

EXOPOLISACÁRIDOS Y SUS USOS

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a moléculas de exopolisacáridos y su uso para estimular el sistema inmunológico.

ANTECEDENTES

El consumo de productos alimenticios y de suplementos denominados probióticos, es decir, que contienen células microbianas vivas, para prevenir o tratar enfermedades específicas, está ganando popularidad constantemente.

Varias especies de *Lactobacillus*, pero también algunas otras, han sido propuestas y se usan como cepas probióticas, microorganismos vivos como suplemento alimenticio para beneficiar la salud.

Las cepas de *Lactobacillus paracasei* son grampositivas que no forman esporas y son habitantes comunes del tracto intestinal humano. Las cepas específicas de *L. paracasei* se encuentran naturalmente en varios productos alimenticios fermentados, y tradicionalmente utilizadas en la producción de leches y quesos fermentados.

Más recientemente, cepas específicas de *L. paracasei* se han utilizado en suplementos dietéticos probióticos, incluida la cepa *L. paracasei* DG (conocida comercialmente como *L. casei* DG®, Enterolactis®). Se ha atribuido a *L. paracasei* DG una serie de propiedades que promueven la salud, incluida la mejora de la colitis ulcerosa y el tratamiento del sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado y se han propuesto varios mecanismos para el efecto probiótico.

Uno de los mecanismos más estudiados se relaciona con la capacidad de las bacterias probióticas para antagonizar los organismos patógenos mediante la excreción de

agentes antimicrobianos o el desplazamiento de organismos patógenos a través de la ocupación competitiva de los sitios de adhesión. Además, existe una serie de informes que hacen referencia a los beneficios para la salud que resultan de la estimulación del sistema inmunológico debido a los componentes presentados en la superficie de las cepas de probióticos.

Varios estudios han demostrado que los polisacáridos presentes en la superficie de las bacterias, denominados cápsulas o exopolisacáridos (SPE), pueden desempeñar un papel tanto en el desplazamiento de organismos patógenos como en la estimulación del sistema inmunológico.

En este contexto, la presente invención se refiere a moléculas de exopolisacáridos y su utilidad como prebióticos y/o probióticos, en particular para estimular el sistema inmunológico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- La figura 1 presenta un análisis genómico comparativo de *Lactobacillus paracasei* DG con otras secuencias completas de genomas de cepas de *L. paracasei*. (A) Mapa del genoma circular de *L. paracasei* (genoma de referencia) y otros seis genomas de *L. paracasei* disponibles al público; en el mapa se destacan las dos regiones de exopolisacárido (EPS) putativo de la cepa DG.
- La figura 2 presenta el análisis de RMN del exopolisacárido (EPS) aislado a partir de *Lactobacillus paracasei* DG. En particular, la figura 2 muestra regiones seleccionadas de la 1H-RMN del DG-EPS, registrada a 70° C en D₂O y utilizando acetona como estándar interno, las resonancias anoméricas (H-1) están etiquetadas A-F en orden de desviación química decreciente.
- La figura 3 presenta el análisis de RMN del exopolisacárido (EPS) aislado a partir de *Lactobacillus paracasei* DG. En particular, la figura 3 muestra las regiones

seleccionadas de los espectros superpuestos COSY (contornos negros) y TOCSY (contornos grises) para la DG-EPS registrada a 70°C; los símbolos A-F identifican los azúcares individuales y los números (1-6) identifican la posición del anillo C/H.

- La figura 4 muestra el análisis de RMN del exopolisacárido (EPS) aislado de *Lactobacillus paracasei* DG. En particular, la figura 4 muestra regiones seleccionadas del espectro HSQC de DG-EPS; la ubicación del anillo individual y los protones H6 y carbonos se identifican en el marco superior, y la ubicación de los protones y carbonos anoméricos se identifica en el marco inferior. El espectro se registró en D₂O a 70° C.
- La figura 5 muestra el análisis de RMN del exopolisacárido (EPS) aislado de *Lactobacillus paracasei* DG. En particular, la figura 5 muestra la región anomérica de un espectro ROESY registrado para la DG-EPS; Los NOE inter e intra-residuos de los hidrógenos anoméricos a los protones del anillo se etiquetan individualmente.
- La figura 6 muestra la estructura de la unidad de repetición de DG-EPS, es decir, el heteropolisacárido aislado de *Lactobacillus paracasei* DG.
- La figura 7 muestra el análisis de la expresión génica por qRT-PCR en macrófagos humanos THP-1 después de 4 h de estimulación con una molécula DG-EPS purificada (0,1, 1 y 10 µg ml⁻¹), con o sin la adición de LPS (1 µg ml⁻¹). Los niveles de expresión de TNF-α, IL-6, IL-8, CCL20 y COX-2 se muestran como el cambio de la inducción (FOI) en relación con el control (macrófagos no estimulados), que se estableció en un valor de 1. Los datos se presentan como la media de tres experimentos independientes ± desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (según la prueba t Student no pareada de dos colas) en comparación con las células THP-1 no estimuladas (muestras bajo el eje Y izquierdo) o estimuladas con LPS (muestras bajo el eje Y derecho): *, P < 0,05; **, P < 0,01.

- La figura 8 muestra la organización funcional predica *in silicium* de la región EPS-b de *L. paracasei* DG; la figura muestra los resultados de búsqueda de BLASTN para la región EPS-b y se ha obtenido al agregar una imagen del grupo de genes EPS putativo sobre la representación gráfica de la salida de BLASTN. En blanco se indican marcos de lectura abiertos (ORF) fuera del operón EPS putativo; en negro están los ORF que no comparten una homología significativa con otras secuencias en GenBank. D.R., repetición directa de secuencias.

DEFINICIONES

En el contexto de la presente invención, el término “exopolisacárido” significa sustancias poliméricas extracelulares (EPS) compuestas principalmente de carbohidratos, es decir, polímeros naturales de alto peso molecular secretados por microorganismos en su entorno.

En el contexto de la presente invención, el término “prebiótico” significa sustancias que inducen el crecimiento o la actividad de microorganismos (por ejemplo, bacterias y hongos) que contribuyen al bienestar de su huésped.

En el contexto de la presente invención, “estimular el sistema inmunológico” significa principalmente activar las células del sistema inmunológico hacia cualquier elemento potencialmente perjudicial.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un exopolisacárido que comprende al menos una unidad repetitiva de ramnosa, galactosa y N-acetilgalactosamina en una proporción de 4:1:1, respectivamente. El exopolisacárido también se puede definir como un heteropolisacárido.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el ramnitol es 1,2,3,4,5-penta-O-acetil-L-ramnitol.

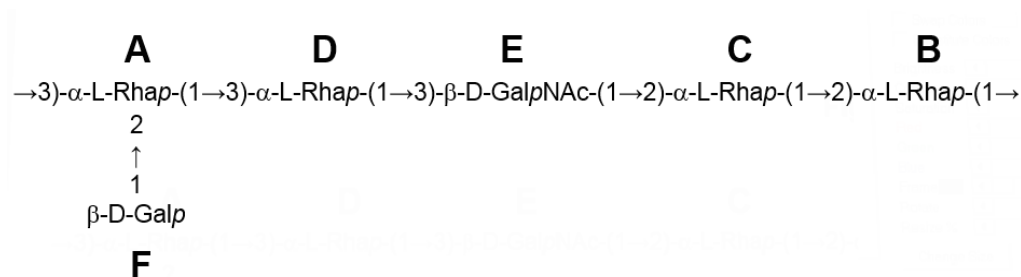
Según otra realización preferida de la invención, la galactosa es 1,2,3,4,5,6-hexa-O-acetil-D-galactitol.

De acuerdo con una realización preferida adicional de la invención, la N-acetilgalactosamina es 2-acetamido-1,3,4,5,6-penta-O-acetil-2-deoxi-D-galactitol.

De acuerdo con una realización preferida adicional de la invención, el ramnitol es 1,2,3,4,5-penta-O-acetil-L-ramnitol, la galactosa es 1,2,3,4,5,6-hexa-O-acetil-D-galactitol, y la N-acetilgalactosamina es 2-acetamido-1,3,4,5,6-penta-O-acetil-2-deoxi-D-galactitol.

De acuerdo con una realización preferida, los residuos de ramnosa tienen configuración L y/o la galactosa y/o la N-acetilgalactosamina tiene (tienen) configuración D.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el exopolisacárido comprende la unidad de repetición que tiene la Fórmula I:



(Fórmula I)

A preferiblemente como una ramnosa con enlaces 2,3; **B** preferiblemente como una ramnosa con enlace 2; **C** preferiblemente como una ramnosa con enlace 2; **D** preferiblemente como una ramnosa con enlace 3; preferiblemente **E** (N-acetilgalactosamina) con enlaces 1,3; y **F** preferiblemente es monómero de galactosa terminal.

De acuerdo con una realización preferida, **A** está unido preferiblemente a la posición 3 de **D**; **C** está unido preferiblemente a la posición 2 de **B**; **D** está unido preferiblemente a la posición 3 de **E**; **F** está unido preferiblemente a la posición 2 de **A**.

De acuerdo con una realización adicional de la invención, el exopolisacárido se produce o puede obtenerse a partir de la cepa *L. paracasei* DG o de una cepa mutante de la misma.

En otras palabras, cuando estas bacterias se cultivan en un medio o caldo apropiado a la temperatura apropiada y durante un tiempo predeterminado, las moléculas de exopolisacáridos se secretan en el medio o caldo. Este medio o caldo se define como medio condicionado, lo que significa que contiene los metabolitos derivados de las bacterias. El exopolisacárido es uno de los metabolitos.

En algunas realizaciones, el exopolisacárido permanece anclado o es parte de la membrana celular y/o la pared celular. Por lo tanto, en algunas realizaciones es posible aislar la membrana o pared de las bacterias en las que dicha membrana o pared comprende el exopolisacárido de la invención.

Por lo tanto, como alternativa o en combinación con el uso del medio condicionado, es posible utilizar la fracción de la membrana o pared de las bacterias que comprende el exopolisacárido o sus fragmentos.

La cepa *Lactobacillus paracasei* DG se ha depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur con el código CNCM I-1572.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al clúster de genes que codifican las proteínas implicadas en la síntesis o expresión del exopolisacárido de la invención.

Este clúster comprende la SEC ID NO: 1 o fragmentos de esta, o cualquier secuencia que tenga 80-99% de identidad.

SECUENCIA	SEC ID NO	NOMBRE
ccatctttag attattaaat aatattatcc tagattgcaa taataaagtt accacctagaaagaggcttg ctactgctt gaactggggt ttgccaacgg agacatttc taggtttgtattgataaac gctgtggctc gtgtaatatt ggctctgaa acctgatcaa actgtgtcccttcgggaaa tagtagcgaa gttctcgatt gaaccgttcg ttcgtgcccc gttcattcgggtgataggca tggcaaaagt aaatcgggat ccgatagcgc tttgtaagcg cctgatcgaggaaaactct ttaccgtgat caaccgtcac tgatgaacc ggacccgga agtctaccatcagtcttga aatccttga gaacagcatt ttgtgataag tttcaagct tagttgtcgccattaaacgt gtcacccgat cgacaatggt caaaacagca gccttgacc cgcgaccaccgcgaactgta tccatctcta aatgtccttt ttcggttcgc cgattagctg actcactgcgaatcctaatt gaggtgccta ctgcttggt atagcgcgac cgaaggtctt gtctcttttatgacgttta ccgtgatcaa agagttggct tggctgaaaa tgcactgtc ttgataaatccagtgtgaa atcgtgtgtg gcgcacagtg aacgacataa ccgaccattt caggggaccaaacctagggtt agcttctcag ttaccatccg cttaactta ggcgttaaaa tcgagtgccgaccacaacga tgcgacaag tatcggcatg atcctgagct ataattggcg agtaatcacctcagggcaa cggtaagct catgcctaag agaaatacga gagcggccta aggtcgcggcgatgtattga atcgtgtgtt gttgcatcag ttctatctga gatcgttcaa ttaaggtataatggccatg ggacctgtcc ttctctctag atggtatgtt atgcaaacac cattttagcaagaacggaca ggtcttttt cacattttct ggggtgtaac ttaattatg caatctaggtataaaaatct ttgatagcc cggcgtttca tctaattgta aagcataacg ccgcacattaaagggtgggg aaaccatgtt agacaatac gggaaattgg tgcaccaaca gcgcgcgagtttgaacttga cgattgagaa gttggcggag cgatccggcg tctcgatcag tctgatttcggaatggagc gtggagacgt caacaatac agcataaaaa aattgaccga cattgcgcgggctttaata tgcaggtagg cgactcttt attgctccgg aaatgagcga tattagcacattagcgttg tgaataactt aaccactta ccagagaaag aacgggcgcg tgtttccgaggtactcatgc aggtgattaa cctgtaagta ccacctttt agaacagtct gtcactgaggctgtcttt ttgatatac aaaatgtcag aatgacctta aaaggatggc gcaaccggtgtcagtcagc tggtaaaacg cgtatactaa atgactgat ttagacaat gaacgcgaactgcacgggt agcttggtt gacaagtgg cactgaatag ttgatcaagt attgttcggctaacaggct ttctcaca taaccaaccg ccatgtggag aacgcatttt aaaagaaggagaatgatcga catgacattt gaagcaattt taccgtcctt taaagccggc aagaaggccgttcgcaccgg ctgggaaggt actgagttgt atgtgcaact agttccggaa ggcaaatcgaaggcgacac ttgaatccg ttttttga tcaaaactgc cgacgaagct ttactgtctgttcaccgac tgacttgac attttgctg aagactggca gcttgtaac gcatgacgcatttcgacttc accgacaaga ccgtcatcat caccggcgcg gcttctgga tccgtgcggctcaggcgcg gctttcagg cagctgggtc cactgtgta ggaattgacc tccaaccaattagcaacctc acagacgcca ttcaggccga tgtgagcgt cctgccacgg cagcagcgattgcggtcaa taccagccag atattgtctg caatacggcg ggcgtgttg atggttatcaaactgtgacc gatacggcg tctcgcatg gcagcacatt ctcgatgtc atcctaccagtcagttcta atgatcaagg cgctgctgcc ggggatgctg gctcgggtc acggtattttcatcaatag agttccatc ctggttagt cgggtgtgtt ggcggcttg cgtatactgtgtaagcac gccgtcatc ttctacca gcaattagac ctgattacg ccgcaagggcattcgcgc aacgcgctc caccaggcg tatcaacacg ccatgaacg ccgctgattttccggcgac gggaaaatgg ctgctgtgg agcgcgcgaa acccagcca aacgctgggccaagccgag gaagtgcac aattatcctt gtttctggc agcgtatctg ctgattatattcatgaacc gtgattcca ttgacggcg ctggctcga aagtaaact aatgattgcaacacaaaaa ctgaaaacgg aaggcaatcc ttccacgacg atacttact tcctttgatcgtgttacta ctggcatagc cacaaggag aacaacatg caaacaact caaccaccatcgttaatc gtcagtctc ccaaaaccg catgatcag tccattacg tctgtatgacctcatgctc agtccactca gctcgggt cgtacaagt cggttctcg agatgtcaactacacggca ctctcaacc gccgttatgt ctggggcgtc acgctgggtg ttttttgccaatttaacc tctgaaccg cactctcga tctccaatc ggcacctcg gcagctcgtcttcatc atcagccgt ggtagccaa actcgtccaa ccaaaatgg ctaaatcaccatcatgggt atcctttcg ccttatccat gttcaccatt gccggcgaac tgaccatctcacaagaatc cacttggc caacctacg taccatcgc ctggcgaag ccatctcgatggcgtcgtt ggcgttgta tcatgattt gacgcgatt gtggatttg ataagtaggcgataaggcta ttgaaagg ctcctataga aaaaagctta ctggcaggaa aggtttcgtgaagctttc gatctggcag aagggaagc aggtctgatt gctgtgtca aaagtgtcgcagggttag gctccgat cactgattt tggtaataa ttggttaa acaaaaaagcatcaagacaa ttgtctgat gctttttta atggaaggga tacgccta atctttttaagcaagatgc taatcctagg taatgatgtt ctttcatg ttacttttc aatgtctgatgacatcct agcaatcaac gttagtaat gcggccggc agcgtcgtt ggatggacaccgtcatcagc aaaccagtcg tcatggcac ctgccagata ataccaatcc accacatgcagattggcatg ggttttagt gccgatgaa tcagctgtt aaccggatca atccagctttcccgagc atacgcgtc accagaaga cctgacgtc agtccaaagc tgatccagaatccgttaat gtcggcctt gtcaggtc cgttcgtcc caaactgatc acaaccgtgttgaaccaact accattgcc ttcatgtac taataatcg aggtgtcgc tgcacctgcgaccaactc agcatcaatc gacatctcg gaaaaagcac cttcaaata gccgaactcccagcataat cgaatcgca atcgccgaca ccggcaatgt ttggccgca ttaatctcgtgtcagttaa gccataaagc cgatactgat tcagaacctt ttctcttc acctgccttagaatcct ctgaatgcgc tgcgcgtc attggttaac cgcaatgcc tctcagactgataatgctt gacgtagaag aaccccgca caccagcagt tgccaatccc aacgcgatacttaatagcca gtctcgtaga cgtagctgt ttttttcat gatttagta acccccaaaattgcattgc ttatattta aactaaaaat caggtagtc tgattacaag ttaggtcattctgacgggt ttataggaaa ctgtaaatag actgtaataa aatgaaatt gaagtaccaaccttagtaa aaggcgtgta tatcggattc aaactaatct gatagtacaa ccaaaaacatgacattcatt caaacagggt agactcgtc acacatgcta ggttattatg gtttgagtagagtttaaa agtcttttt agaaatgcg gctgcgtc ttgtgtccg cattttgaggttgatata aattatggga ttagggtggg aaagagttaa tgaacaagca aatcgacct tgcagttgt ggaatgtatt	SEC ID NO: 1	<i>Cepa</i> <i>Lactobacillus</i> <i>paracasei</i> DG Exopolisacárido- b región EPS-b

taaacgcagc ttgttgcaa tgattattct cggaattctt gggatggcgg ctgcttattt cggtgctaaa acgtttattt cgccaaaata tgagtctgat acgtcattgc tggtaaatcg caagcaggat aacgatccaa acatgcaatt gaatgctcag caggctgata ttacagatcat taatacatac aaggacatta tcacacgtcc agtcgtttta caggctgttg cgagtgaact aacaagtccc cagcgtgtat tgataaaaaa agctacaaaag gcggtttatg gtacgcgta caatgaaca acagggttc gagaagaata tgttactcaa aaagctcaac cggcgcaata taagttaaag ccagctcaat actccaatct tcatctacc gatcttgcta aggtcgtaac agtatccaca cagcaaaatt ctcaagtgtt taccgttaac gttaaagata cagatcctgt tcgggcaaga gatattgcaa atgaagtgc taaggttttt gaaaagaaaa ttgctaaaaat catgagcatt tccaatgttt ccgttgtttc aaggggcaacg gctgatccga taccagtatt gcctcggttg aatctaattg cattaattgg cctagtttta ggagtcttg tcgctttcgt ttggggattg attcgagaac tgacagatca gaccattaag gatattgact ttatcacgga cgacctggg ttggttaatt tgggaatagt caattatgtt caacatatgc gtgacatgag tgaagcgtc gatgccacaa agtcaataga agctgaggat actgaagatt acgatgcgtc ggactttccg caacgtagcc gtcgccgaat ctaaggagga agaaaacatg aagtgttctt tcaacaact ttccaccgg caacaagaag atcaagaac tcaaaagaac ggggtcattt tagtcacttt cgctgaacca aaacatgttg ttcagaaca gtttcgaca gtgcgaacta atattgagt ttctggagca gctctgata agtgtaagt tgtattgtt acgtcttcag tgatgtccaa gggcaagtgc actgttccg caaacgtgc ggtaacttg gctcaggcgg ggaaaaaggt ttactgatt gattgtgacc ttcgacgacc gactgtacat gcaactttc gaacgcttaa tctagaggga gtcacaacag tattaacggg gaaaagtct gtcacaata tagttgagca aacatttg agtaatttag atattctac ctccgggccg ctacctcca ctccgtctga acttttaaat tcacaacgta tggctaacct cgtggattgg gacgcgaca attatgat tgtgttcta gatgcaccgc cagttttggc agtatctgat gtacaggct tagtcccaa aacagatggc gtatgggtg tcgcaaagat ggggaagact ttaaaggag acttaagacg aactattgaa gttctgaagc ttgcaaaagc taaacttct ggatgtgat agcgtgtgaa tgttaacgt ggcgatcgc gctatggcta cggttatggc tacggttatg ggaatgaagg gactaaataa tccgatatta tcaacctaaa gaaaaaaggc atagctcaaa tattataaa ttgatctta acgcattgt gtctgtttt gatgttggg tggttatctg attattatg tgatttaata gtggcaagaa aagttataa atttaataa ctgcacaaa gattttaag aatgcaagt ttattcttg caaagtga aaagtatt cgacttagc acggggaacg cgacatacta aagtcacttc acgtagtgcg ttgggggag gaaggatcat gtatcaacac ttcatlaaaa gaattttaga tttttgga gcaataatag cattgcta ctggcaatc ccgtttatca ttattgcaat acttattagg atggattcaa cgggtccagc cttttctg cagcaaagaa tgggaagga tgggaagccc ttagaattt acaagtttcg tacaatggac caagaggccc cacacgatct tgcaactgct aaactagata atgctaataa gcagattaca cgggtcggc gattgtccg aaagacaagt attgatgagt tacctcagt cattaatgt taaaggcg acatgagcat ggtcggacca cgtccggtg tctgacaga aactgagcta attgaatgc gtcacaaaaa tggcgctgaa agtgcttac cggggataac aggattagc caggtaaagc gaagagatc gttatccaat ttaagtaaat ctaattacga tggatttat gtttctcaa ttcatttt tatagattca aagataatgg tcaaaactt ctggtatga gctctcgat taggtattg agaagtcgt ccaaattcta aaaaagtaa tgcgtctaat atcggagaaa aaaatattag gccgaacgaa cagcaactat ttttaaaaag gaaagcttag atttaatgaa tgataatac aaagaaatta gctttgtac cgttactat aacagcgcaa aagaagtgc ccagttata gaaaatag agtctctaaa aagcgatttg tttctcac gagtttcat tttgataat ggggtccaa agacacagt gaatatagt taaagctt ctcaggaaca ctctaactt gtttaatta ggcctgatg gaataggga ttggagcag gcaacaatca ggtgttaaat atgattacct cggattacca tattctgatt aatccagatg tgcgtatacc gtctccaga acgattgaaa agatgatcgg gtatatggat actcattctg atgttgact gttatcccc aaaattcta atgtgacgg ctacgtcaa aaattatta gacataatc tactgtact gatatggcgt tacggtcat ctcacctaat ctatgaaaa aaaggcaaga ttggtcgt catgaagaga cgggtatc tcagagcgga gtgatcgtc aagctagtg agcatttat ttttccgta catctgatt taaaggata gcgggtttg atgagagata cttatgat ttgaggatg cagacattac tcgtaaggc aatgctgta gcaaagcaat ttttatct gaagtaagca tcatgcataa gtggaatcga caaaatcatt caaagtga attcattggc tatacaatta agagcatgt tcaatattt aacaaatgg gatggaagt attctaacca ctggggagat tgattgaatg atttgctg gaattgtctg tattagctt atatctagt gttccaaaa attagagaag tcagcgggt tgatatctt ttgggtta ggtatttg cgggcacacc aaatattg tacgatccg atgctttgt ctattaca aattataat cgggcactga ttattcgag acaggatata attgggtgac aaagctatt gagcctagt tagattatca aacatttaga ttatacagta gttatttat ttttctctg atgttttag cagtacttt gatgacaa cacgatcaa gtattcggt gtttatgca atcgcaatgt ttcgggtga taaagcacag actagaaatg tcagtcagc cgtctttgt tctttttg agttcstgt ttttctgt aagcttgga aaagaggaat tctcccta ttactggca ttttattag gatctttt tcatagtct gcactctact tttttact accattata tggttgta aaggcttat tgaaaagcat ttttgcga ttactacatg tctaattgt gtgcgtta ttttgaaat cttaggtca acaagcatag cgccactatt agtacaact ttgggaaagt ttgcaaatc tgcgaacgt gcagaaaatg tgtcaactt atatgctgga ggtcagcat ttatgctg tttgtttct ttcgcagta ctatgatg aatttaaca gttcaattc ttagaaggca ataccctaac aatatgagat cctattacca aatgattta tgttctcga tattatggtc agcagcgta atattgatg ctcttcaat gtactacata agaattcga gaattgtac gtactctat ttatctata tcgtgaatgt tacttcaaat cagaagagca cggatcgct tataggggtg acaatcagta ttggatctgc agtcgtttg atgttgcg ggttatgggt ctacggatt agtggtgacc aaatcgagc aattttggg ttatttaag gggactgaag aatgtgaaa gttggagtaa ttgtgttac ttacaatccg gatttaatga ttctacagaa taatctgacg actactaaaa ggcaaatgg catcaactgt ctgattgtg ataacggctc taagaattca aacgatttaa aaaaagtaag tgaaaacta aaagtcaaca ttatttact tgatagta ctggggattg cttatgaca aaatcgaggt ttgaattt tcaaaagaga aggttaaag tggcgctta cttagacca agacagcata gttctgata acttactaga agtgaatga aagcaaaaag aattgaactc ttccagaca gcaatttaa cttgatgta cgttgatg gactggactg gaaagcaaaa agaagctatg cttcagcgtg aaaagattgt gcaaaagcaa tatgtcatt ctcaggtaa tctgtaaga atttctct ggcaaaaagt gggtggatt gacgaattc tcttattga catggtgac ttcgacttg acgctaaact atttttagct ggcttaaaa tctggcagac gaatgaagtc gtactaaaac attctgttg acaatctta aagaagccca tctgaaaaa aatactctg attccagaaa ctgctattt ggccgatcat tcaccaatc gtcagtata cattataga aatagtata tttcgagaa aagatacag atgattacc aacgaaagt ttgtgtct catacttcg ttgcaacaag gagaatgtt gcgtatagca ataagttac caagatgtt gcagctggc cggagattat tgatgtgcc agatacaatg tagacaagga caaacaatt aaaaaaacac tggcaaaact gaaacgatag ttattgggg tgaaataatg agaagtgaac acgtaagtgt cgcaattgt ttagccacgt ataacgggga gaagtattta gaaaaacaga ttgactcaat agttcccaa tctgtctta gttggacatt gtttattaga gatgatggt		
---	--	--

ccaccgatgg aacgcaaaaa atcattaataa agtttgcaaa gaagtatccg caaaaagttt tcaacttacc agggttccat ggaggcgga atctaaaga aaatttttt actattctgc aatgggtgag cgaacacaaa acttttgatt attttatgtt ttctgatcaa gatgacattt gggtacctga taaaattgca ttaagtgtca aggctattga ttctgatgat tctccatgtt tagttcatc tgatctaaaa gtgtcgata aaaacttgga tacaataaca gaattcttca ttcggtacag taacttaaat tctcaagtaa aggatttttc gcatacctt gtacagaaca atgtaactgg ctgcacaatg ttgtggaata agagttaaa cgatttaac gattttcatc cagattctag aatccttatg catgattggt ggattgcttt aattgcatca gcgtttgaa atgtcgtctt tgtaaaaact ccaaccatcc tctatcgaca acatgatgaa aatgtagtgg gggcagaagc ggctgggtct gtggcatata ttatttcaa atgctgtaat tataagttga ttaaaaaagg attgcaacgt acctttgggc aagcaaatat tttaaagag atttattatc atcgggttaga tgccagttct aaaagtatac tagatgagta ttgcagctt cctgccaagt ccaaacttag aaaaatatat ctttcttca agtatggatt taaaaacaa agcaccatac aaattattgg gcagtttctt ttgtctagt ctgttagggc tgattaattg cgagttttaa aaaattattt atatagtgtt gggtatcaag ttctaaacat gatattgcca ctcataacag gaccgtatgt tgcacgagtt ctggaccga aggggtgttg gattaatact tatacagggtg cagtaacaca atactttgt ttattcgtg gcctagggat agcgtttat ggaaatcgac agattgctta tgtaagggt gaccacatc agtaagcat taccttttg gaaatacagt ttattaaaac gattacaaca gtttgcgct ttgtcgttt tcaatatat ttaatttcg tcaaagaata taagttttat ttactgttac aatccgcgta tattttagct acaggattg atatttcagt gctttatgag ggcgttgagg atttaaaaa gacctttact agaaacacgt tagttcgaat agtctccctt gttctaacc tcacgctgtt acacaaacaa agtgacgttt gggatacat agtcttctc gcagcttcta acctcggtgg gtatgttgcg ttgtggcaa cttaaggcg gctgctcgta ccattaaac tgtctgaatt acatcctagg aaacattga agggcacact gattttatt gtgccataca tgacgtgaa catttacct atcataata aaacattact caaacattt ctgggggtg atgttccgg ttatttgaa aaaagtgat tgatgatac tatggcgtt acagtagtga cgtcggaag cgcagtatta ctgccacata catccaaggc ttgtctgat ggcaagggtt cgtaattaa gaaattgcta aaaacctct ttggatatgt gtccatgatg gcattcccaa tgcattagg aatggcgga atagcacc aaattggtt ttctttat ggtgaagggt ttgcaccgt tgggccagca atgatgata aatctagtgc cattatttc atgggggtgt cgagcatcac aggtaacag tatttaattc cgacgatgca gtcaagcat tacacgcaact cagtcttct aggcctggtt ttgaatatt ttctgacgt tctcttacc attattttg ggcttaattg tgcagcgtt gctacttga ttgctgaagc gtttattgt atatacagt taataatgat cagtgtcag gttgattt ccacttggct gatggacac attaatatt gtgtagctgc tataatcat ttctgcttg tttttcgc aagtagcatg ttgacgatga ccatctgac cttagtgc gaaatcatgc ttgtgccat cattactta gtatgtctgt ttctatgaa acccgcaact aataagcaac taaacgggc agcatttca attattaacc gagtcggtc atgattatt ttgggggaat aatgacaata agacgaagag ttcttggtt gattcgttca cctgcacgat tacatgtgt gtatcggatt gacgattta caaataatt gaagttcga agactgtac atatactatt gatccagtc ggcatgtta acttaattag gctaaaactg atgactagat cacctgaaaa gttatgtat caattatcaa ttgtactac agtcaaaaat gaggtccat acttaagaga gtggctgaga tatcacatt cggttgagt acagcactt tatctttat ataatgatag tcaagataac ttgatgaag tgtaaaaaga ttttccgac tacgttact taacaaagat acacggacga gttagacaat ttgatcata caatgacgc ataaatcgt tcaggatga acaaaagat atggcggtga tagacgcgga tgagttatt tttagaccag gtaaagacaa gctgttacta cctctattg attatttact tcaataaag tcattggag gattggcgtt gaattggga atatttggt ctgcgggtt aaaaaagaaa ccttaggat tggttaccga caactttga tatcgggcca acgataact taggaaaaac aggcgtggtt aaactatctg caatccgaga aaagtcttt acttttcat tagccatgct gcaaattact tgccagggtt ttatgcagt aatgagaatc aggaaaaagt tgattggaca acaacgcaag ttcccagat cagtaagatt agaattaac actatttc aaaatcaca gaagagttt tacgaaagc agtcgaggc gctggggatg ttgtggcct tagagactta ggagaattcg cagaacatga tcgaaatgat gttttgac actcgttag agttataat gaatcaagag gtttaacaa agactgagg ggatattgaa agatgaagg gattatatta gctgggggat ccggaactcg acttatcca attacgaag caacaagtaa acagttagt ccaatttat acaagccat gattattac ccattctct cgtaattgt gtctgggac aaagagttt tgattttc tacgccagaa ttctgccac agttgaaga attatttgt gatggacata ctctgggact aaatattcat tacaagggtt aaacagagcc aaatggattg gctgaggcat ttactcttg tgcgattt atcggaatg attccgtgc tttagtctg ggagataatg tttttatg tgctgggtt tcaaagctat tacaagatg ggccgcaaag gaatctggc ccacaattt tgggtacag gtaactgat ctgaacgtt ttgttagta gaattgata gccatcaaca cgtgtatcg attgtgaa agccaacca tccacgcat aattatgag taactggtt gtattttat gataatgat tggtaatat tgcaaaaaat gtaagccat ctgcgctgg cgaactgaa attaccgat tgatgagga atactctgt cgcgggcagc tagatgtaaa agttatgggc agaggtatg ctgtttaga tactggaacg catgactcat tgctgtctg ttcaagttt gtgcaacta ttgagaatca acaaatctt aaagtggcgt gtctgagga aattgctt cgtatgggt atattaatc tgaacagtg gaagaactg ccagccgtt caaaaaaat gattatggtc agtattgtt gcgttggtc aaggaggaga gtaagtaag gctttaaag taatccgac aaagttaact gatgtcaagt ttgttagac agatgtttt ggtgataac gcggttctt cacagaacg tatactgac ctaagttca agaggcggc atcacgaat attcaatca agataatcag tcattgtct ctgaagcagg tgtgtgaaga ggcattgact accagatggc tccatgca caaacaat tagttcgtgt ggtaactggt gttgtgaag atgtttgt tgacatcca aagggtcac caactatg tcagtggga ggatatatt taagcgaatt caaccatgc caattactg tgccaaagg gttgtcat ggtttatta cattaactcc aatgttaat ttgttata aggtgaagg gtattatgt cctgaagct atcgtggaat tgctttgat gatcctgaca ttggcattaa ttggcaatg tcaacagcac acctattat gtctgagaag gatcaacacc atccacagct gaggatgct gaaaataact ttgtatcgg ggagattga taatgaaact tatgatcact ggcggggctg gtttatcgg ataatttt gtccattt ttataataa ccatccagat gttcagatta ttgtttgga caagctaaca tatcccgga caaagttca tattgaagat atctgggc atcgtgtcaa attagaagtc gggatattg ccgacaagaa ttgtgcat aaattgat gtgaagtcga tacagtgtc aacttgccg cagaagtc caatgacaat tggttgata atccgatcc gtctgcac agcaatgta ttggcaccta tactttact gaagcagcaa gaaagtacga tttcgattc caccattt ccacagatga ggtgtacgga gatctaccat tacgtcgga tctccagga cgcgggaag gccctggcga gaagtcacc gtaacagtc gttataatcc ttccagcca tatttcaa ctaaagctc cagtacatg ttgtacatg catgggcacg ttatttggc gtacgcgca caatttcaa ttgctgaat aactatgtc cataccaaca cattgagaaa ttacttctc ggcaaatcac aaacattta agcggaatca aaccgaagct ttatggcact ggcaaaatg ttctgattg gattcacaca aacgatcatt caagtctat ctgggatatt ttgactaac ggaaaattg tgagacttac ttgatcgcg ccaatggcga aaaagacaat aagacgtac tcgaacttat cttaaaattg atgggcaaac cagctgata ctatgaacag gtaaggatc gtccgggca tgatatgca tatgccatt atgcttcaa		
--	--	--

aaccggtgaa gaacttggtt gggaacctca gtatacgaat ttgaagaag gtttagcaga taccatcaaa tggtacacag atcatcacag ctggtggcaa ggtgaaaaga ctgcggtaga agaaaagtac caagaaaacg gtcaatgact ttagctcata gtaatggtcg tactaatta tgaacctgtt atttctgga atgtcgagga gaagatacat gaagactttg attactggtg cgcaaggta gcttggtaca gaattgcgcc gcctattaga tgcgcagggc gttgcttacc gagcaacaga tgcccatgat ttagacatta ctgatgagac tgcggttaat cagtatttta aagattatca acccgagtta gtttatcact gtgctgccta tacggctgtc gataaggctg aaggtaagc taaggcaatt aatcaaaaag ttaatgtga cggaacacgt aatttggcaa aagcggccgc tgaagtagat gcgacactg ttatcatcag tacagattat gtatttgatg gtgacagcaa agaaatttat accgtcgatg atcaacctgc tccacgtaat gagtatggcc gggcaaaaata tgaaggtag caacaagtc aaaaatatct taagaagttc tatatttta gaacctcatg ggtattcggg gaatttggc ataactttgt ttatacaatg ttgacttag ccaagacaca caaagaactc agcgtgtcgc acgatcaata cggctcgtccg tcatggacca agacactgc agaattcatg acgttcgcag tgaatcaaca ttggattat ggcatttacc acttgtctaa tgataacagt tgaactggt acgaattgc tagcgctatt ttggctgaca aagatgttga tgtaagcca gtatcgtcat cagagtatcc gcagaaggca tggcgtccgc gacattcgat ttggactta agtaagacga aggttacagg cttaagata gacactggc aagaagctt gacaaactt ttacaagtta tcgataaata agtgaacta gatcaagtgt atcaaaaaga acgtaaaaac caatctggcg attggtttcg gcgcccttt gatacacgta acaataacgg gtctacactt tctggtgtg agaaataatc agcactgaac gtgtaggcc ttttggata acgcaaaaag acacctattc agtgacctg ctatgctgt tagcgtcgaa accaaaagca agcgaggta tgagtaaag tccaatacgt attctacact gtccgtcctt ggaataccag accataatat caaagtagcc ttgttcgtc atgaatatcg cggcaacggg gtacgtcgcc gccagatca tgtgattgat gctgagctga cttaccggtt acactgtgtg gctttgaggc ctgacacct aacgggttt acacggcca tgtgcgctc ctcaacggg ttgaatgcc gacagtcatt gactgcaca agcaacgatg gcgctgcat aactgttacc acacagtcag tgccaagcgc ccactcgtc aaccaacca cagatcgcc gtcacatga cagagcgaat catgaagta gcgatgaac ggttgccagt caaaaccatc gcccgattta tcggaatc agcctcctcg gttcaacgga taittgacca aaatctcaaa ctccgaccgc ctgcgcggct acccagcga ctctgcttg atgagttccg ttccactcat ggcgatgt cgttatctg tctgatgcc gattcacatc atctgattgc cttgctggt gatcgatgca accgcacgat taaaaactc ttctcgctc attattcact cgctgaacgc actcgggtcc agacggtcac catggacatg aatgcagctt atcagacgat tattcatgag gttttccca aggcccaagt cgtcattgat cggttccata tcattcaact tgcggctcgt gcccttgatc aggtacgct ccaagcgtc aaacagctg atgacaaaca cagccgtcct tataagatca tgaagacaaa ctggcggtt ttcatcaaa ctgcgctga cgtaaacac aaacagttc tgttggtt gaataagac gtcacgaac aggaggccat cgataattgca ctgatactg agccaagct caagcaaac tacgagacct acttagcgct tcatgatgt ttgatgtga agaaacatcc cgcggaactg gcaaacctgt tagctacta cgagccaaac ggtacggcaa tggacatgac gatcgcgacg ctaagcgac acaaagtcgc tgttctcgcc gctgtacca gcccttatt caacggtccg atcgaagggt taaccgcctc atcaagtcac tcaaacgatc ctgtttggc ttaagaatc agtgaactt ctcaaacga atcatacca atcacggcat aacatgaca agacggcggc atgatccta agctataata ggcgcagtaa tcacctcag ggcaacgta agctcatgcc taatagaaat acgagagcgg cctaaggctg cggcgatgta ttgaatcgtg tgggtgtgca tcagtctat ctgagatcgt taattaagg ttataatgc catgggacct gtcttctct ctgatggta tgtatgcaa acaccattt agcaagaacg gacaggtctt ttacacatt ttctgggtg taacttaat tatgcaatc aggcattaag ggtcaaatc ccagatgata atatgcctga ttcatata atcgcgtgtg aaaaaggaa attaatctta ggagaattga tgatg		
---	--	--

Como se muestra en la figura 8, las regiones que codifican las proteínas A-P son fundamentales para la síntesis/expresión/secreción del exopolisacárido.

La SEC ID NO: 1 comprende secuencias T1 y/o T2 correspondientes a secuencias de transposones. Estas secuencias pueden usarse para mutagénesis insercional.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, la SEC ID NO: 1 o fragmentos de esta se introducen, eventualmente usando un vector, en una célula, preferiblemente una bacteria.

Esto permite obtener una célula diseñada, preferiblemente una bacteria o levadura diseñada que comprende la SEC ID NO: 1 o fragmentos de esta. La célula diseñada produce el exopolisacárido de la invención.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un medio que comprende el exopolisacárido de la invención, preferiblemente dicho medio es el medio condicionado en el que han crecido las células que producen dicho exopolisacárido. Estas células son preferiblemente bacterias o levaduras, preferiblemente diseñadas genéticamente. Alternativamente, las células que producen el exopolisacárido de la invención son la cepa *L. paracasei* DG, que es la bacteria que produce naturalmente el exopolisacárido de la invención.

Preferiblemente, las células modificadas genéticamente comprenden el ácido nucleico SEC ID NO: 1 o cualquiera de sus fragmentos.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición que comprende el exopolisacárido tal como se describió anteriormente o el medio condicionado tal como se describió anteriormente y otros ingredientes, preferiblemente excipientes.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al exopolisacárido de la invención o el medio condicionado de la invención o la composición que comprende el exopolisacárido o el medio condicionado de la invención en combinación con cualquier otra bacteria o levadura probiótica. Preferiblemente, las bacterias pertenecen al género *Lactobacillus* y/o *Bifidobacterium*.

Preferiblemente, dicho *Lactobacillus* pertenece a una especie seleccionada de: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus kefiranofaciens*,

Lactobacillus kefir, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus sanfranciscensis*, más preferiblemente es la cepa *Lactobacillus paracasei* DG®.

Preferiblemente, dicho *Bifidobacterium* pertenece a una especie seleccionada de: *B. animalis*, *B.B. angulatum*, *B. asteroides*, *B. boum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. denticolens*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. inopinatum*, *B. lactis*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. subtile*, *B. thermacidophilum*, *B. thermophilum* y *B. tsurumiense*.

Preferiblemente, dicha levadura es *Saccharomyces*, más preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces boulardii*.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al exopolisacárido de la invención o el medio condicionado de la invención o la composición que comprende el exopolisacárido o el medio condicionado de la invención para uso como un medicamento.

Preferiblemente, el exopolisacárido de la invención o el medio condicionado de la invención o la composición que comprende el exopolisacárido o el medio condicionado de la invención se usa en este contexto para estimular la respuesta del sistema inmunológico en un individuo que lo necesite.

Por lo tanto, el exopolisacárido de la invención o el medio acondicionado de la invención o la composición que comprende el exopolisacárido o el medio acondicionado de la invención es (son) útiles como alimento funcional y/o prebiótico.

En otras palabras, el exopolisacárido de la invención o el medio acondicionado de la invención o la composición que comprende el exopolisacárido o el medio acondicionado

de la invención se pueden agregar a cualquier alimento, como leche, yogur, queso o jugo para estimular la respuesta inmune.

Por lo tanto, el exopolisacárido de la invención o el medio condicionado de la invención o la composición que comprende el exopolisacárido o el medio condicionado de la invención puede ser útil como adyuvante para tratar cualquier enfermedad o déficit o afección causada por una respuesta inmune deteriorada o comprometida.

Preferiblemente, la enfermedad o déficit o afección de la invención implica una regulación por disminución de al menos una citoquina, preferiblemente seleccionada entre: IL6, IL8, TNF- α y CCL20.

De hecho, los ejemplos aquí proporcionados muestran claramente que el exopolisacárido de la invención puede aumentar la expresión de citoquinas, con particular referencia a IL6, IL8, TNF- α y CCL20.

Por lo tanto, el refuerzo del sistema inmunitario o su respuesta se debe principalmente a su capacidad de activar citoquinas, preferiblemente la expresión de citoquinas proinflamatorias.

La enfermedad o déficit o condición preferiblemente utilizada para tratar enfermedades intestinales, preferiblemente es seleccionada entre: enfermedades autoinmunes, preferiblemente artritis reumatoide, lupus eritematoso o miastenia gravis, inmunodeficiencias, reacciones alérgicas o hipersensibilidad e infecciones preferiblemente bacterianas y/o virales.

Además, el exopolisacárido de la invención o el medio condicionado de la invención o la composición que comprende el exopolisacárido o el medio condicionado de la invención puede ser útil como adyuvante para curar o tratar afecciones no patológicas asociadas a estrés, cambio de estaciones, deficiencias de vitaminas preferiblemente B12 y/o B19,

edad, embarazo, abuso de alcohol, uso de drogas y envenenamiento por metales pesados preferiblemente plomo y/o mercurio.

EJEMPLO

Identificación del clúster de genes putativos EPS

A la luz de la importancia potencial de las moléculas de EPS en la comunicación cruzada entre las bacterias probióticas y el huésped, realizamos análisis *in silicium* para identificar los posibles operones putativos de EPS en el borrador del genoma de la cepa probiótica *L. paracasei* DG.

El borrador de la secuencia del genoma de *L. paracasei* DG se obtuvo a través de “Ion Torrent PGM” (Life Technologies, Alemania) como se describió anteriormente (Guglielmetti et al, 2014). Los datos de secuencia sin procesar se ensamblaron utilizando MIRA v.3.9 (http://www.chevreux.org/projects_mira.html), aplicando los parámetros predeterminados recomendados para el procesamiento de datos Ion Torrent. La anotación automatizada inicial del genoma se realizó utilizando RAST, combinado con BLASTX. Los resultados del programa de codificación de genes se combinaron manualmente con los datos del análisis BLASTP contra una base de datos de proteínas no redundantes proporcionada por el Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI). El borrador de la secuencia del genoma de *L. paracasei* DG se comparó con otras secuencias del genoma de *L. paracasei* por medio de “BLAST Ring Image Generator (BRIG)”. La anotación funcional de la región EPS-b se llevó a cabo combinando los resultados de BLASTN, BLASTP y la “CD-search” de la base de datos de dominio conservado (CDD) disponible en el sitio web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

La secuencia de ADN de la región EPS-b se ha depositado en la base de datos EMBL con el número de acceso LT629195.

Específicamente, el análisis comparativo con otros genomas de la misma especie condujo a la identificación en el genoma de la cepa *L. paracasei* DG de dos regiones diferentes que codifican marcos de lectura abiertos (ORF) supuestamente involucrados en la biosíntesis de moléculas de EPS (regiones EPS-a y EPS-b en la figura 1). Notablemente, mientras que la región EPS-a es común a todos los genomas de *L. paracasei* investigados, EPS-b es una región de 13 kb que codifica para varias glicosiltransferasas putativas que incluyen una región de aproximadamente 7 kb en el centro del clúster que no encontró ninguna coincidencia con otras secuencias en GenBank según búsqueda de BLASTN. El %GC de la región de 7 kb es mucho más bajo (36%) que el contenido promedio de GC del genoma completo de *L. paracasei* DG (aproximadamente el 46%), lo que respalda la idea de la adquisición de estos genes por transferencia horizontal de genes desde un huésped filogenéticamente no relacionado.

Aislamiento y purificación de EPS

La cepa *Lactobacillus paracasei* DG (depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur bajo el código CNCM I-1572) se cultivó a 37°C en el caldo “Man-Rogosa-Sharpe (MRS)” (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI) por 24 h. Este cultivo se utilizó para inocular el medio químicamente definido (CDM, Tabla 1).

Tabla I

Componente	Concentración (g l ⁻¹)
Sol. 1	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,15
MnSO ₄ × 4 H ₂ O	0,02
Sol. 2	
Adenina	0,005
Piridoxal	0,002
Ácido Nicotínico	0,001
Ca ²⁺ -D-pantotenato	0,001
Riboflavina	0,001
Tiamina	0,001
Vitamina B12	0,000001
Biotina	0,00001
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	0,000005
Ácido fólico	0,00001
Sol. 4 *	
Guanina	0,005
Xantina	0,005

Uracilo	0,005
Sol. 5	
K ₂ HPO ₄	4,56
Sol. 6	
Acetato de sodio	0,05
Citrato de sodio	0,02
KH ₂ PO ₄	0,01
NaCl	0,002
CaCl ₂	0,002
Sol. 7	
Tween 80	1
Tween 20	1
Glicerol	1
Glucosa	20
Casaminoácidos	10

Se realizó la extracción en múltiples etapas y la purificación de EPS a partir de aproximadamente 1 L de CDM suplementado con 2% de glucosa. Después de crecer a 37°C durante 48 h, las células se recogieron mediante centrifugación a 12000 × g durante 15 min a 4°C (Avant J-26 XPI, Beckman Coulter Ltd, High Wycombe, Reino Unido) y se separaron del medio agotado. Las dos fracciones fueron tratadas por separado. El medio agotado se añadió con un volumen igual de etanol absoluto y se almacenó a 4°C durante 48 h. Después del almacenamiento, se centrifugó a 25000 × g durante 35 minutos a 4°C. El sedimento obtenido (fracción S1) se disolvió en agua desionizada (aproximadamente 20-50 ml), mientras que el sobrenadante se añadió a un segundo volumen de etanol y se almacenó nuevamente a 4°C durante 48 h.

Posteriormente, se repitió la etapa de centrifugación, y el sedimento (fracción S2) se disolvió en agua desionizada como anteriormente se realizó. Con respecto a las fracciones celulares, el sedimento se lavó con tampón fosfato salino (PBS) para eliminar las impurezas del polisacárido y luego se trató con hidróxido de sodio 1M y se agitó durante la noche a 4°C. Posteriormente, se centrifugó nuevamente a 12000 × g 4°C durante 15 minutos para eliminar el hidróxido de sodio. El EPS bruto se precipitó mediante la adición de un volumen igual de etanol absoluto refrigerado; esto se almacenó durante 48 horas a 4°C y luego se centrifugó a 25000 × g a una temperatura de 4°C durante 35 minutos. El sedimento recuperado (fracción C1) se volvió a disolver en agua desionizada (aproximadamente 20 ml). El sobrenadante resultante se añadió

luego a un segundo volumen de etanol absoluto y se incubó de nuevo durante 48 horas a 4°C.

Otra centrifugación, como se describe anteriormente, se recuperó una segunda fracción precipitada (C2), que se disolvió en agua desionizada. Luego se eliminaron los pequeños azúcares neutros y proteínas mediante diálisis (con membranas de acetato de celulosa de corte de 100 kDa) de las fracciones extraídas durante 72 horas a 4°C, contra tres cambios de agua desionizada por día. Después de tres días, se recogieron los contenidos de la membrana de diálisis y se liofilizaron en un liofilizador (Northern Scientific, York, Reino Unido). Luego se determinó la masa seca de EPS. La presencia de ADN bacteriano contaminante en las preparaciones de EPS se probó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) con dos pares de partidores: partidores universales dirigidos al gen 16S rRNA (EUB), y partidores específicos de la cepa DG dirigidos al gen *welF*. Este análisis reveló la presencia de 10-63 ng ml⁻¹ en las soluciones madre de 1 mg ml⁻¹ de EPS, que corresponde a una concentración máxima global de 0,6 ng ml⁻¹ de ADN incubado con células THP-1 cuando la concentración más alta de EPS (10 µg ml⁻¹) se usó en experimentos inmunológicos.

Los resultados muestran que, aunque el crecimiento fue más lento que el observado en medios más convencionales como el caldo MRS, se eligió el CDM ya que no contiene polisacáridos contaminantes que interfieran con la caracterización de los polisacáridos bacterianos por RMN. Para aislar una muestra de polisacárido adecuada para la caracterización, se cultivó *L. paracasei* DG durante tres días, momento en el cual la biomasa celular se separó de los licores de fermentación por centrifugación. Se aisló EPS de alta pureza del sobrenadante por precipitación fraccionada de material.

La adición de un volumen de etanol liberó pequeñas cantidades de un material EPS contaminado con proteínas (típicamente 20-25 mg de una fermentación discontinua de 500 ml). La adición de un segundo volumen de etanol también precipitó una cantidad relativamente pequeña de EPS (20-25 mg) pero con una pureza mucho mayor y de una pureza que fue adecuada para la caracterización por RMN. Como los rendimientos de

EPS fueron bajos, y para determinar si se estaba reteniendo materiales adicionales con la biomasa, se intentaron varios métodos diferentes para recuperar el material capsular unido a las células. La agitación de una suspensión de las células durante la noche en una solución acuosa de hidróxido de sodio 1M y luego la precipitación del polisacárido crudo agregando dos volúmenes de etanol produjo una cantidad significativa de material que incluía tanto polisacárido como proteína. Se adoptó el mismo enfoque para el aislamiento de moléculas de polisacáridos extracelulares de la cepa *L. paracasei* LPC-S01.

La pureza de las EPS liberadas en el sobrenadante se estableció mediante el examen de un espectro de ^1H -RMN de la muestra (Fig. 2). La región de bajo campo del espectro contenía seis señales anoméricas. Dentro del error de los experimentos, las integrales de área de pico para cada una de las señales anoméricas fueron las mismas, lo que implica que se había aislado un solo EPS que tenía una unidad de repetición que contenía seis monosacáridos. Además de las señales anoméricas, una resonancia única con una altura integral de tres fue visible a un cambio químico de 2,05 ppm, lo que es indicativo de la presencia de una N-acetilhexosamina y otros dos conjuntos de dobletes superpuestos, cada uno integrado a seis protones, estuvieron presentes a 1,25 y 1,32 ppm; estas señales indicaron que la unidad de repetición contenía cuatro 6-desoxihexosas.

Determinación de la composición de monómeros y análisis de ligamiento.

Para determinar la composición monomérica del polisacárido, la EPS (3 mg) se hidrolizó mediante tratamiento con ácido trifluoroacético 2M (TFA, 120°C durante 2h); Los monosacáridos liberados se derivaron posteriormente para formar acetatos de alditol, que se analizaron mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). Para derivatizar los monómeros, la mezcla resuspendida en 1 ml de agua Milli-Q se añadió con 10 mg de NaBH_4 y se incubó a 40°C durante 2 h. Después de la evaporación de la solución, se añadió 1 ml de ácido acético glacial al residuo, y nuevamente se evaporó a sequedad. Posteriormente, se agregaron 3 ml de metanol y

luego se evaporaron para eliminar el complejo de borato y dar los alditoles de azúcar metilados. Luego se agregaron 2 ml de piridina y 2 ml de anhídrido acético; la reacción de acetilación se realizó a 100°C durante 2h. Al final de la reacción, la solución se evaporó y los monómeros acetilados se resuspendieron en agua. La extracción con cloroformo se realizó para recoger la fase orgánica, que contenía los azúcares de acetato de alditol. Se eliminó cualquier rastro de agua agregando sulfato de sodio anhidro y almacenando la muestra durante 30 minutos a 4°C. El sulfato de sodio se eliminó por filtración en papel de filtro y cloroformo por evaporación. El residuo resultante se resuspendió en acetona. El análisis GC-MS se realizó en un sistema cromatógrafo de gases Agilent 7890A (Santa Clara, CA, EE. UU.) acoplado a un MS cuadrupolo Agilent 5675c. Las muestras se eluyeron de una columna HP-5 (30 m x 0,25 mm id, 0,25 µm de película) utilizando helio como portador (9 psi, caudal 1 ml min⁻¹) y utilizando un programa de temperatura (temperatura inicial 150°C, tiempo de espera 4 min, y una temperatura final de columna de 250°C alcanzada a través de un gradiente ascendente de 4°C min⁻¹).

Las proporciones de los diferentes azúcares se determinaron mediante el examen de las respuestas relativas de los diferentes acetatos de alditol con referencia a las respuestas relativas determinadas para una mezcla estándar de acetatos de alditol. El área integral para los azúcares amino fue baja, y esto es el resultado de haber sufrido una descomposición térmica durante el análisis.

La proporción final de monómeros, para el amino azúcar, se tomó de la integración de las integrales de los picos de resonancia magnética nuclear (RMN) para los respectivos protones anoméricos y H2. Las configuraciones absolutas de los monosacáridos se determinaron por conversión a sus 2-butilglicósidos usando el procedimiento descrito por Gerwig et al. 1979. Para determinar el patrón de enlace del EPS, la muestra se permetiló utilizando los procedimientos descritos por Ciucanu y Kerek, 1984.

El polisacárido permetilado se hidrolizó luego (TFA 2M, 120°C durante 2 h) y los monosacáridos metilados se convirtieron en acetatos de alditol metilados. La identidad

de los acetatos de alditol metilados se determinó mediante el análisis de sus patrones de fragmentación del espectro de masas individuales generados durante el análisis GC-MS. Los análisis de GC-MS se realizaron en la misma instrumentación que el análisis de monómeros, pero utilizando el siguiente programa de temperatura: temperatura de inicio 155°C, tiempo de espera de 1 minuto y una temperatura final de la columna de 195°C alcanzada a través de un gradiente creciente de 0,75°C min⁻¹.

El análisis de GC-MS de los acetatos de alditol generados durante el análisis de monómeros de la EPS identificó la presencia de 1,2,3,4,5-penta-O-acetil-L-ramnitol, 1,2,3,4,5,6 -hexa-O-acetil-D-galactitol, y 2-acetamido-1,3,4,5,6-penta-O-acetil-2-deoxi-D-galactitol en una relación de 4:1:1. Los resultados del análisis de monómeros identificaron la presencia de ramnosa, galactosa y N-acetilgalactosamina en la unidad de repetición.

Los acetatos de alditol metilados generados durante el análisis de ligamiento incluyeron: un 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilhexitol que confirma que la galactosa está presente en su forma de piranosa como un azúcar terminal; un 1,3,5-tri-O-acetil-2-(acetilmetilamino) -2-deoxi-4,6-di-O-metilgalacitol, que confirma que la N-acetilgalactosamina está presente en su forma de piranosa como un monosacárido con enlaces en 1,3; dos 1,2,5-tri-O-acetil-3,4-di-O-metil-6-desoxihexitoles, lo que indica que dos de los monómeros de ramnosa tienen enlaces en 1,2; un 1,3,5-tri-O-acetil-6-desoxi-2,4-di-O-metilhexitol, que indica que uno de los monómeros de la ramnosa está unido en 1, 3; y, finalmente, un 1,2,3,5-tetra-O-acetil-6-desoxi-4-O-metilhexitol que sugiere que la ramnosa final es una ramnosa con enlaces en 1,2,3 presente como un punto de puente en la unidad de repetición.

La conversión de los monómeros a mezclas de sus 2-butilglicósidos epiméricos confirmó que todos los monómeros de ramnosa tenían una configuración absoluta de L, mientras que tanto la galactosa como la N-acetilgalactosamina tenían una configuración absoluta de D.

Análisis de RMN de la EPS de *L. paracasei*

Se registraron los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) para las muestras de EPS que se disolvieron (10-20 mg ml⁻¹) directamente en D₂O (Goss Scientific Instruments Ltd., Essex, Reino Unido). Los espectros de RMN se registraron a una temperatura de sonda de 70°C. Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker Avance 500,13 MHz ¹H (125.75 MHz ¹³C) (Bruker-Biospin, Coventry, Reino Unido) que operan con gradientes de campo Z cuando sea apropiado y utilizando los programas de pulso de Bruker. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm en relación con la acetona interna (δ 2,225 para ¹H y δ 31,55 para ¹³C). Los espectros registrados incluyeron: un espectro de correlación de filtro cuántico doble gradiente 2D seleccionado (gs-DQF-COSY) registrado en modo de magnitud a 70°C; experimentos de espectroscopia de correlación total (TOCSY) registrados con tiempos de mezcla variables (60, 90, 120 ms); ¹H-¹³C espectros de coherencia cuántica única (HSQC) heteronucleares (desacoplados y acoplados); un espectro de correlación heteronuclear de enlaces múltiples (HMBC); y finalmente, un espectro de efecto Overhauser nuclear de marco giratorio (ROESY). Los espectros 2D se registraron con 256 experimentos de 1024 puntos de datos. El espectro ROESY se registró utilizando una secuencia de pulsos de Bruker y 256 experimentos de 1024 puntos de datos utilizando un tiempo de mezcla de 200 ms. Para la mayoría de los espectros, los datos del dominio del tiempo se multiplicaron por las funciones de campana sinusoidal (cuadrada) de desplazamiento de fase. Después de aplicar el llenado a cero y la transformada de Fourier, se obtuvieron conjuntos de datos de 1024-1024 puntos.

Los desplazamientos químicos de cada uno de los protones y carbonos en la unidad de repetición se determinaron mediante la inspección de una serie de espectros de RMN 1D & 2D (Tabla II).

Tabla II

Posición	A	B	C	D	E	F
H1 (C1)	5,30 (102,6)	5,21 (102,2)	5,15 (102,4)	4,87 (102,5)	4,72 (103,5)	4,53 (106,0)
H2 (C2)	4,21 (79,8)	4,07 (79,6)	4,13 (80,3)	3,90 (71,6)	3,82 (57,1)	3,59 (72,5)

H3 (C3)	4,01 (78,2)	3,91 (72,0)	3,86 (71,3)	3,79 (79,5)	3,65 (83,1)	3,63 (76,5)
H4 (C4)	3,67 (70,4)	3,49 (73,6)	3,35 (73,7)	3,55 (72,9)	3,54 (72,6)	3,93 (70,1)
H5 (C5)	3,82 (70,6)	3,77 (70,6)	3,66 (73,8)	4,02 (70,5)	3,45 (77,3)	3,53 (70,0)
H6 (C6)	1,32 (18,6)	1,32 (18,1)	1,25 (18,0)	1,25 (17,9)	3,91/3,75 (62,4)	3,75 (62,3)
Acetil (CH₃CO)				CH ₃ δ 2,05 CH ₃ δ 23,5 CO δ 175,6		

El análisis del espectro COSY 1H-1H (Fig. 3, contornos negros) en combinación con el espectro TOCSY 1H-1H (Fig. 3, contornos grises) permitió que el acoplamiento escalar dentro de los azúcares individuales se rastreara desde los protones anoméricos (etiquetados De A F en orden decreciente de cambio químico, ver Fig. 2) de H1 a H6 en los azúcares de ramnosa (A, B, C y D) y de H1 a H4 en los monómeros de galactosa y N-acetilgalactosamina (Fig. 3).

Se usó un espectro de HSQC para correlacionar los carbonos del anillo con sus protones unidos (Fig. 4) y la posición distintiva de C2 y la identificación de H2 de la N-acetilgalactosamina confirmada, mediante la observación del acoplamiento escalar a la resonancia H1 a 4,72 en el espectro COSY, que la resonancia anomérica a 4,72 ppm (E en la Fig. 2) fue la de la N-acetilgalactosamina. La resonancia anomérica restante a 4,53 ppm, por lo tanto, debe pertenecer a la galactosa terminal.

Mediante la inspección de los desplazamientos químicos de carbono de los carbonos del anillo de ramnosa, fue posible identificar puntos de enlace mediante la localización de aquellos carbonos cuyos desplazamientos químicos se habían movido hacia posiciones de campo bajo (por encima de 78 ppm) en comparación con los valores normalmente asociados con las posiciones de anillo no sustituidas (menos de 74 ppm para azúcares de ramnosa). Esto identificó A como una ramnosa con enlaces en 2,3 (C2, δ 79,8 ppm; C3, δ 78,2 ppm), B como una ramnosa con enlace en 2 (C2, δ 79,6 ppm), C como una ramnosa con enlace en 2 (C2, δ 80,3 ppm), y D como una ramnosa

con enlace en 3 (C3, δ 79,5 ppm). Los resultados del análisis de ligamiento ya identificaron que la N-acetilgalactosamina (E) está unida en 1,3, y esto se confirmó por el alto cambio químico de C-3 en E (δ 83,1 ppm). Finalmente, los desplazamientos químicos de los carbonos en el residuo F concuerdan con que es un monómero de galactosa terminal.

La configuración anomérica de los monosacáridos se determinó midiendo las constantes de acoplamiento $^1J_{C1-H1}$ que eran visibles en un espectro de HSQC acoplado. Los residuos A D tenían constantes de acoplamiento $^1J_{C1-H1}$ A (177 Hz), B (172Hz), C (175Hz) y D (174 Hz) que son más de 170 Hz, lo que indica que los residuos de ramnosa están alfa-enlazados, mientras que el tamaño de las constantes de acoplamiento $^1J_{C1-H1}$ en E (164 Hz) y F (157 Hz) identifica estas dos resonancias como monómeros con enlace beta.

Finalmente, la secuencia de los azúcares en la unidad de repetición se estableció a través de la inspección tanto del espectro ^1H - ^{13}C -HMBC como del espectro ^1H - ^1H -ROESY (Fig. 5). El acoplamiento escalar entre residuos observado en el espectro HMBC incluyó: el acoplamiento entre A-H1 y D-C3, indicando que A está vinculado a la posición 3 de D; el acoplamiento entre C-H1 y B-C2, lo que indica que C está vinculado a la posición 2 de B; el acoplamiento entre D-H1 y E-C3, lo que indica que D está vinculado a la posición 3 de E; el acoplamiento entre F-H1 y A-C2, indicando que F está vinculado a la posición 2 de A. En el espectro de ROESY, se observaron NOE entre residuos: entre A-H1 y D-H3, confirmando la A (1-3) Enlace D; entre B-H1 y A-H3 (fuerte) y A-H4 (moderado), identificando que B está vinculado a la posición 3 de A; entre C-H1 y B-H2, confirmando el enlace C (1-2) B; entre D-H1 y E-H3, identificando un enlace D (1-3) E; entre E-H1 y C-H2, identificando el enlace E (1-2) C; y también entre F-H1 y A-H2, confirmando el enlace F (1-2) A.

Los resultados combinados del análisis químico y de RMN de la EPS aislada de *L. paracasei* DG indican que la DG-EPS es un heteropolisacárido novedoso que tiene la estructura de la unidad repetitiva informada en la Fig. 6.

Adhesión bacteriana a la línea celular Caco-2

Para investigar la capacidad potencial de DG-EPS para mediar en la interacción de la bacteria con el huésped, primero usamos la línea celular Caco-2, que se considera una herramienta *in vitro* valiosa para estudiar los mecanismos subyacentes a la interacción entre las células bacterianas y el intestino humano.

La adhesión de cepas *L. paracasei* a la capa de células Caco-2 (ATCC HTB-37) se evaluó tal como se describió anteriormente en Balzaretto et al, 2015. En resumen, para los experimentos de adhesión, se utilizaron células Caco-2 totalmente diferenciadas (es decir, 15 días después de la confluencia). Se incubaron 100 µg ml⁻¹ de EPS con una monocapa de células Caco-2 durante 1 hora a 37°C. Finalmente, las monocapas fueron examinadas microscópicamente (magnificación, 400×) bajo inmersión en aceite después de la tinción de Giemsa. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

La participación potencial de DG-EPS se evaluó probando también la capacidad de adhesión de la cepa DG después de la eliminación de la molécula de EPS (células DG "desnudas", nDG, preparadas mediante lavados con PBS y sonicación suave) y luego de la incubación previa de células Caco-2 con EPS purificado.

Los resultados demuestran que el EPS purificado no fue capaz de afectar las propiedades de adhesión de la cepa DG. De hecho, la adhesión de *L. paracasei* DG no fue significativamente diferente de la de nDG y fue bastante modesta (aproximadamente 300 bacterias por 100 células Caco-2); Además, la capacidad de adhesión no se vio afectada por la co-incubación de las células bacterianas con EPS purificado.

Activación del factor nuclear κB (NF-κB) por exopolisacáridos

La activación del factor nuclear κB (NF-κB) se estudió mediante una línea celular recombinante Caco-2 transfectada de forma estable con el vector pNiFty2-Luc

(InvivoGen, Labogen, Rho, Italia). Las monocapas de Caco-2 recombinante (aproximadamente 3×10^5 células/pocillo), cultivadas en presencia de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ de zeocina, se lavaron con tampón Tris-HCl $0,1 \text{ M}$ (pH 8,0) y luego se suspendieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) fresco que contiene HEPES 100 mM (pH 7,4) y con $0,1 \text{ ml}$ de *L. paracasei* DG-EPS, que corresponde a una concentración final de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. La estimulación se realizó añadiendo 10 ng ml^{-1} de interleuquina (IL)- 1β . Después de la incubación a 37°C durante 4 h , las muestras se trataron y la bioluminiscencia se midió según lo descrito por Stuknyte et al., 2011. Se realizaron dos experimentos independientes por triplicado para cada condición.

Recientemente se ha demostrado que *L. paracasei* DG posee una capacidad evidente para reducir la activación de NF- κB en células Caco-2 al inicio del estudio y luego de la estimulación con la citoquina proinflamatoria IL- 1β (Balzaretti, 2015), según lo determinado por un sistema indicador obtenido al transfectar células Caco-2 con un vector indicador de luciferasa. Aquí, el mismo modelo inmunológico se ha utilizado para probar la macromolécula de EPS aislada de la cepa DG. Los resultados muestran que la molécula de EPS purificada, a diferencia de las células bacterianas completas y su caldo agotado, no pudo afectar la activación de NF- κB tanto al inicio como en presencia del estímulo proinflamatorio IL- 1β (datos no mostrados. Otras cepas de *L. paracasei* en estudio (a saber, las cepas LPC-S01 y Shirota) mostraron la misma capacidad de la cepa DG para reducir la activación de NF- κB en células Caco-2 (13), lo que sugiere que DG-EPS no contribuye a este específico efecto inmunomodulador.

Activación de la línea celular de macrófagos humanos THP-1: cultivo celular, condiciones de crecimiento y protocolo de estimulación

La línea celular THP-1 monocítica se adquirió de la Colección de Cultivos Tipo de EEUU (Manassas, VA, EE. UU.). Las células THP-1 se cultivaron originalmente a partir de sangre periférica de un niño de 1 año con leucemia monocítica aguda. Son células no adherentes, que pueden diferenciarse en células similares a macrófagos a través de una vía de señalización dependiente de la especie de oxígeno reactivo (EOR) mediada

por la proteína quinasa C por tratamiento con miristato acetato de forbol (PMA). El medio de crecimiento normal para las células THP-1 consistió en medio RPMI 1640 (Lonza, Basilea, Suiza) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (v/v) (Gibco-BRL, Life Technologies, Milán, Italia), 2 mM L-glutamina, 100 unidades ml⁻¹ de penicilina y 100 µg ml⁻¹ de estreptomycin (Sigma-Aldrich). Las células se sembraron a una densidad de 5 x 10⁵ células/pocillo en placas de 24 pocillos y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con aire al 95% y 5% de CO₂. La diferenciación se indujo mediante la adición de PMA (Sigma-Aldrich) en el medio celular a una concentración final de 100 nM y se dejó que continuara durante 24 h. Posteriormente, las células se lavaron una vez con tampón PBS estéril para eliminar todas las células no adherentes, y se añadió medio completo fresco. Las bacterias se usaron en la multiplicidad de infección (MOI) de 50, EPS en concentraciones finales de 0,1, 1 y 10 µg ml⁻¹; Se usó lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella enterica* (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1 µg ml⁻¹. Se usó una muestra no tratada, es decir, solo medio RPMI 1640 con 10% (v/v) de FBS, como control.

Preparación de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Después de incubar las células THP-1 a 37°C durante 4 h, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante de cada pocillo y se aisló el ARN celular total de las células adheridas con el kit de células de cultivo y sangre de ARN total (GeneAid, New Taipei City, Taiwán). Posteriormente, se eliminaron trazas de ADN mediante tratamiento con la enzima DNase (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN y la pureza se determinaron con un lector de placas de varios volúmenes Take3 (Biotek, Luzern, Suiza), y la transcripción inversa a ADNc se realizó con el kit de síntesis de ADNc iScript™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), utilizando el siguiente término: 5 min a 25°C, 30 min a 42°C y 5 min a 85°C. La PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se llevó a cabo para medir los niveles de expresión de citoquinas en el ARNm mediante la tecnología “SYBR Green Technology” utilizando SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) en un sistema Bio-Rad CFX96 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los partidores fueron los siguientes (5'...3'):

GAPDH hacia adelante, 5'-GGGAAGGTGAAGGTCGGAGT-3';

GAPDH reverso, 5'-TCAGCCTTGACGGTGCCATG-3';

IL-6 hacia adelante, 5'-CGGTACATCCTCGACGGCAT;

IL-6 reverso, 5'-TCACCAGGCAAGTCTCCTCAT-3';

IL-8 hacia adelante, 5'- TGTGGTATCCAAGAATCAGTGAA-3';

IL-8 reverso, 5'-TATGTTCTGGATATTTTCATGGTACA-3';

CCL20 hacia adelante, 5'-CTGCTTGATGTCAGTGCTG;

CCL20 reverso, 5'-CACCCAAGTCTGTTTTGG-3';

TNF- α hacia adelante, 5'-TCAGCTCCACGCCATT-3';

TNF- α reverso, 5'-CCCAGGCAGTCAGATCAT-3';

COX-2 hacia adelante, 5'-CCCTTGGGTGTCAAAGGTAA;

COX-2 reverso, 5'-TGAAAAGGCGCAGTTTACG-3'.

Todos los partidores se diseñaron previamente y su especificidad se evaluó con curvas de fusión durante la amplificación y mediante geles de agarosa al 1%. La PCR cuantitativa se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente ciclo: retención inicial a 95°C durante 30 s y luego 39 ciclos a 95°C durante 2 s y 60°C (para TNF- α y ciclooxigenasa COX-2) o 58,2°C (para IL-6, IL-8 y CCL20) durante 5 s. La expresión génica se normalizó con respecto al gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de referencia. La cantidad de ADNc de plantilla utilizada para cada muestra fue de 15 ng. Todos los resultados con respecto a los niveles de expresión de ARNm de citoquinas se informan como el pliegue de la inducción (FOI) en relación con el control (es decir, THP-1 no estimulado), al que atribuimos un FOI de 1. Se han determinado diferencias estadísticamente significativas a través de la prueba t Student no pareada con una distribución de dos colas.

Se cuantificó la expresión génica del factor de necrosis tumoral (TNF) - α , la interleuquina (IL) -6, el ligando 20 (CCL20) de quimiocina (C-C), la quimiocina IL-8 y la

ciclooxigenasa (COX)-2 a través de qRT-PCR. Se analizaron tres concentraciones de la molécula DG-EPS purificada (0,1, 1 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Los mismos experimentos se realizaron en presencia de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ del estímulo proinflamatorio LPS.

Los resultados muestran que la DG-EPS purificada puede estimular la expresión de todos los genes en estudio de una manera dependiente de la concentración, con la excepción de COX-2 (Fig. 7). En particular, las quimioquinas IL-8 y CCL20 se indujeron aproximadamente 70 veces por 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DG-EPS, mientras que las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 26 y 39 veces, respectivamente. Se observó un perfil estimulante similar con las células bacterianas de la cepa DG (MOI 50), aunque en menor medida (Fig. 8). Además, cuando se eliminó el EPS mediante lavados con PBS y sonicación suave, las células bacterianas de la cepa DG perdieron su capacidad para estimular la expresión génica de TNF- α , IL-8 y CCL20; la adición de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de EPS purificado reconstituyó parcialmente la capacidad estimuladora de las células (Fig. 8).

Como se esperaba, la estimulación de las células THP-1 con LPS determinó una sobreexpresión marcada de todos los genes analizados, en particular IL-6, IL-8 y CCL20. Sin embargo, la adición de DG-EPS no afectó significativamente las inducciones asociadas a LPS de todos los genes probados (Fig. 7).

En conclusión, gracias al análisis genómico sobre la cepa *L. paracasei* DG, pudimos identificar dos clúster de genes que codifican supuestamente la biosíntesis de EPS. Curiosamente, la búsqueda en GenBank reveló que una de estas regiones, EPS-b, no tiene precedentes.

Después de la purificación de la fracción de células exopolisacáridicas de la cepa DG, la unidad de repetición de EPS se caracterizó mediante métodos cromatográficos y espectroscopía de RMN, estableciendo que posee una estructura novedosa.

En efecto, las estructuras de unidades repetitivas de varias cepas diferentes del grupo de especies de *L. casei* (es decir, *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*) se han publicado previamente, y la que se describe aquí es diferente.

Cualquier molécula de EPS con una secuencia de monosacáridos diferente puede representar un potencial patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) novedoso.

DG-EPS muestra propiedades inmunoestimuladoras en células THP-1 monocíticas de leucemia humana al aumentar la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 y, en particular, las quimioquinas IL-8 y CCL20. Por el contrario, el nivel de expresión de la enzima ciclooxigenasa COX-2 no se vio afectado.

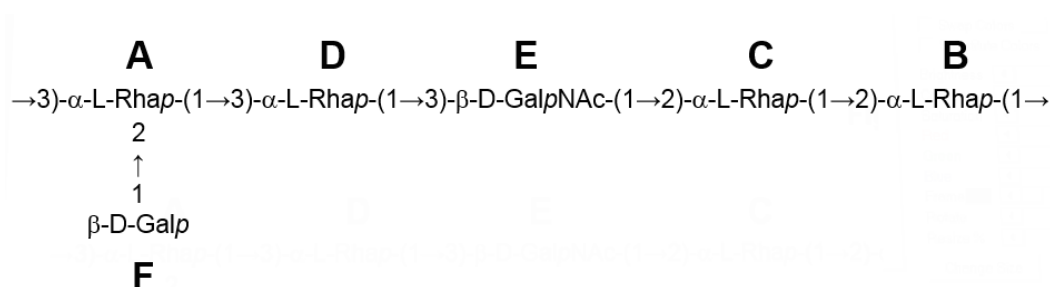
El EPS purificado producido por *L. paracasei* DG mostró una actividad inmunoestimuladora, particularmente en términos de expresión de quimioquinas. Por lo tanto, el EPS de *L. paracasei* DG, en vez de ser una molécula inerte, puede considerarse un producto bacteriano que puede estimular el sistema inmunológico como una molécula secretada liberada de la bacteria o también, plausiblemente, como una envoltura capsular sobre la pared de la célula bacteriana.

En conclusión, la cepa probiótica *L. paracasei* DG produce un hetero-exopolisacárido rico en ramnosa único, llamado DG-EPS, que posee propiedades inmunoestimulantes.

DG-EPS puede representar una nueva molécula para potenciales aplicaciones nutracéuticas y farmacéuticas.

REIVINDICACIONES

1. Un exopolisacárido que comprende al menos una unidad repetitiva de ramnosa, galactosa y N-acetilgalactosamina en una proporción de 4: 1: 1 respectivamente.
2. El exopolisacárido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ramnitol es 1,2,3,4,5-penta-O-acetil-L-ramnitol; y/o la galactosa es 1,2,3,4,5,6-hexa-O-acetil-D-galactitol; y/o la N-acetilgalactosamina es 2-acetamido-1,3,4,5,6-penta-O-acetil-2-deoxi-D-galactitol.
3. El exopolisacárido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la ramnosa tiene configuración L y/o la galactosa tiene configuración D y/o la N-acetilgalactosamina tiene configuración D.
4. El exopolisacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la unidad de repetición tiene la Fórmula I



(Fórmula I)

5. El exopolisacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, obtenido de la cepa *L. paracasei* DG o una cepa mutante de la misma.
6. Un medio que comprende el exopolisacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, preferiblemente dicho medio es el medio condicionado donde han crecido las células que producen dicho exopolisacárido, preferiblemente dichas células son bacterias, más preferiblemente bacterias genéticamente modificadas y/o cepa de *L. paracasei* DG.

7. El medio de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dichas bacterias modificadas genéticamente comprenden el ácido nucleico SEC ID NO: 1 o cualquiera de sus fragmentos.
8. Una composición que comprende el exopolisacárido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o el medio de acuerdo con la reivindicación 6 o 7 y otros ingredientes, preferiblemente excipientes.
9. El exopolisacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o el medio de acuerdo con la reivindicación 6 o 7 o la composición de acuerdo con la reivindicación 8 en combinación con cualquier probiótico, preferiblemente cualquier bacteria que pertenezca al género *Lactobacillus* y/o *Bifidobacterium*, preferiblemente dicho *Lactobacillus* es la especie *Lactobacillus paracasei*, más preferiblemente la cepa *Lactobacillus paracasei* DG.
10. El exopolisacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o el medio de acuerdo con la reivindicación 6 o 7 o la composición de acuerdo con la reivindicación 8 para uso como un medicamento.
11. Uso del exopolisacárido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o el medio de acuerdo con la reivindicación 6 o 7 o la composición de acuerdo con la reivindicación 8 para estimular la respuesta del sistema inmunológico.
12. Uso del exopolisacárido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el medio según la reivindicación 6 o 7 o la composición según la reivindicación 8 como alimento funcional.

RESUMEN

La presente invención se refiere a moléculas de exopolisacáridos, medios condicionados o composiciones que comprenden dichas moléculas o medios. Además, la presente invención se refiere al uso de dichas moléculas de exopolisacáridos, medios condicionados o composiciones como prebióticos, preferiblemente para estimular el sistema inmunológico.