



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

**ANÁLISIS DE miR-21-5p, miR-26a-5p, miR-30b-3p Y
EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN CÉLULAS DE
GANGLIOS MESENTÉRICOS DE CERDO ESTIMULADAS CON
Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* Bb12**

Por:

Sonia Carolina Rosas Fornes

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Sonia Carolina Rosas Fornes, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. Verónica Mata Haro
Directora de Tesis



Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort
Integrante del comité de tesis



M.C. Leticia Félix Valenzuela
Integrante del comité de tesis



Dr. Jesús Hernández López
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Análisis de miR-21-5p, miR-26a-5p, miR-30b-3p y Evaluación de la Respuesta Inmune en Células de Ganglios Mesentéricos de Cerdo Estimuladas con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12” 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 de la autora Sonia Carolina Rosas Fornes, 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 de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pablo Wong González", written over a horizontal line.

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante la realización de mis estudios de Maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por aceptarme en su programa y permitirme realizar este proyecto en sus instalaciones.

Al proyecto 257462 de Investigación Científica Básica de CONACyT, que financió el proyecto “Participación de microRNAs en la vía de señalización de TLR2/NF-kB en células dendríticas porcinas: un posible mecanismo de regulación de acción de probióticos”.

A mi directora de tesis la Dra. Verónica Mata Haro. Aprendí tantas lecciones de usted; tanto en ciencia como de la vida. Muchas gracias por aceptarme en su laboratorio, por su apoyo y sentido del humor. Me quedo con recuerdos muy bonitos.

A los miembros de mi comité, Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort y Dr. Jesús Hernández López, por sus sugerencias en los seminarios y por su apoyo en el trabajo experimental de este proyecto.

Al laboratorio de Inmunología de CIAD, por los convivios con o sin razón justificada; aprendí mucho de ustedes. En especial, muchas gracias a la M.C. Mónica Reséndiz por su invaluable apoyo en el trabajo experimental.

A la M.C. Leticia Félix Valenzuela, por su apoyo y consejos que vienen desde que realizamos la tesis de licenciatura. Muchas gracias por todo; por las palomitas, galletas, historias y risas compartidas.

A la Dra. Marlene Bravo Parra, por sus recomendaciones y guía sobre el trabajo experimental.

A Osmara y Valeria, por las risas, comida e historias compartidas en el cubículo de estudiantes. También por su asesoría y ánimos para que esta tesis pudiera culminar.

A todas las personas en CIAD (doctores, maestros, personal administrativo, compañeros, amigos) con las cuales compartí experiencias durante este proceso.

A mis padres y hermanos, los cuales creen en mí cuando incluso yo no puedo hacerlo. Porque cuando todo va bien o mal, sé que siempre estarán ahí; por ser mi lugar seguro y mis ejemplos a seguir. Gracias por todo, siempre.

Por último, agradezco tanto a Dios, por estar en todo momento; en las buenas, en las malas y en la incertidumbre. Porque sé que todo lo que tenga que afrontar, jamás lo haré sola.

DEDICATORIA

A mi nana María, que desde hace años encuentra la forma de estar conmigo y apoyarme en todo momento. Por esa conexión que sólo nosotras conocemos y por recordarme que debo vivir en honor de quienes no pueden hacerlo.

A mis padres y mis hermanos, porque sin ustedes no sería quién soy, ni podría haber llegado hasta aquí. Por su amor, sacrificios, y por todo lo que hemos vivido juntos. Esto es por y para ustedes, como siempre ha sido.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	2
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	15
2.1. Cerdo	15
2.1.1. Industria Porcina: Inconvenientes y Alternativas.....	15
2.2. Probióticos	16
2.2.1. <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb12.....	17
2.2.2. Mecanismos de Acción de Probióticos.....	18
2.3. miRNAs.....	18
2.3.1. Historia.....	19
2.3.2. Biogénesis y Procesamiento.....	20
2.3.3. Participación de miRNAs en el Tracto Gastrointestinal	21
2.3.4. miRNAs y Sistema Inmunológico.....	22
2.4. Señalización de Respuestas	24
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	27
4.1. General	27
4.2. Específicos.....	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1. Cerdos.....	28
5.2. Obtención y Cultivo de Células de Ganglios Mesentéricos	28
5.3. Cultivo de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb12.....	29
5.4. Estimulación de Células de Ganglios Mesentéricos con Bb12	29
5.5. Análisis de Proteínas de Superficie de Membrana por Citometría de Flujo	30
5.6. Determinación de la Expresión Relativa de miRNAs por RT-qPCR	30
5.7. Cuantificación de IL-10 e IL-12 en Sobrenadantes de Cultivos Celulares por ELISA	31
5.8. Cuantificación de la Expresión Relativa de IL-10 e IL-12 por RT-qPCR	32
5.9. Análisis Estadístico	33

CONTENIDO (continuación)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
6.1. Expresión de Proteínas de Superficie de Membrana.....	34
6.2. Análisis de la Expresión de miRNAs por RT-qPCR	36
6.3. Cuantificación de Citocinas en Sobrenadantes de Cultivos Celulares por ELISA.....	40
6.4. Cuantificación de Citocinas por RT-qPCR	42
7. CONCLUSIONES	45
8. REFERENCIAS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Descripción de la biogénesis, procesamiento y función de los miRNAs.....	21
2	Estrategia de análisis de proteínas de membrana por citometría de flujo.....	35
3	Porcentajes de células dendríticas estimuladas con Bb12.....	36
4	Expresión relativa de miR-21-5p, miR-26a-5p y miR-30b-3p.....	38
5	Cuantificación de IL-10 en sobrenadantes de cultivo celular.....	41
6	Cuantificación de IL-12 en sobrenadantes de cultivo celular.....	42
7	Expresión relativa de las citocinas IL-10 e IL-12.....	43

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Secuencias de iniciadores sentido y anti-sentido empleados en la determinación de la expresión relativa.....	31

RESUMEN

En la actualidad, los probióticos son utilizados ampliamente debido a la gran cantidad de efectos benéficos que presentan, destacando principalmente su capacidad para modular el tracto gastrointestinal y la respuesta del sistema inmunológico. En la industria porcina son empleados en gran medida para mantener una buena salud digestiva de los animales, así como para aminorar la sintomatología de diferentes padecimientos. Los mecanismos de acción de los probióticos son variados, pero uno de ellos es mediado por microRNAs (miRNAs), pequeñas secuencias de RNA no codificante capaces de bloquear la producción de proteínas de respuesta, impactando en procesos como la señalización de receptores tipo Toll (TLR), presentación antigénica y producción de citocinas. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión de los miRNAs miR-21-5p, miR-26a-5p, miR-30b-3p en células de ganglios mesentéricos de cerdo, y determinar si el probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (Bb12) podría inducir cambios en la expresión de dichos miRNAs y proteínas de la respuesta inmune. Para esto, se utilizaron células aisladas de ganglios mesentéricos de cerdos y se estimularon con Bb12 por 4 h y 24 h y se determinó el porcentaje de proteínas de superficie de membrana (CD3, CD21, CD172 y CADM1) mediante citometría de flujo. Después se cuantificó la expresión de los miRNAs mediante reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-qPCR). Posteriormente se evaluó la producción y expresión de las citocinas IL-10 e IL-12 mediante un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y RT-qPCR. En los resultados, se encontró que el porcentaje de células dendríticas no se vió afectado al utilizarse concentraciones bajas del probiótico (10^4 y 10^5 UFC/mL), mientras que al emplearse concentraciones mayores de Bb12 (10^7 y 10^8 UFC/mL) el porcentaje de células dendríticas disminuyó significativamente entre 2-5 %, respectivamente ($p < 0.05$). Además, se encontró la expresión de los miRNAs estudiados; sin embargo, al estimular con el probiótico en concentraciones de 10^4 y 10^5 UFC/mL, no se observaron cambios en su expresión. Asimismo, la producción y expresión de IL-10 e IL-12 no presentó variaciones ante el estímulo con los tratamientos de 10^4 y 10^5 UFC/mL del probiótico. Se considera que la expresión de los miRNAs y proteínas de respuesta inmune estudiadas, podrían depender de cantidades mayores a 10^7 UFC/mL del probiótico Bb12 en células de ganglios mesentéricos; sin embargo, es necesario la realización de más investigaciones al respecto.

Palabras clave: miRNAs, probióticos, ganglios mesentéricos, respuesta inmune, cerdo

ABSTRACT

Currently, probiotics are widely used due to the large number of beneficial effects they confer, highlighting their ability to modulate the gastrointestinal tract and the immune system response. In the swine industry, they are used to maintain the good digestive health of animals, as well as to reduce the symptomatology related to several diseases. Probiotic mechanisms of action are diverse, but one is mediated by microRNAs (miRNAs), small-non coding RNAs capable of blocking response proteins production, impacting processes such as Toll-like receptor (TLR) signaling, antigenic presentation, and cytokine production. Therefore, this work aimed to analyze the miRNAs miR-21-5p, miR-26a-5p y miR-30b-3p expression in swine mesenteric lymph node cells, and to determine if probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (Bb12) could induce changes in the expression of these miRNAs and cytokines. For this, mesenteric lymph nodes cells from swine were isolated and stimulated with Bb12 for 4 h and 24 h, after which, the cell surface molecules (CD3, CD21, CD172, and CADM1) percentage was determined by flow cytometry. Then miRNAs expression was quantified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR). Afterward, cytokine IL-10 and IL-12 production and expression were evaluated by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and RT-qPCR. As result, it was found that dendritic cells percentage were not affected by using low concentrations of probiotic (10^4 and 10^5 CFU/mL), while higher probiotic concentrations (10^7 and 10^8 CFU/mL) significantly decreased dendritic cells percentage to 2-5%, respectively ($p < 0.05$). Furthermore, the miRNAs expression was found, however when stimulated with probiotic at 10^4 and 10^5 CFU/mL concentration, there was no modulation in their expression. Likewise, IL-10 and IL-12 production and expression did not significantly change when stimulated with probiotics at 10^4 and 10^5 CFU/mL concentrations. MiRNAs and response proteins studied could likely be dependent on probiotic Bb12 in higher amounts than 10^7 CFU/mL in mesenteric lymph nodes cells; however, more research is needed on this subject.

Key words: miRNAs, probiotics, mesenteric lymph nodes, immune response, swine

1. INTRODUCCIÓN

El tracto gastrointestinal es el sitio donde convergen una gran cantidad de microorganismos, estableciéndose en las diferentes regiones del intestino y contribuyendo a la salud del hospedero al mantener la homeostasis del tracto gastrointestinal (Tuohy y Scott, 2015). Cuando ocurren cambios que afectan dicha homeostasis, una forma de recuperarla es mediante el uso de probióticos. Uno de los géneros ampliamente utilizado es *Bifidobacterium*, siendo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb12) una de las especies más destacadas (Jungersen *et al.*, 2014). Diversas investigaciones demuestran su acción benéfica al contrarrestar efectos secundarios al uso de antibióticos, mejorar la salud gastrointestinal, así como modular la respuesta del sistema inmunológico (Quigley, 2017). Dentro de los mecanismos estudiados mediante los cuales los probióticos realizan su función se encuentran aquellos donde evitan la adhesión de microorganismos patógenos, impidiendo así que provoquen subsecuentes infecciones, ya sea por la secreción de sustancias o metabolitos (Plaza-Díaz *et al.*, 2019). Sin embargo, existen otros mecanismos de tipo molecular que no han sido completamente esclarecidos. Dentro de ellos encontramos la participación de microRNAs (miRNAs) en los efectos proporcionados por probióticos. No obstante, la forma en la que se relacionan es un tema relativamente nuevo, el cual continúa siendo investigado. Es, por tanto, que se ha demostrado en diferentes estudios la estrecha relación que mantienen la microbiota, probióticos y miRNAs y la forma en la que se considera que éstos últimos son excelentes candidatos para realizar ajustes y recuperar la homeostasis intestinal (Zhao *et al.*, 2021).

La interacción miRNAs-probióticos ha sido poco estudiada en humanos, y en su mayoría se han empleado modelos murinos, sin embargo, es difícil extrapolar los resultados obtenidos de ratones a humanos a causa de las pocas similitudes que presentan. En cambio, los modelos porcinos son considerados como una opción más adecuada para estudiar la participación de miRNAs en respuesta a probióticos, debido a que cerdos y humanos comparten similitudes en aspectos genéticos, de tracto gastrointestinal, desarrollo cognitivo y tipo de dieta (Lunney *et al.* 2021). Las investigaciones publicadas hasta el momento, se encuentran enfocadas en los efectos proporcionados por probióticos o a la participación de miRNAs en determinadas patologías, pero existe muy poca información acerca de su estudio en forma conjunta. Además, se acentúa la relevancia de realizar investigaciones conjuntando los efectos proporcionados con mecanismos de

acción de probióticos para comprender los diversos aspectos por los cuales se presentan los efectos de probióticos para una futura aplicación.

Por lo mencionado anteriormente, se sustenta la importancia de tratar de mantener e incrementar la población de bacterias del género *Bifidobacterium* en el tracto gastrointestinal, lo cual puede ser logrado a través del consumo de probióticos. Para esto, las investigaciones relacionadas no solo con sus efectos proporcionados sino con sus mecanismos de acción, son de vital relevancia. Por lo tanto, y debido a que en células del sistema inmunológico se ha visto un incremento en la expresión de estos miRNAs y de proteínas involucradas en la respuesta inmune, es que se considera que el probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 tiene la capacidad de modular la expresión de estos elementos, en células de ganglios mesentéricos porcinos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cerdo

2.1.1. Industria Porcina: Inconvenientes y Alternativas

En la actualidad la industria porcina es considerada una de las más prolíferas. El consumo de carne de cerdo posee el primer lugar a nivel mundial con un 37.4%, seguida de la avícola (35.3%), bovina (22.6%) y ovina (4.7%) (FAO, 2009; McGlone, 2013). El incremento en la población, supone un incremento en la producción de alimentos derivados del cerdo. Por lo cual diferentes metodologías y procesos han sido adoptadas por las industrias con la finalidad de crear un ambiente que proporcionen las mejores condiciones para los animales y para los productores. Uno de los retos que se presenta en la crianza de cerdos comerciales, es el asegurar una correcta salud digestiva de los ejemplares.

Los antibióticos son una herramienta utilizada frecuentemente en la producción de animales de granja desde la década de 1950, en particular durante la cría intensiva para mantener a los animales sanos y aumentar la productividad. En la actualidad también son utilizados comúnmente no solo para el tratamiento, sino también para controlar la propagación y prevención de infecciones, particularmente en períodos de estrés y vulnerabilidad, así como para mejorar la eficiencia de la alimentación y la promoción del crecimiento de los animales (Lekagul *et al.*, 2019).

Por otro lado, el uso de antibióticos en animales ha generado inconvenientes relacionadas con resistencia bacteriana (Burow *et al.*, 2019). La presencia de bacterias resistentes a antibióticos en animales es alarmante desde una perspectiva veterinaria, pero también desde el aspecto zoonótico. Un ejemplo es el descubrimiento de un gen resistente a la colistina mediado por plásmidos (MCR-1) encontrado en *Escherichia coli* proveniente de cerdo y en carne de cerdo cruda, el cual comienza a ser preocupación a nivel mundial ya que se ha encontrado también en humanos, aunque de forma esporádica por el momento (Liu *et al.*, 2016). Por tanto, las bacterias resistentes a antibióticos que emergen entre los animales destinados para consumo pueden propagarse a los humanos, a través

de la cadena de producción de alimentos, siendo un tema mundial de gran prioridad la crianza de animales para consumo sin la utilización excesiva de antibióticos (Osterberg *et al.*, 2016).

Una de las alternativas que ha emergido desde hace un tiempo, es el uso de probióticos para mejorar la salud gastrointestinal. Gran cantidad de efectos benéficos han sido descritos en modelos porcinos empleando diferentes bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* como son: mejora en la absorción y digestión de nutrientes, reducción de diarreas, y mejora en el desarrollo de los animales (Liao y Nyachoti., 2017). Específicamente, el periodo de lactancia es un punto crítico donde los lechones son más susceptibles a enfermedades causadas por bacterias patógenas, donde pueden disminuir en gran cantidad su microbiota, por lo cual la administración de probióticos resulta como una solución viable (Kenny *et al.*, 2011).

2.2. Probióticos

Etimológicamente el término probiótico es derivado del latín “pro” y del griego “bios” y significa “por la vida” (Salazara y Montoya, 2003). La definición brindada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), enuncia que probióticos son “cepas vivas de microorganismos seleccionados estrictamente, los cuales administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del hospedero” (FAO/WHO, 2002). Debido a que una diversidad de estudios clínicos han probado la efectividad de los probióticos, la utilización de los mismos va en aumento; cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las más utilizadas comercialmente (Plaza-Díaz *et al.*, 2017). Estos dos géneros de bacterias, se encuentran dentro de las Bacterias Ácido Lácticas (LAB, por sus siglas en inglés). Éstas son un grupo de bacterias Gram-positivas que comparten la característica de convertir rápidamente los carbohidratos a lactatos, acidificando su ambiente (Burgé *et al.*, 2015). Las LAB se encuentran distribuidas ampliamente en hábitats naturales, como tractos gastrointestinales de mamíferos, así como alimentos fermentados (Gilliland, 1990). En el apartado siguiente se abordarán las características e importancia de una especie en particular del género *Bifidobacterium*.

2.2.1. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12

B. animalis subsp. *lactis* Bb12 es una bacteria Gram positiva que se encuentra frecuentemente colonizando el tracto gastrointestinal de los mamíferos (Quigley, 2017). Este microorganismo presenta características singulares, como una gran capacidad de tolerancia a ambientes ácidos en comparación con otras bacterias de procedencia humana, resistencia al estrés oxidativo y habilidad para crecer en ambientes con una temperatura elevada para este tipo de bacterias (Vernazza *et al.*, 2006). Anteriormente se consideraba a *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium lactis* como dos especies diferentes, sin embargo, en la actualidad se clasifican como parte de la misma especie, *B. animalis*, y se consideran dos subespecies: *animalis* y *lactis* (Masco *et al.*, 2004).

Dentro de las funciones presentadas por este microorganismo, y que podrían tener importancia en el ámbito clínico, se encuentran la inmunomodulación, la adherencia a las células epiteliales y la mejora de la función de la barrera intestinal. En humanos, la utilización principalmente de este organismo se ha enfocado en la inmunidad, con base a los diferentes ensayos clínicos que se han realizado, en sujetos sanos y enfermos, se han presentado efectos satisfactorios en inmunomodulación, prevención de infecciones, así como disminución de desórdenes inflamatorios, considerándose como resultados prometedores al estimular la respuesta inmune (Quigley, 2017; Meng *et al.*, 2016; Meng *et al.*, 2017; Sheiki *et al.*, 2016; Tonucci *et al.*, 2017).

Por otra parte, en animales se ha demostrado su capacidad para disminuir la permeabilidad intestinal en ratones que sufrían de enterocolitis necrotizante (Krumbeck *et al.*, 2018; Bergamann *et al.*, 2013). Particularmente en cerdos, se ha encontrado que este probiótico modula la respuesta inmunológica local y mejora la función intestinal en ejemplares juveniles que habían sido infectados con el nemátodo *Ascaris suum* (Solano-Aguilar *et al.*, 2018). De forma similar, Vlasova y colaboradores (2013), demostraron en un modelo de infección con el virus HRV en ejemplares gnotobióticos, que al utilizar los probióticos Bb12 y *Lactobacillus rhamnosus* (LGG), contribuyeron a la inmunomaduración, regulación de la homeostasis de la respuesta inmunológica, entre otros efectos, logrando así un control en la diarrea provocada por dicho virus.

2.2.2. Mecanismos de Acción de Probióticos

Para ser capaces de proporcionar sus efectos, los probióticos cuentan con una amplia variedad de mecanismos de acción, siendo la modulación del sistema inmunológico uno de los ampliamente estudiados (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Se ha determinado que mediante la producción de moléculas inmunomoduladoras y antiinflamatorias se pueden estimular células de la respuesta inmune, siendo así que estos efectos sean proporcionados a causa de la interacción de los probióticos con células intestinales y células dendríticas, monocitos, macrófagos y linfocitos (D'Amelio y Sassi, 2018; Plaza-Díaz *et al.*, 2019).

Por otro lado, y refiriéndonos específicamente a los mecanismos de acción descritos sobre *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12, en diversos artículos se ha descrito su capacidad de adhesión a la mucosa intestinal, inhibición de patógenos al producir sustancias inhibitorias, mejora de la barrera intestinal y modulación de respuestas del sistema inmunológico (Jungersen *et al.*, 2014; Commane *et al.*, 2005; Laparra y Sanz, 2009; Martins *et al.*, 2009; López *et al.*, 2010).

Las investigaciones enfocadas a la elucidación de los mecanismos empleados por probióticos, ha conllevado un gran interés por aquellos procesos moleculares en la interacción hospedero-microbioma. Es de esta forma, que surgen las investigaciones relacionadas con miRNAs-probióticos-hospedero, ya que estos elementos, como se verá en el apartado siguiente, son un mecanismo molecular participe en los efectos proporcionados por probióticos. Es este estudio de los mecanismos de acción de probióticos, el que podría ayudar al desarrollo de estrategias de tratamiento para enfermedades del sistema inmunológico y del tracto gastrointestinal.

2.3. miRNAs

Todos los organismos al ser sistemas con cierto grado de orden y estructura, deben tener una regulación de sus diferentes procesos. Por lo cual, elementos como los miRNAs son esenciales para el correcto funcionamiento de los individuos. Estos son pequeñas secuencias de RNA no codificante que cumplen una amplia variedad de procesos biológicos como son desarrollo,

diferenciación y homeostasis, pero principalmente son conocidos por ser reguladores de la expresión génica (Gebert y MacRae, 2019). En la mayoría de los casos, los miRNAs se unen a la región 3' UTR del RNAm de sus genes blanco; esta interacción es muy dinámica y depende de muchos factores, como la abundancia de los miRNAs y el RNAm de sus genes blanco, así como la afinidad en su interacción (O'Briend *et al.*, 2018). En la respuesta inmune, se ha demostrado la capacidad de los miRNAs para regular respuestas al modular la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune. De esta forma, modulan el balance entre respuestas inflamatorias efectivas y dan una resolución de inflamación que evita un daño tisular (Runtsch *et al.*, 2014).

2.3.1. Historia

El descubrimiento de los microRNAs (miRNAs) fue realizado por el grupo de trabajo de Lee y colaboradores (1993), mientras se encontraban estudiando al nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Es así que, encontraron una disminución de una proteína denominada LIN-14, la cual determinaron era esencial para un cambio en los primeros estadios larvales. Además, aunado a esta disminución de LIN-14, se encontró que esta proteína era dependiente de la transcripción de un segundo gen, llamado lin-4. Sin embargo, dentro de lo más relevante de esta investigación fue que lin-4 no era traducido a una proteína activa, en cambio daba origen a dos RNAs pequeños de aproximadamente 21 y 61 nucleótidos de longitud (Bhaskaran y Mohan, 2014).

Posteriormente, y relacionado con este mismo grupo de trabajo en conjunto con Wightman y colaboradores (1993), determinaron que el RNA de menor tamaño era la secuencia antisentido con complementariedad en múltiples sitios de la región 3'UTR del RNAm de lin-14, encontrando así, que la unión entre estas dos regiones complementarias disminuyó la expresión de la proteína LIN-14 sin causar cambios significativos en sus niveles de RNAm.

Este novedoso hallazgo en el área de la regulación de la expresión génica, se creía era un evento exclusivo del organismo estudiado en cuestión, *C. elegans*. Sin embargo, en el año 2000 dos grupos descubrieron, de forma separada, que un RNA pequeño, let-7, era esencial para el cambio de un estado larval tardío a adulto en *C. elegans* (Reinhart *et al.*, 2000; Slack *et al.*, 2000). Aún más importante, es que homólogos de este gen fueron descubiertos de forma subsecuente en muchos

otros organismos, incluyendo a los humanos. Posteriormente proviene un auge aunado a los RNA pequeños, llegando a clonarlos e inclusive encontrando aspectos evolutivos de los mismos tales como que muchos se encontraban conservados entre especies. De igual forma, es importante mencionar que desde el 2002 se creó un repositorio de miRNAs, denominado miRBase, encontrándose nomenclatura, posibles secuencias de miRNAs, así como diversa información de predicción (Kozomora *et al.*, 2019).

2.3.2. Biogénesis y Procesamiento

La biogénesis de los miRNAs es un proceso complejo que involucra la participación de varias proteínas, además de ocurrir en más de un lugar dentro de la célula. La Figura 1 muestra de forma resumida el proceso de biogénesis y procesamiento de estos elementos. La transcripción de los miRNAs ocurre en el núcleo donde la RNA polimerasa II transcribe directamente del templado de DNA a sustratos de RNA con una longitud de varios cientos de nucleótidos, conocido como miRNA primario (pri-miRNA). Posteriormente, y de igual forma en el núcleo, este pri-miRNA es procesado por dos proteínas, Drosha y DGCR8, que se encuentran formando un complejo denominado Microprocesador, en el cual este pri-miRNA es transformado a una secuencia de aproximadamente 70 a 120 nucleótidos de longitud, siendo llamado ahora pre-miRNA (Bhaskaran y Mohan, 2014; Ha y Narry, 2014). Este pre-miRNA es ahora transportado al citoplasma por la proteína exportina 5 y una vez encontrándose ahí, el pre-miRNA es procesado por la proteína Dicer en pequeños fragmentos, dando como resultado un miRNA maduro con una longitud de 18 a 22 nucleótidos; de las dos cadenas del dúplex de miRNA, una de ellas es la hebra guía la cual se une a un complejo conocido como RISC, mientras que la hebra pasajera es degradada, conllevando de esta forma al silenciamiento del gen (Thijssen *et al.*, 2019; Matsuyama y Suzuki, 2019).

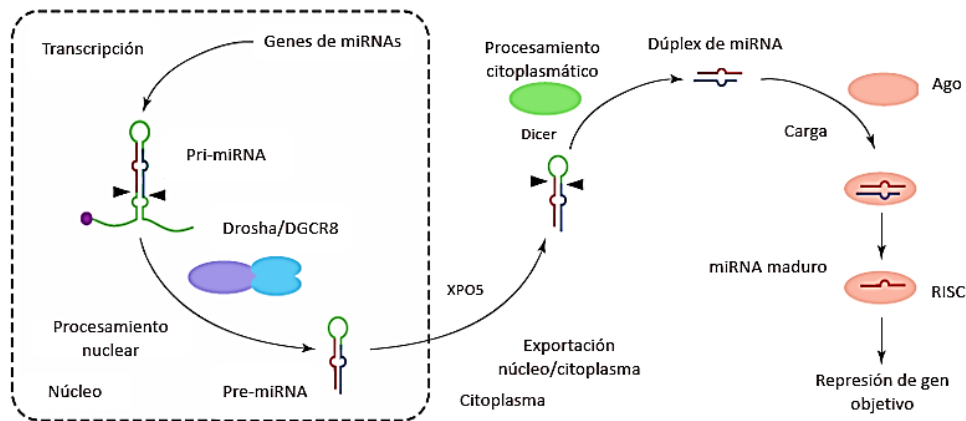


Figura 1. Descripción de la biogénesis, procesamiento y función de los miRNAs. (Modificada de Matsuyama y Suzuki, 2019).

2.3.3. Participación de miRNAs en el Tracto Gastrointestinal

El tracto gastrointestinal porcino es un sistema complejo que se encuentra cambiando de forma constante, ocurriendo principalmente en cerdos juveniles que se encuentran en proceso del destete (Pluske *et al.*, 2018). Dentro de este sistema se producen relaciones de gran dinamismo como son la interacción de la mucosa epitelial, la microbiota y procesos de nutrición lo que conlleva al buen sustento de una correcta salud intestinal. Para esto, se conoce que los miRNAs tienen participación en los diferentes procesos mencionados, ayudando a la homeostasis intestinal (Runtsch *et al.*, 2014).

Dentro de las investigaciones relacionadas con expresión de miRNAs en diferentes procesos del tracto gastrointestinal, se encuentra la investigación de Zhu y colaboradores (2017), donde encontraron que el miRNA miR-29a tuvo un incremento significativo en el yeyuno proveniente de cerdos con restricción del crecimiento intrauterino (IUGR, por sus siglas en inglés) y que se encontraba además, regulando este padecimiento. Asimismo, se ha visto que en humanos este miRNA regula la permeabilidad intestinal en pacientes que padecen el síndrome de colon irritable (IBD, por sus siglas en inglés) (Zhou *et al.*, 2010). Por otro lado, Zou y colaboradores (2019), determinaron que la expresión del miRNA miR-100 estaba relacionado con la regeneración de células epiteliales intestinales porcinas. Mientras que en humanos este miRNA se ha documentado como un inhibidor de supresión tumoral al interferir con la expresión de la proteína Lgr5 (Zhou *et al.*, 2015).

También se han visto implicados miRNAs en otros procesos relacionados al tracto gastrointestinal porcino, como la digestión de lípidos. Sun y colaboradores (2018), determinaron que los miRNAs miR-214-3p y ssc-un39 se expresaron de forma significativa en muestras provenientes de estómago de cerdo, encontrando también que tenían participación en el proceso de digestión de lípidos. En contraste, en humanos se ha encontrado que una disminución en la expresión de miR-214-3p podría contribuir a la comprensión de la patogénesis de la colitis ulcerativa, ya que se determinó que regulaba de forma negativa a su gen blanco STAT6 (Li *et al.*, 2017).

De igual manera, un tema relevante en cerdos es el estrés post-destete, una de las condiciones que más afectan a estos animales y en el cual se ha visto que participan miRNAs. En este sentido, Tao y colaboradores (2016), realizaron un análisis transcriptómico de la expresión de los miRNA en intestinos delgados de cerdos lactantes y destetados, y encontraron que el miRNA ssc-mir-146b presentó la mayor diferencia en expresión entre los dos grupos estudiados. En humanos, se ha reportado que este miRNA está relacionado con funciones como la regulación de la respuesta inflamatoria, al regular de forma negativa la expresión del receptor TLR4 (Curtale *et al.*, 2013).

2.3.4. miRNAs y Sistema Inmunológico

Actualmente, se ha descubierto que cientos de miRNAs son expresados por las células del sistema inmunológico. Aún más relevante es que la expresión de estos elementos puede ser regulada en respuesta a una gran cantidad de estímulos tales como bacterias benéficas que son reconocidos por los receptores de las células T o B, citocinas y componentes microbianos que activan a los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés), de lo cual se describirá con mayor detalle en un apartado siguiente (Wu y Lu, 2017).

Diversos estudios han reportado la participación de los miRNAs en la respuesta inmune a virus en cerdo, tal es el caso del trabajo realizado por Kuang y colaboradores. (2017), donde compararon cerdos infectados con el virus herpes simple tipo 2 (HSV2v, por sus siglas en inglés) contra ejemplares sanos, encontrando que la expresión de los miRNAs miR-592, miR-1245b-5p, miR-150, miR-342-5p, miR-1245b-3p y miR-124 había sido incrementada y que además éstos tenían participación en la vía de señalización de los receptores TLR. De forma similar, en humanos se ha

reportado que un incremento en miR-592 posee una función de regulación. Es así que Liu y colaboradores (2015), encontraron que este miRNA inhibió la expresión de CCND3 en células de cáncer colorrectal al incrementarse su expresión.

En otras investigaciones de miRNA en sistema inmune, tenemos que Núñez-Hernández y colaboradores (2017), demostraron que en cerdos infectados con el virus de la peste porcina africana (ASF, por sus siglas en inglés) los miRNAs miR-126-5p, miR-92c, miR-92a, miR-30e-5p y miR-500a5p se vieron incrementados mientras que miR-125b, miR-451 y miR-125a fueron disminuidos, determinando además su participación en diversas funciones incluidas las vías de señalización de la respuesta inmune.

En cuanto a modulación de infecciones por parte de miRNAs, Brogaard y colaboradores. (2016), trabajaron con el virus de influenza tipo A (IAV, por sus siglas en inglés) subtipo H1N2 en leucocitos circulantes, y descubrieron que 20 transcritos de miRNAs entre ellos ssc-miR-15a, ssc-miR-21 y ssc-miR-29b, así como una variedad de proteínas participantes de la respuesta inmune como IL-8, IL-10 y receptores TLR, fueron regulados de forma significativa posterior a la infección con el virus. Similar a esto, Brogaard y colaboradores (2018), trabajaron también con el virus IAV subtipo H1N2, aunque enfocado a los pulmones de cerdo, encontrando que posterior a la infección viral, se habían expresado significativamente los miRNAs ssc-miR-18a, hsa-miR-590-3p, ssc-miR-15a, ssc-miR-21 y ssc-miR-29b siendo estos tres últimos encontrados en el estudio anterior, y concluyeron además, que podrían estar relacionados con la modulación de la respuesta al reconocimiento del virus así como al proceso de apoptosis.

Por otro lado, uno de los padecimientos que afectan severamente a los cerdos está relacionado con el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV, por sus siglas en inglés). En la literatura se encuentra reportado diferentes enfoques en los cuales se ha estudiado este virus y una de ellas es la participación de miRNAs. Zhang y colaboradores (2016), demostraron que el miRNA miR-30c era un potente regulador negativo de interferón de tipo 1 (IFN-I), lo que resultaba en una mejora de la infección por el virus PRRSV, encontrando así una manera prometedora de evitar la respuesta inmune mediada por IFN-I. Mientras que Guo y colaboradores (2013), se enfocaron a inhibir la replicación *in vitro* del virus PRRSV en la línea celular de primates MARC-145 utilizando el miRNA miR-181, el cual previamente había sido identificado como un regulador positivo de la respuesta inmune. Asimismo, Fleming y Miller (2019), se enfocaron en el incremento de miRNAs con potencial de acción pro y antiviral encontrando que los miRNAs ssc-miR-125b y

ssc-miR-145-5p, potencialmente podrían predecir un límite en los niveles del virus PRRSV y activar de forma alternativa a macrófagos, respectivamente.

Dentro de la respuesta inmune, se ha visto también la participación de miRNAs en respuesta a probióticos. Archambaud y colaboradores (2012), encontraron que al aplicar tratamientos con *Lactobacillus*, producían cambios en los niveles de expresión de miRNAs como miR-192, miR-200b y miR-215, los cuales se encontraron que eran inhibidos durante una infección por *L. monocytogenes*. Otro estudio por Heydari y colaboradores (2019), emplearon un modelo murino de cáncer de colon inducido por azoximetano, el cual encontraron que tras la inducción, los niveles de los miRNAs miR-135b, miR155 y el gen blanco de estos miRNAs, KRAS, incrementaba, pero que al administrar una preparación de los probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* resultaba en una disminución en los niveles de expresión de dichos elementos. De forma similar, en nuestro grupo de trabajo se ha investigado la relación probióticos-miRNAs. Es así que se ha encontrado la activación del receptor TLR2 por el probiótico Bb12, lo cual tiene efecto en la regulación de la citocina IL-10 así como también se ven implicados una serie de miRNAs entre ellos miR-21-5p, miR-26a-5p, miR671-5p, miR30b-3p y miR-9858-5p (Arenas-Padilla, 2018). Por otro lado, también se ha descubierto que en células dendríticas derivadas de cerdo (moDCs) estimuladas con Bb12, miR671-5p, miR30b-3p y miR-9858-5p disminuyen la expresión de proteínas del sistema inmune como SLA-DR y CD80, mientras que únicamente miR671-5p se encuentra regulando la expresión de IL-10 (Bravo-Parra *et al.*, 2020).

2.4. Señalización de Respuestas

Un mecanismo por el cual la microbiota puede influenciar a las células inmunológicas del intestino es a través de receptores en la superficie celular, denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés), los cuales reconocen estructuras microbianas conservadas (PAMPS, por sus siglas en inglés) en bacterias patógenas y comensales, como son peptidoglicanos, lipopolisacáridos y lipoproteínas (Hawlich y Kohl, 2006). Un tipo de PRRs son los receptores Tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés), los cuales activan principalmente la proteína adaptadora MyD88 para activar factores de transcripción tales como NF- κ B. Los TLRs se

encuentran en una gran cantidad de células, incluidas las del sistema inmune como células dendríticas, macrófagos y células B (Asgari *et al.*, 2018). Generalmente la activación de receptores de superficie celular por bacterias comensales inducen respuestas de tipo tolerogénicas, lo cual resulta como algo fundamental para el mantenimiento del equilibrio intestinal (Runtsch *et al.*, 2014).

La detección a través de PRRs desencadena una serie de respuestas inmunológicas y de activación de vías de señalización; aunado a esta activación, se encuentra la participación de moléculas co-estimuladoras y de proteínas de respuesta, como las citocinas (Purchiaroni *et al.*, 2013). Éstas son proteínas de bajo peso molecular, producidas por una diversidad de células, entre ellas monocitos, macrófagos y células dendríticas (McInnes, 2017). Las citocinas regulan una gran cantidad de procesos celulares, incluidos desarrollo, migración, diferenciación, pero también tienen una participación muy importante en las respuestas innata y adaptativa (Foster, 2001). Dentro de los procesos inflamatorios, una citocina que se encuentra en acción es IL-12, ya que ante un estímulo es producida por el organismo para tratar de desencadenar una respuesta de defensa. Por otro lado, IL-10 es una citocina de función primordial, que se encuentra regulando este tipo de respuestas inflamatorias para tratar de evitar acciones exacerbadas y daños, promoviendo así el equilibrio de la respuesta inmune.

B. animalis subsp. *lactis* Bb12, se ha observado que interacciona con el receptor TLR2 y que además proporciona un efecto de tipo anti inflamatorio. Es así que, Meng y colaboradores (2017) encontraron que en células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) de personas que habían recibido cuatro diferentes tratamientos que incluía al probiótico Bb12 inactivado por calor, en una concentración de $\log_{10} \pm 0.5$ UFC/día, encontraron una disminución de las citocinas pro inflamatorias IL-6 y TNF- α , la cual determinaron pudo ser mediada por el receptor TLR2. Asimismo, en nuestro grupo de trabajo, se demostró que Bb12 indujo la producción de IL-10 en monocitos y células de ganglios mesentéricos en un modelo porcino, a través de la interacción del probiótico con el receptor TLR2 (Arenas-Padilla *et al.*, 2018).

3. HIPÓTESIS

Los miRNAs miR-21-5p, miR-26a-5p y miR-30b-3p son expresados en células de ganglios mesentéricos de cerdo siendo modulada su expresión y la de proteínas involucradas en la respuesta inmune, por el probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Analizar la expresión de los miRNAs miR-21-5p, miR-26a-5p y miR-30b-3p en células de ganglios mesentéricos de cerdo, y determinar si el probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 induce cambios en la expresión de dichos miRNAs y de proteínas involucradas en la respuesta inmune.

4.2. Específicos

- 1) Analizar por citometría de flujo la expresión de proteínas de superficie de membrana CD3, CD21, CD172 y CADM1 en células de ganglios mesentéricos de cerdo estimuladas con el probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12.
- 2) Determinar mediante RT-qPCR diferencias en la expresión relativa de los miRNAs miR-21-5p, miR-26a-5p y miR-30b-3p en células de ganglios mesentéricos de cerdo sin estímulo y estimuladas con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12.
- 3) Cuantificar mediante ELISA la producción de IL-10 e IL-12 en células de ganglios mesentéricos de cerdo estimuladas con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12.
- 4) Cuantificar mediante RT-qPCR la expresión relativa de IL-10 e IL-12 en células de ganglios mesentéricos de cerdo sin estímulo y estimuladas con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cerdos

Se utilizaron cerdos sanos de 6-9 semanas de edad, los cuales se mantuvieron en la granja experimental del Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, Hermosillo, México). Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a agua y alimentos. Los cuidados de los animales se realizaron de acuerdo a los lineamientos de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Los animales se sacrificaron siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, donde se describen los métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. Para la obtención de células mesentéricas se disectaron los animales y se expuso la cavidad abdominal, posteriormente se obtuvieron los ganglios mesentéricos y se colectaron en buffer salino de fosfatos (PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 4.2 mM) y se mantuvieron en hielo hasta su procesamiento en el laboratorio.

5.2. Obtención y Cultivo de Células de Ganglios Mesentéricos

Los ganglios mesentéricos se colectaron en tubos Falcon de 50 mL con 15 mL de PBS frío. Una vez en condiciones asépticas, se maceraron y filtraron a través de una malla de 0.22 µm, seguido de un lavado con PBS. A continuación, se adicionó cloruro de amonio (NH₄Cl; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), para la remoción de eritrocitos presentes en la suspensión celular. Luego se realizó un lavado con PBS para eliminar los residuos de cloruro de amonio. Finalmente, para su almacenamiento se resuspendieron las células en medio de congelación compuesto por dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; Invitrogen Co., EUA), suero fetal bovino (SFB; Gibco, EUA) al 40% y dimetil sulfóxido (DMSO; Gibco, EUA) al 30% y se almacenaron a -70°C hasta su posterior uso (10x GENOMICS, 2019).

Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 5000 UI/mL de penicilina, 5 µg/mL estreptomicina y 5 µg/mL de anfotericina (antibióticos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) y 20 % de SFB, a temperatura de 37°C con 5% de CO₂. Para la determinación de la viabilidad celular se realizó una tinción de exclusión de azul de tripán (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

5.3. Cultivo de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12

El cultivo de Bb12 se realizó en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS; BD Difco, Sparks, MD, EUA) suplementado con 0.05% de cisteína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 37°C por 5 días con una resiembra a las 72 horas, en condiciones de anaerobiosis utilizando tabletas efervescentes para la producción de CO₂, tal como se describe en los trabajos de Pérez y colaboradores (2012) y Bravo-Parra y colaboradores (2020). El pellet bacteriano se lavó con PBS y la concentración de bacterias se determinó mediante una curva de correlación, utilizando la densidad óptica (600 nm) y la ecuación $y = 5 \times 10^9 X + 0.052$, obtenida en los ensayos preliminares.

5.4. Estimulación de Células de Ganglios Mesentéricos con Bb12

Las células de ganglios mesentéricos se cultivaron en una placa de cultivo de 24 pozos colocando 2×10^6 células totales; mientras que el probiótico se añadió en una cantidad de 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 y 10^4 UFC/mL (relación célula:bacteria de 1:100, 1:10, 1:1, 10:1 y 100:1, respectivamente) para los experimentos de citometría de flujo, mientras que para RT-qPCR y ELISA, basado en los resultados de citometría de flujo, se agregó el probiótico en concentraciones de 10^5 y 10^4 UFC/mL (relación célula:bacteria de 10:1, 100:1, respectivamente). Los tiempos de incubación fueron de 4 h para los experimentos de RT-qPCR y 24 h para los ensayos de citometría de flujo y ELISA.

5.5. Análisis de Proteínas de Superficie de Membrana por Citometría de Flujo

La determinación de las proteínas de superficie de membrana se realizó empleando la técnica de citometría de flujo, siguiendo el protocolo descrito por Parra-Sánchez y colaboradores (2018). Para lo cual, previo al marcaje, las células fueron bloqueadas con 10% de suero porcino por 10 min a 25°C; después se agregó 2 mL de PBS con EDTA 2 mM (PBS/EDTA) y se centrifugó a 1,400 rpm, por 8 min a 25°C. Posteriormente, las células fueron incubadas con los anticuerpos anti-CD3 (IgG1, clon 145-2C11; Southern Biotech, EUA), anti-CD21 (IgG1, clon BB6-11C9.6; Southern Biotech, EUA), anti-CADM1 (IgY, clon 3E1; MBL, Japón) y anti-CD172a (IgG2b, clon 742215^a; Monoclonal Antibody Center, EUA). A continuación, fueron agregados los anticuerpos secundarios: anti-IgG1 PE (Phycoerythrin, BioLegend, EUA) anti-IgG1 FITC (5/6-fluorescein isothiocyanate, BioLegend, EUA), anti-IgG2b Alexa-Fluor 647 (BioLegend, EUA) y biotina (BioLegend, EUA). Finalmente se agregó BV421 (Streptavidin-Brilliant Violet, BioLegend, EUA). Todos los anticuerpos fueron utilizados en relación 1:100 con excepción de anti-IgG2b Alexa-Fluor 647, empleado en relación 1:200. Las incubaciones con los anticuerpos se realizaron por periodos de 15 min a temperatura ambiente, seguido de dos lavados con PBS/EDTA a 1,400 rpm, por 10 min a 25°C. La adquisición y análisis de los datos se realizaron en el citómetro de flujo FACSCanto II™ (BD Biosciences, San José, CA, EUA) utilizando el programa FACSDiva ver. 2.9 (BD Biosciences, San José, CA, EUA).

5.6. Determinación de la Expresión Relativa de miRNAs por RT-qPCR

La cuantificación de la expresión relativa se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). El RNA se obtuvo utilizando TRIsure (Meridian Life Science Inc, Memphis, TN, EUA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para determinar la concentración y pureza del RNA, se empleó un NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). El RNA total se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

Para la síntesis de cDNA a partir del RNA total extraído, se realizaron reacciones de transcripción

reversa (RT), para lo cual se elaboró una mix de RT universal empleando buffer PAP 10X, ATP 1mM, Primer RT 10 µM, mix de dNTPS 1mM, MU-LV RT y la polimerasa Poly (A) por reacción, en un volumen final de 10 µl. Para la reacción de síntesis se utilizó un termociclador MJ mini[®] (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA), con el siguiente protocolo de corrida: 60 min a 37°C y 5 min a 95°C. Finalmente, se almacenaron a -20°C.

Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en un termociclador QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) en un volumen final de 10 µl, incluyendo 2 µl de la enzima HOT FIREPol[®]Eva Green[®] (Solis Biodyne, Tartu, EE, UE), 1 µl de cada primer a 10 µM, 1 µl de cDNA (10 ng totales) y 5 µl de agua ultrapura. Los niveles de expresión relativa fueron determinados mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, y se empleó el gen constitutivo snRNA U6 para la normalización de los datos. En el Cuadro 1 se muestra las secuencias de los miRNAs, para lo cual se empleó la base de datos miRBase.

Cuadro 1. Secuencias de iniciadores sentido y anti-sentido empleados en la determinación de la expresión relativa.

miRNA	Número de acceso miRbase	Iniciador sentido	Iniciador antisentido
ssc-miR-21-5p	MIMAT0002165	GCAGTAGCTTATCAGAC TGATG	CAACTTTTTTTTTT TTTTTGACCTGG
ssc-miR-26a-5p	MIMAT0002135	CGAGTTCAAGTAATCCA GGA	CCAGTTTTTTTTTT TTTTTAGCCTATC
ssc-miR-30b-3p	MIMAT0015269	GCTGGGAGGTGGATGT	CAGGTCCAGTTTT TTTTTTTTTTTAAG

5.7. Cuantificación de IL-10 e IL-12 en Sobrenadantes de Cultivos Celulares por ELISA

Posterior a la estimulación por 24 h de las células de ganglios mesentéricos con el probiótico, se colectaron los sobrenadantes los cuales se centrifugaron para remover las células. La producción de IL-10 e IL-12 se determinó mediante el kit de ELISA DuoSet[®] (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para esto, se colocaron 100 µl de la dilución del anticuerpo de captura por pozo y se incubó durante toda una noche a temperatura ambiente

(TA). Al día siguiente se lavaron los pozos con una solución de PBS y Tween 20 al 0.05 % y se bloquearon con 300 μ l de una solución de PBS y albúmina al 0.5 % (Research Organics Inc, Cleveland, OH, EUA) durante 2 h. Después, se lavó la placa y se agregaron 100 μ l de muestra por pozo, y se incubó por 2 h a TA. Luego, se lavó y se añadieron 100 μ l de la dilución del anticuerpo de detección a cada pozo, y se incubó por 2 h a TA. Posteriormente, se realizaron lavados y se agregó 100 μ l a cada pozo de la mezcla de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (Streptavidin-HRP, por sus siglas en inglés) y se incubó por 20 min en obscuridad y a TA. Por último, se realizó un lavado de la placa, se le añadieron 100 μ l del sustrato 3,3',5,5' tetrametilbencidina (TMB) y se incubó por 20 min en obscuridad a TA. Para detener la reacción se agregó H_2SO_4 2N. La lectura se realizó dentro de los primeros 15 min. a 450 nm en un lector de Microplacas BenchMark (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA).

5.8. Cuantificación de la Expresión Relativa de IL-10 e IL-12 por RT-qPCR

La cuantificación de la expresión relativa de las citocinas se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). El RNA se obtuvo utilizando TRIsure (Meridian Life Science Inc, Memphis, TN, EUA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para determinar la concentración y pureza del RNA, se empleó un NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). El RNA total se almacenó a $-20^{\circ}C$ hasta su posterior uso.

Las reacciones de RT-qPCR se realizaron por duplicado en un termociclador StepOne (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) empleando el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR[®] Green QRT-PCR Master Mix. (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). El volumen final de reacción fue de 20 μ l, donde se añadió 1.5 μ l de RNA (15ng), 4.8 μ l de H_2O ultrapura, 0.25 μ l de primer sentido y antisentido (10 μ M), 12.5 μ l de la mix, 0.2 μ l del gen constitutivo DDT y 0.5 μ l de la enzima. Los niveles de expresión relativa fueron determinados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, y se emplearon los datos del gen constitutivo DDT, que codifica para la proteína D-dopacromo tautomerasa, para la normalización de los mismos.

5.9. Análisis Estadístico

Los experimentos se realizaron al menos por triplicado y de forma independiente. Para el análisis estadístico se utilizaron los softwares NCSS 2007 (NCSS, LLC, Kaysville, UT, EUA) y GraphPad Prism versión 6.1 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, EUA). Para esto, se realizó un análisis descriptivo de los datos, encontrándose un comportamiento normal (Kurtosis). Además, se buscaron efectos significativos mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA); para determinar diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó el método de Fisher-LSD para la comparación de medias considerando como significativo $p < 0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Expresión de Proteínas de Superficie de Membrana

Las células presentadoras de antígeno (APCs, por sus siglas en inglés) se caracterizan por procesar y presentar antígenos en conjunto con otras moléculas como son MHC de clase I y II, para que puedan ser reconocidas en la superficie celular por receptores de células linfocitarias. Dentro de las principales APC, se encuentran las células dendríticas, macrófagos y células B (Cruse *et al.*, 2004). Enfocándonos en las células dendríticas, encontramos que existen dos poblaciones principales: las plasmocitoides (pDCs) y las convencionales o clásicas (cDCs). Para la caracterización de células dendríticas, se utiliza la búsqueda de moléculas de superficie, como son el antígeno mielomonocítico SWC3 (CD172a), la proteína presentadora de antígeno de clase II (MHCII) y la molécula de adhesión celular CADM1; en este sentido, en el trabajo realizado por Parra-Sánchez y colaboradores (2018), caracterizaron los subtipos cDC1 y cDC2 de células convencionales en diferentes tejidos incluyendo ganglios mesentéricos en cerdo, encontrando los siguientes fenotipos: cDCs ($\text{MHCII}^{\text{alto}}\text{CADM1}^{\text{alto}}\text{CD3}^{-}\text{CD21}^{-}\text{CD163}^{-}$), cDC1 ($\text{MHCII}^{\text{alto}}\text{CADM1}^{\text{alto}}\text{CD172}^{-/\text{bajo}}$) y cDC2 ($\text{MHCII}^{\text{alto}}\text{CADM1}^{\text{alto}}\text{CD172}^{+}$).

En el presente trabajo, se utilizó la estrategia de selección celular por tamaño y complejidad, posteriormente se eligieron las células con fenotipo $\text{CD3}^{-}\text{CD21}^{-}$ seguido de la selección de la población celular con fenotipo $\text{CD172}^{+/-}\text{CADM1}^{+}$, tal como se muestra en la Figura 2.

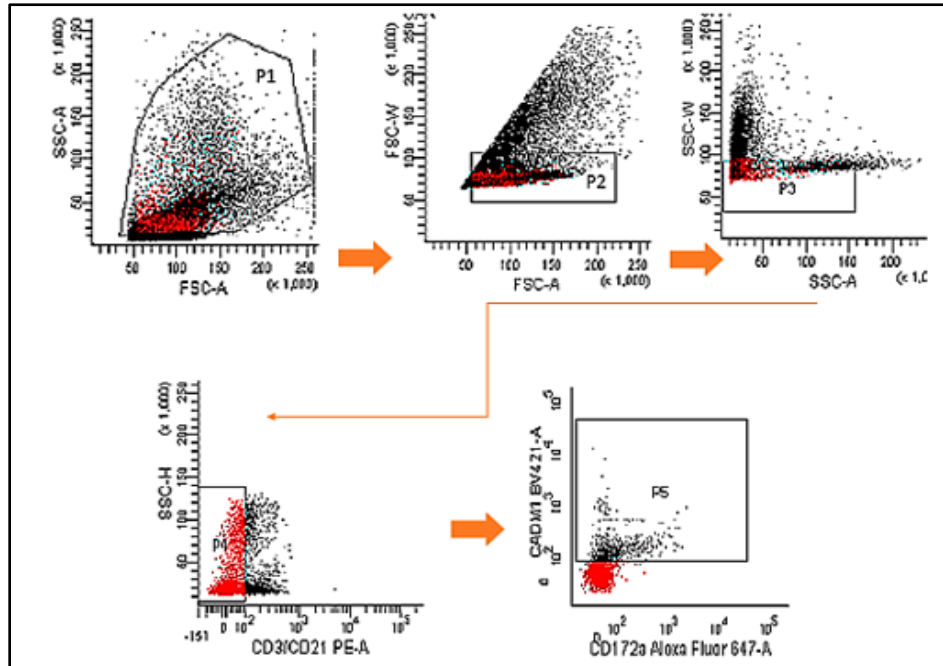


Figura 2. Estrategia de análisis de proteínas de membrana por citometría de flujo. Las gráficas muestran un ejemplo representativo de cómo se llevó a cabo la selección de la población y el análisis de cada molécula. P1: total de células adquiridas y área seleccionada; P2 y P3: comprobación de la población seleccionada de acuerdo a tamaño y complejidad; P4: análisis de selección de CD3⁻CD21⁺; P5: análisis de la población CD172⁺/CADM1⁺.

El porcentaje de células dendríticas en el tratamiento sin estímulo fue de 16 %, mientras que las concentraciones bajas del probiótico como 10^4 y 10^5 UFC/mL fueron de 11-12 %, en tanto la concentración de 10^6 UFC/mL fue de 9 %; estos tres tratamientos mantuvieron sin cambios significativos el porcentaje de células dendríticas, comparados con el tratamiento sin estímulo (SE), tal como se muestra en la Figura 3. Resultados similares se han encontrado en el trabajo de Baglatzi y colaboradores (2015), donde se comparó el efecto de una dosis infantil que contenía una dosis baja (10^4 UFC/g) del probiótico *Bifidobacterium lactis* con una dosis regular (10^7 UFC/g), determinando que no se presentaba una diferencia significativa en parámetros inmunológicos al utilizarse una concentración menor del probiótico. Es importante no descartar la utilización de concentraciones bajas de probióticos en las investigaciones, debido a que la microbiota que se encuentra en el intestino delgado presenta una menor densidad (10^3 - 10^7) al compararse con la microbiota encontrada en el colon (10^{11} - 10^{12}), además de que el sistema inmunológico asociado a mucosas se encuentra localizado en el intestino delgado y de que las concentraciones bajas de bacterias son consideradas como suficientes para interactuar con la mucosa y desencadenar

acciones por parte del sistema inmune (El Aidy *et al.* 2015).

Por otra parte, los tratamientos del probiótico utilizados en una mayor concentración (10^7 y 10^8 UFC/mL) resultaron en una disminución significativa ($p < 0.05$) del porcentaje de células dendríticas siendo 5 % y 2 % para cada uno de los tratamientos respectivamente, comparados con el tratamiento sin estímulo (SE). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Duarte-Gutiérrez (2015), donde al estimular células de ganglios mesentéricos con una concentración de 6×10^8 UFC/mL observó, mediante citometría de flujo, una disminución en la cantidad de células APCs analizadas.

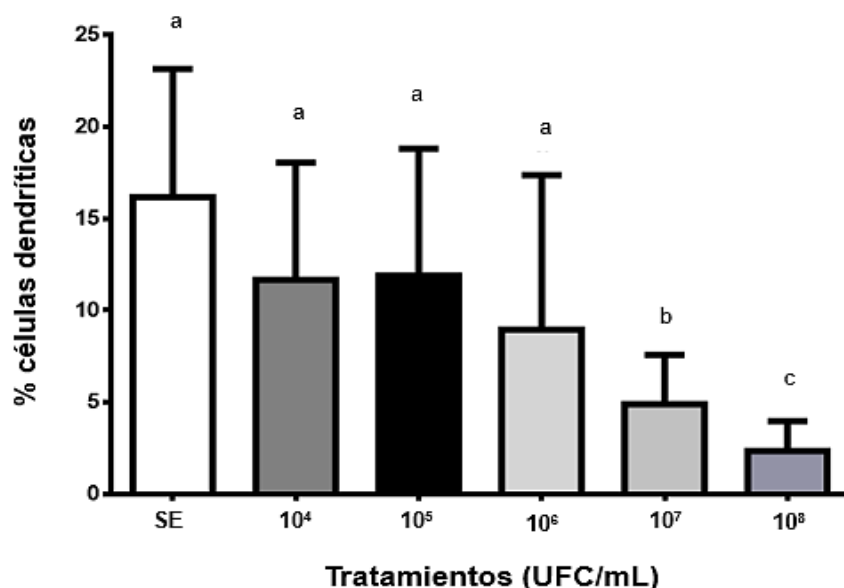


Figura 3. Porcentajes de células dendríticas de ganglios mesentéricos estimuladas con diferentes concentraciones del probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 UFC/mL) con respecto al tratamiento sin estímulo (SE). Los gráficos representan las medias y la desviación estándar ($n=4$) del porcentaje inducido por los distintos tratamientos. Literales distintas representan diferencias entre tratamientos (ANOVA, Fisher-LSD) $p < 0.05$.

6.2. Análisis de la Expresión de miRNAs por RT-qPCR

Dentro de los mecanismos empleados por probióticos para ejercer sus efectos, se encuentran los mediados por miRNAs. Estas pequeñas secuencias de RNA no codificante, poseen una gran cantidad de funciones dentro de los organismos, siendo la regulación de la expresión génica una de

sus principales funciones y una de las más estudiadas. Diferentes estudios han observado la capacidad de probióticos para modular la expresión de miRNAs, siendo considerada de gran importancia el tipo de moderación hospedero-microbiota que cumplen estos elementos. Además, se considera que los probióticos son reguladores o amplificadores en los niveles de expresión de miRNAs, y se cree que estos elementos podrían ser una parte central dentro de los mecanismos moleculares utilizados por probióticos para mantener el equilibrio intestinal.

En el presente estudio, las células de ganglios mesentéricos se estimularon por periodo de 4 h con una concentración de Bb12 de 10^4 y 10^5 UFC/mL y se utilizó una cuantificación relativa, empleando el gen de referencia U6. Se encontró la expresión de los tres miRNAs en las células de ganglios mesentéricos: miR-21-5p, miR-26a-5p y miR-30b-3p. En comparación con resultados previos de nuestro grupo de trabajo, realizados en monocitos y células dendríticas derivadas de monocitos de cerdo, nuestros resultados representan un hallazgo relevante y diferencial con respecto a la expresión de estos elementos en diversos tipos celulares. Por otro lado, al estimular con el tratamiento de 10^4 UFC/mL de Bb12, se observó una disminución en la expresión de miR-30b-3p entre tratamientos ($p < 0.05$), pero no con respecto al tratamiento sin estimular (SE). Asimismo, no hubo cambios en la expresión de miR-21-5p y miR-26a-5p al estimular las células con la concentración de 10^5 UFC/mL de Bb12, tal como se muestra en la Figura 4. Nuestros resultados difieren a lo reportado por Arenas-Padilla y colaboradores (2020), los cuales encontraron la disminución de miR-21-5p y el aumento de miR-26a-5p tras estimular monocitos porcinos con el probiótico Bb12 en una relación 1:100 (célula-bacteria). Esto contrasta con los resultados de nuestro estudio, ya que miR-21-5p y miR-26a-5p demostraron no depender de concentraciones bajas del probiótico Bb12 para proporcionar su expresión en células de ganglios mesentéricos de cerdo; sin embargo, es muy probable que para generar una modulación en su expresión se necesiten cantidades mayores del probiótico a las empleadas. Asimismo, Bravo-Parra y colaboradores (2020), encontraron el incremento de miR-30b-3p, miR-671-5p y miR-9858-5p en moDCs provenientes de sangre periférica de cerdo, al estimularlos con una concentración del probiótico Bb12 en relación 1:100 (célula-bacteria). Esto difiere con nuestros resultados, ya que los niveles de expresión de miR-30b-3p se mantuvieron constantes con respecto al tratamiento sin estímulo (SE).

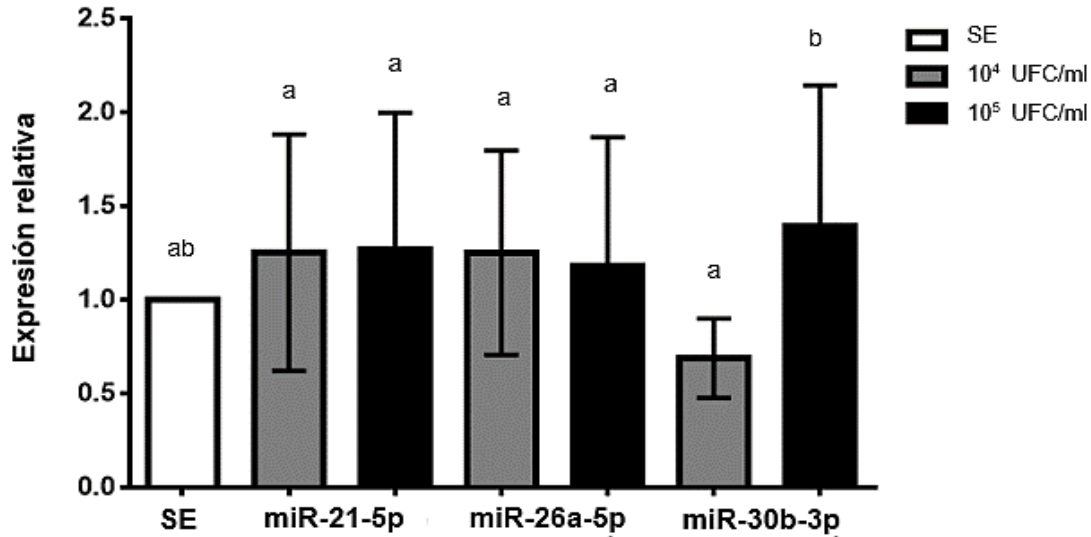


Figura 4. Expresión relativa de miR-21-5p, miR-26a-5p y miR-30b-3p en células de ganglios mesentéricos de cerdo, estimuladas durante 4 h por los diferentes tratamientos del probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 con respecto al tratamiento sin estímulo (SE). Los gráficos representan las medias y la desviación estándar (n=3). Literales distintas representan diferencias entre tratamientos (ANOVA, Fisher-LSD) $p < 0.05$.

miR-21-5p se encuentra involucrado en una gran cantidad de procesos celulares, como proliferación celular, migración y metástasis, por citar algunos. Ha sido ampliamente estudiado, y es considerado como un onco-miRNA al encontrarse una relación entre cambios en sus niveles de expresión en tumores cancerígenos y el avance de la enfermedad en los pacientes; asimismo, se ha observado su relación con padecimientos cardiovasculares al incrementar la fibrosis e hipertrofia cardíaca (Jenike y Halushka, 2021). Se considera que este miRNA es uno de los más abundantes siendo además expresado por la mayoría de las células; sin embargo, su expresión suele diferir dependiendo del tipo celular (McCall *et al.*, 2016; de Rie *et al.*, 2017). En cerdo, se ha visto implicado en la regulación de la proliferación, apoptosis y migración de células del epitelio endometrial, como modelo de estudio de disfunciones miocárdicas y de implantación embrionaria (Hua *et al.*, 2020; Hinkel *et al.*, 2020; Hong *et al.*, 2019). Asimismo, se ha encontrado su expresión en PBMCs de cerdo, al ser estimuladas con lipopolisacárido (LPS) durante 8 h, determinando que 228 nuevos miRNAs que no habían sido enlistados en miRBase anteriormente, entre ellos miR-21, había sido además, uno de los miRNAs más abundantes en la investigación (Zhang *et al.*, 2020). De igual forma, también se ha reportado que en células del sistema inmunológico como macrófagos, monocitos y células dendríticas, este miRNA presenta los mayores niveles de

expresión (McCall *et al.*, 2016; de Rie *et al.*, 2017). Por otro lado, en investigaciones relacionadas con probióticos y miR-21, Nakata y colaboradores (2017), determinaron el rol clave de miR-21-5p en la regulación de la barrera intestinal al encontrar que las bacterias comensales indujeron la expresión de este miRNA en células epiteliales intestinales (IEC, por sus siglas en inglés), incrementando también la permeabilidad de la barrera intestinal. Rahbar Saadat y colaboradores (2020), encontraron una función moduladora del microorganismo *Lactococcus lactis* aislado de la vagina, sobre los miRNAs miR-21 y miR-200b y el receptor tipo toll TLR4, al correlacionar la disminución en su expresión en células de cáncer de ovario CAO-4, con un incremento en la inducción de apoptosis.

Por otro lado, miR-26a-5p es un miRNA involucrado principalmente en procesos de formación de tumores, actuando como un oncomiRNA y también como supresor de actividad tumoral, al verse sobre expresada o disminuida su expresión. También, se ha determinado la participación de miR-26 en el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular de diferentes tejidos (Gao y Liu, 2011). En cerdo se ha encontrado regulando el desarrollo de infección por *Salmonella*, suprimiendo el proceso de autofagia en células Sertoli, e impidiendo la replicación del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS, por sus siglas en inglés) al activar la inmunidad innata, específicamente la vía de señalización del Interferón 1 (IFN-1) (Yao *et al.*, 2016; Ran *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2015). En relación con probióticos, Heydari y colaboradores (2019) analizaron el posible mecanismo molecular de acción (mediante miRNAs) de dos probióticos: *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*, en un modelo murino, para lo cual utilizaron 4 grupos: control, ratones inducidos con cáncer de colon con azoximetano (AMO, por sus siglas en inglés), *L. acidophilus* y *B. bifidum*; en estos dos últimos grupos la cantidad de probiótico utilizada fue de 1×10^9 UFC/g, encontrando que la expresión de miR-26 disminuyó en el grupo AMO y el consumo de los probióticos incrementó su expresión. Demont y colaboradores (2016), utilizaron PBMCs de humano y estimularon con el probiótico *Lactobacillus paracasei* en su forma viva o inactivada por calor, encontrando una diferencia en la expresión de miRNAs, entre ellos miR-26a-5p.

Mientras tanto, miR-30b-3p es un miRNA implicado en una gran cantidad de patogénesis de diversas enfermedades como son cáncer, desordenes metabólicos y enfermedades cardiovasculares; otras de sus funciones también se relacionan con procesos celulares como diferenciación y desarrollo (Zhang *et al.*, 2021). De igual forma, se ha observado la participación de miR-30b en procesos inflamatorios, incluyendo la regulación de la función fisiológica de células

dendríticas y macrófagos, procesamiento de antígenos, producción de citocinas y otras respuestas del sistema inmune (Naqvi *et al.*, 2016; Fordham *et al.*, 2015; Naqvi *et al.*, 2015). En cuanto al estudio de miR-30b y probióticos, Arenas-Padilla (2018), estimuló monocitos de cerdo con el probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 y analizó mediante un microarreglo la expresión de 407 miRNAs, de los cuales miRb-30b-3p presentó un incremento en sus niveles de expresión.

Las diferencias entre los trabajos mencionados anteriormente y nuestro estudio, radican en el tipo celular, la concentración de probiótico utilizada, tiempos de estimulación, entre otros aspectos. Por lo que, la expresión de los miRNAs estudiados, sin presentar algún aumento o disminución considerable con respecto al tratamiento control, en células de ganglios mesentéricos, pudiera estar relacionado a que la expresión de miRNAs suele ser tejido e incluso célula específica (del Pozo-Acebo *et al.*, 2021). De igual forma, la concentración de probióticos utilizada pudo ser un factor determinante para la expresión de estos elementos, ya que se ha visto ligada a los cambios en los niveles de expresión génica de miRNAs.

6.3. Cuantificación de Citocinas en Sobrenadantes de Cultivos Celulares por ELISA

IL-10 es una citocina considerada de gran importancia en la regulación de la función inmunológica, siendo imprescindible su participación en el control de las cascadas inflamatorias al suprimir la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-12. Ambas citocinas son producidas por una gran cantidad de células, principalmente APCs, como son macrófagos, células B y células dendríticas. Asimismo, se ha observado la estrecha relación que posee la utilización de probióticos con estas citocinas, al promover la producción de proteínas antiinflamatorias como IL-10 y suprimir o limitar la expresión de proteínas proinflamatorias como IL-6 o IL-12. Esto es uno de los principales efectos que se estudia en las investigaciones relacionadas con probióticos, su capacidad moduladora de la respuesta inmune, mediante la producción de citocinas.

Para la cuantificación de las citocinas en sobrenadantes de cultivos celulares de ganglios mesentéricos de cerdo, se utilizaron dos concentraciones del probiótico Bb12: 10^4 y 10^5 UFC/mL (relación célula:bacteria de 100:1 y 10:1, respectivamente) por un periodo de 24 h. No se presentaron diferencias significativas en la producción de IL-10, tal como se muestra en la Figura

5. En contraste a nuestros resultados, se ha observado en diferentes investigaciones que una de las características principales del probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 es su capacidad de incrementar la expresión de IL-10. Sheiki y colaboradores (2016) utilizaron los probióticos Bb12 y *Lactobacillus acidophilus* LA-5 inactivados mediante UV, en relación 1:100 y 1:50 (célula-bacteria) en células PBMCs provenientes de pacientes con colitis ulcerosa, encontrando un incremento significativo de IL-10. Asimismo, Hepburn y colaboradores (2013), proporcionaron un suplemento compuesto por tres probióticos: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium bifidum* a personas sanas, y determinaron la producción de citocinas *ex vivo*, encontrando un incremento de IL-10 y TGF- β .

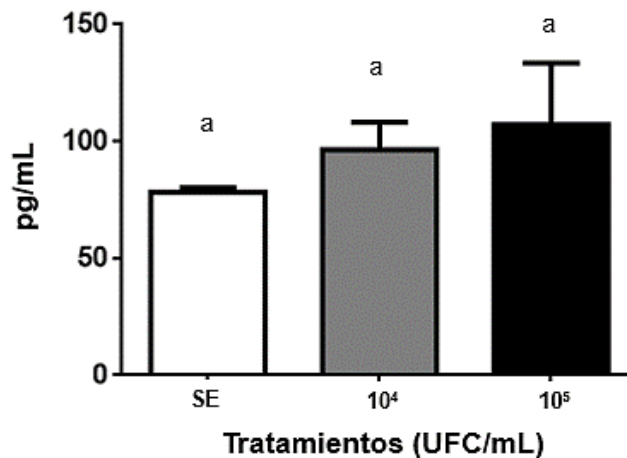


Figura 5. Cuantificación de IL-10 en sobrenadantes de cultivo celular. Las células de ganglios mesentéricos de cerdo fueron estimuladas durante 24 h con las diferentes concentraciones del probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 y un tratamiento sin estímulo (SE). Los gráficos representan las medias y la desviación estándar (n=3) de la concentración inducida por los distintos tratamientos. Literales distintas representan diferencias entre tratamientos (ANOVA, Fisher-LSD) $p < 0.05$.

De forma similar para IL-12, en los dos tratamientos del probiótico empleado en nuestro estudio (10^4 y 10^5 UFC/mL), la producción de la citocina no presentó un cambio en su concentración, manteniéndose constante la producción de IL-12, comparada con tratamiento sin estímulo (SE), tal como se muestra en la Figura 6. Estos resultados son similares a los encontrados por Bárcenas-Preciado (2020), donde se estimularon moDCs porcinos con el probiótico Bb12 en una concentración mayor (10^7 UFC/mL), sin cambios significativos en la concentración de IL-12. Por

otro lado, Falalyeyeva y colaboradores (2017), encontraron una disminución en la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 e IL-12 y un incremento de citocinas antiinflamatorias en un modelo murino estimulado con los probióticos *Lactobacillus casei* IMV, *Bifidobacterium animalis* VKL y *Bifidobacterium animalis* VKB. Sin embargo, esto difiere con nuestros resultados ya que la relación IL-10/IL-12 se mantuvo constante sin presentarse una variación en alguna de las dos citocinas. Con base a lo mencionado anteriormente, es posible hipotetizar que son diversos los factores que pueden intervenir en los ensayos de estimulación con probióticos, tales como el estado del probiótico (vivo, inactivo, entre otros), tipo celular, tipo del probiótico, la cantidad de células y bacterias a utilizar, así como los periodos de estimulación.

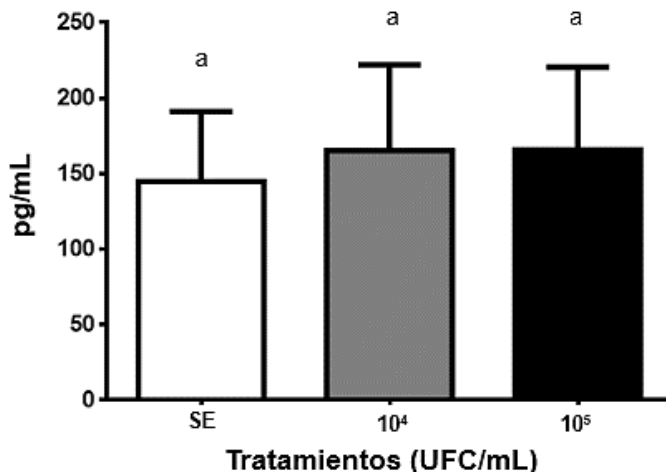


Figura 6. Cuantificación de IL-12 en sobrenadantes de cultivo celular. Las células de ganglios mesentéricos de cerdo fueron estimuladas durante 24 h con las diferentes concentraciones del probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 y tratamiento sin estímulo (SE). Los gráficos representan las medias y la desviación estándar (n=3) de la concentración inducida por los distintos tratamientos. Literales distintas representan diferencias entre tratamientos (ANOVA, Fisher-LSD) $p < 0.05$.

6.4. Cuantificación de Citocinas por RT-qPCR

Para la cuantificación de citocinas por RT-qPCR, se estimularon las células de ganglios mesentéricos por un periodo de 4 h. Dentro de los resultados, se obtuvo que la expresión de IL-10 e IL-12, utilizando los dos tratamientos del probiótico (10^4 y 10^5 UFC/mL), fue similar al

tratamiento sin estímulo (SE), tal como se muestra en la Figura 7. Esto difiere a los resultados descritos en el estudio de Duarte-Gutiérrez (2015), donde se emplearon células de ganglios mesentéricos estimuladas con una concentración mayor de Bb12 (6×10^8 UFC/mL), encontrando un incremento significativo en la expresión del RNAm de IL-10, a las 8 h de estimulación con el probiótico. De igual forma, en el trabajo realizado por Arenas-Padilla y colaboradores (2018), emplearon la misma cantidad de Bb12 (6×10^8 UFC/mL) para estimular monocitos provenientes de sangre periférica de cerdo, encontrando de forma similar, un incremento en la expresión de RNAm de IL-10 tras estimular las células con el probiótico por un periodo de 4 h. Por lo tanto, es posible hipotetizar que la cantidad de probióticos, la cantidad y tipo celular y el tiempo de estimulación utilizados, tienen un papel importante en los efectos presentados por el probiótico, eso explicaría que no se presentara un incremento en los niveles de RNAm de IL-10 en nuestro estudio.

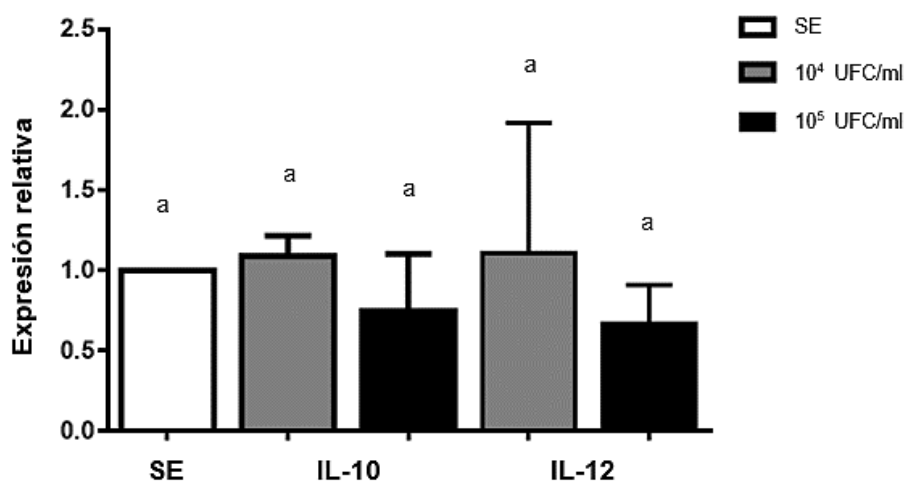


Figura 7. Expresión relativa de las citocinas IL-10 e IL-12 en células de ganglios mesentéricos de cerdo, estimuladas durante 4 h por los diferentes tratamientos del probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 con respecto al tratamiento sin estímulo (SE). Los gráficos representan las medias y la desviación estándar (n=3). Literales distintas representan diferencias entre tratamientos (ANOVA, Fisher-LSD) $p < 0.05$.

Asimismo, en los resultados presentados, se puede observar una correlación en el comportamiento de las citocinas. Esto pudiera deberse a la naturaleza reguladora de IL-10; se sabe que esta citocina regula de forma negativa la expresión de IL-12 (D'Andrea *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 2015). El balance en la expresión de IL-10/IL-12, en modelos de respuesta inmune ha sido considerado como un

parámetro valioso para la determinación de propiedades modulatorias de los microorganismos (Gad *et al.*, 2011; Foligne *et al.*, 2007; Christensen *et al.*, 2002). Citar y colaboradores (2015), encontraron un aumento en la expresión de IL-10 y una disminución de IL-6 e IL-12 al utilizar el probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* IM386 con presencia o ausencia de LPS en la línea celular de humano THP-1. Por otro lado, las leves diferencias presentadas entre los tratamientos de Bb12 utilizados (10^4 y 10^5 UFC/mL) también pudieran ser explicadas dado que los efectos proporcionados por probióticos están ampliamente influenciados por la dosis empleada y los efectos pueden variar de una concentración utilizada a otra. En este sentido, es frecuente que en investigaciones relacionadas con probióticos se excluyan comparaciones de diferentes dosis de un mismo probiótico, debido a que el enfoque suele ser principalmente sobre al efecto que éste posee empleando una sola concentración del mismo. En este sentido, Wen y colaboradores (2012), emplearon concentraciones bajas (10^3 - 10^6) y una alta (10^9) del probiótico *Lactobacillus acidophilus* en un modelo porcino gnotobiótico, encontrando diferencias en la respuesta inmune: las dosis bajas promovieron la producción de IFN- γ , disminuyeron respuesta de células Treg y producción de IL-10; mientras que dosis altas incrementaron respuestas por parte de células Treg. En el presente estudio se utilizaron concentraciones menores del probiótico puesto que se observó una disminución en la cantidad de células dendríticas, además de una pérdida de viabilidad celular al utilizar las concentraciones reportadas en trabajos previos; por tal motivo, se decidió cuidar tanto el número como la viabilidad celular para los experimentos de estimulación con el probiótico. Se consideró que la concentración de citocinas en otros trabajos, podría haber sido producto de una sobreestimulación que pudiera haber desencadenado un perfil de citocinas derivado del número de bacterias más que por el efecto de interacción con la célula. En el caso de las células provenientes de ganglios mesentéricos estimuladas con Bb12, las concentraciones bajas del probiótico no generaron una respuesta por parte del sistema inmune, al no presentarse una producción ni expresión de IL-10 e IL-12. Asimismo, se encontró que las concentraciones bajas de Bb12 resultaron en la expresión de los miRNAs estudiados, pero no generaron cambios en su expresión.

7. CONCLUSIONES

En conclusión, las células de ganglios mesentéricos de cerdo estimuladas con el probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 expresan los miRNAs miR-21-5p, miR-26a-5p y miR-30b-3p; no obstante, el probiótico no fue capaz de modular la expresión de dichos elementos ni de las proteínas involucradas en la respuesta inmune (IL-10 e IL-12) al utilizarse en dosis bajas (10^4 y 10^5 UFC/mL). En concentraciones mayores del probiótico (10^7 y 10^8 UFC/mL) se generó una modulación al disminuir significativamente el porcentaje de proteínas de superficie celular. Por lo tanto, la concentración de probióticos utilizadas en investigaciones relacionadas con estimulación celular, es un factor determinante y a tomarse en gran consideración sobre todo en estudios con probióticos y miRNAs, por lo cual es de suma importancia la inclusión de ensayos con concentraciones bajas y altas en este tipo de investigaciones. En el presente estudio, es muy probable que la expresión de estos elementos y proteínas de respuesta inmune sea dependiente de cantidades mayores a 10^7 UFC/mL del probiótico Bb12 en células de ganglios mesentéricos; sin embargo, es necesario la realización de más investigaciones al respecto.

8. REFERENCIAS

- 10x GENOMICS. 2019. Fresh frozen human PBMCs for single cell RNA sequencing. Document CG00039 Rev E. Recuperado de: support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/sample-prep
- Archambaud, C., Nahori, M. A., Soubigou, G., Bécavin, C., Laval, L., Lechat, P., Smokvina, T., Langella, P., Lecuit, M., y Cossart, P. 2012. Impact of lactobacilli on orally acquired listeriosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(41), 16684–16689.
- Arenas-Padilla, M., Duarte-Gutiérrez, J.L. y Mata Haro, V. 2018. *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 induces IL-10 through cell membrane-associated componentes via TLR2 in swine. *Journal of Applied Microbiology*. 125 (6): 1881-1889.
- Arenas-Padilla, M., González-Rascón, A., Hernández-Mendoza, A., Calderón de la Barca, A.M., Hernández, J. y Mata-Haro, V. 2021. Immunomodulation by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12: integrative analysis of miRNA expression and TLR2 pathway-related target proteins in swine monocytes. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 1-13.
- Asgari, F., Falak, R., Teimourian, S., Pourakbari, B., Ebrahimnezhad, S., y Shekarabi, M. 2018. Effects of oral probiotic feeding on toll-like receptor gene expression of the chicken's cecal tonsil. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*. 6(2):151–157.
- Baglatzi, L., Gavriili, S., Stamouli, K., Zachaki, S., Favre, L., Pecquet, S., Benyacoub, J. y Costalos, C. 2016. Effect of infant formula containing a low dose of the probiotic *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 on immune and gut functions in c-section delivered babies: a pilot study. *Clinical Medical Insights*. 10:11-19.
- Bárcenas-Preciado, V. 2020. Análisis de proteínas de señalización de la vía TLR2 en células dendríticas derivadas de monocitos de cerdo estimuladas con *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 (tesis de maestría). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Sonora, México.
- Bergamann, K.R., Liu, S.X.L., Tian, R., Kushnir, A., Turner, J.R., Li, H.L., Chou, P.M., Weber, C.R., De Plaen, I.G. 2013. Bifidobacteria stabilize claudins at tight junctions and prevent intestinal barrier dysfunction in mouse necrotizing enterocolitis. *The American Journal of Pathology*. 182(5):1595-1606.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorrente, C. y Gil, A. 2012. Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 61(2):160-174.
- Bhaskaran, M. y Mohan, M. 2014. Micro RNAs: history, biogénesis, and their evolving role in animal development and disease. *Veterinary pathology*. 51(4): 759-774.
- Bravo-Parra, M., Arenas-Padilla, M., Bárcenas-Preciado, V., Hernández, J. y Mata-Haro, V. 2020. The probiotic Bb12 induces MicroRNAs involved in antigen processing and presentation in porcine monocyte-derived dendritic cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(3):687.

- Brogaard, L., Heegaard, P.M.H., Larsen, L.E., Mortensen, S., Schlegel, M., Durwald, R. y Skovgaard, K. 2016. Late regulation of immune genes and microRNAs in circulating leukocytes in a pig model of influenza A (H1N2) infection. *Scientific Reports*. 6(21812):1-11.
- Brogaard, L., Larsen, L.E., Heegaard, P.M.H., Anthon, C., Gorodkin, J., Durwald, R. y Skovgaard, K. 2018. IFN- λ and microRNAs are important modulators of the pulmonary innate immune response against influenza A (H1N2) infection in pigs. *PLoS ONE*. 13(4):1-23.
- Burgé, G., Berión, C.S., Moussa, M., Allais, F., Ather, V., y Spinnler, H.E. 2015. Relationships between the use of Embden Meyerhof Pathway (EMP) or phosphoketolase pathway (PKP) and lactate production capabilities of diverse *Lactobacillus reuteri* strains. *Journal of Microbiology*. 53(10):702-710.
- Burow, E., Rostalski, A., Harlizius, J., Gangl, A., Simoneit, C., Grobbel, M., Kollas, C., Tenhagen, B. A., y Käsbohrer, A. 2019. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs from birth to slaughter and its association with antibiotic treatment. *Preventive Veterinary Medicine*. 165: 52–62.
- Christensen, H.R., Frøkiaer, H. y Pestka J.J. 2002. *Lactobacilli* differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 168(1): 171-178.
- Citar, M., Hacin, B., Tompa, G., Štempelj, M., Rogelj, I., Dolinšek, J., Narat, M., y Matijašić, B. B. 2015. Human intestinal mucosa-associated *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with probiotic properties modulate IL-10, IL-6 and IL-12 gene expression in THP-1 cells. *Beneficial Microbes*. 6(3): 325–336.
- Commane, D. M., Shortt, C. T., Silvi, S., Cresci, A., Hughes, R. M. y Rowland, I. R. 2005. Effects of fermentation products of pro- and prebiotics on trans-epithelial electrical resistance in an in vitro model of the colon. *Nutrition and Cancer*. 51(1):102–109.
- Cruse, J.M., Lewis, R.R y Wang, H. 2004. *Immunology Guidebook*. Academic Press. Primera edición. Cambridge, MA. 267-268 pp.
- Curtale, G., Mirolo, M., Renzi, T.A., Rossato, M., Bazzoni, F. y Locati, M. 2013. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10-dependent microRNA-146b. *Proceeding of the National Academy Sciences of the United States of America*. 110(28):11499-11504.
- D'Amelio, P. y Sassi, F. 2018. Gut Microbiota, Immune System, and Bone. *Calcified Tissue International*. 102(4): 415–425.
- D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N. M., Ma, X., Kubin, M., y Trinchieri, G. 1993. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *Journal of Experimental Medicine*. 178(3): 1041–1048.
- de Rie, D., Abugessaisa, I., Alam, T., Arner, E., Arner, P., Ashoor, H., Åström, G., Babina, M., Bertin, N., Burroughs, A. M., Carlisle, A. J., Daub, C. O., Detmar, M., Deviatiiarov, R., Fort, A., Gebhard, C., Goldowitz, D., Guhl, S., Ha, T. J., Harshbarger, J., Hasegawa, A., Hashimoto, K., Herlyn, M., Heutink, P., Hitchens, K., Hon, C.C., Huang, E., Ishizu, Y., Kai, C., Kasukawa, T., Klinken, P., Lassmann, T., Lecellier, C.H., Lee, W., Lizio, M., Makeev,

- V., Mathelier, A., Medvedeva, Y.A., Mejhert, N., Mungall, C.J., Noma, S., Ohshima, M., Okada-Hatakeyama, M., Persson, H., Rizzu, P., Roudnicky, F., Saetrom, P., Sato, H., Severin, J., Shin, J.W., Swoboda, R.K., Tarui, H., Toyoda, H., Vitting-Seerup, K., Winteringham, L., Yamaguchi, Y., Yasuzawa, K., Yoneda, M., Yumoto, N., Zabierowski, S., Zhang, P.G., Wells, C.A., Summers, K.M., Kawaji, H., Sandelin, A., Rehli, M., Hayashizaki, Y., Carninci, P., Forrest, A.R.R. y de Hoon, M.J.L. 2017. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nature Biotechnology*. 35(9):872–878.
- del Pozo-Acebo, L., López de las Hazas, M.C., Margollés, A., Dávalos, A. y García-Ruiz, A. 2021. Eating microRNAs: pharmacological opportunities for cross-kingdom regulation and implications in host gene and gut microbiota modulation. *British Pharmacological Society*. 178:2218-2245.
- Demont, A., Hacini-Rachinel, F., Doucet-Ladevèze, R., Ngom-Bru, C., Mercenier, A., Prioult, G., y Blanchard, C. 2016. Live and heat-treated probiotics differently modulate IL10 mRNA stabilization and microRNA expression. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 137(4): 1264–1267.
- Duarte-Gutiérrez, J. L. 2015. Expresión de ARNm de TLR2, NF- κ B, e IL-10 en células de ganglios mesentéricos de cerdo estimuladas con probióticos (tesis de maestría). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- El Aidy, S., van den Bogert, B., y Kleerebezem, M. 2015. The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health. *Current Opinion in Biotechnology*. 32: 14–20.
- Falalyeyeva, T. M., Leschenko, I. V., Beregova, T. V., Lazarenko, L. M., Savchuk, O. M., Sichel, L. M., Tsyryuk, O. I., Vovk, T. B., y Spivak, M. Y. 2017. Probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria alter pro- and anti-inflammatory cytokines production in rats with monosodium glutamate-induced obesity. *Fiziolohichniy Zhurnal*. 63(1): 17–25.
- FAO. Food and Agriculture Organization. 2009. Food outlook: global market analysis. Roma, Italia. Recuperado de: <https://www.fao.org/3/ak341e/ak341e09.htm#TopOfPage>
- FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/ World Health Organization. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Ontario, Canadá, Recuperado de: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
- Fleming, D.S. y Miller, L.C. 2019. Differentially expressed miRNAs and tRNA genes affect host homeostasis during highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections in young pigs. *Frontiers in Genetics*. 10(691):1-13.
- Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A. y Pot, B. 2007. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology*. 13: 236–243.
- Fordham, J. B., Naqvi, A. R. y Nares, S. 2015. Regulation of miR-24, miR-30b, and miR-142-3p during macrophage and dendritic cell differentiation potentiates innate immunity. *Journal of Leukocyte Biology*. 98(2):195–207.
- Foster, J. R. 2001. The functions of cytokines and their uses in toxicology. *International Journal of Experimental Pathology*. 82(3): 171–192.

- Gad, M., Ravn, P., Soborg D.A., Lund-Jensen, K., Ouwehand, A.C. y Jensen, S.S. 2011. Regulation of the IL-10/IL-12 axis in human dendritic cells with probiotic bacteria. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 63(1):93-107.
- Gao, J., y Liu, Q. G. 2011. The role of miR-26 in tumors and normal tissues (review). *Oncology Letters*. 2(6): 1019–1023.
- Gebert, L., y MacRae, I. J. 2019. Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 20(1): 21–37.
- Gilliland, S.E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 7(1-2):175-188.
- Guo, X. K., Zhang, Q., Gao, L., Li, N., Chen, X. X., y Feng, W. H. 2013. Increasing expression of microRNA 181 inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication and has implications for controlling virus infection. *Journal of Virology*. 87(2):1159–1171.
- Ha, M. y Narry, V. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 15:509-524.
- Hawlich, H., y Köhl, J. 2006. Complement and Toll-like receptors: key regulators of adaptive immune responses. *Molecular Immunology*. 43(1-2):13–21.
- Hepburn, N. J., Garaiova, I., Williams, E. A., Michael, D. R. y Plummer, S. 2013. Probiotic supplement consumption alters cytokine production from peripheral blood mononuclear cells: a preliminary study using healthy individuals. *Beneficial Microbes*. 4(4): 313–317.
- Heydari, Z., Rahaie, M., Alizadeh, A. M., Agah, S., Khalighfard, S., y Bahmani, S. 2019. Effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* probiotics on the expression of microRNAs 135b, 26b, 18a and 155, and their involving genes in mice colon cancer. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 11(4):1155–1162.
- Hinkel, R., Ramanujam, D., Kaczmarek, V., Howe, A., Klett, K., Beck, C., Dueck, A., Thum, T., Laugwitz, K.L., Maegdefessel, L., Weber, C., Kupatt, C. y Engelhardt, S. 2020. AntimiR-21 prevents myocardial dysfunction in a pig model of ischemia/reperfusion injury. *Journal of the American College of Cardiology*. 75(15):1788-1800.
- Hong, L., Liu, R., Qiao, X., Wang, X., Wang, S., Li, J., Wu, Z., y Zhang, H. 2019. Differential microRNA expression in porcine endometrium involved in remodeling and angiogenesis that contributes to embryonic implantation. *Frontiers in Genetics*. 10(661):1-14.
- Hua, R., Zhang, X., Li, W., Lian, W., Liu, Q., Gao, D., Wang, Y. y Lei, M. 2020. Ssc-miR-21-5p regulates endometrial epithelial cell proliferation, apoptosis and migration via the PDCD4/AKT pathway. *Journal of Cell Science*. 133(23):1-12.
- Jenike, A. E. y Halushka, M. K. 2021. miR-21: a non-specific biomarker of all maladies. *Biomarker Research*. 9(1):1-7.
- Jungersen, M., Wind, A., Johansen, E., Christensen, J., Stuer-Lauridsen, B. y Eskesen, D. 2014. The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB 12[®]. *Microorganisms*. 2(2): 92–110.
- Kenny, M., Smidt, H., Mengheri, E. y Miller, B. 2011. Probiotics- do they have a role in the pig industry? *Animal*. 5(3):462.470.

- Kozomora, A., Birgaoanu, M. y Griffiths-Jones, S. 2019. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*. 47(1):155-162.
- Krumbeck, J.A., Rasmussen, H.E., Hutkins, R.W., Clarke, J., Shawron, K., Keshavarzian, A. y Walter, J. 2018. Probiotic *Bifidobacterium* strains and galactooligosaccharides improve intestinal barrier function in obese adults but show no synergism when used together as synbiotics. *Microbiome*. 6:121.
- Kuang, L., Deng, Y., Liu, X., Zou, Z. y Mi, L. 2017. Differential expression of mRNA and miRNA in guinea pigs following infection with HSV2v. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 14(1): 2577-2583.
- Laparra, J.M. y Sanz, Y. 2009. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Letter in Applied Microbiology*. 49(6):695-701.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. y Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75(5): 843-854.
- Lekagul, A., Tangcharoensathien, V. y Yeung, S. 2019. Patterns of antibiotic use in global pig production: a systematic review. *Veterinary and Animal Science*. 7(1): 1-12.
- Li, J. A., Wang, Y. D., Wang, K., Wang, Z. L., Jia, D. Y., Yang, B. Y., y Xiong, C. B. 2017. Downregulation of miR-214-3p may contribute to pathogenesis of ulcerative colitis via targeting STAT6. *BioMed Research International*. 2017(1): 1-7.
- Li, L., Wei, Z., Zhou, Y., Gao, F., Jiang, Y., Yu, L., Zheng, H., Tong, W., Yang, S., Zheng, H., Shan, T., Liu, F., Xia, T., y Tong, G. 2015. Host miR-26a suppresses replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by upregulating type I interferons. *Virus Research*. 195: 86–94.
- Liao, S. F. y Nyachoti, M. 2017. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Animal Nutrition*. 3(4): 331–343.
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H. y Shen, J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 16(2): 161:168.
- Liu, Z., Wu, R., Li, G., Sun, P., Xu, Q., y Liu, Z. 2015. MiR-592 inhibited cell proliferation of human colorectal cancer cells by suppressing of CCND3 expression. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 8(3): 3490–3497.
- López, P., Gueimonde, M., Margolles, A., y Suárez, A. 2010. Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses in vitro. *International Journal of Food Microbiology*. 138(1-2): 157–165.
- Lunney, J. K., Van Goor, A., Walker, K. E., Hailstock, T., Franklin, J. y Dai, C. 2021. Importance of the pig as a human biomedical model. *Science Translational Medicine*. 13(621).
- Ma, X., Yan, W., Zheng, H., Du, Q., Zhang, L., Ban, Y., Li, N. y Wei, F. 2015. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F100 Research*. 4(1465): 1-13.
- Martins, F. S., Silva, A. A., Vieira, A. T., Barbosa, F. H., Arantes, R. M., Teixeira, M. M. y Nicoli,

- J. R. 2009. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. *Archives of Microbiology*. 191(8): 623–630.
- Masco, L., Ventura, M., Zink, R., Huys, G. y Swings, J. 2004. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. *nov.* and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. *nov.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54(Pt4):1137-1143.
- Matsuyama, H. y Suzuki, H. 2019. Systems and synthetic microRNA biology: from biogenesis to disease pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(1):132.
- McCall, M. N., Illei, P. B., y Halushka, M. K. 2016. Complex sources of variation in tissue expression data: analysis of the GTEx lung transcriptome. *American Journal of Human Genetics*. 99(3): 624–635.
- McGlone, J.J. 2013. The future of pork production in the world: towards sustainable, welfare-positive systems. *Animals (Basel)*. 3(2):401-415.
- McInnes, I.B. 2017. Cytokines. En: Firestein, G., Gabriel, S., O'Dell, J., Budd, R. y McInnes, I. (eds.). *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology*. Elsevier, Amsterdam, 396-407.
- Meng, H., Lee, Y., Ba, Z., Peng, J., Lin, J., Boyer, A.S., Fleming, J.A., Furumoto, E.J., Roberts, R.F., Kris-Etherton, P.M. y Rogers, C.J. 2016. Consumption of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 impacts upper respiratory tract infection and the function of NK and T cells in healthy adults. *Molecular Nutrition Food Research*. 60(5):1161-1171.
- Meng, H., Ba, Z., Lee, Y., Peng, J., Lin, J., Fleming, J. A., Furumoto, E. J., Roberts, R. F., Kris-Etherton, P. M. y Rogers, C. J. 2017. Consumption of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in yogurt reduced expression of TLR-2 on peripheral blood-derived monocytes and pro-inflammatory cytokine secretion in young adults. *European Journal of Nutrition*. 56(2): 649–661.
- Nakata, K., Sugi, Y., Narabayashi, H., Kobayakawa, T., Nakanishi, Y., Tsuda, M., Hosono, A., Kaminogawa, S., Hanazawa, S. y Takahashi, K. 2017. Commensal microbiota-induced microRNA modulates intestinal epithelial permeability through the small GTPase ARF4. *The Journal of Biological Chemistry*. 292(37): 15426–15433.
- Naqvi, A. R., Fordham, J. B., y Nares, S. 2015. miR-24, miR-30b, and miR-142-3p regulate phagocytosis in myeloid inflammatory cells. *Journal of Immunology*. 194(4): 1916–1927.
- Naqvi, A. R., Fordham, J. B., y Nares, S. 2016. MicroRNA target Fc receptors to regulate Ab-dependent Ag uptake in primary macrophages and dendritic cells. *Innate Immunity*. 22(7): 510-521.
- NOM-062-ZOO-1999. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación*. Agosto 2001.
- NOM-033-SAG/ZOO-2014. NORMA Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014. Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. *Diario Oficial de la Federación*.

Agosto 2015.

- Núñez-Hernández, F., Pérez, L.J., Muñoz, M., Vera, G., Accensi, F., Sánchez, A., Rodríguez, F. y Núñez, J.I. 2017. Differential expression of porcine microRNAs in African swine fever virus infected pigs: a proof-of- concept study. *Virology Journal*. 14(198):1-13.
- O’Briend, J., Hayder, H., Zayed, Y. y Peng, C. 2018. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontier in Endocrinology*. 9(402):1-12.
- Osterberg, J., Wingstrand, A., Jensen, A.N., Kerouanton, A., Cibir, V., Barco, L., Denis, M., Aabo, S. y Bengtsson, B. 2016. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs in organic and conventional farming in four european contries. *Plos One*. 11(6): 1-12.
- Parra-Sánchez, H., Puebla-Clark, L., Reséndiz, M., Valenzuela, O. y Hernández, J. 2018. Characterization and expression of DEC205 in the cDC1 and cDC2 subssets of porcine dendritic cells from spleen, tonsil, and submaxillary and mesenteric lymph nodes. *Molecular Immunology*. 96(1):1-7.
- Pérez, I., Falco, A., Tapia, M.S. y Alonso, G. 2012. Aislamiento e identificación de cepas del género *Bifidobacterium* presentes en productos lácteos fermentados tipo yogur. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 32(1):29-36.
- Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F., Vilchez-Padial, L.M. y Gil, A. 2017. Evidence of the anti-inflammatory effects of probiotics and synbiotics in intestinal chronic diseases. *Nutrients*. 9(6): 555.
- Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F., Gil-Campos, M. y Gil, A. 2019. Mechanisms of action of probiotics. *Advances in nutrition*. 10(1):49-66.
- Pluske, J.R., Turpin, D.L. y Kim, J.C. 2018. Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. *Animal Nutrition*. 4(2):187-196.
- Purchiaroni, F., Tortora, A., Gabrielli, M., Bertucci, F., Gigante, G., Ianiro, G., Ojetti, V., Scarpellini, E. y Gasbarrini, A. 2013. The role of intestinal microbiota and the immune system. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 17(3): 323–333.
- Quigley, E.M.M. 2017. *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis*. En: Floch, M.H., Ringel, Y. y Walker, W.A. (eds). *The microbiota in gastrointestinal pathophysiology*. Elsevier Inc, Ámsterdam, 127-130 pp.
- Rahbar Saadat, Y., Pourseif, M. M., Zununi Vahed, S., Barzegari, A., Omid, Y. y Barar, J. 2020. Modulatory role of vaginal-isolated *Lactococcus lactis* on the expression of miR-21, miR-200b, and TLR-4 in CAOV-4 cells and in silico revalidation. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 12(3):1083–1096.
- Ran, M., Li, Z., Cao, R., Weng, B., Peng, F., He, C. y Chen, B. 2018. miR-26a suppresses autophagy in swine Sertoli cells by targeting ULK2. *Reproduction in Domestic Animals*. 53(4): 864–871.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., y Ruvkun, G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403(6772): 901–906.
- Runtsch, M., Round, J. y O’Connell, M. 2014. MicroRNAs and the regulation of intestinal homeostasis. *Frontiers in Genetics*. 5(347):1-10.

- Salazara, B. y Montoya, O. 2003. Importancia de los probióticos y prebióticos en la salud humana. VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 10(2): 20-26.
- Sheiki, A. Shakerian, M., Giti, H., Baghaeifar, M., Jafarzadeh, A., Ghaed, V., Heibor, M.H., Baharifar, N., Dadafarin, Z. y Bashirpour, G. 2016. Probiotic yogurt culture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 modulate the cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from patients with ulcerative colitis. Drug Research (Stuttgart). 66(6):300-305.
- Slack, F.J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R. y Ruvkun, G. 2000. The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. Molecular cell. 5(4): 659-669.
- Solano-Aguilar, G., Shea-Donohue, T., Madden, K.B., Quiñones, A., Beshah, E., Lakshman, S., Xie, Y., Dawson, H. y Urban, J.F. 2018. *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* modulates the local immune response and glucose uptake in the small intestine of juvenile pigs infected with the parasitic nematode *Ascaris suum*. Gut Microbes. 9(5):422-436.
- Sun, W.K., Li, Y., Cheng, C., Chen, Y.H., Zeng, K., Chen, X., Gu, Y., Liu, R., Lv, X. y Gao, R. 2018. Comparison of stomach microRNA transcriptomes of Tibetan and Yorkshire pigs by deep sequencing. Genes & Genomics. 40(9): 937-943.
- Tao, X., Xu, Z. y Men, X. 2016. Analysis of serum microRNA expression profiles and comparison with small intestinal microRNA expression profiles in weaned piglets. PLoS ONE. 11(9):1-11.
- Thijssen, M., Bruggenwirth, I., Gillooly, A., Khvorova, A., Kowalik, T. y Martins, P. 2019. Gene silencing with siRNA (RNA interference): a new therapeutic option during ex vivo machine liver perfusion preservation. American Association for the Study of Liver Diseases. 25(1): 140-151.
- Tonucci, L., Olbrich dos Santos, K.M., Licursi de Olivera, L., Rocha Ribeiro, S.M., Duarte Martino, H.S. 2017. Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Clinical Nutrition. 36(1): 85-92.
- Tuohy, K.M. y Scott, K.P. 2015. The microbiota of the human gastrointestinal tract. Diet-Microbe Interactions in the Gut. 1:15.
- Vernazza, C.L., Gibson, G.R. y Rastall, R.A. 2006. Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*. Journal of Applied Microbiology. 100(4): 846-853.
- Vlasova, A. N., Chattha, K.S., Kandasamy, S., Liu, Z., Esseili, M., Shao, L., Rajashekara, G. y Saif, L.J. 2013. Lactobacilli and Bifidobacteria promote immune homeostasis by modulating innate immune responses to human rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs. PLoS ONE. 8(10):1-14.
- Wen, K., Li, G., Bui, T., Liu, F., Li, Y., Kocher, J., Lin, L., Yang, X., y Yuan, L. 2012. High dose and low dose *Lactobacillus acidophilus* exerted differential immune modulating effects on T cell immune responses induced by an oral human rotavirus vaccine in gnotobiotic pigs. Vaccine. 30(6): 1198-1207.
- Wightman, B., Ha, I. y Ruvkun, G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene

- lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 75(5):855-862.
- Wu, C.J. y Lu, L.F. 2017. MicroRNA in immune regulation. En: Yoshimura, A. (ed). *Emerging Concepts Targeting Immune Checkpoints in Cancer and Autoimmunity*. 249-267 pp.
- Yao, M., Gao, W., Tao, H., Yang, J., Liu, G. y Huang, T. 2016. Regulation signature of miR-143 and miR-26 in porcine *Salmonella* infection identified by binding site enrichment analysis. *Molecular Genetics and Genomics*. 291(2): 789–799.
- Zhang, J., Xu, X., Huang, X., Zhu, H., Chen, H., Wang, W. y Liu, Y. 2020. Analysis of microRNA expression profiles in porcine PBMCs after LPS stimulation. *Innate Immunity*. 26(5):435-446.
- Zhang, Q., Huang, C., Yang, Q., Gao, L., Liu, H.C., Tang, J. y Feng, W.H. 2016. MicroRNA-30c modulates type I IFN responses to facilitate porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection by targeting JAK1. *The Journal of Immunology*. 196(5): 2272-2282.
- Zhang, Q., Liu, S., Zhang, J., Ma, X., Dong, M., Sun, B. y Xin, Y. 2021. Roles and regulatory mechanisms of miR-30b in cancer, cardiovascular disease, and metabolic disorders (review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. 21(1):1-8.
- Zhao, Y., Zeng, Y., Zeng, D., Wang, H., Zhou, M., Sun, N., Xin, J., Khalique, A., Sharafat, D., Pan, K., Shu, G., Jing, B. y Ni, X. 2021. Probiotics and microRNA: their roles in the host-microbiome interactions. *Frontiers in Microbiology*. 11:1-12.
- Zhou, M. K., Liu, X. J., Zhao, Z. G., y Cheng, Y. M. 2015. MicroRNA-100 functions as a tumor suppressor by inhibiting Lgr5 expression in colon cancer cells. *Molecular Medicine Reports*. 11(4):2947–2952.
- Zhou, Q., Souba, W. W., Croce, C. M., y Verne, G. N. 2010. MicroRNA-29a regulates intestinal membrane permeability in patients with irritable bowel syndrome. *Gut*. 59(6): 775–784.
- Zhu, Y., Wang, W., Yuan, T., Fu, L., Zhou, L., Lin, G., Zhao, S., Zhou, H., Wu, G. y Wang, J. 2017. MicroRNA-29a mediates the impairment of intestinal epithelial integrity induced by intrauterine growth restriction in pig. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 312(5):434-442.
- Zou, L., Xiong, X., Yang, H., Wang, K., Zhou, J., Lv, D. y Yin, Y. 2019. Identification of microRNA transcriptome reveals that miR-100 is involved in the renewal of porcine intestinal epithelial cells. *Science China-Life Sciences*. 62(6): 816-828.