



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LECHE  
FERMENTADAS CON CEPAS DE *Lactobacillus fermentum*  
SOBRE LA RESPUESTA Th1-Th17 EN UN MODELO  
MURINO CON INFLAMACIÓN INDUCIDA**

---

Por:

**Lourdes Santiago López**

TESIS APROBADA POR LA

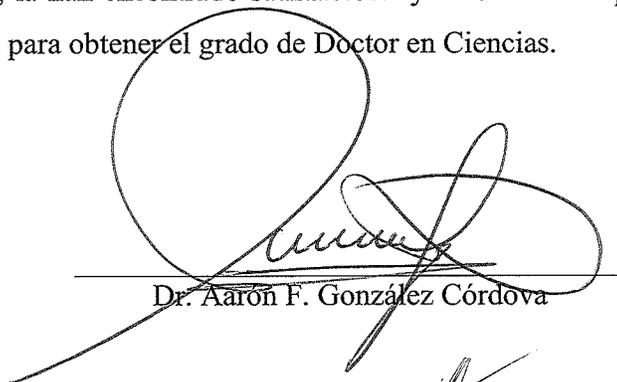
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**DOCTORADO EN CIENCIAS**

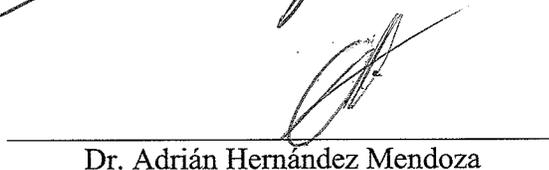
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Lourdes Santiago López, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



---

Dr. Aaron F. Gonzalez Cordova



---

Dr. Adrian Hernandez Mendoza



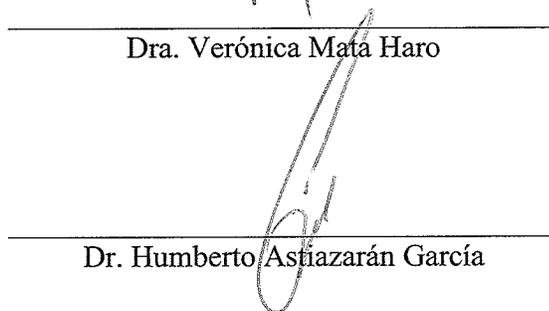
---

Dra. Belinda Vallejo Galland



---

Dra. Veronica Mata Haro



---

Dr. Humberto Astiazaran Garcia

---

Dr. Abraham Wall Medrano

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis requiere la autorización escrita, del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis. En estos casos siempre se deberá dar los créditos al CIAD



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para poder realizar mis estudios de doctorado.

Mis agradecimientos al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por darme la oportunidad, de una vez más, poder desarrollarme profesionalmente, por el apoyo brindado durante el posgrado.

Siempre que exista la posibilidad, gracias a Dios por permitirme seguir avanzando, por darme la fortaleza que algunos momentos son necesarios para no caer.

Gracias a mi director de Tesis, **Dr. Aarón F. González Córdova** por la confianza brindada para realizar este trabajo, por los consejos, la oportunidad de aprender de usted, por el tiempo brindado, espero haber cumplido con sus expectativas como su primer estudiante de Doctorado, pero sobre todo gracias por sus palabras para hacerme crecer en el área de investigación, así también, por ayudarme a crecer como persona.

**Dr. Adrián Hernández Mendoza**, las palabras en ocasiones no son suficientes para expresar lo agradecida que estoy con usted, gracias por su apoyo en la realización de éste trabajo, por siempre decirme “*es todo lo que puedes dar*” retándome siempre a seguir creciendo profesionalmente, gracias por invitarme a colaborar en sus proyectos de investigación de los cuales he aprendido mucho.

Gracias **Dra. Belinda Vallejo Galland** por la disposición brindada durante el desarrollo del trabajo, por abrirme las puertas desde hace unos años para darme cuenta que esto es realmente lo que me gusta, gracias por brindarme la confianza para realizar diversas actividades en los trabajos de laboratorio.

**Dra. Verónica Mata Haro**, gracias por todo el tiempo brindado, por su apoyo, por que siempre dedico unos minutos para apoyarme, explicarme lo que no entendía, espero seguir contando con usted para seguir aprendiendo y creciendo en el tema de inmunología, algo que hace unos años no tenía ni idea de lo que hacía, pero con su apoyo creo que avance, aún hace falta, pero es parte de seguir creciendo.

**Dr. Humberto Astiazarán García**, gracias por el apoyo brindado para el desarrollo del estudio, por tomarse unos minutos de su tiempo para aclarar dudas.

**Dr. Abraham Wall Medrano**, gracias por siempre estar en la mejor disposición para el desarrollo de la investigación, por sus aportaciones, sugerencias, gracias por la invitación a la estancia que también fue un gran aporte para tanto para el desarrollo del trabajo, pero también para conocer otras formas de trabajo.

Mis agradecimientos por el apoyo técnico a los Maestros en Ciencias Carmen Estrada Montoya y Ricardo Reyes Días.

Gracias al grupo de trabajo de la Universidad de Ciudad Juárez por el apoyo brindado durante la estancia, y sobre todo por la amistad. A la Maestra Ma. Elena Chávez Delgado y a la Blgo. Miriam Susana García García.

Gracias al **Dr. Hugo García Galindo** por aceptar la invitación y tomarse unos días de su tiempo para asistir a la presentación, sin duda sus comentarios serán de gran ayuda en mi formación.

cDr. Alejandro Santos, M. en C. Alejandro Epigmenio, M. en C. Miguel Ángel Rendón, Dra. Lilia Beltrán, Dr. Audry Gilmour, Dra. Haydee Romero, cDr. Eleazar Aguilar, Lucero Félix, Estephanie Ramírez, Teresita Maldonado por el apoyo técnico en el desarrollo del trabajo.

Gracias **Adrián Hernández**, lo pongo así, porque aquí me refiero a un gran amigo, a una persona que siempre confió en mí, que siempre me brindó unos minutos para escucharme y más en los momentos difíciles, por compartir experiencias, por sus sugerencias, que créame siempre las tomé en cuenta y fueron muy importantes para ayudarme a crecer y a vencer muchas inseguridades, por no dejarme caer a pesar de todo, porque si hay alguien a quien deba agradecerle lo que soy ahora como persona es a usted.

Gracias **Lilia Beltrán**, por tu amistad, por compartir cuatro años más, en la cual hemos crecido, por los buenos y malos momentos que hemos pasado sobre todo por mí, gracias por todo al igual que a tu familia.

Gracias a las amistades que forme durante la estancia en el posgrado qué sin duda, siempre fueron el soporte para seguir adelante. Gracias Haydee Romero, Audry Gilmour y Daniel González por los buenos momentos que compartimos. Una mención especial a Karen Ramírez, que aun en la distancia siempre estuviste para platicar y por acompañarme, a Carmen Manzanares, Miguel A. Rendón, por su gran amistad. Gracias a Priscilia Heredia, Alejandro Santos, Alejandro Epigmenio, Eleazar Aguilar, compañeros y amigos que hemos compartido tantas experiencias y aventuras.

Gracias a Nicolás González, Ildefonso Guerrero, Paul Cuevas, por su amistad, así como, a todo el grupo de laboratorio de Lácteos: David Verdin, Erick Valenzuela, Wendy Mora, Glen Robles, Isidro Méndez, Wilber Vargas, Cinthya Utrera, Ana Méndez, Adilene Mendoza, Alejandra Pajonares, Hibrain Ramírez, y a los que se integraron recientemente, Hiram Castañon, Lady Valera por compartir buenos momentos.

Un agradecimiento especial al personal de la Unidad de Transferencia y Tecnología (UTI) por el apoyo para todas nuestras visitas en busca del jefe, ya sea por una firma o de cualquier otra que necesitáramos, en especial para Denia Huez Acuña, Marovi Cortez Guzmán, Perla Guadalupe Montaña, Aida Sonia Espinosa.

Gracias a la Dra. María de Jesús Torres, al Dr. Miguel Ángel Mazorra por sus comentarios y sugerencias. Así también, gracias al Dr. Jesús Hernández por su apoyo en las dudas relacionadas con inmunología.

Gracias a Faly Gil por el apoyo técnico brindado durante mi estancia como estudiante desde hace ya unos años.

## DEDICATORIA

*Este trabajo es dedicado a mis padres; **Leonardo Santiago Cruz** y **Herminia López León**, que han sido mi más grande motivación para crecer, por su ejemplo de vida y sobre todo por su apoyo en la toma de mis decisiones, que nos han costado distancia y grandes momentos, pero todo esto es para crecer y salir siempre adelante.*

*A mis hermanos que siempre han estado ahí para darme palabras de ánimo: Ana, Victor, Ale, Ernesto, Héctor, Eduardo, Aurora, Eriberto, Eloy, Isabel, Adriana, por apoyarme en las decisiones que he tomado, saben que los quiero mucho, así también, a los nuevos integrantes que se han sumado a la familia, mis sobrinos (Leonardo, Daniel, Cinthya, Cristian, Jimena, Max, Jeremy, Diego, Lucio, Geraldine) que son mi alegría cada vez que hay oportunidad de verlos, cuñadas y cuñados que se han sumado a la familia. Gracias a todos, saben que son una pieza importante de mi formación.*

*"Nunca dejes que alguien te diga que **NO** puede hacer algo. Las personas que **NO** son capaces de hacerlo, te dirán que **TÚ** tampoco puedes". (Will Smith "En busca de la Felicidad).*

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	7
<b>CONTENIDO</b> .....	8
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	10
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	12
<b>RESUMEN</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	15
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	17
2.1. Inflamación, una Revisión General.....	17
2.1.1. Enfermedades Inflamatorias Intestinales.....	19
2.2. Modelos de Estudio para el Desarrollo de Inflamación.....	20
2.2.1. Inducción de Inflamación con Indometacina.....	23
2.3. Respuesta Inmunológica en la Infección por Enfermedades Intestinales.....	24
2.3.1. Respuesta Th17 en Procesos Inflamatorios Intestinales.....	26
2.4. Leches Fermentadas y su Efecto en Procesos Inflamatorios Intestinales.....	28
2.4.1. Efecto de Leches Fermentadas con Probióticos.....	29
2.4.2. Probióticos y/o Componentes: Respuesta Inmunológica en un Modelo de Inflamación Intestinal.....	30
2.4.3. Efecto Antiinflamatorio de los Metabolitos Derivados de la Fermentación Láctica.....	35
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	37
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	38
4.1. Objetivo General.....	38
4.2. Objetivos Específicos.....	38
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	39

## CONTENIDO (Continuación)

	<b>Página</b>
5.1. Bacterias Ácido Lácticas de Estudio.....	39
5.2. Evaluación de la Supervivencia de <i>Lactobacillus fermentum</i> bajo Condiciones Gastrointestinales Simuladas y DSS.....	39
5.3. Preparación de Leches Fermentadas.....	40
5.3.1. Determinación de Exopolisacáridos en Leches Fermentadas...	41
5.4. Inducción del Proceso de Inflamación Crónica.....	42
5.4.2. Animales de Estudio.....	42
5.4.2. Diseño del Experimento.....	42
5.5. Evaluación de Citocinas en Suero y Mucosa Intestinal.....	43
5.6. Análisis Histológico.....	44
5.7. Inducción de Inflamación Aguda.....	44
5.8. Análisis Estadístico.....	46
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
6.1. Supervivencia de las Bacterias bajo Condiciones de DSS y Simulación Gastrointestinal.....	47
6.2. Caracterización de la leche fermentada.....	48
6.2.1. Determinación de Exopolisacáridos.....	49
6.3. Respuesta al Proceso de Inflamatoria Asociada al Consumo de Leche Fermentada.....	51
6.4. Efecto en el Perfil de Citocinas Inflamatorias por la Administración de Leches Fermentadas.....	55
6.5 Análisis Histológico de Muestras de Intestino Grueso.....	68
6.6. Efecto por la Inducción de Indometacina y Leche Fermentada.....	70
6.6.1. Respuesta en el Perfil de Citocinas en el Modelo de Inflamación Aguda.....	72
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>78</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Factores y mecanismos de activación para generar una respuesta inflamatoria.....	18
2	Diferenciación de los subtipos de células T. Posterior a la estimulación de las células naïve T CD4+ se diferencian hacia Th1/Th2/Th17. IL-2 induce la formación de IFN- $\gamma$ , IL-23 promueve el desarrollo de Th17, IL-4 lleva a Th2. Las células T reguladoras suprimen la diferenciación y función de las células Th1-Th2, sin embargo, en presencia de IL-6, TGF- $\beta$ derivado de células reguladoras puede inducir la diferenciación de las células Th17.....	25
3	Factores que favorecen la activación de la respuesta Th17 a nivel de mucosa intestinal. La presencia de IL-23, IL-6 y TGF- $\beta$ contribuyen al desarrollo de la respuesta.....	27
4	Diagrama del proceso de simulación continuo para evaluar el efecto de la simulación gastrointestinal y el efecto del inductor de inflamación (DSS) sobre la viabilidad de <i>Lactobacillus fermentum</i> J20 y J28.....	40
5	Representación del proceso de inducción de inflamación crónica con DSS y la administración de LF=Leche fermentada, PLF=Leche pasteurizada pos-fermentación, LA=leche acidificada.....	43
6	Efecto del proceso de simulación gastrointestinal simulado y DSS sobre la viabilidad de <i>Lactobacillus fermentum</i> .....	48
7	Concentración de exopolisacáridos en leches fermentadas con cepas de <i>Lactobacillus fermentum</i> a 48 h .....	50
8	Ganancia de peso de los animales de estudio durante el proceso de inducción de inflamación y por la administración de leches fermentadas con cepas de <i>Lactobacillus fermentum</i> .....	52
9	Efecto del proceso de inflamación y de la administración de leches fermentadas sobre la longitud del intestino delgado grueso de los animales de estudio a las seis y 10 semanas.....	54
10	Concentración de IL-17 y IFN- $\gamma$ en muestras de suero por efecto de la administración de DSS y leche fermentada a las seis y 10 semanas.	58
11	Concentración de IL-6 y TNF- $\alpha$ en muestras de suero por efecto de la administración de DSS y leche fermentada a las seis y 10 semanas.	60
12	Concentración de IL-10 en muestras de suero por efecto de la administración de DSS y leche fermentada a 6 y 10 semanas. minúsculas indican diferencia estadística a las 10 semanas.....	63

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
13	Concentración de IL-17 e IFN- $\gamma$ en muestras de mucosa de intestino grueso por efecto de la administración de DSS y leche fermentada a las 10 semanas.....	66
14	Análisis histológico de secciones transversales de muestras de tejido de colon (x10) teñidas con hematoxilina-eosina. A y A') grupo con agua, B y B') grupo con DSS, C y C') grupo con LA, D y D') grupo con LFJ20, E y E') grupo con LFJ28.....	69
15	Efecto de la indometacina y administración de leche fermentada sobre la ganancia de peso (A) y longitud del intestino delgado (B) a los 15 días de estudio.....	72
16	Efecto de indometacina y leche fermentada sobre la concentración de citocinas IL-23, IL-17, IL-6 en muestras de suero a 15 días de tratamiento.....	74
17	Efecto de la inducción de inflamación y leche fermentada-pasteurizada con indometacina y la respuesta en las citocinas IL-17, IFN- $\gamma$ en muestras de mucosa intestinal.....	76

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Evaluación de administración de bacterias probióticas en diferentes modelos de inflamación intestinal.....	33
2	Caracterización de componentes o metabolitos derivados de la fermentación de la leche.....	49
3	Modificación del peso de los órganos a las seis y 10 semanas por efecto de DSS y de la administración de leche fermentada.....	56
4	Peso de los órganos después del proceso de inducción de inflamación con indometacina y de la administración de leche fermentada.....	72
5	Efecto de la administración de indometacina y leche fermentada sobre la concentración de citocinas antiinflamatorias y pro-inflamatorias a nivel sistémico.....	75

## RESUMEN

Los procesos inflamatorios intestinales están asociados con la respuesta Th1 (IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) y Th17 (IL-22, IL-23, e IL-17). Una alternativa para disminuir esta respuesta se ha asociado con el consumo de leches fermentadas con bacterias ácido lácticas específicas. En este sentido, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la administración de leches fermentadas con *Lactobacillus fermentum* sobre la respuesta Th1-Th17 en un modelo murino con inflamación inducida. Se evaluó la viabilidad de las cepas (J20 y J28) durante el proceso de simulación gastrointestinal, y la adición de dextrán sulfato de sodio (DSS). Se determinó la concentración de exopolisacáridos (EPS), ácido láctico (AL) y proteína en las leches fermentadas. En el ensayo *in vivo*, se trabajaron con ratones machos C57Bl/6, los cuales recibieron intragastricamente leches fermentadas (LF) o leches pasteurizadas pos-fermentación (PLF), y se realizó el proceso de inducción de inflamación con DSS e indometacina. Se tomaron muestras de sangre, bazo, hígado, riñones, e intestino a las seis y 10 semanas. Las citocinas IL-6, IL-10, y TNF- $\alpha$  fueron determinadas en suero, e IL-17, IL-23, e IFN- $\gamma$  en muestras de mucosa intestinal y suero. Los resultados no mostraron diferencia significativa ( $p>0.05$ ) en la viabilidad celular, contenido de AL y proteína. La concentración de EPS fue más alto para la LFJ28. No se mostraron cambios significativos ( $p>0.05$ ) en el peso del bazo, hígado y riñones, así como, en la longitud de intestino delgado y grueso. Los grupos que recibieron LFJ20 and PLFJ20 presentaron la menor concentración de IL-17, IFN- $\gamma$ , en suero, se incrementó la concentración de IL-10 ( $p<0.05$ ) a las seis semanas. Además, las citocinas IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-23, e IFN- $\gamma$  en muestras de suero y mucosa no mostraron cambios significativos ( $p>0.05$ ), e IL-17 fue menor para los grupos con LFJ28 y LFJ20. En el modelo de inflamación aguda el grupo administrado con LFJ28 mostró la menor concentración de IL-17 en mucosa, así como, IL-17 e IL-6 en muestras de suero. Con los resultados obtenidos, leches fermentadas PLF mostraron una tendencia a disminuir citocinas inflamatorias. Sin embargo, son necesarios incluir otros estudios que permitan elucidar las rutas de activación para disminuir la respuesta Th17 asociada a procesos inflamatorios.

**Palabras clave:** leches fermentadas, respuesta Th1-Th17, inflamación, DSS, indometacina

## ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases are associated with the Th1 (IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), and Th17 (IL-22, IL-23, e IL-17) response. An alternative to decrease this response has been associated with the consumption of fermented milks with specific lactic acid bacteria. Hence, the aim of the present study was to evaluate the effect of fermented milk with *Lactobacillus fermentum* on the Th1-Th17 response in a murine model of mild IBD. First, the viability of strains during the gastrointestinal process and dextran sulfate sodium (DSS) was evaluated. Exopolysaccharides (EPS), lactic acid (LA) and protein contents were determined. Male C57Bl/6 mice intragastrically received either raw fermented milk (FM) or pasteurized (PFM) milk-fermented before and during DSS and indomethacin administration. Blood, spleen and colon samples were collected at weeks 6 and 10. IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  were determined in serum, means while, IL-17, IL-23 and IFN- $\gamma$  were evaluated in serum and mucosal intestinal. The results no showed difference ( $p>0.05$ ) on the cell viability, LA, and protein; FM-J28 had the highest EPS content. Spleen, liver and kidneys weight and colon length did not differ among the FM groups ( $p>0.05$ ). In the other hand, the groups with FM-J20 and PFM-J20 groups, IL-17 and IFN- $\gamma$  decreased, and the IL-10 concentration was enhanced ( $p<0.05$ ) at week 6. IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-23 and IFN- $\gamma$  did not differ in serum and mucosa ( $p>0.05$ ), but IL-17 was lowest in FM-J28 and FM-J20. Acute inflammation model, FMJ28 showed the lowest concentration of IL-17 in mucosa samples, and IL-6, IL-17 serum samples. Fermented PLF milks showed a tendency to decrease inflammatory cytokines. It is necessary to include other studies that allow to know the activation pathway to decrease the Th17 response associated with inflammatory processes.

**Keyword:** fermented milk, Th1-Th17 response, inflammation, DSS, indomethacin

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) son caracterizadas por un proceso de inflamación crónico, a nivel de mucosa intestinal (Chami et al., 2014). En este sentido, la respuesta Th1 ha sido mencionado como la vía principal de activación durante un proceso de inflamación, sin embargo, la respuesta Th17 en los últimos años, ha sido descrita como una ruta alterna y de importancia biológica en los procesos inflamatorios no solo intestinales. Estas dos vías de respuesta se caracterizan por la liberación de citocinas (IL) como IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , e IL-17, IL-21, IL-23, respectivamente (Ito et al., 2008; Weaver et al., 2013). Citocinas como IL-6, factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), e IL-23 promueven el desarrollo de la respuesta Th17 en las EII (Ito et al., 2008). Algunos estudios han demostrado que las células Th1 y Th17 median la respuesta a nivel de intestino, y se sugiere que la respuesta Th1 pueden coadyuvar la respuesta Th17 (Kikly et al., 2006; Yen et al., 2006). Por ejemplo, en un estudio con ratones CBirl, donde se indujo colitis, hubo un incremento de la respuesta Th17 y menor para Th1 (Feng et al., 2011). Contrario a esto, en otro estudio, la concentración de citocinas de respuesta Th1 y Th17, en un modelo de inflamación agudo, incrementó TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, y la quimiocina atrayente de queratinocitos (KC) (Alex et al., 2009).

Otros estudios han demostrado el papel que juega en los procesos inflamatorios intestinales, la citocina IL-23 como activadora de la respuesta Th17, donde ratones con ausencia del receptor de IL-23R, muestran una reducción de la proteína Reg3b a nivel de mucosa intestinal, que está relacionada con su efecto antimicrobiano; Reg3b es una proteína dependiente de la expresión de IL-23R, además de participar como mecanismo de regulación en el número de neutrófilos en lamina propia de intestino (Aden et al., 2016). Algunas de las estrategias que se han estudiado para mediar la respuesta Th17 es a través de la administración de probióticos, los cuales se ha demostrado ampliamente su efecto anti-inflamatorio regulando la respuesta Th1/Th2/Th17 (Herías et al., 2005; Chiba et al., 2010; Dai et al., 2013). En este sentido, un estudio *in vitro* con células PBMCs reportó que la estimulación con *Bifidobacterium breve* y *Lactobacillus rhamnosus* reduce la respuesta Th17 e incrementa la respuesta Th2 (Zheng et al., 2014). Además, algunos

componentes de bacterias probióticas pueden incrementar el número de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> en los ganglios linfoides mesentéricos (MLN) y disminuir la presencia de factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , e IL-10 en placas de Peyer. Un potencial mecanismo anti-inflamatorio fue descrito *in vitro*, estimulando macrófagos RAW 264.7 donde se observó que los componentes bacterianos activan los mecanismos de señalización de (TNF)- $\alpha$  y con esto prevenir la activación de factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (Zakostelska et al., 2011).

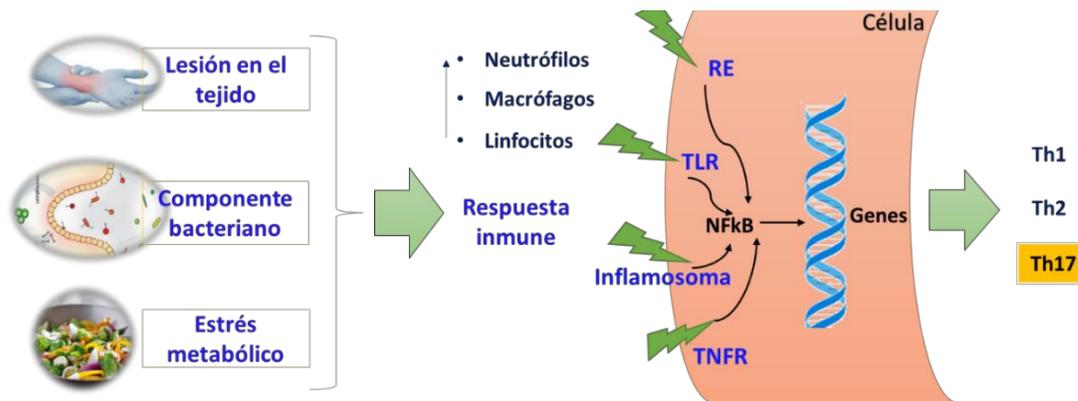
Otra de las estrategias que se han estudiado es a través de la administración de leches fermentadas con probióticos (Santiago-López et al., 2015). El efecto de leche fermentada no solo se puede atribuir a la presencia de bacterias probióticas, sino que además, los metabolitos derivados de la fermentación como péptidos, exopolisacáridos (EPS), vitamina A, y componentes bacterianos juegan un papel importante en los EII (Santiago-López et al., 2017). Sin embargo, pocos estudios han documentado el efecto de la leche fermentada modulando la respuesta Th17. Por ejemplo, la administración de Dahi, leche fermentada con probióticos, reduce la actividad enzimática de la mieloperoxidasa (MPO) y disminuye la presencia de TNF- $\alpha$ , IL-6, e IFN- $\gamma$  (Jadhav et al., 2012), mientras que, leche fermentada con *Lactobacillus rhamnosus* GG reduce el proceso de inflamación activando la ruta de señalización mediada por la proteína quinasa B (Akt). Este efecto fue atribuido a la presencia de las proteínas p40 y p75 liberadas durante el proceso de fermentación (Yoda et al., 2014). Estos estudios han demostrado el potencial papel anti-inflamatorio de la leche fermentada con probióticos, pero no se ha documentado como se podría modificar la respuesta Th1-Th17. En este sentido, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto por la administración de leche fermentada con *Lactobacillus fermentum* sobre la respuesta Th1-Th17 en un modelo murino con inflamación inducida.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Inflamación, una Revisión General

La inflamación es generalmente definida como un mecanismo de respuesta del sistema inmune, el cual está mediado por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la presencia de citocinas pro-inflamatorias. Además de generar una respuesta fisiológica que se ve reflejada en síntomas como fiebre, dolor, pérdida de peso, y estas son dependientes del sitio de infección (Zhang et al., 2014). Cuando existe una excesiva respuesta de células del sistema inmune innato como son macrófagos, el proceso de inflamación conlleva al desarrollo de diferentes enfermedades (Bertolini et al., 2001; Ashley & Weil 2012).

Algunos autores también definen a la inflamación como el mecanismo de defensa del organismo contra alguna infección, que puede desencadenarse por factores como la presencia de productos microbianos, lesión en el tejido, y estrés metabólico. Además de participar en el proceso de reparación del tejido, y ayudar a restaurar el proceso de homeostasis en los sitios de infección (**Figura 1**) (Calder et al., 2017). Las rutas de activación durante el proceso de inflamación es la activación de receptores tipo Toll (TLRs) y NF- $\kappa$ B, formación de complejos de proteína conocido como inflamosoma que es el responsable para la liberación de diversas citocinas inflamatorias, así como, la activación del retículo endoplásmico (Sun et al., 2012; Calder et al., 2017).



**Figura 1.** Factores y mecanismos de activación para generar una respuesta inflamatoria

El tiempo preciso de la respuesta inflamatoria, incluyendo la activación de las células y los mediadores involucrados, es determinada por la naturaleza, extensión y localización del daño (Calder et al., 2017). El proceso de regulación o finalización del proceso de inflamación involucra la activación de mecanismos tales como, la secreción de citocinas anti-inflamatorias, inhibición de cascadas de señalización para la secreción de citocinas pro-inflamatorias, la activación de receptores para mediar la respuesta inflamatoria y la activación de células reguladoras (Calder et al., 2009).

La inflamación de acuerdo a su patología, se clasifica como aguda y crónica. La inflamación aguda es la respuesta inicial del cuerpo hacia un agente infeccioso, el cual se reconoce por el incremento de granulocitos hacia el sitio de infección y se representa por la activación de una cascada de eventos bioquímicos y que involucran al tejido vascular local y varios tipos de células hacia el sitio de infección. La respuesta es mediada por citocinas anti-inflamatorias y mediadores lipídicos (Serhan & Savill 2005; Fredman & Serhan 2011; Iyer & Cheng 2012). Sin embargo, cuando el proceso de inflamación es prolongado, o crónico, ésta involucra un cambio progresivo en el tipo de células presentes en el sitio de daño. El resultado de inflamación puede volverse patológica debido a la pérdida de tolerancia y/o procesos de regulación, existiendo procesos de bajo grado de

inflamación y bajo tales circunstancias, las manifestaciones clínicas pueden ser mínimas o ausentes; la elevación en la concentración de marcadores inflamatorios a nivel sistémico. La inflamación de “bajo grado” o asintomática puede ocurrir en el tejido adiposo, bajo estas condiciones, se genera una infiltración de macrófagos y células T (Calder et al., 2011).

Por otro lado, algunas enfermedades son caracterizadas por una elevada concentración de marcadores inflamatorios y la activación de células hacia los sitios de daño y la circulación sistémica; este estado de inflamación puede ser considerado como de “alto grado de inflamación”, donde se incluyen artritis reumatoide, dermatitis atópica, soriasis, asma, y EII (Calder et al., 2009; Calder et al., 2017).

### **2.1.1. Enfermedades Inflamatorias Intestinales**

Uno de los trastornos donde se tiene una respuesta inflamatoria constante es en las EII, que comprende la enfermedad de Crohn (EC) y Colitis Ulcerativa (CU). Ambas enfermedades son de naturaleza crónica, pero con distinta patogénesis y con una respuesta inflamatoria distinta para cada tipo de enfermedad, y por consecuencia, síntomas y estrategias de tratamiento distintos (Geier et al., 2007). Aunque se desconoce las causas de inicio de la enfermedad, estudios experimentales han sugerido que la inducción de la patogénesis es un proceso multifactorial que involucra la interacción de cambios genéticos, respuesta inmune exacerbada, bacterias entéricas y factores ambientales (Benno et al., 1993; Berrebi et al., 2003). El sistema inmune a nivel intestinal mantiene un delicado balance entre la identificación y eliminación de microorganismos patógenos, mientras que coexisten con bacterias comensales y antígenos alimentarios. Los factores que pueden destruir este balance intestinal y conllevar al desarrollo de EII, es la alteración de la función barrera intestinal por activación de células del sistema inmune *e.g.*, macrófagos, células dendríticas (CD), linfocitos, los cuales mantiene activo ese mecanismo de tolerancia (Lofthus 2004).

La EC puede afectar a cualquier segmento del tracto gastrointestinal, mientras que CU se limita únicamente al colon, fundamentalmente en la región distal y se extiende progresivamente en dirección proximal de forma continua. La inflamación se caracteriza por afectar las capas superficiales de la pared intestinal, normalmente la mucosa y submucosa, además de presentar necrosis del epitelio, presencia de edema y hemorragia con infiltración de neutrófilos, eosinófilos y células plasmáticas (Morgan et al., 2013).

## 2.2. Modelos de Estudio para el Desarrollo de Inflamación

Diferentes modelos han sido utilizados para simular el proceso de inflamación a nivel intestinal, como son los modelos de modificación genética ( $IL-10^{-/-}$  y  $TNF^{\Delta ARE}$ ), modelos de modificación inmunológica que es transferencia de células T, modelos de inducción de inflamación con agentes químicos (DSS, ácido Trinitrobenzenesulfónico (TNBS), Indometacina).

- a) *Ratones con deficiencia de la citocina IL-10*. La superficie de la mucosa es una de las zonas mayormente afectadas, pero, también es la zona que se encuentra en constante activación por los alimentos y bacterias antigénicas, las cuales estimulan al sistema inmune y permiten la secreción de IL-10 y subsecuente suprimen la respuesta inflamatoria. El proceso de inflamación bajo condiciones de deficiencia de IL-10 es debido a la alta expresión de citocinas inflamatorias que se producen por la presencia de antígenos entéricos. Cuando se comparan ratones con deficiencia de IL-10 y ratones bajo condiciones convencionales, presentan anemia y colitis en el mismo grado. Así, la combinación de bacterias como *Helicobacter rodentium* y *Helicobacter typholnius* resultó en un incremento de la severidad de la colitis (Chichlowski et al. 2008). La ruta de activación de las citocinas inflamatorias es a través de la activación de la proteína de diferenciación mieloide-88 (MyD88) y la señalización de los ligandos de TLR, al no existir IL-10, que suprime esta respuesta, las bacterias comensales activan MyD88 por fagocitos mononucleares lo que conlleva a la generación del proceso de inflamación.

Ratones de la cepa C57Bl/6 IL-10<sup>-/-</sup> incrementaron la respuesta Th1 en respuesta a una infección por nemátodos. Este modelo es muy común manejarlos para estudios donde se buscan diferentes estrategias terapéuticas para los procesos inflamatorios (Jones-Hall y Grisham 2014).

- b) *Modelo de TNF<sup>ARE</sup>*. Otro modelo de inflamación es por la vía de TNF- $\alpha$ , el cual ha demostrado participar en los procesos de inflamación. Ratones con modificación en el gen ARE (AU-rich elements) desarrollan patologías similares a los que se presentan en un modelo de inflamación en humanos. Ileítis terminal es la lesión principal, que ocasiona un incremento en el tamaño de las vellosidades del intestino que se pierden entre los 4-7 meses de edad, además de generar una inflamación transmural y la aparición de granulomas (Pizarro et al. 2003). La sobreproducción de TNF, además, incrementa la respuesta Th1, expansión de células CD8<sup>+</sup>, regulación de IL-10 e IL-17, con estos resultados comprobaron que las células epiteliales son la mayor fuente de producción de TNF (Jones-Hall y Grisham 2014).
- c) *Transferencia de células T*. En ratones, las células CD4+CD45RB<sup>high</sup> son distintos de células CD4+CD45RB<sup>low</sup>, las primeras producen IL-2 pero no IL-4, se encuentran presentes las células T naïve, pero hay ausencia de células T reguladoras (Treg); en cambio las segundas producen IL-4 e IL-2, hay presencia de células naïve y Treg (DeVoss y Diehl 2014). La diferencia entre estos dos tipos de poblaciones celulares radica en el desarrollo de una colitis crónica por la transferencia de células CD4+CD45RB<sup>high</sup>. Diversos estudios han demostrado que la ausencia de células Treg y en presencia de antígenos entéricos, las células naïve podrían convertirse a células efectoras (e.g. Th1 y Th17) que inducen colitis y en ausencia de un efecto supresor de Treg, las células naïve podrían convertirse a efectoras autoagresivas. Ratones con células CD4+CD45RB<sup>high</sup> mostraron señales de pérdida de peso, diarrea, hiperplasia con pérdida de las células goblet, ausencia de criptas y erosión a nivel de mucosa (Strober et al. 2007). Así, se ha demostrado el papel que juega la presencia de células Treg en los procesos inflamatorios.

d) *Modelo de inducción química*. Dextrán sulfato de Sodio (DSS), ácido 2,4,6-Trinitrobenzenesulfónico (TNBS) e indometacina. Estos modelos de inducción químico han sido de los más estudiados, y se describen a continuación DSS e Indometacina.

DSS tiene un efecto directo sobre las células del epitelio donde causa una lesión química, lo que conlleva a una exposición de la lámina propia y del compartimento submucosal a antígenos lumenales y bacterias entéricas, lo que resulta en un proceso de inflamación (Low et al. 2013). La efectividad de la administración de DSS depende de factores como: la dosis (1-5 %), tiempo de administración (agudo o crónico), cepa de animal de estudio (C3H/HeJ y BALB/c), género (ratones machos son más susceptibles) y ambiente microbiano de los animales (ratones libres de bacterias). Además, el proceso de inflamación inducido con DSS es de los ensayos mayormente utilizados, ya que ofrece la ventaja de administrarla en el agua. Las características que ofrece este modelo de inflamación es una progresiva destrucción de las criptas de células de colon, macrófagos y células TCD4 (CD4+) (Kawada et al. 2007).

Histológicamente, la inflamación es superficial, afectando principalmente la mucosa, pero puede extenderse a la submucosa y a mucosa muscularis. Esta es caracterizada por las úlceras superficiales, edema a nivel de mucosa, pérdida de células goblet, destrucción y ausencia de las criptas; el cual es acompañado de una infiltración celular de la mucosa y submucosa con neutrófilos, macrófagos, células plasmáticas, y linfocitos (Solomon et al. 2010). En el proceso de inducción de inflamación crónico, también se caracteriza por la presencia de erosiones, regeneración epitelial, fibrosis mucosal y existe un prominente crecimiento de los folículos linfoides; displasia y adenocarcinoma (Cooper et al. 2000). Por otro lado, aunque el sitio de inducción del DSS se genera a nivel de intestino grueso, el intestino delgado es también afectado, aunque en menor proporción, siendo en el íleon donde se incrementa la proliferación celular de las criptas, pero la altura de las vellosidades y la actividad de borde de cepillo se conservan (Geier et al. 2008).

Aunque el mecanismo por el cual el DSS genera el proceso de inflamación es desconocido, un posible mecanismo por el cual se genera es actuando directamente sobre la permeabilidad del tracto gastrointestinal. Las proteínas de unión tales como ocludina-1 se reducen por la administración de DSS lo que permite que se incremente la permeabilidad, y con este cambio se extiende hacia la mucosa colónica. El DSS es atrapado por macrófagos, células Kupffer de hígado, y MNL, el cual es detectable en los primeros días de inducción (Solomon et al. 2010).

Otro mecanismo sugerido es la concentración dependiente de DSS para generar un efecto de citotoxicidad, el cual permite la alteración de la integrina  $\alpha_4$  y subunidades de los niveles de M290 sobre las células del epitelio, destruyendo su interacción con las células T intraepiteliales  $\gamma\delta$ , que están involucradas en la protección a nivel de mucosa (Chen et al. 2002). A este respecto, se ha demostrado que la inducción de inflamación con DSS incrementa los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-4 en muestras de tejido de colon, al mismo tiempo que existe un incremento en la concentración de IL-1, IL-12 y TNF- $\alpha$  en muestras de tejido de colon de ratón (Dieleman et al. 1998; Egger et al. 2000).

### **2.2.1. Inducción de Inflamación con Indometacina**

Los efectos adversos de los medicamentos no esteroideos anti-inflamatorios (NSAIDs) por sus siglas en inglés, causan la alteración del tracto gastrointestinal, además que pueden causar un incremento de la permeabilidad intestinal, y la reducción de la mucosa intestinal, aunque estos mecanismos no han sido esclarecidos (Walker 2002). Estos cambios a nivel de intestino delgado, permiten que algunas sustancias como los ácidos biliares y bacterias intestinales tengan entrada hacia la mucosa, por lo tanto, permiten el desarrollo de la inflamación generando una infiltración de neutrófilos, y un desbalance en la producción de citocinas inflamatorias y la producción de ERO (Corfield et al., 2000).

Aunque diversos factores han sido postulados como elementos patogénicos de ulceración intestinal inducido por indometacina, que incluyen actividad contráctil del intestino, activación de neutrófilos y sobreproducción de óxido nítrico, sales biliares e invasión enterobacteriana (Takeuchi et al., 2002; Tanaka et al., 2005).

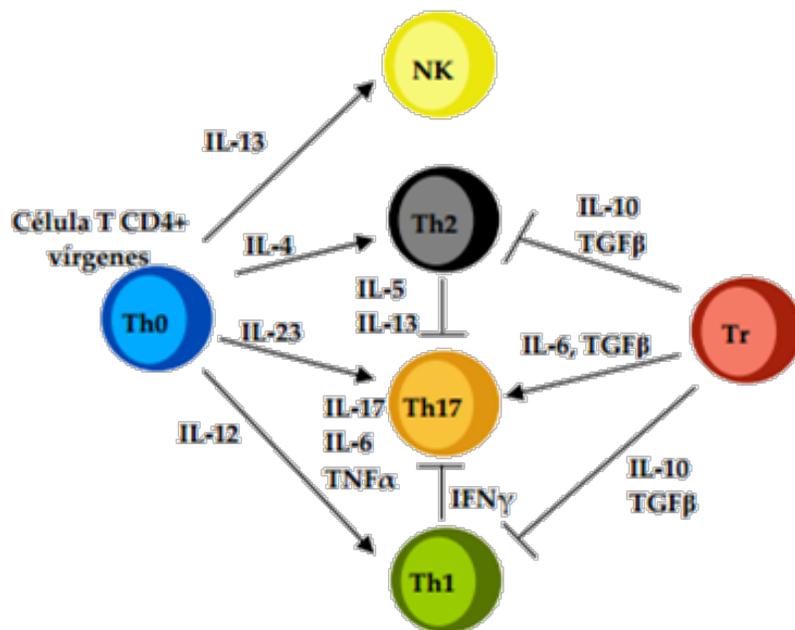
### 2.3. Respuesta Inmunológica en la Infección por Enfermedades Intestinales

El intestino constituye una extensa superficie con vellosidades, microvellosidades y criptas especialmente diseñadas para aumentar el área de contacto y favorecer la absorción de nutrientes que provienen principalmente de los alimentos (Sepúlveda et al., 2008). Además de mantener una constante interacción con bacterias comensales que se alojan en la mucosa, por lo que, el sistema inmune debe tener la capacidad de diferenciar entre comensales y patógenos y generar adecuada respuesta de tolerancia o inflamación (Coombes et al., 2005).

La respuesta inmunológica que se genera a diferentes antígenos puede originarse por diferentes mecanismos y estos son presentados por células presentadoras de antígenos (APC) las cuales las presentan a las células T. El reconocimiento de antígenos a partir de células B requiere la interacción entre el antígeno, el complejo mayor de histocompatibilidad antigénico sobre la superficie de las APC y el complejo de receptores a antígenos (TCR) en células T cooperadoras (Th). Las células T son clasificadas como células T CD4+y CD8+; las células CD4+ o Th son divididas en cuatro tipos (Th1, Th2, Th3, Tr) (**Figura 2**) que se pueden diferenciar según el patrón de citocinas liberadas (**Tabla 1**) (Spiekerman y Walker 2001; Gill 2004; Thompson-Chagoyán et al., 2005).

Cuando se origina un proceso de inflamación como es el caso de IBD comparados con organismos estables existe una alteración en el patrón de citocinas, donde se incrementa la relación de citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , los cuales median la respuesta inmune celular y disminuye la relación de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, los cuales favorecen una respuesta inmune humoral. Además, de disminuir la presencia de TGF- $\beta$  e IL-10 por células T reguladoras.

Existe una participación de células Th17 en un modelo de inflamación que expresa la citocina IL-17. Esta citocina fue identificada como respuesta de linfocitos T citotóxicos asociado al antígeno 8. IL-17 induce una respuesta pro y anti-inflamatoria en varios tejidos (Starnes et al., 2001).



**Figura 2.** Diferenciación de los subtipos de células T. Posterior a la estimulación de las células naïve T CD4+ se diferencian hacia Th1/Th2/Th17. IL-2 induce la formación de IFN- $\gamma$ , IL-23 promueve el desarrollo de Th17, mientras que IL-4 lleva a Th2. Las células T reguladoras suprimen la diferenciación y función de las células Th1-Th2, sin embargo, en presencia de IL-6, TGF- $\beta$  derivado de células reguladoras puede inducir la diferenciación de las células Th17.

### 2.3.1. Respuesta Th17 en Procesos Inflamatorios Intestinales

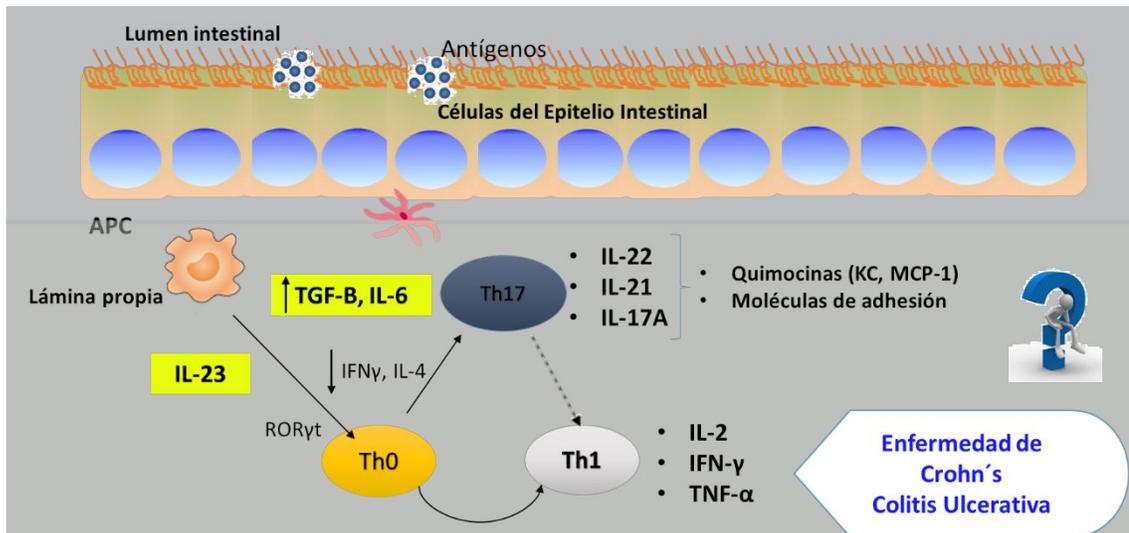
Las células CD4<sup>+</sup> juegan un papel importante en el inicio de la respuesta inmune al proveer ayuda de otras células y tomar una variedad de funciones efectoras durante una reacción inmune. Bajo una estimulación antigénica, células naïve T CD4<sup>+</sup> se activan y diferencian a células efectoras como células Th1 y Th2 que se caracterizan por la producción de diferentes tipos de citocinas y funciones efectoras (Guo et al., 2014). Recientemente se ha documentado que la respuesta Th17 juega un papel importante en las EII.

Las células Th1 producen IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-1, mientras que Th2 secreta IL-2, IL-4, IL-10, las cuales son apropiadas para la generación, por ejemplo; de anticuerpos específicos para la eliminación de antígenos externos (Zhou et al., 2009). La identificación de las citocinas de la familia IL-17, como IL-23 media la expansión de células T productoras de IL-17, generando así, un nuevo subtipo de células conocidas como Th17 (Kikly et al., 2006; Liu et al., 2009). Las células Th17 requieren citocinas y factores de transcripción específicas para su diferenciación. Aunque la función de este tipo de respuesta aún no está esclarecida, estudios sugieren que la respuesta Th17 tiene un papel importante contra patógenos extracelulares (Codolo et al., 2008). Además, células naïve estimuladas con TGF- $\beta$  más IL-6 podrían secretar grandes cantidades de IL-17, mientras que IL-23 podría desencadenar la proliferación de Th17, únicamente la combinación adecuada de IL-6 y TGF- $\beta$  es suficiente para inducir la diferenciación de células Th17 (Mangan et al., 2006).

La familia de citocinas de la respuesta Th17 incluye seis miembros IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. La presencia de IL-17 puede inducir la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$ , quimiocinas como: KC, MCP-1 y MIP-2; y una matriz de metaloproteasas las cuales median la respuesta inflamatoria (Park et al., 2005). Diversas citocinas han sido asociadas al desarrollo o proliferación de las células Th17. Por ejemplo, la neutralización de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  *in vitro* incrementa el número de células productoras de IL-17 generadas por la estimulación de IL-23. Además, el número de células Th17 se incrementa por la adición de un anticuerpo neutralizante de IL-4,

indicando que IL-4 e IFN- $\gamma$  podría inhibir la expansión de Th17 (Mills 2008). Otro de las especificaciones para generar la respuesta Th17, es la presencia del factor de transcripción ROR $\gamma$ t, que ha sido documentado como necesario para la expansión de la respuesta Th17 (**Figura 3**) (Kikly et al., 2006).

Células CD4<sup>+</sup> Th17 se han encontrado en lámina propia colónica e íleon, pero no se ha encontrado a nivel de duodeno, yeyuno, MLN, o bazo, además de que estas células se encuentran ampliamente infiltradas en áreas con alguna lesión. En términos de inmunidad de la mucosa, la relación de IL-23/IL-17 juega un papel importante para mantener la homeostasis intestinal. Algunos estudios han demostrado que IL-23 está principalmente expresada en células dendríticas de lámina propia en íleon terminal de ratones normales. Contrario a esto, ratones con ausencia de IL-23<sup>-/-</sup> son susceptibles a procesos de inflamación (Becker et al. 2003).



**Figura 3.** Factores que favorecen la activación de la respuesta Th17 a nivel de mucosa intestinal. La presencia de IL-23, IL-6 y TGF- $\beta$  contribuyen al desarrollo de la respuesta.

La expresión de IL-17 en muestras de mucosa es elevada en pacientes con EII, además de, células CD68+ expresaron IL-17 (Fujino et al., 2003). En un modelo de inducción de inflamación, ratones deficientes en la expresión del receptor IL-17R reducen la migración de células polimorfonucleares hacia el colon, así como, reducen la cantidad de CXCL2 (Zhang et al., 2006). Por otro lado, el bloqueo de IL-23 es efectivo para prevenir la colitis en ratones deficientes de IL-10, a través de la inhibición de IL-17 e IL-6 (Yen et al., 2006).

Es así que las células Th17 juegan un papel importante en los procesos inflamatorios tanto en modelos animal como en humanos, y su bloqueo podría disminuir la respuesta de inflamación a nivel de intestino, por lo que el desarrollo de alimentos funcionales con blanco en la disminución de este tipo de respuesta celular, podría considerarse como una buena estrategia para aliviar los síntomas relacionados a estos padecimientos.

#### 2.4. Leches Fermentadas y su Efecto en Procesos Inflamatorios Intestinales

Los productos lácteos fermentados han sido de interés en los últimos años debido a los efectos benéficos asociados a su consumo. Además de poseer microorganismos benéficos a la salud como son las bacterias probióticas (Heller 2001). Por otra parte, permite la retención y optimización de la viabilidad y productividad microbiana, además de preservar las propiedades probióticas (Ross et al., 2002; Stanton et al., 2003). Cuando las bacterias son incorporadas en los alimentos fermentados, diversos factores podrían ser considerados para mantener la estabilidad de estas bacterias. En este sentido, los productos lácteos, principalmente las leches fermentadas han demostrado ser el vehículo ideal para probióticos (Hosono et al., 2000; Boza-Mendez et al., 2012), además, se ha demostrado que el consumo de este tipo de producto puede ayudar a restablecer el balance de la microbiota intestinal (Lourens-Hatting y Viljoen 2001).

### 2.4.1. Efecto de Leches Fermentadas con Probióticos

El uso de bacterias probióticas en productos lácteos se ha incrementado en los últimos años, no solo como cultivos iniciadores de fermentación que confieren características especiales, sino además como suplementos nutricionales y fórmula de infantes, dada la fuerte evidencia de sus efectos benéficos. Los productos alimenticios o suplementos dietarios que contienen bacterias probióticas permiten su consumo eficiente. El consumo de leches fermentadas ha sido una de las mejores opciones ya que presentan características sensoriales atractivas para los consumidores, además de ser una opción para promover efectos en la salud cuando son enriquecidas con bacterias probióticas (Yoda et al., 2014).

Un estudio realizado en 2012 demostró el efecto protector por el consumo de un producto fermentado (Dahi LaBb) con bacterias probióticas (*Lactobacillus acidophilus* LaVK2, *Bifidobacterium bifidum* BbVK3) y cultivos iniciadores del Dahi (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* NCDC-86, *Lactococcus lactis* spp. *lactis* NCDC-60), en comparación con la leche de búfalo únicamente con los cultivos iniciadores, ante un modelo de colitis inducido con DSS en ratones Swiss albino. Marcadores de inflamación como MPO, citocinas pro-inflamatorias como IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , así como el análisis histológico en muestras de colon disminuyó significativamente en grupos tratados con Dahi LaBb, lo que sugiere que éste producto puede ser utilizado para disminuir el daño ocasionado en un proceso de colitis inducida con DSS (Jadhav et al., 2012).

Estudios han demostrado que la presencia de la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG en yogur previene desórdenes como diarrea, dermatitis atópica y CU (Yan y Polk 2006; Goldin y Gorbach 2008). El mecanismo por el cual se cree que esta cepa puede ejercer efecto es a través de la activación de Akt y la activación de p38 con esto logra evitar la apoptosis inducida por citocinas en células epiteliales intestinales. Dos proteínas solubles, p40 y p75, han sido aisladas en sobrenadantes de esta bacteria, factor importante asociado con el efecto de la bacteria sobre la apoptosis inducida por citocinas (Yan et al., 2007). Estas proteínas tienen la capacidad de proteger la función barrera intestinal del daño ocasionado por peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Seth et al., 2008). Estos resultados

fueron comprobados por Yoda et al. (2014), donde el consumo de leches fermentadas logra reducir significativamente el daño ocasionado por DSS, además el acortamiento de intestino se ve disminuido en grupos tratados con leche fermentada. Por otro lado, la fracción soluble de leche con *Lactobacillus rhamnosus* estimula la activación del factor de crecimiento epidermal y Akt, suprime la apoptosis, y disminuye el efecto ocasionado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **2.4.2. Probióticos y/o Componentes: Respuesta Inmunológica en un Modelo de Inflamación Intestinal**

2.4.2.1. Efecto antiinflamatorio de probióticos. Los microorganismos probióticos se han definido como microorganismos vivos que afectan de manera positiva el balance microbiano intestinal; cuando estos son administrados en cantidades adecuadas. Sin embargo, recientes investigaciones han permitido ampliar el concepto de probióticos demostrando que microorganismos no viables presentan de la misma manera efectos benéficos en la salud (FAO/OMS 2001; Isolauri et al., 2002). Existe evidencia de que la administración de probióticos puede ser efectivo en la prevención y tratamiento de infecciones intestinales (Thompson-Chagoyán et al., 2005). Diversas investigaciones sugieren que los probióticos modulan tanto la respuesta inmune innata y adaptativa, activando rutas de señalización para la producción de citocinas pro y anti-inflamatorias como IL-10 y reducir IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , respectivamente, fortalecer la barrera de la mucosa y reducir el proceso de inflamación (**Tabla 2**). Por otro lado, interactúan con bacterias propias o células de la mucosa para inducir la respuesta de células T CD4+ e incrementar los niveles de IgA local y sistémica durante un proceso de inflamación intestinal. Estos mecanismos se han relacionado con el consumo de probióticos ante un efecto terapéutico en el desarrollo de la inflamación (Madsen et al., 1999; Malin et al., 1999; Steidler 2001; Rachmilewitz et al., 2002; McCarthy et al., 2003).

Un balance entre los mediadores de respuesta Th1 y Th2 es esencial para mantener la homeostasis inmunológica. La polarización de la respuesta inmunológica hacia una respuesta tipo Th1 o Th2 genera como resultado un aumento en la incidencia de los trastornos inmunoinflamatorios (Gill et al., 2009).

El tratamiento de la UC con VSL#3 (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*) ha demostrado resultados satisfactorios al disminuir citocinas inflamatorias (Bibiloni et al., 2005; Chapman et al., 2006; Guandalini et al., 2010; Jackson et al., 2011). Sin embargo, los mecanismos por el cual esta mezcla de bacterias ejerce su efecto no han sido bien establecidos. Estudios in vitro han demostrado la participación de la enzima fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y Akt en este proceso de inflamación. La ruta PI3K/Akt juega un papel importante en varios procesos celulares, tales como apoptosis, respuesta inflamatoria y la angiogénesis tumoral. Debido a su papel multifactorial en diversas enfermedades, se ha considerado como una vía de estudio para el efecto terapéutico en padecimientos como cáncer e infecciones intestinales (Dai et al., 2013).

En este sentido, el estudio desarrollado por Dai et al. (2013), mostraron que el consumo de la mezcla de probióticos VSL#3 reduce significativamente el índice de actividad de la enfermedad (diarrea, sangrado, debilitamiento y pérdida de peso corporal) en ratas inducidas con DSS, así como modular la respuesta de MPO y, reducir los niveles de iNOS y COX-2. Además de disminuir citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$  y aumentar citocinas anti-inflamatorias como IL-10. Además, se reportó la capacidad de estas bacterias de interrumpir la ruta de PI3K/Akt.

La administración de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* han demostrado efectos anti-inflamatorios en un modelo de inducción de colitis con DSS ya que se incrementa la proliferación de linfocitos y la síntesis de IL-10 como citocina reguladora, al mismo tiempo se reduce la expresión de TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1.

Por otro lado, la microbiota intestinal se ve afectada ante un modelo de colitis inducida con DSS, tales efectos se observaron en una reducción significativa en la concentración de *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Lactobacillus acidophilus*, mismos que se incrementaron después de un tratamiento con probióticos (Kumar et al., 2008).

2.4.2.2. Componentes bacterianos. De acuerdo con investigaciones previas, el efecto anti-inflamatorio se podría atribuir a la presencia de bacterias probióticas viables. Por ejemplo, existen diversas investigaciones que demuestran el efecto de los probióticos en diferentes modelos de inflamación a nivel intestinal (Herías et al., 2005; Amit-Romach et al., 2008; Kumar et al., 2008). Sin embargo, estudios recientes han reportado que para ejercer un efecto, las bacterias no necesariamente deben de estar viables (Taverniti & Guglielmetti 2011; Shigwedha et al., 2014; Ruiz et al., 2014).

Los efectos que se han reportado para los componentes microbianos puede ser atribuido a la presencia de peptidoglicano, ácidos lipoteicoicos, así como, fragmentos de ADN (Zagato et al., 2014; de Almada et al., 2016). Como ejemplo, cepas de *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivadas por tratamiento térmico pueden disminuir la concentración de TNF- $\alpha$  en muestras de cultivo de células Caco-2 (Zhang et al., 2005). Además, la presencia de ácidos lipoteicoicos, mayor componente de la pared celular de algunas cepas de *Lactobacillus*, activan macrófagos y células dendríticas a través de TLR2 de manera cepa específica (Matsuguchi et al., 2003)

**Tabla 1.** Evaluación de administración de bacterias probióticas en diferentes modelos de inflamación intestinal.

<b>Probióticos</b>	<b>Modelo</b>	<b>Respuesta</b>	<b>Referencia</b>
<i>L. casei</i> Shirota	Ratones BALB/cOlaHsd inducidos con dextran	Se mostró una pérdida de peso corporal y se incrementó la regeneración del tejido colonico.	Herías et al., 2005
<i>L. fermentum</i> BR11	Ratas macho	Se observó una disminución en el índice de actividad de la enfermedad en grupos administrados con BR11 y Bb12.	Geier et al., 2007
<i>L. rhamnosus</i> GG	Sprague-Dawley inducidas con dextrán	Longitud de colon incrementó en 10 % en grupos tratados con BR11 y GG.	
<i>B. lactis</i> Bb12		BR11 fue más efectivo en reducir los síntomas de la colitis, Bb12 presentó efecto mínimo, mientras que TH-4 no presentó efecto y LGG exacerbó algunos síntomas de colitis.	
<i>S. thermophilus</i> TH-4			
<i>L. rhamnosus</i> GG,	Ratas machos	Reduce la actividad MPO.	Amiri-Romach et al., 2008
<i>L. acidophilus</i> ,	Wistar inducidas con TNBS		
<i>B. lactis</i> ,			
<i>S. thermophilus</i>			
<i>L. rhamnosus</i> GG,	Ratones machos	Reducción significativa de la pérdida de peso y la expresión de TNF- $\alpha$ y TGF- $\beta$ 1.	Kumar et al., 2008
<i>L. plantarum</i> ,	Swiss-albino con dextrán.		
<i>L. casei</i> , <i>L. lactis</i>			
<i>B. bifidum</i> , <i>longum</i>			
<i>B. infantis</i> , <i>lactis</i>			

**Tabla 1. (Continuación)** Evaluación de administración de bacterias probióticas en diferentes modelos de inflamación intestinal.

<b>Probióticos</b>	<b>Modelo</b>	<b>Respuesta</b>	<b>Referencia</b>
<i>L. plantarum</i> HY115, <i>L. brevis</i> HY7401, <i>L. acidophilus</i> (CSG)	Ratones machos ICR inducidos con dextrán	Disminuyó la actividad MPO. Expresión de proteínas de IL-1 $\beta$ , IL-6 en mucosa de colon.	Lee et al., 2008
<i>B. longum</i> HY8001, <i>B. infantis</i> KCTC3226, <i>B. animalis</i> CTC3216, <i>B. adolescentes</i> JCM1275	Ratones machos Wistar inducida con DSS	Inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.	Dai et al., 2013
VSL#3 ( <i>S. thermophilus</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. bulgaricus</i> )	Ratones machos BALB/c inducidos con dextrán	Disminuyó la actividad MPO, así como indicadores de inflamación como iNOS, Ciclooxigenasa-2, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-6 y p-Akt, además de un incremento en IL-10.	Ko et al., 2014
<i>B. breve</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>S. thermophilus</i>		Se mostró un efecto protector por consumo de probióticos, al disminuir los niveles de IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-1 $\beta$ , mientras que IL-10 no mostró cambios significativos.	

\*MPO=Actividad Meloperoxidasa, (iNOS)=Óxido Nítrico Sintasa

### **2.4.3. Efecto Antiinflamatorio de los Metabolitos Derivados de la Fermentación Láctica**

2.4.3.1 Péptidos antiinflamatorios. Diversos estudios han demostrado el potencial efecto antiinflamatorio de péptidos derivados de la leche en modelos de inflamación a nivel sistémico (Matar et al., 2001; Reyes et al., 2018). Algunas de sus acciones está relacionada con el potencial efecto de mantener, reforzar o reparar la función barrera del intestino (Martínez-Augustin et al., 2014).

Aunque existe evidencia de que no solo péptidos de la leche presentan efecto antiinflamatorio en modelos de inflamación a nivel sistémico (Santiago-López et al., 2017), no se han reportado estudios que muestren evidencia del rol de estos péptidos y su mecanismo de acción en los diferentes procesos inflamatorios intestinales. En este sentido, un estudio reportó que el glicomacropéptido derivado de k-caseína, ejerce un efecto antiinflamatorio en un modelo de inflamación con DSS. El tratamiento con el glicomacropéptido disminuyó hasta en un 60 % el índice de actividad de la enfermedad, además de mostrar un menor daño a nivel de mucosa. Por otro lado, normalizó la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-23, IL-6, TGF-  $\beta$ , IL-10, Foxp3 en muestras de colon, y IL-10 en NML. Mientras que los valores de la actividad MPO, ciclooxigenasa-2, y fosfatasa alcalina no mostraron cambios significativos. El análisis histopatológico mostró una mejor preservación del epitelio y atenuó la infiltración a nivel de la submucosa (López-Posadas et al., 2010).

2.4.3.2. Exopolisacáridos. Los EPS son polímeros de carbohidratos presentes en la capa extracelular que cubren la superficie de las bacterias tanto Gram positivas como negativas. El interés de los EPS se ha derivado por su potencial aplicación en el desarrollo de alimentos, biotecnología, cosméticos o medicina, además, las implicaciones en la salud. La producción de EPS a partir de bacterias ácido lácticas ha sido ampliamente reportado, y se ha demostrado su potencial efecto en la salud, la producción de EPS por bacterias probióticas se han correlacionado con su potencial efecto para modular la respuesta del

sistema inmune tanto innata como adaptativa (Ciszek-Lenda et al., 2011). Como principales efectos se ha encontrado que el consumo de EPS puede disminuir la concentración de citocinas pro-inflamatorias. Estos efectos hacia el sistema inmune se ha correlacionado con la interacción entre bacterias productoras de EPS y el ambiente gastrointestinal del hospedero (Hidalgo-Cantabrana et al., 2014). Por ejemplo, cepas productoras de EPS que fueron co-cultivadas con células mononucleares PBMC inducen la proliferación de células Th1 y Th2 y esta proliferación es dependiente del tipo de EPS (Sánchez et al., 2013; Hidalgo-Cantabrana et al., 2014).

En un estudio con ratas, donde se indujo inflamación con ácido acético, se observó que la administración de probióticos productores de EPS atenuaron los efectos ocasionados por el proceso de inflamación de manera dosis dependiente (Sengül et al., 2006). Por otro lado, las cepas de *Lactobacillus reuteri* 115, *Lactobacillus johnsonii* 142, *Lactobacillus animalis* 148 inducen la producción de citocinas por macrófagos de manera dosis dependiente (Marcinkiewicz et al., 2007).

Un estudio donde se desarrolló un proceso de inflamación con DSS, reportó que cepas isogénicas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* con diferente capacidad para producir EPS, mostró la capacidad de disminuir el índice de daño a nivel de tejido. Se incrementó la presencia de células T-reguladoras en los MLN, por lo que, estas cepas productoras de EPS podrían tener la capacidad de disminuir la respuesta inflamatoria a nivel intestinal (Hidalgo-Cantabrana et al. 2016)

En base a los antecedentes que se han documentado, las leches fermentadas en conjunto con los metabolitos derivados de la fermentación, podrían tener potencial efecto anti-inflamatorio en modelos gastrointestinales, considerando específicamente la ruta de respuesta de células Th1-Th17, aunque son pocos los estudios que han demostrado que las bacterias *per se* ejerzan un papel importante en los procesos inflamatorios; sin embargo, los metabolitos que están presentes en la leche fermentada no se han mencionado qué papel juegan en las rutas de activación mencionadas.

### 3. HIPÓTESIS

La administración de leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus fermentum* y los metabolitos derivados de su fermentación, en conjunto, puede modular la respuesta de células Th1-Th17, en diferentes modelos de inflamación intestinal inducida.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto por la administración de leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus fermentum* sobre la respuesta Th1-Th17, en un modelo murino con inflamación inducida.

### 4.2. Objetivos Específicos

- ✓ Evaluar el efecto del Dextrán Sulfato de Sodio sobre sobre la viabilidad de las cepas de *Lactobacillus fermentum*.
- ✓ Determinar el contenido de Exopolisacáridos, ácido láctico, proteína en las leches fermentadas.
- ✓ Evaluar el efecto de la administración de leches fermentadas sobre la concentración de citocinas de respuesta Th1-Th17 en muestras de suero y mucosa a partir de diferentes modelos de inflamación intestinal inducida.
- ✓ Determinar el efecto de la administración de leches fermentadas sobre la estructura de intestino grueso de ratones con inflamación inducida.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Bacterias Ácido Lácticas de Estudio

Cepas de *Lactobacillus fermentum* J20 y J28 fueron obtenidas del Laboratorio de Productos Lácteos, que previamente demostraron capacidad de regular el sistema inmune y tener efecto anti-inflamatorio a nivel sistémico *in vivo* (Sosa-Castañeda 2014; Santiago-López et al., 2018) Las bacterias se reactivaron en caldo Man Rogosa y Sharpe (MRS) al 1 % (v/v) y se dejaron incubar a 37 °C por 24 h. Subsecuentemente se realizaron dos subcultivos de 18 y 12 h, respectivamente.

### 5.2. Evaluación de la Supervivencia de *Lactobacillus fermentum* bajo Condiciones Gastrointestinales Simuladas y DSS

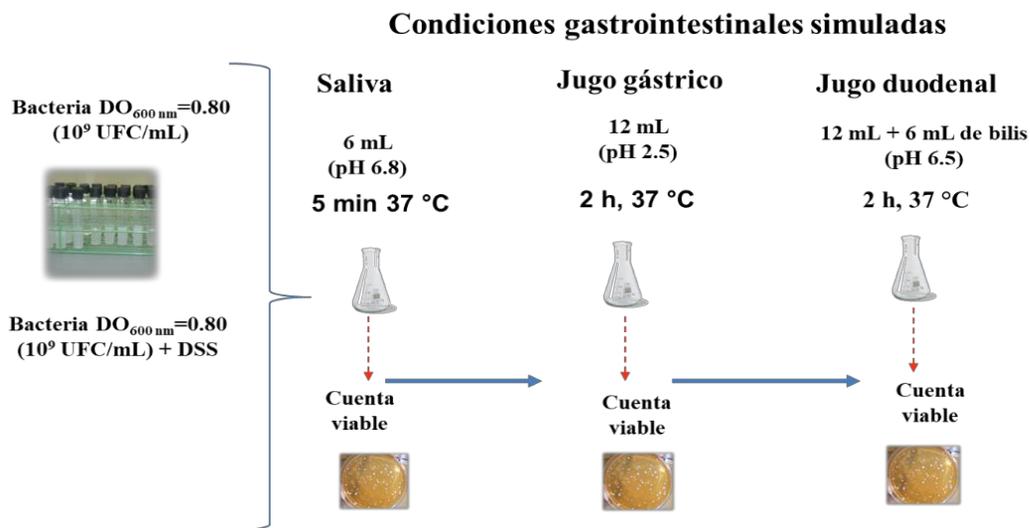
Se determinó el efecto de la simulación gastrointestinal y la adición de DSS sobre la viabilidad de las cepas de *Lactobacillus fermentum* J20 y J28. La metodología de simulación se siguió de acuerdo a lo reportado por Rivas-Jimenez et al. (2016) con algunas modificaciones.

Cultivos de 12 h en caldo MRS se centrifugaron (3600 *xg*, 10 min, 10 °C), el paquete celular se lavó dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS, pH 7.2, 0.02 M), posteriormente, el paquete celular fue re-suspendido y se ajustó a una densidad óptica (DO<sub>600 nm</sub>) de 0.80, equivalente a una concentración de *c.a.* 10<sup>9</sup> UFC/mL. A la solución de bacteria ajustada se adiciono DSS (3 %, p/v).

Para el proceso de simulación se tomaron 5 mL de bacteria ajustada más DSS y se adicionaron 6 mL de saliva, se ajustó el pH de la mezcla a 6.8 y se dejó incubar por 5 min. Posteriormente, 12 mL de jugo gástrico fueron adicionados y se ajustó el pH a 2.5 y se

dejó incubar por 2 h. Finalmente, se adicionaron 12 mL de jugo duodenal + 6 mL de jugo biliar + 2 mL de HCO<sub>3</sub>, se ajustó el pH a 7.5 y se dejó incubar por 2 h. Todo el proceso de simulación se realizó a una temperatura de 37 °C (**Figura 4**).

Se determinó el porcentaje de sobrevivencia de las bacterias en las etapas gástrico e intestinal. Para ello, la muestra fue centrifugada y el paquete celular se re-suspendió en 5 mL de PBS, se tomó 1 mL para realizar diluciones seriadas y posteriormente la siembra en placas de MRS. Las placas se dejaron incubar por 48 h a 37 °C.



**Figura 4.** Diagrama del proceso de simulación continuo para evaluar el efecto de la simulación gastrointestinal y el efecto del inductor de inflamación (DSS) sobre la viabilidad de *Lactobacillus fermentum* J20 y J28.

### 5.3. Preparación de Leches Fermentadas

Para la preparación de la leche fermentada se utilizó leche semidescremada en polvo (Alpura®, México) al 10 % (p/v), se esterilizó (110 °C, 10 min). Posteriormente, las cepas de 12 h en caldo MRS se inocularon en leche (1 % v/v) y se dejó incubar por 24 h a 37 °C. Del cultivo de 24 h en leche, se tomó una alícuota al 1 % (v/v) y se inoculó nuevamente en leche, se dejó incubar por 12 h a 37 °C.

A partir de este último cultivo, se tomó una alícuota (3 %, v/v) y se inoculó nuevamente en leche, se dejó fermentar por 48 h a 37 °C. Finalizado el proceso de fermentación, la leche se dividió en dos lotes: leche fermentada (LF), leche pasteurizada (73 °C/ 15 min) pos-fermentación (PLF) con el objetivo de inactivar a las bacterias presentes. Además, se preparó leche acidificada (LA) utilizando ácido láctico (~90%, Sigma-Aldrich México) en proporción de 400 µL por cada 10 mL de leche para obtener un pH de 4.18 y 4.05 para J20 y J28 respectivamente, similar a lo obtenido en las leches fermentadas.

### **5.3.1. Determinación de Exopolisacáridos en Leches Fermentadas**

Para la cuantificación los EPS en la leche fermentada se siguió la metodología citada por (Tallon et al. 2003) con modificaciones. Las diferentes muestras de leches fermentadas y pasteurizadas pos-fermentación (10 mL) de 48 h se les adicione ácido tricloroacético (20 %, v/v) y se dejó reposar durante 40 min a 4 °C. El material insoluble fue removido por centrifugación (3600 *xg*, 40 min, 10 °C), el sobrenadante obtenido se le adicionó etanol frío (95 %) dos veces su volumen y se dejó reposar durante 24 h a 4 °C. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas (3600 *xg*, 40 min, 10 °C), el precipitado obtenido se re-suspendió en 1 mL de agua mili-Q y se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

El contenido total de EPS fue determinado utilizando el método de fenol-sulfúrico (Dubois et al. 1956) y se utilizó glucosa (40 mg/mL) como estándar. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de glucosa.

A las muestras de leches fermentadas se determinó el contenido de ácido láctico y contenido de proteína total por microKjeldahl de acuerdo a la metodología establecida por la AOAC (2002).

## 5.4. Inducción del Proceso de Inflamación Crónico

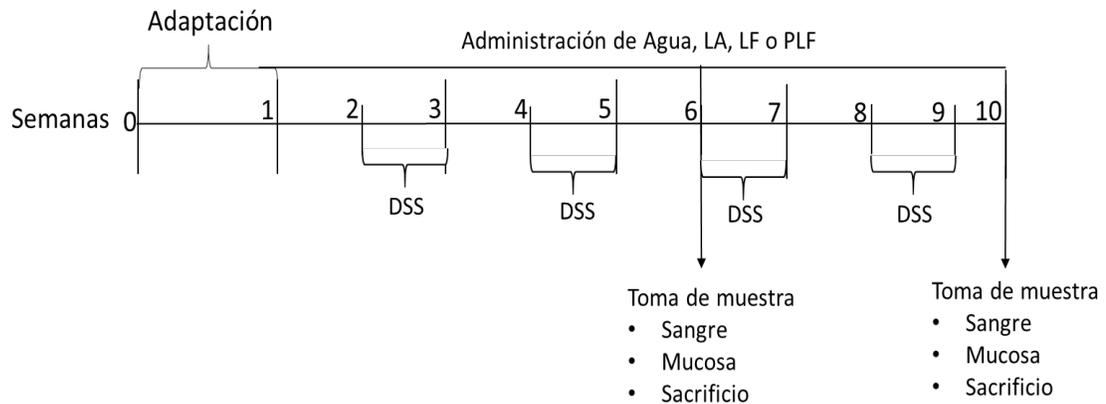
### 5.4.1 Animales de Estudio

Para el estudio se trabajaron con 70 ratones machos de la cepa C57Bl/6 (6-8 semanas, 25-35 g) (BIOINVERT México City). Los ratones fueron distribuidos individualmente en jaulas de acero inoxidable y se mantuvieron en un cuarto con condiciones controladas de temperatura  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con ciclos de luz-obscuridad de 12 h. Los animales recibieron comida y agua *ad libitum*. El trabajo fue aprobado por el comité de ética del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. con el número de folio de CE/002/2015.

### 5.4.2. Diseño del Experimento

Para el proceso de inducción de inflamación crónico, se siguió la metodología reportada por (Alex et al., 2009) con algunas modificaciones. Se utilizó DSS (PM 40, 000, Sigma-Aldrich, México) como agente inductor de inflamación a una concentración de 3 % (p/v). Los animales de estudio fueron distribuidos en 7 grupos (n=10) que fueron: a) grupo con agua, b) DSS, c) LA+ DSS, d) grupo con LFJ20+DSS, e) PLFJ20 + DSS, f) LFJ28 + DSS, g) PLFJ28 + DSS. Antes de comenzar con el estudio, todos los animales llevaron una semana de adaptación, al día seis se registró el peso, el cual se utilizó como variable de respuesta para la aleatorización y formación de cada uno de los grupos. Una vez formado los grupos (día 7), los animales recibieron 800  $\mu\text{L}$  de LF o LA. Posterior a una semana de administración de cada una de las leches fermentadas se administró el DSS (200  $\mu\text{L}/\text{día}/\text{ratón}$ ) por una semana, sin dejar de administrar LF (**Figura 5**).

Durante el ensayo, se registró el peso, consumo de alimento, y agua. A la sexta semana del ensayo, se realizó un primer sacrificio y se obtuvieron muestras de sangre, intestino delgado y grueso; hígado, riñones y bazo. De intestino grueso, se recuperó la mucosa intestinal siguiendo la metodología citada por Kumar et al. (2008). Mismo procedimiento al finalizar el estudio.



**Figura 5.** Representación del proceso de inducción de inflamación crónica con DSS y la administración de LF=Leche fermentada, PLF=Leche pasteurizada pos-fermentación, LA=Leche acidificada.

### 5.5. Evaluación de Citocinas en Suero y Mucosa Intestinal

Las muestras de sangre obtenidas se centrifugaron (2500 rpm, 10 min, 4 °C), se recuperó el suero y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Se evaluaron citocinas inflamatorias IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22, IL-23 utilizando kits de ELISA (R & D Systems, Inc. USA) en muestras de suero y mucosa de intestino grueso. Las concentraciones se calcularon utilizando el programa ELISAanalysis.com (Australia), y las citocinas IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10 se cuantificaron en muestras de suero utilizando el kit Th1/Th2/Th17 (Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 cytokine kit, BD, San José, CA, USA) las cuales fueron determinados por citometría de flujo (BD FACSII Canto, California), las concentraciones se calcularon utilizando el programa FACSArray™ Bionalyzer (Becton Dickson, San José California, USA).

Por otro lado, el intestino grueso se abrió longitudinalmente y se recuperó la mucosa. Para ello, los cortes de intestino grueso se colocaron en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, México) suplementado con penicilina-estreptomicina (1 % v/v). Las muestras se dejaron incubar por 24 h a 37 °C. Las muestras se centrifugaron, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

## 5.6. Análisis Histológico

Se recuperaron muestras de ileon y de colon distal y se almacenaron en una solución de formalina 10 % (Sigma-Aldrich), para realizar el proceso de fijación. Las muestras de tejido se procesaron con diferentes solventes y se prepararon las muestras para el proceso de tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E). Una vez obtenido el corte histológico, estos fueron teñidos con una solución de H-E. Los cambios morfológicos de las muestras de colon fueron visualizados por microscopia (LEICA. DM2000, Leica Microsystems Inc., Chicago, IL, USA). Las imágenes fueron procesadas con el programa LEICA V2.

## 5.7. Inducción de Inflamación Aguda

La indometacina es un componente no esterooidal (NSAIDs, por sus siglas en inglés) que ha sido utilizado como anti-inflamatorio, sin embargo, se ha reportado que en algunos casos puede causar desórdenes gastrointestinales a nivel de intestino delgado y por lo tanto conlleva a un proceso de inflamación (Yamadi et al., 2003). Para fines de este estudio, se utilizó indometacina como agente inductor de inflamación a una concentración de 10 mg/kg peso del ratón. La indometacina se disolvió en una solución de carbonato de sodio (pH 7.0, 0.1 M), y se calcularon las dosis respectivas para cada animal de estudio.

Para el diseño experimental los animales fueron distribuidos en 4 grupos: 1) grupo con agua (n=5); 2) grupo con indometacina (n=7); 3) grupo con indometacina + PLFJ20 (n=7); 4) grupo con indometacina + PLFJ28 (n=7). Los animales llevaron una semana de adaptación, el consumo de agua y alimento fueron administrados *ad libitum*, y se registró el peso durante el ensayo. Los animales recibieron 1 mL de PLFJ20 o PLFJ28 durante 15 días. Posterior a la primera semana de administración de cada una de las leches fermentadas, se administró indometacina a la dosis correspondiente, cada tercer día, durante una semana, sin dejar de administrar la PLF. Los animales fueron sacrificados, se recuperaron muestras de sangre, intestino delgado, bazo, hígado y riñón.

De las muestras de sangre se recuperó el suero, el cual fue almacenado a -80 °C hasta su posterior análisis, mientras que los órganos se pesaron, se midió la longitud del intestino delgado. Posteriormente, una muestra de íleon se abrió longitudinalmente y se mezcló con medio RPMI-1640, y se dejó incubar por 24 h a 37 °C, posteriormente se recuperó el sobrenadante como se mencionó en la sección 5.5.

De las muestras de suero se analizaron las citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  utilizando el kit Th1/Th2/Th17 (Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 cytokine kit, BD, San José, CA, USA), y las citocinas IL-6, IL-17, IL-23 fueron determinadas utilizando kits de ELISA (R & D Systems, Inc. USA) en muestras de suero. Mientras que IL-17 e IFN- $\gamma$  fueron determinados en muestras de mucosa de intestino delgado. Las concentraciones para cada análisis fueron determinadas como se mencionó en la sección 5.5.

## 5.8. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos para la determinación de EPS, concentración celular, contenido de proteína, AL, así como, el porcentaje de sobrevivencia bajo condiciones de simulación fueron analizados mediante un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) y en caso de mostrar diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) se realizó la comparación de medias por la técnica de Tukey-Kramer. Los valores representan la media  $\pm$  DE de  $n=3$ .

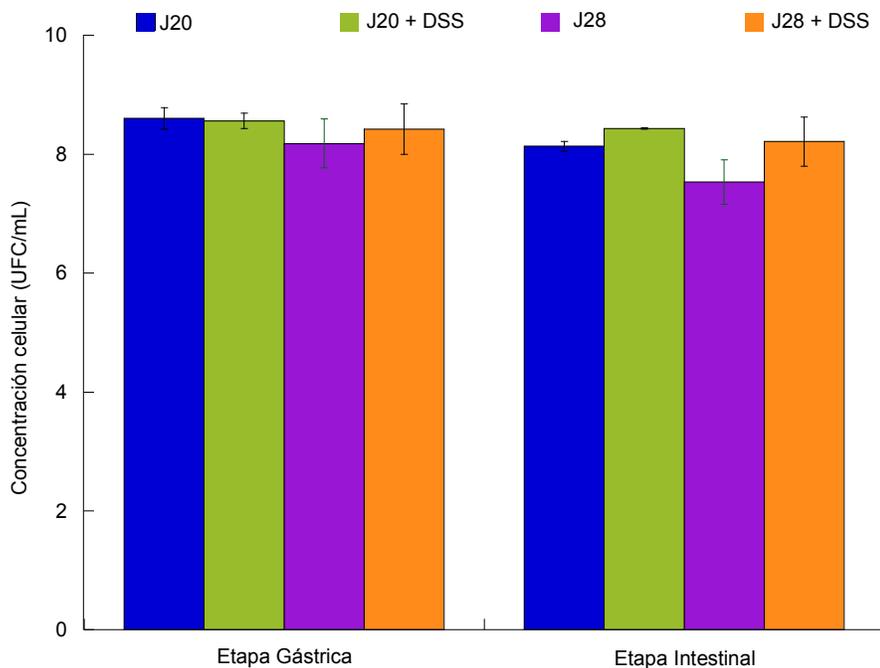
Para el ensayo del modelo animal, se utilizó un diseño completamente al azar. Para la formación de los grupos el peso se utilizó como variable de aleatorización. Los resultados de ganancia de peso, peso de los órganos, y consumo de alimento, fueron analizadas con ANOVA de una sola vía. Mientras que, los valores obtenidos de citocinas fueron analizados con estadística no paramétrica utilizando la técnica de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ). Los valores representan la mediana a las 6 y 10 semanas del estudio. Todas las comparaciones estadísticas se analizaron utilizando el programa estadístico Minitab V.16.1.1. (LEAD Technologies, Inc. USA)

## 6. RESULTADOS Y DISCUSION

### 6.1. Sobrevivencia de las Bacterias bajo Condiciones de DSS y Simulación Gastrointestinal

Para generar un proceso de inflamación a nivel intestinal, diversos métodos son utilizados, siendo uno de ellos la inducción con agentes químicos, como el caso del DSS. El DSS es soluble en agua, además de contener una molécula sulfatada cargada negativamente. Aunque los mecanismos de inducción de inflamación no han sido esclarecidos, algunos estudios reportan que su sitio de acción es sobre la monocapa del epitelio de intestino grueso (Laroui et al., 2012; Chassaing et al., 2015). Este efecto se puede generar a través de una interacción pasiva o activa hacia la célula vía receptores específicos, o bien, el DSS puede penetrar la célula después de la unión con otra molécula generando formas policatiónicas e induciendo una infiltración significativa de macrófagos hacia el epitelio del colón (Kim et al., 2010).

Los resultados demostraron que la presencia de DSS en conjunto con el proceso de simulación gastrointestinal, no afectó la viabilidad de las bacterias (**Figura 6**). Estos resultados nos podrían indicar que la presencia de DSS no podría afectar el efecto benéfico de las bacterias relacionadas con la viabilidad celular, por lo que, pueden llegar activas a al intestino. No se han reportado estudios donde se evalué el efecto del DSS sobre la viabilidad de las bacterias, pero si se ha demostrado que su efecto a nivel de mucosa que conlleva a general el proceso de inflamación. Estos resultados nos indicaron que el agente inductor de inflamación no tiene un efecto sobre la viabilidad de las bacterias.



**Figura 6.** Efecto del proceso de simulación gastrointestinal simulado y DSS sobre la viabilidad de *Lactobacillus fermentum*. Los valores representan la media  $\pm$  DE de n=3. \*\* muestra diferencia significativa con y sin DSS.

## 6.2. Caracterización de la Leche Fermentada

Para la caracterización de las diferentes leches fermentadas, se determinó la concentración celular (UFC/mL), AL (%), proteína (%) (**Tabla 2**). A cada una de las muestras de leche fermentada se determinó la concentración celular, mostrando una concentración de *c.a.* 9 Log UFC/mL, no mostrando diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre cepas y a las muestras de leche pasteurizada pos-fermentación no mostraron viabilidad celular.

El contenido de ácido láctico se determinó para las cuatro muestras de leche, donde ambas leches fermentadas con (LF y PLF) mostraron la concentración más alta ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 2.** Concentración de EPS, LA, proteína y concentración bacteriana de las leches fermentadas.

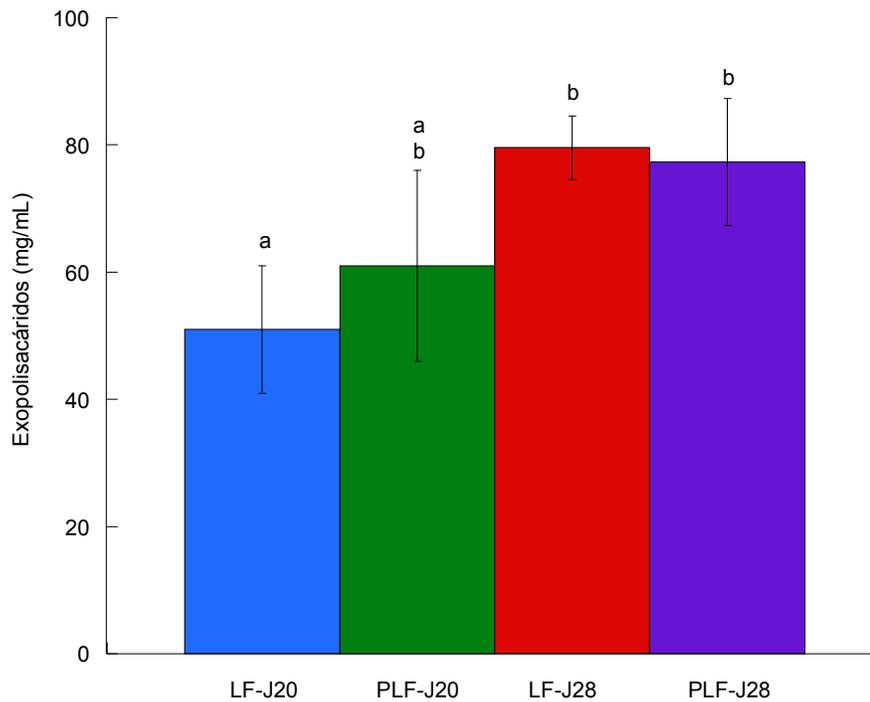
<b>Leche fermentada</b>	<b>Concentración celular (Log UFC/mL)</b>	<b>Ácido láctico (%)</b>	<b>Proteína total (%)</b>
<b>Leche sin fermentar</b>	ND	0.15±0.03 <sup>a</sup>	2.71±0.05 <sup>a</sup>
<b>LF-J20</b>	8.79±0.15 <sup>a</sup>	0.72±0.01 <sup>b</sup>	2.80±0.05 <sup>a</sup>
<b>PLF-J20</b>	NI	0.75±0.03 <sup>b</sup>	2.71±0.04 <sup>a</sup>
<b>LF-J28</b>	9.04±0.18 <sup>a</sup>	0.90±0.01 <sup>b</sup>	3.01±0.11 <sup>a</sup>
<b>PLF-J28</b>	NI	0.87±0.01 <sup>a</sup>	2.88±0.04 <sup>a</sup>

Los valores corresponden a la media ± DE de n=3. Letras diferentes muestran diferencia significativa entre los diferentes tipos de leches fermentadas. NI= No Identificada.

### 6.2.1. Determinación de Exopolisacáridos

La presencia de EPS ha sido de gran importancia debido a los efectos benéficos que se les ha atribuido, por ejemplo; protegen contra compuestos tóxicos, bacteriófagos, estrés osmótico y permiten la adhesión sobre superficies sólidas y la formación de biopelículas, además han demostrado potencial efecto anti-inflamatorio en algunos modelos de estudio (Degeest et al., 2001).

Se cuantificó la presencia de EPS liberados durante el proceso de fermentación, los resultados mostraron que la leche fermentada con la cepa J28 presentó la mayor concentración a 48 h de fermentación ( $p < 0.05$ ), sin mostrar diferencia significativa con respecto a la leche fermentada pasteurizada (**Figura 7**).



**Figura 7.** Concentración de exopolisacáridos en leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus fermentum* a 48 h. Los valores representan la media  $\pm$  DS de  $n=3$ . Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p<0.05$ ) entre los tipos de leche fermentada.

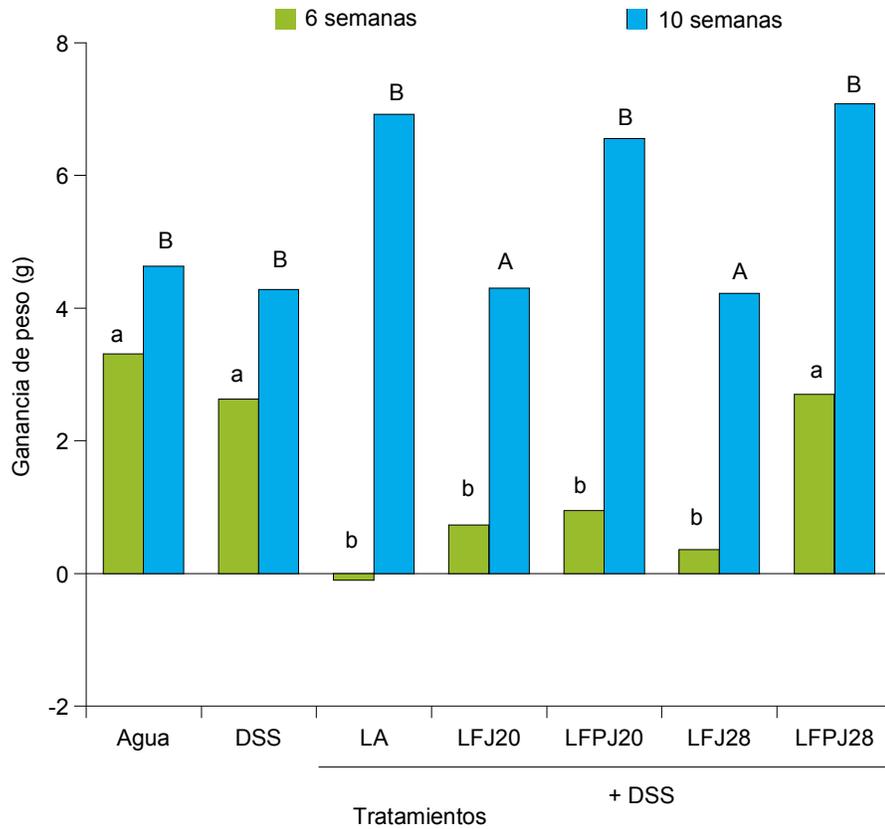
Como se ha reportado en otros estudios, la producción de EPS es dependiente de la cepa, así como de la fuente de carbono. La presencia de bacterias con capacidad de producir EPS se ha atribuido a que estos cumplen funciones tecnológicas importantes, como es brindar textura y viscosidad a los productos, por ejemplo, en algunos estudios se ha relacionado con disminuir la sinéresis de los productos lácteos (Ruas-Madiedo et al., 2002). Sin embargo, la funcionalidad de los EPS, que ha sido menos explorada. Se ha reportado que los EPS unidos a la membrana celular de *Lactobacillus acidophilus* 606 presentaron efecto anti-tumoral (Kim et al., 2010).

Además la presencia de EPS tienen la capacidad de estimular células del sistema inmune, donde se ha documentado que la presencia de EPS en muestras de pared celular de *Lactobacillus rhamnosus* KLC37 disminuye la concentración de citocinas pro-inflamatorias producidas por macrófagos en comparación con la inducción de LPS de *Escherichia coli*, y que esta ruta de activación puede estar mediada por la proteína p38 a través de la vía de activación de cinasas ERK (Ciszek-Lenda et al., 2011). Además, el consumo de EPS puede disminuir la severidad de la colitis y podrían considerarse como potencial contra los procesos inflamatorios intestinales (Leeber et al., 2007), por lo que, en nuestro estudio fue importante conocer si las bacterias de estudio tenían la capacidad de producir EPS y poder considerarlos dentro de la leche fermentada como un componente con posible papel anti-inflamatorio.

### 6.3. Respuesta al Proceso de Inflamatoria Asociada al Consumo de Leche Fermentada

Los resultados sobre la ganancia de peso se muestran en la **Figura 8**, donde los grupos que recibieron LA, LFJ20, PLFJ20 y LFJ28 mostraron menor ganancia de peso en las primeras seis semanas de estudio, siendo el grupo con LA quien no mostró ganancia de peso y el grupo con LFJ28 mostró en general la menor ganancia de peso. Los resultados de ganancia de peso fueron calculados con respecto al peso del día uno y al final de cada tiempo de evaluación por cada animal de estudio.

De acuerdo a estudios previos, el proceso de inducción de inflamación crónico tiene como efecto una disminución del peso corporal (Ito et al., 2008; Feng et al., 2011; Jadhav et al., 2012; Laroui et al., 2012;). Con base a los resultados obtenidos en nuestro estudio, los grupos a los que se les administró LA, LFJ20, PLFJ20 y LFJ28, fueron los grupos que presentaron los valores más bajos de frecuencia de consumo de alimento en relación al peso corporal. Estos resultados podrían estar indicando que la administración de los diferentes leches ocasionó una reducción del apetito en los animales

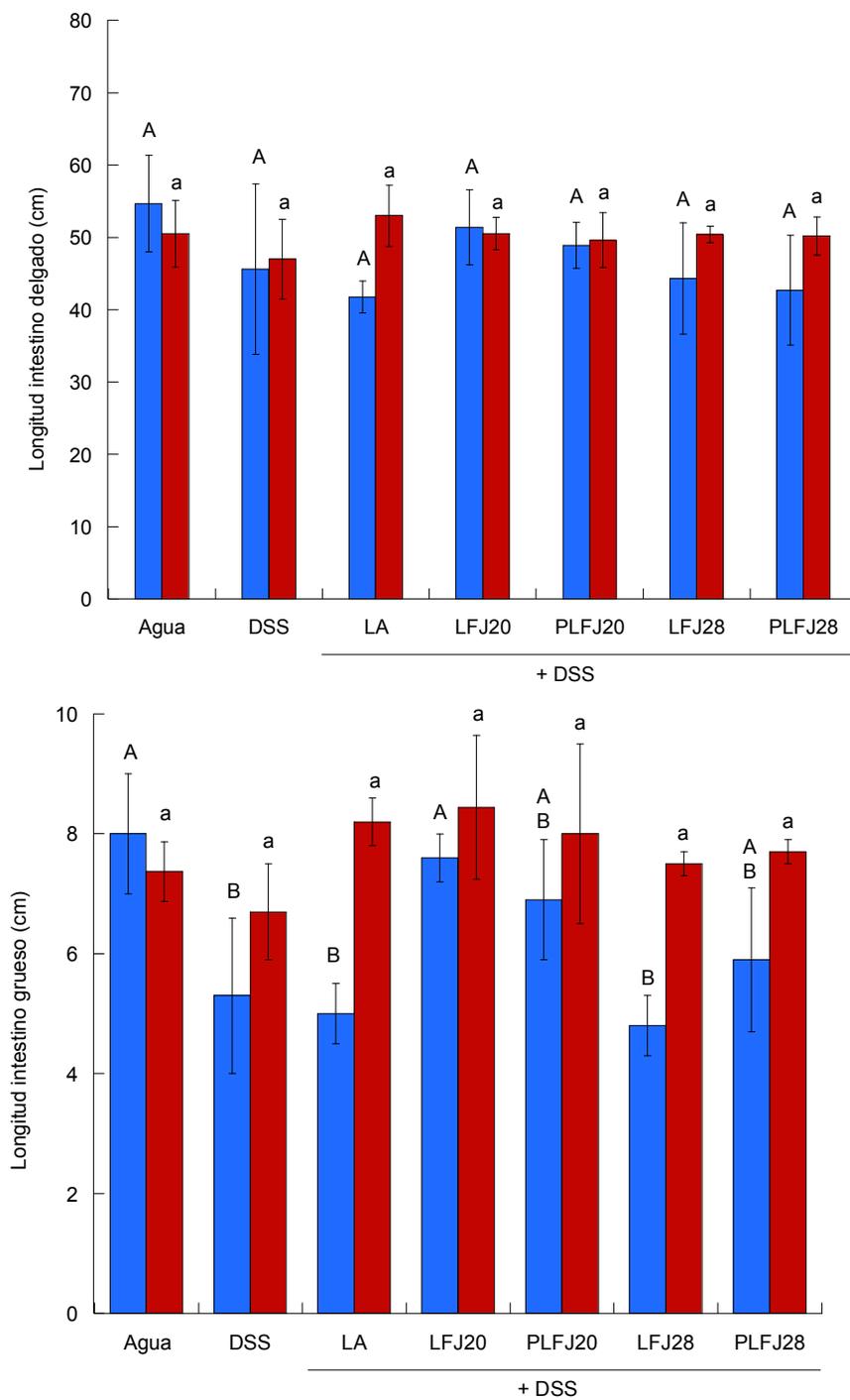


**Figura 8.** Ganancia de peso de los animales de estudio durante el proceso de inducción de inflamación y por la administración de leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus fermentum*. Los valores representan la mediana de cada uno de los grupos de estudio. Los valores fueron analizados con estadística no paramétrica utilizando la prueba de Kruskal-Wallis con  $p < 0.05$ . Letras minúsculas indican diferencia significativa a las seis semanas. Letras mayúsculas indican diferencia significativa a las 10 semanas de estudio. DSS=Dextrán sulfato de Sodio; LA=Leche Acidificada; LF=Leche fermentada; PLF=leche pasteurizada post-fermentación.

Los resultados obtenidos en comparación con el estudio reportado por Herias et al. (2005), demostró que la administración de *Lactobacillus casei* Shirota en un modelo de inflamación aguda con DSS mostró menor ganancia de peso en los primeros nueve días, pero se mostró un efecto de regulación después del día 11.

Otro de los efectos negativos que se ha documentado por efecto del inductor de inflamación es el acortamiento del intestino grueso. La longitud del intestino se midió a las seis y 10 semanas, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en ninguno de los grupos administrados con leche fermentada, en comparación con el grupo que únicamente recibió DSS (**Figura 9**). Sin embargo, otros estudios reportaron que la longitud de las vellosidades se ve afectada debido a que existe un incremento de las células Ki-67+ como respuesta al proceso de recuperación del tejido. Por ejemplo, la administración de DSS al 3 % mostró una reducción en la longitud de las criptas en los primeros 7 días, pero existió un proceso de recuperación a los 14 días. Por consecuencia hubo un incremento en el número de células goblet presente en las criptas (Rose et al., 2012).

Algunos estudios han reportado un efecto negativo en el peso de órganos como bazo, riñones e hígado. Con estos resultados encontramos que únicamente los animales alimentados con LFJ20 y PLFJ28 mostraron cambios significativos en el peso del bazo con respecto al grupo DSS, efecto que solo se observó durante las primera seis semanas del estudio (**Tabla 3**).



**Figura 9.** Efecto de la inflamación y de administración de leches fermentadas sobre la longitud del intestino delgado y grueso de los animales de estudio a las 6 y 10 semanas. Los valores representan la media  $\pm$  DS de cada uno de los grupos de estudio. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos analizados por la prueba de Tukey-Kramer.

Como lo reporta Herias et al. (2005), donde se incrementó el peso del bazo por efecto de la inflamación aguda. Este efecto se podría explicar por la activación de células del sistema además de funcionar como un filtro durante la activación de la respuesta a antígenos. El peso de riñones e hígado no mostraron cambios significativos, indicando que al menos bajo las condiciones de estudio no se presentaron efectos negativos sobre órganos terciarios o que estos órganos no están involucrados durante la respuesta inflamatoria.

#### 6.4. Efecto en el Perfil de Citocinas Inflamatorias por la Administración de Leches Fermentadas

En estudios previos se ha observado que la administración de DSS modifica el perfil de citocinas el cual se ha caracterizado por inducir la respuesta Th1 que se caracteriza por la producción de IL-6, TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$ ; Th2 por las citocinas IL-4 y IL-10, pero la respuesta Th17 juega un papel importante en los procesos inflamatorios intestinales y se caracteriza por la presencia de las citocinas IL-17, IL-22 e IL-23, principalmente (Jego et al., 2003). En este aspecto, las células Th17 han sido descritas por su capacidad de secretar IL-17, pero se caracteriza por la ausencia de IFN- $\gamma$  o IL-4 como importantes mediadores en el proceso de inflamación y daño de tejido (Fischer 2008; Tesmer et al., 2008).

**Tabla 3.** Modificación del peso de los órganos a las seis y 10 semanas por efecto de DSS y de la administración de leche fermentada.

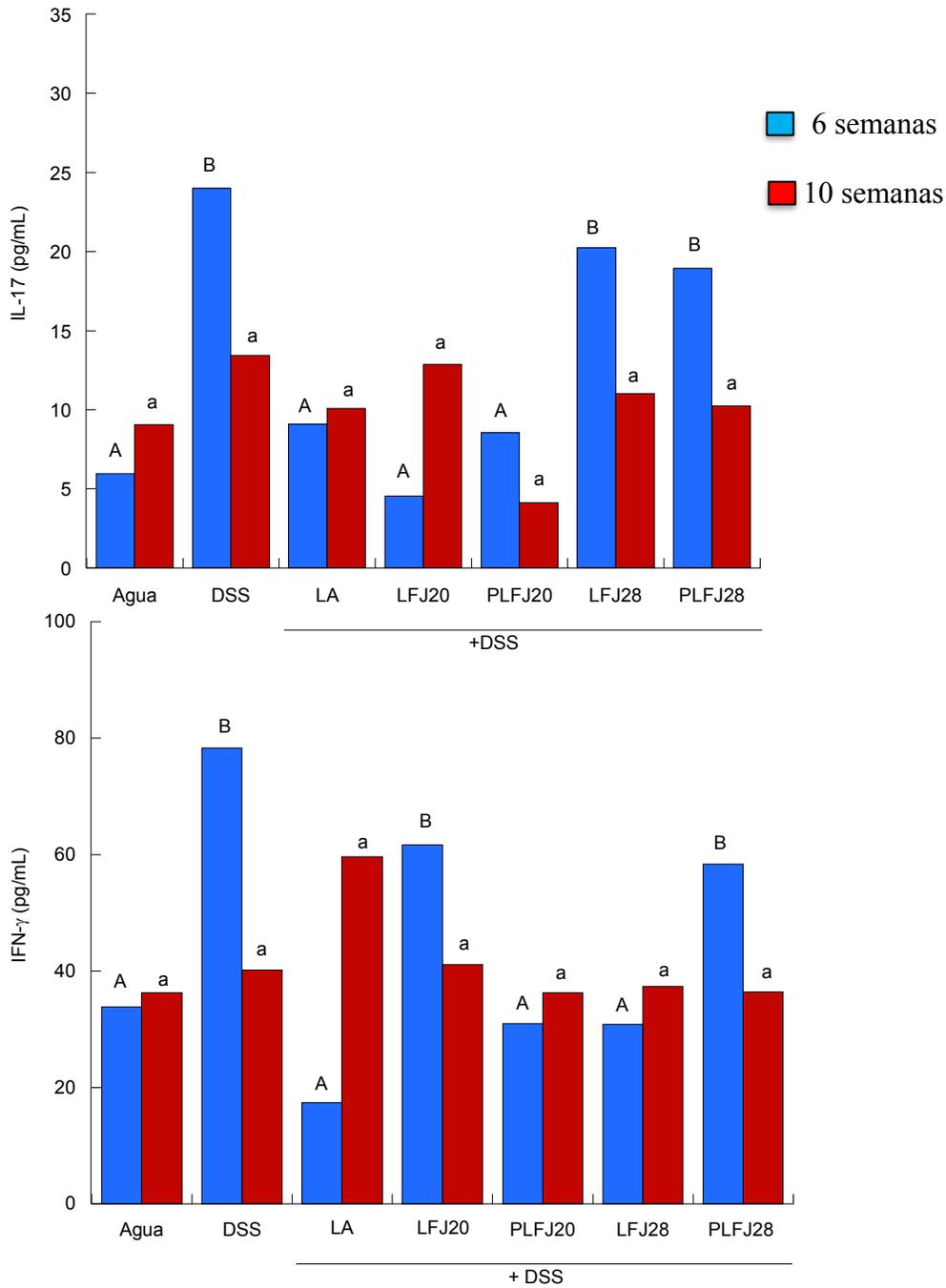
Tratamiento	Tiempo (semanas)							
	Bazo				Riñones			
	6		10		6		10	
Agua	0.11 ± 0.47 <sup>a</sup>	0.087 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.37 ± 0.33 <sup>a</sup>	1.58 ± 0.3 <sup>b</sup>		
DSS	<b>0.05 ± 0.12<sup>b</sup></b>	0.12 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.64 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.22 ± 0.25 <sup>a</sup>	<b>1.64 ± 0.25<sup>a</sup></b>		
LA	<b>0.05 ± 0.005<sup>b</sup></b>	0.09 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.31 ± 0.24 <sup>a</sup>	<b>1.60 ± 4.22<sup>ab</sup></b>		
LFJ20	<b>0.10 ± 0.032<sup>a</sup></b>	0.14 ± 0.43 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.47 ± 0.23 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.20 <sup>ab</sup>		
PLFJ20	0.06 ± 0.029 <sup>ab</sup>	0.02 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.36 ± 0.32 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.20 <sup>b</sup>		
LFJ28	<b>0.09 ± 0.009<sup>a</sup></b>	0.009 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.27 ± 0.18 <sup>a</sup>	<b>1.77 ± 0.17<sup>ab</sup></b>		
PLFJ28	0.06 ± 0.018 <sup>ab</sup>	0.018 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.87 ± 0.28 <sup>ab</sup>		

Los valores representan la media ± DS de n=5. Letras diferentes en una misma columna muestran diferencia significativa entre tratamiento.

En nuestro estudio se cuantificaron citocinas de las tres respuestas a las seis y 10 semanas. Los resultados obtenidos en el estudio mostraron mayor concentración de IL-17 e IFN- $\gamma$  en el grupo administrado con DSS en comparación con el grupo administrado con agua. Mientras que los grupos que recibieron LFJ20 y PLFJ20 presentaron menores concentraciones de IL-17 a las seis y 10 semanas, y únicamente el grupo con PLF-J20 mostró menor concentración para IFN- $\gamma$ . El grupo que recibió LF o PLF de J28 no mostró cambios significativos en la concentración de IL-17, pero el grupo que recibió LF-J28 presentó menor concentración de IFN- $\gamma$  a las seis semanas del estudio, todos estos resultados se observaron a nivel sistémico (**Figura 10**).

Esto podría ser indicativo de que las leches fermentadas con la cepa J20 mostraron la capacidad de regular la respuesta de citocinas inflamatorias caracterizada por la respuesta Th17 independientemente del proceso tecnológico o de la viabilidad de la bacteria. Sin embargo, esta respuesta se observó únicamente a las seis semanas de administración, ya que para la semana 10, este proceso fue revertido, mostrando niveles similares a los producidos por DSS. Por otro lado, PLFJ20 y LFJ28 ( $p < 0.05$ ) también fueron capaces de reducir citocinas de respuesta Th1, dado que la concentración de IFN- $\gamma$  disminuyó únicamente a las seis semanas.

De estos resultados se deduce que las leches fermentadas y pasteurizadas tienen una mayor capacidad para reducir la concentración de citocinas inflamatorias. Los resultados que se obtuvieron mostraron que son cepa dependiente, ya que para IL-17 el efecto antiinflamatorio se vio favorecido por la administración de LF con la cepa J20, mientras que, para IFN- $\gamma$ , el efecto fue brindado tanto por leche pasteurizada pos-fermentación y leche fermentada. Estos efectos se pudieran dar por efecto de los metabolitos liberados (péptidos, EPS, AL) durante el proceso de fermentación.

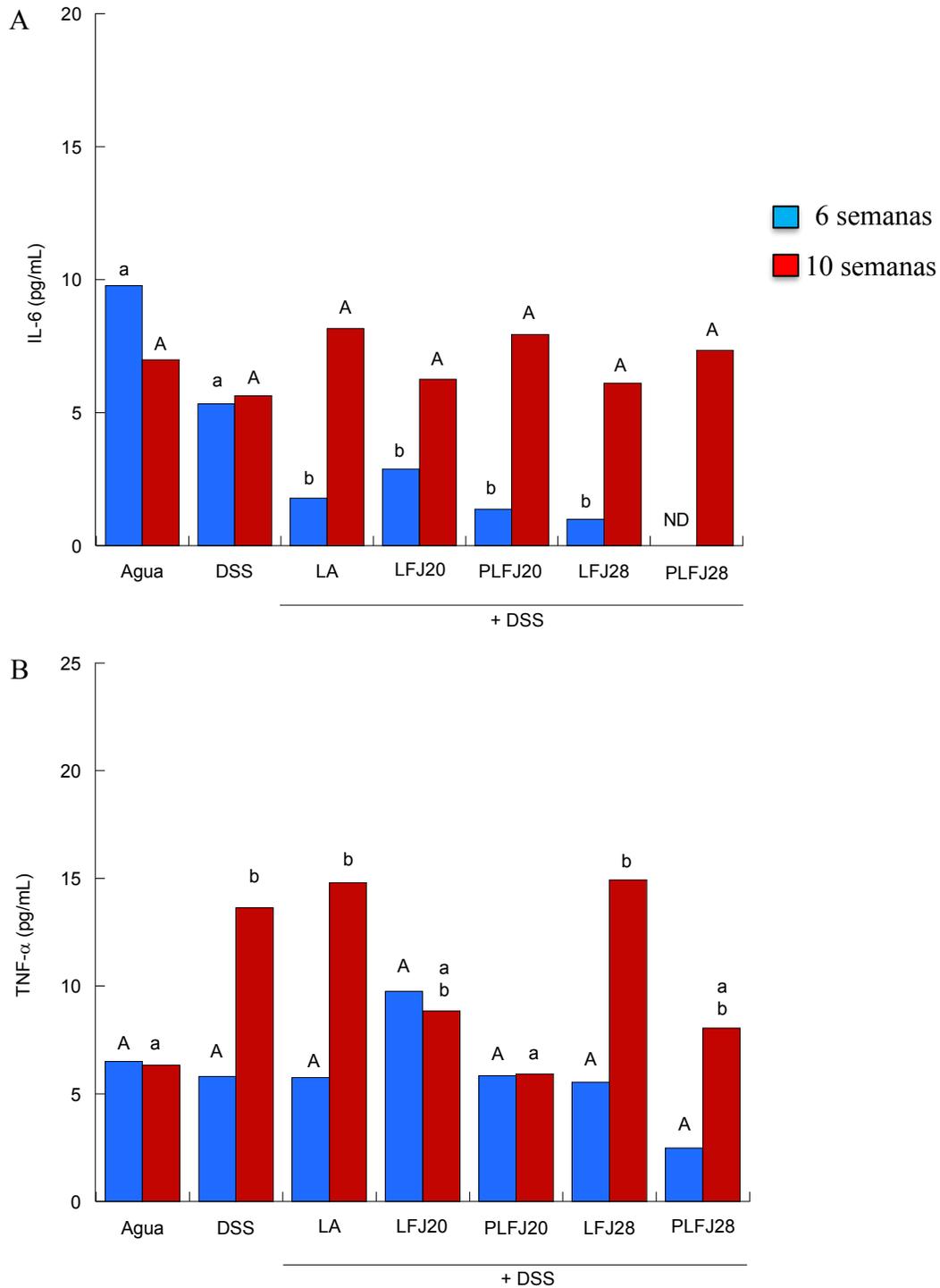


**Figura 10.** Concentración de IL-17 e IFN- $\gamma$  en muestras de suero por efecto de la administración de DSS y leche fermentada a las seis y 10 semanas. Barras con letras mayúsculas indican diferencia estadística entre los diferentes tratamientos a las seis semanas, mientras que, letras minúsculas muestran diferencias significativas a las 10 semanas. Los valores representan la mediana de cada grupo y fueron analizados con estadística no paramétrica utilizando la prueba de Kruskal-Wallis con  $p > 0.05$ . Las concentraciones de citocinas fueron determinadas por ensayos inmunoenzimáticos (Ensayos de ELISA).

Estudios previos han reportado que la expresión de genes para IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-23A, TG-F- $\beta$ , y STAT3 están involucrados en la diferenciación de las células Th17 en los modelos de inflamación inducidos con DSS (Ogawa et al., 2004). Además, las células Th17 requieren citocinas específicas como IL-23, la cual media la expansión de IL-17, mientras que, bajos niveles de IFN- $\gamma$  o IFN- $\alpha$  pueden incrementar la expresión de la misma (Liu et al., 2009).

Los hallazgos reportados en la presente investigación mostraron la presencia de IL-17 e IFN- $\gamma$  para el grupo administrado con DSS, pero IL-23 no fue detectado, (dato no mostrado) al menos por el tipo de método utilizado para la detección de estas citocinas que fue mediante ensayos de ELISA, que muestra una menor sensibilidad para la detección de citocinas en comparación con la determinación por la citometría de flujo. Estos resultados podrían indicar que posiblemente la citocina IL-23 fue requerida para la generación y diferenciación de IL-17, como algunos estudios lo han mencionado (Feng et al., 2011; Korn et al., 2009)

La determinación de IL-6 se presentó en mayor concentración en grupo con DSS, pero, la administración de los diferentes tipos de leche, tanto fermentada-pos-fermentación y fermentada, presentaron ( $p > 0.05$ ) menor concentración, únicamente a las 6 semanas de estudio (**Figura 11A**). Contrario a esto, se observó que, a las 10 semanas, hubo un incremento de esta citocina, aunque no se presentaron diferencia estadística entre los grupos con leche fermentada y el grupo DSS. Sin embargo, si se puede observar que los grupos que recibieron LFJ20 y LFJ28 mostraron potencial a disminuir esta concentración.



**Figura 11.** Concentración de IL-6 (A) y TNF- $\alpha$  (B) en muestras de suero por efecto de la administración de DSS y leche fermentada a las seis y 10 semanas. Barras con letras mayúsculas indican diferencia estadística entre los diferentes tratamientos a las seis semanas, mientras que, letras minúsculas indican diferencia estadística a las 10 semanas. Los valores corresponden a la mediana de n=5 y fueron analizados aplicando la técnica de Kruskal-Wallis. Las concentraciones de las citocinas fueron determinadas por citometría de flujo. ND=No detectado.

Para la cuantificación de TNF- $\alpha$  (**Figura 11B**), los resultados no mostraron diferencia significativa entre los grupos con leche fermentada y DSS a las seis semanas del estudio. Sin embargo, encontramos que a las 10 semanas de administración el grupo con DSS incrementó la concentración y fue similar a lo obtenido por la administración de LA, LFJ28, pero el grupo con PLFJ20 mostró la menor concentración ( $p < 0.05$ ), siendo similar a lo cuantificado a las seis semanas. En base a estos resultados, podemos observar que la administración de PLFJ20 mostró mejor efecto en disminuir la respuesta Th1, considerando las dos citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$ .

IL-6 juega un papel importante durante los procesos de inflamación ya que se produce en respuesta a infecciones y lesión de tejido, contribuye al mecanismo de defensa a través de la estimulación de respuesta de fase aguda, aunque su expresión es estrictamente controlada por mecanismos transcripcionales y pos-transcripcionales, síntesis irregular de IL-6 tiene efectos patológicos sobre procesos de inflamación crónica y procesos autoinmunes (Tanaka et al., 2014).

En base a estos resultados encontramos que la administración de LFJ20 y LFJ28 puede modular la síntesis de IL-6. En cambio, TNF- $\alpha$ , ha sido bien descrito en las EII, donde la interacción contra antígenos lumenales y bacterias comensales generan una excesiva respuesta anti-inflamatoria a nivel de mucosa intestinal y la ausencia de TNF- $\alpha$  puede conllevar a disminuir la respuesta inflamatoria (Fujino et al. 2003). Además, TNF- $\alpha$  induce otras citocinas pro-inflamatorias como IL-1 e IL-6, incrementa la expresión de moléculas de adhesión, además, de inducir proteínas de fase aguda y metaloproteínas (Wera et al., 2016).

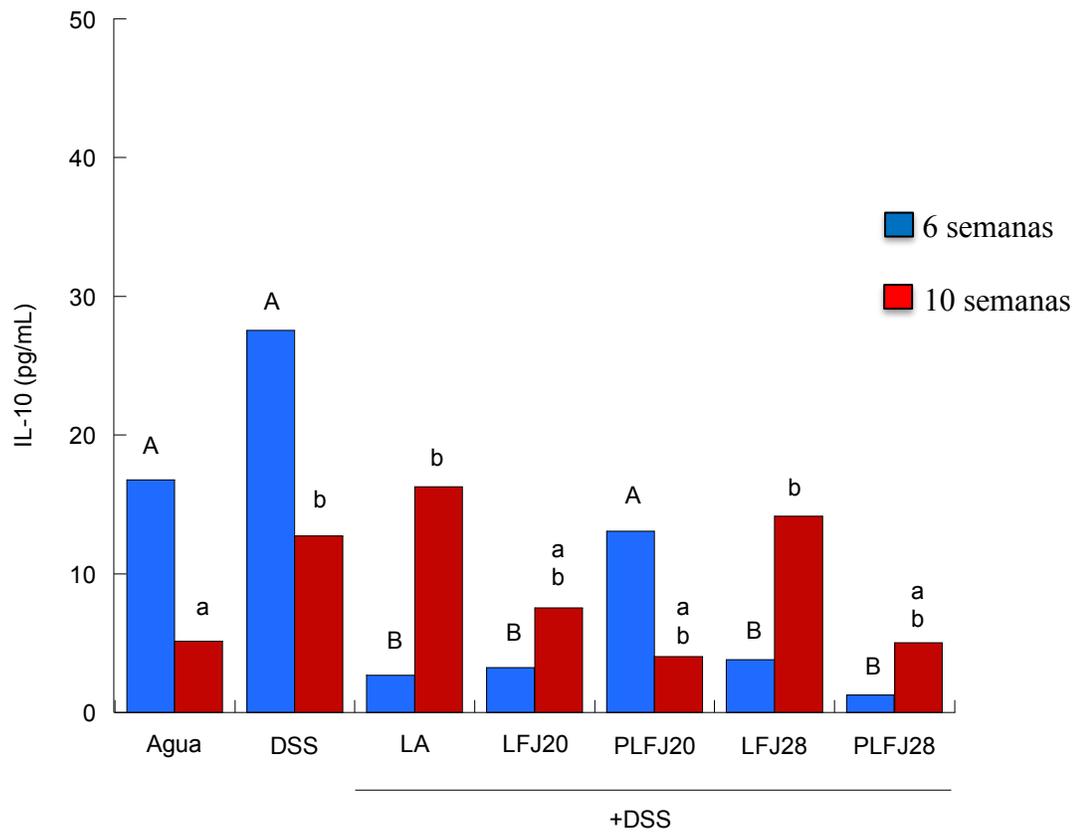
Este efecto que presenta TNF- $\alpha$  puede estar correlacionado con los resultados que se presentaron a las 10 semanas del estudio, donde se incrementó IL-6 y TNF- $\alpha$ , pero no para el caso de PLFJ20, lo cual nos indica mayor potencial de esta leche fermentada en atenuar los procesos inflamatorios.

Las concentraciones de estas dos citocinas fueron determinadas a niveles séricos y de acuerdo a la sensibilidad del método de detección, método de CBA, permitió cuantificar estas dos citocinas que se presentan, principalmente como respuesta de fase aguda, pudiendo sugerir que la respuesta en nuestro estudio, se presentó en menor grado a lo esperado en un proceso de inflamación crónica, como otros estudios han reportado.

Estas dos citocinas son de gran importancia en los procesos inflamatorios y se producen principalmente por la activación de monocitos y macrófagos, donde estas células juegan un papel importante en los procesos de atenuación de la inflamación a nivel de mucosa intestinal (Bobin-Dubigeon et al., 2001). Por consecuente, una baja expresión o concentración de estas citocinas podría indicar el potencial que ofrecen las leches fermentadas a disminuir los procesos inflamatorios al inactivar las principales rutas de respuesta inflamatoria; como es el caso de TNF- $\alpha$  (Dai et al., 2013).

La citocina IL-10, conocida como de respuesta Th2 o con efecto regulador, mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para los grupos que fueron administrados con PLFJ20 y LFJ28 quienes presentaron la mayor concentración a las seis y 10 semanas, respectivamente, al igual que LA (**Figura 12**). IL-10 ha sido de gran interés a nivel terapéutico, debido a que estudios con animales han demostrado que la ausencia de esta citocina incrementa los efectos de la inflamación, como los modelos de estudio en ratones IL-10<sup>-/-</sup> (Sydora et al., 2003). Sin embargo, en nuestro estudio, el grupo que recibió DSS mostró la mayor concentración de IL-10, en comparación con los grupos que recibieron los diferentes tipos de leche. Una posible explicación podría ser, que al presentarse una alta concentración de citocinas inflamatorias como IL-17, se incrementó IL-10 para contrarrestar la respuesta a la inflamación (Alex et al., 2009).

La presencia de IL-10 suprime la producción de citocinas pro-inflamatorias, que concuerda con lo reportado a las seis semanas del estudio. Sin embargo, encontramos que la administración de LF presentó menor concentración de IL-10, lo cual podría corresponder a que existió un proceso de regulación. La ruta de activación de IL-10 es la activación de STAT3, el cual regula la expresión de SOCS y citocinas pro-inflamatorias como TNF  $\alpha$  y MIP-2 (Jones-Hall & Grisham 2014).



**Figura 12.** Concentración de IL-10 en muestras de suero por efecto de la administración de DSS y leche fermentada a las seis y 10 semanas. Barras con letras mayúsculas indican diferencia estadística entre los diferentes tratamientos a las seis semanas, mientras que, letras minúsculas indican diferencia estadística a las 10 semanas. Los valores corresponden a la mediana de n=5 y fueron analizados aplicando la técnica de Kruskal-Wallis. Las concentraciones de citocinas fueron determinadas por citometría de flujo.

Los resultados obtenidos en la presente investigación difieren con lo reportado con otros estudios, donde la administración de la mezcla de probióticos VSL#3 disminuye la concentración de citocinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 e incrementa IL-10 en muestras de suero, lo cual se puede atribuir a la activación de la ruta específica PI3k/Akt y activación del factor de transcripción NF-kB (Dai et al., 2013). Diversos estudios han mencionado que los diferentes metabolitos derivados de la fermentación podrían ser los responsables de generar el efecto anti-inflamatorio, por ejemplo, en el estudio reportado por (Yoda et al., 2014), las proteínas p40 y p75, las cuales derivan durante el proceso de fermentación en leche por *Lactobacillus rhamnosus* GG bloquean la respuesta de señalización de EGFR kinasa y con ello disminuyen la respuesta inflamatoria. Además, el efecto inmunoprotector de un producto lácteo fermentado (Dahi) con *Lactobacillus acidophilus* LaVK2 y *Bifidobacterium bifidum* BbVK3 en un modelo de inflamación con DSS reducen significativamente IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en muestras de colon (Jadhav et al., 2012).

Se ha documentado que los metabolitos derivados de la fermentación tienen respuesta anti-inflamatoria, las bacterias probióticas viables y no viables también pueden ejercer dicho efecto. Una posible ruta es a través de la internalización de las bacterias hacia las células M, localizadas a nivel de intestino delgado, donde se genera una interacción entre las células dendríticas y conlleva a disminuir la concentración de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$  (Kumar et al., 2008). Además, la liberación de péptidos durante el proceso de fermentación, regulan la respuesta inflamatoria a través de la ruta NF-kB, en un modelo de inflamación con LPS (Haversen et al., 2002).

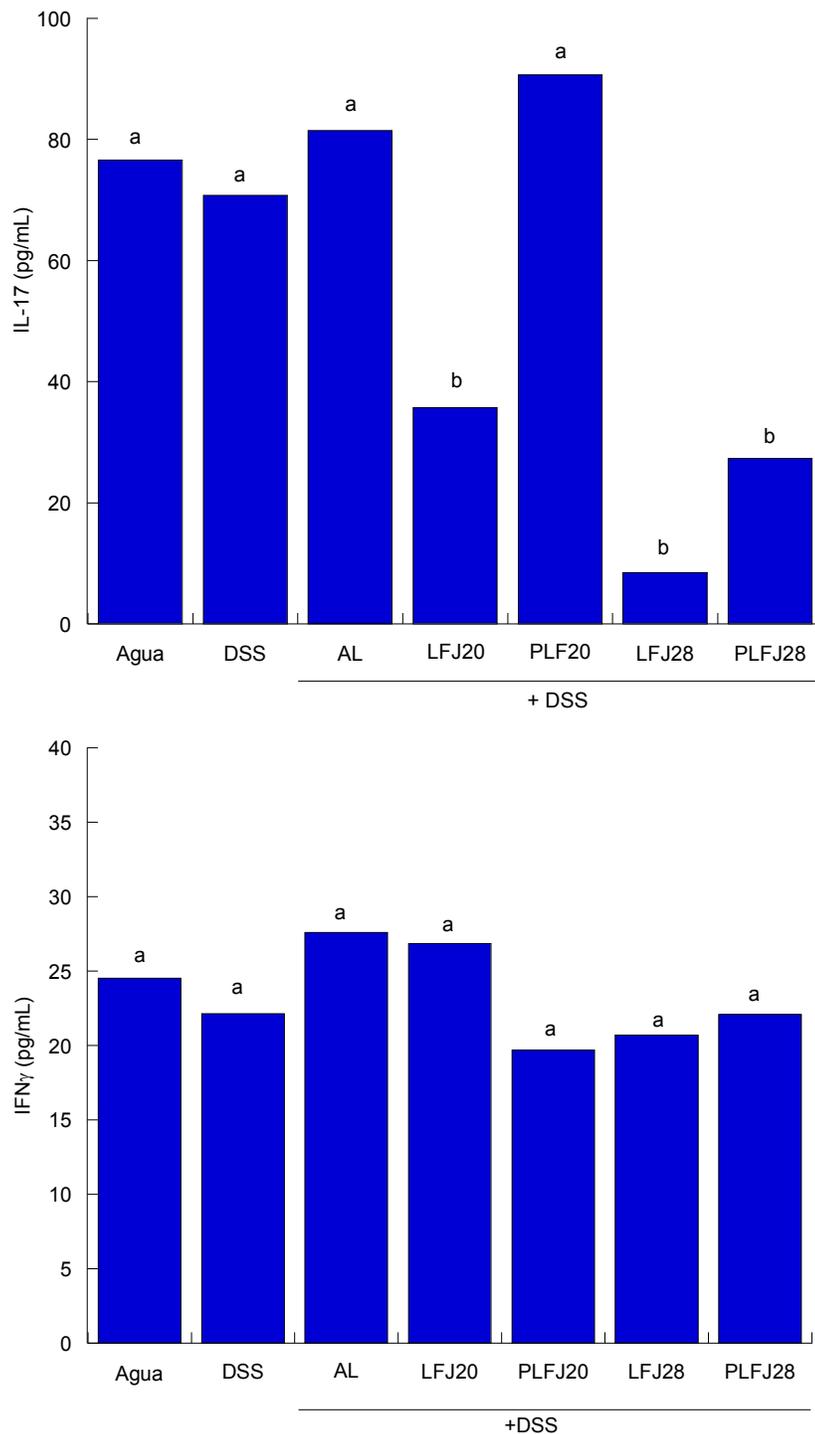
El ácido láctico que se produce durante la fermentación de la leche, de acuerdo a algunos estudios, ejercen un efecto en la respuesta inmunológica, debido a que la presencia de este ácido orgánico acidifica el ambiente intestinal, y se ejercen cambios en la microbiota. Además, la presencia del ácido láctico inhibe la ruta de señalización a través de NF-kB en un modelo de inflamación con LPS (Kellum et al., 2004).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, mostraron que los grupos que fueron administrados con leche acidificada no disminuyeron la concentración de citocinas pro-inflamatorias a las seis y 10 semanas en comparación con la leche fermentada, con excepción de la citocina IL-17 donde se disminuye la concentración siendo estadísticamente igual a LF y LFP-J20.

La determinación de IL-17 e IFN- $\gamma$ , como principales citocinas de respuesta Th1/Th17, fueron determinadas en muestras de mucosa a las seis y 10 semanas (**Figura 13**). Los resultados mostraron, para el caso de IL-17 que los grupos administrados con LFJ20, LFJ28 y PLJ28 mostraron menor concentración ( $p < 0.05$ ), siendo LFJ28 la que presentó la menor concentración. Sin embargo, no se mostró diferencia significativa en las concentraciones de IFN- $\gamma$ , entre los diferentes grupos. Aunque no se mostró diferencia significativa, encontramos que PLFJ20, LFJ28 y PLFJ28 tienden a presentar menor concentración de IFN- $\gamma$ , siendo también, las leches que presentaron menor concentración de IL-17.

Dentro de las posibles variables que pueden modificar estos resultados, es el tamaño de muestra, y las variaciones que existieron entre los diferentes animales de estudio. Por otro lado, se determinó la concentración de IL-22 e IL-23 a nivel de mucosa, ya que la presencia o ausencia nos podría indicar el efecto sobre la proliferación y diferenciación de las células Th17, sin embargo, no se detectaron niveles apreciables de IL-22 e IL-23 a nivel de mucosa (datos no mostrados). Estos resultados son contradictorios a los reportados por Jadhay et al. (2012), quien encontró menor concentración de las citocinas IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en muestras de mucosa intestinal, en los grupos que fueron administrados con un producto lácteo fermentado en comparación con el grupo DSS.

Con los resultados obtenidos en nuestro estudio, nos permite determinar que el mecanismo de inflamación es mucho más complejo, y que no únicamente las citocinas se encuentran involucradas. En un estudio se reportó que las prostaglandinas tienen un papel importante en el mecanismo de regulación de la respuesta inflamatoria, y que puede promover la presencia de IL-23, en un modelo de inflamación sistémico con LPS y TNBS (Sheibanie et al. 2007).



**Figura 13.** Concentración de IL-17 e IFN- $\gamma$  en muestras de mucosa de intestino grueso por efecto de la administración de DSS y leche fermentada a las 10 semanas. Letras diferentes muestran diferencia significativa entre tratamientos. Los valores corresponden a la mediana de n=5 y fueron analizados aplicando la técnica de Kruskal-Wallis. Las concentraciones de citocinas fueron determinadas por ensayos inmunoenzimáticos (Ensayos de ELISA).

Los posibles mecanismos que se han atribuido a las bacterias con respecto a disminuir los procesos inflamatorios es inhibiendo el factor de transcripción NF- $\kappa$ B a través de la ruta de señalización PI3K/Akt (Martelli et al., 2006; Priulla et al., 2007). Se ha documentado que cepas de *Lactobacillus* spp. tienen la capacidad de activar la ruta de señalización de las citocinas (SOCS) e incrementar la expresión de SOCS-2 y SOCS-3, la cual es mediada a través de las rutas de fosforilación y activación de los factores STAT1 y STAT3 inhibiendo la fosforilación de las kinasas (JAK) que inhibe la señalización de SOCS-2/SOCS3 (Lee et al., 2010).

Los péptidos derivados de la fermentación, por otro lado, aunque no se han establecido claramente sus mecanismos anti-inflamatorios, podrían tener una participación importante. Por ejemplo, en otros estudios, se evaluó el efecto anti-inflamatorio del tri-péptido (Val-Pro-Tir) de soya, al disminuir la severidad de la colitis y la supresión de citocinas. Este mecanismo de regulación se generó a través de la activación de un transportador de péptido dependiente de protones (h-Pep-T1). El péptido transportador h-Pep-T1 está localizado sobre la superficie de la membrana que produce un gradiente de protones que acelera el transporte de oligopéptidos hacia el borde de cepillo de los enterocitos y de esta forma entrar a circulación (Kovacs-Nolan et al., 2012).

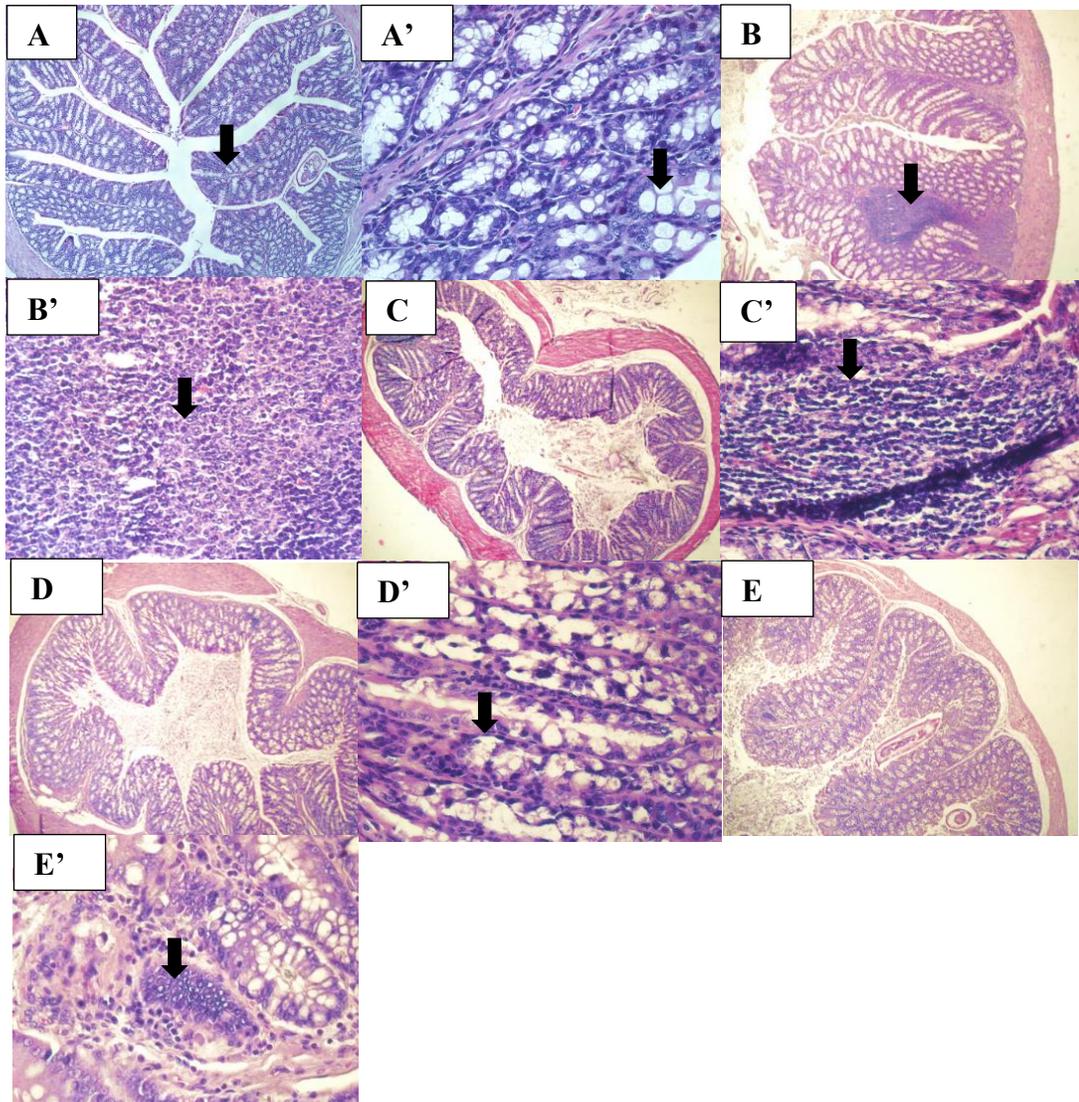
Otro mecanismo de activación que se ha atribuido a los péptidos es activar el receptor de señalización de calcio (CasSR), el cual puede mediar la respuesta anti-inflamatoria al interactuar con amino ácidos L-Trp y L-Val y reducir la concentración de TNF- $\alpha$ , además, L-Trp inhibe la fosforilación de JNK o I $\kappa$ B- $\alpha$  (Mine & Zhang 2015). Estas rutas de activación podrían estar involucrados en los mecanismos de activación para disminuir la respuesta antiinflamatoria, sin embargo, no ha sido reportado que rutas de señalización en la respuesta Th17 se pueden inhibir por la presencia de algunos de los compuestos presentes en la leche fermentada.

Nuestros resultados demostraron que existe un proceso de regulación de la respuesta a las seis semanas del estudio, además, el efecto se puede ejercer aun cuando la bacteria se encuentra inactiva, lo cual nos puede sugerir que los componentes de la bacteria juegan un papel importante como inhibidores de la respuesta, aunque en nuestro estudio no se consideró el evaluar únicamente a la bacteria no viable, encontramos que el grupo administrado con la leche fermentada pasteurizada muestra un efecto mayor o similar que cuando la leche contenía a la bacteria viable.

### 6.5. Análisis Histológico de Muestras de Intestino Grueso

Basado en las características establecidas sobre al análisis de muestras histológicas, las características se analizaron considerando la estructura de la mucosa, infiltración celular hacia la mucosa y submucosa.

En la **Figura 14A** (10x) se muestra el corte de intestino grueso de un animal sano, donde se observa la estructura completa del intestino grueso, y en la **Figura 14A'** (20x) se observa la estructura normal y la presencia de las células goblet, sin presentar infiltración hacia la mucosa y submucosa. En la **Figura 14B**, se muestra la estructura de intestino grueso que recibió DSS donde se observó una ligera acumulación e incremento en el tamaño de los ganglios, lo cual se puede observar con más detalle en la **Figura 14B'** (20x), aunque no se identificaron los tipos de células, pero de acuerdo con estudios previos, se puede tener una infiltración de neutrófilos, principalmente. Por otro lado, el grupo que recibió LFJ20 mostró, de igual forma, una ligera acumulación de células hacia la estructura del epitelio (**Figura 14D'**), mismo caso se presentó en el grupo que recibió LFJ28. De manera general, en ninguno de los tratamientos se mostró un daño marcado a nivel de mucosa, se observaron pequeñas infiltraciones celulares hacia la mucosa, o destrucción de la arquitectura de la mucosa.



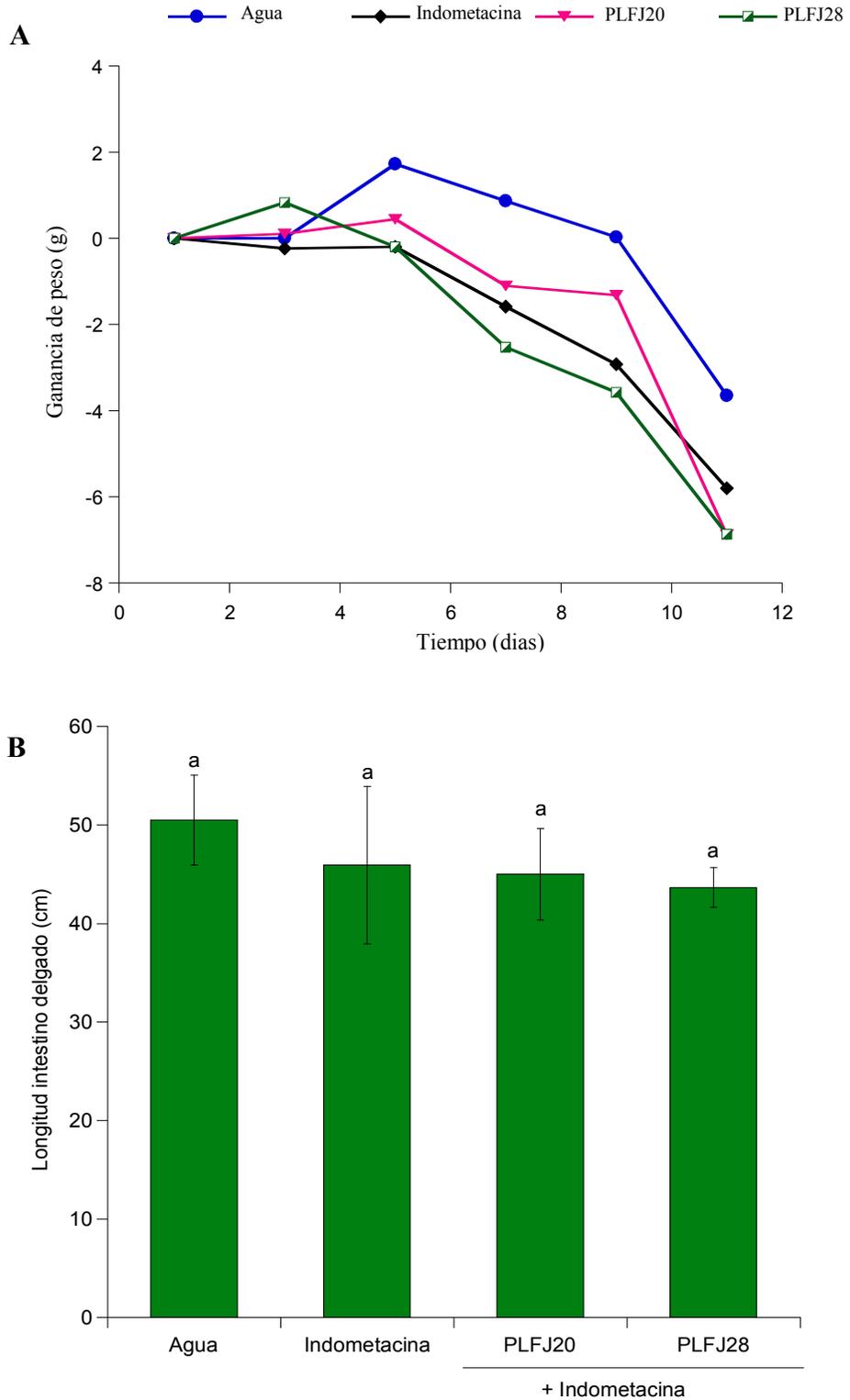
**Figura 14.** Análisis histológico de secciones transversales de muestras de tejido de colon (x10) teñidas con hematoxilina-eosina. A y A') grupo con agua, B y B') grupo con DSS, C y C') grupo con LA, D y D') grupo con LFJ20, E y E') grupo con LFJ28.

Nuestros resultados difieren a lo reportado por otros estudios, donde se observa un mayor grado de daño a nivel de mucosa, infiltración celular y destrucción de la arquitectura de las criptas, utilizando la misma concentración de DSS (3 %), y a un menor tiempo de exposición ( Geboes 2003; Erben et al., 2014). Otro estudio mostró que el efecto del DSS a una concentración de 3 %, como se utilizó en nuestro estudio, mostró erosión y un incremento de infiltración celular como linfocitos, neutrófilos, macrófagos, los cuales se expanden hacia la submucosa (Rose et al., 2012; Dai et al., 2013).

#### 6.6. Efecto por la Inducción de Indometacina y Leche Fermentada

Los efectos negativos que se muestran por la inducción de inflamación con indometacina, se ha demostrado que muestra ulceración a nivel de intestino delgado. El mecanismo de acción, podría ser atribuido por un incremento de la permeabilidad, reducción de la superficie de la mucosa, acompañado por un incremento de la motilidad intestinal. Estos cambios permiten la entrada de sustancias lumenales, como ácidos biliares y bacterias intestinales, permitiendo el acceso hacia la mucosa, lo que conlleva a la infiltración de neutrófilos, y la regulación de citocinas inflamatorias y la producción de ERO (Yamada et al., 2011a; Iwai et al., 2009).

En estudios con ratas se encontró que la inducción de inflamación con indometacina a una dosis de 15 mg/kg de peso corporal causa daños desde duodeno hasta íleon. Los daños fueron observados en las primeras 6 h incrementando hasta las 72 h mostrando efectos como úlceras, peritonitis y causar la muerte de los animales (Fang et al., 1977). Estos resultados concuerdan con lo obtenido en nuestro estudio, donde después de la tercera administración de indometacina a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal, los ratones comenzaron a perder peso y se tuvo la muerte de tres ratones en el grupo que fue administrado con indometacina y el grupo administrado con PLFJ20 + indometacina (**Figura 15A**).



**Figura 15.** Efecto de la indometacina y administración de leche fermentada sobre la ganancia de peso (A) y longitud del intestino delgado (B) a los 15 días de estudio. Letras diferentes mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS. Se realizó una comparación de medias por la técnica de Tukey-kramer.

Por otro lado, como la indometacina afecta principalmente a nivel de intestino delgado, se evaluó la longitud intestinal, pero no se observó diferencia significativa entre los grupos tratados con respecto al grupo control (**Figura 15B**).

Por otro lado, aunque no se mostró diferencia significativa ( $p>0.05$ ) en el peso de los órganos, el bazo, que es un órgano principal para la respuesta inmunológica mostró el peso más alto al igual que el grupo administrado con PLFJ20. Este mismo comportamiento se observó para el peso de hígado y riñones, aunque no son órganos de respuesta inmunológica, algunos estudios han demostrado que, durante el proceso de inflamación, órganos secundarios se pueden ver afectados (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Peso de los órganos después del proceso de inducción de inflamación con indometacina y de la administración de leche fermentada.

	Peso (mg)		
	Bazo	Riñones	Hígado
<b>Agua</b>	140.00 ± 97.64 <sup>a</sup>	452.50 ± 92.15 <sup>a</sup>	1580 ± 313.79 <sup>a</sup>
<b>Indometacina</b>	<b>288.00 ± 274.08<sup>a</sup></b>	500.00 ± 352.35 <sup>a</sup>	1764 ± 1045.12 <sup>a</sup>
<b>PLFJ20</b>	294.00 ± 74.03 <sup>a</sup>	652.00 ± 99.85 <sup>a</sup>	2318 ± 363.00 <sup>a</sup>
<b>PLFJ28</b>	116.00 ± 131.78 <sup>a</sup>	545.00 ± 366.65 <sup>a</sup>	1274 ± 1146.00 <sup>a</sup>

Los valores representan la media ± DS. Letras diferentes en una misma columna muestran diferencia significativa entre tratamientos.

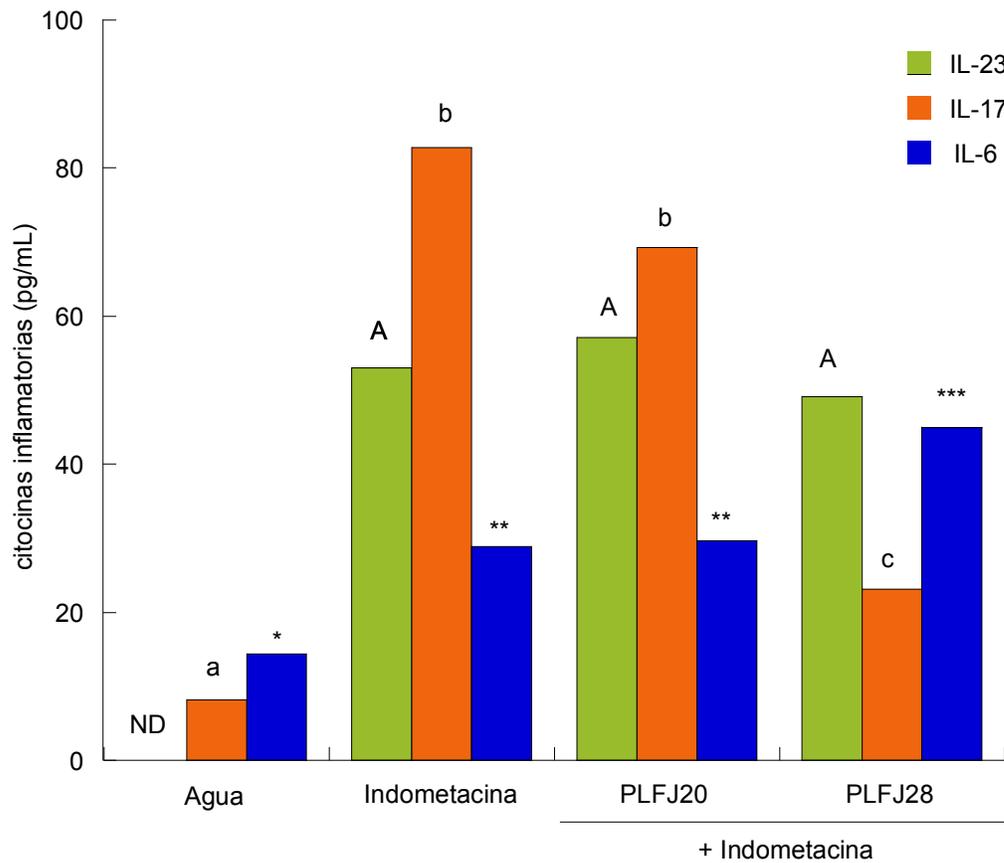
### 6.6.1. Respuesta en el Perfil de Citocinas en el Modelo de Inflamación Aguda

Se cuantificaron las citocinas IL-23, IL-17 e IL-6 en muestras de suero (**Figura 16**). Los resultados demostraron una mayor concentración para IL-23 en los tres grupos que recibieron indometacina, sin diferencias significativas entre los grupos alimentados con leche fermentada y agua ( $p>0.05$ ). Por otro lado, IL-17 se incrementó en todos los grupos que recibieron indometacina comparada con el grupo con agua. Además, se observó una

reducción significativa en la producción de IL-17 en el grupo que recibió PLFJ28. Además, se observó un incremento en la concentración de IL-6 pero no se observaron diferencias significativas entre estos grupos, por el contrario, en el grupo PLFJ28 incrementó los niveles de IL-6. No se presentaron cambios significativos ( $p > 0.05$ ) en la concentración de las citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (**Tabla 5**) a nivel sistémico.

Un estudio demostró que la administración de indometacina induce ulceración en intestino delgado, además de incrementar células productoras de IL-17A+, el cual fue observado principalmente en células mononucleares de lamina propia de mucosa y submucosa (Yamada et al., 2011). La lesión intestinal inducida por indometacina conlleva a que el proceso de inflamación puede estar mediado por una acumulación de neutrófilos. Aunque en nuestro estudio no fue determinado este parámetro, otros estudios demuestran un incremento de esta actividad después de un proceso de inducción de inflamación con indometacina (Evans & Whittle 2003; Hatazawa et al., 2006). Además, ratones con deficiencia de IL-17A inhibieron la infiltración de neutrófilos (Watanabe et al., 2009a), por lo que la deficiencia o regulación de ésta citocina podría considerarse como un factor de estudio para disminuir los procesos de inflamación.

El papel de IL-17 en los procesos de inflamación a nivel gastrointestinal es contradictorio, algunos estudios demuestran el papel que juega esta citocina, sin embargo, otros mencionan que IL-17 puede funcionar como anti-inflamatorio. Estos efectos contrastantes han sido evaluados en modelos con DSS y gastritis inducida por *Helicobacter pylori* (Ito et al., 2008; Ogawa et al., 2004). Pero aún existen pocos estudios que han reportado el papel de papel de esta citocina en modelos de inflamación con indometacina. Un estudio reportado de Yamada et al. (2011) comprobaron que al inhibir IL-17 se disminuyen los parámetros de inflamación, debido a que se genera un incremento de quimiocinas como KC y MCP-1, además de un incremento de las citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6.



**Figura 16.** Efecto de indometacina y leche fermentada sobre la concentración de citocinas IL-23, IL-17, IL-6 en muestras de suero a 15 días de tratamiento. Los valores corresponden a la mediana. Las concentraciones de citocinas fueron determinadas por ensayos inmunoenzimáticos (Ensayos de ELISA). ND=No detectado. Letras minúsculas representan diferencia estadística para IL-23 entre cada grupo; letras mayúsculas muestran diferencia estadística entre grupos para IL-17; \*\*\* representan diferencia estadística para IL-6 entre los diferentes grupos de estudio.

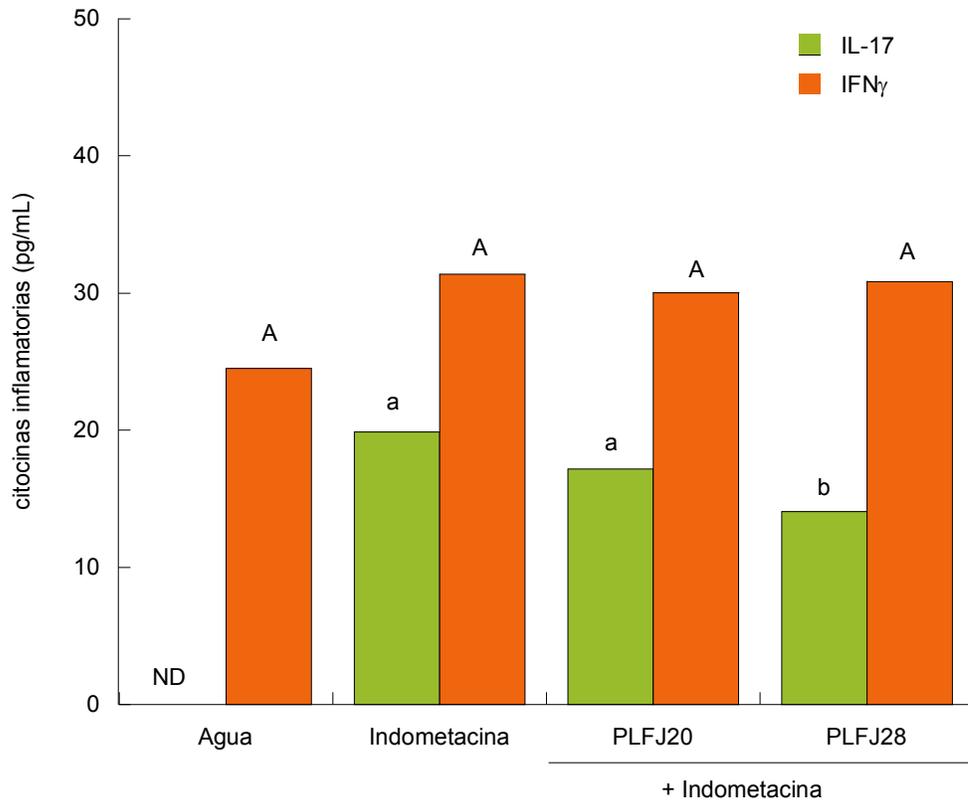
Los resultados de citocinas en muestras de mucosa intestinal mostraron que el grupo con PLFJ28 presentó la menor concentración IL-17 ( $p < 0.05$ ), mientras que, IFN- $\gamma$  no mostró cambios significativos ( $p > 0.05$ ) (**Figura 17**).

**Tabla 5.** Efecto de la administración de indometacina y leche fermentada sobre la concentración de citocinas antiinflamatorias y pro-inflamatorias a nivel sistémico.

Tratamiento	IL-2	IL-4	IL-10	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$
Concentración (pg/mL)					
Agua	6.78 <sup>a</sup>	3.60 <sup>a</sup>	5.13 <sup>a</sup>	5.79 <sup>a</sup>	6.33 <sup>a</sup>
Indometacina	4.33 <sup>a</sup>	5.83 <sup>a</sup>	3.51 <sup>a</sup>	4.67 <sup>a</sup>	3.47 <sup>a</sup>
PLFJ20	4.76 <sup>a</sup>	5.67 <sup>a</sup>	3.48 <sup>a</sup>	4.50 <sup>a</sup>	3.38 <sup>a</sup>
PLFJ28	5.18 <sup>a</sup>	5.49 <sup>a</sup>	3.17 <sup>a</sup>	2.5 <sup>a</sup>	4.37 <sup>a</sup>

Los valores representan la mediana de cada grupo de estudio. Las concentraciones fueron determinadas por citometría de flujo.

De acuerdo con estos resultados, se mostró un mayor efecto de inflamación por la inducción con indometacina en comparación con el modelo crónico y la leche PLFJ28 mostró las menores concentraciones de IL-17. El uso de indometacina como agente inductor de inflamación, ha sido poco explorado, consecuentemente, los mecanismos para inhibir este proceso también han sido menos estudiados. De los estudios que se han documentado, los probióticos han demostrado ser una alternativa al tratamiento contra NSAID. Por ejemplo, en un estudio *in vivo* donde se administró *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium lactis* Bb12 (Bb12) mostraron un incremento en la actividad MPO y en la formación de úlceras en el grupo que recibió *Lactobacillus rhamnosus*, además, se incrementó el porcentaje de proliferación de células T (Kamil et al., 2007).



**Figura 17.** Efecto de la inducción de inflamación y leche fermentada-pasteurizada con indometacina y la respuesta en las citocinas IL-17, IFN- $\gamma$  en muestras de mucosa intestinal. Los valores representan la mediana. Las concentraciones de citocinas fueron determinadas por ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). ND= No detectado. Letras minúsculas representan diferencia estadística para IL-17 entre cada grupo; letras mayúsculas muestran diferencia estadística entre grupos para IFN- $\gamma$ .

El uso del probiótico *Lactobacillus casei* Shirota, así como, el efecto del ácido láctico fue evaluado por Watanabe et al. (2009). Los análisis histológicos demostraron ulceración intestinal con destrucción de la mucosa, necrosis del epitelio e infiltración por células inflamatorias en el grupo testigo (indometacina). Mientras que la administración de *Lactobacillus casei* Shirota a una dosis de  $10^9$  UFC/mL en la primera semana de estudio, disminuyó la actividad de MPO, así como la expresión de iNOS, TNF- $\alpha$ , CINC-2 $\alpha$  (Watanabe et al., 2009). Además, en el ensayo con células THP-1, una concentración de 10 mM de ácido láctico inhibió la producción de TNF- $\alpha$  de manera dosis dependiente, mientras que la presencia de HCl (4.2 mM) no mostró efecto inhibitor. En este estudio, se mostró una posible ruta de inhibición por parte del ácido láctico, a través de la inhibición de la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$ , e inactivar la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B en células THP-1.

Con los resultados obtenidos en el presente estudio, encontramos que la administración de leche fermentada con la cepa J28 mostró mayor potencial a atenuar los efectos como pérdida de peso, además, mostró menor concentración de citocinas inflamatorias. Debido a estos antecedentes y bajo las condiciones del estudio, ésta leche fermentada y los metabolitos derivados de la misma, pueden ser fuente de mayores estudios y ser considerado con mayor potencial a disminuir los efectos de los procesos inflamatorios a nivel intestinal.

## 7. CONCLUSIONES

La administración de leche fermentada con *Lactobacillus fermentum* PLFJ20 y PLFJ28 disminuyeron las citocinas IFN- $\gamma$  e IL-17 de manera sistémica y en mucosa. Mientras que la leche fermentada con J20 disminuyó la concentración de IL-17 solamente a nivel sistémico. Con los resultados obtenidos podemos destacar que el efecto obtenido por la administración de las leches fermentadas es cepa dependiente, tanto de bacterias viables como no viables, y que los metabolitos liberados durante el proceso de fermentación también podrían actuar para disminuir la concentración de citocinas inflamatorias.

Con base a los hallazgos obtenidos, son necesarios más estudios que permiten ampliar y establecer los posibles mecanismos y rutas de activación de la respuesta Th17 a través de la interacción tanto de los componentes de la leche fermentada como de las bacterias.

## 8. REFERENCIAS

- Aden, K. Rehman, A. Fal-Paulsen, M. Secher, T. Kuiper, J. Tran, F. Pfeuffer, S. Sheibani-Tezerji, R. Breuer, A. Luzius, A. Jentzch, M. Hasler, R. Billmann-Born, S. Will, O. Lipinski, S. Bharti, R. Adolph, T. Iovanna, J.L. Kempster, S.L. Blumberg, R.S. Schreiber, S. Becher, B. Chamaillard, M. Kaser, A. Rosenstiel, P. (2016). Epithelial IL-23R Signaling Licenses Protective IL-22 Responses in Intestinal Inflammation. *Cell Reports*, 16(8), 2208–2218.
- Alex, P. Zachos, N.C. Nguyen, T. Gonzales, L. Chen, T.E. Conklin, L.S. Centola, M. Li, X. (2009). Distinct cytokines patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-Induced Colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(3), 341–352.
- de Almada, C.N. Almada, C.N. Martinez, R.C.R. Sant'Ana, A.S. (2016). Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 58, 96–114.
- Amit-Romach, E., Uni, Z. & Reifen, R., (2008). Therapeutic potential of two probiotics in inflammatory bowel disease as observed in the trinitrobenzene sulfonic acid model of colitis. *Diseases of the Colon and Rectum*, 51(12), 1828–1836.
- Ashley N.T. Weil, Z.M. Nelson, R.J. (2012). Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and systematics*, 43, 385–406.
- Becker, C. Wirtz, S. Bleesing, M. Pirhonen, J. Strand, D. Bechthold, O. Frick, J. Galle, P.R. Autenrieth, I. Neurath, M.F. (2003). Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 112, 693–706.
- Bertolini, A., Ottani, A., Sandrini, M., (2001). Dual acting anti-inflammatory drugs: A reappraisal. *Pharmacological Research*, 44, 437–450.

- Bibiloni, R. Fedorak, R.N. Tannock, G.W. Madsen, K.L. Gionchetti, P. Campieri, M. De Simone, C. Sartor, R.B. (2005). VSL#3 probiotic- mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *The American Journal Gastroenterology* 100(7), 1539–1546.
- Bobin-Dubigeon, C. Collin, X. Grimaud, N.. Robert, J.M. Le Baut, G. Petit, J.Y. (2001). Effects of tumour necrosis factor-alpha synthesis inhibitors on rat trinitrobenzene sulphonic acid-induced chronic colitis. *European Journal of Pharmacology*, 431, 103–110.
- Boza-Mendez E, Lopez-Calvo R and Cortes-Muñoz M (2012) Innovative dairy products development using probiotics: Challenges and Limitations. In: Rigobelo E. (ed), pp 213-226, Probiotics. InTech.
- Calder, P.C. Ahluwalia, N. Albers, R. Bosco, N. Bourdet-Sicard, R. Haller, D. Holgate, S.T. Jonsson, L.S. Latulippe, M.E. Marcs, A. Moreines, J. M'Rini, C. Pawelec, G. van Neerven, R.J. Watzi, B. Zhao, J. (2013). A Consideration of Biomarkers to be used for Evaluation of Inflammation in Human Nutritional Studies. *The British Journal of Nutrition*. 109, 1:S1-34.
- Calder, P.C. Ahluwalia, N. Brouns, F. Buetler, T. Clement, K. Cunningham, K. Esposito, K. Jonsson, L.S. Kolb, H. Lansink, M. Marcos, A. Margioris, A. Matusheski, N. Nordmann, H. O'Brien, J. Pugliese, G. Rizkalla, S. Schalwijk, C. Tuomilehto, J. Warnberg, J. Watzl, B. Winklhofer-Roob, B.M. (2011). Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *British Journal of Nutrition*, 106, S1–S78.
- Calder, P.C. Albers, R. Antonie, J.M. Blum, S. Bourdet-Sicard, R. Ferns, G.A. Folkerts, G. Friedmann, P.S. Frost, G.S. Guarner, F. Lovik, M. Macfarlane, S. Meyer, P.D. M'Rabet, L. Serafini, M. van Eden, W. van Loo J. Vas Dias, W. Vidry, S. Winklhofer-Roob, B.M. Zhao, J. (2009). Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *British Journal of Nutrition*, 101, 1, S1–45.

- Chapman, T.M. Plosker, G.L. Figgitt, D.P. (2006). VSL#3 probiotic mixture: a review of its use in chronic inflammatory bowel diseases. *Drugs*, 66(10), 1371–1387.
- Chami, B. Yeung, A.W.S. van Vreden, C. King, N.J.C. Bao, S. (2014). The Role of CXCR3 in DSS-Induced Colitis. *PLoS ONE*, 9, p.e101622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101>.
- Chassaing, B. Aitken, J.D. Malleshappa, M. Vijay-Kumar, M. (2015). Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in mice. *Current Protocols Immunology*, 104, 15–25.
- Chen, Y. Chou, K. Fuchs, E. Havran, W.L. Boismenu, R. (2002). Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta t cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 14338–14343.
- Chiba, Y. Shida, K. Nagata, S. Wada, M. Bian, L. Wang, C. Shimizu, T. Yamashiro, Y. Kiyoshima-Shibata, J. Nanno, M. Nomoto, K. (2010). Well-controlled proinflammatory cytokine responses of Peyer's patch cells to probiotic *Lactobacillus casei*. *Immunology*, 130(3), 352–362.
- Chichlowski, M. Sharp, J.M. Vanderford, D.A. Myles, M.H. Hale, L.P. (2008). Rodentium Differentially Affect the Severity of Colon Inflammation and Inflammation-Associated Neoplasia in IL10-Deficient Mice. *Comparative medicine*, 58(6), 534–541.
- Ciszek-Lenda, M. Nowak, B. Małgorzata, S. (2011). Immunoregulatory potential of exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* KL37. Effects on the production of inflammatory mediators by mouse macrophages. *International Journal of Experimental pathology*, 92, 382–391.
- Codolo, G. Amedei, A. Steere, A.C. papinutto, E. Cappon, A. Polenghi, A. Benagiano, M. Paccani, S.R. Sambri, V. Del Prete, G. Baldari, C.T. Zanotti, G. montecucco, c. D'Elis, M.M. de Bernard, M. (2008). *Borrelia burgdorferi* NapA-driven Th17 cell inflammation in lyme arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 58, 3609–3617.

- Coombes, J.L. Robinson, N.J. Maloy, K.J. Uhling, H.H. Pwrie, F. (2005). Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol Reviews*, 204, 184–194.
- Cooper, H.S. Murthy, S. Kido, K. Yoshitake, H. Flanigan, A. (2000). Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, b-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis*, 21, 757–768.
- Corfield, A.P. Myerscough, N. Longman, R. Sylvester, P. Arul, S. Pignatelli, M. (2000). Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. *Gut*, 47, 589–594.
- Dai, C. Zheng, c.Q. Meng, F.J. Zhou, Z. Sang, L.X. Jiang, M. (2013). VSL#3 probiotics exerts the anti-inflammatory activity via PI3k/Akt and NF- $\kappa$ B pathway in rat model of DSS-induced colitis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 374(1-2), 1–11.
- Degeest, B. Janssens, B. De Vuyst, L. (2001). Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus sakei* 01: Production kinetics, enzyme activities and EPS yields. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 470–477.
- DeVoss, J. Diehl, L. (2014). Murine models of inflammatory bowel disease (IBD): challenges of modeling human disease. *Toxicologic Pathology*, 42, 99–110.
- Dieleman, L.A. Palmen, M.J. Akol, H. Bloemena, E. Peña, A.S. Meuwissen, S.G. Van Rees, E.P. (1998). Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (dss) is characterized by th1 and th2 cytokines. *Clinical and Experimental Immunology*, 114, 385–391.
- Dubois, M. Gilles, K.A. Hamilton, J.K. Rebers, P.A. Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chemistry*, 28, 350–356.
- Egger, B. Bajaj-Elliot, M. MacDonald, t.T. Inglin, R. Eysselein, V.E. Buchler, M.W. (2000). Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion*, 62, 240–248.

- Erben, U. Loddenkemper, C. Doerfel, K. Spieckermann, S. Haller, D. Heimesaat, M.M. Zeitz, M. Siegmund, B. Kuhl, A.A. (2014). Original Article A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(8), 4557–4576.
- Evans, S. M. Whittle, B. J. (2003). Role of bacteria and inducible nitric oxide synthase activity in the systemic inflammatory microvascular response provoked by indomethacin in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 461, 63–71.
- Fang, W.-F., Broughton, A. Jacobson, E. D. (1977). Indomethacin-induced intestinal inflammation. *The American Journal of Digestive Diseases*, 22, 749–760.
- FAO/WHO. (2001). Report of a Joint FAO/WHO working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
- Feng, T. Qin, H. Wang, L. Benveniste, E.N. Elson, C.O. Cong, Y. (2011). Th17 cells induce colitis and promote Th1 cell responses through IL-17 induction of innate IL-12 and IL-23 production. *Journal of immunology*, 186, 6313–6318.
- Fischer, A. (2008). Human immunodeficiency:connecting STATA3, Th17 and human mucosal immunity. *Immunology and Cell Biology*, 86, 549-551.
- Fredman, G. Serhan, C.N. (2011). Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution. *The Biochemical Journal*, 437, 185–197.
- Fujino, S. Andoh, A. Bamba, S. Ogawa, A. Hata, K. Araki, Y. Bamba, T. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, 52, 65–70.
- Geboes, K. (2003). Histopathology of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. In: *Diagnosis: A clinician's perspective*, capitulo 18, pp. 726–733.
- Geier, M.S. Butler, R.N. Giffard, P. Howarth, G.S. (2007). *Lactobacillus fermentum* BR11, a potential new probiotic, alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats. *International of Food Microbiology*, 114, 267-274.

- Geier, M.S. Smith, C.L. Butler, R.N. Howart, G.S. (2008). Small-intestinal manifestations of dextran sulfate sodium consumption in rats and assessment of the effects of lactobacillus fermentum br11. *Digestive Diseases and Sciences*, 54, 1222–1228.
- Gill, H.S. Grover, S. Batish, V.K. Gill, P. (2009). Immunological effects of Probiotics and their Significance to Human Health. In *Prebiotics and Probiotics Science and Technology* pp 901-948. Springer New York.
- Goldin, B.R. Gorbach S.L. (2008). Clinical indications for probiotics: an overview. *Clinical Infection Diseases*, 46(Suppl 2):S96–100; discussion S144–S151.
- Guandalini, S. Magazzu, G. Chiaro, A. La Balestra, V. Di Nardo, G. Gopalan, S. Sibal, A. Romano, C. Canani, R.B. Lionetti, P. Setty, M. (2010). VSL#3 improves symptoms in children with irritable bowel syndrome: a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *Journal Pediatric Gastroenterology Nutrition*, 51(1), 24–30.
- Guo, X. Jiang, X. Xiao, Y. Zhou, T. Guo, Y. Wang, R. Zhao, Z. Xiao, H. Hu, C. Ma, L. Lin, Y. Lang, X. Feng, J. Chen, G. Shen, B. Han, G. Li, Y. (2014). IL-17A Signaling in Colonic Epithelial Cells Inhibits Pro- Inflammatory Cytokine Production by Enhancing the Activity of ERK and PI3K. *Plos One*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089714>.
- Hatazawa, R. Ohno, R. Tanigami, M. Tanaka, A. Takeuchi, K. (2006). Roles of endogenous prostaglandins and cyclooxygenase isozymes in healing of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318, 691–699.
- Haverson, L. Ohlsson, B.G. Hahn-Zoric, M. Hanson, L.A. Mattsby-Baltzer, I. (2002). Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cellular Immunology*, 220, 83–95.
- Herías, M.V. Koninkx, J.F. Vos, J.G. Huist in't Veld J.H, van Dijk, J.E. (2005). Probiotic effects of Lactobacillus casei on DSS-induced ulcerative colitis in mice. *International Journal of Food Microbiology*, 103(2), 143–155.

- Heller K.J (2001) Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 374S-379S.
- Hidalgo-Cantabrana, C. Sánchez, B. Milani, C. Ventura, M. Margolles, A. Ruas-Madiedo, P. (2014). Genomic Overview and Biological Functions of Exopolysaccharide Biosynthesis in *Bifidobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 9-18.
- Hidalgo-Cantabrana, C. Algeri, F. Rodriguez-Nogales, A. Vezza, T. Martinez-Cambor, P. Margolles, A. Ruas-Madiedo, P, Gálvez, J. (2016). Effect of a Ropy *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Strain Orally Administered on DSS-Induced Colitis Mice Model. *Frontiers microbiology*, 7, 1–11.
- Hidalgo-Cantabrana, C. Sánchez, B. Moine, D. Berger, B. de ls Reyes-Gavilán, C. Geuimode, M. Margolles, A. Ruas-Madiedo, P. (2013). Insights into the ropy phenotype of the expolysaccharide-producing strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* A1dOxR. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 3870–3874.
- Hoffman, W.P. Ness, D.K. van Lier, R.B. (2002). Analysis of rodent growth data in toxicology studies. *Toxicological Sciences*, 66, 313–319.
- Hosono, A. Otani, H. Yasui, H. Watanuki, M. (2002). Impact of fermented milk on human health: Cholesterol-lowering and immunomodulatory properties of fermented milk. *Animal Science Journal*, 71, 241-256.
- Isolauri, E. Kirjavainen, P.V. Salminen, S. (2002). Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut* 50, 54–9.
- Ito, R. Kita, M. Shin-Ya, M. Kishida, T. Takeda, R. Sakagami, J. Imanishi, J. Iwakura, Y. Okanou, T. Yoshikawa, T. kataoka, K. Mazda, O. (2008). Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(1), 12–16.

- Iwai, T. Ichikawa, T. Goso, Y. Ikezawa, T. Saegusa, Y. Okayasu, I. Saigenji, K. Ishihara, K. (2009). Effects of indomethacin on the rat small intestinal mucosa: Immunohistochemical and biochemical studies using anti-mucin monoclonal antibodies. *Journal of Gastroenterology*, 44(4), 277–284.
- Iyer, S.S. Cheng, G. (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*, 32, 23–63.
- Jackson, E.L. Hamlin, P.J. Ford, A.C. (2011). VSL#3 and remission in active ulcerative colitis: larger studies required. *The American Journal of Gastroenterology*, 106(3), 547.
- Jadhav, S.R. Shandilya, U.K. Kansal, V.K. (2012). Immunoprotective Effect of Probiotic Dahi Containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on Dextran Sodium Sulfate-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(1), 21–26.
- Jego, G. Palucka, A.K. Blanck, J.P. Chalouni, C. Pascual, V. Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity*, 19, 225–234.
- Jones-Hall, Y. Grisham, M.B. (2014). Immunopathological characterization of selected mouse models of inflammatory cytokines patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-Induced colitis. *Pathology*, 21, 267–268.
- Jones-Hall, Y.L. Grisham, M.B. (2014). Immunopathological characterization of selected mouse models of inflammatory bowel disease: Comparison to human disease. *Pathophysiology: the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP*, 21, 1–22.
- Kamil, R. Geier, M.S. Butler, R.N. Howarth, G.S. (2007). *Lactobacillus rhamnosus* GG exacerbates intestinal ulceration in a model of indomethacin-induced enteropathy. *Digestive Diseases and Sciences*, 52(5), 1247–1252.

- Kawada, M. Arihiro, A. Mizoguchi, E. (2007). Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human Inflammatory Bowel Disease. *World Journal of Gastroenterology*, 19, 677–682.
- Kellum, J.A. Song, M. Li, J. (2004). Lactic and hydrochloric acids induce different patterns of inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 286, R686–692.
- Kikly, K. Liu, L., Na, S. Sedgwick, J. (2006). The IL-23/Th17 axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 18(6), 670–675.
- Kim, I. Myung, S.J. Do, M.Y. Ryu, Y.M. Kim, M.J. Do, E.J. Park, S. Yoon, S.M. Ye, B.D. Byeon, J.S. Yang, S.K. Kim, J.H. (2010). Western-style diets induce macrophage infiltration and contribute to colitis-associated carcinogenesis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 25, 1785–1794.
- Kim, Y. Oh, S. Yun, H.S. Oh, S. Kim, S.H. (2010). Cell-bound exopolysaccharides from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumor cells. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 123–130.
- Ko, S.J. Bu, Y. Bae, J. Bang, Y. Kim, J. Lee, H. Beom-Joon, L. Hyun, Y.H. Park, J.W. (2014). Protective effects of *Laminaria japonica* with probiotics on murine colitis. Hindawi Publishing Corporation.
- Korn, T. Bettelli, E. Oukka, M. Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review Immunology*, 27, 485–517.
- Kovacs-Nolan, J. Zhang, H. Ibuki, M. Nakamori, T. Yoshiura, K. Turner, P.V. Matsui, T. Mine, Y. (2012). The PepT1-transportable soy tripeptide VPY reduces intestinal inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1820(11), 1753–1763.

- Kumar, N.S.N. Balamurugan, R. Jayakanthan, K. Pulimood, A. Pugazhendhi, S. Ramakrishna, B.S. (2008). Probiotic administration alters the gut flora and attenuates colitis in mice administered dextran sodium sulfate. *Gastroenterology*, 23, 1834–1830.
- Laroui, H. Ingersoll, S.A. Baker, M.T. Ayyadurai, S. Charania, m.A. Laroui, F. Yan, Y. Sitaraman, S.V. (2012). Dextran sodium sulfate (dss) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. *PLoS ONE*, 7(3). doi: 10.1371/journal.pone.0032084.
- Lee, H.S. Han, S.Y. Bae, E.A. Huh, C.H.S. Ahn, Y.T. Lee, J.H. Kim, D.H. (2008). Lactic acid bacteria inhibit proinflammatory cytokine expression and bacterial glycosaminoglycan degradation activity in dextran sulfate sodium-induced colitic mice. *International Immunopharmacology*, 8, 574-580.
- Lee, J.S. Paek, N.S. Kwon, O.S. Hahm, K.B. (2010). Anti-inflammatory actions of probiotics through activating suppressor of cytokine signaling (SOCS) expression and signaling in Helicobacter pylori infection: a novel mechanism. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 25, 194–202.
- Leeber, S. Ceuppens, J. Geboes, K. Van Assche, G. Rutgeerts, P. Vanderleyden, J. De Keersmaecker, S. (2007). Mechanisms of probiotic-host interaction with IBD as a case study: a role for exopolysaccharides?. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 72, 41–45.
- Liu, Z.-J. Yadav, P.-K. Su, J.-L. Wang, J.-S. Fei, K. (2009). Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 15(46), 5784–5788.
- Lofthus, E.V. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126, 1504–1517.

- López-Posadas, R. Requena, P. González, R- Suárez, M.D. Zarzuelo, A. Sánchez de Medina, F. Martínez-Augustin, O. (2010). Bovine Glycomacropeptide has intestinal antiinflammatory effects in rats with dextran sulfate-induced colitis. *The Journal of Nutrition*, 140, 2014–2019.
- Lourens-Hattingh, A. Viljoen, B. (2001) Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11, 1-17.
- Low, D. Nguyen, D.D. Mizoguchi, E. (2013). Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. *Drug Design, Development and Therapy*, 7, 1341–1356.
- McCarthy, J. O’Mahony, L. O’Callaghan, L. Sheil, B. Vaughan, E.E. Fitzsimons, N. O’Sullivan, G.C. Kiely, B. Collins, J.K. Shanahan, F. (2003) Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut*, 52, 975–80
- Madsen, K.L. Doyle, J.S. Jewell, L.D. Tavernini, M.M. Fedorak, R.N. (1999). Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 116, 1107–14.
- Malin, M. Soumalainen, H. Saxelin, M. Isolauri, E. (1996). Promotion of IgA immune response in patients with Crohn’s disease by oral bacteriotherapy with Lactobacillus GG. *Annals of Nutrition Metabolism*, 40, 137–45
- Mangan, P.R. Harrington, L.E. O’Quinn, D.B. Helms, W.S. Bullard, D.C. Elson, C.O. Hatton, R.D. Wahl, S.M. Schoeb, T.R. Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, 441, 231–234.
- Marcinkiewicz, J. Ciszek, M. Bobek, M. Strus, M. Heczko, P.B. Kurnyta, M. Biedron, R. Chmielarczyk, A. (2007). Differential inflammatory mediator response in vitro from murine macrophages to lactobacilli and pathogenic intestinal bacteria. *International Journal of Experimental Pathology*, 88, 155–164.

- Martelli, A.M. Nyakern, M. Tabellini, G. Tazzari, P.L. Evangelisti, C. Cocco, L. (2006). Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 20, 911–928.
- Martínez-Augustin, O. Rivero-Gutierrez, B., Mascaraque, C. 2014. Food derived bioactive peptides and intestinal barrier function. *International journal of molecular sciences*, 15(12), pp.22857–73.
- Matar, C. Valdez, J. C. Medina, M. Rachid, M. Perdigon, G. (2001). Immunomodulating effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. *Journal of Dairy Research*, 68, pp.601–609.
- Matsuguchi, T. Takagi, A. Matsuzaki, T. Nagaoka, M. Ishikawa, K. Yokokura, T. Yoshikai, Y. (2003). Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10, 259–266.
- Mills, K.H. (2008). Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *European Journal of Immunology*, 38, 2636–2649.
- Mine, Y. Zhang, H. (2015). Calcium-Sensing Receptor (CaSR)-Mediated Anti-inflammatory Effects of. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(45), 9987–9995.
- Morgan, M.E. Zhengm B. Pim, J. Koelink, P.J. van de Kant, H.J.G. Haazen, L.C.J.M, van Roest, M. Garssen, J. Folkerts, G. Kraneveld, A.D. (2013). New Perspective on Dextran Sodium Sulfate Colitis: Antigen-Specific T Cell Development during Intestinal Inflammation. *PLoS ONE*, 8(7), 1–12.
- Nanda K.N.S. Balamurrugan, R. Jayakanthan, K. Pulimood, A. Pugazhendhi, S. Ramakrishna, B.S. (2008). Probiotic administration alters the gut flora and attenuates colitis in mice administered dextran sodium sulfate. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 23(12), 1834–1839.

- Ogawa, A. Andoh, A. Araki, Y. Bamba, T. Fujiyama, Y. (2004). Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clinical Immunology*, 110(1), 55–62.
- Park, H. Yangm X.O. Chang, S.H. Nurieva, R. Wang, Y.H. Wang, Y. Hood, L. Zhu, Z. Tian, Q, Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*, 6, 1133–1141.
- Pizarro, T.T. Arseneau, K.O. Bamias, G. Cominelli, F. (2003). Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 9, 218–222.
- Priulla, M. Calastretti, A. Bruno, P. Azzariti, A. Paradiso, A. Canti, G. Niclin, A. (2007). Preferential chemosensitization of PTENmutated prostate cells by silencing the Akt kinase. Preferential chemosensitization of PTENmutated prostate cells by silencing the Akt kinase. *Prostate*, 67, 782–789.
- Rachmilewitz, D. Karmeli, F. Takabayashi, K. Hayashi, T. Leider-Trejo, L. Lee, J. Leoni, L.M. Raz, E. (2002). Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. *Gastroenterology*, 122, 1428–41.
- Reyes-Díaz, A., Mata-Haro, V. Hernandez, J. González-Córdobam A.F. Hernández-Mendoza, A. Reyes-Díaz, R. Torres-Llanez, M.J. Beltrán-Barrientos, L.M. Vallejo-Cordoba, B. (2018). Milk Fermented by Specific *Lactobacillus* Strains Regulates the Serum Levels of IL-6 , TNF-  $\alpha$  and IL-10 cytokines in a LPS-stimulated murine model. *Nutrients*, 29, 10(6), doi: 10.3390/nu10060691.
- Rivas-Jimenez, L. Ramirez-Ortiz, K. González-Córdoba, A.F. Vallejo-Cordoba, B. Garcia, H.S. Hernández-Mendoza, A. (2016). Evaluation of Acrylamide-Removing Properties of Two *Lactobacillus* Strains Under Simulated Gastrointestinal Conditions Using a Dynamic System. *Microbiology Research*, 190, 19–26.
- Rose II, W.A. Sakamoto, K. Leifer, C.A. (2012). Multifunctional role of dextran sulfate sodium for in vivo modeling of intestinal diseases. *BMC Immunology*, 13:41 doi: 10.1186/1471-2172-13-41.

- Ross, R.P. Fitzgerald, G.F. Collins, J.K. Stanton, C. (2002). Cheese delivering biocultures probiotic cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57, 71-78.
- Ruas-Madiedo, P. Hugenholtz, J. Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 163–171.
- Ruiz, L. Hevia, A. Bernardo, D. Margolles, A. Sánchez, B. (2014). Extracellular molecular effectors mediating probiotic attributes. *FEMS Microbiology Letter*, 359, 1–11.
- Santiago-López, L. Hernández-Mendoza, A. Garcia, H.S. Mata-Haro, V. Vallejo-Cordoba, B. González-Córdova, A.F. (2015). The effects of consuming probiotic-fermented milk on the immune system: A review of scientific evidence. *International Journal of Dairy Technology*, 68(2), 153–165.
- Santiago-López, L., González-Córdova, A.F. Hernández-mendoza, A. Vallejo-Cordoba, B. (2017). Potential Use of Food Protein-Derived Peptides in the Treatment of Inflammatory Diseases. *Protein and Peptide Letters*, 24, 137-145.
- Sengül, N. Aslím, B. Ucar, G. Yucel, N. Isik, S. Bozkurt, H. Sakaogullari, Z. Atalay, F. (2006). Effects of exopolysaccharide-producing probiotic strains on experimental colitis in rats. *Diseases of the Colon and Rectum*, 49, 250–258.
- Sepúlveda, S.E. Beltrán, C.J. Peralta, A. Rivas, P. Rojas, N. Figueroa, C. Quera, R. Hermoso, M.A. (2008). Enfermedad inflamatoria intestinal: Una mirada inmunológica. *Revista Médica de Chile*, 136(1), 367–375.
- Serhan, C.N. Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunology*, 6, 185–197.
- Sheibanie, A.F. Yen, J.H. Khayrullina, T. Emig, F. Zhang, M. Tuma, R. Ganea, D. (2007). The proinflammatory effect of prostaglandin E2 in Experimental Inflammatory Bowel Disease is Mediated through the IL-23-IL-17 Axis. *The Journal of Immunology*, 178, 8138–8147.

- Shigwedha, N. Sichel, L. Jia, L. Zhang, L. (2014). Probiotal Cell Fragments ( PCFs ) as “Novel Nutraceutical Ingredients” *Journal of Biosciences and Medicines*, 2, 43–55.
- Solomon, L. Mansor, S. Malln, P. Donnelly, E. Hoper, M. Loughrey, M. Kirk, S. Gardiner, K. (2010). The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: An overview. *Comparative Clinical Pathology*, 19(3), 235–239.
- Stanton, C. Desmond, C. Coakley, M. Collins, J.K. Fitzgerald, G. Ross, R.P. (2003). Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In *Handbook of Fermented Functional Foods* ed. Farnworth, E.R. pp. 27–58. Boca Raton: CRC Press.
- Steidler, L. (2001). Microbial and immunological strategies for treatment of inflammatory bowel disease. *Microbiology Infection*, 3, 1157–66.
- Strober, W., Fuss, I. Mannon, P. (2007). The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 117, 514–521.
- Sun, S. Ji, Y. Kersten, S. (2012). Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. *Annual Review of Nutrition*, 32, 261–286.
- Sydora, B.C. Tavernini, M.M. Wessler, A. Jewell, L.D. Fedorak, R.N. (2003). Lack of interleukin-10 leads to intestinal inflammation, independent of the time at which luminal microbial colonization occurs. *Inflammatory Bowel Diseases*, 9, 87–97.
- Takeuchi, K. Miyazawa, T. Tanaka, A. Kat, S. Kunikata, T. (2002). Pathogenic importance of intestinal hypermotility in NSAID-induced small intestinal damage in rats. *Digestion*, 66, 30–41.
- Tallon, R. Bressollier, P. Urdaci, M.C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 154(10), 705–712.

- Tanaka, A. Matsimoto, M. Hayashi, T. Takeuci, K. (2005). Functional mechanism underlying cyclooxygenase-2 expression in rat small intestine following administration of indomethacin: relation to intestinal hypermotility. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 20, 38–45.
- Tanaka, T. Narazaki, M. Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), 016295–016295.
- Taverniti, V. Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics : proposal of paraprobiotic concept). *Genes & Nutrition*, 261–274.
- Tesmer, L. Lundy, S.K. Sarkar, S. Fox, D.A. (2008). Th17 cells in human disease. *Immunological Reviews*, 223, 87–113.
- Thompson-Chagoyán, O.C. Maldonado, J. Gil, A. (2005). Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): Role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clinical Nutrition* 24, 339-352.
- Walker, W.A. (2002). Development of the intestinal mucosal barrier. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 34, S33–S39.
- Watanabe, T. Nishio, H. Tanagawa, T. Yamagami, H. Okazaki, H. Watanabe, K. Tominaga, K. Fujiwara, Y. Oshitani, N. Asahara, T. Nomoto, K. Higuchi, K. Takeuchi, K. Arakawa, T. (2009). Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: involvement of lactic acid. *American Journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 297(3), 506–513.
- Weaver, C.T. Elson, C.O. Fouser, L.A. Kolls, J.K. (2013). The Th17 Pathway and Inflammatory Diseases of the Intestines, Lungs, and Skin. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 8(1), 477–512.

- Wera, O. Lancellotti, P. Oury, C. (2016). The Dual Role of Neutrophils in Inflammatory Bowel Diseases. *Journal of Clinical Medicine*, 5, 118, doi: 10.3390/jcm5120118.
- Yamada, S. Naito, Y. Takagi, T. Mizushima, K. Hirai, Y. Horie, R. Fukumto, K. Inoue, K. Harusato, A. Yoshida, N. Uchiyama, K. Handa, O. Ishikawa, T. Konish, H. Wakabayashi, N. Yagi, N. Kokura, S. Kita, M. Yoshikawa, T. (2011). Reduced small-intestinal injury induced by indomethacin in interleukin-17A-deficient mice. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 26(2), 398–404.
- Yamaki, K. Uchida, H. Harada, Y. Yanagisawa, R. Takano, H. Hayashi, H. Mori, Y. Yoshino, S. (2003). Effect of the Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Indomethacin on Th1 and Th2 Immune Responses in Mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92, 1723–1729.
- Yan, F. Polk, D.B. (2006). Probiotics as functional food in the treatment of diarrhea. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 9, 717–721.
- Yen, D. Cheung, J. Scheerens, H. Poulet, F. McClanahan, T. McKenzie, B. Kleinschek, M.A. Owyang, A. Mattson, J. Blumenschein, W. Murphy, E. Sathe, M. Cua, D.J. Kastelein, R.A. Rnnick, D. (2006). IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *Journal of Clinical Investigation*, 116(5), 1310–1316.
- Yoda, K. Miyazawa, K. Hosoda, M. Hiramatsu, M. Yan, F. He, F. (2014). *Lactobacillus* GG-fermented milk prevents DSS-induced colitis and regulates intestinal epithelial homeostasis through activation of epidermal growth factor receptor. *European Journal of Nutrition*, 53(1), 105–115.
- Zagato, E. Miletì, E. Massimiliano, L. Fasano, F. Budelli, A. Penna, G. Rascigno, M. (2014). *Lactobacillus paracasei* CBA 174 metabolic products and fermented milk for infant formula have anti-inflammatory activity on dendritic cells in Vitro and protective effects against colitis and an enteric pathogen in vivo. *PLoS ONE*, 9(2), e87615.

- Zakostelska, Z. Kverka, M, Klimesova, K. Rossamann, P. Mrazek, J. Kopecny, J. Hornova, M. Strutkova, D. Hudcovic, T. Ridl, J. Tlaskalova-Hogenova, H. (2011). Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. *PLoS ONE*, 6(11), doi.org/10.1371/journal.pone.0027961.
- Zhang, H. Hu, C.A. Kovacs-Nolan, J. Mine, Y. (2014). Bioactive dietary peptides and amino acids in inflammatory bowel disease. *Amino Acids*, 47(10), 2127–2141.
- Zhang, L. Li, N. Caicedo, R. Neu, J. (2005). Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *The Journal of Nutrition*, 135, 1752–1756.
- Zhang, Z. Zheng, M. Bindas, J. Schwarzenberger, P. Kolls, J.K. (2006). Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 12, 382–388.
- Zheng, B. van Bergenhenegouwen, J. Overbeek, S. van de Kant, H.J.G. Garssen, J. folkerts, G. Vos, P. Morgan, M.E. Kraneveld, A.D. (2014). *Bifidobacterium breve* attenuates murine dextran sodium sulfate-induced colitis and increases regulatory T cell responses. *PLoS ONE*, 9(5), 1–11.
- Zhou, L. Chong, M.M. Littman, D.R. (2009). Plasticity of CD4<sup>+</sup> T cell lineage differentiation. *Immunity*, 21, 467–476.