# “ESTUDIO DEL ROL DE LOS ARNS PEQUEÑOS DE LA LECHE COMO FACTORES DE PROTECCIÓN FRENTE AL ESTRÉS TÉRMICO EN BACTERIAS DEL GÉNERO *LACTOBACILLUS*”

**Borri, Octavio[1,2]; Acciarri, Giuliana[1]; Claus, Clara[1]; Spinelli Silvana[1].**

[1] Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IDICER - CONICET - UNR).
[2] Cátedra de Fisiología Humana - Facultad de Ciencias Médicas UNR

## INTRODUCCIÓN

La leche bovina se considera cada vez más no solo una fuente de nutrientes, sino una matriz bioactiva compleja con moléculas de función regulatoria. Específicamente, contiene un amplio repertorio de ARN pequeños no codificantes (sARNs), caracterizados por una elevada estabilidad estructural que les permite persistir frente a tratamientos térmicos como la pasteurización y el tratamiento UHT (ultra-high temperature). A pesar de su persistencia en matrices lácteas, se desconoce su potencial regulador sobre la respuesta al estrés en bacterias del microbioma. En este estudio investigamos el rol de oligonucleótidos sintéticos correspondientes a estos sARNs lácteos termoestables —en particular, fragmentos derivados de ARNt y ARNr— en la modulación de la respuesta al estrés térmico de *Lactobacillus*, evaluando su capacidad para mejorar la supervivencia bacteriana ante un choque térmico agudo.

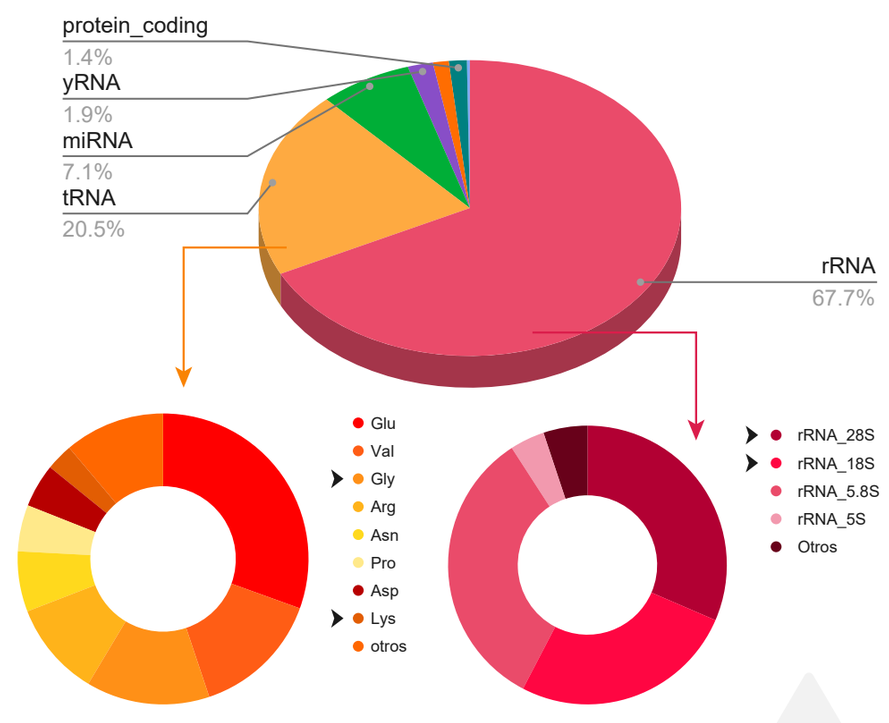



Fig.1 Repertorio de sRNA en leche bovina (n=8). Distribución general por biotipos (arriba) y desglose de las clases dominantes según isoaceptor parental de ARNt (tDR, izquierda) y especie de ARNr de origen (rDR, derecha). En recuadros se destacan las especies seleccionadas para estudio en este trabajo (Gly, Lys, 28S y 18S).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar la respuesta al estrés térmico, se aplicó un protocolo estandarizado de shock térmico sobre cultivos de *Lactobacillus reuteri.* Las bacterias fueron tratadas con ARNs totales extraídos de leche entera o con un pool de 10 oligonucleótidos sintéticos homólogos a sRNAs abundantes en leche (MixRNA, 100 nM). Adicionalmente, se evaluaron de forma individual cuatro sRNAs: rRF 18S-1120, rRF 28S-5', 5'-tRF-Gly y 5'-tR-F-Lys. Como control negativo se utilizó un microARN exógeno (cel-miR-39 de *C. elegans*), y para determinar la especificidad dependiente del ARN lácteo, los cuatro sRNAs se compararon con análogos sintéticos de ADN de secuencia idéntica. Por último, el efecto protector se evaluó en *Lactobacillus plantarum* y en enteropatógenos de referencia (*Escherichia coli ATCC 25922* y *Salmonella Typhimurium*).

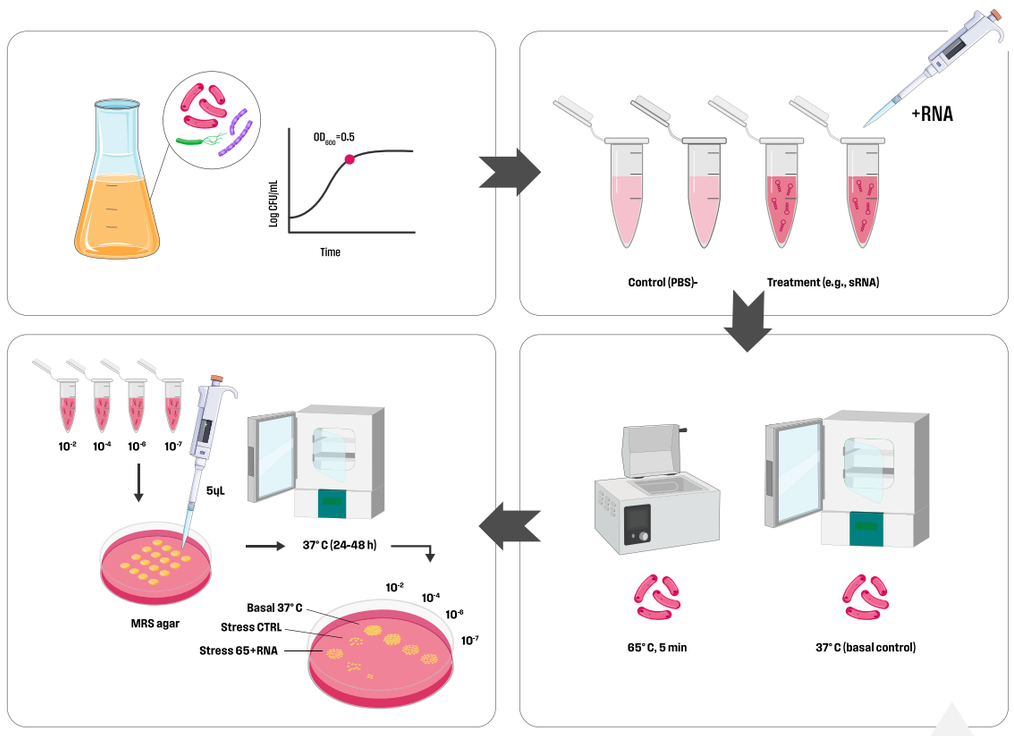



Fig.2. Diseño experimental del protocolo de respuesta al estrés térmico

## RESULTADOS

### EL ARN LÁCTEO CONFIERE TERMOPROTECCIÓN EN *L. REUTERI*

- El shock térmico (65 °C, 5 min) reduce la viabilidad a <0,01% frente al control basal (37 °C).
- El ARN de leche cruda rescata la supervivencia al 19,3 ± 2,2% ($p < 0,0001$).

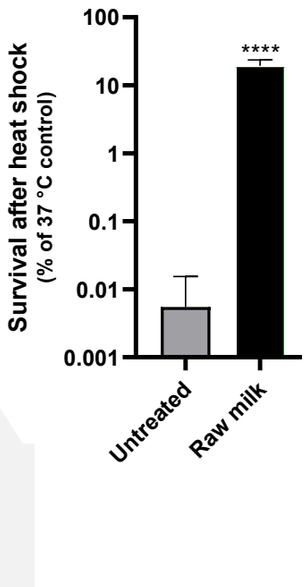



Fig. 3: Supervivencia de *L. reuteri* sometida a shock térmico (65 °C, 5 min) con y sin ARN de leche cruda, normalizada frente al control basal (37 °C).

### LOS ARN LÁCTICOS EJERCEN UN EFECTO PROTECTOR SELECTIVO EN BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS (BAL)

- La mezcla sintética (MixARN) reproduce el efecto protector observado con ARN total.
- Rescate significativo en BAL: *L. reuteri* (~1.000x) y *L. plantarum* (~500x) ($p < 0,001$).
- Sin diferencia significativa en supervivencia respecto al control en bacterias patógenas (*E. coli* y *S. typhimurium*).

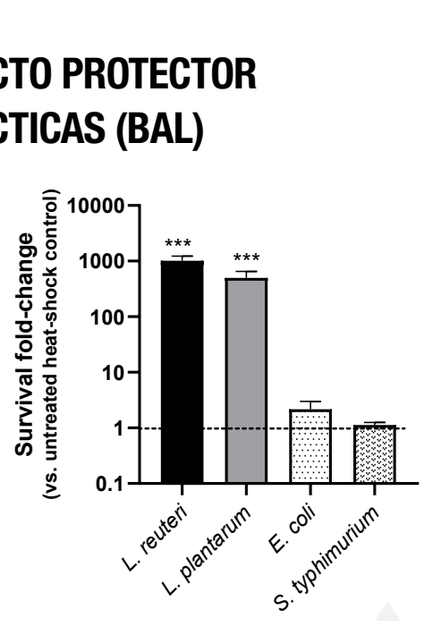



Fig. 4: Variación relativa de viabilidad (survival fold-change) inducida por sRNA sintético frente a shock térmico no tratado en bacterias probióticas y enteropatógenos.

### EL EFECTO PROTECTOR SE ASOCIA CON SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE ARN LÁCTEO

- Fragmentos individuales lácteos incrementan la viabilidad >1.000 veces ($p < 0,05$).
- Los análogos de ADN homólogos no confieren termo protección.
- El ARN exógeno no lácteo (cel-miR-39) carece de actividad protectora.

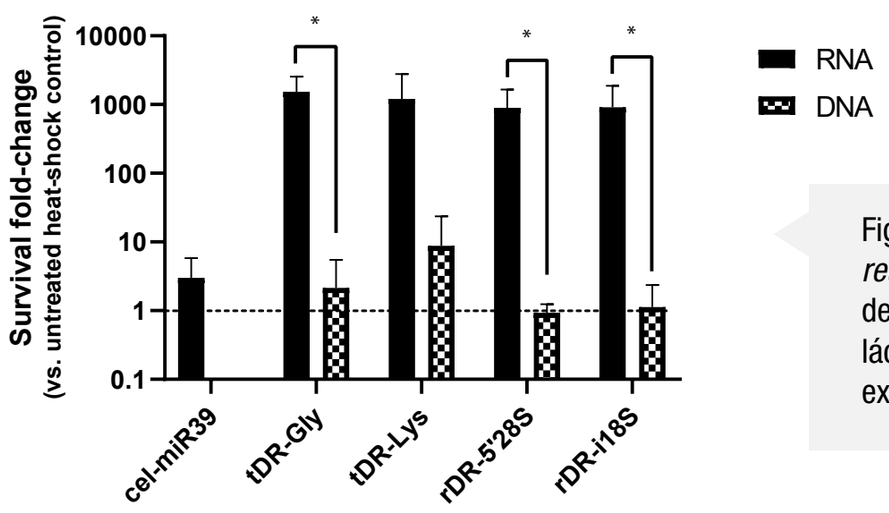



Fig. 5: Supervivencia (fold-change) de *L. reuteri* tras estrés térmico en presencia de fragmentos individuales de ARN lácteo, sus versiones de ADN y el control externo cel-miR-39.

## CONCLUSIONES

Estos resultados identifican un efecto no descrito previamente de los ARN derivados de la leche sobre la tolerancia bacteriana al estrés. La respuesta fue selectiva entre las especies evaluadas, la mezcla sintética de sRNA incrementó fuertemente la supervivencia en *L. reuteri* y *L. plantarum*, mientras que se observó una protección escasa o nula en *E. coli* o *S. Typhimurium.* Diferencias en la arquitectura de la envoltura celular, en la captación o procesamiento de ARN extracelular y en las vías de respuesta al estrés podrían contribuir a esta selectividad, aunque el número acotado de especies examinadas impide atribuirle aún a un grupo bacteriano o mecanismo particular. En conjunto, se identifica la modulación de la tolerancia al estrés bacteriano como una propiedad funcional de los sRNA derivados de la leche que podría resultar relevante en entornos lácteos donde las BAL enfrentan estrés térmico durante la producción, formulación o almacenamiento.