Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

Puesta a punto de un método de *screening* para bacterias ácido-lácticas con potencial inmunomodulador.

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Isabella Gama Carnelli (186941)

Tutor: Inés Tiscornia

2020

Declaración de Autoría

Yo, Isabella Gama Carnelli, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el Trabajo final de carrera para Ingeniería en Biotecnología;

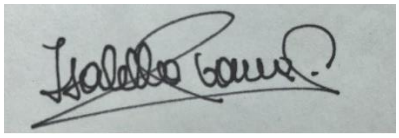
Cuando he consultado trabajos publicados por otros, lo he atribuido con claridad;

Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;

En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;

Cuando la obra se basa en trabajo realizado juntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;

Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Isabella Gama. C

Montevideo, 4 de marzo del 2020.

Dedicatoria

A mi familia y amigos.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecerle a mi tutora Inés Tiscornia, por su tiempo, dedicación, paciencia y por realmente comprometerse con este proyecto y ayudarme a sacarlo adelante.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay, en especial a Felipe Machado, Sebastián Rodríguez y Mariana Umpierrez por atender mis consultas y permitirme quedar hasta más tarde siempre que lo necesité.

Por último, pero no menos importante, a mi familia, mis amigos, y mis compañeros de trabajo, por el apoyo incondicional no solo durante la elaboración de este trabajo final, sino que también por su presencia y confianza durante toda la carrera.

¡Muchas gracias a todos!

Resumen:

El ser humano ha co-evolucionado con la microbiota normal desarrollando complejos mecanismos inmunológicos para monitorear y controlar este ecosistema. Las alteraciones de este equilibrio pueden conducir a patologías de tipo inflamatorio, autoinmune o infeccioso. Por lo tanto, la intervención sobre la microbiota comensal se ha planteado como una estrategia terapéutica y profiláctica mediante el enriquecimiento con probióticos. Se prevé que el tamaño del mercado de probióticos humanos superará los USD 5 billones para el año 2024 debido a sus perspectivas de aplicación en alimentos y bebidas, lácteos, productos no lácteos y productos cárnicos fermentados.

Durante el trabajo final de carrera de Leonardo Benech (Aislamiento, caracterización y selección de cepas bacterianas potenciales probióticas para ganado vacuno, 2017), se realizó la generación de una colección de cepas de bacterias ácido-lácticas, seleccionadas en base a diferentes criterios, para determinar su potencial aplicación como bacterias probióticas. Sin embargo, no se realizaron estudios que permitieran determinar la interacción y el efecto en el hospedero, por lo cual otro nivel de estudio complementario es requerido para poder determinar si realmente tienen potencial de aplicación como probióticos.

En el presente trabajo se desarrolló un modelo de *screening* en placa de 12 pocillos, empleando co-cultivos de células intestinales humanas HT-29 ($5x10^5$ células/pozo) con estas cepas de bacterias ácido-lácticas. Se analizaron cuatro condiciones simultáneamente por triplicado: basal, LPS, bacteria + LPS, Bacteria; en un periodo de incubación de 4 hs. Se demostró que el uso de HEPES 1% como agente regulador de pH permite llevar a cabo los co-cultivos fuera de estufa con 5% de CO_2, permitiendo simplificar el equipamiento necesario. Durante las 4 hs de incubación la viabilidad promedio para la condición basal, LPS y bacteria, se mantuvo por encima del 90%. La estimulación con 100 ng de LPS no afectó el recuento, ni la viabilidad celular. Además, se logró obtener ARN de alta pureza con una relación 260/280 nm de 2, con el tratamiento con DNAsaI se eliminaron los residuos de ADN genómico, y se diseñaron 10 juegos de primers (IL6, IL8, IL10, IL12, TNF-α , TGF-β , ACT-β, GAPDH, RPL27,

hBD1) los cuales pueden ser utilizados para la evaluación del perfil de citoquinas (IL6, IL8, IL10, IL12, TNF-α, TGF-β) expresadas.

Se desarrolló una plataforma de *screening* sencilla, que no requiere equipamiento sofisticado y que puede ajustarse a la evaluación de otros compuestos o investigación de mecanismos inflamatorios en células intestinales humanas. Este tipo de modelo es muy útil ya que permite hacer un cribado inicial, permitiendo así, reducir el número de ensayos en estudios posteriores, lo cual permite disminuir los costos globales de desarrollo. Se estimó el costo de evaluación por cepa en 87 USD, 4 veces menor al costo en un modelo animal.

Palabras clave:

BALs, Probióticos, cultivo celular, HT-29, *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium*, citoquinas, inflamación, inmunomodulación, LPS, ARN, ADNc, RT-qPCR.

Abreviaturas:

ABS: Absorbancia

ACT-β: Beta actina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia.

ARN: Ácido ribonucleico.

ATCC: del inglés, *American Type Culture Collection*

BALs: Bacterias ácido-lácticas

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad óptica

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

Fig.: Figura

GALT: tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (del inglés *Gut-associated lymphoid tissue*)

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GRAS: del inglés Generally *Regarded as Safe*

hs: Horas

IL-6: Interleuquina 6.

IL-8: Interleuquina 8.

IL-10: Interleuquina 10.

IL-12: Interleuquina 12.

hBD1: Beta defensina humana 1.

LPS: Lipopolisacárido.

MAMPs: del inglés *Microbe-Associated Molecular Patterns*.

MOI: del inglés *Multiplicity of Infection*

MRS: Man Rogose Sharpe.

NOD: receptores del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (del inglés *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*)

O.N.: *Overnight.*

PBS: buffer de fosfatos salino.

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

RPL 27: Proteína ribosómica 60 s L27.

SFB: Suero Fetal Bovino.

SCFA: Ácidos grasos de cadena corta (del inglés *short chain fatty acids).*

TGI: Tracto gastrointestinal.

TLR: receptor tipo toll (del inglés *Toll-like receptor*)

TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés *Tumor necrosis factor alfa*).

TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta (del inglés *Transforming growth factor beta*).

UFC: unidad formadora de colonias.

CEI: células intestinales epiteliales.

PRRs: receptores de reconocimiento de patrones (del inglés *Pattern recognition receptors*).

WHO: *World Health Organization.*

Índice

1. INTRODUCCIÓN 12
1.1 Microbiota, epitelio intestinal y sistema inmune 12
1.2 Disbiosis, proceso inflamatorio y patologías asociadas 14
1.3 Citoquinas asociadas a la inflamación 16
1.4 Bacterias ácido-lácticas y su roles como probióticos 18
1.5 Cultivos celulares como plataformas de *screening* 20
1.6 Real time PCR 20

2. OBJETIVOS 23
2.1 Objetivos general 23
2.2 Objetivos específicos 23

3. METODOLOGÍA 24
3.1.1 Cepas 24
3.1.2 Línea Celular 25
3.1.3. Medios de cultivo 25
3.1.4 Reactivos 27

3.2. Métodos 28
3.2.1. Estudio de las cepas a utilizar: pureza y viabilidad 28
3.2.2. Generación de bancos bacterianos 28
3.2.3. Descongelado de viales del banco de bacterias de trabajo 29
3.2.4. Estudio de las cepas a utilizar: curvas de correlación 29
3.2.5. Estudio de las cepas a utilizar: crecimiento en medio óptimo vs medio de co-cultivo 29
3.2.6. Descongelado de la línea celular HT-29 30
3.2.7. Subcultivo de la línea celular HT-29 30
3.2.8. PCR a tiempo final para detección de Micoplasma en cultivos de células HT-29 31
3.2.9. Generación de banco de trabajo de células HT-29 33
3.2.10. Prueba de crecimiento células HT-29 fuera de atmosfera 5% CO_2 33
3.2.11. Ensayo de co-cultivo de células HT-29 con bacterias ácido-lácticas 34
3.2.12. Extracción de ARN 35
3.2.13. Cuantificación de ARN 36
3.2.14 Eliminación de ADN genómico por tratamiento con DNAsaI 36
3.2.15. Confirmación de la eliminación de ADNg mediante PCR 18s y electroforesis en gel de agarosa 36
3.2.16. Transcripción Reversa 38
3.1.17. PCR real time 38

4. Resultados y discusión 39
4.1. Estudio de las cepas a utilizar: pureza y viabilidad 39
4.2 Estudio de las cepas a utilizar: curvas de correlación 40
4.3 Estudio de las cepas a utilizar: crecimiento en medio óptimo vs medio de co-cultivo 42
4.4 Detección de micoplasma en el banco de células HT-29 46
4.5 Puesta a punto de los co-cultivos 47
4.6 Puesta a punto de la extracción de ARN 53
4.7 Eliminación de ADN genómico en el ARN extraído 55
4.8 RT-qPCR 56
4.9. Perspectivas a futuro 65

5.0 Análisis económico.....67

6. CONCLUSIÓN.....70

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: 71

1. Introducción

1.1 Microbiota, epitelio intestinal y sistema inmune

La microbiota intestinal consiste en una comunidad de microorganismos que comprende bacterias de múltiples especies, hongos, protozoos, arqueas y hasta virus, que habitan dentro del tracto gastrointestinal (TGI) en sinergia mutua con el organismo hospedador (1). Las especies de bacterias dominantes en el tracto gastrointestinal son relativamente estables y comprenden principalmente cuatro filos: Bacteroides, Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria (2). El hospedador depende de su microbiota para contar con una amplia colección de enzimas digestivas y metabólicas que no están codificadas en su genoma, por ejemplo: enzimas capaces de degradar polisacáridos, fenoles y sintetizar vitaminas (3).

La microbiota del TGI interviene en el desarrollo intestinal normal, debido a su capacidad de influir en la proliferación y la apoptosis de células epiteliales del hospedador (4). Aunque las interacciones íntimas entre la microbiota y las células del hospedador son ampliamente desconocidas, un mecanismo importante parece involucrar ácidos grasos de cadena corta (*SCFA* por sus siglas en *inglés short chain fatty acids*), los cuales son resultado de la fermentación de polisacáridos no digeribles (fibras), con un importante papel antiinflamatorio. Los *SCFA* también sustentan la homeostasis intestinal en el colon normal, ayudando la reparación intestinal a través de la promoción de la proliferación y diferenciación celular (4).

Los metabolitos derivados de la microbiota intestinal pueden ser absorbidos e ingresar en las vías metabólicas endógenas y exógenas del hospedador, e influir en su fenotipo metabólico global (3). Esto genera un diálogo cruzado entre el genoma del hospedador y su microbiota, siendo esta capaz de influir fuertemente en el perfil de genes expresados, se postula que esto puede ocurrir a través de la modulación de los micro-ARNs (3,5).

La microbiota intestinal también desempeña un papel fundamental en el desarrollo y la función cerebral (6). Los genes codificados en la microbiota intestinal humana, denominados microbioma, son capaces de producir una amplia variedad de compuestos neuro activos (7). Investigaciones recientes indican que la microbiota tiene un gran impacto en la función cognitiva y los patrones de comportamiento fundamentales, como la interacción social y el

manejo del estrés, lo que le ha permitido al ser humano convivir en comunidades organizadas, y de esta forma poder prevalecer en el medio ambiente (7).

Dada la presencia de una enorme cantidad de microorganismos que reside tan cerca del tejido con mayor área superficial en el cuerpo (300 m^2), no es una sorpresa que el sistema inmune del intestino haya desarrollado un estricto control para optimizar la protección contra patógenos y al mismo tiempo evitar una respuesta inmune innecesaria (8).

El intestino es el sitio primario de interacción con antígenos exógenos y está asociado a varios tipos de órganos linfoides, a los que colectivamente se les refiere como *GALT* (por sus siglas en inglés *Gut-associated lymphoid tissue*). *GALT* es la colección más grande de tejidos linfoides del cuerpo, y consiste en: nódulos linfáticos mesentéricos, placas de Peyer, lamina propria y el epitelio (8). Estas cuatro estructuras se encargan de inducir respuestas inmunes protectoras frente a patógenos o tolerancia frente a microorganismos comensales y componentes dietarios inocuos (9) (Fig.1).

La interacción entre el hospedador y los microorganismos de la microbiota se da en la interfase de la mucosa, en donde las bacterias entéricas interactúan directamente con el epitelio, el cual, junto con la capa de mucus, representa una barrera interpuesta entre el contenido luminal y los compartimentos subyacentes (10).

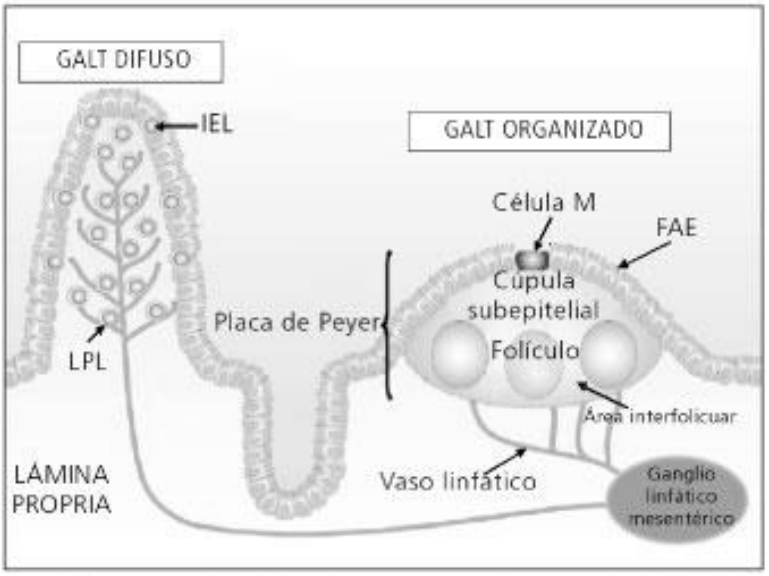


Figura 1| Representación de los tejidos que integran el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT): GALT organizado o inductor de la respuesta inmunitaria placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos) y GALT difuso o efector (linfocitos interepiteliales o LIE y linfocitos de la lámina propria o LPL). Extraído de (10).

El epitelio y las células linfoides están involucrados en el reconocimiento diferencial entre los microorganismos comensales y los patógenos. El epitelio intestinal es capaz de detectar antígenos bacterianos e iniciar y regular respuestas del sistema inmune innato y adaptativo. La señales de la bacteria pueden ser transmitidas a células inmunitarias adyacentes como macrófagos, células dendríticas y linfocitos, a través de moléculas expresadas en la superficie de las células epiteliales, como, por ejemplo, en el complejo mayor de histocompatibilidad I y II, receptores tipo toll (TLRs por sus siglas en inglés *toll-like receptors*) y los receptores del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD por sus siglas en inglés, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*)) (11-13).

El rol de los TLRs es reconocer diferentes patrones moleculares asociados a microrganismos (MAMPs por su siglas en inglés *Microbe-Associated Molecular Patterns*) como, por ejemplo: peptidoglicano, lipopolisacárido, flagelina, etc. El reconocimiento de antígenos microbianos por parte de los TLRs desencadena una respuesta del sistema inmune innato, seguido de la estimulación, se inicia una cascada de señales, llevando a la liberación del factor nuclear de cadena liviana kappa (NF-kB del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), el cual activa una variedad de genes que codifican para quimioquinas, citoquinas, proteínas de fase aguda, y otros efectores de la respuesta inmune (11).

Mediante el reconocimiento de estas señales, las células epiteliales son capaces de comunicarse con las células inmunitarias del GALT, por medio de la secreción de citoquinas y quimioquinas, entre las cuales se destacan: IL-6, IL-8, IL-12, TNF-α (13,14). La activación de los TLR por antígenos pertenecientes a la microbiota es una señal de inhibición de las reacciones inflamatorias, y contribuye al mantenimiento esencial de la homeostasis (11).

1.2 Disbiosis, proceso inflamatorio y patologías asociadas

Una microbiota saludable tiene una composición balanceada de las tres clases principales de bacterias, simbiontes, comensales y patobiontes (microorganismos benignos que en condiciones favorables tienen la capacidad de provocar determinadas patologías).

Se le denomina disbiosis a la pérdida de la homeostasis entre la microbiota y su hospedero, lo cual genera que se desencadene una respuesta adversa (Fig.2). En condiciones de disbiosis hay un cambio anti-natural en la composición de la microbiota, el número de simbiontes disminuye y/o aumentan los patobiontes (14). Esta pérdida de equilibro puede verse influenciada por varios factores, como la administración frecuente de antibióticos, la dieta, la edad, y factores tanto medioambientales como genéticos (15).

Las causas de la esto no están del todo claras, pero el resultado es una inflamación no específica, que puede predisponer a ciertas personas genéticamente susceptibles a enfermedades inflamatorias causadas por patógenos, que son organismos oportunistas (14).

La disbiosis se ha asociado con afecciones tan disímiles como el asma, enfermedades inflamatorias crónicas como la esclerosis múltiple, la artritis, el síndrome de colon irritable y además otras patologías como la obesidad, la demencia, la esteatohepatitis no alcohólica, y hasta la diabetes tipo 1 (16). Sin embargo, aún no se ha esclarecido si la disbiosis es la causa o una consecuencia de estas patologías. Estudios recientes empiezan a perfilar la asociación entre la disbiosis y las enfermedades gastrointestinales. Se ha demostrado que pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas presentan diferencias importantes en la microbiota en comparación con los individuos sanos (16).

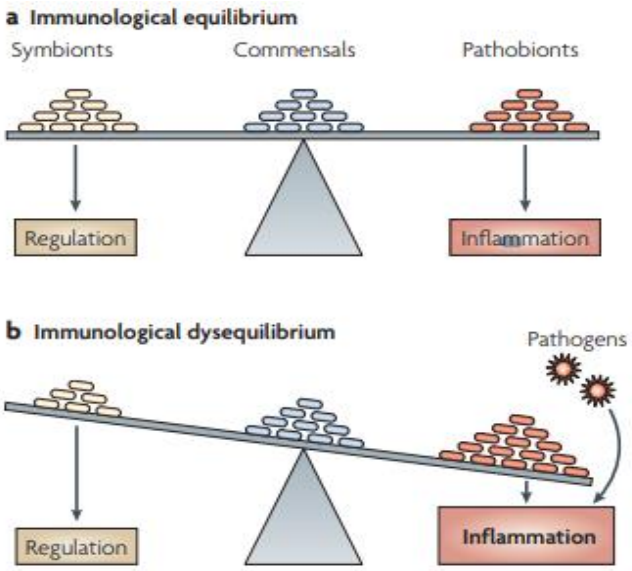


Figura 2| Desregulación inmunológica asociada a disbiosis de la microbiota. .a- Una microbiota saludable: simbiontes, comensales y patobiontes. b- En disbiosis el equilibrio se pierde y aumentan las bacterias patógenas, lo que desencadenan una respuesta inflamatoria aguda en el individuo. Extraído de (14).

El desarrollo de la disbiosis intestinal puede poner en juego procesos que activan la respuesta inmune inflamatoria del hospedador, creando el escenario perfecto para enfermedades inflamatorias crónicas (17).

1.3 Citoquinas asociadas a la inflamación

La respuesta inflamatoria del intestino comienza con el reconocimiento por parte de las células epiteliales, de uno o varios de los componentes del microorganismo, lo desencadena la activación de genes que codifican para citoquinas (11).

Las citoquinas son pequeñas proteínas secretadas por diferentes tipos celulares que tienen un efecto específico sobre las interacciones y comunicaciones entre células. Las citoquinas pueden actuar sobre las células que las secretan (acción autócrina), en células cercanas (acción paracrina) o, en algunos casos, en células distantes (acción endócrina). (18)

Algunas de las citoquinas con mayor importancia en los procesos inflamatorios son:

- **Factor de Necrosis Tumoral (TNF-α):** esta citoquina es muy conocida, ya que está involucrada en la regulación de un amplio espectro de procesos biológicos que incluyen la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, el metabolismo de los lípidos y la coagulación (19). Además, está implicada en otros eventos como la respuesta de fase aguda, inflamación sistémica y carcinogénesis (18). Puede ejercer funciones perjudiciales en el intestino, ya que niveles elevados de TNFα inducen o contribuyen a la formación de defectos de barrera epitelial, aumentando la permeabilidad intestinal, y de esta forma proporciona un punto de entrada para la invasión de bacterias patógenas (20).

- **Interleuquina 6 (IL-6):** esta citoquina está involucrada en la hematopoyesis, la estimulación del eje hipotálamo hipofisario-adrenal, la regulación de las respuestas de fase aguda, el metabolismo óseo y lipídico y en la maduración de las células B. Dado su papel en la regulación de las respuestas de fase aguda, esta citoquina está involucrada en los procesos inflamatorios, y se ha demostrado que es un buen

marcador molecular de inflamación, ya que se encontró una correlación significativa de la expresión de IL-6 con el grado actividad histológica. (21 -22)

- **Interleuquina 8 (IL-8):** es un poderoso quimiotáctico capaz de guiar a los neutrófilos al sitio de la infección, regula la producción de moléculas de adhesión e intensifica la infamación. Debido a esto es la citoquina más importante en el proceso inflamatorio intestinal. (19)

- **Interleuquina 12 A (IL-12 A):** es una citoquina proinflamatoria que actúa sobre las células T y las células *natural killers*, ante una infección bacteriana, promoviendo la diferenciación celular de las Th1 y Th2 (23).

- **Interleuquina 10 (IL-10):** es la citocina antiinflamatoria más importante en la respuesta inmune, juega un papel fundamental en el control de la inmunidad y procesos antiinflamatorios. Es un potente inhibidor de las citocinas proinflamatorias, incluyendo TNF-α, IL-1ß, IFN-γ, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, además, degrada el ARN mensajero encargado de la síntesis de estas citocinas (24). La IL-10 ha demostrado actividad protectora contra cáncer de colon, debido a que es capaz de suprimir la inflamación asociada al cáncer y la activación de la actividad inmunológica antitumoral (25).

- **Factor de crecimiento transformante beta (TGF-β):** actúa como un quimioatrayente de fibroblastos, monocitos y neutrófilos, suprime la proliferación y la diferenciación de las células T y B y limita la producción de IL-2, IFN-γ y TNF-α (24,26). Por lo tanto, tiene una gran papel en la inhibición de los procesos inflamatorios (26). Además, en estudios con ratones que carecen de TGF-ß, se demostró que lo animales sufren reacciones inflamatorias descontroladas (24).

1.4 Bacterias ácido-lácticas y su roles como probióticos

Las bacterias acidolácticas (BALs) constituyen un grupo de bacterias gram positivas agrupadas por características morfológicas, fisiológicas y metabólicas, esta clasificación fue iniciada en 1919 por Orla Jensen (13, 27). La descripción general de este grupo incluye bacterias gram positivas, no esporogénicas, sin motilidad, catalasa negativas, que pueden presentar morfología celular de bacilos o cocos, de longitud y grosor variable (0.5 - 0.8 µm). Forman parte del filo Firmicutes dentro un grupo muy heterogéneo con un bajo contenido G+C, el cual consiste en 6 familias y al menos 38 géneros, incluyendo *Lactobacillus, Lactococcus, Enterococcus, Bifidobacterium, Streptococcus, Oenococcus, Pediococcus y Tetragenococcus* (27).

La gran mayoría de las BALs carecen de actividad respiratoria debido a la falta de la enzima citocromo catalasa, por lo cual, en su mayoría son estrictamente fermentativas. El grupo se subdivide en homo y hetero fermentativas en función de su metabolismo (27). Las homo-fermentativas generan ácido láctico como único producto de la fermentación de carbohidratos, mientras que las hetero fermentativas pueden además generar etanol, dióxido de carbono y ácido acético (28).

Por lo general, las bacterias ácido-lácticas son asociadas a *hábitats* ricos en nutrientes, como pueden ser algunos productos alimenticios tales como: leche, carne, bebidas y vegetales; pero, algunas de estas bacterias también forman parte de la microbiota normal de la boca, el intestino y la vagina de los mamíferos, y se ha demostrado que estas bacterias poseen un bajo potencial patogénico, por lo cual, son consideradas microorganismos GRAS (del inglés *General Regarded As Safe*) (17, 27).

Las BALs han sido asociadas con un amplio rango de efectos inmunomoduladores en el hospedero, por ejemplo, cepas de *Lactobacillus plantarum* han demostrado funciones inmunomoduladoras y antiinflamatorias en cultivos de células HT-29 en diferentes condiciones experimentales (29). En este modelo celular, *L. rhamnosus* GG demostró que protege contra la muerte celular inducida por TNF-α, por medio de la activación de la vía celular Akt (30). En un estudio en células HT-29*, L. acidophilus* logró disminuir la actividad transcripcional de NF-kB y

como resultado demostró ser capaz de inhibir tres factores proinflamatorios IL-8, iNOS y PTGS-2 (31). *Enterococcus faecium* (cepa HDRsEf1) demostró que también es capaz de regular la respuesta inflamatoria en células HT-29 (32). En este mismo modelo celular, la cepa *Lactobacillus plantarum* BFE 1685 (aislada de heces de infantes) y la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus GG*, aumentaron los niveles de transcripción de TLR2 y TLR9, lo que sugiere que la estimulación de vías de señalización ocurre en el dialogo cruzado entre las bacterias probióticas y las células del epitelio intestinal (33). Evidencia reciente sugiere que esta interacción entre las BALs y el hospedero no está limitada a la interacción directa los receptores PPRs, y podría involucrar mediadores solubles derivados de las BALs (34, 35).

Varias cepas de BALs han sido categorizadas como probióticos, pero debe tenerse en cuenta que los potenciales beneficios a la salud de los efectos descritos solo pueden ser atribuidos a las cepas que han sido evaluadas en cada estudio y no puede generalizarse a todo el grupo (27).

Los probióticos son microorganismos que cuando son administrados en cantidad suficiente confieren un efecto benéfico para la salud del hospedador (35). Este beneficio puede deberse ya sea a un cambio en la composición o en la actividad metabólica de la microbiota, o modulación de la reactividad del sistema inmune (37). Los probióticos junto con las bacterias comensales que residen en el intestino son los principales estimuladores del sistema inmune y de la respuesta inflamatoria que evoca la producción de citoquinas, las cuales juegan un papel central en influenciar tanto el sistema inmune innato como el sistema inmune adaptativo (34). El mecanismo de acción de las cepas probióticas es multifactorial, específicamente en el contexto de las implicancias directas de su rol inmunomodulador en beneficios para la salud (29).

Los beneficios para la salud de los probióticos han generado grandes perspectivas de aplicación en diferentes sectores de la industria alimentaria, como los alimentos y bebidas funcionales, suplementos nutricionales, productos lácteos y aditivos para alimentación animal. Se prevé que el tamaño del mercado de probióticos humanos superará los 5 billones de dólares para el año 2024, debido a sus perspectivas de aplicación en alimentos y bebidas,

lácteos, productos no lácteos y productos cárnicos fermentados, a causa de la creciente búsqueda del consumidor de mejorar el sistema inmunitario y la salud digestiva (39).

1.5 Cultivos celulares como plataformas de *screening*

Los modelos celulares han ganado interés a lo largo de la comunidad científica, resultando en su amplio uso en la industria farmacéutica y cosmética. Ofrecen una alternativa al testeo *in vivo* en animales, permitiendo *screening* masivos a menores costos, sin los cuestionamientos éticos asociados al uso de modelos animales. (40)

Estos modelos celulares simplifican los sistemas biológicos a una plataforma de investigación más fácil y manejable. El establecimiento de métodos basados en cultivos celulares estandarizados y validados para la investigación toxicológica, metabólica, y otros campos de estudio, está potenciando el uso de modelos celulares intestinales debido a su simplicidad, fiabilidad y reproducibilidad. (40)

Los co-cultivo de probióticos con células eucariotas se han aplicado para evaluar la respuesta inmune en el sistema gastrointestinal del huésped (40). Este tipo de modelo in vitro puede ser muy útil como herramienta de investigación de los mecanismos celulares de los procesos inflamatorios (40). Estos modelos permiten evaluar la respuesta del epitelio intestinal, y de esta forma aportan información que puede ser significativa para la elucidación de las interacciones entre bacterias (patógenas o probióticas) y el epitelio (41).

Las plataformas *in vitro*, sencillas y bien diseñadas son una herramienta muy útil para el cribado inicial, el cual es fundamental en las primeras etapas de desarrollo (41).

1.6 Real time PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR fue desarrollada por Kary Mullis en los años 80, y poco después, se convirtió en una de las técnicas más utilizadas en los laboratorios, ya que es rápida, económica y sencilla (42). El nombre de la técnica proviene de la enzima que se utiliza en la reacción, la ADN polimerasa, la cual, es capaz de producir miles o millones de

copias de ADN in vitro. Cada una de las copias se utiliza de molde para el siguiente ciclo de amplificación, de aquí su nombre de reacción en cadena. Así, el molde original se copia en el primer ciclo, se multiplica por dos en el siguiente ciclo y así sucesivamente, para generar millones de copias al cabo de 30 o 40 ciclos. (42)

Los requerimientos de la PCR convencional, son básicamente: ADN molde (muestra), enzima ADN polimerasa, buffer para proporcionar el medio adecuado para la enzima, primers (delimitan la secuencia a amplificar) y los didesoxinuleótidos (bloques que conforman el ADN). Además, también de un equipo capaz de calentar y enfriar la reacción en cada ciclo de una manera precisa (termocilador). Mediante el empleo de este tipo de técnica, es posible amplificar copias de ADN procedentes de pequeñas cantidades de material biológico de muy diverso origen e incluso de baja calidad (42). La gran desventaja de esta técnica es que no permite cuantificar el producto, y además, luego de la amplificación, se debe realizar una electroforesis. Esto puede generar que los pequeños fragmentos de ADN formen aerosoles mediante el pipeteo y la manipulación, y contaminen el ambiente, los reactivos e incluso las muestras (42).

En el año 1993, la técnica tuvo un gran salto tecnológico, ya que Higuchi y colaboradores (43), publicaron las características de la primera PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)). Esta modificación de la técnica original permite el análisis de los productos amplificados a medida que transcurre la reacción (44). Esto se consigue incorporando una serie de fluorocromos que se activan con el producto amplificado, y son detectados por el propio instrumento en donde se desarrolla la reacción (44). También, se pueden incorporar oligonucleótidos marcados que se hibriden con la secuencia a amplificar, permitiendo un mayor grado de especificidad de la reacción. Además, mediante el uso de muestras de referencia, la qPCR permite determinar la cantidad inicial de ADN (44).

La técnica de PCR a tiempo real también puede utilizarse para la cuantificación de la expresión génica o la detección de genomas virales del tipo ARN, para ello, se requiere de un paso previo de retro-transcripicón, en el que las muestras de ARN son copiadas a ADN por medio de una

enzima llamada retrotranscriptasa, a esta técnica se le refiere como RT-qPC (44). Cuando se realiza una RT-qPCR con fines de investigación es necesario seguir las guías MIQE, las cuales detallan los aspectos claves a tener en cuenta para obtener información robusta.

Como un breve resumen estas guias establecen lo siguiente:

1- los primers diseñados debe validarse mediante curvas estándar con al menos cinco puntos (repetidos tres veces) (44).

2- Se debe utilizar ARN de buena calidad (integro y libre de inhibidores), si se utiliza SYBR green se debe eliminar el ADN genómico para evitar sobre cuantificación (44).

3- Por último, se deben relativizar los resultados utilizando un gen normalizado, el cual debe demostrar expresión estable en las diferentes condiciones evaluadas (44).

2. Objetivos

2.1 Objetivos general

Diseñar y poner a punto una plataforma screening de bacterias ácido-lácticas, mediante del co-cultivo con células de intestino humano (HT-29), y posterior cuantificación del perfil de citoquinas expresadas, utilizando la técnica de RT-qPCR.

2.2 Objetivos específicos

1- Estudiar las cepas a utilizar: evaluar pureza y viabilidad, realizar curvas de correlación.

2- Evaluar la viabilidad de las células HT-29 durante el co-cultivo ajustando los tiempos de incubación y la concentración de bacterias a inocular.

3-Poner a punto el protocolo de extracción de ARN de las células HT-29.

4- Determinar las citoquinas a evaluar y diseñar primers para su detección y cuantificación por RT-qPCR.

5- Validar los primers diseñados para la RT-qPCR.

3. Metodología

Todos los ensayos realizados en el presente trabajo fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Universidad ORT Uruguay, cumpliendo con todas las normas de bioseguridad.

3.1. Materiales

3.1.1 Cepas

Las cepas de bacterias estudiadas pertenecen a al banco de cepas aisladas y caracterizadas por Leonardo Benech en su trabajo final de carrera “Aislamiento, caracterización y selección de cepas bacterianas potenciales probióticas para ganado vacuno, 2017”.

Tabla 1: Cepas aisladas por Leonardo Benech, provenientes de fuentes de muestreo animal y vegetal, seleccionadas en base a criterios de actividad antifúngica y antimicrobiana contra patógenos humanos y animales, capacidad de formación de *biofilm*, tolerancia a condiciones gastrointestinales simuladas, y sensibilidad antibiótica, posteriormente las cepas aisladas fueron identificadas molecularmente mediante la secuenciación de la región codificante para el ARNr 16s.

Código	Cepa
M3.1.1	*Enterococcus faecium/ faecalis*
M2	*Enterococcus faecium/ faecalis*
P2	*Lactobacillus plantarum*
PE1	*Lactobacillus plantarum*
M.5.1	*Lactobacillus rhamnosus*
L5.2	*Enterococcus faecium/ faecalis*

Código	Cepa
PE2.2	*Enterococcus faecium/ faecalis*
M3.1	*Lactobacillus plantarum*
C.1.	*Lactobacillus plantarum*
GH3	*Lactobacillus plantarum*

3.1.2 Línea Celular

Para los co-cultivos se utilizó la línea celular Humana HT-29 (ATCC® HTB-38™) adquirida de ATCC.

3.1.3. Medios de cultivo

3.1.3.1 Medio líquido de cultivo de bacterias:

Caldo MRS

Tabla 2: Composición de medio de cultivo MRS.

Componente	Cantidad
Peptona	10 g
Extracto de Carne	8 g
Extracto de Levadura	4 g
D (+) Glucosa	20 g
Fosfato de hidrogeno di-potásico	2 g

Componente	Cantidad
Acetato de sodio trihidratado	5 g
Citrato tri-amonio	2 g
Sulfato de magnesio 7-hidratado	0.2 g
Sulfato de manganeso 4-hidratado	0.05 g
Agua destilada	csp* 1 L

* csp: cantidad suficiente para

pH final 6.2 ± 0.2 a 25°C

3.1.3.2 Medio sólido de cultivo de bacterias:

MRS Agar

Tabla 3: Composición de medio de cultivo MRS Agar.

Componentes	Cantidad
MRS	51 g
Agar	15 g
Agua destilada	csp* 1 L

3.1.3.3 Medio de congelado de bacterias:

Caldo MRS + 15 % glicerol.

3.1.3.4- Medio de subcultivo:

DMEM + 10 % Suero fetal bovino (descomplementado).

3.1.3.5 – Medio de congelado HT-29:

DMEM + 10 DMSO.

3.1.3.6 – Medio de co-cultivo:

DMEM + 10 % Suero fetal bovino (descomplementado) + 1% hepes.

3.1.4 Reactivos

Los reactivos químicos utilizados para la extracción de ARN se obtuvieron de Dorwil S.A (Buenos Aires, Argentina) y de Merck KGAa (Darmstadt, Alemania), el medio de cultivo para bacterias provenía del proveedor Oxoid Limited (Inglaterra). Los reactivos de cultivo celular HEPES, Gentamicina, Tripsina-EDTA, LPS, se obtuvieron de Sigma Aldrich (una subsidiaria de Merck KGAa), el medio de cultivo DMEM y suero fetal bovino de Capricorn Scientific GmbH (Ebsdorfergrund, Alemania). Los reactivos utilizados en las técnicas de biología molecular Taq polimerasa, buffer Taq 10x, dNTPs, Oligo dT, enzima RT, buffer RT 5x, DNAsaI y buffer DNAsaI y Syber Green se obtuvieron de Thermo Fisher SCIENTIFIC (Massachussets, Estados Unidos).

3.2. Métodos

3.2.1. Estudio de las cepas a utilizar: pureza y viabilidad

De cada vial se tomó una anzada y se estrió en placas de petri con medio MRS agar estéril. Las placas fueron incubadas a 37°C en condiciones de microaerofilia (jarra de vela). Una vez se obtuvieron colonias visibles, se comprobó que cada placa solo presentara colonias con un tipo de morfología, pudiendo variar la morfología entre las placas. De cada una de las placas se picó una colonia aislada y se realizó tinción de gram.

Luego de comprobar la pureza de los viales congelados, se procedió a verificar que las bacterias aún conservaban su viabilidad y capacidad de crecimiento. Para ello, de cada placa de Petri se picó una colonia aislada, y se inoculó en un tubo cónico con 12 mL de caldo MRS (80% de la capacidad del tubo ocupada para disminuir la columna de aire), los tubos se incubaron overnight en estufa a 37°C, se utilizó un tubo con MRS estéril sin inocular como control.

Luego de 12 horas se verificó turbidez y/o formación de pellet como indicadores de crecimiento bacteriano.

3.2.2. Generación de bancos bacterianos

Los bancos de bacterias fueron generados a partir de colonias aisladas en placas de Petri con medio MRS agar, de cada cepa se picó una colonia aislada y se inoculó en un tubo cónico con 12 mL de caldo MRS estéril. Los tubos fueron incubados *overnight* en estufa a 37°C. Luego del período de incubación, los tubos se centrifugaron a 3000 g y 4 °C por 5 minutos, y se descartó el sobrenadante. El pellet bacteriano fue resuspendido en 12 mL PBS 1x estéril, para lavar las bacterias y eliminar restos de medio. Posteriormente, los tubos se centrifugaron otra vez a 3000g y 4°C por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, y el pellet de cada tubo fue resuspendido en 2 mL de medio de congelado de bacterias (Caldo MRS +15 % de glicerol). Los 2 mL de cada tubo fueron alicuotados en crio tubos a razón de 1mL/crio tubo,

obteniéndose así dos viales por cepa, de los cuales uno se conservó a -20 °C (banco de trabajo) y el otro a -80°C (banco maestro).

3.2.3. Descongelado de viales del banco de bacterias de trabajo

Para descongelar las bacterias se tomó 20 µl de cada crio tubo conservado a -20 °C y se inoculó en tubos cónicos con 12 mL de caldo MRS estéril (80% de la capacidad del tubo ocupada para disminuir la columna de aire), los tubos se incubaron a 37°C por 12 horas. Posteriormente, se realizó un repique del descongelado, para ello se tomó 20 µl de cada tubo, y se inoculó nuevos tubos con caldo MRS, los cuales fueron incubados a 37°C por 12 horas.

3.2.4. Estudio de las cepas a utilizar: curvas de correlación

Para realizar las curvas de correlación, se partió de un cultivo bacteriano *overnight* en medio líquido. Las bacterias se lavaron tres veces, y posteriormente llevaron a cabo diluciones seriadas en PBS 1x estéril, empleando un factor de dilución de dos en dos ($^1/_2$, $^1/_4$, $^1/_8$, $^1/_{16}$, $^1/_{32}$), se midió la absorbancia a una longitud de onda (λ) de 595 nm, y se seleccionó aquella dilución con una absorbancia entre 0.8- 1. Posteriormente, se prepararon diluciones en serie, las cuales fueron sembradas en placas de Petri. Se utilizó una micropipeta para sembrar por cada dilución tres gotas 10 µl de volumen, y las placas se incubaron hasta obtener colonias visibles. Tras la incubación, se contaron las colonias en cada gota, y el recuento se calculó a partir de un promedio de las colonias contadas en la dilución con 20 colonias o más por gota. Con los datos obtenidos se realizó una regresión lineal y se obtuvo la ecuación de la recta para las cepas ensayadas.

3.2.5. Estudio de las cepas a utilizar: crecimiento en medio óptimo vs medio de co-cultivo

Se utilizó una placa de 48 pocillos, en la cual se sembró 300 µL de MRS en 15 pocillos y en otros 15 se sembró 300 µl de medio de co-cultivo. Por cada bacteria se inocularon 3 pocillos

con MRS y 3 pocillos con medio de co-cultivo, el inóculo utilizado fue de 15 µl (% 5 v/v) de suspensión bacteriana lavada y resuspendida en PBS 1X. La placa se colocó en el equipo infinite 200pro™ y se incubó a 37°C por 12 horas, el equipo se programó para medir la absorbancia a 600 nm cada 30 minutos. Una vez transcurridas las 12 horas de incubación, se procesaron los datos obtenidos y se graficó la absorbancia en función del tiempo, construyéndose así las curvas de crecimiento.

3.2.6. Descongelado de la línea celular HT-29

El protocolo desarrollado para el descongelado de células se describe a continuación.

Se descongeló rápidamente un vial de la línea celular HT-29 (ATCC® HTB-38™) mediante agitación suave en un baño de agua termostatizada a 37°C, evitando que los bordes de la tapa del tubo entren en contacto con el agua. Luego, se agregó 500 µl de medio DMEM termostatizado a 37°C, se homogeneizó suavemente y se transfirió el contenido del vial a un tubo cónico con 4 mL de medio DMEM termostatizado. Las paredes del criotubo se lavaron con 500 µl de DMEM y se agregaron al tubo cónico, el cual se centrifugó 5 minutos a 250 g. Posteriormente, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet celular en 1 mL del medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino, y se tomó una alícuota de 20µl para realizar recuento celular (por duplicado) en cámara de Neubauer. Una vez realizado el recuento celular, se calculó y transfirió el volumen de la suspensión celular a inocular en una botella de cultivo T-25 con 5 mL de DMEM + 10% SFB. La botella fue incubada a 37° C en estufa con atmósfera de 5% de CO_2.

3.2.7. Subcultivo de la línea celular HT-29

Una vez que el cultivo alcanzó 80% de confluencia, se descartó el medio de cultivo y se lavó la monocapa celular utilizando PBS 1X estéril. Posteriormente, se adicionaron 20 µl/cm^2 de tripsina-EDTA y la botella fue incubada por 6 minutos a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se observó el cultivo en el microscopio para verificar que las células se hayan despegado. La acción de la tripsina fue neutralizada empleando DMEM + 10% SFB

(adicionando el doble del volumen de tripsina utilizado) y se homogeneizó suavemente repetidas veces, para deshacer aglomerados de células. Luego, se tomó una alícuota de 20µl y se adicionaron 20µl de azul de tripán, se sembraron 10 µl en cámara de Neubauer y se realizó el recuento celular.

En base al recuento celular obtenido y el objetivo de este paso de subcultivo, mantenimiento del cultivo o expansión del número de células, se seleccionó la botella de cultivo (T-25 o T-75), y se incorporó el volumen de medio de cultivo necesario. Luego, se adicionó el volumen de suspensión celular correspondiente al repique y se rotuló la botella detallando línea celular, fecha, Nro. de pasaje, medio de cultivo y proporción de repique. Por último, se incubó la botella a 37°C en estufa con atmósfera de 5% de CO_2.

3.2.8. PCR a tiempo final para detección de Micoplasma en cultivos de células HT-29

El primer paso para llevar a cabo fue la extracción del material genético a amplificar en la PCR. A partir un repique de células HT-29 con al menos 72 horas, se tomó una alícuota de 1 mL de sobrenadante raspando un poco la botella para obtener algunas células eucariotas y poder detectar Micoplasma adsorbido en la membrana. Posteriormente la alícuota se centrifugo a 13500g por 5 minutos, y luego se descartó el sobrenadante. El pellet celular fue resuspendido en 1 mL de PBS 1x estéril. Otra vez, se centrifugaron las células 5 minutos a 13500g, el sobrenadante se descartó, y el pellet se resuspendió en 200 µl de PBS 1x estéril, y se centrifugó a 13500g. Se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 100 µl de PBS 1x empleando vortex, y se incubó a 95°C por 15 minutos. Luego de transcurrido el tiempo de incubación, la muestra se homogeneizó utilizando un vortex, y se tomó una alícuota de 2 µl para realizar la PCR.

Para preparar los mix de reacción se utilizó la receta que se detalla a continuación.

Tabla 4: Mix de PCR (1 x)

Componentes	Muestra sin control interno	Muestra con control interno
dNTPs	1 µl	1 µl
Myco-5’	0.5 µl	0.5 µl
Myco-3’	0.5 µl	0.5 µl
10× PCR buffer	2.5 µl	2.5 µl
$MgCl_2$	1 µl	1 µl
Agua Mili Q estéril	18.3 µl	17.3 µl
Taq Polimerasa	0.2 µl	0.2 µl
Control interno de micoplasma	-	1 µl

En la tabla 5 continuación se detalla el ciclado utilizado.

Tabla 5: Ciclado PCR micoplasma

Paso del ciclado	Condiciones	Repeticiones
Pre-desnaturalización del ADN	95°C 1 minuto	1
Desnaturalización del ADN	95°C 30 segundos	40
Hibridación	58°C 30 segundos	40
Extensión	72°C 45 segundos	40
Extensión final	72°C 7 minutos	1

3.2.9. Generación de banco de trabajo de células HT-29

Para generar un banco de trabajo de células HT-29, se partió de un criovial del banco maestro y se descongelaron de acuerdo con el protocolo de descongelado del laboratorio. Una vez alcanzado el 80-90% de confluencia de una botella T-75 en fase de crecimiento exponencial, se lavaron y tripsinizaron las células, se tomó una alícuota de 20 µl para recuento en cámara de Neubauer. La suspensión celular fue trasferida a un tubo cónico y centrifugada a 200 g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, el pellet celular fue resuspendido en medio de congelación, el volumen de medio utilizado corresponde al volumen final necesario para ajustar la concentración celular a $2.0x10^6$ células/mL. La suspensión celular se alicuotó a razón de 1mL/ crio tubo, y estos se almacenaron a -80°C utilizando un sistema de enfriamiento progresivo de 1°C por minuto (Nalgene), y a las 24 horas se trasfirieron al tanque de nitrógeno líquido.

3.2.10. Prueba de crecimiento células HT-29 fuera de atmosfera 5% CO_2

Las células HT-29 de una botella de cultivo celular T-25 se lavaron, despegaron y se resuspendieron en medio de cultivo. En una placa de 12 pocillos se sembraron $2.5x10^5$células/pozo en medio DMEM + 10% SFB y se incubaron 48 horas a 37°C en estufa con atmosfera de 5% de CO_2. A las 48 hs, la monocapa celular de uno de pozos se lavó, tripsinizó, se realizó el conteo celular en cámara de neubauer y se calculó su viabilidad, El medio de los restantes 11 pocillos fue descartado, las células fueron lavadas con PBS 1x estéril, y se adicionó 1 mL/pozo de DMEM +10% SFB + 1%HEPES. Posteriormente, las células fueron incubadas a 37°C en estufa sin atmósfera de CO_2 por 24 horas. Se realizaron muestreos a las 4, 18 y 24 horas, en los cuales se contaron las células y se calculó la viabilidad.

3.2.11. Ensayo de co-cultivo de células HT-29 con bacterias ácido-lácticas

A partir de una botella T-25 con una monocapa celular con confluencia ≥80 %, las células fueron lavadas, tripsinizadas y contadas utilizando azul de tripán y cámara de Neubauer. Posteriormente, se calculó el volumen de resuspensión necesario para obtener $2.5x10^5$celulas/mL en un volumen final de 13 mL, se realizó la dilución y se sembró 1mL/pocillo, es decir $2.5x10^5$células/pocillo. Las placas fueron incubadas por 48hs a 37°C con atmósfera de 5% de CO_2.

Paralelamente al sembrado e incubación de las células HT-29 en placa de 12 pocillos, las bacterias fueron descongeladas siguiendo el protocolo de la sección 3.2.3. Luego fueron lavadas 2 veces, y resuspendidas en PBS 1x estéril. Se midió la absorbancia de las suspensiones bacterianas en PBS 1x, y los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en la curva de correlación de cada cepa. A su vez, los valores de UFC/mL obtenidos se utilizaron para calcular las diluciones necesarias para obtener la MOI (del inglés, Multiplicity of Infection) seleccionada en un volumen de 100 µl.

Luego de 48 hs de incubación, el medio de cultivo de las placas fue descartado y cada pocillo fue lavado con PBS 1x estéril y se sembró medio de co-cultivo, el cual varía según la condición a evaluar, 1000 µl/pocillo (basal), 900 µl/pocillo (bacteria), 900 µl/pocillo (LPS) y 800 µl/pocillo (bacteria +LPS). Posteriormente, se sembró 100 µl/pozo de la dilución de bacterias, 100 ng/pozo de LPS + 100 µl/pozo de suspensión de bacteria, o 100 ng/pocillo de LPS según corresponda. Las placas fueron incubadas en condiciones de microaerofilia por 4 horas. Posteriormente, el medio de cultivo se descartó, al monocapa celular de cada pozo fue lavada y tripsinizadas y el contenido de cada pocillo (300 µl) fue trasferido a tubos eppendorf, los cuales fueron centrifugados 5 minutos a 200g. Se descartó el sobrenadante, y el pellet fue congelado utilizando nitrógeno líquido, y los tubos se almacenaron inmediatamente en freezer a -80°C hasta la extracción de ARN.

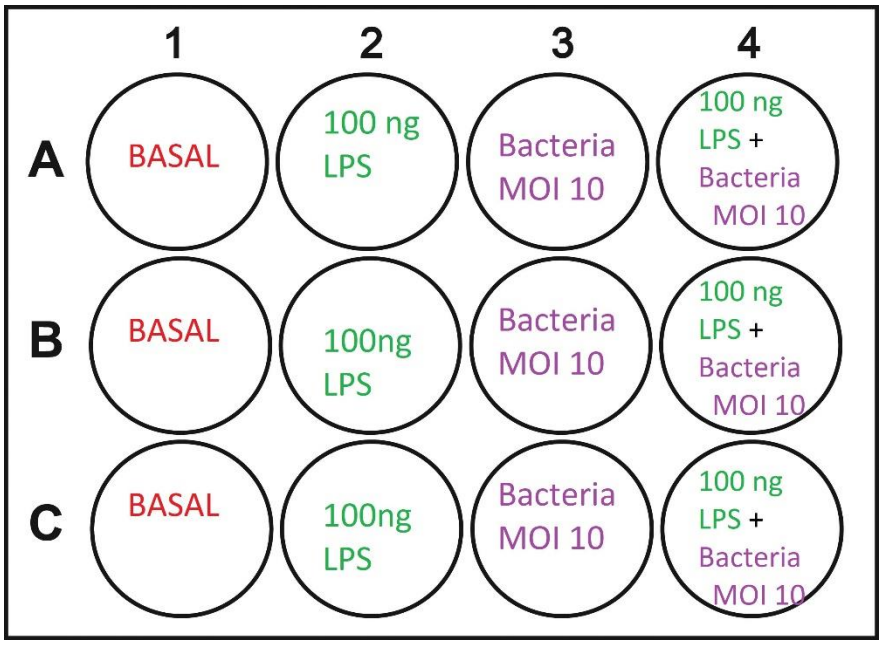


Figura 3| Modelo de sembrado de las placas de 12 pocillos, las cuatro condiciones evaluadas se sembraron por triplicado.

3.2.12. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizó el solvente orgánico TRIzol® y se evaluaron dos protocolos de extracción. Primero se llevó a cabo el protocolo descrito en las instrucciones del fabricante de dicho solvente y, además, el protocolo elaborado por Zaghi B. (51).

Protocolo del fabricante: se toma la muestra de células y se le adiciona 1 mL de TRIzol® para generar la lisis celular, el tubo se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego, se le adiciona 0.2 mL de cloroformo por cada mL de TRIzol® utilizado, el cloroformo permite la formación de un gradiente, que luego del centrifugado genera 3 fases: acuosa (ARN y sales), interfase (ADN) y fase orgánica (fenoles, proteínas y lípidos). Se toma la fase acuosa y se le añade isopropanol y se centrifuga para precipitar el ARN. Posteriormente el isopropanol es descartado y el pellet se lava con etanol 75% para eliminar las sales que precipitaron junto con el ARN. Se descarta el etanol, el tubo se deja secar, y luego, el pellet se resuspende en agua libre de RNAsas.

La modificación de Zaghi B agrega un segundo paso de cloroformo antes de la precipitación con isopropanol, y luego de esta, se realiza una re-precipitación con acetato de sodio 3M pH 5.2, etanol 100 % y agua libre de RNAsas, que se congela ON a -80°C. Al siguiente día la

muestra se descongela, se centrifuga, se descarta el sobrenadante. El pellet se lava con etanol 75%, y luego se resuspende en agua libre de RNAsas.

3.2.13. Cuantificación de ARN

La Concentración de ARN se cuantificó en el equipo infinite 200pro™, determinando la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm frente a un blanco de agua de grado molecular. Asimismo, se consideró la relación A260/280 para estimar el grado de pureza de las muestras de forma que un valor superior a 2 se consideró indicador de contaminación con ADN genómico e inferior a 1.6 se consideró indicativo de contaminación con fenol y/o proteínas.

3.2.14 Eliminación de ADN genómico por tratamiento con DNAsaI

Una vez cuantificado el ARN las muestras fueron tratadas con DNAsaI I, para eso se agregó a cada tubo 1 µl de enzima y 1 µl de buffer DNAsaI I 10 x, y posteriormente los tubos fueron incubados en un bloque térmico a 37 °C por 30 minutos. Una vez finalizado el tratamiento las muestras fueron conservadas a -80°C hasta que se llevó a cabo la retro transcripción.

3.2.15. Confirmación de la eliminación de ADNg mediante PCR 18s y electroforesis en gel de agarosa

Para la confirmación de la eliminación del ADNg se realizó una PCR a tiempo final del gen 18s, utilizando alícuotas pre y post tratamiento con DNAsaI, posteriormente los productos de la PCR se sembraron un gel de agarosa 1.5% y se corrieron 30 minutos a 100v.

Para esta PCR se utilizaron primers que se encontraban disponibles en la colección del laboratorio. Los primers utilizados fueron los siguientes: Fw18sA4 - 5' ACC TGG TTG ATC CTG CCA GT 3' y Rv18sA4 - 5' TCT CAG GCT CCC TCT CCG GA 3', los cuales aplifican un producto de aproximadamente 500 pb.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Tabla 6 : Mix de reacción para la PCR a tiempo final de 18s.

Componentes	**Volumen (µL)**
dNTPs (10mM)	3
Fw18sA4 (10µM)	1.5
Rv18sA4 (10µM)	1.5
10× PCR buffer	2.5
$MgCl_2$	1
Agua Mili Q estéril	14
Taq Polimerasa	1

Tabla 7: condiciones de cilado de la PCR 18s.

Paso del ciclado	**Condiciones**	**Repeticiones**
Pre-desnaturalización del ADN	95°C 1 minuto	1
Desnaturalización del ADN	95°C 30 segundos	40
Hibridación	56°C 1 minuto	40
Extensión	72°C 3 minutos	40
Extensión final	72°C 7 minutos	1

3.2.16. Transcripción Reversa

Para la síntesis de ADN copia (ADNc) se utilizó la enzima RevertAid Reverse Transcriptase, el siguiente protocolo fue llevado a cabo.

En un tubo estéril se mezcló 500 ng de ARN (5µl) con 1µl de oligo dT y cantidad suficiente de agua grado molecular para alcanzar un volumen de 13 µl. Se incubó a 65°C por 5 minutos y luego las muestras fueron enfiadas en hielo por 2 minutos. En otro tubo se preparó el mix de reacción con 4 µl de buffer RT, 2 µl de dNTPs 10mM c/u y 1 µl de enzima RT, y el contenido de este tubo se transfirió al primer tubo, se incubó 1 hora a 42°C y luego la enzima RT se inactivó por calor a 70°C por 10 minutos. Las muestras de ADNc se conservaron a -20°C.

3.1.17. PCR real time

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 10µl, el mix de reacción contenía 5.0 µl de 2x SYBER Green PCR Máster Mix, 1 µl de ADNc , 0.3 µl de cada primer (10 mM c/u) y 3.4 µl de agua libre de RNAsas. Los controles negativos sin molde consistieron en primers, agua y 2X SYBER Green Máster Mix, que se incluyeron para cada set de primers en cada corrida.

Las condiciones de ciclado incluyeron una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de: desnaturalización (10 s a 95°C), annealing (20s a 60°C) y extensión (15 s a 72°C). Para la curva de melting se programó el equipo para que midiera continuamente la absorbancia en un rango de 60 a 95 °C con una velocidad de calentamiento de 0.11°C/s. Par validar los primers se realizaron diluciones seriadas del ADNc en base 10: 1/20, 1/200, 1/2.000 y 1/20.000

4. Resultados y discusión

4.1. Estudio de las cepas a utilizar: pureza y viabilidad

Se descongelaron las 10 cepas detalladas en la tabla 1. Para ello, se tomó una anzada de cada crio tubo y se estrió en placas de petri con medio MRS agar, las placas se incubaron 48 horas a 37°C en jarra de vela (microaerofilia). Las cepas PE1, M2, P2, M.5.1 y M.3.1.1 fueron las únicas que presentaron crecimiento, de cada placa se picó una colonia aislada y se realizó una tinción de gram.

Como se observa en la figura 4, todas las cepas presentaron coloración violeta, lo cual indica que son bacterias gram positivas. Las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* M.51, P2 y PE1 presentaron morfología de bastones, para las cepas M2 y M3.1.1 del género *Enterococcus,* se observó morfología de pequeñas esferas. Se confirmó que las cepas coinciden con la morfología y coloración esperada. Sin embargo, esto no implica la ausencia de contaminaciones, ya que puede existir contaminación cruzada con otras cepas con la misma morfología y coloración. Además, debe tenerse en cuenta que el descongelado se realizó en MRS, el cual es un medio selectivo para BALs, que contiene acetato de sodio, el cual, inhibe el crecimiento de muchos microorganismos. Por lo tanto, para confirmar la pureza de los viales, estos se deberían haber sembrado en un medio enriquecido que pudiera dar lugar crecimiento a hongos u otras bacterias.

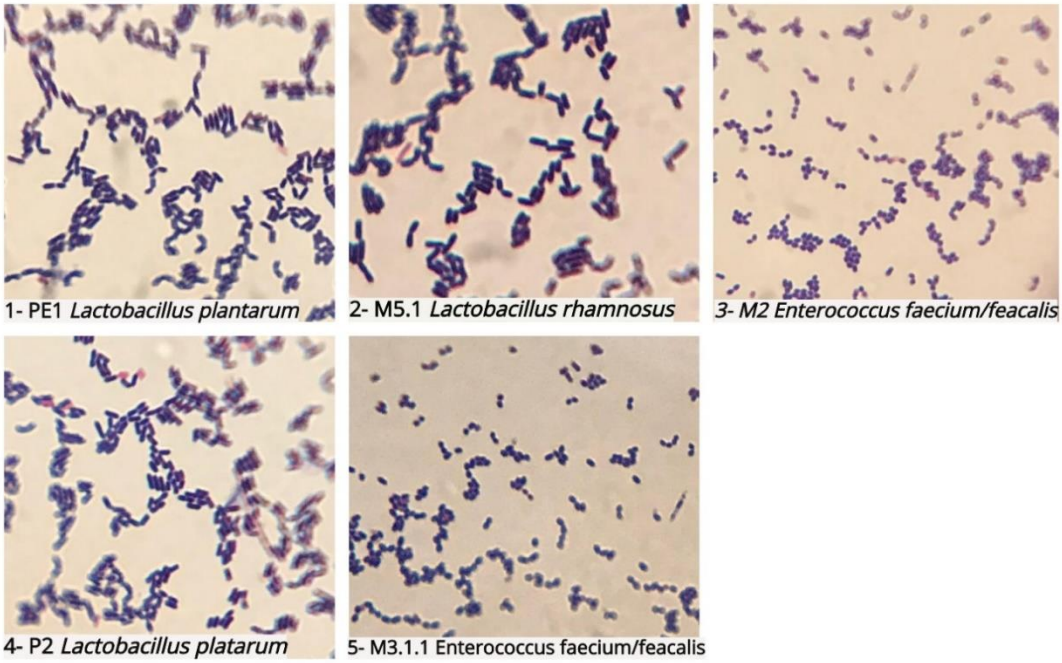


Figura 4| Imágenes de microscopía óptica (aumento 100X) de: 1-*Lactobacillus plantarum* PE1 2-*Lactobacillus rhamnosus M.5.1, 3- Enterococcus faecium/faecalis M2, 4- Lactobacillus plantarum, 5 M3.1.1 Enterococcus faecium/faecalis.* Se realizó tinción de gram y las muestras se visualizaron empleando aceite de inmersión.

4.2 Estudio de las cepas a utilizar: curvas de correlación

Con el objetivo de contar con una herramienta sencilla y rápida que permitiera determinar las UFC/mL en una suspensión, se construyeron curvas de correlación. Se graficaron los valores de absorbancia medidos para una serie de diluciones en base dos ($^1/_2$, $^1/_4$, $^1/_8$, $^1/_{16}$, $^1/_{32}$), en función de las colonias contadas en placas de petri en las que fueron sembradas utilizando el método de la gota, diluciones seriadas en base diez, preparadas a partir de una de las diluciones en base dos. A todos los gráficos obtenidos se les agregó la línea de tendencia con su ecuación ($y = a.x + b$) y el coeficiente de determinación R^2, todas las curvas se realizaron por duplicado.

Como se visualiza en la figura 2, para las cinco cepas, valores mayores de absorbancia se correspondieron con recuentos bacterianos más altos, indicando una proporcionalidad directa entre la absorbancia y el número de UFC. Además, en todas las curvas el coeficiente de determinación R^2 fue mayor a 0.99, indicando una tendencia lineal de los datos dentro de la

curva. Para la determinación del recuento bacteriano se realizó un promedio de las ecuaciones obtenidas para cada cepa.

La cepa P2 (*Lactobacillus plantarum*) alcanzó los valores de recuento y absorbancia más altos, seguida de M.5.1 (*Lactobacillus rhamnosus*), M.3.1.1 (Enterococcus faecium/faecalis) y M2 (Enterococcus faecium/faecalis) respectivamente; la cepa PE1 obtuvo el recuento más bajo, pero valores de absorbancia relativamente altos, esto puede deberse a su morfología y tamaño.

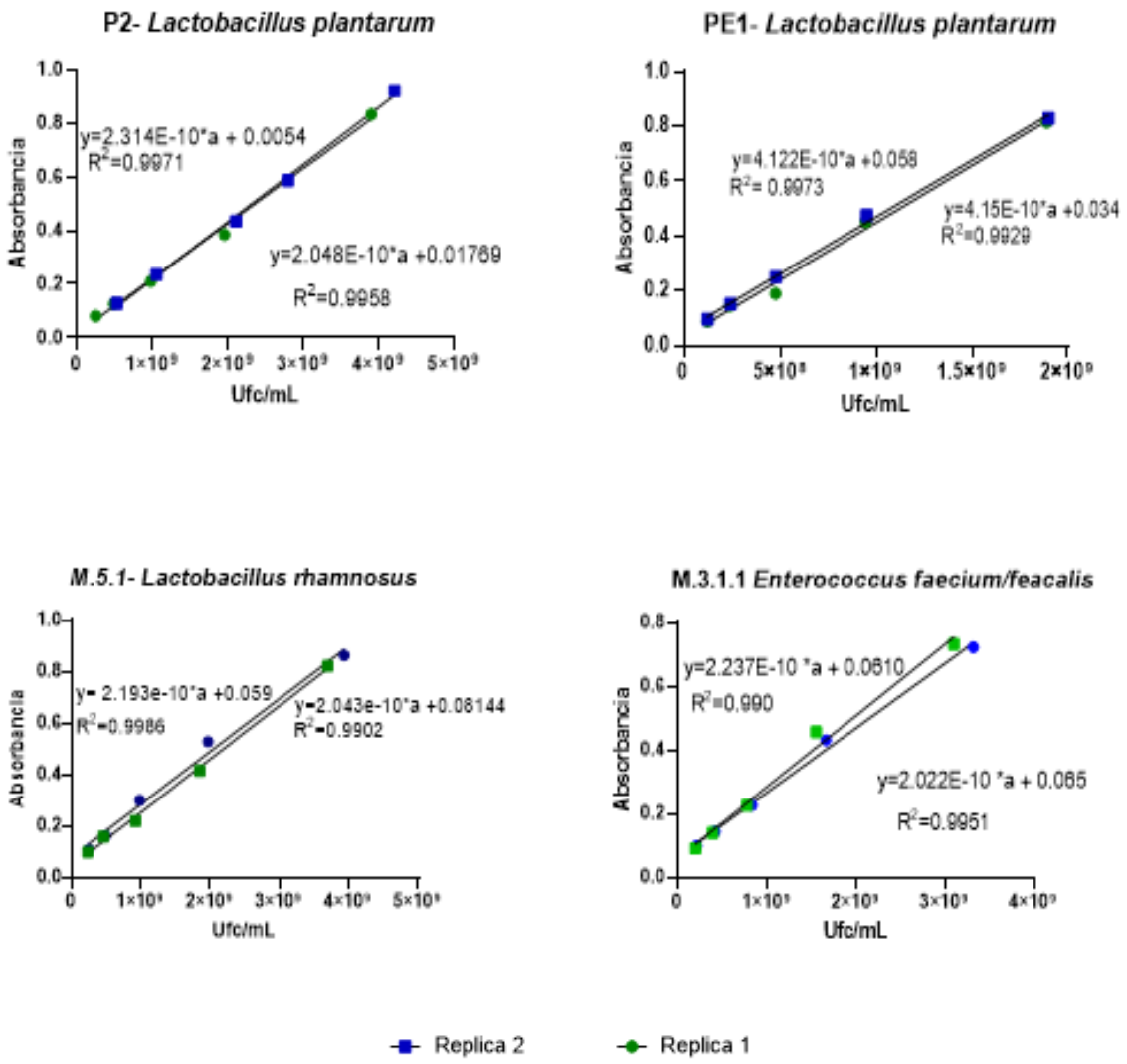


Figura 5 | Curva de correlación de absorbancia a 595 nm y recuento (UFC/mL) para las cepas P2, PE1, M.5.1, M.3.1.1, Cada curva se realizó por duplicado.

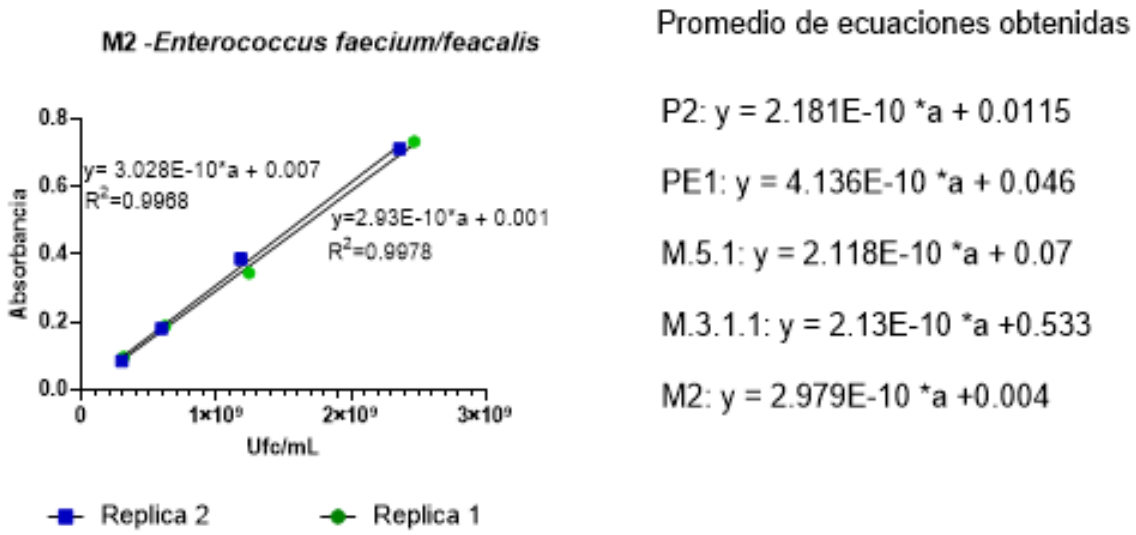


Figura 5 cont. | Curva de correlación de absorbancia a 595 nm y recuento (UFC/mL) para la cepa M2. Cada curva se realizó por duplicado.

4.3 Estudio de las cepas a utilizar: crecimiento en medio óptimo vs medio de co-cultivo

Con el objetivo de evaluar el posible impacto del medio de co-cultivo en la capacidad de crecimiento de las BALs, se realizaron curvas de crecimiento en medio óptimo (caldo MRS) y en medio de co-cultivo (DMEM alto en glucosa + 10 SFB + 1% Hepes), se sembró por triplicado cada bacteria en MRS y medio de co-cultivo, la absorbancia se midió cada 30 min por 12hs, los resultados obtenidos se graficaron y se presentan en la figura 6.

En MRS todas las cepas presentaron curvas de crecimiento sigmoidales con fase *lag*, por lo cual todas requirieron de una fase de adaptación, en la que su crecimiento fue lento debido a que en este lapso las células comienzan a prepararse para duplicación, lo cual requiere que sinteticen moléculas necesarias para llevar a cabo este proceso. Las cepas de *Enterococcus* presentaron fases lag más cortas que las cepas de *Lactobacillus*; M2 y M.3.1.1 (*Enterococcus*) presentaron una fase lag de aproximadamente 2 hs, mientras que las cepas de *Lactobacillus* (M.5.1, PE1, P2) la fase lag fue de 5 hs.

La fase crecimiento exponencial en medio MRS fue variada, al igual que en la fase lag, las cepas del género *Enterococcus* tuvieron una fase exponencial más corta de aproximadamente 1.5 h, mientras que las cepas de *Lactobacillus* PE1 y M.5.1 fue de 2.5 hs, para P2 la fase de

crecimiento exponencial comenzó a las 8 hs y se extendió hasta 12 hs. Como se observa en la figura 6, solo la cepa M2 alcanzó la fase estacionaria, las cepas M3.1.1 (*Enterococcus),* PE1 (*L. Plantarum*) y M.5.1(*L. rhamnosus*) comienzan a reducir su velocidad de crecimiento y las 12 hs parecería que comienzan a entrar en la fase estacionaria; La cepa P2 (*L. plantarum*) a las 12 hs continúa en fase de crecimiento exponencial.

Las curvas de crecimiento obtenidas en MRS son similares a las reportadas en bibliografía, donde para los lactobacillus la fase lag se da entre 3-5 hs, la fase exponencial entre 3-7 hs y la fase estacionaria comienza a las 12 hs y en algunos casos se alcanza a las 24 hs; para el caso de los *Enterococcus* crecidos en MRS la bibliografía reporta fase estacionaria entre 1-2 hs, crecimiento exponencial entre las 2-5 hs, y comienzo de la fase estacionaria a las 7 hs (45-49).

En medio de co-cultivo ninguna de las cepas presentó fase lag, pero la fase de crecimiento exponencial es muy corta, y luego se alcanza una fase de meseta, donde se retrasa el crecimiento, esto puede deberse a que los nutrientes se agotan rápidamente, algunas de las bacterias luego de esta meseta presentan una nueva fase de crecimiento. M3.1.1 fue la única cepa que presento una fase continua de crecimiento y alcanzó los valores de absorbancia más altos en medio de co-cultivo. Cabe destacar que los valores de absorbancia obtenidos en MRS son hasta 10 veces más altos que los obtenidos en medio de co-cultivo, teniendo en cuenta esto y el comportamiento de los gráficos, podría concluirse que las bacterias crecerán un poco las primeras horas, pero luego se mantendrán relativamente estables.

Las diferencias de crecimiento observadas podrían deberse a la composición de cada uno de los medios, MRS contiene 20 g/L de glucosa, mientras que el medio de co-cultivo 4.5 g/L. Además, debe tenerse en cuenta que MRS es el medio óptimo para estas bacterias, ha sido formulado para obtener el mejor crecimiento, por lo cual es de esperarse que las bacterias crezcan menos.

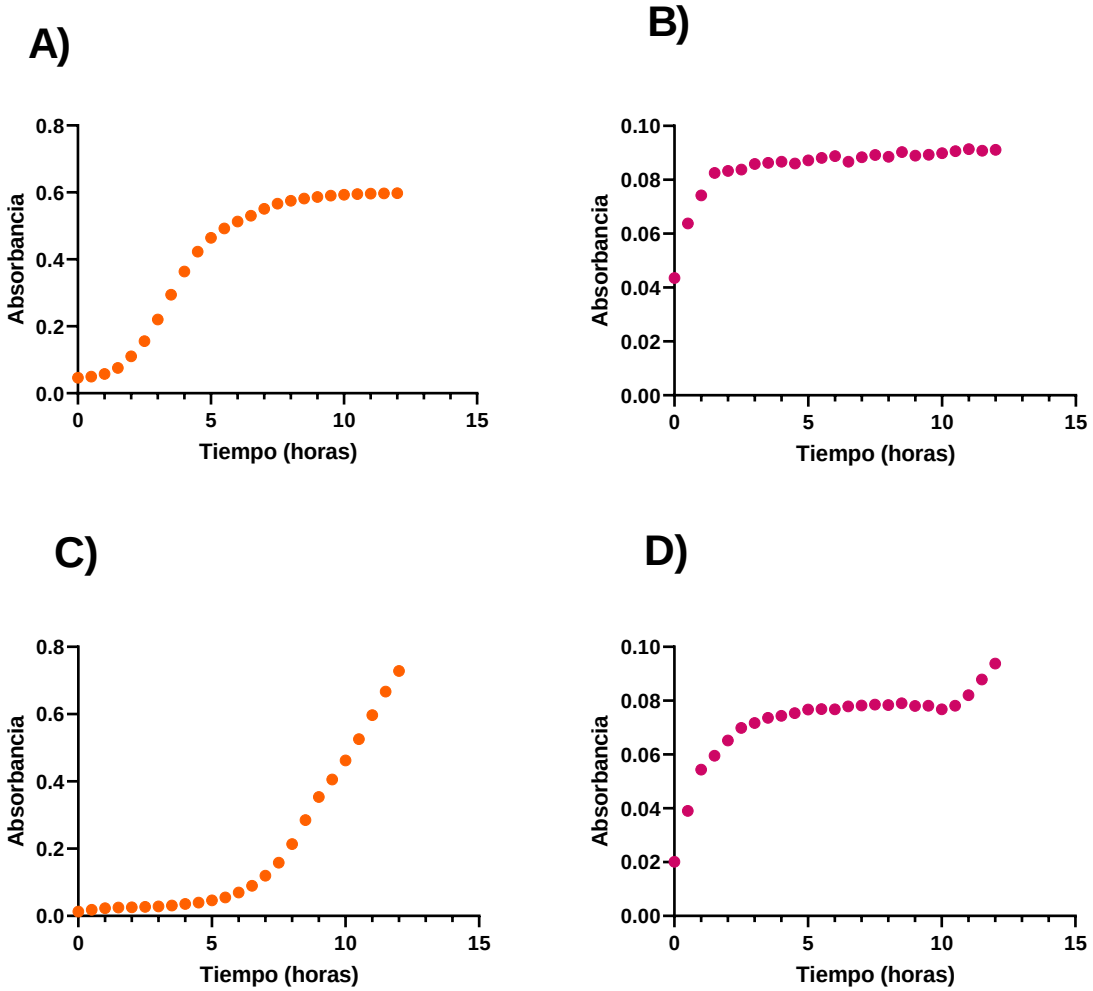


Figura 6| Curvas de crecimiento en MRS (naranja) vs medio de co-cultivo (fucsia), A y B : M2 (*Enterococcus faecium*), C y D: P2 (*L. plantarum*)

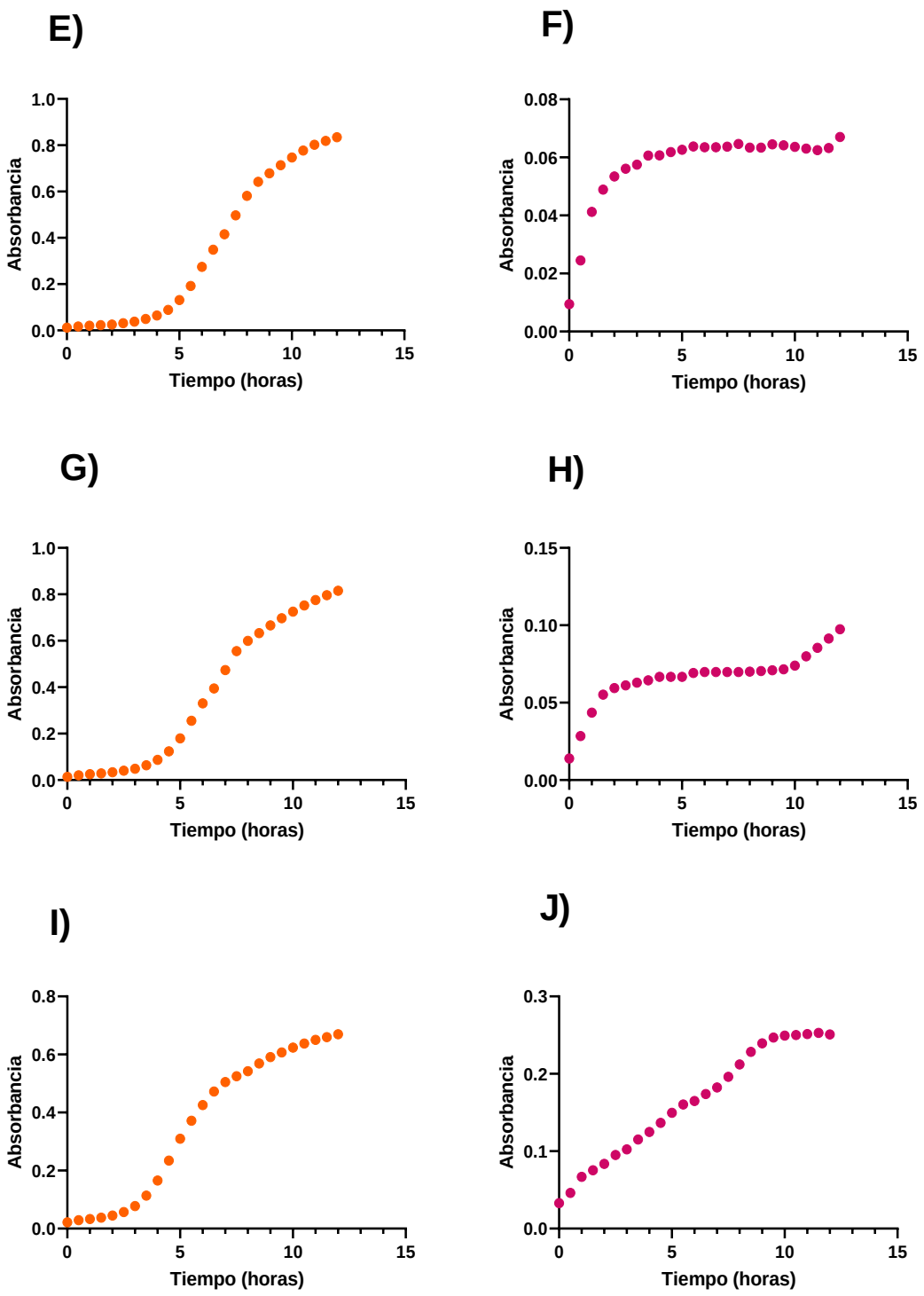


Figura 6 cont.| Curvas de crecimiento en MRS (naranja) vs medio de co-cultivo (fucsia), E y F: PE1 (*L. plantarum*), G y H: M.5.1 *(L. rhamnosus), I y J:* M3.1.1 (*Enterococcus faecium*).

4.4 Detección de micoplasma en el banco de células HT-29

Las contaminaciones causadas por micoplasmas constituyen uno de los problemas más importantes y frecuentes cuando se trabaja con líneas y cultivos celulares, su presencia, además de poner en riesgo la viabilidad del cultivo afectado, conlleva la obtención de resultados poco confiables. Por este motivo, se decidió realizar un control de contaminación con micoplasma al banco celular empleado en el desarrollo del presente trabajo. Para ello, se realizó una PCR a tiempo final empleando cuatro primers 5' (myco 5') y dos primers 3' (myco 3'), con el objetivo de amplificar la mayor cantidad de secuencias ya que no todos los micoplasmas tienen las mismas secuencias en las regiones que hibridan los primers (50). Además, se utilizó un control positivo, Micoplasma Bovis (510 pb) y un control interno (1000 pb). Se preparó 2 mix de PCR, uno con control interno (1/100) y otro mix sin control interno. Los resultados obtenidos se observan en la figura 6.

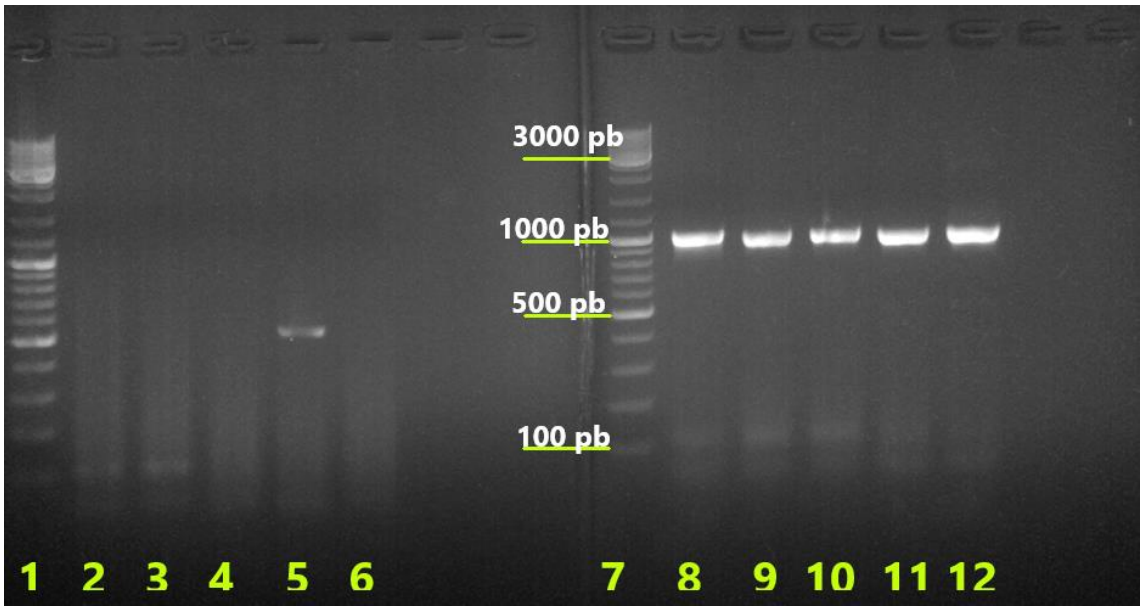


Figura 7| Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos de PCR a tiempo final para la detección de micoplasma. Muestras sin control interno: 1 y 7- Marcador de peso molecular #SM0331, 2- muestra sin diluir, 3- muestra diluida 1/10, 4- muestra diluida 1/100, 5- control positivo, 6- control negativo. Muestras con control interno: 8- muestra sin diluir, 9- muestra diluida 1/10, 10- muestra diluida 1/100, 11- control positivo, 12- control negativo.

Como se observa en la figura 6, para el mix sin control interno, la única muestra que amplificó fue el control positivo, ni el control negativo, ni la extracción del cultivo y sus diluciones amplificaron.

Para el caso de las muestras del mix con control interno, este amplificó en todas las muestras,

por lo cual, se pueden descartar problemas de mal funcionamiento del termociclador, de los reactivos de la mezcla o de la presencia de inhibidores en la muestra que pudieran impedir la amplificación de los ácidos nucleicos. Sin embargo, el control interno inhibió al control positivo, que, si amplifico en ausencia de CI, este fenómeno se debe a una competencia entre el CI y el control positivo por los primers, provocando una disminución en el límite de detección del ensayo y por tanto en la eficiencia de amplificación. Para contrarrestar este problema deberían realizarse diluciones seriadas del control interno y el control positivo, ensayarlas, y determinar cuál es la concentración en que ambos amplifican simultáneamente en un mismo tubo.

Dados los resultados obtenidos, puede concluirse la ausencia de micoplasma en el cultivo.

4.5 Puesta a punto de los co-cultivos

Para contar con una plataforma de *screening* rápida, se optó por el uso de cultivos celulares en placas de 12 pocillos, esto permite evaluar 4 condiciones por placa, obteniendo cantidad de muestra suficiente para realizar extracción de ARN y cuantificación de la expresión de genes de interés. Se evaluaron distintos parámetros: crecimiento fuera de estufa con 5% CO_2, multiplicidad de infección, tiempo de incubación y tiempo de manipulación.

Como primer paso en la puesta a punto de esta plataforma de *screening*, se estudió si realizar co-cultivos fuera de la atmosfera de 5% CO_2 podría representar un desafío adicional para las HT-29, además se evaluó el efecto del LPS en la viabilidad celular. Para llevar a cabo este ensayo se sembró en dos placas de 12 pocillos $2.5x10^5$. células/mL y se incubaron por 48 hs a 37°C en atmósfera con 5 % CO_2, una vez transcurridas 48 hs, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo, se lavó con PBS 1x, y se adicionó DMEM + 10% SFB + 1% Hepes a razón 1 mL/pozo, las placas fueron incubadas a 37°C por 24 hs dentro de un recipiente plástico hermético con una vela, para simular condiciones de microaerofilia. A las 4,18 y 24 hs, se descartó el medio de cultivo, las monocapa celular se lavó con PBS 1x, se tripsinizó, y se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer y el cálculo de viabilidad, por duplicado.

Para ambas condiciones, los valores de recuento y viabilidad fueron muy similares. Como se esperaba, el recuento celular aumentó con el transcurso del tiempo, y el agregado de LPS tampoco afectó el recuento celular. En lo que respecta a la viabilidad, esta se mantuvo estable en cada condición durante trascurso del ensayo, demostrando así que las células pueden ser cultivadas fuera del atmosfera de 5% CO2, adicionando 1% Hepes al medio de cultivo celular, también se demostró que el LPS no representa un desafío adicional para el cultivo celular, ya que los valores de viabilidad y recuento celular son muy similares a la condición basal. Estos resultados coinciden con los reportados en un estudio de la actividad inmunomoduladora de cepas con potencial probiótico sobre células HT-29, las cuales fueron previamente estimuladas con 100 ng/mL de LPS por 3hs y obtuvieron una viabilidad mayor al 95% (30).

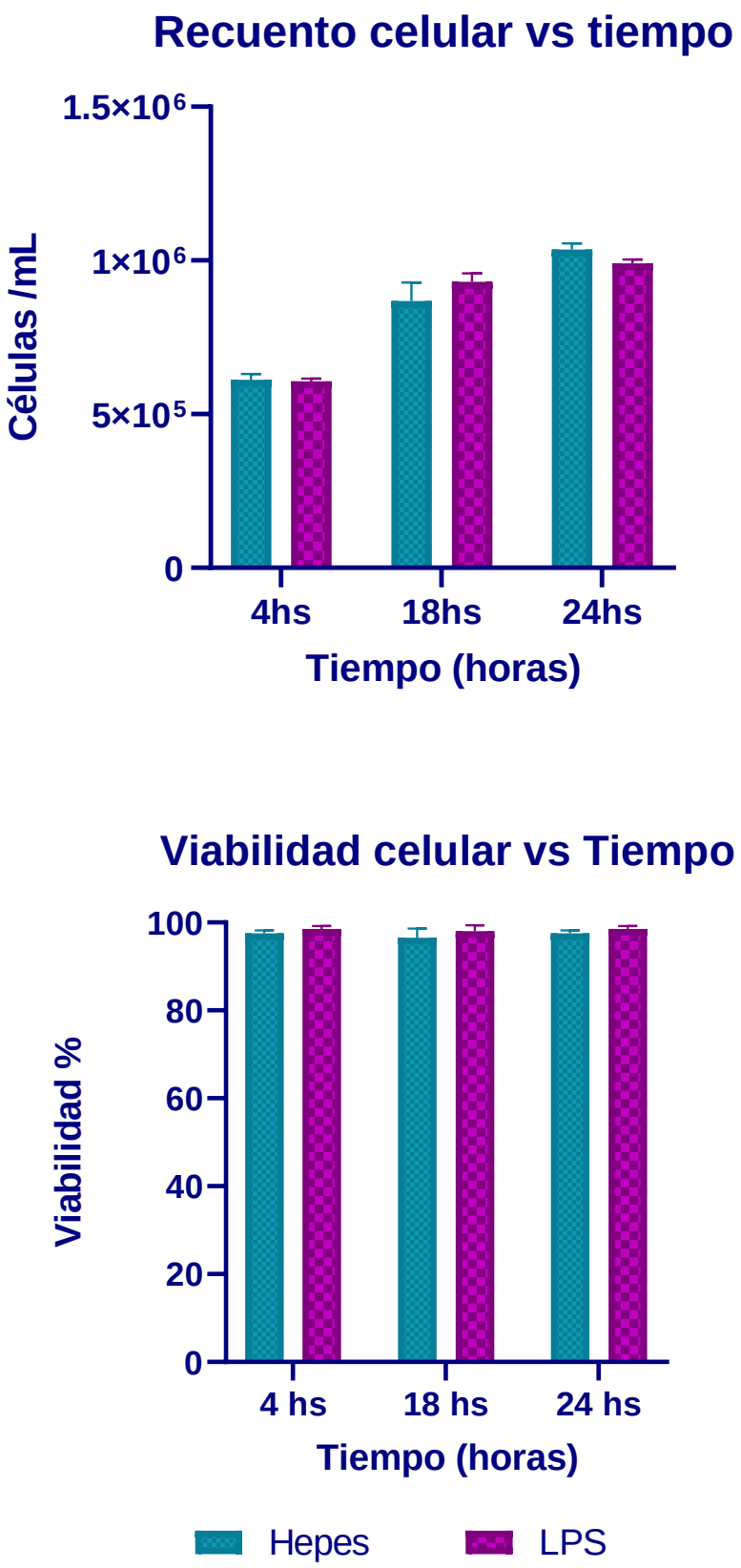


Figura 8| Promedio de recuento celular y viabilidad de las dos réplicas de cada tiempo (4,18 y 24hs) para HT-29 en medio con Hepes 1% y HT-29 + 100ng de LPS en medio con 1% de Hepes. El recuento se realizó utilizando cámara de neubauer y se utilizó el método de exclusión de azul de tripán para evaluar viabilidad.

Para determinar el número de bacterias a inocular sin que se comprometa la viabilidad de las HT-29, primero se evaluó la cepa M.5.1 *L. rhamnosus* utilizando una MOI de 50, las muestras fueron colectadas a los tiempo de 4, 18 y 24 hs de co-cultivo. Como se muestra en la tabla 10, la MOI de 50 provocó la muerte de las células HT-29 en todos los tiempos evaluados, por lo cual se decidió disminuir la MOI a 10 y adicionar 50µg/mL de gentamicina 4hs de iniciado el co-cultivo, se decidió que la adición de antibiótico sería a este tiempo, ya que bibliografía consultada reporta detección de expresión de génica en HT-29 incubadas con bacterias vivas por 3hs (51, 52) y también 6hs (53), por lo cual pensando en un modelo rápido y sencillo se decidió que las HT-29 serían incubadas con bacterias vivas por 4hs.

Las modificaciones realizadas al modelo inicial permitieron obtener células con una viabilidad mayor al 90% los 3 tiempos de muestreo, pese a esto, la condición con bacterias presentó menor viabilidad y recuento que la condición basal. Este efecto ha sido observado en algunas investigaciones, las cuales sugieren que algún metabolito, proteína, o incluso ADN genómico de cepas muertas de Lactobacillus silvestres pueden exhibir actividad anti proliferativas en las cultivos de HT-29 (54,55).

Además, en la evaluación MOI 10 se realizó la incubación en presencia/ausencia de LPS, con el objetivo de simular una situación de inflamación previa al agregado de bacterias. Se observó que luego del agregado bacterias, a las 4 hs de la viabilidad se mantuvo superior al 80%, pero posteriormente provocó la muerte de las HT-29 en los demás tiempos de muestreo.

Tabla 8: Resultados del co-cultivo utilizando una MOI de 50 y de 10 para M.5.1

	4 horas		18 horas		24 horas	
	Recuento (Células)	Viabilidad %	Recuento	Viabilidad %	Recuento	Viabilidad %
Basal	$6.41x10^5$	98	8.79x10	97	$1.5x10^6$	97
LPS	$6.28x10^5$	95	$9.1x10^5$	95	$1.3x10^6$cel	97

	4 horas		18 horas		24 horas	
	Recuento (Células)	Viabilidad %	Recuento	Viabilidad %	Recuento	Viabilidad %
MOI 50 M5.1	Células Muertas	0	Células Muertas	0	Células Muertas	0
Basal	$4.5x10^5$	100	$8.8x10^5$	100	$1.4x10^6$	98
LPS	$4.6x10^5$	99	$8.9x10^5$	98	$1.2x10^6$	100
MOI 10 M5.1	$4.4x10^5$	96	$8.4x10^5$	94	$9.6x10^5$	91
MOI 10 M.5.1 + LPS	$4.4x10^5$	83	Células Muertas	0	Células Muertas	0

Posteriormente, se realizaron co-cultivos con las demás cepas para verificar que el modelo con una MOI de 10 y el agregado de antibiótico a las 4 hs fuera viable para todas las cepas a ensayar.

Al igual que para M5.1, en la condición LPS + bacteria, para las cepas M.3.1.1, M2, P2 y PE1, no se obtuvieron células viables en los tiempos 18 y 24 hs. Debido a esto, se reevaluó el modelo que se estaba utilizando, ya que no permitía tener réplicas de cada condición en cada tiempo de muestreo, además el recuento de cada condición en los tres puntos de muestreó resultó muy tedioso y consumió mucho tiempo, por todo esto y en base a bibliografía que reporta expresión génica en HT-29 luego del desafío con bacterias vivas entre 3hs y 6hs, se decidió seleccionar el tiempo de co-incubación de 4 hs en ausencia de antibiótico para esta plataforma de *screening.* De esta forma en cada placa se evalúan por triplicado las cuatro condiciones.

Para estandarizar la plataforma se calculó el promedio del recuento de las placas a tiempo 0 hs, el cual corresponde a las 48 hs después de que se sembraran $2.5x10^5$ células/pozo, el resultado obtenido fue $5.03x10^5$celulas por pozo. Posteriormente, se calculó el promedio de los recuentos a las 4 hs para cada una de las condiciones, obteniéndose los resultados que se presentan a en la tabla 12. Como se observa estos resultados no difieren mucho del resultado de recuento inicial, por lo cual puede considerarse que en las primeras 4 horas el recuento casi no varía, y asumirse que en todas las condiciones la cantidad de células por pozo serán $5.0x10^5$.

Tabla 9: Resultado del análisis de los recuentos y viabilidad a las 4 horas, para todas las condiciones ensayadas.

Condición	Promedio de recuento (células)	Coeficiente de desviación (%)	promedio viabilidad (%)	Coeficiente de desviación (%)
HT-29	$5.2x10^5$	15.02	99.7	0.76
HT-29 + LPS	$5.02x10^5$	15.01	98.4	2.1
HT-29 +PE1	$4.4\ x10^5$	12.5	97.5	3.5
HT-29 + M.5.1	$4.8x10^5$	11.79	96	0.0
HT-29 + M2	$5.19x10^5$	5.72	97.5	0.725
HT-29 + P2	$5.4X10^5$	5.24	95	1.5
HT-29 + M3.1.1	$5.2X10^5$	5.44	93	1.5

Por lo cual el modelo de co-cultivo final corresponde a una placa de 12 pocillos con $5x10^5$ células por pozo, en los cuales se siembra por triplicado las 4 condiciones a evaluar: basal, 100ng/pozo LPS, bacteria MOI 10 ($5.0x10^6$ UFC/pozo), LPS 100ng/pozo + $5.0x10^6$ UFC/pozo, la placa es incubada por 4 hs, posteriormente, la monocapa celular de cada uno de los pocillos es despegada, centrifugada y el pellet es congelado instantáneamente en nitrógeno líquido y conservado a -80°C hasta la extracción de ARN.

4.6 Puesta a punto de la extracción de ARN

Luego de la incubación de las células HT-29 en las diferentes condiciones evaluadas, se procedió a la extracción de ARN por medio del uso del reactivo comercial TRIzol™, para ello se llevaron a cabo dos protocolos, el primero siguiendo las instrucciones del fabricante y el segundo el desarrollado por Benjamin Zhagi (55) el cual corresponde a una modificación el protocolo del fabricante, agregando un paso adicional de separación de fases con cloroformo y una precipitación con acetato de sodio 3M a pH 5.2 con congelado a -80°C overnight para favorecer la precipitación del ARN. Luego de la extracción las muestras fueron cuantificadas y se obtuvo la relación 260/280 nm usando el equipo infinite 200pro™.

El ARN obtenido a partir de las muestras a las cuales se les realizó la extracción siguiendo el protocolo de fabricante no fueron de buena calidad, la relación 260/280 nm resultó menor a 1.6 indicando la presencia de fenoles, los cuales son capaces de inhibir a las enzimas que se pretenden utilizar en pasos posteriores como la retro transcripción y la PCR real time. Los resultados de la cuantificación se detallan en la tabla 10.

El principal problema con este protocolo fue la pequeña cantidad de células en la muestra, lo que luego del agregado de cloroformo y centrifugado resultó en una interfase poco definida, la cual dificultó la extracción de la fase acuosa, además en los pasos posteriores fue muy difícil obtener un pellet visible, lo cual llevó a la pérdida de muestra.

Según reporta el fabricante de TRIzol™ por cada $1x10^6$ células epiteliales se debería obtener entre 8-15 µg de ARN (56). Teniendo en cuenta que se estandarizó la concentración celular en $5.0x10^5$ cel./pozo, si multiplicamos las concentraciones de ARN obtenidas por el volumen total (50 µL), la cantidad de ARN obtenida es mayor que la reportada, superando los valores de rendimiento especificados por el fabricante. Además, si consideramos la relación 260/280 nm obtenida menor a 1.6 queda en evidencia la presencia de fenoles y/o proteínas en las muestras, por lo cual, se puede afirmar que la cuantificación está sobreestimada, y este fenómeno puede deberse también a degradación del ARN, ya que los nucleótidos libres aumentan el valor de absorbancia.

Tabla 10: Resultados de la cuantificación por espectrofotometría del ARN empleando el protocolo del fabricante.

Muestra	Concentración ng/µl	Relación 260/280	ARN total (µg)
HT-29	321,84	1,52	16,092
HT-29	247,28	1,55	12,364
M2	418,48	1,57	20,924
M2	203,44	1,6	10,172
M.5.1	223,36	1,51	11,168
M.5.1	562,48	1,54	28,124
HT-29 + LPS	202,72	1,49	10,136
HT-29 + LPS	449,76	1,58	22,488

El ARN obtenido por el protocolo modificado, fue muy puro, con una relación 260/280 promedio de 2, los resultados obtenidos se detallan en la tabla 11. Si bien este protocolo es más largo, el hecho de utilizar un doble paso de cloroformo permite eliminar los rastros de fenoles que pudieron haberse arrastrado desde el paso de separación de fases, permitiendo obtener ARN libre de inhibidores.

Cabe destacar que los resultados de cuantificación son previos al tratamiento con DNAsaI I, por lo cual el pequeño rastro de ADN genómico que puedan contener las muestras será eliminado en un paso posterior.

La cantidad de ARN obtenido varió según la condición, esto puede deberse a que no se hayan despegado todas las células de la monocapa cuando se realizó el muestreo o que se haya perdido muestra durante la extracción. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que para los pasos posteriores se utilizan cantidades iguales de ARN para cada condición, con el propósito de evitar la sobreestimación de la expresión génica por diferencias en las cantidades de ADNc utilizado como molde.

A excepción de las condiciones de incubación con M.5.1 (*L. rhamnosus*) y M3.1.1 (*Enterococcus faecium*), la cantidad de ARN total obtenido para demás condiciones está dentro

del rango reportado, si consideramos que para $5x10^5$ células se esperaría obtener la mitad que para $1x10^6$ células, es decir, entre 4 y 7,5 µg de ARN. Si multiplicamos las concentraciones obtenidas por el volumen final (50 µl), se obtiene la cantidad de ARN total por tubo.

Tabla 11: Resultados de la cuantificación por espectrofotometría del ARN extraído por medio del protocolo modificado.

Muestra	Concentración ng/µl	Relación 260/280	ARN total (µg)
HT-29	149,68	2,03	7,484
HT-29 +LPS	133,67	2,03	6,684
HT-29 + M2	178,23	2,02	8,912
HT-29 + P2	85,84	2,00	4,297
HT-29 + M.5.1	65,01	1,99	3,250
HT-29 + M.5.1 + LPS	115,6	2,06	5,780
HT-29 + PE1	154,8	2,03	7,740
HT-29 + M.3.1.1	46,28	2,04	2,314

Dados los resultados obtenidos se decidió no utilizar el protocolo del fabricante, y por lo tanto emplear el protocolo modificado.

4.7 Eliminación de ADN genómico en el ARN extraído

Una vez cuantificado el ARN, las muestras fueron tratadas con DNAsaI I, se tomó una muestra previo al tratamiento y otra post tratamiento, y se utilizaron como molde para llevar a cabo una PCR del gen humano 18s con el objetivo de comprobar que el ADNg haya sido eliminado.

Figura 9| Productos de PCR 18 s para la detección de ADN genómico en las muestras de ARN pre y post tratamiento con DNAsaI. Muestras pretratamiento: Carril 1: HT-29, Carril 2: HT-29 + M2, Carril 3: HT-29 +P2, Carril 4: HT-29 +PE1, Carril 5: HT-29 + M.5.1, Carril 6 HT-29 + M.3.1.1, Carril 7: control positivo ADN g, Carril 8: control negativo (agua). Muestras post tratamiento: Carril 9: control positivo ADNg, Carril 10: control negativo (agua), Carril 11: HT-29 + M.3.1.1, Carril 12: HT-29 + M.5.1, Carril 13: HT-29 +PE1, Carril 14: HT-29 +P2, Carril 15: HT-29 + M2, Carril 16: HT-29.

Como se observa en la figura 9, las muestras de ARN extraído presentaban un contenido leve de ADNg, ya que hay amplificación, luego del tratamiento con DNAsaI no se observa amplificación, solo del control positivo. Dados los resultados obtenidos puede concluirse que el tratamiento con DNAsaI funcionó, y las muestras están en condiciones para ser utilizadas en la PCR real time.

4.8 RT-qPCR

Una vez se eliminó el ADN genómico de las muestras de ARN, se realizó la retro-trasncripción de las mismas, a partir del ADN copia generado se realizaron diluciones seriadas en base 10 que se utilizaron como molde para llevar a cabo PCRs real time.

En primera instancia se utilizaron primers que se habían diseñado al comienzo del proyecto listados en la tabla 12.

Tabla 12: lista de primers diseñados al comienzo del proyecto, para el diseño se utilizó el programa snap gene.

Gen	Secuencia del primer	Amplificado (pb)	Tm °C
IL-10	Forward: ATATAAGCTTAAAGAAGGCATGCACAGCTC Reverse: ATATGGATCCAAGCATGTTAGGCAGGTTGC	152	59
IL-8	Forward: ATATAAGCTTACATACTCCAAACCTTTCCACCC Reverse: ATATGGATCCCAACCCTCTGCACCCAGT	161	60
IL-6	Forward: ATATAAGCTTCATCCTCGACGGCATCTCAG Reverse: ATATGGATCCTCTGCAGGAACTGGATCAGG	310	57
TGFβ-1	Forward: ATATAAGCTTGCTGCTGTGGCTACTGGTGC Reverse: ATATGGATCCCATAGATTTCGTTGTGGGTTTC	334	57
TNFα	Forward: ATATAAGCTTTCTCGAACCCCGAGTGACAA Reverse: ATATGGATCCTATCTCTCAGCTCCACGCCA	144	61
hBD1	Forward: ATATAAGCTTCTCTGTCAGCTCAGCCTC Reverse: ATATGGATCCCTTGCAGCACTTGGCCTTCCC	299	52
GAPDH	Forward: ATATAAGCTTGGAAGGTGAAGGTCGGAGTC Reverse: ATATGGATCCTCAGCCTTGACGGTGCCATG	204	61
RPL27	Forward: ATATAAGCTTTCGCCAAGAGATCAAAGATAA Reverse: ATATGGATCCCTGAAGACATCCTTATTGACG	141	52
ACTB	Forward: ATATAAGCTTAGCACGGCATCGTCACCAACT Reverse: ATATGGATCCTGGCTGGGGTGTTGAAGGTCT	200	62

Para estos primers, las curvas obtenidas no fueron las deseadas, como resultado, la eficiencia obtenidas oscilaban entre 2.4 - 3. Dado que SYBR Green es un fluoroforo no específico que detecta ADN doble hebra, las eficiencias mayores 1 generalmente son resultado de dímeros de primers o amplificaciones inespecíficas (58).

Las curvas de melting se añadieron al final de cada ensayo, ya que permiten evaluar la especificidad de los primers, por lo cual, para verificar si la presencia de dímeros era la causa de las eficiencias mayoreas a 1, se analizaron las curvas de melting, un ejemplo de los resultados se muestra en la figura 10.

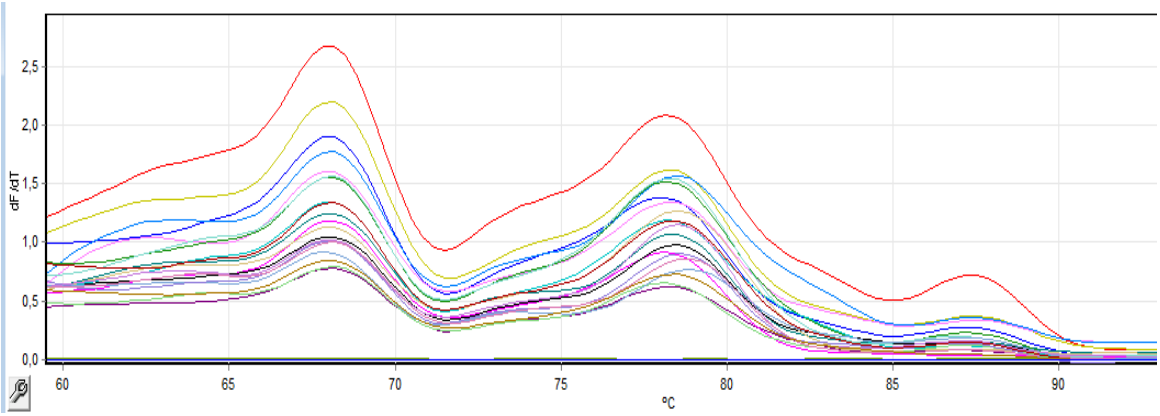


Figura 10| Analisis de la curva de melting de IL 10. Se utilizó el equipo Rotor-Gene Q y el Software 2.1.0.9; la corrida fue de 3 etapas + melting

Como se observa en la figura 10, se confirmó la presencia de dimeros de primers, ya que se obervan tres picos, cuando idealmente se esperaría obervar un solo pico. La presencia de picos a temperaturas menores a 78°C puede indicar formacion de dimeros de primer en la reacción o alternativamente productos de aplificacion no especificos más pequeños (44). Por lo tanto, en la figura 10, se podría suponer que el primero pico correspondería a los dimeros, y el segundo y tercer pico a productos de PCR, ya que se requiere una temperatura mayor para separar la doble hebra de ADN y que SYBER Green se “suelte”, dejando así de emitir fluorescencia. Para confirmar aplificaciones inespecíficas y formación de dimeros de primers, basta con realizar una electroforesis en gel de agarosa de los productos de la real time.

Pese a los resultados desfavorables obtenidos en la real time, se decidió realizar una PCR a tiempo final para IL6, IL8 e IL10 usando las muestras: HT-29 , HT-29 +M2, HT-29 + P2, HT-29 + PE1, con el objetivo de evaluar expresión de algunos de estos genes, y además visualizar amplificaciones inespecíficas y/o dimeros de primers. El tamaño del producto esperado para IL6 era de 310pb, para IL8 152 pb, y para IL10 171pb. Los resultados se muestran en la figura 11.

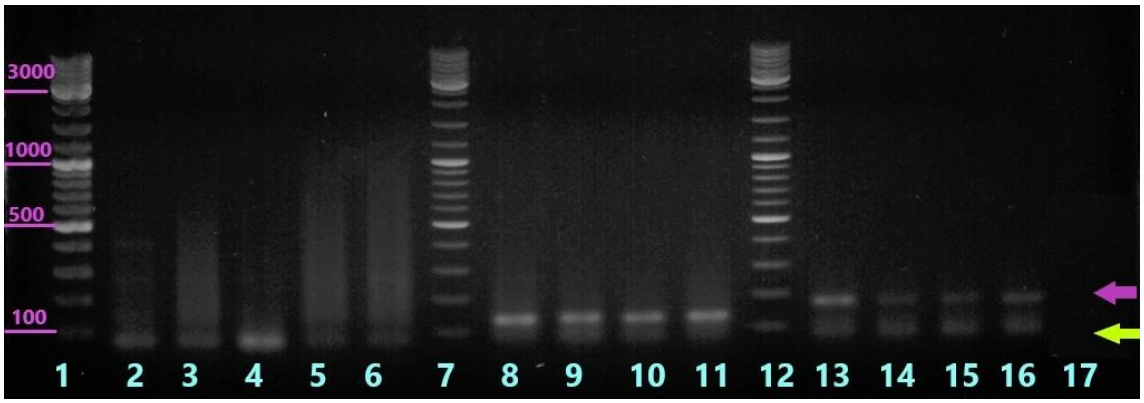


Figura 11| Gel de agarosa 1.5% (TAE 0.5X) Visualización de los productos de PCR de IL6 (carril 2 -6), IL8 (carril 8-11), IL10 (Carril 13-16). Sembrado del gel: Cariiles 1,7 y12 = Marcador de peso molecular SM0331, Carril 2: HT-29, Carril 3: HT-29 + M2, Carril 4: HT-29 +P2, Carril 5: HT-29 + PE1, Carril 6: Control negativo (agua). Carril 8 HT-29, Carril 9: HT-29 + M2, Carril 10: HT-29 +P2, Carril 11: HT-29 + PE1. Carril 13: HT-29, Carril 14: HT-29 + M2, Carril 15: HT-29 +P2, Carril 16: HT-29 + PE1, Carril 17: Control negativo.

Como se observa en la figura 11, para los 3 genes evaluados se observan dímeros de primers. Además, para IL6 no hubo amplificación, lo cual no quiere decir que no haya expresión, sino que tal vez este ensayo no es lo suficientemente sensible como para detectarlo. Para IL8 e IL10 en todas las muestras se observa amplificación de productos con el tamaño esperado, lo cual indicaría expresión de estos genes, sin embargo, cabe destacar que solo se sembró el control negativo de IL8 por falta de disponibilidad de pocillos.

Para tratar de disminuir la formación de dímeros de primers, se redujo la concentración de estos en el mater mix utilizado, y se llevaron a cabo nuevas corridas de PCR real time (no se muestran los resultados). Desafortunadamente, éstos dímeros siguieron formándose, por lo cual, se decidió diseñar nuevos primers. Para llevar a cabo esto, las secuencias de los ARNm se obtuvieron de la base de datos de NCBI. A partir de estas secuencias, los primers se diseñaron utilizando la herramienta PrimerBlast – NCBI. Para el diseño de los primers se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

- Los primers deben tener un largo de entre 20pb – 30 pb.

- La temperatura de annealing (temperatura a la cual los primers hibridan con la secuencia de ADN) debe ser aproximadamente 60°C.

- Preferentemente deben comenzar y/o terminar con G o C para favorecer la hibridación.

- El contenido GC debe ser entre 40% – 60 %.

- La secuencia del primer no debe contener cuatro o más nucleótidos repetidos consecutivamente. Adicionalmente tampoco debe contener muchos G o C consecutivos, ya que esto puede disminuir la eficiencia del primer debido a la formación de horquillas.

- La secuencia del primer no puede ser palindrómica (es decir, que no puede leerse igual de 5' a 3' que de 3' a 5'), esto es para evitar que forme homodímeros.

- Preferentemente el fragmento a amplificar no debe superar las 200 pb.
- De la lista de primers diseñados por el programa, seleccionar aquel que amplifique una región cercana al extremo 3' del ARNm. El motivo radica en que la retro transcripción utiliza primers oligo dT, los cuales hibridan con las colas Poli-A que se encuentran en el extremo 3'. Por lo tanto, si por algún motivo la reacción de retro transcripción se interrumpe o la secuencia del ARNm es muy larga, es más probable que el cDNA generado contenga la región de interés si los primers hibridan más cerca del extremo 3'.

Los primers diseñados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13: Lista de primers re-diseñados

Gen	Secuencia del primer	Amplificado (pb)	Tm (°C)
IL-10	Forward: 5' TGGGCTTGGGGCTTCCTAAC 3' Reverse: 5' GGAATCCCTCCGAGACACTGG 3'	100	62
IL-8	Forward: 5' AACTGGGTGCAGAGGGTTGT 3' Reverse: 5' GCTTGAAGTTTCACTGGCATCT 3'	112	61
IL-6	Forward: 5' TTACAGGGAGAGGGAGCGAT 3' Reverse: 5' TTCTCTTTCGTTCCCGGTGG 3'	132	61
IL-12	Forward: 5' CCAGAAGGCCAGACAAACTCTA 3' Reverse: 5' GCCAGGCAACTCCCATTAGTT 3'	180	60
TGF- β1	Forward: 5' GAGAAGAACTGCTGCGTGCG 3' Reverse: 5' TCCAAATGTAGGGGCAGGGC 3'	124	61
TNF-α1	Forward: 5' GCAAGGACAGCAGAGGACCA 3' Reverse: 5' TGTGGCGTCTGAGGGTTGTT 3'	78	62
hBD1	Forward: 5' TCTGCCTGCCCGATCTTTACC 3' Reverse: 5' CTGGTCACTCCCAGCTCACTT 3'	84	62
GAPDH	Forward: 5' GGTGACTAACCCTGCGCTCC 3' Reverse: 5' GCCTCGCTCCACCTGACTT 3'	71	62
ACT-β	Forward: 5' ACAGAGCCTCGCCTTTGCC 3' Reverse: 5' GAGGATGCCTCTCTTGCTCTG 3'	250	62
RPL 27	Forward: 5' CGAGACTCAGCACCACACAA 3' Reverse: 5' GCGATCTGAGGTGCCATCAT 3'	192	62

Una vez se recibieron los nuevos primers, se inició la validación de estos, para ello se realizaron diluciones seriadas (1/1, 1/20, 1/200, 1/2000 y 1/20.000) del ADNc de HT-29, que se utilizó como molde para las corridas de real time, se comenzó por IL-10 y Beta actina, para evaluar eficiencia de un gen *target* y un gen normalizador. Los resultados obtenidos para IL 10 se muestran en la figura 12, 13 y 14, y los resultados de beta actina en la figura 15, 16 y 17.

Tanto como para IL-10 como para Beta actina, se obtuvieron curvas de eficiencia muy cercana al 100 %, curvas de melting sin dímeros, por lo cual el re-diseño de primers fue una decisión acertada. Para ambos genes, en las curvas de melting se observó una especie de “brazo” que podría deberse a una pequeña formación de dímeros de primers, esto podría eliminarse disminuyendo la concentración de primers en el máster mix.

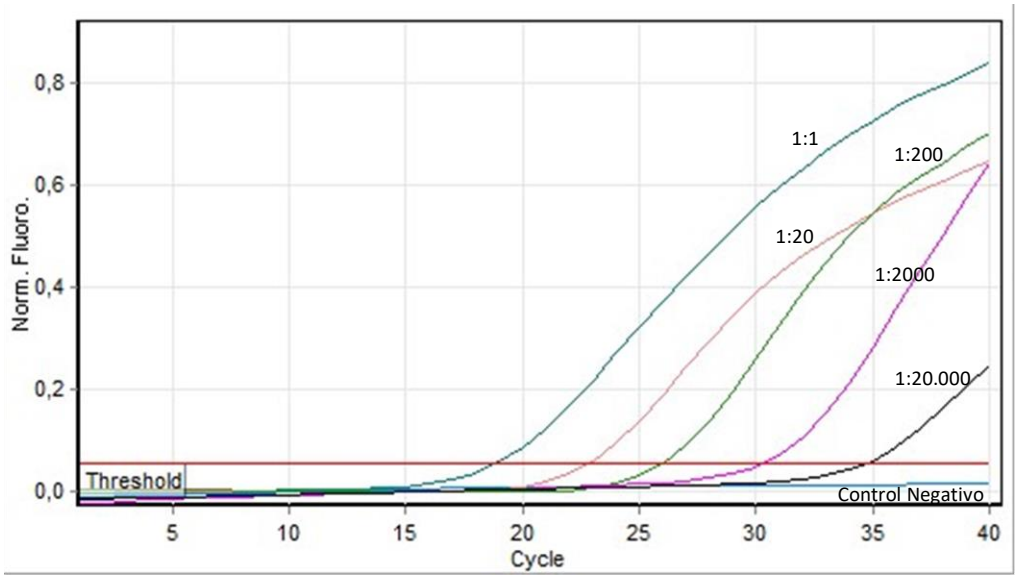


Figura 12| Grafico de las curvas amplificación de IL 10 de las diluciones seriadas de ADNc de HT-29, en escala lineal.Se utilizó el equipo Rotor-Gene Q y el Software 2.1.0.9; la corrida fue de 3 etapas + melting

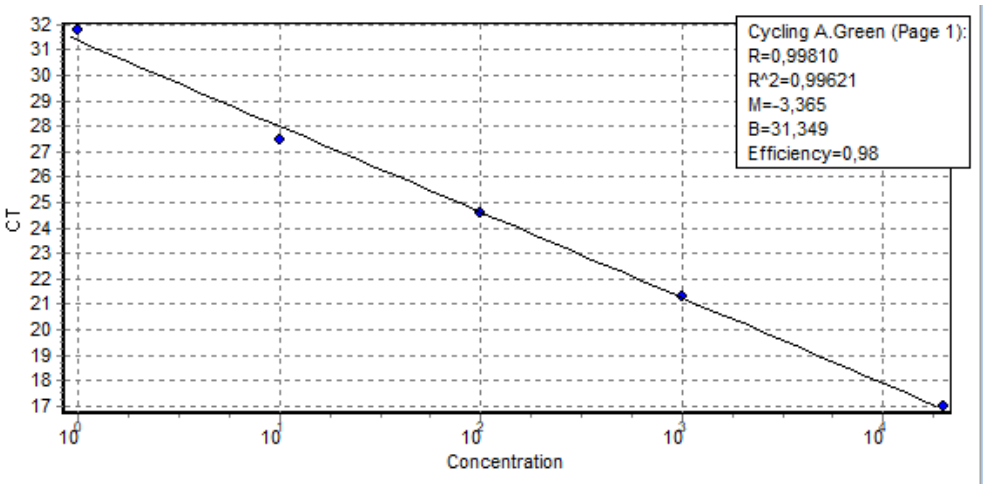


Figura 13| Ct vs Log(concentración). Curva de eficiencia de la reacción para las diluciones seriadas de ADNc utilizando los primers de IL 10. La eficiencia fue calculada utilizando la función "*Analysis"del* Software 2.1.0.9 Rotor-Gene Q.

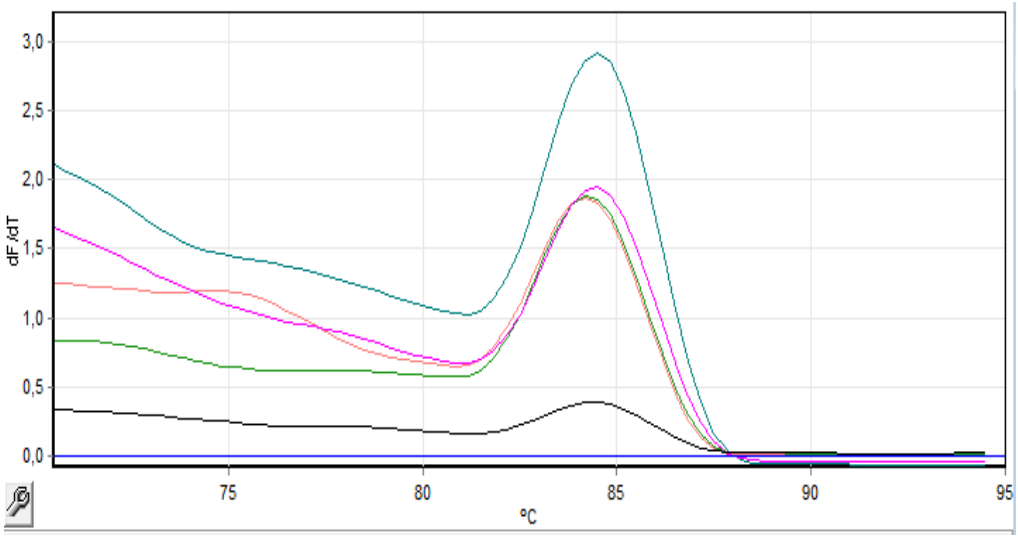


Figura 14| Analisis de la curva de melting de los nuevos primers de IL-10. Se utilizó el equipo Rotor-Gene Q y el Software 2.1.0.9

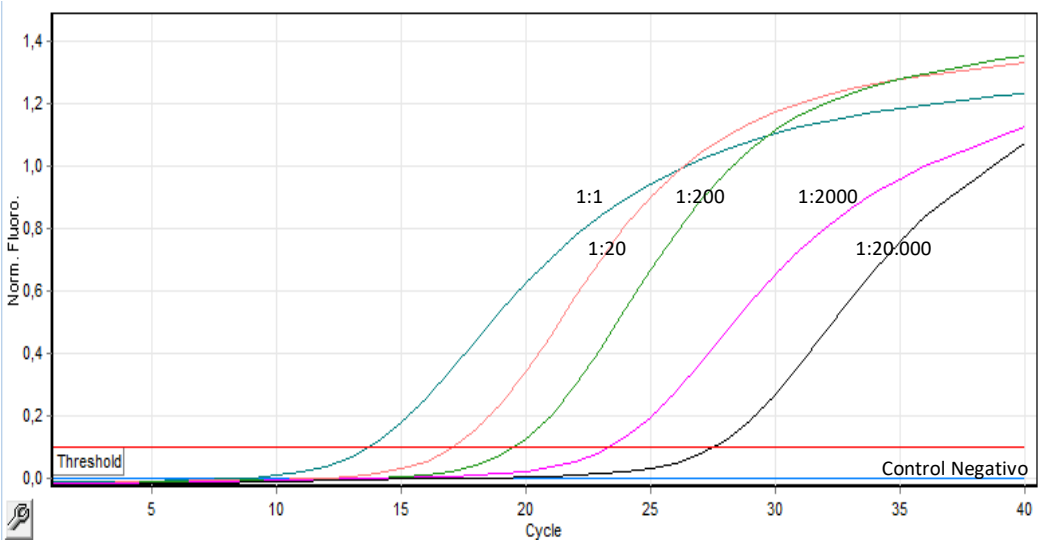


Figura 15| Grafico de las curvas amplificación de Beta Actina para las diluciones seriadas de ADNc de HT-29, en escala lineal. Se utilizó el equipo Rotor-Gene Q y el Software 2.1.0.9; la corrida fue de 3 etapas + melting

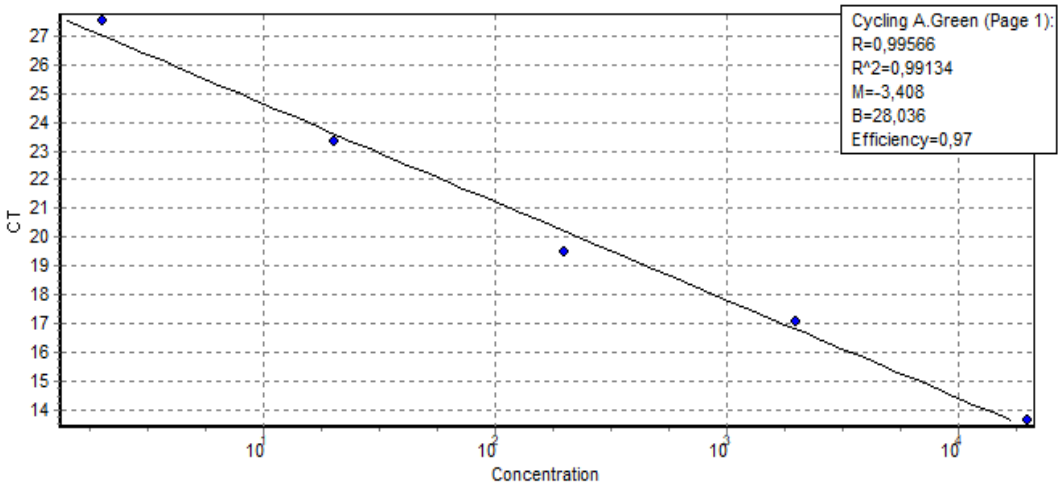


Figura 16| Ct vs Log(concentración). Curva de eficiencia de la reacción para las diluciones seriadas de ADNc utilizando los primers de Beta Actrina . La eficiencia fue calculada utilizando la función "*Analysis" del* Software 2.1.0.9 Rotor-Gene Q.

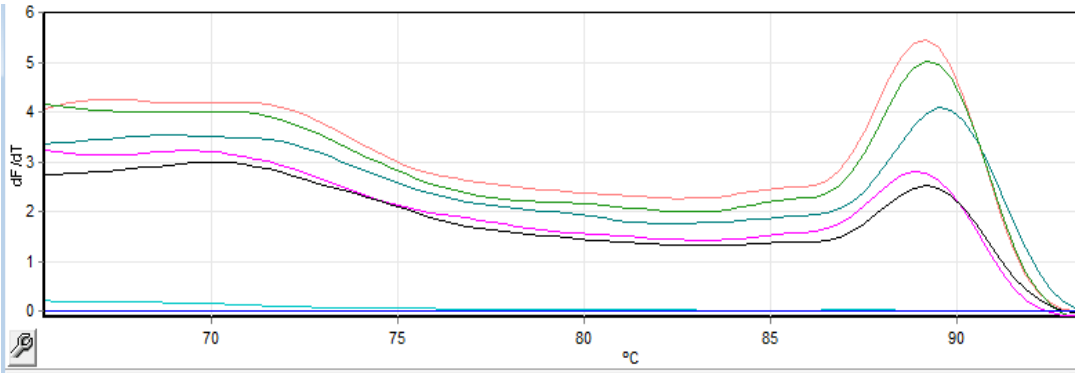


Figura 17| Analisis de la curva de melting del nuevo juego de primers de Beta actina. dF/dt vs Se utilizó el equipo Rotor-Gene Q y el Software 2.1.0.9

4.9. Perspectivas a futuro

En primer lugar, será necesario validar los nuevos primers, para eso se deberán realizar curvas estándar con diluciones seriadas 1/10 y por lo menos 5 puntos, cada punto se debe realizar por triplicado. Luego se examinará la pendiente de la regresión lineal de la curva para determinar la eficiencia, es decir que se graficará Ct vs Log (concentración).

Además, también se deben realizar las curvas de melting, en donde por cada primer solo se debería observar un pico definido, correspondiendo al producto deseado, para verificar que la reacción este siendo específica, se puede realizar una electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR.

Una vez que se validen todos los primers, será necesario escoger el gen de expresión constitutiva que se utilizará para relativizar los resultados de cuantificación. Para ello, tomando cantidades iguales de ADNc se analizarán las diferentes condiciones del ensayo (basal, LPS, bacteria, LPS + bacteria) para cada uno de los genes candidato: GAPDH, ACTB, h DB1, RPL 27, y se evaluará la variabilidad en cantidad de Ct entre las muestras. El gen que presente menor variación será seleccionado como gen normalizador,

Posteriormente se evaluaría la expresión de las citoquinas para tratar de discernir el tipo de respuesta que se está generando en cada condición y compararlo con la bibliografía reportada, aunque se debe tener en cuenta que la respuesta es específica de la cepa, y al tratarse de cepas aisladas de fuentes nativas, este estudio estaría generando los primeros datos para estas cepas.

Cabe destacar que este modelo puede utilizarse no solo para estudiar la respuesta de las HT-29 a bacterias, sino que ajustándolo podrían evaluarse otro tipo de microorganismos o compuestos. Además, ya que los primers han sido diseñados para la amplificación de genes humanos, una vez validados podrían utilizarse para cuantificación de expresión génica de

cualquier otra muestra de especie humana, por lo tanto, permitirían el estudio de procesos inflamatorios en otros tejidos.

Como puntos a mejorar, podría evaluarse complejizar el modelo ya que, la falta de consideración de esta variabilidad de microbiota puede limitar aún más la capacidad predictiva del modelo (40-41). Por lo tanto, existe la necesidad de explorar modelos *in vitro* más sensibles y discriminatorios, considerando la complejidad de la microbiota, para desarrollar plataformas de selección con una mayor capacidad de predecir la respuesta *in vivo.*

Además de lo mencionado anteriormente, la evaluación de la expresión de gen NF-kB podría aportar datos interesantes, ya que los antígenos microbianos al ser reconocidos por los TLRs desencadenan una cascada de señales, llevando a la liberación del factor nuclear de cadena liviana kappa (NF-kB nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), el cual activa una variedad de genes que codifican para quimioquinas, citoquinas, y otros efectores de la respuesta inmune (11). En un modelo de líneas celulares reporteras, NF-kB ha demostrado que puede ser activado por señales como TNF-α, IL-1β, LPS (56), por lo tanto, evaluar este gen podría ayudar a elucidar el tipo de respuesta y/o señal que las HT-29 generan.

5.0 Análisis económico

Ya que para este modelo de screening se requiere que las células sean sembradas 48 hs antes de iniciar los co-cultivos, estos se podrán realizar 3 veces por semana, 2 placas por vez.
Los lunes, martes y miércoles se siembran 2 placas de 12 pocillos con $5.0x10^5$ células/pozo. Los miércoles se realizan los co-cultivos con las células sembradas los lunes, los jueves con las células sembradas el martes, y el viernes el co-cultivo con las células sembradas el miércoles.

En una placa se evalúan las condiciones: basal, LPS, LPS + bacteria X y bacteria X, en una segunda placa se siembran: bacteria Y, LPS + bacteria Y, bacteria Z, LPS + bacteria Z (todas la condiciones por triplicado). Por lo cual, por co-cultivo se evalúan 3 cepas bacterianas. Entonces, si se evalúan 3 bacterias por co-cultivo, serían 9 cepas por semana (3 cepas/co-cultivo *3 veces a la semana), lo que permite evaluar 36 cepas por mes (9 cepas semanales * 4 semanas).

Haciendo un estimado de los gastos de los reactivos de cultivo celular, para poder contar con la cantidad de células necesarias, aproximadamente $40x10^6$ cel por semana ($5.0x10^5$ cel/pozo * 12 pocillos *2 placas * 3 veces a la semana =$36x10^6$ células + $4.0x10^6$ para mantenimiento del cultivo), implicaría el uso de 3 botellas de cultivo T-75 por semana.

El medio de cultivo necesario para un botella T-75 es de 13 mL, por lo cual , se requiere 36 mL para el cultivo, pero, además el medio se cambia 1 vez por semana, entonces se requieren otros 36 mL de DMEM + 10 % SFB, lo que da un total de 72 mL de medio DMEM +10% SFB, además, cuando se tripsinizan las T-75 se necesita 3mL/ botella de DMEM +10%SBF para la neutralización de la tripsina (9 mL en total), entonces, para el mantenimiento semanal de las células se requiere un total de 81 mL de DMEM +10% SBF.

Para el sembrado en las placas se requerirá 72 mL de DMEM + 10% SBF (1 mL/pozo *12 pozos * 2 placas * 3 veces a la semana), el cual a las 48 hs es sustituido por DMEM + 10%

SBF + 1% hepes; por lo cual se requiere otros 72 mL , y 14.4 mL para inactivación de tripsina en la placa (0.2 mL/pozo *12 pozos *2 placas *3 veces a la semana). Es así que, la cantidad total de DMEM + 10% SFB que se requiere por semana para los co-cultivos es de 250 mL (240 mL +10 mL de margen), por lo cual, es ½ botella (500mL) de DMEM (225 mL sin SFB) por semana, en un mes se consumen 2 botellas (1/2 *4).

Ya que el medio se suplementa con un 10% de suero fetal bovino, serían 25 mL por semana, lo que en un mes sería 100 mL, que equivale al volumen de 1 botella de SFB. Además, cuando se trabaja fuera de estufa con ambiente de CO_2, se adiciona hepes 1%, por mes serían 5 mL (el 1% del volumen medio + margen (72 mL por semana * 4 semanas + 14.4 mL por semana * 4 semanas)), lo que equivale a ¼ botella al mes.

Además, también se utiliza tripsina para despegar las células de la botella y de la placa. Para una botella T-75 se utiliza 1.5 mL/botella, 18 mL al mes (1.5 * 3 botellas * 4 semanas), para las placas por mes se utiliza 28.8 mL (0.1ml/pozo *12 pozos * 2 placas * 3 veces a la semana * 4 semanas), por lo tanto, al mes se requieren 50 mL de tripsina (47 mL + 3 mL de margen), lo que equivale a ½ botella al mes.

Gastos mensuales del cultivo celular: DMEM 1000mL, 100mL SFB, 50mL tripsina, 5 mL hepes + 12 botellas T-75 + 24 placas 12 pocillos.
Gasto = 26 USD (2 botellas DMEM HPSTA, 500mL c/u) + 32 UDS (1 botella. 100 mL SFB Capricorn Scientific) + 6 USD (Hepes, 23 UDS 20 mL, Bioreagent) + 7 USD (tripsina edta,14 USD 100mL) + 88 USD 24 placas 12 pocillos (264 USD, 72 placas) + 16 USD 12 botellas T-75 (160 usd, 120 botellas) = 175usd / 36 Cepas= 4.85 USD/ cepa (60-65)

Como paso posterior al co-cultivo, se debe realizar la extracción del ARN, lo mejor sería utilizar un kit, ya que es un método más simple y rápido, incluye el paso de tratamiento con DNAsaI, y, además, le evita al usuario el manejo de solventes orgánicos tóxicos. Se eligió el Kit Quick-RNA Microprep Kit Zymo® research, de 200 reacciones que tiene un precio 675 UDS (66), el

costo unitario por reacción sería 3.4 USD, lo cual por co-cultivo sería 81 USD (24 muestras por co-cultivo), como se evalúan 3 cepas por co-cultivo, el costo de cada cepa sería 27 USD.

Para la retro-trasncripción, se eligió el kit de transcripción inversa de ADNc de gran capacidad de 200 reacciones de Applied Biosystems™, con un costo tolal de 443 USD (67), el costo por reacción sería de 2.22 USD. Por lo cual por cocultivo el costo sería de 53 USD, por lo cual el costo por cepa sería de 17.70 USD. Se eligió este kit ya que el procedimiento es rápido y contiene todos los componentes necesarios para una transcripción inversa rápida y eficiente.

Para la real time se propone utilizar el Kit real time Maxima sybr green de 200 reacciones, que tiene un precio de 184 USD (68), lo cual sería 0.92 USD por reacción. El costo del co-cultivo sería de 22 USD, siendo 7.36 USD el costo por cepa. Además, también se requieren primers, cada set cuesta 25 USD (69), ya que son 10 genes para evaluar, el costo total de todos los primers es 250 USD, según el proveedor se puede llegar a realizar hasta 1000 reacciones (69), por lo cual el costo por reacción sería de 0.25 USD, generando un costo de 6 USD por co-cultivo, es decir 2 USD por cepa.

Los gastos en honorarios para el operario se calculan 1000 USD mensuales (1000 USD / 36 cepas) = 28 USD por cepa. En resumen, para evaluar una cepa por triplicado en este modelo de *screening in vitro* de dos condiciones (presencia/ausencia de LPS) el costo es de 87 USD (28 + 2 + 7.36 + 17.70 +27 +4.85 = 87 USD).

Un modelo *in vivo* tiene un costo estimado de 8 USD por animal por lo que si se quisiera evaluar una cepa en dos condiciones (condición sin estímulo e inflamatoria) y el grupo control, considerando 10 animales por grupo tenemos un costo de 2400 USD. Luego se suman los costos de la determinación de citoquinas (según lo detallado anteriormente) serían aproximadamente, 51 USD para extracción de ARN (3.4 *15), 33 USD para la retro-trasncripción (2.22 *15), 14 USD en reactivos real time y 3.75 USD en primers, lo que da un total de 342 USD por cepa.

6. Conclusión

Se logró poner a punto una plataforma de co-cultivos de HT-29 con bacterias ácido-lácticas. El modelo validado consiste en una placa de 12 pocillos con $5.0x10^5$ células/pozo, en la cual se inoculan cuatro condiciones por triplicado (basal, LPS, bacteria, LPS + bacteria) y se incuban 4 hs. Se detrminó que una MOI de 10 y un tiempo de incubación de 4 hs son las condiciones adecuadas para este modelo porque reduce el tiempo de espera para el operario, permitiendo un mayor procesamiento de muestras semanal. Durante las 4 hs de co-cultvo, la viabilidad de las células HT-29 se mantuvo por encima del 90%, con un coeficiente de variación entre 0.25% - 3.5 %.

El protocolo de extracción de ARN se puso a punto y se logró obtener ARN de alta calidad, los residuos de ADN genómico fueron eliminados con tratamiento de DNAsaI, obteniendose así un material de partida de buena calidad para realizar RT-qPCR.

Una vez que los nuevos primers diseñados sean validados, pueden ser utilizados para la evaluación del perfil de citoquinas expresadas en ésta y en otras líneas celulares. Por lo cual, la plataforma de *screening* diseñada puede ajustarse a otros modelos o investigación de procesos inflamatorios en los que se pretenda utilizar células humanas.

En comparación con un modelo animal, esta plataforma in vitro demostró que puede permitir la evaluación simultanea de 3 cepas a un costo 4 veces menor.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Kosiewicz MM, Zirnheld AL and Alard P. Gut microbiota, immunity, and disease: a complex relationship. Frontiers in microbiology. 2011, vol. 2: 180.

2. Rodríguez J M, Murphy K, Stanton C, Ross R P, Kober O I, Juge N and Marchesi J R. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. Microbial ecology in health and disease. 2015, vol. 26(1): 26050.

3. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I & Tuohy K. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. European journal of nutrition. 2018, vol.57(1): 1-24.

4. Lazar V, Ditu LM, Gradisteanu Pircalabioru G, Gheorghe I, Curutiu C, Holban AM, Picu A, Petcu L and Chifiriuc MC. Aspects of gut microbiota and immune system interactions in infectious diseases, immunopathology, and cancer. Frontiers in immunology. 2018, vol. 9:1830.

5. Patrignani P, Tacconelli S and Bruno A. Gut microbiota, host gene expression, and aging. Journal of clinical gastroenterology. 2014, vol. 48: 28-31.

6. Zhou L and Foster J A. Psychobiotics and the gut–brain axis: in the pursuit of happiness. Neuropsychiatric disease and treatment. 2015, vol.11: 715.

7. Dinan T G, Stilling R M, Stanton C and Cryan J F. Collective unconscious: how gut microbes shape human behavior. Journal of psychiatric research. 2015, vol. 63: 1-9.

8. Bischoff S C, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke J D, Serino M & Wells J M. Intestinal permeability–a new target for disease prevention and therapy. BMC gastroenterology. 2014, vol.14(1):189

9. Schirmer M, Smeekens S P, Vlamakis H, Jaeger M, Oosting M, Franzosa E A. & Kurilshikov A. Linking the human gut microbiome to inflammatory cytokine production capacity. Cell. 2016, vol.167(4):1125-1136.

10. Ramiro-Puig E, Pérez Cano FJ, Castellote C, Franch A y Castell M. El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. Revista Española de Enfermedades Digestivas. 2008, vol. 100(1):29-34.

11. Icaza-Chávez, M. E. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. Revista de Gastroenterología de México. 2013, vol. 78 (4): 240-248.

12. Okumura R & Takeda K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. Experimental & molecular medicine. 2017, vol 49(5): 338-346.

13. León A J, Garrote J A y Arranz E. Citoquinas en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal. Medicina clínica. 2006, vol.127(4):145-152.

14. Round J L & Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nature Reviews Immunology.2009, vol.9(5): 313–32.

15. De Almada C N, Martinez R C R and De Souza Sant'Ana A.Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. Applied microbiology and biotechnology.2015, vol. 99(10): 4175-4199.

16. Shi N, Li N, Duan X & Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. Military Medical Research. 2017, vol.4(1):14.

17. Rooks M G & Garrett W S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. Nature Reviews Immunology.2016, vol.16(6): 341–352.

18. Zhang J M and An J. Cytokines, inflammation and pain. International anesthesiology clinics. 2007, vol. 45(2): 27.

19. Francescone R, Hou V and Grivennikov S I. Cytokines, IBD, and colitis-associated cancer. Inflammatory bowel diseases. 2015, vol.21(2): 409-418.

20. Ruder B, Atreya R and Becker C. Tumour necrosis factor alpha in intestinal homeostasis and gut related diseases. International journal of molecular sciences. 2019, vol. 20(8): 1887.

21. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014; vol.6(10).

22. Fonseca-Camarillo G C, Villeda-Ramírez M A., Sánchez-Muñoz F, Barreto-Zúñiga R, Domínguez-López A, Uribe-Esquivel M y Yamamoto-Furusho J K. Expresión del gen de IL-6 y TNF-α en la mucosa rectal de pacientes con colitis ulcerosa crónica idiopática y controles. 2009, vol .74(4): 334-340.

23. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. Immunity. 2014;41(4):529-42.

24. Pablo Sánchez R, Sanz J M, Martín A P, Martín E R., de Mon Soto M Á y García M S. Balance entre citocinas pro y antiinflamatorias en estados sépticos. Medicina intensiva. 2005, vol. 29(3) :151-158.

25. Revisiting immunomodulatory functions of IL10 by examining human knock-outs. UNIVERSITAETSKLINIKUM FREIBURG [internet], 2016. [Citado: 30/3/2020] Disponible desde: https://cordis.europa.eu/project/id/294253/reporting/es

26. Gálvez-Gastélum F J, Sandoval-Rodríguez A S y Armendáriz-Borunda J. El factor de crecimiento transformante beta como blanco terapéutico. Salud pública de México. 2004; vol. 46: 341-350.

27. Zhou WJ, Yang H L, Shao J, Mei J, Chang K K., Zhu R and Li M Q. Anti-inflammatory cytokines in endometriosis. Cellular and Molecular Life Sciences. 2019; vol. 76(11): 2111-2132

28. Sanchez L & Tromps J. In vitro characterization of acid lactic bacteria with probiotic potential. Rev Salud Anim. [Internet]. 2014 [citado 2019-12-23]; vol.36. (2):124-129. Disponible desde: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2014000200008&lng=es&nrm=iso.

29. Huertas R y Parra A. Bacterias ácido-lácticas: Papel funcional en los alimentos. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial.2010; vol. 8(1):93-105.

30. Duary R K, Batish V K, & Grover S. Immunomodulatory activity of two potential probiotic strains in LPS-stimulated HT-29 cells. Genes & nutrition.2014; 9(3), 398.

31. Jeffrey, M. P., Strap, J. L., Jones Taggart, H., & Green-Johnson, J. M. (2018). Suppression of intestinal epithelial cell chemokine production by Lactobacillus rhamnosus R0011 and Lactobacillus helveticus R0389 is mediated by secreted bioactive molecules. Frontiers in immunology, 9, 2639.

32. Chen K, Liang N L, Luo X G, and Zhang T C. *Lactobacillus acidophilus* strain suppresses the transcription of proinflammatory-related factors in human HT-29 cells. Journal of microbiology and biotechnology.2013, vol. 23(1): 64-68

33. Tian, Z., Yang, L., Li, P., Xiao, Y., Peng, J., Wang, X., ... & Shi, DThe inflammation regulation effects of Enterococcus faecium HDRsEf1 on human enterocyte-like HT-29 cells. Animal cells and systems. 2016, vol. 20(2):70-76.

34. Pinto M G V, Gómez M R, Seifert S, Watzl B, Holzapfel W H and Franz C M. Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT-29 intestinal epithelial cells in vitro. International journal of food microbiology. 2009, vol. 133 (1-2): 86-93.

35. Jeffrey M P, Strap J L, Jones Taggart H & Green-Johnson J M. Suppression of intestinal epithelial cell chemokine production by Lactobacillus rhamnosus R0011 and Lactobacillus helveticus R0389 is mediated by secreted bioactive molecules. Frontiers in immunology. 2018; vol.9: 2639.

36. Vinderola G, Matar C & Perdigon G. Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria: involvement of toll-like receptors. Clin. Diagn. Lab. Immunol.2005; vol. 12(9):1075-1084.

37. Joint, F. A. O. WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. 2002, vol. 30.

38. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S & Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. Cell, 2004, vol. 118 (2): 229-241.

39. Probiotics Market by Application (Functional Food & Beverages [Dairy Products, Non-dairy Beverages, Infant Formula, Cereals], Dietary Supplements, Feed), Ingredient (Bacteria, Yeast), Form (Dry, Liquid), End User, and Region – Global Forecast to 2023. [Internet] 2019 [Citado 2019/12/23]. Disponible desde: https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/probiotic-market-advanced-technologies-and-global-market-69.html?gclid=CjwKCAiA-vLyBRBWEiwAzOkGVA8vT4cHDTm2g4r-gQbHM0WKLzmZR1l0OSXCWeAdduaKw2ovrR9jixoCo6cQAvD_BwE

40. Langerholc T, Maragkoudakis P A, Wollgast J, Gradisnik L, & Cencic A. Novel and established intestinal cell line models–An indispensable tool in food science and nutrition. Trends in Food Science & Technology. 2001, vol .22: S11-S20.

41. Marzorati M, and Van de Wiele T. An advanced in vitro technology platform to study the mechanism of action of prebiotics and probiotics in the gastrointestinal tract. Journal of clinical gastroenterology. 2016, vol. 50: S124-S125.

42. Almudena Pérez Rico. Selección de genes de referencia y Análisis de expresión diferencial en semen equino criopreservado. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, Zootecnia y Gestión Sostenible, Conservación de Recursos Genéticos Animale. 2015.

43. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G y Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology.1993, vol. 11(9): 1026-1030.

44. Bustin S A, Benes V, Garson J A, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, and Vandesompele, J. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. 2009.

45. Serra S & De Simeis D. Use of Lactobacillus rhamnosus (ATCC 53103) as whole-cell biocatalyst for the regio-and stereoselective hydration of oleic, linoleic, and linolenic acid Catalysts. 2018, vol. 8(3):109.

46. Vinderola G, Gueimonde M, Gomez-Gallego C, Delfederico L and Salminen S. Correlation between in vitro and in vivo assays in selection of probiotics from traditional species of bacteria. Trends in food science & technology. 2017, vol. 68: 83-90.

47. Van Loveren H, Sanz Y and Salminen S. Health claims in Europe: probiotics and prebiotics as case examples. Annual review of food science and technology. 2012, vol. 3: 247-261.

48. Nogacka A M, Ruas-Madiedo P, Gómez E, Solís G, Fernández N, Suárez M and Gueimonde M. Real-time monitoring of HT-29 epithelial cells as an in vitro model for assessing functional differences among intestinal microbiotas from different human population groups. Journal of microbiological methods. 2018, vol. 152: 210-216.

49. Choi H R, Chung YH, Yuk H G, Lee H, Jang H S, Kim Y & Shin D. Characterization of Lactobacillus plantarum strains isolated from black raspberry and their effect on BALB/c mice gut microbiota. Food Science and Biotechnology. 2018, vol.27(6):1747-1754.

50. Uphoff C C & Drexler H G. Hans G. Detecting mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. In Cancer Cell Culture. Humana Press. 2011: 93-103.

51. Tian Z, Yang L, Li P, Xiao Y, Peng J, Wang X & Shi D. Regulation effects of Enterococcus faecium HDRsEf1 on human enterocyte-like HT-29 cells. Animal cells and systems. 2016; vol. 20 (2): 70-76.

52. Bahram B, Macfarlane S and Macfarlane GT. Induction of cytokine formation by human intestinal bacteria in gut epithelial cell lines. Journal of applied microbiology.2011; vol. 110(1): 353-363.

53. Moshiri M, Dallal M M S, Rezaei F, Douraghi M, Sharifi L, Noroozbabaei Z, & Mirshafiey A. The effect of lactobacillus acidophilus PTCC 1643 on cultured intestinal epithelial cells infected with Salmonella enterica serovar Enteritidis. Osong public health and research perspectives. 2017; vol. 8(1): 54-60

54. Song S, OH S, LIM K T. The proteins (12 and 15 kDa) isolated from heat-killed Lactobacillus plantarum L67 induces apoptosis in HT-29 cells. Cell biochemistry and function. 2015; vol. 33(2): 89-96.

55. Shu Mei W, Wei Zhang L, Gu W, Hui Xue C, Chun Zhang Y, Zhang L, Luo X and Bo Li H. Screening for Antiproliferative Effect of Lactobacillus Strains Against Colon Cancer HT-29 Cells. Advanced Materials Research. 2012; vol.573–574:1039-1043.

56. Zaghi Benjamin. The Undergraduate's Guide to RNA Isolation. [Internet]. BERKELEY: UNIVERSITY OF CALIFORNIA, HE LAB; 15/5/2012. [Citado 29/05/2019]. Disponible desde: http://helabucb.weebly.com/uploads/8/3/9/1/83914476/rna_protocol_ben_zaghi2012.pdf

57. ThermoFisher Scientific. TRIzol™ Reagent User Guide. [Internet]. Calrdsbad, California. 9 /11/2016. [citado 20/12/2019]. Disponible desde: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf

58. Real time PCR: the use of reference genes and essential rules required to obtain Normalization Data relaiable to quantitative gene expression.

59. Mastropietro G, Tiscornia I, Perelmuter K, Astrada S and Bollati-Fogolín M. HT-29 and Caco-2 reporter cell lines for functional studies of nuclear factor kappa B activation. Mediators of inflammation. 2015; vol. 2015.

60. Capricon Scientific, Cell culture media, DMEM HPA. [Internet]. Ebsdorfergrund, Germany. [Citado 25/4/2020] disponible desde: https://www.capricorn-scientific.com/products/cell-culture-media/classical-media/

61. Capricon Scientific, fetal bovine serum, [Internet]. Ebsdorfergrund, Germany. [Citado 25/4/2020] disponible desde: https://www.capricorn-scientific.com/products/fetal-bovine-sera-other-sera/fetal-bovine-serum-fbs/

62. Capricon Scientific, Detachment, Trypsin-EDTA (0.05 %) in DPBS (1x). [Internet]. Ebsdorfergrund, Germany. [Citado 25/4/2020] disponible desde: https://www.capricorn-scientific.com/products/reagents-supplements/detachment/

63. Sigma Aldrich, HEPES solution, 1 M, pH 7.0-7.6, sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture. San Luis, Misuri, Estados Unidos. [Internet]. [Citado 25/4/2020] disponible desde: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h0887?lang=en&region=UY

64. Sigma Aldich, TPP® tissue culture plates, 12 well plate, flat bottom, polystyrene, 3.6 cm2, sterile, 72/cs. San Luis, Misuri, Estados Unidos [Internet]. [Citado 25/4/2020] disponible desde: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z707783?lang=en&region=UY

65. Green bioresearchT-75 Greiner Bio One Cell Culture Flasks. [Internet]. [Citado 25/4/2020] disponible desde: https://greenbioresearch.com/greiner-bio-one-cell-culture-flasks/

66. Zymo research, Quick-RNA Microprep Kit. [Internet]. Irvine, California, Estados Unidos [Citado 25/4/2020] disponible desde: https://www.zymoresearch.com/collections/quick-rna-kits/products/quick-rna-microprep-kit

67. Fisher scientific, Applied Biosystems™ Kit de transcripción inversa de ADNc de gran capacidad. [Internet]. Madrid, España. [Citado 25/4/2020] disponible desde: https://www.fishersci.es/shop/products/applied-biosystems-high-capacity-cdna-reverse-transcription-kit-4/p-4926517

68. Thermo Scientific, Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X). [Internet]. Waltham, Massachusetts, Estados Unidos. [Citado 25/4/2020]. Disponible desde: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0221#/K0221

69. RealTimePrimers, Quantitative real time PCR primer set. [Internet]. [Citado 25/4/2020] Disponible desde: https://www.realtimeprimers.com/real-time-pcr-primer-sets.html