

**MÉTODO PARA PRODUCIR METABOLITOS PROTEICOS PEGILADOS CON ACTIVIDAD
ANTIVIRAL, ANTIBACTERIANA Y REPARADORA DE LA ESTRUCTURA INTESTINAL, A PARTIR
DE UN CULTIVO BACTERIANO DE *BIFIDOBACTERIUM ADOLESCENTIS***

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece al campo técnico de los métodos para producir metabolitos proteicos multifuncionales modificados a partir de cultivos bacterianos. En particular, la presente invención se refiere a la obtención de metabolitos proteicos PEGilados con actividad antiviral, antibacteriana y de reparación de la estructura intestinal a partir de un cultivo bacteriano de *Bifidobacterium adolescentis*.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La enfermedad diarreica aguda (EDA) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. La principal causa de esta enfermedad en humanos es la infección por virus, bacterias y parásitos protozoarios, siendo el rotavirus (RV) el agente causal más importante. Aunque desde el 2006 existen dos vacunas disponibles contra RV, RotaTeq® y Rotarix, estas aún tienen algunos desafíos, ya que solo han sido aprobadas en el 70% de los países, su eficacia en los países más afectados aún no ha sido comprobada y no proveen protección sobre las nuevas cepas virales emergentes. Adicionalmente, los tratamientos utilizados como las sales de rehidratación oral sólo revierten los síntomas durante la enfermedad, pero no son específicos contra la infección por RV y a la fecha no se dispone de un terapéutico antiviral avalado para tratar infecciones virales por virus enteropatógenos.

Dada la necesidad de producir nuevas alternativas para el control y prevención de la EDA, el uso de probióticos ha tomado fuerza en los últimos años porque se ha demostrado que pueden ejercer actividad antiviral contra virus enteropatógenos y además disminuyen la duración y gravedad de la diarrea, reducen la incidencia de la infección y modulan la respuesta inmune frente al RV. Uno de los géneros de probióticos más reportados con esta actividad es *Bifidobacterium*.

Específicamente, la especie bacteriana *Bifidobacterium adolescentis* ha mostrado actividad anti-rotavirus. En un primer estudio realizado en el Laboratorio de Virología de la Pontificia Universidad Javeriana, reportado en el 2016 por Olaya y colaboradores, se demostró que proteínas PEGiladas del secretoma de *B. adolescentis* son capaces de interferir con la concentración citoplasmática de la enterotoxina rotaviral NSP4, disminuyendo su expresión y manteniendo regulados los niveles de Ca^{2+} intracelular (Olaya Galán NN, Ulloa Rubiano JC, Velez Reyes FA, Fernandez Duarte KP, Salas Cárdenas SP, Gutierrez Fernandez MF. *In vitro*

antiviral activity of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium adolescentis* against rotavirus infection monitored by NSP4 protein production. Journal of Applied Microbiology. 2016;120(4):1041–51).

5 Posteriormente, otros resultados del mismo grupo de investigación también demostraron la disminución de la infección viral *in vitro* por RV hasta en un 50,99 % por parte de los metabolitos proteicos PEGilados de *B. adolescentis* producidos a escala de 500 mL. Adicionalmente, se evaluaron los efectos de estos metabolitos administrados de forma aguda (única dosis) sobre células intestinales humanas – C2BBE1, observando que estos no ejercen
10 ningún efecto negativo sobre la viabilidad celular, la integridad de la monocapa celular o evidencia de muerte celular por apoptosis. Por el contrario, presentaron un efecto de fortalecimiento de la integridad de la monocapa celular (Hernández, M., *et al.* (2023). "Postbiotic Activities of *Bifidobacterium adolescentis*: Impacts on Viability, Structural Integrity, and Cell Death Markers in Human Intestinal C2BBE1 Cells." Pathogens 13(1).)

15

A pesar de la evidencia sobre los beneficios de los probióticos en el tratamiento de la EDA por RV, los efectos varían entre estudios, principalmente debido a factores como el diseño experimental. Un factor clave es el método de cultivo de los probióticos, especialmente las condiciones de fermentación. Particularmente, factores como el tipo de cultivo, el porcentaje
20 de inóculo, la temperatura, el pH, el tiempo de cultivo y la concentración de oxígeno, entre otros, influyen directamente en los efectos que pueden producir los probióticos.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, es necesario considerar los desafíos que se presentan al estudiar metabolitos producidos por bacterias probióticas, ya que recrear las
25 condiciones de su ambiente natural en el tracto gastrointestinal y mantener sus beneficios es aún un reto.

Adicional al proceso de producción, es importante tener en cuenta otros factores que pueden afectar a los metabolitos producidos, con la estabilidad y la viabilidad de los postbióticos
30 tanto en laboratorio de investigación o producción, como en el tracto gastrointestinal (TG). Por tanto, los metabolitos producidos deben resistir a la actividad proteolítica del TG, para lo cual son utilizadas estrategias como el uso de nanopartículas (encapsulamiento) o sustancias que funcionan como transportadores. Uno de esos transportadores es el polietilenglicol (PEG-(HO- (CH₂ CH₂ O)_n -CH₂ CH₂ -OH)), el cual se adhiere covalentemente tanto a
35 proteínas como a péptidos, de manera aleatoria no específica (PEGilación de primera generación) o mediante conjugación específica (PEGilación de segunda generación) protegiendo sus propiedades generales. La PEGilación ofrece otras ventajas farmacológicas como: una mejor solubilidad, frecuencia de dosificación reducida, mayor velocidad de eliminación renal, menor toxicidad, vida circulante extendida, aumento en la estabilidad,

protección a degradación proteolítica, menor inmunogenicidad y antigenicidad y protección de la actividad biológica.

Si bien el PEG proporciona beneficios para las proteínas, es necesario tener en cuenta que este puede alterarse si experimenta cambios significativos en sus propiedades físicas al ser expuesto a diferentes rangos de temperatura. A bajas temperaturas, el PEG tiende a cristalizarse, lo que aumenta su viscosidad y puede afectar su solubilidad en algunos solventes. Por otro lado, a altas temperaturas, el PEG se vuelve más fluido debido al aumento de la energía cinética de sus moléculas, disminuyendo su viscosidad y mejorando su capacidad para disolver otras sustancias. Sin embargo, las altas temperaturas pueden provocar la degradación del polímero, alterando su estructura molecular y sus propiedades. Dado lo anterior, existe una necesidad de estudiar la estabilidad de estos polímeros frente a condiciones variables de temperatura o pH, por ejemplo.

En vista de todo lo anterior, existe una clara necesidad en el campo técnico de un método para producir metabolitos estables con actividad probiótica, que permita obtener esos compuestos PEGilados a partir de la bacteria *Bifidobacterium adolescentis* y que tenga un rendimiento tal que permita un escalamiento industrial.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El desarrollo aquí revelado se refiere a un método que permite producir metabolitos proteicos PEGilados con actividad antiviral, antibacteriana y de reparación de la estructura intestinal a partir de un cultivo bacteriano de *Bifidobacterium adolescentis*. De acuerdo con realizaciones preferidas, el método de la presente divulgación comprende:

- resuspender entre 50 a 1000 μL de *B. adolescentis*, liofilizado o descongelado, en 0,5 a 10 mL de caldo MRS para formar una suspensión bacteriana;
- incubar la suspensión bacteriana a una temperatura de entre 35 a 42°C, durante 24 a 48 h, en condiciones anaeróbicas, hasta que alcance una concentración de entre 1×10^7 a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para obtener el inóculo inicial;
- cultivar el inóculo inicial en caldo MRS, incubar a una temperatura de entre 35 a 42°C, durante 24 a 48 h en condiciones anaeróbicas y agitación constante de entre 100 a 250 rpm, hasta que se encuentre en fase crecimiento exponencial o hasta que se encuentre en el final de una fase previa a la fase de crecimiento estacionaria para obtener la biomasa bacteriana;
- separar la biomasa bacteriana del medio líquido por medio de centrifugación a una fuerza de entre 600 a 800 xg, durante 10 a 20 minutos, a una temperatura de entre 4 a 10°C, o, por medio de filtración o microfiltración, para obtener los metabolitos proteicos;

- concentrar los metabolitos proteicos por medio de ultrafiltración con un ultrafiltro de tamaño entre 1 kDa a 3 kDa, a una temperatura de entre 4 a 10°C;
- tratar los metabolitos proteicos con polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular para obtener los metabolitos proteicos PEGilados precipitados, en donde el PEG de alto peso molecular comprende una concentración de entre 8% a 12% p/v, en donde la precipitación de los metabolitos proteicos tratados con PEG comprende agitación continua de entre 35 y 60 rpm durante 12 a 18 h, a una temperatura de 4 a 10°C;
- obtener los metabolitos proteicos PEGilados por medio de centrifugación a fuerza de 12.000 a 20.000 xg durante 20 a 40 minutos a una temperatura de 4 a 10°C;

en donde metabolitos proteicos PEGilados tienen un tamaño de entre 158 Da a 251,5 KDa, actividad antiviral y capacidad de reparación de las uniones estrechas celulares y del citoesqueleto de células intestinales de mamíferos y aves.

De manera ventajosa, el método de la presente invención proporciona un método que permite obtener metabolitos proteicos PEGilados con actividad antiviral y antibacteriana, a partir de un cultivo bacteriano de *Bifidobacterium adolescentis*, en un fermentador brindando un producto de alta pureza.

Particularmente, el método aquí divulgado permite producir eficientemente y a gran escala metabolitos proteicos PEGilados de *Bifidobacterium adolescentis* con potencial para mejorar las defensas intestinales contra infecciones virales y bacterianas al fortalecer las uniones paracelulares de la barrera intestinal a través de la sobreexpresión de ocludina en las uniones estrechas celulares.

De manera sorprendente, realizaciones preferidas del método aquí divulgado permiten producir metabolitos PEGilados de *Bifidobacterium adolescentis*, los cuales tienen una baja toxicidad y son capaces de inhibir la infectividad del rotavirus con reversión de las alteraciones en la distribución de F-actina en células infectadas con el virus.

Asimismo, los inventores han demostrado que los metabolitos proteicos PEGilados de *Bifidobacterium adolescentis* obtenidos según realizaciones del método aquí revelado son estables y bioactivos en condiciones de consumo oral convencional, y además tienen baja toxicidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** enseña la cinética de crecimiento de *Bifidobacterium adolescentis* en diferentes condiciones de microcultivo. (a) Efecto de la velocidad de agitación (50 rpm, 100 rpm y 150 rpm) (b) Efecto de la concentración del inóculo (5% y 10%) (c) Efecto de la concentración del medio (MRS sin diluir, MRS diluido 1/2 y MRS diluido 1/5).

La **Figura 2** muestra la caracterización del crecimiento de *Bifidobacterium adolescentis* en un biorreactor a escala de laboratorio en condiciones anaeróbicas. a) Cinética de crecimiento de *B. adolescentis* b) Modelo cinético de primer orden ajustado a los datos.

5 La **Figura 3** presenta los resultados de la electroforesis en gel de poliacrilamida nativa (7,5 % PAGE) para confirmar la presencia de metabolitos proteicos PEGilados producidos en un biorreactor a escala de laboratorio y en controles de cultivo.

La **Figura 4** muestra los resultados de un ensayo colorimétrico MTT (abs 540 nm) que evidencia el efecto de dosis únicas y múltiples de los metabolitos proteicos PEGilados sobre el porcentaje de viabilidad celular y la morfología en células MA104 y C2BBe1. (a) Efecto de una dosis única de 14 concentraciones diferentes de los metabolitos proteicos PEGilados durante 24 horas. (b) Efecto de múltiples dosis de los metabolitos proteicos PEGilados a la Máxima Concentración no Tóxica MCNT administradas cada 48 horas durante 14 días. (c) 15 Fotografías de células MA104 y C2BBe1 no tratadas y tratadas con los metabolitos proteicos PEGilados en un microscopio Olympus CKX-41 (Olympus Corporation, Tokio, Japón).

La **Figura 5** muestra el efecto de dosis únicas de 14 concentraciones de proteína diferentes de un Control Abiótico (control abiótico, azul oscuro) y un Control de Producción (control de 20 producción, azul claro) sobre el porcentaje de viabilidad celular en células MA104.

La **Figura 6** presenta la evaluación de marcadores de muerte celular en células MA104 y C2BBe1 después de la exposición a los metabolitos proteicos PEGilados MCNT. (a) Translocación de fosfatidilserina evaluada utilizando Annexin V-FITC (filtro de 488 nm). (b) 25 Fragmentación de ADN evaluada utilizando fluorocromo de yoduro de propidio (PI) (filtro de 617 nm).

La **Figura 7** muestra la actividad anti-rotavirus *in vitro* en células MA104.

30 La **Figura 8** muestra el efecto de la exposición a los metabolitos proteicos PEGilados a la MCNT y a la mitad sobre la arquitectura del citoesqueleto después de la infección por RV en células C2BBe1 a las 6 hpi y 9 hpi.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

35

La presente invención se relaciona con un método para producir metabolitos proteicos PEGilados con actividad antiviral, antibacteriana y de reparación de la estructura intestinal a partir de un cultivo bacteriano de *Bifidobacterium adolescentis*.

De manera preferida el método aquí revelado comprende:

- resuspender entre 50 a 1000 μL de *B. adolescentis*, liofilizado o descongelado, en 0,5 a 10 mL de caldo MRS para formar una suspensión bacteriana;
- incubar la suspensión bacteriana a una temperatura de entre 35 a 42°C, durante 24 a 48 h, en condiciones anaeróbicas, hasta que alcance una concentración de entre 1×10^7 a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para obtener el inóculo inicial;
- cultivar el inóculo inicial en caldo MRS, incubar a una temperatura de entre 35 a 42°C, durante 24 a 48 h en condiciones anaeróbicas y agitación constante de entre 100 a 250 rpm, hasta que se encuentre en fase crecimiento exponencial o hasta que se encuentre en el final de una fase previa a la fase de crecimiento estacionaria para obtener la biomasa bacteriana;
- separar la biomasa bacteriana del medio líquido por medio de centrifugación a una fuerza de entre 600 a 800 xg, durante 10 a 20 minutos, a una temperatura de entre 4 a 10°C, o, por medio de filtración o microfiltración, para obtener los metabolitos proteicos;
- concentrar los metabolitos proteicos por medio de ultrafiltración con un ultrafiltro con punto de corte molecular de entre 1 kDa a 3 kDa, a una temperatura de entre 4 a 10°C;
- tratar los metabolitos proteicos con polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular para obtener los metabolitos proteicos PEGilados precipitados, en donde el PEG de alto peso molecular comprende una concentración de entre 8% a 12% p/v, en donde la precipitación de los metabolitos proteicos tratados con PEG comprende agitación continua de entre 35 y 60 rpm durante 12 a 18 h, a una temperatura de 4 a 10°C;
- obtener los metabolitos proteicos PEGilados por medio de centrifugación a fuerza de 12.000 a 20.000 xg durante 20 a 40 minutos a una temperatura de 4 a 10°C;

en donde los metabolitos proteicos PEGilados tienen un tamaño de entre 158 Da a 251,5 KDa, tienen actividad antiviral y capacidad de reparación de las uniones estrechas celulares y del citoesqueleto de células intestinales de mamíferos y aves. En una realización preferida de la invención, el paso de resuspender entre 50 a 1.000 μL de *B. adolescentis*, liofilizado o descongelado, en 0,5 a 10 mL de caldo MRS para formar una suspensión bacteriana comprende resuspender entre 50 a 1000 μL de *B. adolescentis*, liofilizado o descongelado, preferiblemente entre 50 a 500 μL , más preferiblemente entre 50 a 200 μL .

En una realización preferida de la invención, el paso de resuspender entre 50 a 1.000 μL de *B. adolescentis*, liofilizado o descongelado, en 0,5 a 10 mL de caldo MRS para formar una suspensión bacteriana comprende resuspender un volumen determinado de *B. adolescentis* en 0,5 a 10 mL, preferiblemente en 0,5 a 7 mL, en 0,5 a 5 mL, más preferiblemente en 0,5 a 1,5 mL, de caldo MRS para formar una suspensión bacteriana.

En una realización preferida de la invención, el paso de incubar la suspensión bacteriana a una temperatura de entre 35 a 42°C, durante 24 a 48 h, en condiciones anaeróbicas, hasta que alcance una concentración de entre 1×10^7 a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para obtener el inóculo inicial comprende incubar la suspensión bacteriana a una temperatura de entre 35 a 42°C, preferiblemente entre 36 a 38, más preferiblemente de 37°C.

Por otro lado, en realizaciones preferidas de la invención, dicho paso de incubar en condiciones anaeróbicas hasta que alcance una concentración de entre 1×10^7 a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para obtener el inóculo inicial comprende incubar la suspensión bacteriana a una temperatura determinada durante 24 a 48h, preferiblemente durante 36 a 48 h, más preferiblemente durante 48 h.

Así mismo, en realizaciones preferidas del método aquí revelado, el paso de cultivar el inóculo hasta que se encuentre en fase crecimiento exponencial o hasta que se encuentre en el final de una fase previa a la fase de crecimiento estacionaria para obtener la biomasa bacteriana se realiza a una temperatura de entre 35 a 42°C, preferiblemente entre 36 a 38, más preferiblemente de 37°C.

En otras realizaciones dicho paso de cultivar el inóculo inicial hasta que se encuentre en fase crecimiento exponencial o hasta que se encuentre en el final de una fase previa a la fase de crecimiento estacionaria para obtener la biomasa bacteriana comprende incubar a una temperatura determinada, durante 24 a 48h, preferiblemente durante 36 a 48 h, más preferiblemente durante 48 h.

En otra realización, el paso de cultivar el inóculo inicial hasta que se encuentre en fase crecimiento exponencial o hasta que se encuentre en el final de una fase previa a la fase de crecimiento estacionaria para obtener la biomasa bacteriana se realiza con agitación constante de entre 100 a 250 rpm, preferiblemente entre 150 a 200 rpm, más preferiblemente a 150 rpm.

Por otro lado, en realizaciones del método aquí revelado el paso de separar la biomasa bacteriana del medio líquido se lleva a cabo por medio de centrifugación a una fuerza de entre 600 a 800 xg, preferiblemente entre 700 a 800 xg, más preferiblemente de 730 xg.

En realizaciones de la invención, el paso de separar la biomasa bacteriana del medio líquido conlleva la centrifugación del medio líquido a una fuerza determinada, durante 15 minutos.

De forma similar, en ciertas realizaciones del método aquí divulgado, dicho paso de separar la biomasa bacteriana del medio líquido se realiza por medio de centrifugación a una temperatura de entre 4 a 10°C, preferiblemente entre 4 a 6°C, más preferiblemente 4°C.

Por otro lado, en una realización del método aquí divulgado, el paso de concentrar los metabolitos proteicos se lleva a cabo a una temperatura de entre 4 a 10°C, preferiblemente entre 4 a 6°C, más preferiblemente 4°C.

Por su parte, dentro de realizaciones preferidas, el paso de tratar los metabolitos proteicos con polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular para obtener los metabolitos proteicos

PEGilados precipitados se realiza con PEG de alto peso molecular en una concentración de entre 8% a 12% p/v, preferiblemente 9% a 11% p/v, más preferiblemente 10% p/v.

Así mismo, en realizaciones preferidas, dicho paso de tratar los metabolitos proteicos con polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular para obtener los metabolitos proteicos

5 PEGilados precipitados lleva a cabo durante 12 a 18h, preferiblemente durante 14 a 16 h, más preferiblemente durante 16 h.

De forma similar, en realizaciones de método aquí revelado, el paso de tratar los metabolitos proteicos con polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular para obtener los metabolitos proteicos PEGilados precipitados se realiza a una temperatura de entre 4 a 10°C,

10 preferiblemente entre 4 a 6°C, más preferiblemente 4°C.

En realizaciones preferidas, el paso de obtener los metabolitos proteicos PEGilados por medio de centrifugación se realiza a fuerza de 12.000 a 20.000 xg, preferiblemente entre 14.000 a 18.000 xg, más preferiblemente a 16.000 xg.

En otras realizaciones del método de la invención, dicho paso de obtener los metabolitos proteicos PEGilados por medio de centrifugación se lleva a cabo durante 20 a 40 minutos,

15 preferiblemente 25 a 35 minutos, más preferiblemente durante 30 minutos.

Así mismo, en realizaciones preferidas de la invención, dicho paso de obtener los metabolitos proteicos PEGilados por medio de centrifugación se lleva a cabo a una temperatura de entre 4 a 10°C, preferiblemente entre 4 a 6°C, más preferiblemente 4°C.

20 Por otro lado, en una realización de la invención, las condiciones anaeróbicas en las que se lleva a cabo el método aquí divulgado comprenden suministrar al sistema una mezcla de nitrógeno gaseoso y dióxido de carbono en proporción de 70 a 90 % de nitrógeno gaseoso y 30 a 10% de dióxido de carbono, con un caudal de entre 0,5 a 1 L/min.

En una realización preferida de la invención, las condiciones anaeróbicas comprenden

25 inyectar una mezcla de nitrógeno gaseoso y dióxido de carbono en proporción de 70 % a 90 % de nitrógeno gaseoso, preferiblemente 75 a 85 % de nitrógeno, más preferiblemente 80 % de nitrógeno gaseoso y 30 a 10% de dióxido de carbono, preferiblemente 25 a 15 % de dióxido de carbono, más preferiblemente 20% de dióxido de carbono.

De acuerdo con realizaciones del método aquí revelado, antes de cultivar el inóculo inicial en

30 caldo MRS se realizan las siguientes etapas:

- transferir entre 0,1 mL a 1 mL, preferiblemente entre 0,1mL a 0,5mL, más preferiblemente 0,2mL de suspensión de *B. adolescentis* a un medio MRS sólido mediante siembra masiva e incubar a una temperatura de entre 35 a 42°C, preferiblemente entre 36 a 38, más preferiblemente de 37°C, durante 24 a 48h,
- 35 preferiblemente durante 36 a 48 h, más preferiblemente durante 48 h, en condiciones anaeróbicas.

- verificar la viabilidad celular mediante recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL);

- confirmar identidad y pureza del cultivo con un sistema o estuche comercial basado en actividad bioquímica específica o un sistema equivalente para la identificación de la especie *B. adolescentis*.

Según estas realizaciones, el paso de cultivar el inóculo inicial en caldo MRS comprende
5 cultivar dicho inóculo inicial en un frasco, Erlenmeyer o tubo (0,5 – 1 L), en un tanque (25 – 50 L), o en un biorreactor.

Así mismo, en concordancia con algunas realizaciones del método aquí revelado, el paso de separar la biomasa bacteriana del medio líquido se realiza por medio de filtración con malla de retención de biomasa, o microfiltración con poro de entre 0,22 µm a 0,45 µm.

10 Según una realización de la invención, el paso de obtener los metabolitos proteicos PEGilados comprende eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en PBS 1X estéril a un factor de concentración de 20 a 50 con respecto al cultivo.

De acuerdo con realizaciones preferidas, los metabolitos proteicos PEGilados concentrados son almacenados a una temperatura de entre 4 a 10°C, preferiblemente entre 4 a 6°C, más
15 preferiblemente 4°C.

En una realización de la invención, el rango de temperatura en el que las proteínas PEGiladas son más estables es entre 4 a 45°C, más preferiblemente entre 4 a 37°C.

De forma preferida, durante el método de la invención se toma una alícuota de los metabolitos proteicos PEGilados obtenidos para determinar la concentración final de
20 proteínas.

De acuerdo con realizaciones de la invención, la determinación de la concentración final de proteínas se lleva a cabo con el método del ácido bicinconínico (BCA).

En una realización de la invención se verifica la presencia de los metabolitos proteicos PEGilados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en condiciones nativas
25 entre el 5 y 15 %, preferiblemente 6 a 10 %, más preferiblemente 7,5 %, y detectar las proteínas con tinción de nitrato de plata.

Según realizaciones de la invención, luego de tener los metabolitos proteicos PEGilados separados se evalúa *in vitro* sus efectos citotóxicos mediante la evaluación de la viabilidad celular por MTT o XTT o equivalente, y la identificación *in vitro* de marcadores de muerte
30 celular para apoptosis o necrosis en células intestinales humanas C2BBe1, CaCo2, HT-29, T84, HCT-8, SW480, INT-407, HIEC-6, o similar, otras células intestinales de cerdo como IPEC-J2 o similar y células de riñón de mono verde MA-104 o células de riñón de cerdo PK-15 o similar a concentraciones entre 500 µg/mL y 0,125 µg/mL.

De acuerdo con realizaciones del método aquí divulgado se evalúa *in vitro* la actividad
35 antiviral directa o virucida de los metabolitos proteicos PEGilados contra rotavirus (por ejemplo, cepa RRV/MOI: 0,1) y astrovirus (por ejemplo, cepa Oxford y/o Yuc-8) a concentraciones de 500 µg/mL y 0,125 µg/mL mediante inmunocitoquímica ensayo de unidades formadoras de placas o ensayo de focos fluorescentes o Reacción en cadena de la

polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR) en células intestinales humanas como C2BBe1 o las incluidas en anteriores realizaciones y células de riñón de mono verde MA-104.

Así mismo, realizaciones de la invención incluyen la evaluación *in vitro* de la actividad post-infección de los metabolitos proteicos PEGilados contra rotavirus (por ejemplo, cepa RRV/MOI: desde 0,1 hasta 5) y astrovirus (por ejemplo, cepa Oxford y/o Yuc-8 /MOI: Desde 0,1 hasta 5) a concentraciones entre 500 µg/mL y 0,125 µg/mL mediante inmunocitoquímica o ensayo de focos fluorescentes o reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR) en células intestinales humanas como, por ejemplo, C2BBe1, CaCo2, HT-29, T84, HCT-8, SW480, INT-407, HIEC-6, o similares y células de riñón de mono verde MA-104.

De otra parte, realizaciones de la invención incluyen pasos adicionales en los que se evalúa *in vitro* la actividad de reparación estructural celular producida por los metabolitos proteicos PEGilados contra rotavirus (por ejemplo, cepa RRV/MOI: 0,1) y astrovirus (por ejemplo, cepa Oxford y/o Yuc-8) post-infección a concentraciones de 500 µg/mL y 0,125 µg/mL mediante inmunocitoquímica o ensayo de focos fluorescentes o reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR) en células intestinales humanas como C2BBe 1, CaCo2, HT-29, T84, HCT-8, SW480, INT-407, HIEC-6, o similares y células de riñón de mono verde MA-104.

La presente invención se explica con mayor detalle en lo siguiente al hacer referencia a los ejemplos, los cuales son meras ejemplificaciones y no limitan la presente invención.

EJEMPLOS

1. Activación de *Bifidobacterium adolescentis*

Se cultivó *Bifidobacterium adolescentis* liofilizado en medio líquido MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) en condiciones anaeróbicas a 37 °C para la activación bacteriana. La pureza se verificó utilizando un kit de identificación enteral/no fermentador BBL™ Crystal™ (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) y se determinó que la viabilidad era $\geq 10^7$ UFC/ml.

2. Condiciones de cultivo para *B. adolescentis* en un biorreactor a escala de laboratorio

Se realizó la evaluación del efecto de la velocidad de agitación, la concentración del inóculo y la concentración del medio de cultivo en la producción de biomasa de *Bifidobacterium adolescentis* como se describirá a continuación:

Para mejorar el cultivo estático tradicional de *Bifidobacterium adolescentis*, que normalmente se lleva a cabo en condiciones no controladas, se evaluó primero el efecto de

la velocidad de agitación en su crecimiento anaeróbico. Se probaron tres velocidades de agitación (50, 100 y 150 rpm), junto con un control sin agitación, para determinar su impacto en la producción de biomasa y la cinética de crecimiento. Además, se evaluaron dos concentraciones de inóculo (5% y 10% v/v) y tres diluciones del medio de cultivo MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) (medio MRS a la concentración recomendada por el fabricante, así como a diluciones 1:2 y 1:5). La producción de biomasa se controló cada 6 horas mediante cuantificación del peso seco en microcultivos de 5 mL y 25 mL.

Para la evaluación de la agitación, se inocularon 5 mL de medio MRS y se incubaron a 37 °C durante 54 horas en condiciones anaeróbicas a las velocidades de agitación probadas. En los microcultivos de 25 mL, se evaluaron los efectos de la concentración del inóculo y la dilución del medio en condiciones idénticas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado en tres ensayos independientes.

Después de determinar las condiciones de crecimiento para *B. adolescentis* a partir de las pruebas preliminares, se realizó el primer cultivo en lote en un biorreactor Applikon de 3 L (Applikon Biotechnology, Delft, Países Bajos), con un volumen máximo de trabajo de 1,5 L. El biorreactor estaba equipado con un sistema de agitación mecánica con dos turbinas Rushton, medidores de flujo de CO₂ y N₂ y sensores integrados de pH y oxígeno disuelto (OD) para el monitoreo y control en tiempo real de las condiciones de cultivo. Se mantuvo la temperatura a 37°C y 0% de OD utilizando el sistema de control automatizado del biorreactor. Se generó una curva de crecimiento inicial durante 54 horas, con muestras tomadas cada 6 horas para monitorear la concentración de biomasa. Esta primera curva definió las fases de crecimiento bacteriano (Lote 1). Las curvas de crecimiento posteriores (Lotes 2, 3 y 4) se realizaron en el punto de máxima concentración de biomasa (final de la fase exponencial).

El biorreactor, con un volumen de trabajo de 1,5 L de medio MRS, se inoculó con 75 mL de *B. adolescentis* (5% v/v). El cultivo se mantuvo a 37°C, con inyección constante de N₂ y CO₂, y la agitación se aumentó a 200 rpm para mejorar la dispersión de las burbujas de CO₂. Se recogieron muestras (5 mL) cada 6 horas, se dividieron en tres tubos, se centrifugaron a 730 x g durante 15 minutos y el pellet se utilizó para las mediciones de peso seco de biomasa.

La velocidad de agitación influyó significativamente en el crecimiento bacteriano, y velocidades más altas resultaron en una mayor producción de biomasa ($p < 0,001$) en comparación con los cultivos estáticos. A 150 rpm, las bacterias permanecieron en la fase exponencial, produciendo 0,87 g/L más de biomasa, un aumento del 84,64% en comparación con los cultivos sin agitación (Figura 1a). Luego, se evaluó la concentración de inóculo al 5% (v/v) y al 10% (v/v), mostrando una producción de biomasa similar durante la mayor parte del período de cultivo. Sin embargo, se observó un aumento significativo ($p > 0,001$) en la

biomasa a la hora 30 con el inóculo al 5% en comparación con el 10% (Figura 1b). Finalmente, la concentración del medio de cultivo tuvo un efecto significativo en el crecimiento bacteriano ($p < 0,001$). El medio MRS diluido 1/5 no favoreció el crecimiento de *B. adolescentis*, mientras que el medio diluido 1/2 permitió una fase de crecimiento exponencial, aunque con niveles de biomasa más bajos en comparación con el medio sin diluir. El medio MRS sin diluir produjo la concentración de biomasa más alta (3,72 g/L), 51,33% más alta que en el medio diluido 1/2 (Figura 1c).

La Figura 1 muestra la cinética de crecimiento de *B. adolescentis* en diferentes condiciones de microcultivo. (a) Efecto de la velocidad de agitación (50 rpm, 100 rpm y 150 rpm) en el crecimiento en un medio de cultivo MRS de 5 mL en condiciones anaeróbicas, con un inóculo del 5%, a 37°C durante 54 horas. (b) Efecto de la concentración del inóculo (5% y 10%) en el crecimiento en un medio de cultivo MRS de 25 mL en condiciones anaeróbicas, a 37°C, 150 rpm, durante 54 horas. (c) Efecto de la concentración del medio (MRS sin diluir, MRS diluido a la mitad y MRS diluido a la quinta parte) en el crecimiento en un cultivo de 25 mL en condiciones anaeróbicas, con un inóculo del 5%, a 37°C, 150 rpm, durante 54 horas. Los puntos de datos representan la media de tres experimentos independientes, con barras de error que indican la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico para evaluar las diferencias significativas entre los grupos, eligiendo la prueba adecuada (paramétrica o no paramétrica) según la distribución de los datos.

Consecuentemente, el método de la invención aquí descrita permite establecer las mejores condiciones de cultivo, como la velocidad de agitación, la concentración del inóculo y la concentración del medio de cultivo, lo que tiene un impacto significativo en la producción de biomasa de *Bifidobacterium adolescentis*.

2.1. Evaluación del crecimiento de *B. adolescentis* en un biorreactor de 3 L

Después de identificar las condiciones adecuadas para el crecimiento para *B. adolescentis* en microcultivo, se aplicaron estos parámetros al cultivo en biorreactor para mejorar el rendimiento de biomasa y realizar un seguimiento de las fases clave de crecimiento. La dinámica de crecimiento se evaluó en un cultivo de 1,5 L dentro de un biorreactor de 3 L, lo que permitió un seguimiento preciso de la curva de crecimiento bacteriano en condiciones de ampliación. La fase exponencial duró de 6 a 42 horas, con una concentración máxima de biomasa de 2.109 g/L. Se observó una disminución del crecimiento después de 48 horas, lo que indica una transición a la fase estacionaria (Figura 2a). La cinética de primer orden del crecimiento de *B. adolescentis* en condiciones de biorreactor se presenta en la Figura 2b. Este análisis se realizó para determinar la tasa de crecimiento específica y el tiempo de duplicación del cultivo. La línea de tendencia cinética arrojó un coeficiente de determinación

(R²) de 0,917, con una tasa de crecimiento específica de 0,068 h⁻¹ y un tiempo de duplicación calculado de 10 horas.

La figura 2 presenta la caracterización del crecimiento de *Bifidobacterium adolescentis* en biorreactor a escala de laboratorio en condiciones anaeróbicas. a) La cinética de crecimiento de *B. adolescentis* se monitoreó en un biorreactor de 3 L con un volumen de trabajo de 1,5 L de medio MRS. El tamaño del inóculo fue del 5% (v/v), con agitación a 200 rpm y temperatura a 37°C durante 54 horas. Los puntos de datos representan la media de tres mediciones independientes, con barras de error que indican la desviación estándar. b) Cinética de crecimiento de orden 1 a partir de la figura a, seleccionando el tiempo de crecimiento exponencial y el logaritmo natural del valor de biomasa en cada hora monitoreada (fase exponencial), sobre el valor de biomasa a la hora cero. Las barras de error indican la desviación estándar.

3. Producción de los metabolitos proteicos PEGilados de *B. adolescentis*

Una vez establecida la fase exponencial del cultivo controlado de *B. adolescentis*, se montaron tres lotes a un volumen final de 1,5 L. Entre ellos, solo el lote 2 cumplió con todas las condiciones controladas de cultivo, logrando una concentración de proteína de 2.323 µg/mL. En comparación, los lotes 1 y 3 produjeron concentraciones de proteína total de 486 µg/mL y 2.571 µg/mL, respectivamente. El cultivo de control abiótico produjo una concentración de proteína de 578 µg/mL. Las proteínas del lote 2 se utilizaron posteriormente para ensayos de toxicidad celular y pruebas de actividad antiviral en células MA104. Particularmente, se seleccionó el lote 2 debido a que fue el lote con el cual se desarrollaron todos y cada uno de los pasos del método de producción de metabolitos aquí descrito.

Se monitoreó la biomasa y las proteínas totales, y se separaron las proteínas de interés. La separación de proteínas se realizó por medio de la centrifugación del cultivo final a 7.500 xg durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se ultrafiltró utilizando un casete Pellicon® XL 50 (Merck Millipore). Se añadió PEG 8000 (10% p/v) al volumen retenido, y la mezcla se agitó durante la noche (16 h) a 4°C.

Las proteínas se precipitaron por centrifugación a 16.100 xg durante 30 minutos a 4°C, después se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en PBS 1X estéril y se microfiltró a través de una membrana de 0,22 µm.

Adicionalmente, se incluyeron dos controles de cultivo de *B. adolescentis* para comparar la citotoxicidad y la actividad antiviral en células MA104: (1) un control abiótico (CA), que

consistió en un cultivo de 1,5 L de medio MRS sin *B. adolescentis*; y (2) un control de producción (CP) según la metodología de Hernández, M., *et al*, 2023 (Hernández, M.; Sieger, M.; Barreto, A.; Guerrero, C.A.; Ulloa, J. Postbiotic Activities of *Bifidobacterium adolescentis*: Impacts on Viability, Structural Integrity, and Cell Death Markers in Human Intestinal C2BBE1 Cells. *Pathogens* **2023**, *13*, 632 doi:10.3390/pathogens13010017), en el que la producción de proteínas se realizó en matraces con un volumen de trabajo de 500 mL durante 30 horas, un método previamente demostrado que exhibe actividad anti-rotavirus *in vitro*. Ambos controles se incubaron en las mismas condiciones que el cultivo experimental y se sometieron a procedimientos idénticos de centrifugación, ultrafiltración y precipitación de proteínas.

La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA (Thermo Scientific™, Waltham, MA, EE. UU., Cat #23227), con albúmina de suero bovino (BSA) como estándar para la curva de calibración. La presencia de proteínas se confirmó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida nativa (concentración del 7,5 %). Se cargó un total de 100 ng de proteína en cada carril para el análisis PAGE, y las proteínas se visualizaron utilizando tinción con nitrato de plata (Figura 3).

La figura 3 muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (7,5 % PAGE) para confirmar la presencia de las proteínas PEGiladas de *B. adolescentis* producidas en biorreactor a escala de laboratorio y los controles de cultivo. De izquierda a derecha, los carriles corresponden a: el marcador de peso molecular (kDa), proteínas del control abiótico (AC), control de producción (PC) y proteínas PEGiladas de *B. adolescentis* Pet de los lotes 1, 2, y 3. Se cargó un total de 100 ng de cada grupo proteico por carril y las proteínas se tiñeron con nitrato de plata.

Estos resultados destacan la importancia de un control preciso de las condiciones de cultivo para maximizar la producción de metabolitos proteicos a partir de cultivos bacterianos de *B. adolescentis*, lo que permite su potencial escalamiento a nivel industrial.

4. Líneas celulares y virus

Se utilizó la línea celular MA104 (células de riñón de mono verde africano) y la línea celular C2BBE1-ATCC 186 2102™ (células de adenocarcinoma de colon humano, subclon de CaCo2). Las células se mantuvieron a 37 °C con 5 % de CO₂ en una atmósfera húmeda y se cultivaron en medio Advanced - DMEM (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EE. UU.) suplementado con 5 % de suero bovino fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina y antibiótico/antimicótico (Gibco™, Grand Island, NY, EE. UU.).

La cepa de rotavirus RRV (*Rhesus Rotavirus*) se activó con 10 µg/mL de tripsina durante 1 hora a 37 °C y posteriormente se neutralizó con inhibidor de tripsina de soja (Life Technologies™, Carlsbad, CA, EE. UU., Cat # R-007-100).

5. Citotoxicidad de los metabolitos proteicos PEGilados en células MA104 y C2BBe1

5.1.1. Efecto de las proteínas PEGiladas de *B. adolescentis* sobre la viabilidad celular con dosis única

Se evaluó el efecto citotóxico de los metabolitos proteicos PEGilados producidos en el biorreactor en células MA104 y C2BBe1 susceptibles al rotavirus, tanto en dosis únicas como repetidas (14 días/cada 48 h). Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos, con 10.000 células MA104 y 30.000 células C2BBe1 por pocillo, incubadas durante 48 horas hasta alcanzar >90% de confluencia. Para la evaluación de dosis única, se aplicaron 14 concentraciones de los metabolitos proteicos PEGilados (desde 250 µg/mL a 0,03 µg/mL en medio Advanced - DMEM sin SFB) a las células durante 24 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. La viabilidad celular se evaluó utilizando el ensayo MTT (Sigma-Aldrich®, Cat #M5655), siguiendo las instrucciones del fabricante, con la absorbancia medida a 540 nm utilizando un lector de placas (Thermo Scientific™ Multiskan™ FC). Las proteínas obtenidas del control abiótico y control de producción se incluyeron como controles para evaluar la actividad citotóxica de los metabolitos proteicos PEGilados. La concentración máxima no tóxica (CMNT) se definió como la concentración más alta de los metabolitos proteicos PEGilados que mantiene ≥95 % de viabilidad celular. Se realizaron tres experimentos independientes, cada uno por triplicado.

Los resultados de la exposición a dosis única de 14 concentraciones diferentes de los metabolitos proteicos PEGilados, en células MA104 y C2BBe1, durante 24 horas se presentan en la Figura 4a. En las células MA104, ninguna de las concentraciones de los metabolitos proteicos PEGilados evaluadas causó una disminución significativa en la viabilidad celular. Se observó un aumento en la viabilidad celular en 8 de las concentraciones probadas, y la concentración de 0,06 µg/mL mostró el mayor, alcanzando el 24%. En las células C2BBe1, ninguna de las 14 concentraciones probadas exhibió efectos citotóxicos en términos de reducción de la viabilidad celular. Por el contrario, 12 de las concentraciones aumentaron significativamente la viabilidad celular en comparación con el control ($p < 0,001$), con aumentos de hasta el 22%.

5.1.2. Efecto de la concentración máxima no tóxica (CMNT) de las proteínas PEGiladas de *B. adolescentis* sobre la viabilidad celular con dosis repetidas

Cada modelo celular se expuso a la CMNT de los metabolitos proteicos PEGilados (250 $\mu\text{g/mL}$) cada 48 horas durante 14 días (dosis repetidas). Los controles incluyeron células no tratadas (control celular, CC) y células expuestas a 1 mM H_2O_2 (control de citotoxicidad). La actividad mitocondrial (MTT) se midió como se describió previamente. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes, cada uno por triplicado. Las células no expuestas a los metabolitos proteicos PEGilados (células de control, CC) y las células expuestas a 1 mM H_2O_2 para MA104 o 50 mM H_2O_2 para C2BBe1 (control de citotoxicidad) se incubaron en paralelo para ambos ensayos. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron de forma independiente tres veces. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes ($p < 0,05$) con el software GraphPad Prism 6.0b.

Los resultados no mostraron una reducción significativa de la viabilidad celular para las líneas celulares evaluadas. Particularmente, la figura 4b muestra el efecto de dosis múltiples de las proteínas PEGiladas de *B. adolescentis* a la CMNT administradas cada 48 horas durante 14 días. Cada barra representa la media del porcentaje de viabilidad celular de tres experimentos independientes, con barras de error que indican la desviación estándar. Las comparaciones entre CC y proteínas PEGiladas de *B. adolescentis* (BaP) a la CMNT y H_2O_2 se analizaron utilizando la prueba U de Mann-Whitney con un nivel de confianza del 95%. Los niveles de significancia se indican de la siguiente manera: $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$. CC: Control celular; H_2O_2 : Control positivo. Sin embargo, en las células C2BBe1, la actividad de la succinato deshidrogenasa aumentó significativamente en un 3,35 % ($p < 0,05$) después de la exposición repetida a los metabolitos proteicos PEGilados.

Finalmente, se observaron algunos cambios morfológicos, incluida la circularización, el desprendimiento y el agrandamiento de las células, tanto en los grupos de control como en los tratados, y estas alteraciones fueron más prominentes en la línea celular MA104. Particularmente, la Figura 4c muestra fotografías de células MA104 y C2BBe1 no tratadas y tratadas con las proteínas PEGiladas de *B. adolescentis* en un microscopio Olympus CKX-41 (Olympus Corporation, Tokio, Japón) utilizando una cámara Moticam con el software MoticImages, con un aumento de 100X. Las imágenes muestran la morfología clásica de las células epiteliales en monocapas y resaltan un aumento de los grupos de células tratadas.

5.1.3. Efecto de la concentración máxima no tóxica (CMNT) sobre marcadores de muerte relacionados con respuestas apoptóticas/necróticas.

Adicionalmente, se cultivaron células C2BBe1 y MA104 en microplacas de 96 pocillos de poliestireno negro de fondo transparente y planos tratadas con TC (Costar®, Kennebunk, ME, EE. UU.) y se expusieron cada 48 horas durante 14 días a CMNT a los metabolitos proteicos

PEGilados producidos en biorreactor (250 µg/mL) a 37 °C con CO₂ al 5 %. Las células no expuestas a los metabolitos proteicos PEGilados (control celular: CC) y expuestas a 1 mM de H₂O₂ para células M104 o 50 mM de H₂O₂ para C2BBE1 (control de citotoxicidad) se incubaron en paralelo. La asimetría de la membrana plasmática (translocación de fosfatidilserina a la membrana celular externa de la hoja) y la fragmentación del ADN se evaluaron por fluorometría con anexina V y yoduro de propidio, respectivamente, con el kit ApoDETECT™ Annexin V-FITC (Invitrogen™, Frederick, MD, EE. UU.). El kit se utilizó sin centrifugaciones ya que estas líneas celulares son adherentes y, al final, se realizó la fijación celular agregando 50 µL de paraformaldehído al 2% (Sigma Aldrich®, Ltd.; St, Louis, MO, EE. UU.). Las señales de fluorescencia se midieron como unidades de fluorescencia relativas (RFU) en un lector de placas FLUOstar® Omega (BMG LABTECH, Allmendgrün, Ortenberg, Alemania). Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron independientemente tres veces. Las diferencias se analizaron mediante la prueba T de Student para muestras independientes ($p < 0,05$) utilizando el software GraphPad Prism 6.0b.

5.1.4. Evaluación de la citotoxicidad de las proteínas del control abiótico (AC) y del control de Producción (PC)

Concentraciones de 250 µg/mL y 125 µg/mL de las proteínas del CA (Caldo MRS sin inoculación de *B. adolescentis*) redujeron significativamente la viabilidad celular de células MA104, mientras que siete de las concentraciones probadas aumentaron la actividad succinato deshidrogenasa entre un 9% y un 45%. Por otra parte, ninguna de las 14 concentraciones de las proteínas de *B. adolescentis* producidas con el método de Hernández *et al* 2023 (Hernández, M.; Sieger, M.; Barreto, A.; Guerrero, C.A.; Ulloa, J. Postbiotic Activities of *Bifidobacterium adolescentis*: Impacts on Viability, Structural Integrity, and Cell Death Markers in Human Intestinal C2BBE1 Cells. *Pathogens* **2023**, *13*, doi:10.3390/pathogens13010017) evidenció citotoxicidad en células MA104, sin embargo, se observó que estas producen un aumento significativo de la actividad succinato deshidrogenasa, siendo la concentración de 125 µg/mL la que más aumentó dicha actividad con un valor de porcentaje de viabilidad de 128%.

La Figura 5 muestra el efecto que producen 14 concentraciones diferentes de proteína de un Control Abiótico (AC, azul oscuro) y un Control de Producción (PC, azul claro) sobre el porcentaje de viabilidad celular en células MA104, medido mediante el ensayo colorimétrico MTT (Abs 540 nm). Cada barra representa el porcentaje medio de viabilidad celular de tres experimentos independientes, con barras de error que indican la desviación estándar. Los datos se analizaron utilizando una prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes. Las diferencias entre las concentraciones evaluadas y el control de células (CC) fueron

significativas a $p < 0,001$. El control celular (CC) corresponde a células no tratadas, cultivadas en medio sin FBS.

5.1.5. Ensayos complementarios para evaluar la citotoxicidad mediada por la expresión de marcadores de muerte celular asociados con la apoptosis y la necrosis.

Para reunir evidencia adicional sobre los posibles efectos *in vitro* de las proteínas de *B. adoslescentis*, se realizó un ensayo complementario para evaluar la citotoxicidad cuantificando la expresión de marcadores de muerte celular asociados con la apoptosis y la necrosis (Figura 6). Después de 8 días de exposición de las proteínas de *B. adoslescentis* a la CMNT, administrada cada 48 horas, las células intestinales C2BBe1 exhibieron un aumento significativo ($p < 0,05$) de aproximadamente 1.000 unidades de fluorescencia relativa (RFU) en la translocación de fosfatidilserina (PS), sin evidencia de fragmentación del ADN (Figura 6a). Por el contrario, las células MA104 no mostraron cambios significativos en ninguno de los marcadores de muerte celular en comparación con el control (Figuras 6a y b).

La Figura 6 muestra la evaluación de marcadores de muerte celular después de la exposición a las proteínas de *B. adoslescentis* a la CMNT en células MA104 (recuadros azules) y C2BBe1 (recuadros rojos) durante 8 días cada 48 h. (a) Translocación de fosfatidilserina evaluada utilizando Annexin V-FITC (filtro de 488 nm). (b) Fragmentación de ADN evaluada utilizando fluorocromo de yoduro de propidio (PI) (filtro de 617 nm). Los recuadros representan la media y el rango intercuartil de tres experimentos independientes con exposición a las proteínas de *B. adoslescentis* a la CMNT. Los bigotes indican los valores máximos y mínimos. Las comparaciones entre el control celular (CC) y las proteínas de *B. adoslescentis* a la CMNT se analizaron utilizando la prueba t de Student con un nivel de confianza del 95%. Los niveles de significancia se indican de la siguiente manera: $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$. Abreviaturas: CC, control celular; H_2O_2 , control positivo.

6. Evaluación de la actividad anti-rotavirus de los metabolitos proteicos PEGilados

La actividad antiviral de los metabolitos proteicos PEGilados de *B. adoslescentis* producidos en un biorreactor se evaluó mediante co-incubación de estos con rotavirus (RRV) seguida de exposición a células MA104. También se incluyeron las proteínas de los controles: control abiótico y control de producción. La CMNT de los metabolitos proteicos PEGilados y una dilución a la mitad (1:2) se co-incubaron en una proporción 1:1 con RRV a una concentración final de 20.000 unidades formadoras de focos (FFU) previamente activadas con tripsina durante 1 hora a 37°C. Después de la co-incubación, la mezcla se aplicó a células MA104 previamente cultivadas en placas de fondo negro de 96 pocillos (Costar®, Cat # 3603) durante 1 hora a 37°C para facilitar la adsorción viral. Las células se lavaron y se incubaron durante 9

horas posteriores a la infección (hpi). Después de 9 hpi, las células se fijaron con acetona al 80 %-PBS (v/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA), seguido de tres lavados con PBS 1X estéril (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

- 5 A continuación, se añadieron 50 µL de anticuerpo primario anti-TLP y las células se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS 1X estéril y se añadieron 50 µL de anticuerpo secundario IgG anti-conejo de cabra conjugado con Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las células se lavaron dos veces con PBS 1X estéril y se
- 10 cuantificó la fluorescencia utilizando un lector de placas Omega FLUOStar® (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemania) con excitación a 488 nm y emisión a 520 nm. Los resultados de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado, se expresaron como porcentaje de infectividad. Finalmente, se obtuvieron imágenes de focos infecciosos fluorescentes utilizando un microscopio invertido Olympus CKX-41 (Olympus Corporation,
- 15 Tokio, Japón), equipado con un módulo Lumin Epi-Fluorescence. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron de forma independiente tres veces. Las diferencias se analizaron mediante la prueba T de Student para muestras independientes ($p < 0,05$) utilizando el software GraphPad Prism 6.0b.
- 20 Con base en la evaluación de citotoxicidad usando el ensayo MTT (Figuras 4 y 5), la CMNT fue determinado para las proteínas provenientes del control abiótico, y el control de producción (Figura 6). La CMNT y una concentración a la mitad fueron evaluadas para conocer su actividad anti-rotavirus usando un enfoque de co-incubación (efecto virucida) en células MA104, seguido por cuantificación de FFU/mL. Como se muestra en la figura 7a,
- 25 ambas concentraciones de los metabolitos proteicos PEGilados (250 µg/mL y 125 µg/mL) resultaron en una reducción significativa en la infección por rotavirus, con disminuciones de 16% y 17%, respectivamente. En contraste, la evaluación de la actividad antiviral de las proteínas obtenidas del control abiótico (Figura 7b) no mostró reducción en el porcentaje de infección en ninguna de las concentraciones probadas. Para las proteínas del control de
- 30 producción, ambas concentraciones evaluadas redujeron significativamente el porcentaje de infección en 42% y 45%, respectivamente (Figura 7c).

La figura 7 muestra la actividad anti-rotavirus *in vitro* en células MA104. El rotavirus Rhesus (RRV) se co-incubó con dos concentraciones de (a) proteínas de *B. adoslescentis* producidas

35 en bioreactor, (b) CA y (c) CP durante 1 hora a 37 °C. Las células MA104 se expusieron posteriormente a la mezcla con proteínas de *B. adoslescentis*/AC/PC-RRV y se incubaron durante 9 horas adicionales. Los niveles de infección viral se cuantificaron utilizando inmunofluorescencia para medir las FFU/mL, y se graficaron los porcentajes de infección calculados en relación con el control de infección positiva (RRV) sin tratamiento. El diagrama

de dispersión muestra valores medios con barras de error que representan la desviación estándar de tres muestras independientes. Las comparaciones entre el control positivo de la infección (RRV) y los tratamientos con las proteínas de *B. adollescentis* se analizaron utilizando la prueba t de Student con un nivel de confianza del 95%, con niveles de significancia indicados de la siguiente manera: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$. Abreviaturas: RRV, control positivo de la infección; MOCK, control no infectado. Las fotografías se capturaron utilizando un microscopio invertido Olympus CKX-41 455 (Olympus Corporation, Tokio, Japón) equipado con un módulo de epifluorescencia Lumin y una cámara Moticam con el software MotiClmages, con un aumento de 100×. Las imágenes muestran unidades formadoras de focos infecciosos (FFU) en verde, que representan células infectadas con RRV.

7. Efecto post-infección de la administración de los metabolitos proteicos PEGilados en la estructura de células intestinales humanas– C2BBe1.

Se evaluó el impacto de los metabolitos proteicos PEGilados en la estructura del citoesqueleto de las células C2BBe1 después de la infección por rotavirus (RV) a la concentración máxima no tóxica (CMNT) y a una concentración de media dosis (250 µg/ml y 125 µg/ml).

Para ello, las células C2BBe1 se sembraron en cubreobjetos de 6 mm en placas de 24 pocillos hasta alcanzar el 100% de confluencia. Las células se infectaron con rotavirus (RRV) preactivado y se dejaron adsorber durante 1 hora a 37 °C. Después de la adsorción, las células se lavaron dos veces con PBS 1X estéril y se incubaron en medio sin suero. A las 3 horas post-infección (hpi), se añadieron los metabolitos proteicos PEGilados y las células se incubaron hasta las 6 hpi y 9 hpi, puntos temporales conocidos por el aumento de la expresión de NSP4 y la concentración elevada de Ca^{2+} intracelular, lo que da lugar a alteraciones del citoesqueleto. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2 % (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU.) durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA), seguido de dos lavados con PBS 1X estéril (Gibco™). Las células se permeabilizaron con Triton™ X-100 al 0,03 % (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU.) en PBS 1X durante 5 minutos y se lavaron tres veces igualmente con PBS 1X estéril. La estabilidad del citoesqueleto se evaluó mediante tinción con faloidina conjugada con Alexa Fluor® (Molecular Probes™, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Cat# 12379) durante 30 minutos a TA, seguido de dos lavados con PBS 1X estéril.

Se montaron portaobjetos de vidrio con 50 % de glicerol-PBS (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU.) y se realizaron observaciones con un microscopio de epifluorescencia Zeiss HAL 100 (Zeiss, Oberkochen, Alemania) con un objetivo de 40X. Los registros fotográficos se capturaron con el software Zen 2.3 lite (Zeiss) y las imágenes se analizaron con el software

FotoCanvas v1.1 e ImageJ (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, EE. UU.). El experimento se realizó por duplicado.

Las células tratadas con 250 µg/mL de los metabolitos proteicos PEGilados a las 6 y 9 horas posteriores a la infección (hpi) exhibieron diferentes cambios morfológicos en comparación con los controles no infectados. Mientras que las células infectadas no tratadas exhibieron una desorganización pronunciada del citoesqueleto, lo que resultó en una pérdida de la morfología celular con un redondeo predominante a las 9 hpi, las células tratadas con los metabolitos proteicos PEGilados mostraron una morfología similar al control sin tratamiento MOCK, con una mayor concentración de F-actina observada tanto a las 6 como a las 9 hpi cuando se trataron con 250 µg/mL. Además, las células tratadas con 125 µg/mL de los metabolitos proteicos PEGilados mostraron una morfología más homogénea, más parecida al control MOCK no tratado en comparación con las tratadas con 250 µg/mL, un efecto evidente tanto a las 6 como a las 9 hpi.

La figura 8 muestra el efecto de la exposición de células intestinales humanas C2BBel infectadas con RV a la CMNT de las proteínas PEGiladas de *B. adolescentis* y la mitad sobre la arquitectura del citoesqueleto a las 6 hpi y 9 hpi. Las fotomicrografías muestran la morfología y la distribución del citoesqueleto celular en células no infectadas (MOCK), células no tratadas infectadas (+RRV) y cada condición de tratamiento con las proteínas PEGiladas. La fluorescencia en verde (F-actina) indica la organización del citoesqueleto.

Los resultados obtenidos al evaluar los efectos de los metabolitos proteicos PEGilados demuestran un notable potencial en su aplicación en diversas áreas de la biotecnología. La PEGilación de los metabolitos proteicos mejora su estabilidad y funcionalidad, lo que abre nuevas oportunidades para su uso en la producción de productos biológicos y procesos industriales. Estos hallazgos subrayan la viabilidad de producir estos metabolitos a gran escala, proporcionando una opción eficiente y sostenible para diversas aplicaciones biotecnológicas.