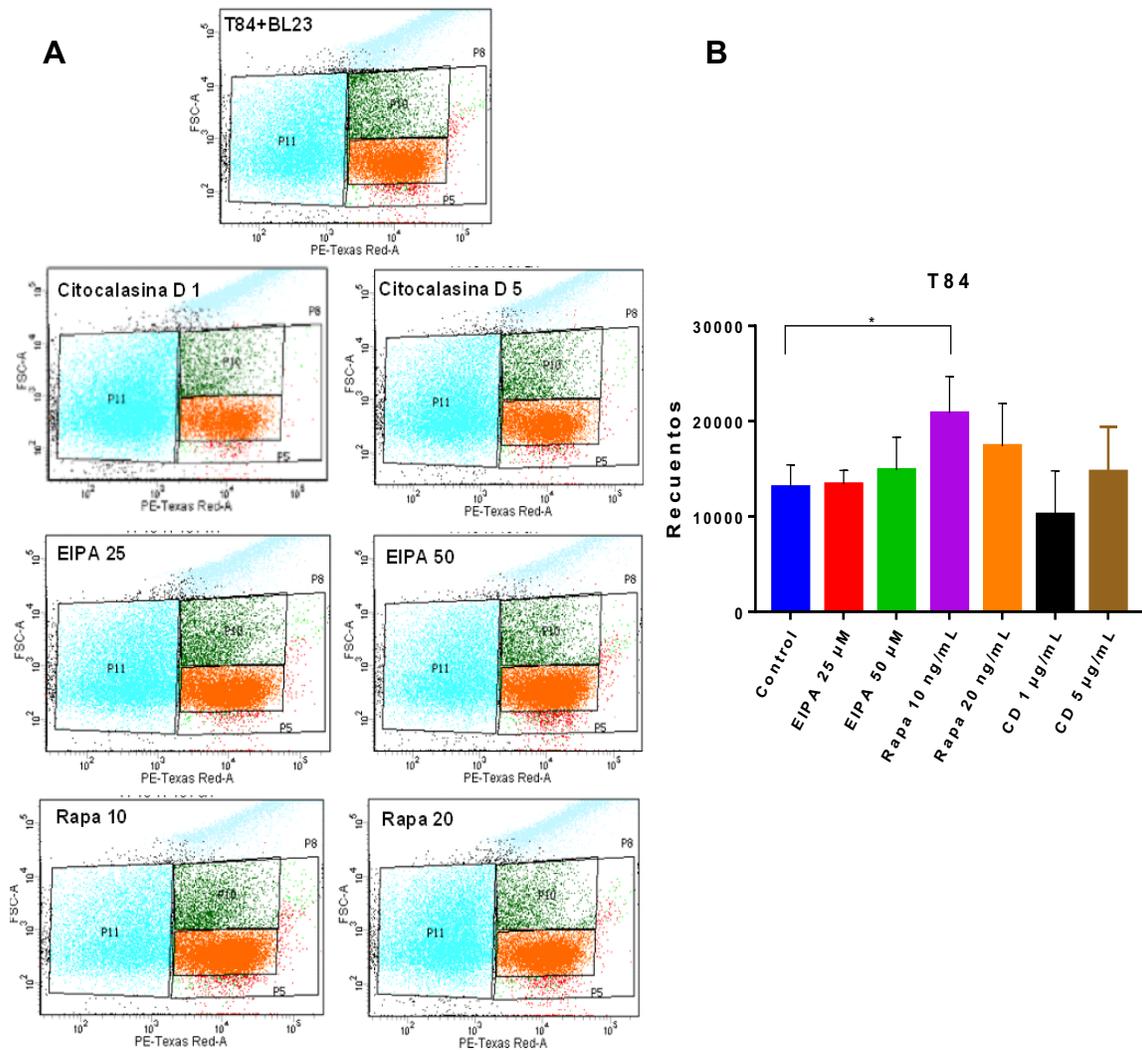


Fig. 44. Internalización de *L. casei* BL23 en T84 con y sin citocalasina D, EIPA y rapamicina. A) Diagrama de dispersión de Citometría de Flujo de un experimento representativo. B) Los datos son presentados como las medias del número de eventos fluorescentes en la región P8, con desviación estándar. Los experimentos fueron realizados con dos replicas por duplicado y las diferencias entre grupos comparadas con la prueba de Bonferroni. * $P < 0.05$. Rapa: Rapamicina. CD: Citocalasina D.

X. DISCUSION

Lactobacillus son bacterias lácticas, nativas del TGI, conocidas por su estatus GRAS y algunas utilizadas como probióticos, reconocidas por sus beneficios al hospedero y comercializadas principalmente en productos lácteos y liofilizados encapsulados (Vargas-García y col. 2015). Hasta la fecha han sido consideradas como no invasivas. Sin embargo, recientemente se ha observado que cepas de *Lactobacillus* además de inhibir la internalización de patógenos, también son internalizadas en células epiteliales. A pesar de esto, aún no se ha determinado el mecanismo de internalización de este tipo de bacterias. (Botha y col. 2012; Bouchard y col. 2013; Chen y col. 2013; Solberg, 2013; Christophe y col. 2015; Souza y col. 2017).

En este estudio se intentó estudiar y esclarecer la interacción entre algunas de las bacterias probióticas más estudiadas, *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG y células epiteliales del hospedero, así como determinar las condiciones en las cuales estas son endocitadas, ya sea procesos inflamatorios u otros factores que participen en procesos de endocitosis, determinando el papel de proteínas presentes en su pared celular, p40 y p75, que son conocidas por su capacidad antiapoptótica, regeneradora de la barrera epitelial y por su participación en la activación del receptor del EGF de células epiteliales y vías de señalización que conducen a la activación del proceso de macropinocitosis. Intentamos también determinar si la internalización ocurre por alguno de los

procesos conocidos de endocitosis, por lo que se ensayaron inhibidores conocidos de dichos procesos.

En todos los experimentos se observaron mayores recuentos en T84 en comparación con Caco-2. Estas diferencias pueden ser específicas de la línea celular por expresar diferentes receptores o procesos relacionados con la internalización. Sin embargo, Caco-2 y T84 se prepararon con diferentes grados de confluencia por razones técnicas, por lo que el estado de diferenciación y crecimiento activo constituye en el análisis de las variables un elemento de confusión de primer orden para explicar las diferencias entre líneas celulares, así como el diferente comportamiento de las dos bacterias ensayadas en las dos líneas celulares, ya que *L. casei* BL23 mostró mayor eficiencia de penetración en T84 que en Caco-2. T84 se preparó estado pre-confluyente, por lo que se encontraba en etapas reproductivas con gran actividad, además de tener la superficie apical y lateral expuestas al contacto bacteriano. Mientras que Caco-2 se utilizó en estado confluyente formando monocapa, lo cual disminuye su actividad por cese de reproducción celular, lo cual podría ocasionar una respuesta tardía o más lenta en comparación a T84. Lo anterior coincide con lo observado mediante Microscopía, donde se observa mayor internalización bacteriana en células extendidas, más activas, presentes en zonas baja confluencia o periferia de la monocapa, en comparación a la zona central confluyente, donde raramente se encontraban bacterias. Resultados similares obtuvieron Burns y col. (2001) al realizar ensayos de invasión con diferentes

cepas de *E. coli* en T84 y Caco-2, teniendo porcentajes de invasión 3-4 veces mayores en T84 en comparación con Caco-2. La influencia del estado de crecimiento, también se pone de manifiesto por el ligero aumento de internalización de *L. casei* BL23 observado con p40 y p75, ya que éstas activan el receptor de EGF.

Para llevar a cabo análisis de Microscopía y Citometría de Flujo se utilizó la cepa de *L. casei* BL23 portadora del plásmido pT1GRPC37, que expresa la RFP y GFP. Al comparar la capacidad de internalización de estas cepas se esperaba no encontrar diferencias significativas, sin embargo, la cepa de *L. casei* BL23 [pT1GRPC37] mostró menor capacidad de internalización en comparación a la cepa sin plásmido, en ambas líneas celulares, posiblemente debido al casete de resistencia a eritromicina presente en el plásmido, lo que afecta su capacidad para reproducirse fácilmente (crecimiento lento) y podría estar perjudicando su capacidad de internalización.

Al comparar las cepas probióticas utilizadas, en Caco-2, se encontró una mayor capacidad de internalización de *L. rhamnosus* GG en comparación a *L. casei* BL23, de manera significativa, lo cual puede estar relacionado a su capacidad de adherencia a estas células. De acuerdo con Doullard y col. (2013) y Moussavi y Adams (2010), *L. rhamnosus* muestra altos niveles de unión a la mucosa intestinal humana y a Caco-2, mientras que *L. casei* BL23 muestra niveles de moderados a bajos.

Por otro lado, en T84 se observó que *L. rhamnosus* GG se comporta de manera similar que en Caco-2, mientras que *L. casei* BL23 aumenta de manera significativa su internalización. En este sentido, Haeri y col. (2012) observaron que *L. rhamnosus* GG presenta una capacidad de adhesión moderada T84 (20-50 bacterias adheridas a 100 células) mientras que *L. casei* muestra una capacidad mayor (>51 bacterias adheridas a 100 células). Como se ha mencionado, podría depender tanto de características propias de la línea celular como del estado de confluencia (T84 se suele preparar en estado preconfluyente), sugiriendo que *L. casei* BL23 es más dependiente del crecimiento activo para penetrar en las células humanas.

Pero estos resultados también pueden deberse a que Caco-2 secreta mayor cantidad de mucinas (Navabi y col. 2013), lo cual podría favorecer su interacción con los pili de *L. rhamnosus* GG, la adherencia de estas bacterias y posteriormente su entrada en la célula, mientras que *L. casei* BL23 no produce pili, lo que podría estar disminuyendo su adherencia en Caco-2, y con ello, su capacidad de internalización. Por otro lado, en T84, una menor cantidad de mucosidad podría favorecer el contacto de la superficie de T84 con proteínas presentes en la superficie de *L. casei* BL23 que podrían favorecer su internalización.

Para determinar si estas bacterias probióticas son endocitadas en condiciones inflamatorias, se realizó el tratamiento de Caco-2 y T84 con IFN- γ durante 48 h. Anteriormente, se ha demostrado que esta citoquina promueve la

internalización de bacterias patógenas y comensales facilitando el paso a través de las microvellosidades y la internalización mediante balsas lipídicas o endocitosis mediada por caveolinas. Esta citoquina también induce la internalización de proteínas componentes de las uniones estrechas mediante macropinocitosis, proceso que la célula utiliza para internalizar grandes volúmenes de fluido externo o partículas. Esta desorganización en las uniones estrechas aumenta la permeabilidad y el daño de la barrera epitelial, favoreciendo la endocitosis bacteriana. Asimismo, el IFN- γ también se ha asociado a la inducción de autofagia, participando principalmente en la formación de autofagosomas (Bruewer y col. 2005; Clark y col. 2005, Singh y col. 2006; Feng y col. 2009; Tu y col. 2011; Li y col. 2012; Smyth y col. 2012; Wu y col. 2014; Yu, 2015). Como se ha observado mediante Microscopía, es posible que la autofagia esté participando en la captura de bacterias intracelulares y su arrastre formando grupos de éstas, englobadas en vesículas, aunque no siempre se acompañó de lisis de las bacterias.

De acuerdo con los resultados del Ensayo de Protección a la Gentamicina y Citometría de Flujo, el tratamiento con IFN- γ aumentó la internalización de *L. rhamnosus* GG, en ambas líneas celulares, teniendo un aumento significativo con IFN- γ 1000 UI/mL en Caco-2. En el caso de *L. casei* BL23 se observó un aumento en la internalización en T84, mientras que en Caco-2 disminuyeron los recuentos bacterianos. En este sentido, T84 es más resistente al tratamiento de IFN- γ que Caco-2 al presentar una Resistencia Eléctrica Transepitelial (TER) más alta. La

TER se utiliza para medir la integridad de la barrera epitelial, y principalmente, la resistencia de las uniones estrechas, las cuales se ven perjudicadas con el tratamiento de IFN- γ (Seth y col. 2008; Yu, 2015; Devriese y col. 2017). Además, de acuerdo a lo observado en Microscopía el IFN- γ acelera el proceso de degradación bacteriana, observando la proteína RFP o GFP difuminada englobada en lo que podrían ser vesículas, con escasa presencia de unidades con morfología bacteriana íntegra, algo que sí se observa en otros tratamientos. Esto coincide con los trabajos de Singh y col. (2006), Feng y col. (2009), Tu y col. (2011), Li y col. (2012), donde el IFN- γ juega un papel importante en la eliminación de patógenos intracelulares como *Helicobacter*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Rickettsia conorii* induciendo la autofagia, proceso que se activa en respuesta a infecciones, para degradación de orgánulos dañados o estrés por inanición, observando la formación de autofagosomas envolviendo a los patógenos para su degradación en autolisosomas.

Al llevar a cabo el ensayo “time lapse” o a diferentes tiempos, bajo el tratamiento de IFN- γ y sin él. Se observó que *L. casei* BL23 es internalizada incluso desde el primer contacto (tiempo 0) observando algunas bacterias, sin embargo, es más notorio bajo el tratamiento con IFN- γ . En el ensayo sin tratamiento, conforme pasa el tiempo las bacterias internalizadas se van curvando (6 h) y tomando forma esférica (8-12 h), iniciando la degradación bacteriana. Sin embargo, a las 24 h se observa una gran cantidad de bacterias en todos los campos observados, incluso mayor a la observada en tiempos

anteriores, con lo cual, se podría deducir que *L. casei* BL23 podría estar reproduciéndose en el interior de la célula (se necesitan más estudios para comprobar esta hipótesis). Por otro lado, bajo el tratamiento de INF- γ se observa degradación bacteriana a partir de las 6 h. Esto concuerda con otros estudios donde se ha observado el papel del IFN- γ en la degradación de bacterias patógenas intracelulares por inducción del proceso de autofagia (Singh y col. 2006; Feng y col. 2009; Tu y col. 2011; Li y col. 2012).

En otro ensayo, se pre-incubó 1 h con gentamicina y cloranfenicol y se mantuvieron durante las 2 h de co-incubación entre *L. casei* BL23 y T84, observando que las bacterias no viables también son endocitadas, con una tasa aparente menor que la de las vivas.

Por lo que se está discutiendo, podría ser que entre los factores que se han ensayado, el EGF nos ofrezca las mejores claves para comprender el proceso.

El EGF es una citoquina cuya participación es clave en el crecimiento y proliferación celular. Se sabe que el EGF (entre otros ligandos) se une al EGFR conduciendo a la propia internalización del receptor-ligando EGFR-EGF mediante macropinocitosis, observándose un aumento general en las ondulaciones o arrugamientos de membrana, y de esta manera, permitiendo la internalización bacteriana (Haigler y col. 1979; García-Del Portillo y col. 1994; Koivusalo y col. 2010). También, se ha reportado que las proteínas p40 y p75 estimulan la fosforilación del receptor del EGF (EGFR) que lleva a su activación.

La p40/LC y p75 son proteínas presentes en la superficie bacteriana de *L. casei* BL23 mientras que p40/LGG está presente en la superficie de *L. rhamnosus* GG, aunque también son secretadas al medio. Por lo anterior, nos planteamos la hipótesis de podrían actuar de manera similar al EGF, activando la macropinocitosis e induciendo la internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG. Asimismo, estas proteínas fortalecen la barrera epitelial, protegiendo las uniones estrechas y adherentes de daños como el peróxido de hidrogeno, incrementando la resistencia eléctrica transepitelial (Seth y col. 2008). Por otro lado, en estudios anteriores, se ha observado como la p40 y p75 de ambas cepas bacterianas están distribuidas por toda la pared celular pero mayormente concentradas en los polos celulares, además presentan gran capacidad de unión a las mucinas secretadas por las células epiteliales y al colágeno (Baüerl y col. 2010). En la mayoría de las imágenes de Microscopía se pueden observar bacterias de *L. casei* BL23 internalizadas y penetrando directamente de forma apical, sin formación de vesículas endocíticas, lo que podría indicar inducción del proceso de internalización por parte de la bacteria, donde las proteínas p40 y p75 podrían estar participando directa o indirectamente.

De acuerdo con los resultados obtenidos de los recuentos bacterianos y Citometría de flujo (en T84), el tratamiento con EGF aumentó la internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en ambas líneas celulares, pero de manera significativa de *L. casei* BL23 en T84. Al tratar las células T84 y Caco-2 con las proteínas p40/LC, p40/LGG y p75 también aumentaron la internalización de *L.*

casei BL23 con respecto al control. Sin embargo, en el caso de *L. rhamnosus* GG, los recuentos disminuyeron o se mantuvieron con respecto al control, en ambas líneas celulares, aunque este efecto no es significativo.

Con respecto a estos resultados, se podría hipotetizar que ambas bacterias se comportan de manera distinta, *L. casei* BL23 podría entrar en la célula mediante varios mecanismos, siendo endocitada, mediante macropinocitosis o en condiciones de inflamación (por ejemplo, en presencia de IFN- γ) a través de hendiduras entre las microvellosidades y/o mediante endocitosis mediada por caveolina, y a su vez, induciendo su propia internalización, observando penetración apical directa en las imágenes de Microscopía, pudiendo participar proteínas que faciliten esta interacción como p40 y p75, localizadas en la superficie bacteriana pero principalmente en la zona apical. Además, las bacterias de *L. casei* BL23 internalizadas se observan en zonas de crecimiento activo donde se observan las extensiones de actina, lo que podría indicar la presencia de receptores específicos para esta cepa en este tipo de células. En los demás casos, *L. rhamnosus* GG podría tener mas penetración debido a la ventaja que le confieren los pili.

L. rhamnosus GG no parece inducir su internalización, sino, ser endocitada en condiciones de daño epitelial y a las uniones estrechas. En este sentido, la proteína p40 y p75 tienen un papel importante en la regeneración y fortalecimiento de la barrera epitelial, lo cual disminuiría la endocitosis de esta cepa. Asimismo, la ubicación de las proteínas p40 y p75 presentes en la pared

celular de *L. rhamnosus* GG entre los pili podrían obstaculizar el contacto directo con la superficie celular o las mucosas y en este caso, no participando directamente en la trasactivación del EGFR.

Para observar el efecto de la macropinocitosis y la autofagia en la internalización bacteriana, se utilizó el derivado de la amilorida, 5-(N-etil-N-isopropil)-amilorida (EIPA). La EIPA es comúnmente utilizada para inhibir el proceso de macropinocitosis, inhibiendo el intercambiador de Na⁺/ H⁺ en la membrana plasmática. Aún no se ha determinado como inhibe la macropinocitosis, pero se cree que el disminuir el pH submembranoso (citósólico) afecta las GTPasas involucradas en la polimerización de actina, además de inhibir la autofosforilación del EGFR (Koivusalo y col. 2010; Lim y Gleeson, 2011; Tian y col. 2014; Rasmussen y Vilhardt, 2015). Sin embargo, estudios recientes muestran que la EIPA también interviene en procesos relacionados con la autofagia al inhibir el intercambiador NHE3, estimulando la formación de autofagosomas (Togashi y col. 2013; Shi y col. 2017).

En los resultados obtenidos, la EIPA aumenta los recuentos bacterianos de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG, en Caco-2 y T84, principalmente a una concentración de 25 µM en comparación a 50µM, aunque este efecto no es significativo, observando el mismo patrón en Citometría de flujo (en T84). Además, en las imágenes de Microscopía con *L. casei* BL23 se observan bacterias internalizadas, en su mayoría formando agrupaciones con posible degradación bacteriana, aparentemente englobadas en lo que podrían ser

vesículas o autofagosomas. También se puede observar mayor cantidad de bacterias internalizadas al utilizar una concentración de 25 μM en comparación a 50 μM , similar a lo observado en los recuentos bacterianos. Sin embargo, al contrario de otros estudios, aquí se observaron, mayores recuentos bacterianos en comparación al control, esto podría indicar que la disminución en los eventos de macropinocitosis por EIPA no afecta la internalización de estas cepas y que estas podrían estar siendo endocitadas mediante otros mecanismos. De acuerdo con Wu y col. (2014) y Yu (2015), bacterias comensales pueden internalizarse a través de espacios entre las microvellosidades mediante endocitosis mediada por caveolina.

Para profundizar más en el proceso de autofagia e internalización bacteriana, se utilizó el tratamiento con rapamicina, un inhibidor de mTORC1, encargado de regular el proceso de autofagia. La inhibición de mTORC1 da lugar a la inducción de la autofagia y la macropinocitosis, como mecanismo de captación de nutrientes.

Tanto *L. casei* BL23 como *L. rhamnosus* GG aumentaron su internalización en Caco-2 y T84 bajo el tratamiento con Rapamicina (10 y 20 ng/mL), tanto en los recuentos bacterianos como Citometría de Flujo (en T84). Esto coincide con los resultados obtenidos por Sung y col. (2015) y Palm y col. (2015), donde observaron que la activación de la autofagia por Rapamicina, también activa a la macropinocitosis. En este sentido, en Microscopía se observaron bacterias internalizadas agrupadas y acumuladas en ciertas zonas

donde se intensifican las extensiones o prolongaciones de actina. Asimismo, se observan múltiples círculos o esferas de actina, lo cual podría indicar la formación de vesículas, producto de la activación de la autofagia.

Finalmente, para observar el efecto de la inhibición de la endocitosis dependiente de actina en la internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG, principalmente la macropinocitosis (y fagocitosis en otros tipos celulares), se utilizó la Citocalasina D. El tratamiento con Citocalasina D en Caco-2 en ensayos de internalización con recuentos bacterianos no pudo ser realizado después de múltiples intentos, debido al desprendimiento de la monocapa, sin embargo, en el caso de las células adheridas a cubreobjetos, se observó desprendimiento celular, pero gracias a las células que permanecieron adheridas se pudo observar el proceso mediante Microscopía y tener una referencia del efecto de este tratamiento en Caco-2. En este ensayo se observó que el tratamiento con 1 µg/mL de citocalasina D tiene mayor efecto de inhibición en comparación a 5 µg/mL, lo cual coincide con lo observado en T84 y de igual forma, con los recuentos bacterianos obtenidos para *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG. En T84 se obtuvo una disminución significativa en la internalización de *L. casei* BL23 con ambas concentraciones de citocalasina D, mayor a la observada con *L. rhamnosus* GG con 1 µg/mL. Esto también coincide con otros estudios realizados, donde indican que 1 µg/mL es la concentración óptima para inhibir la internalización bacteriana (Wells y col. 1998; Youakim y Ahdieh, 1999; Rasmussen y Vilhardt 2015; Boye y col. 2016). Lo anterior indica que la actina

juega un papel importante en la internalización de ambas cepas probióticas. La citocalasina D es un agente perturbador de actina, el cual inhibe todos los procesos de endocitosis y translocación de moléculas, dependientes de actina, como la macropinocitosis, también se observan disminuidas las extensiones de actina pertenecientes a las zonas de crecimiento activo.

Finalmente, los ensayos de observación del proceso bajo el microscopio nos han abierto nuevas áreas de exploración. Así, el experimento a lo largo del tiempo no indica que es posible que se establezca una relación simbiótica por la que las bacterias probióticas llegan a proliferar dentro de las células epiteliales. También se pudo observar que las bacterias no viables son internalizadas, con una tasa aparente menor a la de las bacterias vivas. Esto sugiere que se planteen nuevos ensayos para comparar la tasa proliferación de las bacterias internalizadas, así como la de internalización de las bacterias vivas frente a las no viables, ensayando si los inhibidores citocalasina D y EIPA lo reducen.

Estos resultados nos brindan las bases para esclarecer la interacción entre probiótico y célula hospedera. Ahora sabemos que estas cepas probióticas son capaces de internalizarse, al igual que muchos patógenos, lo cual puede ser controversial debido a que estas bacterias son comercializadas como bacterias benéficas en productos lácteos o liofilizados encapsulados y sus beneficios han sido demostrados ampliamente en estudios clínicos. Sin embargo, faltan muchos estudios para entender este comportamiento. Quizas la entrada de estas bacterias mutualistas podría relacionarse con una mayor necesidad de nutrientes

por parte de la epiteliales durante fases de crecimiento activo, o se vuelven susceptibles a la penetración por lactobacilos en busca de un nicho.

Lo siguiente sería determinar el mecanismo por el cual son internalizadas, así como esclarecer el papel de los pili y de las proteínas presentes en la superficie de estas bacterias, ya sea utilizando mutantes sin las proteínas p40 y p75, o bien, *L. casei* BL23 sobreexpresando la proteína de unión a Fibronectina (FnBP), homóloga a la FnBPA de *S. aureus* y la cual le facilita intestinalizarse en células epiteliales (Muñoz-Provencio y col. 2009). Además, se deberían utilizar marcadores de proteínas como Caveolina, Clatrina o Dinamina, que participan en procesos de endocitosis de bacterias comensales y patógenas (Wu y col. 2014). Finalmente, debería determinarse si estas bacterias, también son capaces de traslocarse hacia el lado basolateral, internalizarse en linfocitos y ser presentadas a las células dendríticas (DCs).

XI. CONCLUSIONES

L. casei BL23 y *L. rhamnosus* GG se internalizan de forma distinta en las células epiteliales intestinales por un posible mecanismo de endocitosis-internalización asociado a la autofagia, en el que participan de forma activa de las bacterias, como ocurre en algunas patógenas.

El estado de las células epiteliales influye en la internalización bacteriana. T84 pre-confluentes, en crecimiento activo, con mayor superficie expuesta (apical y lateral) internalizan mayor cantidad de bacterias *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG que Caco-2 en monocapa. También las bacterias no viables de *L. casei* BL23 también son endocitadas, con una tasa aparente menor a la de las vivas, posiblemente por requerimiento de nutrientes de las células epiteliales en estado activo.

L. rhamnosus GG se comporta de manera similar en ambas líneas celulares, mientras que *L. casei* BL23 se internaliza con mayor eficiencia en T84 que en Caco-2, incluso en mayor grado que *L. rhamnosus* GG.

La internalización de ambas cepas se ve aumentada por alteraciones en la barrera epitelial y procesos relacionados a la activación de la autofagia, por IFN- γ , EIPA o rapamicina, que también aceleran la degradación bacteriana.

El EGF favorece la internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG, por aumento en los eventos de macropinocitosis o efectos en el crecimiento y proliferación celular por activación del EGFR.

La p40 y p75, aumentan la internalización de *L. casei* BL23, posiblemente induciendo su entrada, por activación de EGFR o mediando su adherencia a células epiteliales. Sin embargo, disminuyen la entrada de *L. rhamnosus* GG, posiblemente por fortalecimiento de la barrera epitelial, disminuyendo la permeabilidad, lo que indica que esta cepa entra mediante un mecanismo de internalización no inducida.

La actina tiene un papel importante en la internalización *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG, disminuyendo su entrada en presencia de citocalasina D, donde la macropinocitosis es el principal mecanismo de endocitosis dependiente de actina.

XII. PERSPECTIVAS

1. Determinar el papel de p40 y p75, llevando a cabo ensayos de internalización con *L. casei* BL23 mutante para p40 y p75.
2. Determinar el papel de otras proteínas como la FbpA y PrtP de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en su capacidad de internalización.
3. Determinar el papel de los pili en *L. rhamnosus* GG, llevando a cabo ensayos de internalización con un mutante de *L. rhamnosus* GG sin pili.
4. Confirmar el mecanismo de entrada de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG marcando con anticuerpos las proteínas Caveolina, Clatrina y Dinamina, que participan diferentes tipos de endocitosis.
5. Analizar el efecto de filipina y metil- β -ciclodextrina, inhibidores de balsas lipídicas, en la internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG.
6. Estudiar la capacidad de traslocación de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG hacia el lado basolateral.
7. Estudiar la capacidad de internalización de *L. casei* BL23 y *L. rhamnosus* GG en Linfocitos y determinar si estas son presentadas a las DCs.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Acedo-Felix E. y Perez-Martinez G. 2003. Significant differences between *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393T and a commonly used plasmid-cured derivative revealed by a polyphasic study. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53, 67-75.
- Aires K. A., Cianciarullo A. M., Carneiro S. M., Villa L. L., Boccardo E., Perez-Martinez G., Perez-Arellano I., Oliveira M. L. S., Ho P. L. 2006. Production of Human Papillomavirus Type 16 L1 Virus-Like Particles by 1Recombinant *Lactobacillus casei* Cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(1):745-752. DOI:10.1128/AEM.72.1.745-752.2006.
- Almeida J. F., Mariat D., Azevedo V., Miyoshi A., Moreno-LeBlanc A., del Carmen S., Martin R., Langella P., LeBlanc J. G. y Chatel J. M. 2014. Correlation between fibronectin binding protein A expression level at the surface of recombinant *Lactococcus lactis* and plasmid transfer *in vitro* and *in vivo*. *BMC Microbiology*. 14:248. DOI: 10.1186/s12866-014-0248-9.
- Alonso A. y García-Del Portillo F. 2004. Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *International Microbiology*. 7 (3): 181-191.
- Ardita C., Mercante J. W., Kwon Y. M., Luo L., Crawford M. E., Powell D. N., Jones R. M. y Neish A. S. 2013. Epithelial adhesion mediated by pilin Spa is required for *Lactobacillus rhamnosus* GG-induced cellular responses.

Applied and Environmental Microbiology. 80(16):5068-5077. DOI: 10.1128/AEM.01039-14.

Bacsó Z., Bene L., Damjanovich L. y Damjanovich S. 2002. INF-g Rearranges Membrane Topography of MHC-I and ICAM-1 in Colon Carcinoma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 290 (2): 635–640. DOI:10.1006/bbrc.2001.6246.

Bastos-Pereira V., Pacheco-Azevedo M. S., Luerce-Saraiva T. D., Mendes-Souza B., Zurita-Turk M., Prósperi-De Castro C., Mancha-Agresti P., Alvarenga-Lima F., Azevedo V., Santos-Pontes D. y Miyoshi A. 2013. Use of bacteria in DNA vaccine delivery. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.). 1993-2003.

Bäuerl C., Pérez-Martínez G., Yan F., Polk D. B. y Monedero V. 2010. Functional Analysis of the p40 and p75 Proteins from *Lactobacillus casei* BL23. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*.19:231–241. DOI: 10.1159/000322233.

Bäuerl C., Llopis M., Antolín M., Monedero V., Mata M., Zúñiga M., Guarner F. y Pérez-Martínez G. 2013. *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus plantarum* strains downregulate proinflammatory genes in an *ex vivo* system of cultured human colonic mucosa. *Genes Nutrition*. 8 (2): 165-180. DOI: 10.1007/s12263-012-0301-y.

- Bonazzi M. y Cossart P. 2006. Bacterial entry into cells: A role for the endocytic machinery. *FEBS Letters*. 580(12): 2962–2967.
- Botha M., Botes M., Loos B., Smith C., y Dicks L. M. T. 2012. *Lactobacillus equigenerosi* Strain Le1 Invades Equine Epithelial Cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (12): 4248–4255. DOI:10.1128/AEM.00552-12.
- Bouchard D. S., Rault L., Berkova N., Le Loir Y. y Even S. 2013. Inhibition of *Staphylococcus aureus* Invasion into Bovine Mammary Epithelial Cells by Contact with Live *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 79 (3): 877-885. DOI:10.1128/AEM.03323-12.
- Boye L., Welsby I., Lund L. D., Goriely S. y Frøkiær H. 2016. Plasma membrane Toll-like receptor activation increases bacterial uptake but abrogates endosomal *Lactobacillus acidophilus* induction of interferon- β . *Immunology*. 149: 329-342. DOI:10.1111/imm.12650.
- Bruewer M., Utech M., Ivanov A. I., Hopkins A. M., Parkos C. A. y Nusrat A. 2005. Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *FASEB Journal*. 19(8): 923-33. DOI: 10.1096/fj.04-3260com.
- Burns J. L., Griffith A., Barry J. J., Jonas M. y Chi E. Y. 2001. Transcytosis of Gastrointestinal Epithelial Cells by *Escherichia coli* K1. *Pediatric Research*. 49(1): 30-37. DOI: 0031-3998/01/4901-0030.

- Chatel J. M., Pothelune L., Ah-Leung S., Corthier G., Wal J. M. y Langella P. 2008. In vivo transfer of plasmid from food-grade transiting lactococci to murine epithelial cells. *Gene Therapy*. 15(16): 1184-90. DOI: 10.1038/gt.2008.59.
- Chen T. L., Chen S., Wu H. W., Lee T. C., Lu Y. Z., Wu L. L., Ni Y. H., Sun C. H., Yu W. H., Buret A. G. y Yu L. C. H. 2013. Persistent gut barrier damage and commensal bacterial influx following eradication of *Giardia* infection in mice. *Gut Pathogens*. 5(1):26. DOI: 10.1186/1757-4749-5-26.
- Chermesh I. y Eliakim R. 2006. Probiotics and the gastrointestinal tract: Where are we in 2005?. *World Journal of Gastroenterology*. 12(6):853-857. DOI:10.3748/wjg.v12.i6.853.
- Choi J., Kim H., Bae Y. K. y Cheong H. 2017. REP1 Modulates Autophagy and Macropinocytosis to Enhance Cancer Cell Survival. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(9). pii: E1866. DOI: 10.3390/ijms18091866.
- Christophe M., Kuczkowska K., Langella P., Eijsink V. G. H., Mathiesen G. y Chatel J. M. 2015. Surface display of an anti-DEC-205 single chain Fv fragment in *Lactobacillus plantarum* increases internalization and plasmid transfer to dendritic cells *in vitro* and *in vivo*. *Microbial Cell Factories*. 14:95. DOI 10.1186/s12934-015-0290-9.
- Clark E., Hoare C., Tanianis-Hughes J., Carlson G. L. y Warhurst G. 2005. Interferon gamma induces translocation of commensal *Escherichia coli*

across gut epithelial cells via a lipid raft-mediated process.

Gastroenterology. 128(5) :1258-67. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.01.046.

Clark R. T., Hope A., López-Fraga M., Schiller N. y Lo D. D. 2009. Bacterial particle endocytosis by epithelial cells is selective and enhanced by tumor necrosis factor receptor ligands. *Clinical and Vaccine Immunology*. 16(3): 397-407. DOI: 10.1128/CVI.00210-08.

Cossart P. y Helenius A. 2014. *Endocytosis of Viruses and Bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 6(8): a016972. DOI: 10.1101/cshperspect.a016972.

De Azevedo M., Karczewski J., Lefèvre F., Azevedo V., Miyoshi A., Wells J. M., Langella P., Chatel J.M. 2012. *In vitro* and *in vivo* characterization of DNA delivery using recombinant *Lactococcus lactis* expressing a mutated form of *L. monocytogenes* Internalin A. *BMC Microbiology*. 12(1): 299. DOI: 10.1186/1471-2180-12-299.

Devriese S., Van den Bossche L., Van Welden S., Holvoet T., Pinheiro I., Hindryckx P., De Vos M. y Laukens D. 2017. T84 monolayers are superior to Caco-2 as a model System of colonocytes. *Histochemistry and Cell Biology*. 148:85–93. DOI 10.1007/s00418-017-1539-7.

Douillard F. P., Ribbera A., Järvinen H. M., Kant R., Pietilä T. E., Randazzo C., Paulin I., Laine P. K., Caggia C., von Ossowski I., Reunanen J., Satokari R., Salminen S., Palva A. y de Vos W. M. 2012. Comparative genomic and functional analysis of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus*

- strains marketed as probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(6):1923-33. DOI: 10.1128/AEM.03467-12.
- Feng C. G., Zheng L., Lenardo M. J. y Sher A. 2009. Interferon-inducible immunity-related GTPase Irgm1 regulates IFN gamma-dependent host defense, lymphocyte survival and autophagy. *Autophagy*. 5(2):232-4.
- Ferreira P.C.D., da Silva J. B., Piazza R. M. F., Eckmann L., Ho P. L., y Oliveira M. L. S. 2011. Immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing a Beta-Intimin Fragment reduces intestinal colonization by *Citrobacter rodentium*. *Clinical and Vaccine Immunology*. 18(11):1823–1833. DOI:10.1128/CVI.05262-11.
- Garcia-del Portillo F., Pucciarelli M. G., Jefferies W. A. y Finlay B. B. 1994. Salmonella typhimurium induces selective aggregation and internalization of host cell surface proteins during invasion of epithelial cells. *Journal of Cell Science*. 107(Pt 7): 2005-2020.
- Gosalbes M. J., Esteban C. D., Galan J. L. y Perez-Martinez G. 2000. Integrative Food-Grade Expression System Based on the Lactose Regulon of *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(11): 4822-4828.
- Guimarães V. D., Innocentin S., Lefèvre F., Azevedo V., Wal J. M., Langella P. y Chatel J. M. 2006. Use of native lactococci as vehicles for delivery of DNA into mammalian epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(11):7091-7097. DOI:10.1128/AEM.01325-06.

- Haeri A., Khodaii Z, Hossein-Ghaderian S. M., Tabatabaei-Panah A. S. Akbarzadeh-Najar R. 2012. Comparison of adherence patterns of a selection of probiotic bacteria to Caco-2, HEp-2, and T84 cell lines. *Annals of Microbiology*. 62:339–344. DOI 10.1007/s13213-011-0267-9.
- Haigler H.T., McKanna J. A. y Cohen S. 1979. Rapid stimulation of pinocytosis in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor. *The Journal of Cell Biology*. 83(1):82-90.
- Innocentin S., Guimarães V., Miyoshi A., Azevedo V., Langella P., Chatel J. M. y Lefèvre F. 2009. *Lactococcus lactis* expressing either *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A or *Listeria monocytogenes* internalin A can efficiently internalize and deliver DNA in human epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(14): 4870-8. DOI: 10.1128/AEM.00825-09.
- Kajikawa A., Ichikawa E., Igimi S. 2010. Development of a highly efficient protein-secreting system in recombinant *Lactobacillus casei*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(2):375-382. DOI: 10.4014/jmb.0907.07032.
- Kankainen M., Paulin L., Tynkkynen S., von Ossowski I., Reunanen J., Partanen P., Satokari R., Vesterlund S., Hendrickx A. P. A., Lebeer S., De Keersmaecker S. C. J., Vanderleyden J., Hämäläinen T., Laukkanen S., Salovuori N., Ritaria J., Alatalo E., Korpela R., Mattila-Sandholm T., Lassig A., Hatakka K., Kinnunen K. T., Karjalainenb H., Saxelin M, Laakso K.,

- Surakka A., Palva A., Salusjärvi T., Auvinen P. y de Vos W. M. 2009. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human mucus binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(40):17193-17198. DOI: 10.1073/pnas.0908876106.
- Koivusalo M., Welch C., Hayashi H., Scott C. C., Kim M., Alexander T., Touret N., Hahn K. M., y Grinstein S. 2010. Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *The Journal of Cell Biology*. 188 (4):547–563. DOI: 10.1083/jcb.200908086.
- Li P., Du Q., Cao Z., Guo Z., Evankovich J., Yan W., Chang Y., Shao L., Stolz D.B., Tsung A., Geller D.A. 2012. Interferon- γ induces autophagy with growth inhibition and cell death in human hepatocellular carcinoma (HCC) cells through interferon-regulatory factor-1 (IRF-1). *Cancer Letters*. 314(2):213-222. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.09.031.
- Lim J. P. y Gleeson P. A. 2011. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and Cell Biology*. 89: 836–843. DOI:10.1038/icb.2011.20.
- Mazé A., Boël G., Zúñiga M., Bourand A., Loux V., Yebra M. J., Correia V., K., Jacques N., Beaufils S., Poncet S., Joyet P., Milohanic E., Casarégola S., Auffray Y., Pérez-Martínez G., Gibrat J. F., Zagorec M., Francke C., Hartke A. y Deutscher J. 2010. Complete Genome Sequence of the Probiotic

- Lactobacillus casei* Strain BL23. *Journal of Bacteriology*. 192 (10):2647-2648. DOI: 10.1128/JB.00076-10.
- Monedero V., Rodríguez-Díaz J., Viana R., Buesa J. y Pérez-Martínez G. 2004. Selection of Single-Chain Antibodies against the VP8* Subunit of Rotavirus VP4 Outer Capsid Protein and Their Expression in *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(11): 6936–6939. DOI: 10.1128/AEM.70.11.6936–6939.2004.
- Muniz L. R., Knosp C. y Yeretssian G. 2012. Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Frontiers in Immunology*. 3(310). DOI: 10.3389/fimmu.2012.00310.
- Munóz-Provencio D., Pérez-Martínez G. y Monedero V. 2009. Characterization of a fibronectin-binding protein from *Lactobacillus casei* BL23. *Journal of Applied Microbiology*. 108: 1050–1059. DOI:10.1111/j.1365-2672.2009.04508.x.
- Navabi N., McGuckin M.A., Lindén S.K. 2013. Gastrointestinal Cell Lines Form Polarized Epithelia with an Adherent Mucus Layer when Cultured in Semi-Wet Interfaces with Mechanical Stimulation. *PLoS ONE* 8(7): e68761. DOI:10.1371/journal.pone.0068761.
- Oliveira M. L., Monedero V., Miyaji E. N., Leite L. C. C., Lee-Ho P., Perez-Martinez G. 2003. Expression of *Streptococcus pneumoniae* antigens, PsaA (pneumococcal surface antigen A) and PspA (pneumococcal surface

- protein A) by *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiology Letters*. 227(1):25-31. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00645-1.
- Palm W., Park Y., Wright K., Pavlova N. N., Tuveson D. A. y Thompson C. B. 2015. The Utilization of Extracellular Proteins as Nutrients Is Suppressed by mTORC1. *Cell*. 162(2): 259–270. DOI:10.1016/j.cell.2015.06.017.
- Pérez-Arellano I. y Pérez-Martínez G. 2003. Optimization of the green fluorescent protein (GFP) expression from a lactose-inducible promoter in *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiology Letters* 222: 123-127. DOI:10.1016/S0378-1097(03)00244-1.
- Pérez-Arellano I., Zúñiga M. y Pérez-Martínez G. 2001. Construction of Compatible Wide-Host-Range Shuttle Vectors for Lactic Acid Bacteria and *Escherichia coli*. *Plasmids*. 46: 106-116. DOI: 10.1006/plas.2001.1531.
- Pontes D., Innocentin S., del Carmen S., Almeida J. F., LeBlanc J. G., de Moreno-de LeBlanc A., Blugeon S., Cherbuy C., Lefèvre F., Azevedo V., Miyoshi A., Langella P. y Chatel J. M. 2012. Production of Fibronectin Binding Protein A at the Surface of *Lactococcus lactis* Increases Plasmid Transfer *In Vitro* and *In Vivo*. *PLoS ONE*. 7(9): e44892. DOI: 10.1371/journal.pone.0044892.
- Rasmussen I., Vilhardt F. 2015. Macropinocytosis Is the Entry Mechanism of Amphotropic Murine Leukemia Virus. *Journal of Virology*. 89:1851–1866. DOI:10.1128/JVI.02343-14.

- Sánchez B, Saad N., Schmitter J. M., Bressollier P. y Urdaci M. C. 2010. Adhesive properties, extracellular protein production, and metabolism in the *Lactobacillus rhamnosus* GG strain when grown in the presence of mucin. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(6):978-984. DOI: 10.4014/jmb.0911.11007.
- Santos-Pontes D., Pacheco- de Azevedo M. S., Chatel J. M., Langella P., Azevedo V. y Miyoshi A. 2011. *Lactococcus lactis* as a live vector: Heterologous protein production and DNA delivery systems. *Protein Expression and Purification*. 79: 165–175. DOI: 10.1016/j.pep.2011.06.005.
- Segers M. E. y Lebeer S. 2014. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. *Microbial Cell Factories*. 13(Suppl 1): S7. DOI: 10.1186/1475-2859-13-S1-S7.
- Seth A., Yan F., Polk B. y Rao R. K. 2008. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 294: G1060–G1069. DOI:10.1152/ajpgi.00202.2007.
- Shi H., Zhao X., Ding Z., Han C., Jiang Y., Qian W., Lin R., Hou X. 2017. Na⁺/H⁺ Exchanger Regulates Amino Acid-Mediated Autophagy in Intestinal Epithelial Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 42: 2418-2429. DOI: 10.1159/00048018.

- Silva A. J., Zangirolami T. C., Marques-Novo-Mansur M. T., Campos-Giordano R. y Leme-Martins E. A. 2014. Live bacterial vaccine vectors: An overview. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45 (4): 1117-1129. DOI: 10.1590/S1517-83822014000400001.
- Singh S.B., Davis A.S., Taylor G.A., Deretic V. 2006. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science*. 313(5792):1438-1441.
- Smyth D., McKay C. M., Gulbransen B. D., Phan V. C., Wang A. y McKay D. M. 2012. Interferon-gamma signals via an ERK1/2-ARF6 pathway to promote bacterial internalization by gut epithelia. *Cellular Microbiology*. 14(8):1257-70. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2012.01796.x.
- Solberg. 2015. Targeting of *Lactobacillus* to M-Cells to Improve its Potential as Vaccine Delivery Vector. Norwegian University of Life Sciences. Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science.
- Souza R. F. S., Jardim J., Cauty C., Rault L., Bouchard D. S., Bermúdez-Humarán L. G., Langella P., Monedero V., Seyffert N., Azevedo V., Le Loir Y. y Even S. 2017. Contribution of sortase SrtA2 to *Lactobacillus casei* BL23 inhibition of *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells. *PLoS ONE*. 12(3): e0174060. DOI: 10.1371/journal.pone.0174060.
- Stephenson D. P., Moore R. J. y Allison G. E. 2011. Transformation of, and Heterologous Protein Expression in, *Lactobacillus agilis* and *Lactobacillus*

- vaginalis* Isolates from the Chicken Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(1):220-228. DOI:10.1128/AEM.02006-10.
- Sung S., Choi J. y Cheong H. 2015. Catabolic pathways regulated by mTORC1 are pivotal for survival and growth of cancer cells expressing mutant Ras. *Oncotarget*. 6(38): 40405–40417.
- Tian T., Zhu Y. L., Zhou Y. Y., Liang G. F., Wang Y. Y., Hu F. H. y Xiao Z. D. 2014. Exosome Uptake through Clathrin-mediated Endocytosis and Macropinocytosis and Mediating miR-21 Delivery. *The Journal of Biological Chemistry*. 289(32): 22258–22267. DOI 10.1074/jbc.M114.588046.
- Togashi K., Wakatsuki S., Furuno A., Tokunaga S., Nagai Y. y Araki T. 2013. Na⁺/H⁺ Exchangers Induce Autophagy in Neurons and Inhibit Polyglutamine-Induced Aggregate Formation. *PLoS ONE*. 8(11): e81313. DOI:10.1371/journal.pone.0081313.
- Tripathi P., Beaussart A., Alsteens D., Dupres V., Claes I., von Ossowski I., de Vos W. M., Palva A., Lebeer S., Vanderleyden J. y Dufrêne Y. F. 2013. Adhesion and Nanomechanics of Pili from the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *ACS Nano*. 7 (4): 3685-3697. DOI: 10.1021/nn400705u.
- Tu S. P., Quante M., Bhagat G., Takaishi S., Cui G., Yang X. D., Muthuplani S., Shibata W., Fox J. G., Pritchard D. M. y Wang T. C. 2011. IFN- γ Inhibits Gastric Carcinogenesis by Inducing Epithelial Cell Autophagy and T-Cell Apoptosis. *Cancer Research*. 71(12): 4247–4259. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4009.

- Tuomola E. M. y Salminen S. J. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy Lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*. 41: 45–51.
- Vargas-García C.E., Petrova M., Claes I. J. J., De Boeck I., Verhoeven T. L. A., Dilissen E., von Ossowski I., Palva A., Bullens D. M., Vanderleyden J. y Lebeer S. 2015. Piliation of *Lactobacillus rhamnosus* GG Promotes Adhesion, Phagocytosis, and Cytokine Modulation in Macrophages. *Applied and Environmental Microbiology*. 81: 2050- 2062. DOI:10.1128/AEM.03949-1.
- Wang L., Cao H., Liu L., Wang B., Walker W. A., Acra S. A. y Yan F. 2014. Activation of Epidermal Growth Factor Receptor Mediates Mucin Production Stimulated by p40, a *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived Protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 289(29): 20234–20244. DOI: 10.1074/jbc.M114.553800.
- Wells C. L., Van De Westerlo E. M. A., Jechorek R. P., Haines H. M. y Erlandsen S. L. 1998. Cytochalasin-Induced Actin Disruption of Polarized Enterocytes Can Augment Internalization of Bacteria. *Infection and Immunity*. 66 (6): 2410–2419. DOI: 0019-9567/98/\$04.0010.
- Wells C.L., Jechorek R.P., Kinneberg K.M., Debol S.M. y Erlandsen S.L. 1999. The isoflavone genistein inhibits internalization of enteric bacteria by cultured Caco-2 and HT-29 enterocytes. *The Journal of Nutrition*. 129(3):634-640.

- Woltman A. M., Schlagwein N., van der Kooij S. W. y van Kooten C. 2004. The Novel Cyclophilin-Binding Drug Sanglifehrin A Specifically Affects Antigen Uptake Receptor Expression and Endocytic Capacity of Human Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. 172:6482-6489. DOI:10.4049/jimmunol.172.10.6482.
- Wu L. L., Peng W. H., Kuo W. T., Huang C. Y., Ni Y. H., Lu K. S., Turner J. R. y Yu L. C. 2014. Commensal bacterial endocytosis in epithelial cells is dependent on myosin light chain kinase-activated brush border fanning by interferon- γ . *The American Journal of Pathology*. 184(8):2260-74. DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.05.003.
- Yan F., Liu L., Dempsey P. J., Tsai Y. H., Raines E. W., Wilson C. L., Cao H., Cao Z., Liu L. y Polk D. B. 2013. A *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived Soluble Protein, p40, Stimulates Ligand Release from Intestinal Epithelial Cells to Transactivate Epidermal Growth Factor Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 288(42): 30742-30751. DOI: 10.1074/jbc.M113.492397.
- Youakim A. y Ahdieh M. 1999. Interferon- γ decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *The American Journal of Physiology*. 276(5 Pt 1): G1279-G1288.
- Yu L. C. H., Shih Y. A., Wu L. L., Lin Y. D., Kuo W. T., Peng W. H., Lu K. S., Wei S. C., Turner J. R. y Ni Y. H. 2014. Enteric dysbiosis promotes antibiotic-resistant bacterial infection: systemic dissemination of resistant and commensal bacteria through epithelial transcytosis. *American Journal of*

Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 307: G824–G835.

DOI:10.1152/ajpgi.00070.2014.

Yu L. C. 2015. Commensal bacterial internalization by epithelial cells: An alternative portal for gut leakiness. *Tissue Barriers*. 3(3): e1008895. DOI: 10.1080/21688370.2015.1008895.

Zurita-Turk M., del Carmen S., Santos A. C. G., Pereira V. B., Cara D. C., Leclercq S. Y., de LeBlanc A. dM, Azevedo V., Chatel J. M., LeBlanc J. G. y Miyoshi A. 2014. *Lactococcus lactis* carrying the pValac DNA expression vector coding for IL-10 reduces inflammation in a murine model of experimental colitis. *BMC Biotechnology*. 14:73.

XIV ABREVIATURAS

µg/mL	Microgramo por mililitro.
µL	Microlitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AJ	Uniones Adherentes
AJC	Complejo de Unión Apical
APC	Célula presentadora de antígeno
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BAL	Bacteria ácido láctica
BLG	β-Lactoglobulina
CMV	Citomegalovirus
CSF-1	Factor estimulante de colonias de macrófagos
DCs	Células dendríticas
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético

EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EIPA	5-(N-Etil-N-isopropil) amilorida
FnBP	Proteína de unión a fibronectina
FnBPA	Proteína de unión a fibronectina A
g	Gramos
GFP	Proteína verde fluorescente
GI	Gastrointestinal
GRAS	Generalmente reconocidas como seguras
JAM	Moléculas de Adhesión de Unión
h	Hora
IFN- γ	Interferón gama
IL-10	Interleucina 10
InIA	Internalina A
LPS	Lipopolisacáridos
LTA	Ácido lipoteicoico
M	Molar
MHC	Complejo de Histocompatibilidad Mayor

min	Minuto
mL	Mililitro
MLC	Cadena Ligera de la Miosina
MLCK	Quinasa de la Cadena Ligera de la Miosina
Mm	Milimolar
mmol/L	Milimol por litro
MOI	Multiplicidad de infección
nm	Nanómetro
NHE	Intercambiador de Na ⁺ /H ⁺
ORF	Marco de lectura abierto
PBS	Buffer Salino de Fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RE	Retículo endoplasmático
RFP	Proteína Roja Fluorescente
s	Segundo
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato sódico

SNX	Nexina de clasificación
SNX5	Nexina de clasificación 5
TER	Resistencia Eléctrica Transepitelial
TGF	Factor de crecimiento transformante
TGI	Tracto Gastrointestinal
TJ	Uniones Estrechas
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TW	Red terminal
x g	Gravedades
ZO	Zonula Ocludens

XV ANEXOS

En esta sección se incluyen todos los experimentos realizados sin resultados positivos o que no pudieron ser continuados.

A METODOLOGÍA

1 Transfección de Caco-2 con pCMV_GFP (Addgene)

a Cultivo de líneas celulares

Se realizó la transfección de las células Caco-2 con pCMV-GFP (Matsuda y Cepko, 2004) para confirmar la expresión de la GFP bajo el promotor humano del CMV por las células Caco-2 siguiendo el protocolo sugeridos por Thermo Fisher Scientific *Transfecting Plasmid DNA into Caco-2 Cells Using Lipofectamine™ LTX Reagent*.

Un cultivo de Caco-2 (pase 18-24) se lavó con 10 mL PBS, se añadió 1 mL de tripsina-EDTA, se incubó a 37°C 5% CO₂ durante 5 min y posteriormente se llevó a cabo el conteo celular en una cámara de Neubauer. Para esto, se mezclaron 40 µL de cultivo y 40 µL de azul de tripano (1:1). Se cargaron 12 µL aprox. a cada lado de la cámara y se visualizó al microscopio óptico utilizando el objetivo 10X (OLYMPUS CKX41). Se calculó el número de células por mL (tal como se mencionó en la sección VIII.C.1) y se sembraron 16,000 células por pocillo en un volumen de 200 µL en una placa de 96 pocillo, incubándose a 37°C con CO₂ 5% durante 24-48 h hasta tener entre 50-80% de confluencia.

b Transfección de células Caco-2

Previo a la transfección, se reemplazó el medio de cultivo por 100 μL de medio completo para Caco-2 pero sin antibióticos. Se diluyeron 100 ng del plásmido pCMV-GFP en 20 μL de medio de suero reducido Opti-MEM® I sin suero (Cat. No. 31985-070, Thermo Fisher Scientific). Se mezcló gentilmente y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Se diluyó 0.35 o 0.70 μL de Lipofectamine® LTX (Cat. No. 15338100, Thermo Fisher Scientific) en la solución anterior, se mezcló e incubó durante 25 min a temperatura ambiente para formar los complejos ADN- Lipofectamine® LTX. Se agregaron 20 μL de los complejos de ADN-Lipofectamine® LTX directamente a cada pocillo, se mezcló balanceando la placa adelante y atrás. Se incubaron las células a 37 °C CO₂ 5% durante 18-24 h. Posteriormente, se visualizó el resultado de la transfección mediante Microscopía de Fluorescencia (Nikon Eclipse E90i), utilizando el filtro en verde Fitc 465-495/515-555, esperando observar expresión de GFP en células transfectadas con el plásmido pCMV-GFP.

2 Construcción de plásmido portador del promotor CMV y GFP mediante Biobricks

Los Biobricks parts son secuencias de ADN que presentan sitios de restricción específicos entre los cuales se encuentra un inserto determinado, permitiendo el ensamblaje directo mediante digestiones y ligaciones sencillas.

a Obtención de pSB1K3, pCMV y GFP

En este caso, se intentó obtener el promotor CMV a partir del Biobrick pSB1C3- BBa_I712004, mediante la digestión con las enzimas EcoRI y SpeI, en reacciones separadas. Primeramente, se llevó a cabo la digestión con 1 μ L de SpeI (Thermo Scientific, Cat. No. ER1251), 9 μ L de pSB1C3- BBa_I712004 (500 ng), 3 μ L de 10X Thermo Scientific Tango Buffer (Thermo Scientific, Cat. No. BY5) para concentración final 1X, y 17 μ L de H₂O Milli Q estéril para un volumen final de 30 μ L. Se incubó 1 h a 37 °C y posteriormente, se adicionó 1 μ L de EcoRI (Thermo Scientific, Cat. No. ER0271) y 3.75 μ L de 10X Thermo Scientific Tango Buffer para una concentración final de 2X aprox (Según la fórmula $V=A/8$, donde V es volumen y A es volumen final de la primera reacción, protocolo sugerido por Thermo Scientific para dobles digestiones). Esto se incubó 1 h a 37 °C

Para obtener la secuencia codificante de la GFP a partir de pSB1C3- BBa_E0040, se digirió con 1.5 μ L de XbaI (Thermo Scientific, Cat. No. ER0681) y 1.5 μ L de PstI (Thermo Scientific, Cat. No. ER0611), 18 μ L del biobrick portador de GFP (1 μ g), 6 μ L de 10X Thermo Scientific Tango Buffer, para concentración final de 2X y 3 μ L de H₂O Milli Q estéril para un volumen final de 30 μ L. Se incubó a 37 °C durante 1 h.

Como secuencia base se utilizaría el Biobrick pSB1K3- BBa_J04450 (Parts Registry; <http://parts.igem.org>), al cual se le extraería la RFP (BBa_J04450), teniendo finalmente una secuencia de ADN con resistencia a ampicilina y un origen de replicación para gram positivos, pMB1, en la cual se

ensamblaría el promotor CMV y la GFP. Este fue digerido con 1 μL de PstI y 1 μL de EcoRI, 10.6 μL de pSB1K3- BBa_J04450 (1 μg), 3 μL de Buffer O 10X (Thermo Scientific, Cat. No. BO5) para una concentración final de 1X y 14.4 μL de H₂O Milli Q estéril para un volumen final de 30 μL . Se incubó 1 h a 37 °C.

Las digestiones fueron visualizadas mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% con REALSAFE Nucleic Acid Staining Solution (Durviz) 2X. Para esto, se utilizaron 3 μL de las digestiones con 0.5 μL de 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, Lithuania). Además, se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler, DNA Ladder Mix (#SM0331, Thermo Scientific, Lithuania). El gel se corrió a 100 V durante 30 min aproximadamente.

Estos fragmentos fueron purificados a partir de gel siguiendo el protocolo del kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel, Germany). Se cortaron las bandas con bisturí estéril y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL (pesado previamente), se pesó el tubo con el gel de agarosa. Se añadió 200 μL de NT1 (Binding Solution; solución de unión) por cada 100 mg de gel de agarosa. Se incubó a 65 °C 5-10 min, hasta fundir la agarosa. Se transfirió el contenido a la minicolumna (colocada en el tubo colector), se incubó 1 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 11 000 x g durante 1 min. Se añadieron 700 μL de NT3 (Wash Solution; solución de lavado). Se centrifugó a 11 000 x g durante 1 min, se descartaron residuos del tubo colector y se volvió a centrifugar a 11 000 x g durante 1 min. La minicolumna se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril, se agregaron 50 μL de H₂O Milli Q estéril y se incubó 5 min a 70

°C, finalmente se centrifugó a 11 000 x g durante 1 min. Se descartó la minicolumna y el producto purificado se almacenó a -20 °C.

b Ligación entre plásmido pSB1K3 y fragmentos pCMV y GFP

Se realizó ligación entre los tres fragmentos, el plásmido pSB1K3 de 2163 pb, el pCMV de 650 pb y la GFP de 720 pb. Para esto se utilizó una relación de 1:3:3 vector-inserto-inserto, T4 Ligation Buffer 1X (Roche Diagnostics, USA) y 1 µL (1 U) de T4 DNA Ligase (Roche Diagnostics, USA), en un volumen final de 20 µL. Posteriormente, se incubó a 16 °C 16-24 h.

La ligación fue purificada con el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macharey-Nagel, Germany) utilizando el protocolo anteriormente descrito, en una elución final de 15 µL con H₂O Milli Q estéril. La ligación purificada se almacenó a -20 °C hasta su uso.

c Transformación de *E. coli* DH5α con la ligación pSB_pCMV_GFP

La transformación fue realizada siguiendo el protocolo de Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells (Cat. No. 18265-017; Invitrogen).

Se mezclaron 50 µL de *E. coli* DH5α con 2 µL de ligación purificada pSB_pCMV_GFP. Se incubó en hielo durante 30 min. Se aplicó choque térmico durante 20 s a 42 °C en baño de agua e inmediatamente se colocaron en hielo durante 2 min. Se adicionaron 950 µL de medio SOC precalentado y se incubó a 37 °C durante 1 h a 200 rpm. Finalmente, se sembraron 250, 100 y 50 µL en placas LB Km⁵⁰ e incubó 24 h a 37 °C.

d Preparación de *E. coli* TOP 10 electrocompetentes

Se inoculó 5 mL de medio LB con la cepa *E. coli* TOP 10 y se incubó a 37 °C a 200 rpm 24 h. Se inocularon 400 mL de medio LB precalentado con esos 5 mL de cultivo y se incubó a 37 °C a 200 rpm hasta obtener una densidad óptica de 0.5-0.6 a 600λ, la cual fue cuantificada en un espectrofotómetro (Milton Roy Spectronic 20D spectrophotometer). El medio cultivado se distribuyó en dos frascos preenfriados (de 250 mL) y se mantuvo en hielo 30 min. Se centrifugaron 20 min a 5,000 $\times g$ a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 200 mL de H₂O Milli Q estéril por frasco. Se centrifugó 20 min a 5,000 $\times g$ a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 40 mL de glicerol al 10%, se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 750 μ L de glicerol al 10%. Las resuspensiones fueron mezcladas en un solo tubo eppendorf de 1.5 mL y se distribuyeron 50 μ L de células competentes por tubo eppendorf (1.5 mL) enfriados instantáneamente en nitrógeno líquido (N₂), los cuales se almacenaron a -80 °C.

e Transformación de *E. coli* DH5 α con la ligación pSB_pCMV_GFP

Para llevar a cabo la transformación con la construcción obtenida (pSB_pCMV_GFP) se tomaron 5 μ L y se mezclaron con 50 μ L de bacterias electrocompetentes. La mezcla fue transferida a una cubeta de electroporación, la cual se colocó en el electroporador Gene Pulser (Bio-Rad Life Science). Se realizó la electroporación 2.5 KV y 200 Ω .

Tras la electroporación se agregó inmediatamente 450 μ L de medio de recuperación SOC a las células transformadas. Esto se incubó a 200 rpm, 37°C durante 1 h y se sembró en placas LB-Agar Km⁵⁰ utilizando diferentes volúmenes: 250, 150 y 100 μ L. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

f Extracción de plásmido de colonias obtenidas y comprobación

Las colonias obtenidas fueron inoculadas en 10 mL de medio LB Amp¹⁰⁰ e incubadas a 37 °C durante 24 h. El cultivo se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min y se prosiguió a extraer el plásmido utilizando el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel). Para esto, el pellet fue resuspendido en 250 μ L de A1 (Resuspension Buffer), se adicionaron 300 μ L de A2 (Lysis Buffer), se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, se adicionaron 350 μ L de A3 (Neutralization Buffer), y se centrifugó a 11 000 x g durante 1 min. El lisado se transfirió a una minicolumna ensamblada en el tubo colector y se centrifugó a 11 000 x g durante 1 min. Se agregaron 600 μ L de A4 (Wash Buffer) y se centrifugó a 11 000 x g durante 1 min, se recentrifugó y la minicolumna se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se adicionaron 50 μ L de H₂O MQ estéril, se incubó a 70 °C durante 5 min en bloque térmico y finalmente, se centrifugó a 11 000 x g durante 1 min. Se descartó la minicolumna y el purificado se almacenó a -20 °C.

Para comprobar que el plásmido extraído es el correcto, se realizó la digestión con las enzimas EcoRI y PsTI, las cuales deberían dar como resultado dos bandas, una perteneciente al promotor pCMV ligado a la GFP con aprox. 1370 pb y el plásmido pSB1K3 de 2163 pb. Se digirió 1 μ g de plásmido extraído,

con 1 μL de EcoRI, 1 μL de PstI, 3 μL de Buffer O 10X y H_2O MQ estéril, hasta un volumen final de 30 μL . La digestión se incubó de 2-3 h a 37 °C.

La digestión fue visualizada mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% con REALSAFE Nucleic Acid Staining Solution (Durviz) 2X. Para esto, se utilizaron 3 μL de las digestiones con 0.5 μL de 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, Lithuania). Además, se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler, DNA Ladder Mix (#SM0331, Thermo Scientific, Lithuania). El gel se corrió a 100 V durante 30 min aproximadamente.

3 Ensamblaje de Gibson

a Aislamiento de pT1GRPC37 de *L. casei* BL23

La extracción de plásmido fue realizada siguiendo el Método Sullivan y Klaenhammer (1993) seguido del protocolo del kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) con modificaciones.

L. casei BL23 portadora de pT1GRPC37 fue inoculada en 10 mL de MRS Erm⁵ e incubada a 37 °C durante 24-48 h. El cultivo fue centrifugado a 4,000 rpm durante 10 min. El pellet se resuspendió en 1 mL de 50 mM EDTA, se incubó durante 15 min. Se centrifugó a 11 000 rpm durante 10 min. El pellet se resuspendió en 200 μL de Tris-EDTA con 1 μL de mutanolisina (10 U/ μL) y 1.2 mg de lisozima y se incubó durante 30 min a 37 °C. Se adicionaron 400 μL de SDS alcalino (3% SDS, 0.2 N NaOH) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 300 μL de 3 M acetato de sodio pH 4.8, se incubó en

hielo durante 5 min. Se centrifugó a 11 000 rpm durante 15 min a 4 °C, se transfirió sobrenadante a otro tubo y se adicionaron 650 µL de isopropanol al 96% (-20°C). Se mezcló y centrifugó a 11 000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se descartó sobrenadante, se lavó con etanol 70% (-20 °C) y finalmente se resuspendió en 500 µL de A1 (Resuspension Buffer) para continuar con el protocolo del kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) y se incubó 1 h a 37 °C. Se adicionaron 500 µL de A2 (Lysis Buffer) y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 600 µL de A3 (Neutralization Buffer). Se centrifugó a 11 000 x g durante 1 min. El lisado se transfirió a una minicolumna, ensamblada en tubo colector. Se centrifugó a 11 000 x g durante 1 min, se descartaron desechos, se adicionaron 600 µL de A4 (Wash Buffer) y se centrifugó a 11 000 x g durante 1 min, se volvió a centrifugar para eliminar residuos de etanol y se transfirió la minicolumna a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se agregaron 50 µL de H₂O MQ estéril, se incubó a 70 °C en bloque térmico durante 5 min y se centrifugó a 11 000 x g durante 1 min. Se descartó la minicolumna y se almacenó a -20 °C.

b Aislamiento de pT1GRPC37 de *L. lactis* MG1363

La extracción de plásmido fue realizada siguiendo el protocolo del kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) con modificaciones.

L. lactis MG1363 portadora de pT1GRPC37 se inoculó en 10 mL de M17 glucosa 0.5 % Erm⁵ y se incubó a 30 °C durante 24-48 h. El cultivo fue centrifugado a 4,000 rpm durante 10 min. El pellet se resuspendió en 500 µL de A1 (Resuspension Buffer), se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril con

2.5 mg de lisozima (Cat. No. L6876; Sigma-Aldrich) y se incubó durante 60 min a 37 °C en bloque térmico. Se adicionaron 500 µL de A2 (Lysis Buffer) y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 600 µL de A3 (Neutralization Buffer). Se centrifugó a 11 000 x *g* durante 1 min. El lisado se transfirió a una minicolumna, ensamblada en tubo colector. Se centrifugó a 11 000 x *g* durante 1 min, se descartaron desechos, se adicionaron 600 µL de A4 (Wash Buffer) y se centrifugó a 11 000 x *g* durante 1 min, se volvió a centrifugar para eliminar residuos de etanol y se transfirió la minicolumna a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se agregaron 50 µL de H₂O MQ estéril, se incubó a 70 °C en bloque térmico durante 5 min y se centrifugó a 11 000 x *g* durante 1 min. Se descartó la minicolumna y se almacenó a -20 °C.

c Diseño de oligonucleótidos

Otra técnica es la de ensamblaje de Gibson, en la cual, productos de PCR, correspondientes incluso a plásmidos enteros, son directamente ligados y transformados. Para esta técnica se siguió el protocolo del Gibson Assembly Cloning Kit (Cat. No. E5510S, New England BioLabs). Esta técnica se basa en el diseño de oligonucleótidos para cada fragmento, los cuales deben solapar en los extremos con los oligonucleótidos del otro fragmento y de esta manera poder llevar a cabo la ligación entre los fragmentos amplificados y su posterior transformación (Fig. 45).

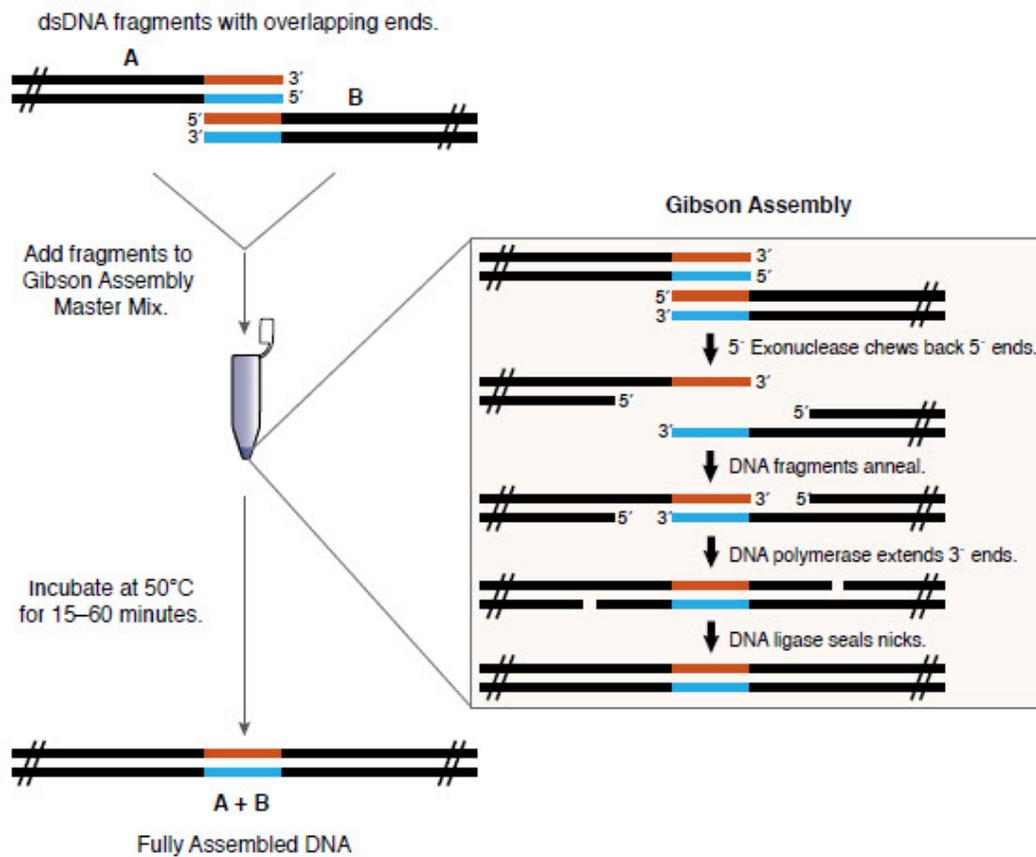


Figura 45. Ensamblaje de Gibson. Técnica de ensamblaje de fragmentos amplificados con oligonucleótidos que solapan entre sí.

En este caso, se diseñaron oligonucleótidos a partir del plásmido completo pT1GRPC37 (excluyendo la GFP), amplificando un fragmento de aprox. 6 kb. y por otro lado, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el plásmido completo pCMV_GFP (Matsuda y Cepko, 2004). A los dos pares de oligonucleótidos se les adicionó el sitio de restricción para la enzima EcoRV.

d Amplificación de fragmentos por PCR

El plásmido pT1GRPC37 sin GFP fue amplificado mediante PCR a partir del mismo plásmido aislado de *L. casei* BL23 o *L. lactis* portadoras (cepa C81 o C76, respectivamente, código de la colección del IATA-CSIC). Mientras que el plásmido completo pCMV_GFP fue amplificado del plásmido obtenido de Addgene (#11153; Matsuda y Cepko, 2004).

Para las reacciones de PCR se utilizaron aprox. 40 ng del plásmido pT1GRPC37 o pCMV_GFP, como molde, 2.5 µL del oligo directo (Gibson_pT1::pCMV_for o Matsuda_prom_for, respectivamente) y 2.5 µL del oligo reverso (Gibson_pT1::pCMV_rev o Matsuda_prom_rev, respectivamente) (10 mM), 0.5 µL de Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, #F-530S, Lithuania), 10 µL de Phusion HF Buffer 5X, 1 µL de dNTP's mix 10 mM y 31.5 µL de H₂O para una reacción de 50 µL.

Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 98°C durante 3 min, desnaturalización a 98 °C durante 30 s, alineamiento a 45 °C para amplificar el pT1GRPC37 o 55 °C para el pCMV_GFP, durante 30

s, extensión a 72 °C durante 4 min 30 s o 2 min, respectivamente, por 35 ciclos, con una extensión final a 72 °C durante 5 min.

Las amplificaciones fueron visualizadas mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% con REALSAFE Nucleic Acid Staining Solution (Durviz) 2X. Para esto, se utilizaron 3 µL de las digestiones con 0.5 µL de 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, Lithuania). Además, se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler, DNA Ladder Mix (#SM0331, Thermo Scientific, Lithuania). El gel se corrió a 100 V durante 30 min aproximadamente.

Los fragmentos amplificados fueron purificados siguiendo el protocolo del kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

e Reacción de Gibson

Para llevar a cabo el ensamblaje se mezclaron de 100 ng de cada fragmento con Gibson Assembly Master Mix 2X hasta 1X, teniendo un total de 20 µL. La mezcla se incubó a 50 °C durante 60 min (para mayor eficacia, lo normal 15 min). Al final, se incubaron en hielo o a -20 °C hasta su uso para transformación.

f Transformación de *E. coli* DH5α por choque térmico

Se mezclaron 2 µL de la reacción de Gibson con 50 µL de *E. coli* DH5α quimiocompetentes y se incubaron en hielo durante 30 min. Se aplicó choque térmico 2 s a 42 °C e inmediatamente se incubaron en hielo durante 2 min. Se adicionaron 950 µL de medio SOC precalentado y se incubó a 37 °C durante 1 h

a 200 rpm. Finalmente, se sembraron 250, 100 y 50 μL en placas LB Amp¹⁰⁰ y se incubaron a 37 °C durante 24 h.

g Alternativa: Digestión y ligación de fragmentos amplificados para reacción de Gibson

Otra alternativa a la reacción de Gibson, fue digerir ambos fragmentos amplificados con la enzima EcoRV, incluida en los extremos de cada fragmento y finalmente, realizar la ligación y su transformación en alguna cepa de *E. coli* competente.

Los fragmentos pT1GRPC37 o pCMV_GFP amplificados fueron digeridos, cada uno con 1 μL de EcoRV, 1.5 μL de Buffer R 10X y H₂O MQ estéril, para un volumen de 15 μL . Se incubó 2-3 h a 37 °C.

Los fragmentos fueron purificados siguiendo el protocolo del kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) y finalmente ligados. Se utilizó una relación 1:3 vector-inserto, se adicionó T4 Ligation Buffer 10X (Roche Diagnostics, USA) y 1 μL (1 U) de T4 DNA Ligase (Roche Diagnostics, USA), en un volumen final de 20 μL . Posteriormente, se incubó a 16 °C 16-24 h.

h Transformación de *E. coli* DH5 α por choque térmico y de *E. coli* TOP 10 por electroporación

Se llevaron a cabo dos procedimientos de transformación con la ligación obtenida. El protocolo fue descrito en la sección Anexos 2.d y 2.f.

El resultado de la transformación fue sembrado en placas LB Amp¹⁰⁰ e incubado 24 h a 37 °C.

4 Clonación del plásmido pCMV_GFP completo en pT1GRPC37

a Digestión del plásmido pT1GRPC37 y formación de extremos romos

El plásmido pT1GRPC37 fue digerido con las enzimas PstI y SpeI para eliminar el fragmento correspondiente a la GFP (evitar futuros inconvenientes al estar expresando la RFP y GFP). Se realizó la mezcla de 1 µL de SpeI, 1.5 µL de PstI, aprox. 1 µg del plásmido, 3 µL de Buffer Tango 10X y H₂O MQ estéril hasta un volumen final de 30 µL. Se incubó durante 2-3 h a 37 °C.

Se llevó a cabo la purificación de la digestión siguiendo el protocolo del kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

Posteriormente, se realizó la formación de extremos con la enzima DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (Cat. No. M0210S, New England, BioLabs). Se mezcló el plásmido digerido y purificado, 2.5 µL de dNTP mix (10 mM), 1 µL de la enzima DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment, 5 µL del Buffer REact 2 10X y H₂O MQ estéril, para un volumen final de 50 µL. Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y se inactivó la enzima a 75 °C durante 20 min.

El plásmido digerido y con extremos en romo fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% con REALSAFE Nucleic Acid Staining Solution (Durviz) 2X. Para esto, se utilizaron 3 µL de las digestiones con 0.5 µL de 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, Lithuania). Además, se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler, DNA Ladder Mix (#SM0331, Thermo Scientific, Lithuania). El gel se corrió a 100 V durante 30 min aproximadamente.

5 Clonación del fragmento pCMV_GFP_poliA en pIAV9

a Obtención del fragmento codificante del pCMV, la GFP y el terminador

Poli-A

La amplificación de la secuencia codificante del promotor CMV, la GFP y el terminador Poli-A se llevó a cabo a partir del plásmido pCMV_GFP de Matsuda y Cepko (2004) (Addgene, plasmid #11153) diseñando oligonucleótidos específicos, adicionándole el sitio para la enzima de restricción, EcoRV.

Para la reacción de PCR se utilizaron aprox 40 ng del plásmido pCMV_GFP como molde, 2.5 µL del oligo directo (Forward) y 2.5 µL del oligo reverso (Reverse) (10 mM), 0.5 µL de Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, #F-530S, Lithuania), 10 µL de Phusion HF Buffer 5X, 1 µL de dNTP's mix 10 mM y 31.5 µL de H₂O para una reacción de 50 µL.

Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 98°C durante 3 min, desnaturalización a 98 °C durante 30 s, alineamiento a 55 °C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 4 min 30 s, por 35 ciclos, con una extensión final a 72 °C durante 5 min.

Para analizar los productos de PCR se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con REALSAFE Nucleic Acid Staining Solution (Durviz, España) 20000X. Se utilizarón 3 µL de producto de PCR y 0.5 µL de DNA Loading Dye 6X (#R0611, Thermo Scientific, Lithuania). Además, para determinar el tamaño de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler, DNA Ladder

Mix (#SM0331, Thermo Scientific, Lithuania). El gel se corrió a 100 V durante 20-30 min, esperando obtener una banda de aproximadamente 2008 pb.

La purificación del amplicón se realizó a partir del producto de PCR siguiendo el protocolo del kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel, Germany). Se agregaron 100 μ L de Binding Buffer (NTI) a los 45-50 μ L de producto de PCR (relación 2:1), se transfirió a la minicolumna (ensamblada en el tubo colector) y se centrifugó a 11 000 $\times g$ durante 1 min. Se agregaron 700 μ L de Wash Buffer (NT3) y se centrifugó a 11 000 $\times g$ durante 1 min. Se centrifugó una vez más para eliminar residuos de etanol. Se transfirió la minicolumna a un tubo eppendorf de 1.5-2 mL estéril. El ADN purificado se eluyó en 50 μ L de H₂O Milli Q estéril, incubándose en bloque térmico a 70 °C durante 2-5 min. Finalmente, se centrifugó a 11 000 $\times g$ durante 1 min. La minicolumna fue descartada y el fragmento purificado se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

El amplicón fue digerido con la enzima EcoRV, sitio incluido en los oligonucleótidos utilizados para amplificar la secuencia. Se realizó una reacción con 500 ng amplicón purificado (44 μ L), 1 μ L de EcoRV y 5 μ L de 10X Thermo Scientific Buffer R, teniendo un volumen final de 50 μ L. Se incubó a 37 °C durante 1 h.

La purificación del amplicón digerido se realizó siguiendo el protocolo del kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel, Germany) descrito en la sección Anexos 2.a en una elución final de 40 μ L. Se determinó la

concentración del amplicón digerido y purificado mediante el Qubit™ 3.0 Fluorometer (Invitrogen) utilizando la mezcla de 199 μL de Qubit™ dsDNA HS Buffer y 1 μL de Qubit™ dsDNA HS Reagent 200X concéntrate (REF Q32854) más 1 μL de la muestra a cuantificar. El amplicón digerido y purificado fue almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso.

b Obtención el plásmido pIAV9

El aislamiento del plásmido pIAV9 (plásmido lanzadera de *E. coli* y gram-positivos) fue llevado a cabo a partir de la cepa portadora *E. coli* en medio líquido LB con Cm^{25} . Incubándose 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 200 rpm (Perez-Arellano y col. 2001).

La extracción de plásmido se realizó con el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Germany) utilizando el protocolo para bajo número de copias (Low-copy plasmid). Se tomaron 10 mL del cultivo, se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 500 μL de Resuspension Buffer (A1). La mezcla fue transferida a un tubo eppendorf estéril. Se agregaron 500 μL de Lysis Buffer (A2) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Después se agregaron 600 μL de Neutralization Buffer (A3) y se centrifugó a $11\ 000\ \times\ g$ durante 1 min. El lisado fue transferido a la minicolumna (ensamblada en el tubo colector) y se centrifugó a $11\ 000\ \times\ g$ durante 1 min. Se agregaron 600 μL de Wash Buffer (A4) y se centrifugó a $11\ 000\ \times\ g$ durante 1 min. Adicionalmente, se centrifugó nuevamente 1 min para evaporar restos de etanol. La minicolumna fue transferida a un tubo eppendorf de 1.5-2 mL estéril. Se agregaron 50 μL de H_2O Milli Q estéril, se incubó a

temperatura ambiente 1 min y finalmente, se centrifugó a 11 000 x g durante 1 min. El plásmido purificado se almacenó a -20 °C.

Después del aislamiento se determinó la concentración de ADN mediante Qubit™ 3.0 Fluorometer, como se mencionó anteriormente en la sección Anexos 5.a.

La digestión enzimática del plásmido se realizó con la enzima SmaI para abrir el plásmido y dejar extremos en romos. Utilizando 1 µL de SmaI, 500 ng del plásmido (30 µL), 3.5 µL de 10X Thermo Scientific Tango Buffer. La reacción se incubó a 30 °C durante 1 h.

El plásmido digerido fue visualizado mediante un gel de agarosa 0.8% con REALSAFE Nucleic Acid Staining Solution (Durviz) 2X. Para esto, se utilizarán 3 µL del plásmido con 0.5 µL de 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, Lithuania). Además, se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler, DNA Ladder Mix (#SM0331, Thermo Scientific, Lithuania). El gel se corrió a 100 V durante 30 min aproximadamente.

La concentración de ADN plasmídico obtenido después de la digestión y purificación fue determinada mediante Qubit™ 3.0 Fluorometer, como se mencionó anteriormente en la sección Anexos 5.a.

c Ligación entre pIAV9 y el fragmento pCMV_GFP_poliA

Se realizó ligación entre el plásmido pIAV9 y el amplicón pCMV_GFP_poliA, con una relación de 1:3 vector-inserto, T4 Ligation Buffer 1X

(Roche Diagnostics, USA) y 1 μ L (1 U) de T4 DNA Ligase (Roche Diagnostics, USA), en un volumen final de 20 μ L. Posteriormente, se incubó a 16 °C 12-24 h.

La ligación fue purificada con el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macharey-Nagel, Germany) utilizando el protocolo anteriormente descrito, en una elución final de 15 μ L con H₂O Milli Q estéril. La ligación purificada se almacenó a -20 °C hasta su uso.

d Transformación de *E. coli* DH5 α por choque térmico y de *E. coli* TOP 10 por electroporación

Se llevaron a cabo dos procedimientos de transformación con la ligación obtenida. El protocolo fue descrito en la sección Anexos 2.d y 2.f.

El resultado de la transformación fue sembrado en placas LB Cm²⁵ e incubado 24 h a 37 °C.

e Comprobación de clonas positivas por PCR de colonia

De las colonias obtenidas se realizó PCR para corroborar que presenten el inserto. Para esto se picaron colonias con palillos estériles y se sumergieron rápidamente en la mezcla para PCR con los siguientes componentes: 2.5 μ L 10X KAPA Taq Buffer A (Sigma-Aldrich), 0.1 μ L de KAPA Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich, SKU KK1014), 0.5 μ L de KAPA dNTP Mix 10 mM cada uno (Sigma-Aldrich), 1.25 μ L del oligo directo y 1.25 μ L del oligo reverso y 19.4 μ L de H₂O Milli Q estéril, para un volumen final de 25 μ L, utilizando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 45 °C durante 30 s y una

extensión a 72 °C durante 2 min, así como una extensión final a 72 °C durante 5 min.

6 Transformación de *L. rhamnosus* GG con pT1GRPC37

a Preparación de electrocompetentes

Se inocularon 5 mL de medio MRS con glicina 2% con la cepa *L. rhamnosus* GG y se incubaron a 37 °C 24 h. Con esos 5 mL de cultivo (D.O.₅₅₀ 0.8-1) se inocularon 100 mL de medio MRS con glicina 2% y se incubaron a 37 °C hasta una D.O.₅₅₀ de 0.2-0.3, la cual fue determinada en un espectrofotómetro (Milton Roy Spectronic 20D spectrophotometer). Se adicionó ampicilina 10 µg/mL y se incubó hasta una D.O.₅₅₀ de 0.4-0.5 (3-4 h desde la inoculación inicial). Se centrifugó 15 min a 6,000 x g. Se eliminó el sobrenadante y el pellet fue lavado 2 veces con buffer de electroporación a temperatura ambiente (sacarosa 0.5 M, fosfato potásico 7 mM pH 7.4 y MgCl₂ 1 mM). Finalmente, el pellet fue resuspendido en 1 mL del mismo buffer y conservado en hielo para la electroporación.

b Electroporación

La electroporación se llevó a cabo con 100 µL de bacterias más 400 ng de ADN plasmídico. Se electroporó a 1.7 kv y 200 Ω. Las bacterias recién transformadas se transfirieron a 5 mL de MRS, CaCl₂ 2 mM y MgCl₂ 20 mM. Se incubó a 37 °C durante 3 h y finalmente se sembraron diferentes volúmenes del cultivo en MRS Agar Erm⁵.

B RESULTADOS

1 Transfección de Caco-2 con pCMV_GFP (Addgene)

Para comprobar que el promotor CMV funcionaba correctamente y expresaba la GFP en células humanas, se llevó a cabo la transfección de células epiteliales intestinales Caco-2.

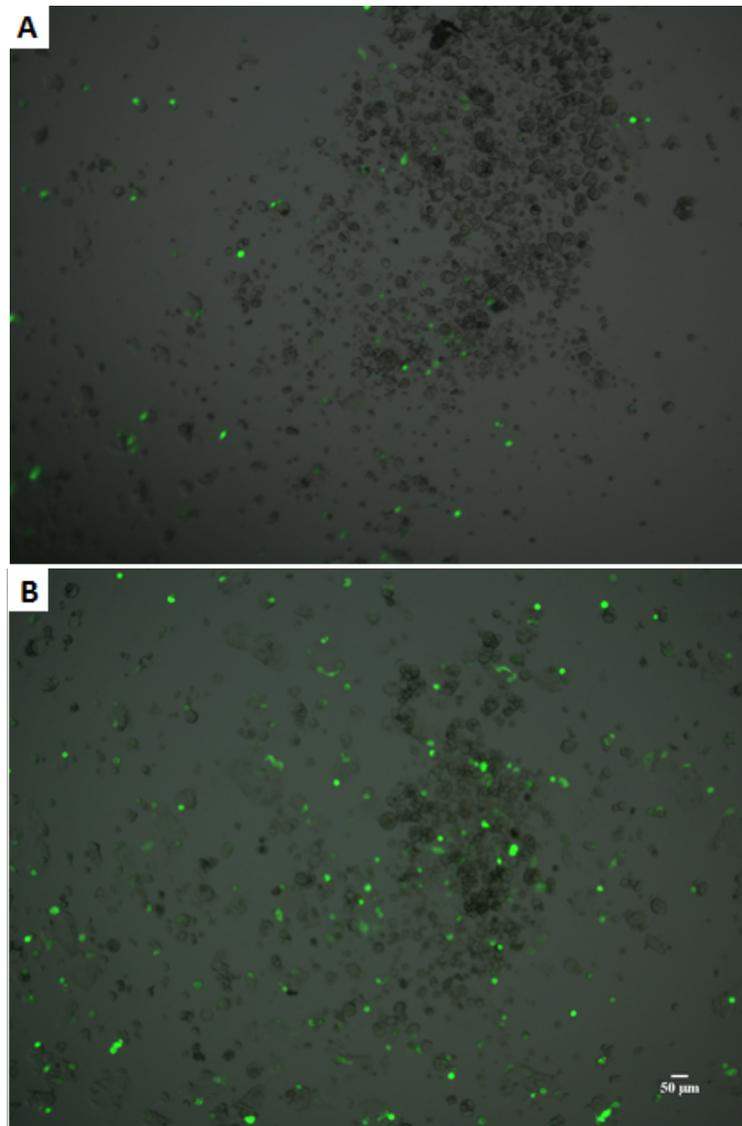


Figura 46. Transfección de Caco-2 con el plásmido pCMV_GFP (Addgene). Mezcla de imagen capturada con luz visible y con fluorescencia en verde. En la imagen A) se observa el nivel de transfección y expresión de la GFP al utilizar la cantidad de 0.35 μ L de Lipofectamine® LTX por reacción, mientras que en la imagen B) se observa grado de transfección el al utilizar 0.70 μ L de Lipofectamine® LTX.

Estos resultados indican que el plásmido pCMV_GFP funciona y puede ser utilizado para extraer el promotor CMV y la GFP y llevar a cabo próximos experimentos de clonación.

2 Construcción del plásmido portador del promotor CMV y GFP

a Construcción del plásmido pSB1K3 con el pCMV y la GFP

El plásmido pSB1K3- BBa_J04450 fue digerido con EcoRI y PstI, excluyendo la proteína mRFP1, esperando un fragmento de 2163 pb correspondiente al plásmido y uno de 1110 pb correspondiente a la mRFP1 (Fig. 48 Carril 1).

El plásmido pSB1C3_BBa_I712004 fue digerido con EcoRI y SpeI, obteniendo el fragmento BBa_I712004, correspondiente al promotor CMV. Esperando un fragmento de 2,070 pb correspondiente al plásmido sin el promotor CMV, y otro de 650 pb correspondiente al promotor CMV (Fig. 48 Carril 2).

Finalmente, el plásmido pSB1C3_BBa_E0040 fue digerido con XbaI y PstI, liberando el fragmento GFP. Esperando una banda de 2,070 pb correspondiente al plásmido sin GFP, y otra banda de 720 pb correspondiente a la GFP (Fig. 48 Carril 3).

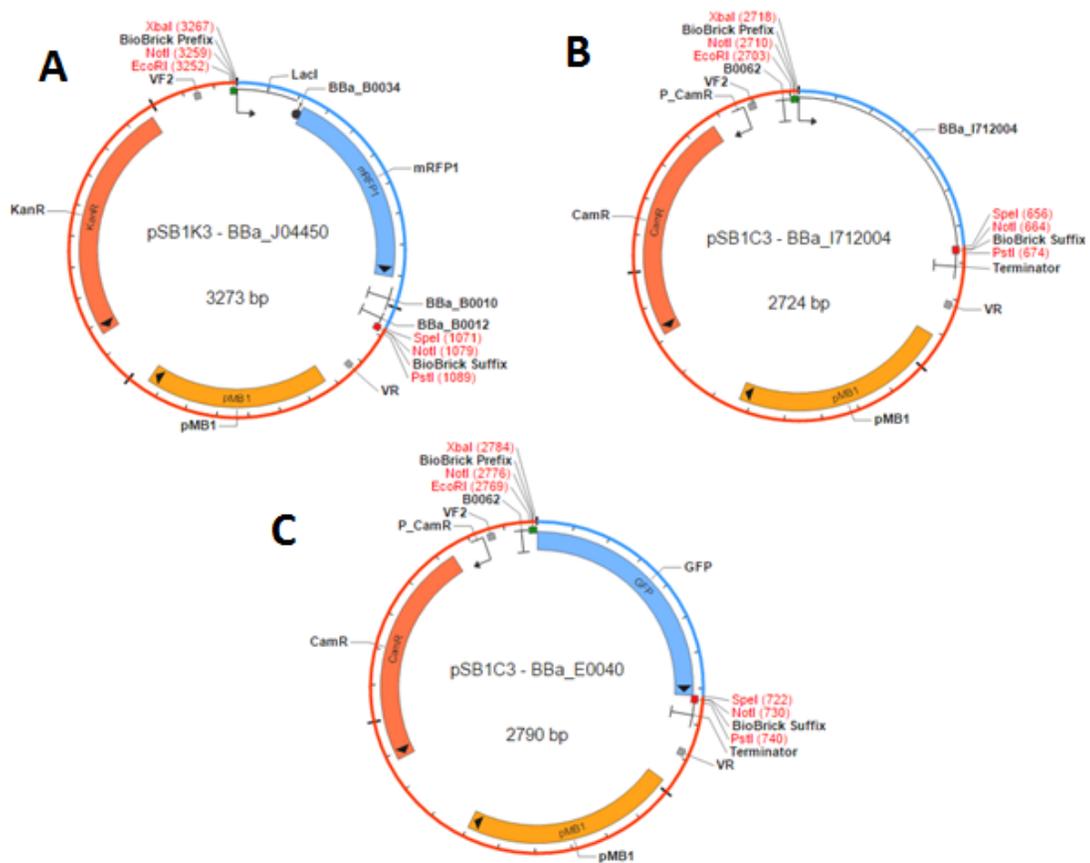


Figura 47. Biobricks utilizados para la obtención de un plásmido portador del promotor CMV y la GFP. En la imagen A) se observa el plásmido pSB1K3 portador de la proteína mRFP1 utilizado como base para la inserción del pCMV y GFP. En la imagen B) se observa el plásmido a partir del cual se extrajo el promotor CMV, y finalmente en la imagen C) el plásmido a partir del cual se obtuvo el fragmento codificante de la GFP.

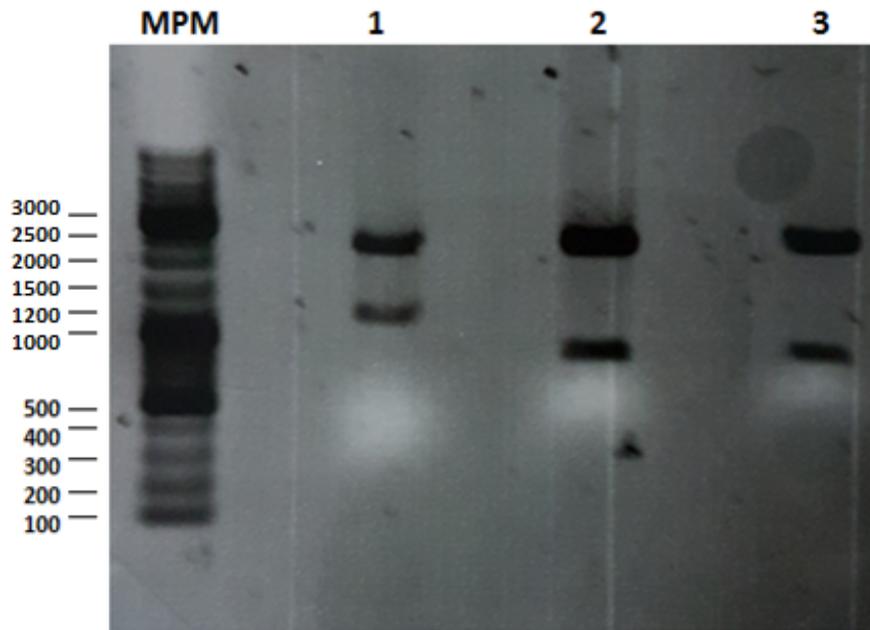


Figura 48. Digestiones de Biobricks para la construcción de un plásmido portador de la GFP bajo el pCMV. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de digestiones realizadas a los plásmidos Biobricks. El carril MPM corresponde al marcador GeneRuler DNA ladder. El carril 1 muestra las bandas correspondientes al plásmido pSB1K3 de 2163 pb y la proteína mRFP1 de 1110 pb. El carril 2, muestra el plásmido pSB1C3 (sin pCMV) de 2,070 pb y la banda correspondiente a promotor CMV de 650 pb. El carril 3, muestra el plásmido pSB1C3 (sin GFP) de 2,070 pb y la banda correspondiente a la GFP de 720 pb.

b Transformación de *E. coli* DH5α con la ligación pSB_pCMV_GFP

Posterior a la purificación de las digestiones, se llevó a cabo la ligación de los fragmentos: el plásmido pSB1K3, el promotor CMV y la GFP. Finalmente se llevó a cabo la transformación mediante choque térmico de *E. coli* DH5α y *E. coli* TOP 10 mediante electroporación, sin embargo, solo se tuvo resultados en la transformación mediante electroporación, con una sola colonia posible positiva.

El plásmido extraído fue digerido con las enzimas EcoRI y PsTI para corroborar que se trata de la construcción correcta. Esta digestión dará lugar a dos fragmentos, uno correspondiente al plásmido pSB1k3 y otro correspondiente al pCMV ligado a la GFP (Fig. 49).

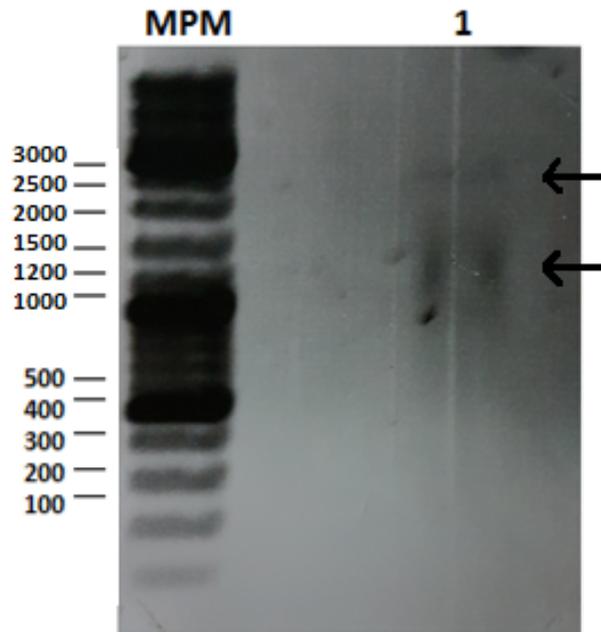


Figura 49. Digestión del plásmido pSB_pCMV_GFP extraído. En el carril 1 se observan dos bandas tenues que podrían corresponder a los tamaños esperados de 2,163 pb del plásmido pSB1K3 y 1370 pb del fragmento correspondiente a pCMV_GFP. El carril MPM corresponde al marcador GeneRuler DNA ladder.

Sin embargo, no existió suficiente cantidad para poder trabajar y a pesar de múltiples intentos posteriores, no se pudo reproducir este resultado.

Este procedimiento de transformación, así como los procedimientos anteriores de digestión, purificación y ligación de los fragmentos, fueron realizados repetidamente sin obtener resultados positivos. Por esto, se intentaron otras técnicas para lograr la obtención de un plásmido portador de la GFP bajo el promotor CMV.

3 Ensamblaje de Gibson

a Aislamiento de pT1GRPC37

Como resultado de la extracción del plásmido portador de las proteínas roja y verde fluorescente a partir de las cepas portadoras de *L. casei* BL23 y de *Lactococcus lactis* MG1363, se observa gran cantidad de ADN genómico en ambos casos, pero solo en la extracción a partir de *Lactococcus lactis* MG1363 se observa ADN plásmidico.

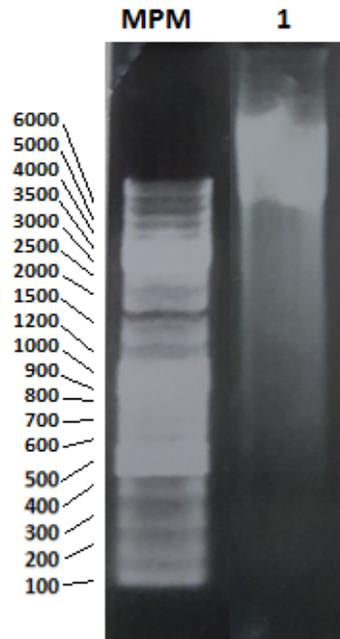


Figura 50. Plásmido extraído de *L. casei* BL23 portadora de pT1GRPC37. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de la extracción de plásmido realizada a *L. casei* BL23 portadora de pT1GRPC37. En el carril 1 se observa gran cantidad de ADN genómico y posible plásmido superenrollado. El carril MPM corresponde al marcador GeneRuler DNA ladder.

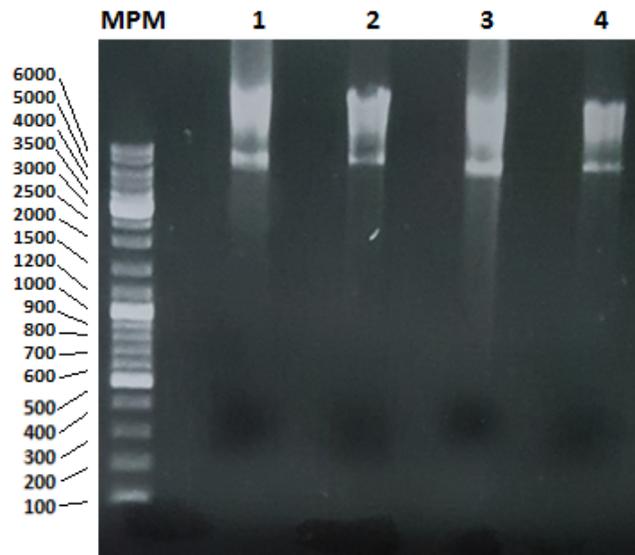


Figura 51. Plásmido extraído de *Lactococcus lactis* MG1363 portadora de pT1GRPC37. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de extracciones de plásmido realizadas a varias clonas positivas de *L. lactis* portadoras de pT1GRPC37, todas positivas con aprox. 6.5 kb. El carril MPM corresponde al marcador GeneRuler DNA ladder.

b Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos para amplificar el plásmido completo pCMV_GFP de Addgene, así como los utilizados para amplificar el plásmido pT1GRPC37 tienen un sitio de restricción EcoRV en sus extremos.

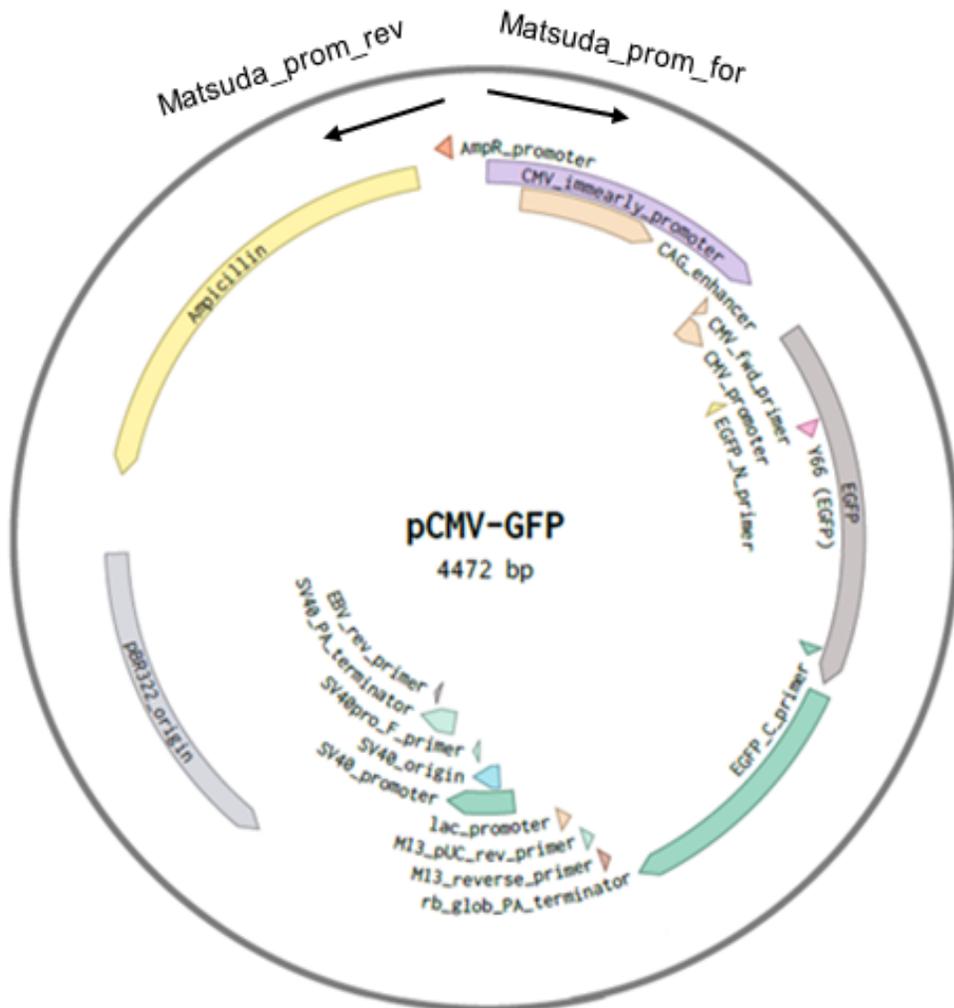


Figura 52. Ubicación de los oligonucleótidos diseñados en el plásmido pCMV_GFP de Addgene. El oligonucleótido forward inicia en el promotor CMV, mientras que el oligonucleótido reverse inicia al final del casete de resistencia a ampicilina en sentido contrario. Ambos incluyen en sus extremos el sitio de restricción para la enzima EcoRV.

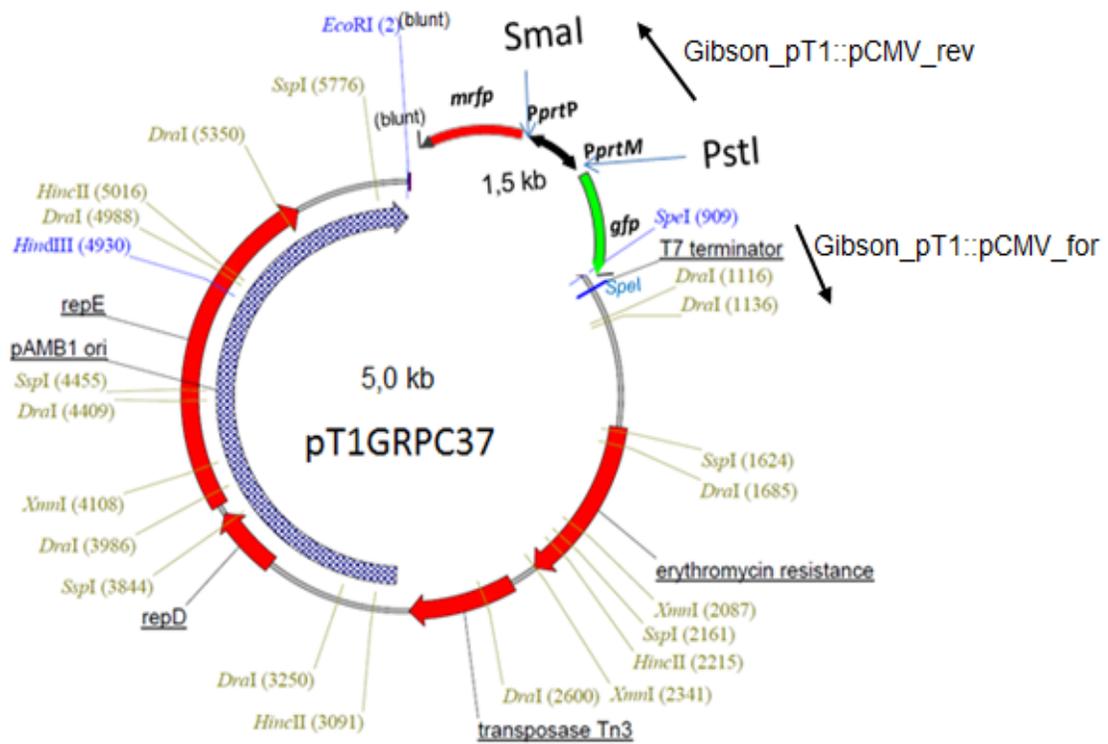


Figura 53. Ubicación de los oligonucleótidos diseñados en el plásmido pT1GRPC37. El oligonucleótido forward inicia en el terminador T7, mientras que el oligonucleótido reverse inicia en el promotor truncado de la PrtP,

Cuadro 1. Oligonucleótidos para amplificación de fragmentos para reacción de Gibson

Amplificación	Oligonucleótido	Secuencia
pCMV_GFP completo	Matsuda_Prom_f	TTGATATCTAGGGGTTCCGCGCACATTT
	or	C
	Matsuda_Prom_rev	TTGATATCTTTGTTTATTTTTCTAAATAC ATTCAAATATGTATC
pT1GRPC37 excluyendo GFP	Gibson_pT1:: pCMV_for	TATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAA AGATATCAAA CTAGTAGATCCGGCTGC
	Gibson_pT1:: pCMV_rev	CGCGGAACCCCTAGATATCAAGTCTCC TCTGAAATGCTTACAG

c Amplificación de plásmidos pT1GRPC37 y pCMV_GFP

Como resultado de la amplificación de los plásmidos pCMV_GFP completo y pT1GRPC37 (excluyendo GFP), se obtuvieron bandas definidas.

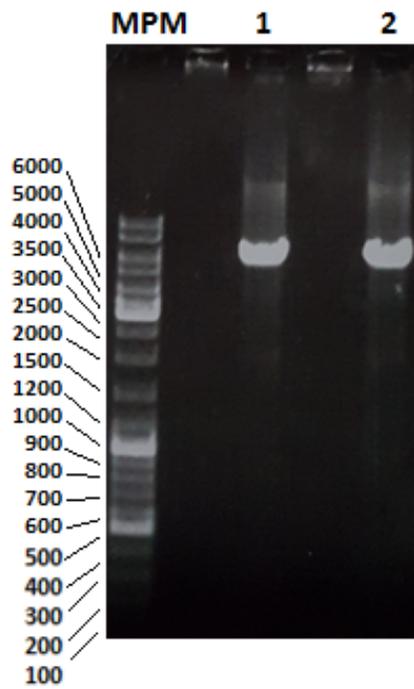


Figura 54. Plásmido pT1GRPC37 amplificado (excluyendo GFP). El carril 1 muestra el plásmido amplificado tomando como molde el plásmido aislado de *L. casei* BL23 portadora, mientras que el carril 2, muestra el plásmido amplificado a partir del plásmido aislado de *L. lactis* MG1363. Ambas resultaron positivas, con un tamaño aprox. de 6.5 kb. El carril MPM corresponde al marcador GeneRuler DNA ladder.

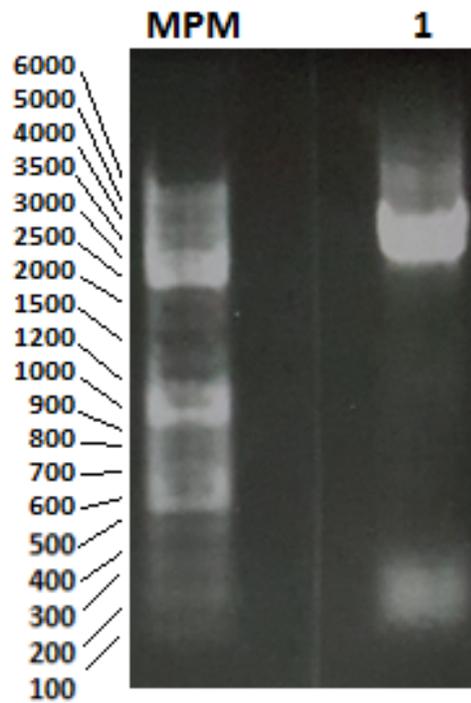


Figura 55. Plásmido pCMV_GFP de Addgene amplificado. El carril 1 muestra el plásmido amplificado con un tamaño aprox de 4.5 kb. El carril MPM corresponde al marcador GeneRuler DNA ladder.

d Transformación de *E. coli* DH5α por choque térmico

Como producto de la transformación de obtuvo gran cantidad de colonias, sin embargo, ninguna resultó positiva. Esta técnica se repitió en varias ocasiones, sin obtener resultados positivos.

e Alternativa: Digestión y ligación de fragmentos amplificados para reacción de Gibson

Después del ensamblaje de Gibson, sin éxito, se optó por digerir ambos fragmentos que tenían integrados en sus extremos el sitio de restricción para la enzima EcoRV. Posteriormente, se ligaron y se realizó la transformación mediante choque termico y electroporación, sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos, posiblemente por la poca estabilidad de ambos plásmidos unidos al tener un total de aprox. 9.5 kb.

4 Clonación del plásmido pCMV_GFP completo amplificado en pT1GRPC37 digerido

a Digestión del plásmido pT1GRPC37 y formación de extremos romos

Se intentó digerir el plásmido pT1GRPC27 con las enzimas PsTI y Spel, liberando el fragmento de la GFP y haciendo extremos romos posteriormente. Sin embargo, la cantidad de ADN al final era escasa para poder seguir con el procedimiento de purificación y posteriormente, ligación con el plásmido completo pCMV_GFP digerido con EcoRV (extremos en romo).

5 Clonación del fragmento pCMV_GFP_poliA en PIAV9

a Obtención del módulo codificante del pCMV, la GFP y el terminador Poli-

A

Se llevó a cabo la amplificación del módulo pCMV_GFP_PoliA a partir del plásmido pCMV_GFP de Addgene. El fragmento corresponde a un tamaño de 2,008 pb.

Cuadro 2. Oligonucleótidos diseñados para amplificar el módulo pCMV_GFP_poliA

Oligonucleótido	Secuencia
Matsuda_Prom_for	TT GATATC TAGGGGTTCCGCGCACATTC
PolyA_rev2	TT GATATC CCTGCAGGTCGAGGGATCTTCAT

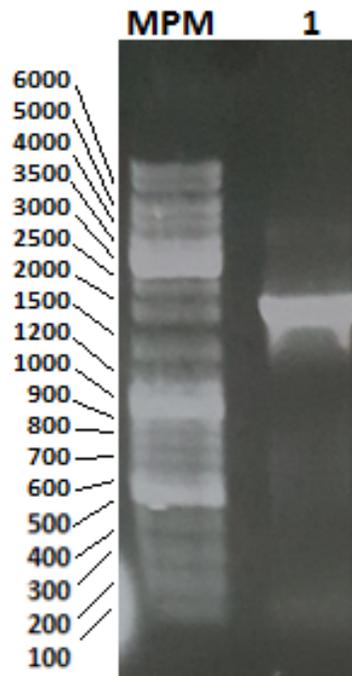


Figura 56. Fragmento pCMV_GFP_poliA amplificado. El carril 1 muestra el fragmento amplificado con un tamaño de 2008 pb. El carril MPM corresponde al marcador GeneRuler DNA ladder.

b Obtención del plásmido pIAV9

Se llevó a cabo la extracción del plásmido pIAV9 a partir de una cepa de *E. coli* portadora. El tamaño correspondió a aproximadamente 5 kb.

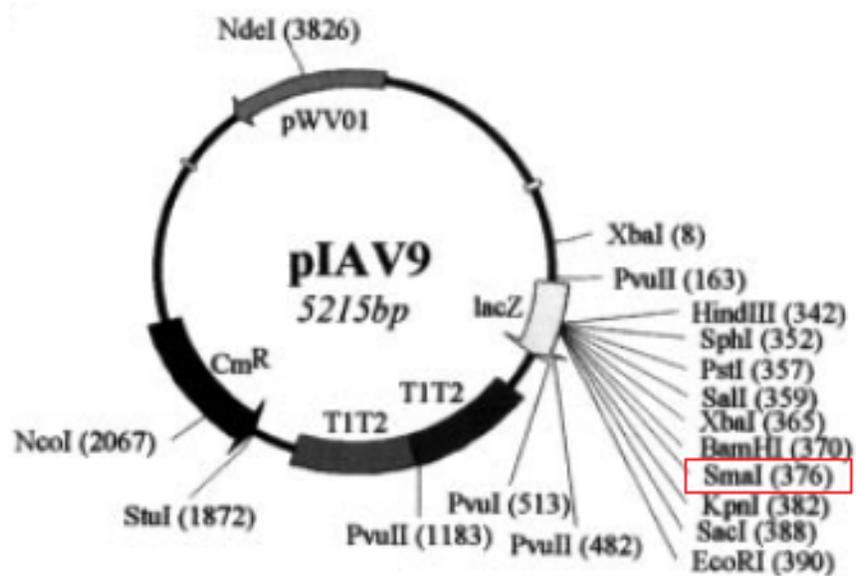


Figura 57. Plásmido lanzadera pIAV9. Reproducible en Gram-positivos y Gram-negativos.

c Transformación de pIAV9_pCMV_GFP_poliA

La ligación entre el plásmido pIAV9 y el módulo pCMV_GFP_PoliA y su posterior transformación en alguna cepa de *E. coli* mediante choque termico y electroporación, no dieron resultados positivos. La cantidad de plásmido inicial fue muy baja, la cepa crecía muy lento, además, el plasmido es de bajo numero de copias. Al final, la ligación también tenía baja cantidad de ADN. Después de múltiples intentos, se encontró que la eficiencia de la enzima SmaI, utilizada para digerir pIAV9, era baja, por lo cual se adquirió nueva. Sin embargo, a pesar de eso, se obtuvieron colonias, pero ninguna positiva.

6 Transformación de *L. rhamnosus* GG con pT1GRPC37

No se obtuvieron colonias de *L. rhamnosus* GG transformada con el plásmido pT1GRPC37.



DOÑA CRISTINA MOLINA ROSELL, DIRECTORA DEL INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE VALENCIA

AUTORIZA la estancia de *Diana Aurora Ramírez Sánchez*, estudiante de Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología de la Salud de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa (Culiacán, México), en el laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos, para la realización del trabajo "Estudio de la capacidad de internalización de *Lactobacillus casei* BL23 y *Lactobacillus rhamnosus* GG in vitro utilizando líneas celulares epiteliales" durante un período de seis meses (03/05/2017 al 27/10/2017) dirigido por el Dr. Gaspar Pérez Martínez.

En este periodo, desarrollará experimentos orientados a comprender mecanismos de interacción entre las células bacterianas y los enterocitos humanos. Concretamente, se investigarán factores asociados a la endocitosis de bacterias por parte de líneas celulares y se construirán cepas de lactobacilos probióticos capaces de ser internalizadas que permitan el seguimiento y cuantificación de dicho proceso. Una aplicación de este estudio será el uso de estas bacterias como vectores epigenéticos en seres vivos. En dicho laboratorio se dirigirá el trabajo y se pondrá a su disposición los medios necesarios para dicha investigación. Los gastos de viaje, alojamiento y manutención, seguro médico, etc. no serán responsabilidad de este Instituto, debiendo presentar a su llegada la documentación que acredite tener todos los gastos cubiertos.

Y para que así conste, a petición de la interesada, expide la presente en Paterna (Valencia), a veintitrés de Enero de dos mil diecisiete.

Fdo: José M. Guillermo



P.A. Vicedirecto