



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

***Bifidobacterium animalis ssp lactis* Bb12 REEMPLAZA LA
FUNCIÓN DE miR-155 EN LA MADURACIÓN DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS HUMANAS**

Por:

Isaac Hernández Mejía

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

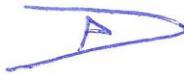
MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Isaac Hernández Mejía, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dra. Verónica Mata Haro
Directora de Tesis



Dr. Jesús Hernández López
Integrante del comité de tesis

Maricela Montalvo Corral

Dra. Maricela Montalvo Corral
Integrante del comité de tesis



Dra. Anna Arely González Rascón
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “*Bifidobacterium animalis ssp lactis* Bb12 Reemplaza la Función de miR-155 en la Maduración de Células Dendríticas Humanas” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Isaac Hernández Mejía, 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.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca económica que se me brindó durante mis estudios de maestría y durante la realización de este trabajo.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, por aceptarme y darme la oportunidad de realizar mi maestría en su institución.

Al Proyecto de Ciencia Básica 257462, al que se me permitió formar parte y tomó en cuenta mi trabajo de tesis.

A mi asesora, la Doctora Verónica Mata, por aceptarme en su equipo de trabajo, por sus consejos, por siempre responder mis dudas, por brindarme su amistad y apoyo en cualquier circunstancia. Gracias por su paciencia y por enseñarme lo que es ser un buen investigador.

Al Dr. Jesús Hernández y a la Dra. Maricela Montalvo, por asistir a mis seminarios, por estar al pendiente de este trabajo y por sus valiosos comentarios y aportaciones.

A la Dra. Anna González, gracias por tu paciencia, tus pláticas, por estar siempre disponible cuando lo necesité, con tu ayuda con el experimental, por tomarte el tiempo de explicarme hasta que me quedara claro y por tus valiosas aportaciones.

A la M.C. Leticia Félix, por siempre estar al pendiente de proveernos lo que necesitamos, por siempre tener la disponibilidad de ayudar, y por traernos dulces y comida.

A Valeria, gracias por ser mi mejor amiga, por tu apoyo incondicional, por tu ayuda en cualquier momento, por los favores, las risas, la compañía. Sin ti este proceso no hubiera sido igual.

A Marlene, Carito, y Marina, gracias por los aportes, la compañía en el laboratorio, la convivencia,

por ayudarme a resolver mis dudas, organizar material, apoyarme con el experimental, o lo que hiciera falta.

A mis padres, que siempre me dieron los medios para poder salir adelante, y me animaron a tomar este paso.

A Jonathan, gracias por estar siempre ahí, por tu apoyo y cariño incondicional, por soportar mis cambios de humor y mi estrés sin hacer preguntas.

DEDICATORIA

A mis padres, por su apoyo incondicional durante toda mi vida, sin ustedes esto no hubiera sido posible.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Sistema Inmune.....	14
2.1.1. Células Dendríticas.....	15
2.1.2. Citocinas.....	15
2.1.3. Complejo Mayor de Histocompatibilidad II y Moléculas Co-Estimuladoras.....	16
2.2. Vías de Señalización	17
2.3. MicroRNAs.....	19
2.3.1. miR-155 y su Rol en el Sistema Inmune.....	20
2.3.2. Papel de miR-155 en Células Dendríticas.....	21
2.4. Probióticos	22
2.4.1. Usos y Beneficios en la Salud	23
2.4.2. Tipos de Probióticos	23
2.4.3. <i>Bifidobacterium animalis ssp lactis</i> Bb12	24
2.4.4. Bb12 y Células Dendríticas.....	24
2.4.5. Interrelación entre DCs, mir-155 y Bb12.....	25
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
4.1. Objetivo General.....	28
4.2. Objetivos Específicos	28
5. METODOLOGÍA	29
5.1. Modelo Experimental.....	29
5.2. Obtención de Monocitos de Sangre Periférica mediante Separación Inmunomagnética.....	29
5.3. Obtención de Células Dendríticas a Partir de Monocitos de Sangre Periférica (moDCs)	30
5.4. Cultivo de Bacterias	30
5.5. Pérdida de Función de miR-155 mediante Secuencias Anti-Sentido	31
5.6. Estimulación de moDCs con Bb12	32
5.7. Cuantificación de miR-155 mediante RT-qPCR	32

CONTENIDO (continuación)

5.8. Determinación de Marcadores de Superficie de moDCs mediante Citometría de Flujo ..	33
5.9. Cuantificación de Citocinas mediante Citometría de Flujo.....	33
5.10. Análisis Estadístico	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
6.1. Obtención y Caracterización de un Cultivo de Células Dendríticas Derivadas de Monocitos de Sangre Periférica.....	35
6.2. Inhibición de la Función de miR-155 en Células Dendríticas Derivadas de Monocitos de Sangre Periférica (moDCs) mediante Secuencias Anti-Sentido (ASO)	37
6.3. Estimulación de DCs y Modelo Experimental	38
6.4. Cuantificación de miR-155 mediante RT-qPCR	39
6.5. Determinación de Marcadores de Superficie: HLA-DR, HLA-ABC, CD14, CD11C, CD80, y CD163 mediante Citometría de Flujo	40
6.6. Cuantificación de Citocinas IL-12, TNF α , IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8 mediante Citometría de Flujo	45
7. CONCLUSIÓN	51
8. RECOMENDACIONES	52
9. REFERENCIAS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Moléculas implicadas en la cascada de señalización tras el estímulo en TLRs.....	19
2	Esquema general de la biogénesis y mecanismos de acción de los miRNAs.....	21
3	Esquema del modelo experimental.....	30
4	Molécula de metioxietanol en el carbono 2.....	33
5	Micrografía de la diferenciación del cultivo de monocitos moDCs.....	36
6	Histogramas de citometría de flujo realizado con las moDCs en donde se muestrala expresión de la molécula MHC II y II.....	37
7	Resultsados de la tinción intracelular realizada con con 5'FAM.....	39
8	Resultados de RT-qPCR presentados en expresión relativa.....	40
9	Datos de citometría de flujo de los marcadores CD11 y CD14.....	42
10	Datos de citometría de flujo de los marcadores MHC I y II.....	43
11	Datos de citometría de flujo de los marcadores CD80 y CD163.....	45
12	Cuantificación de la producción de citocinas IL-12 y TNF α	47
13	Cuantificación de la producción de citocina IL-10.....	48
14	Cuantificación de la producción de citocina IL-6.....	49
15	Cuantificación de la producción de citocina IL-1 β	50
16	Cuantificación de la producción de citocina IL-8.....	51

RESUMEN

Las células dendríticas (DCs) son parte del sistema inmune innato y están especializadas en el reconocimiento de agentes extraños y posterior presentación a células B y T, desencadenando una respuesta inmune adaptativa. Los cambios de fenotipo que sufren las DCs en este proceso, como su maduración y activación, implican cambios en las vías de señalización intracelular que deben ser finamente regulados para promover una respuesta inmune eficiente. Moléculas como las citocinas son cruciales en la regulación de estos procesos. También se han descrito a varios tipos de RNAs no codificantes que tienen un papel importante en la modulación del fenotipo celular mediante la regulación post transcripcional, y entre ellos encontramos a los microRNAs (miRNAs). Como ejemplo, se puede mencionar a miR-155, que se ha reportado que participa en los procesos de regulación de las DCs, como la maduración. Se ha visto que al inhibir la expresión de miR-155, la maduración de las DCs se ve comprometida. Sin embargo, se ha visto que en DCs en las cuales se ha inhibido previamente la expresión de miR-155 y estimuladas posteriormente con Pam3CSK4 (ligando de TLR2), estas son capaces de madurar. Por lo tanto, creemos que *Bifidobacterium animalis ssp lactis* Bb12, un microorganismo Gram positivo, cuyos componentes de superficie son reconocido por las DCs principalmente por la vía TLR2, es capaz de inducir la maduración de las DCs inmaduras en las cuales se ha inhibido de la expresión de miR-155. El objetivo de esta tesis fue determinar el fenotipo de las células dendríticas estimuladas con el probiótico Bb12 en las cuales se ha inhibido la función de miR-155, para ello se establecieron cultivos de DCs a partir de monocitos de sangre periférica humana con GM-CSF e IL-4 y se corroboró la diferenciación mediante citometría de flujo. Las DCs se transfectaron con las secuencias antisentido de miR-155 con Lipofectamina, y se estimularon posteriormente con Bb12. Se validó la eficiencia de transfección por medio de RTqPCR y microscopía de fluorescencia. Nuestros resultados demuestran que Bb12 es capaz de activar a las DCs y permite su diferenciación, maduración y activación a pesar de haber inhibido a miR-155, esto lo demostramos cuantificando el aumento en la expresión de los marcadores de superficie CD80, MHCII MHCI y CD11c y en la producción citocinas, IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8.

Palabras clave: Células dendríticas, Bb12, miR-155.

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are part of the innate immune system and are specialized in the recognition of foreign agents and subsequent presentation to B and T cells, triggering an adaptive immune response. Phenotype changes of DCs in this process, such as maturation and activation, involve changes in intracellular signaling pathways that must be finely regulated to promote an efficient immune response. Molecules like cytokines are crucial in regulating these processes. Several types of non-coding RNAs have also been described to have important roles in modulating cellular phenotypes through post-transcriptional regulation, and among them we find microRNAs (miRNAs). Some of them, such as miR-155, have been identified as potential regulators participating in several DC processes, including their maturation. It was seen that in the absence of miR-155, the maturation of DCs is compromised. However, it is believed that this process can be reversed with a gram-positive probiotic, as observed by stimulating immature DCs with Pam3CSK4 (TLR2 ligand), they switch to mature DCs, even after having inhibited miR-155 expression. On the other hand, *Bifidobacterium animalis ssp lactis Bb12*, a Gram-positive microorganism, whose surface components are recognized by DCs via TLR2. Bb12 is believed to be able to induce the maturation of iDCs in which miR-155 expression has been inhibited. Dendritic cell cultures were established from human peripheral blood monocytes with addition of GM-CSF and IL-4. The cells were transfected with the antisense sequences of miR-155 with Lipofectamine, and subsequently stimulated with Bb12. Transfection efficiency was validated using RT-qPCR and fluorescence microscopy. Our results demonstrate that Bb12 is able to activate DCs and allow their differentiation, maturation and activation despite having inhibited miR-155, this is demonstrated by quantifying the increase in the expression of the surface markers CD80, MHCII, MHC I and CD11c and in the production of cytokines, IL-10, IL-6, IL-1 and IL-8.

Key words: Dendritic cells, Bb12, miR-155

1. INTRODUCCIÓN

Las células dendríticas (DCs) son un componente muy importante de nuestro sistema inmune, ya que son capaces de reconocer un antígeno y presentarlo a otras células como T y B, lo que desencadena la respuesta inmune adaptativa. Por esta razón, su correcta diferenciación y maduración es un proceso de gran importancia. Estos procesos celulares deben ser regulados muy finamente, y se ha reportado la participación de RNAs no codificantes, como los microRNAs (miRNAs) (Testa *et al.*, 2017).

Los miRNAs son secuencias cortas de RNA que llevan a cabo un gran número de funciones en nuestro cuerpo. Estos se han descrito como elementos importantes en el desarrollo celular, ya que están involucrados en una gran cantidad de procesos, regulando de manera post-transcripcional la expresión de diferentes genes. Por ejemplo, el silenciamiento de miR-155 impide la maduración de las células dendríticas (Mashima *et al.*, 2015, Vigorito *et al.*, 2013). Este efecto se puede observar en su morfología, en la producción de citocinas y la alteración de marcadores de superficie. Además, la sobreexpresión o ausencia de ciertos miRNAs se ha relacionado con deficiencias de las respuestas inmunes, generando sucesos fisiológicos que conllevan a graves padecimientos.

Bifidobacterium animalis ssp lactis Bb12 es un microorganismo probiótico modelo utilizado en una gran cantidad de estudios (Peña *et al.*, 2014; Holma *et al.*, 2011; Zarrati *et al.*, 2013). Este probiótico es capaz de modular la respuesta inmune, pero para que esto pueda ser llevado a cabo, es necesaria la maduración adecuada de las DCs. En este contexto, se ha observado que Bb12 es capaz de estimular eficientemente a las DCs induciendo su maduración, lo que se refleja en las moléculas de coestimulación en la membrana de las DCs y alterando la producción de citocinas (Martínez-Abad *et al.*, 2016)

Dado que Bb12 es capaz de estimular eficientemente a las DCs (Martínez-Abad *et al.*, 2016) y que miR-155 es una molécula crucial en la maduración de las DCs (Yang *et al.*, 2016), surge la interrogante de cómo influiría el estímulo de Bb12 en DCs en donde se ha inducido la pérdida de

función de miR-155. La elucidación de estos procesos nos permitiría ampliar el conocimiento del sistema inmune, y nos daría la oportunidad de considerar a Bb12 como terapia en padecimientos causados por la baja expresión de miR-155 que no han sido muy exploradas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Sistema Inmune

El sistema inmune es un conjunto de tejidos, moléculas y células cuya función es proteger y defender de infecciones distinguiendo entre lo propio y lo ajeno, como bacterias, hongos, virus o sustancias extrañas. Dentro del sistema inmune encontramos dos tipos de respuesta, la innata, que es la primera línea de defensa frente a agentes dañinos; y la adaptativa, que es más específica y se activa mediante el reconocimiento de un antígeno, ya sea mediante la respuesta primaria o secundaria (Abbas *et al.*, 2014; Delves *et al.*, 2017).

La respuesta inmune innata se caracteriza por ser la primera línea de defensa contra microorganismos, la cual corresponde a barreras físicas y mecánicas, como tejidos epiteliales, moco, flujo de aire, entre otras. Sin embargo, cuando el agente invasor escapa estos mecanismos de defensa, inician su participación los componentes celulares como los fagocitos. Dentro de las células fagocíticas encontramos a los neutrófilos, monocitos, macrófagos, mastocitos y células dendríticas, entre otras (Auffray *et al.*, 2009; Hemmer *et al.*, 2015). Estos son capaces de detectar, internalizar y digerir microorganismos. También son capaces de producir mediadores inflamatorios para eliminar bacterias, parásitos y virus; y contribuir a la activación de otro tipo de células pertenecientes al sistema inmune adaptativo.

Cuando los mecanismos de inmunidad innata no logran eliminar al agente extraño, entra en juego el sistema inmune adaptativo, el cual está conformado por células B y T, en cuya superficie hay receptores que reconocen antígenos específicos que se encuentran en los microorganismos patógenos. Los linfocitos B inician la respuesta humoral, secretando anticuerpos al torrente sanguíneo y fluidos mucosos, los cuales neutralizan y eliminan microbios y toxinas. Cuando los anticuerpos no pueden acceder a los microbios que se encuentran dentro de las células vivas, actúan los linfocitos T que producen perforinas y proteasas que causan la apoptosis del patógeno, o bien, reclutan células fagocíticas (Abbas *et al.*, 2014; Iwasaki & Medzhitov, 2015).

2.1.1. Células Dendríticas

Las DCs son conocidas como células centinelas ya que se encuentran en constante búsqueda de agentes dañinos en el ambiente que las rodea. Cuando reconocen un antígeno, lo procesan y lo presentan a diferentes células del sistema inmune, como los linfocitos, activando a células T y promoviendo su maduración y proliferación. En este sentido, son consideradas como un enlace entre el sistema inmune innato y adaptativo (Dalod *et al.*, 2002)

Las DCs existen en dos estados básicos: inmaduro (iDCs), y maduro (mDCs); siendo en este último capaz de iniciar la respuesta inmune tras reconocer agentes extraños a través de receptores presentes en la membrana. De los receptores importantes de este tipo, se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs), que se encargan de detectar componentes de la pared celular de bacterias, hongos, protozoos y estructuras de ácidos nucleicos virales. Entre ellos, encontramos a TLR2, que es capaz de reconocer el peptidoglicano presente en bacterias Gram positivas (Su *et al.*, 2017; Swiecki & Colonna, 2015).

Cuando las DCs son estimuladas se altera su fenotipo, esto se puede observar en su morfología y mediante la expresión de ciertas citocinas. También se incrementa la expresión de moléculas de superficie, de esta manera se puede cuantificar por citometría de flujo y otros métodos el cambio en el fenotipo en la maduración de las células a partir de un estímulo. Algunas de las moléculas más importantes en la maduración y activación de las DCs son MHC II y CD80, aumentando su expresión de manera significativa cuando se produce un estímulo que conlleva a la maduración. Existen marcadores que especifican la pureza de un cultivo, como por ejemplo CD11c, que se expresa en mDCs, que es la población con la que trabajamos en este proyecto (Su *et al.*, 2017; Swiecki & Colonna, 2015).

2.1.2. Citocinas

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular, solubles en agua y están compuestas por

polipéptidos o glicoproteínas, formando monómeros. Pueden actuar de manera autocrina, paracrina y endocrina. Dado a su solubilidad, son transportadas en la sangre y en fluidos tisulares, hasta llegar a receptores específicos de membrana en donde inducen la expresión de genes específicos (Netea *et al.*, 2015; Wynn, 2015).

En DCs se ha reportado la expresión de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12, siendo estas de las más importantes ya que juegan un papel crucial en procesos inflamatorios y anti-inflamatorios. También activan o desactivan genes que regulan moléculas importantes en las cascadas de señalización y factores de transcripción. Además, estas moléculas son utilizadas por las células dendríticas para activar a otras poblaciones de células y coordinar la respuesta inmune (Latvala *et al.*, 2008).

2.1.3. Complejo Mayor de Histocompatibilidad II y Moléculas Co-Estimuladoras

La presentación antigénica se lleva a cabo mediante la expresión de una molécula que se encuentra en la célula presentadora de antígeno (APC) y otra en la célula T. En la APC se expresa el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), del cual se pueden encontrar al menos 3 subtipos lo que aumenta su capacidad de presentar una amplia variedad de antígenos. MCH-II está formado de dos heterodímeros unidos no covalentemente por cadenas α y β y se expresan sólo en la superficie de las APCs. Cuando las APCs reconocen un agente patógeno, pueden fagocitarlo, procesarlo y presentar el antígeno de manera extracelular a las células T CD4+ utilizando este complejo, desencadenando la respuesta inmune adaptativa. De manera que la expresión de esta molécula aumenta cuando las DCs están listas para presentar el antígeno (Ng *et al.*, 2017).

Por otra parte, para que la presentación antigénica se lleve a cabo, se requiere la presencia de moléculas de co-estimulación. Dentro de este grupo, B7 es la molécula co-estimuladora más relevante. Esta se encuentra en la superficie de las APCs. Se han descrito dos tipos, B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) ambas actúan sobre el mismo ligando en la célula T (CD28). La co-estimulación CD28-CD80/CD86 induce la expresión del factor de crecimiento de células T, conocido también

como IL-2, además de la producción de citocinas pro-inflamatorias (Nicholas *et al.*, 2017).

2.2. Vías de Señalización

Cuando las APCs reconocen un antígeno, la estimulación de los receptores, que produce una alerta que se transfiere hacia el interior de la célula a través de diversas cascadas de señales bioquímicas. Esta serie de eventos le permiten a la célula responder adecuadamente y generar una respuesta, en la que se pueden activar factores de transcripción que culminan en diversas respuestas como la diferenciación, maduración, proliferación, producción de anticuerpos, citocinas, etc. Existen diferentes vías de señalización importantes en nuestro sistema inmune (Brubaker *et al.*, 2015; Dalod *et al.*, 2014).

Entre estas vías se encuentran las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) la cual se inicia por una cascada de fosforilación en la que través de un receptor se activa una cinasa, que, a su vez activa a la siguiente, y así sucesivamente. Las MAPKs regulan importantes procesos celulares, especialmente en la respuesta inmune, induciendo la producción de citocinas inmunomoduladoras como $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-10 e IL-12. (Arthur & Ley, 2013; Brubaker *et al.*, 2015; Soares-Silva *et al.*, 2016).

Otra de las vías es el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) (Figura 1) que es un elemento clave en la regulación del sistema inmune innato y adaptativo y se puede activar por medio de dos vías: canónica o no canónica. La primera es considerada de acción rápida, en donde TAK1 activa al complejo IKK (formado por $\text{IKK}\alpha$, $\text{IKK}\beta$ y NEMO). IKK fosforila y activa a miembros de la familia I κ B, como p105, inhibidores de NF- κ B que se ubiquitinizan y se degradan, permitiendo la traslocación hacia el núcleo de dímeros formados por NF- κ B1 p50-RELA y NF- κ B1 p50-c-REL. En contraste, la vía canónica está mayormente regulada y es menos rápida. Tras el estímulo, IKK fosforila los residuos de serina de p100 y lo ubiquitiniza, promoviendo su degradación formando el dímero de NF- κ B2 p52 y permitiendo la traslocación de RELB al núcleo, para regular la transcripción de un gran número de genes, incluyendo péptidos antimicrobianos, citocinas,

2.3. MicroRNAs

Los microRNAs son secuencias pequeñas de RNAs no codificantes que miden aproximadamente 24 pb. Son sintetizados en el núcleo por el complejo DROSHA (ribonucleasas de la súper familia III), que se une a DGCR (complejo microprocesador subunidad 8) para exportar la secuencia en forma de pri-miRNA, en donde son cortados por el complejo DICER (endoribonucleasa DICER). En este estado, se unen al complejo miRISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA) que contiene un factor de reconocimiento de RNA, que le ayuda a unirse a una región complementaria (Figura 2) (Islam *et al.*, 2017).

El primer miRNA (lin-4) fue descubierto en 1993 a través de un tamizaje genético en nemátodos por Rosalind Lee. Después, en ese mismo año se demostró que el gen lin-14 era regulado por lin-4, demostrando la función reguladora de estas moléculas. Los miRNA comprenden del 1-2 % del genoma en mamíferos, y se encuentran excepcionalmente conservados (Lee *et al.*, 1993). Dado que cada miRNA regula cientos de genes, se cree que la mayor parte de los genes codificadores de proteínas están bajo su control. Así, cada proceso biológico depende de la actividad reguladora de estos RNAs. Las funciones fisiológicas de miRNAs se conocen partir de estudios de sobreexpresión en animales y cultivos celulares, en procesos como la proliferación, diferenciación, desarrollo, homeostasis y supervivencia celulares. Se ha reportado que estas moléculas actúan como reguladores en varios niveles de las cascadas de señalización que se activan cuando las células del sistema inmune responden a un estímulo. (Mehta & Baltimore, 2016; Vidigal & Ventura, 2015; Wahid *et al.*, 2010).

Los miRNAs reconocen un RNA mensajero específico y reprimen su expresión. Los miRNAs de células animales se unen al RNA con desajustes, es decir, no es un apareamiento perfecto, lo que les da mayor elasticidad al momento de llevar a cabo esta acción. Cuando esto se produce, se inhibe la traducción del RNA, actuando como ribointerferentes. También se pueden ligar a un RNA ya sintetizado, impidiendo su acción y provocando su degradación (Figura 2) (Tétreault & De Guire, 2013; Wahid *et al.*, 2010).

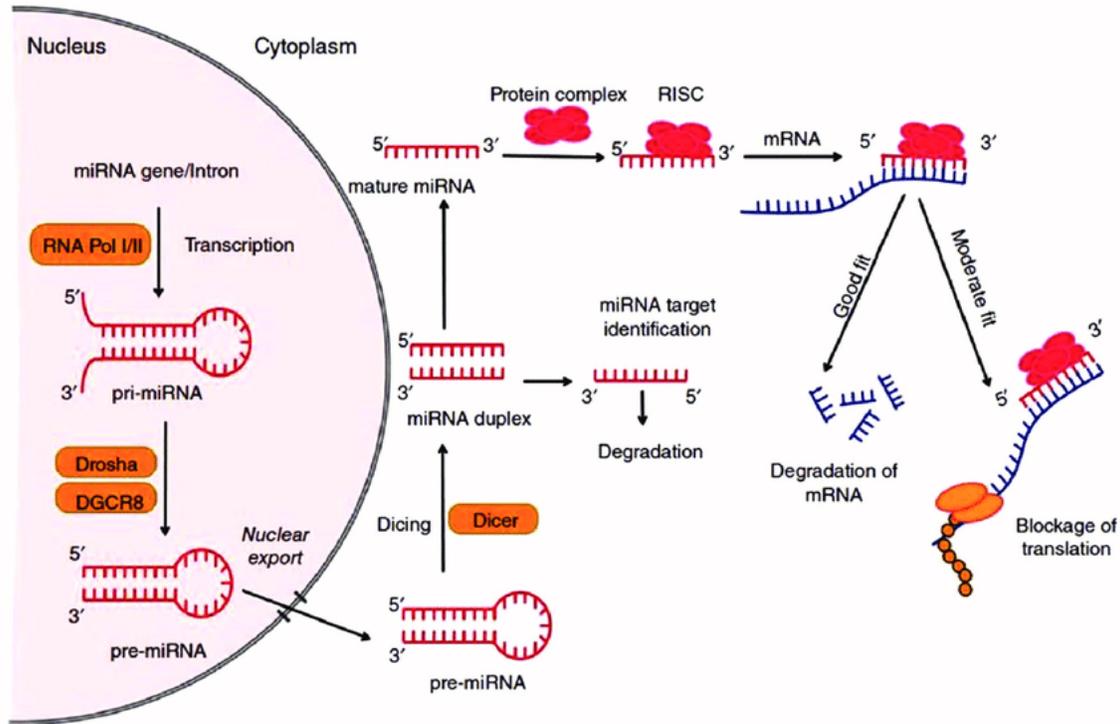


Figura 2. Esquema general de la biogénesis y mecanismos de acción de los miRNAs (Tomada de Islam *et al.*, 2017)

2.3.1. miR-155 y su Rol en el Sistema Inmune

El miR-155 es un miRNA multifuncional que es codificado por el gen MIR155HG. La literatura indica su función en varios procesos biológicos, incluyendo hematopoyesis, inflamación e inmunidad, y su expresión se ha reportado en el timo y el bazo, aunque se ha detectado en otros tejidos (O'Connell *et al.*, 2007; O'Connell *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Se ha estudiado la regulación que ejerce miR-155 en varios genes pertenecientes a células del sistema inmune, y su desregulación se ha visto relacionada con diferentes tipos de enfermedades, entre ellas el cáncer (Faraoni *et al.*, 2009; Vigorito *et al.*, 2013).

Adicionalmente, se ha visto que tras la activación de células del sistema inmune, miR-155 juega regulando tanto positiva como negativamente la respuesta inflamatoria de los mamíferos. Los diversos mecanismos de acción podrían deberse a los cambios en el transcriptoma dependiendo del tipo de célula. Se cree que este miRNA regula positivamente la liberación de citocinas

inflamatorias durante la respuesta inmune innata. Su expresión es inducida por señales inflamatorias producidas por la respuesta a un antígeno, ejerciendo un control sobre el nivel de expresión de TAB2, una molécula importante en las vías de señalización celular (Figura 1) (González-Rascón & Mata-Haro, 2016; Mashima, 2015).

2.3.2. Papel de miR-155 en Células Dendríticas

Se ha demostrado la importancia de miR-155 en DCs, ya que ejerce un efecto en su maduración, diferenciación, adhesión, entre otros. Cuando la DC es estimulada, dentro de la cascada de señalización que se genera al estimular a DCs se activan factores de transcripción que regulan positivamente la expresión de este miRNA, y este a su vez regula estos factores de transcripción, en un proceso de retroalimentación (González-Rascón A, Mata-Haro; Vigorito et al., 2013).

Por otro lado, se ha observado que la expresión de esta molécula modifica el fenotipo de las DCs, ya que induce la producción de citocinas inflamatorias. Por lo tanto, se relaciona a miR-155 con procesos inflamatorios posteriores al estímulo en la célula (Ceppi et al., 2009). Su expresión es importante de forma que, si se elimina, la célula dendrítica DC no es capaz de madurar correctamente, aún después de haber sido estimulada. (González-Rascón 2017).

Los niveles de expresión de miR-155 en estas células DCs se elevan cuando estas han sido expuestas a LPS (Ceppi et al., 2009). También, se comprobó la importancia de miR-155 en la respuesta inflamatoria alérgica de DCs en ratones, al modular la señalización llevada a cabo por P2R, una molécula importante en las vías de señalización (Zech et al., 2015). También se evidenció que miR-155 regula la maduración de las DCs provenientes de médula ósea, en las que al suprimir el miR-155 se impidió la maduración de las DCs (Martínez-Nunez et al. 2009; Yang et al, 2016; Zech et al., 2015). Estos estudios revelan la importancia de miR-155 en el correcto funcionamiento de las DCs.

2.4. Probióticos

En el tracto intestinal del ser humano adulto residen más de 1000 especies de bacterias (Almeida *et al.*, 2019). Algunas de estas son consideradas benéficas para la salud, mientras otras son patogénicas. Generalmente, existe un balance en la microbiota intestinal; no obstante, diferentes factores como antibióticos, medicamentos o procedimientos quirúrgicos pueden alterar esta homeostasis. Entre las bacterias consideradas benéficas para la salud tenemos a los probióticos. Este nombre proviene de una palabra griega que significa “para la vida” y los seres humanos los han utilizado desde hace siglos. Su uso comenzó con la historia del hombre, cuando los griegos y los romanos recomendaban el consumo de productos fermentados a niños y a personas enfermas (Soccol *et al.*, 2010; Williams, 2010).

Según la FAO/WHO (2006) los probióticos son microorganismos vivos, o partes de ellos que al administrarse en una cantidad adecuada confieren beneficios en la salud del hospedero. Por este motivo, en los últimos años se ha despertado un gran interés en estos microorganismos, siendo objeto de muchos estudios en el área de la salud y nutrición. Ello ha conllevado a su implementación en la dieta, encontrándose disponibles en varias presentaciones como tabletas, cápsulas, fibras, polvos, yogures y otras más (Soccol *et al.*, 2010; Williams, 2010).

Algunas características importantes han sido establecidas como parámetros para considerar a una bacteria como probiótica, siguiendo los lineamientos establecidos por la FAO/WHO (2006). Entre ellas que sean totalmente seguras para el huésped, resistencia a la acidez gástrica y a las secreciones pancreáticas, adhesión a las células epiteliales, actividad antimicrobiana, inhibición de la adhesión de bacterias patógenas, resistencia a antibióticos, tolerancia a los aditivos que se agregan a los alimentos y estabilidad en la matriz alimentaria (Havenaar *et al.*, 1992; Soccol *et al.*, 2010; Williams, 2010).

2.4.1. Usos y Beneficios en la Salud

Los probióticos ayudan a establecer un balance positivo en la población de microorganismos que conforman la microbiota intestinal. El efecto benéfico de su consumo se ha demostrado con éxito en diferentes tipos de terapias contra distintas afectaciones. Se ha visto que son capaces de disminuir diarrea y malestar estomacal, de proporcionar protección contra cáncer de colon y han servido como coadyuvantes en padecimientos urogenitales. Además se ha visto que tras su consumo constante, se ha logrado reducir el nivel de colesterol en la sangre (Lourens-Hatting & Viljoen, 2001; Socol *et al.*, 2010).

Muchas investigaciones se enfocan en obtener el mayor provecho posible de diferentes probióticos. Por ejemplo se demostró que la administración prolongada (12 meses) del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG redujo de manera significativa la incidencia de infecciones del tracto reproductivo y del tracto respiratorio, específicamente de rinovirus en un estudio con 94 infantes prematuros (Luoto *et al.*, 2014). En otro estudio se administró yogur adicionado con *Lactobacillus acidophilus* a grupos de 30 y 48 individuos de 49 a 58 años de edad con hipercolesterolemia primaria (rangos de niveles de colesterol entre 4.69 y 8.32 mmol/L); con esta terapia lograron la reducción de 2.9% de en la concentración de colesterol en la sangre (Anderson & Gilliland, 1999).

Es, por lo tanto, que se considera que el consumo de probióticos proporciona beneficios en la salud y es necesario hacer énfasis en la importancia de la investigación científica en esta área, ya que estos procesos y mecanismos están aún lejos de ser completamente elucidados.

2.4.2. Tipos de Probióticos

Los probióticos comprenden un gran número de especies, siendo *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* los géneros pioneros en este campo. Pueden encontrarse en el tracto gastrointestinal de seres humanos, animales y en alimentos. Sus características fisiológicas le permiten su supervivencia en

el tracto gastrointestinal, debido a su resistencia a pH bajo y a diferentes rangos de temperatura. Muchas investigaciones se enfocan en la caracterización de los probióticos, evaluando la composición de cada especie y determinando sus concentraciones en diferentes partes del intestino. La meta es entender las interacciones huésped-microbio y microbio-microbio dentro de la misma microbiota, con el fin de comprender los efectos combinados de estas interacciones en la salud del huésped (Soccol *et al.*, 2010).

2.4.3. *Bifidobacterium animalis ssp lactis* Bb12

Bb12 es una bacteria gram-positiva, anaeróbica y sin motilidad que se presenta en forma de varillas celulares bífidas. Exhibe propiedades tales como una elevada tolerancia al oxígeno, diferente crecimiento en medios a base de leche y la hidrólisis de proteínas pertenecientes a esta. Es una de las especies de *Bifidobacterium* más utilizadas en la industria de los alimentos, cuyo comercio se da en una gran variedad de alimentos y leche de fórmula materna. Esto es debido a su capacidad de aportar grandes beneficios a la salud, sirviendo como terapia para un gran número de enfermedades (Meile *et al.*, 1997; Kabeerdoss *et al.*, 2011).

A pesar de la aceptación general de Bb12 como un probiótico, y su uso en la industria alimentaria y de la salud por sus efectos benéficos, hay poca información definitiva que respalde su mecanismo de acción. Se ha propuesto la resistencia inducida a través de la estimulación con Bb12, modulación del sistema inmune, y la competitividad exclusiva de patógenos como posibles mecanismos de acción; sin embargo, no se han logrado observar estos eventos a nivel molecular (Kabeerdoss *et al.*, 2011; Saxelin *et al.*, 2005).

2.4.4. Bb12 y Células Dendríticas

Numerosos estudios han reportado la importancia de este probiótico dentro del sistema inmune

(Holscher *et al.*, 2012; Luoto *et al.*, 2014; Peña *et al.*, 2014; Zarrati *et al.*, 2013; Zech *et al.*, 2015) y ha servido como organismo modelo para regular respuestas inmunitarias, modulando a las poblaciones pertenecientes a este sistema, tanto a linfocitos B y T, como a DCs, y macrófagos. Su papel va más allá de sólo regular o alterar el comportamiento, sino que puede inducir la generación de linfocitos T de memoria. Esto se ha demostrado en diferentes estudios, ya que ha sido muy utilizado en fórmulas para infantes que no reciben leche materna, y se ha visto que, al administrarse en cantidades adecuadas a los bebés, se estimula la producción de anticuerpos como IgA (Holscher *et al.*, 2012; Schiffrin *et al.*, 1995).

Se ha visto que Bb12 es capaz de estimular efectivamente a DCs. Este estímulo afecta su fenotipo, induciendo la producción de varias citocinas, entre las más reportadas se encuentran TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12. Las citocinas proinflamatorias son las que se expresan en mayor cantidad al inicio de la respuesta inflamatoria, mientras que la de las citocinas antiinflamatorias se muestra muy pobremente, esto se revierte conforme avanza la respuesta. También aumenta la expresión de muchas moléculas de superficie, algunas de las más importantes son CD80, CD86, y MHC II (Latvala *et al.*, 2008).

2.4.5. Interrelación entre DCs, mir-155 y Bb12

Se han analizado los beneficios de las terapias en donde se utiliza Bb12 para modular la respuesta de las DCs y sus efectos en la salud. Así mismo, se ha observado la importancia de miR-155 en la respuesta inmune a través de las células dendríticas. Se ha reportado que al silenciar a miR-155 se ve comprometida la maduración de moDCs por medio del estímulo con LPS, detectado principalmente por TLR4. El mismo estudio demostró que si se estimula a la DC con un agonista de TLR2 (Pam₃CSK₄), se puede inducir la maduración de estas células, aún después de haber silenciado mir-155 (González-Rascón 2017).

Es de interés analizar el comportamiento de la expresión de citocinas y moléculas de superficie en DCs, al estimular con Bb12 después de aplicar un modelo de pérdida de función de miR-155. Esto

nos permitiría analizar el cambio fenotípico en este tipo de células debido a estas interacciones. De esta manera sería posible obtener un panorama más amplio de los procesos regulados por miR-155 y Bb12 en el sistema inmune.

3. HIPÓTESIS

El probiótico *Bifidobacterium animalis ssp lactis* Bb12 es capaz de rescatar la maduración de células dendríticas cuando esta ha sido comprometida por la inhibición de miR-155.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar el fenotipo de las células dendríticas estimuladas con el probiótico Bb12 en las cuales se ha inhibido la función de miR-155.

4.2. Objetivos Específicos

1. Establecer y caracterizar un cultivo de células dendríticas a partir de monocitos (moDCs) obtenidos de sangre periférica y en presencia de Bb12.
2. Inhibir la función de miR-155 en moDCs de sangre periférica mediante secuencias de oligonucleótidos anti-sentido (ASO).
3. Determinar el nivel de silenciamiento de miR-155 mediante RT-qPCR en moDCs con y sin estímulo de Bb12.
4. Determinar marcadores de superficie HLA-DR, HLA-ABC, CD80, CD14, CD163 y CD11c mediante citometría de flujo en moDCs silenciadas en miR-155 y estimuladas con Bb12.
5. Cuantificar la producción de citocinas: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 mediante citometría de flujo, en moDCs silenciadas tratadas con Bb12.

5. METODOLOGÍA

5.1. Modelo Experimental

El modelo experimental general se esquematiza en la Figura 53. En primer lugar se obtuvieron los monocitos (sección 5.2) y se diferenciaron a mDCs con las citocinas GM-CSF e IL-4., (sección 5.3), con. Al día 3, se realizó un recambio de citocinas al día 3. En el día 5 se colocaron las DCs en microplacas de 6 pozos y se agregaron secuencias anisentido (ASO)de ó miR-155 ASO para inhibir su función (sección 5.5). Se dejó en reposo y al día 6 se estimuló con Bb12 (sección 5.6). Al día 7 se colectaron las células y se prosiguió a llevar a cabo citometría de flujo para marcadores de superficie, y RT-qPCR para detección de miRNAS, y citocinas .

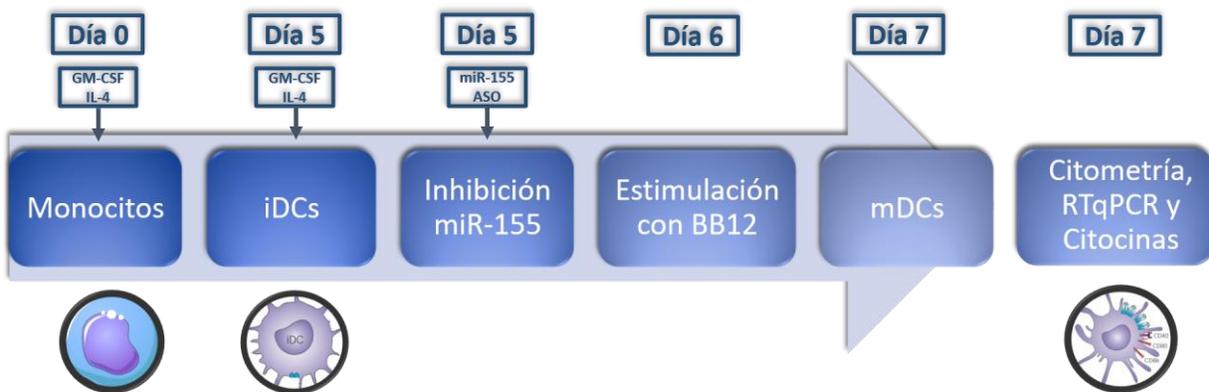


Figura 3. Esquema del modelo experimental.

5.2. Obtención de Monocitos de Sangre Periférica mediante Separación Inmunomagnética.

Paquetes globulares leucoreducidos fueron donados por parte del Banco de Sangre del Centro Médico Dr. Ignacio Chávez del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del

Estado de Sonora. La sangre obtenida se utilizó para aislar la población de células mononucleares (CMN). Se utilizaron 50 mL de sangre diluida en PBS (1:2), se colocó en tubos con Ficoll-Hypaque a una relación 1:3 y se centrifugó a 1600 rpm por 35 min. Se recolectó la capa de células entre el ficoll y el plasma. Se realizaron tres lavados con PBS, y un conteo celular con azul tripán en cámara de Neubauer, para determinar la viabilidad celular. Para separar monocitos, se utilizó la técnica de separación celular mediante perlas magnéticas (MACS). Para lo cual, las CMN se resuspendieron en 100 µL de buffer MACS y se agregaron 20 µL del anticuerpo primario CD14 y se incubaron durante 30 min en refrigeración (4 °C). Por cada 10⁷ células se agregó 1 mL de buffer MACS y se centrifugó a 300 x g por 10 min. Se resuspendió el contenido en 100 µL de buffer MACS y se agregó 20 µl de las microperlas IgG y se incubó por 30 min en refrigeración. Se centrifugó a 300 x g por 10 min con 1 mL de buffer MACS y por último se resuspendió en 500 µL de buffer MACS. Para la selección positiva de monocitos, el contenido marcado con los anticuerpos se pasó a través de una columna magnética, a las células adheridas a esta, se les agregó 3 mL de medio esencial mínimo de Dubecco (DMEM). Posteriormente, se realizó un conteo, utilizando la técnica de azul de tripan descrita anteriormente.

5.3. Obtención de Células Dendríticas a Partir de Monocitos de Sangre Periférica (moDCs)

Para generar las moDCs inmaduras, se cultivaron los monocitos durante cinco días a una densidad de 10⁶ células/mL, a 37 °C, y 5 % de CO₂ en medio completo de Dubecco (DMEM) suplementado con 10% de SFB (suero fetal bovino) y antibióticos (Penicilina-Streptomycin 10 mL/L). Además, se agregaron 500 UI/mL de GM-CSF e IL-4 (Preprotech, México); en el día 3 se agregaron más citocinas a la misma dosis inicial.

5.4. Cultivo de Bacterias

La cepa probiótica comercial utilizada en el presente estudio fue *Bifidobacterium animalis subsp.*

lactis Bb12. El cultivo se realizó en caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe agar) suplementado con 0.05 % de cisteína (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), a 37 °C. Se realizaron resiembras a las 24, 48 y 72 horas, esto con el fin de activar a las bacterias y que lleguen a su fase exponencial.

5.5. Pérdida de Función de miR-155 mediante Secuencias Anti-Sentido

Se llevó a cabo una transfección de secuencias antisentido (ASO) de miR-155 (5'-AmCmCmCmCmUAmUmCAAGAMUmUmAGmCmUmUAA-3'), con el fin de inhibir la función de miR-155, ya que la secuencia ASO ingresa a la célula encapsulada en liposomas y se une a la secuencia madura de miR-155 impidiendo su función y promoviendo su degradación. También se utilizó una secuencia ASO utilizando las mismas bases, pero con distinto orden 5'FAM SCR (5'-CAGUACUUUUGUGUAGUACAA-3') como control. Se realizó una modificación en 2'MOE para darle mayor estabilidad a las secuencias, ya que puede ser degradada por las nucleasas de las células, además de aportarle mayor afinidad a la secuencia blanco. También se agregó una molécula de metioxietanol en el carbono 2 de cada base (Figura 45) (Post et al, 2019). Las secuencias fueron diseñadas de acuerdo con la complementariedad de pares de bases y sintetizadas por Integrated DNA Technologies (IO, USA). Se llevó a cabo la transfección de las moDCs inmaduras al día cinco del cultivo con ASO miR-155. La transfección se llevó a cabo utilizando el reactivo Lipofectamine RNAiMAX (Thermofisher, MA, USA) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Se agregaron células en una placa de 24 pozos a una densidad de 3×10^5 por pozo en 500 uL de medio DMEM, para posteriormente añadir . Se agregaron 3 uL de RNAiMAX y 10 pM de secuencia ASO o secuencia SCR.

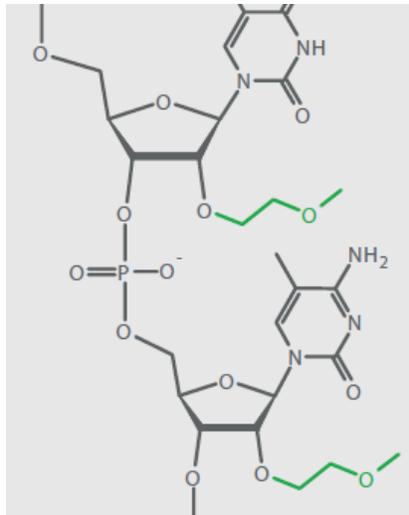


Figura 4. Molécula de metioxietanol en el carbono 2 en cada base para proporcionar mayor estabilidad y afinidad a la secuencia (Post *et al.*, 2019).

5.6. Estimulación de moDCs con Bb12

Al día 6 se adicionaron las bacterias en una relación 1:100 (moDCs:bacterias), se utilizaron como control a células sin estímulo. Transcurridas 24 horas, se realizó un lavado con PBS para remover a las bacterias mediante centrifugación (3500 rpm durante 10 minutos). Se retiró el sobrenadante, mientras que las moDCs permanecieron adheridas en el fondo del pozo.

5.7. Cuantificación de miR-155 mediante RT-qPCR

Para validar la expresión de miR-155 en moDCs, se realizó un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-qPCR), tomando como gen constitutivo a miR-199, ya que se ha visto que la expresión de miR-199 es muy baja en las moDCs y no presenta cambios significativos en los estados maduro e inmaduro (Lu *et al.*, 2011). Para lo cual, se extrajo el RNA de las moDCs estimuladas utilizando el reactivo TRIsure (Bioline, London, UK) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. La transcripción fue realizada utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (Biolabs, New England, UK). Los parámetros para la transcripción fueron de una

incubación a 38°C durante 60 min, 95°C durante 5 min, y una pausa a 4°C. El cDNA obtenido fue almacenado a -20°C hasta su uso. La reacción de qPCR se llevó a cabo con la enzima EVAGREEN (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) y los parámetros de la reacción fueron de una incubación a 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min. Los primers utilizados para cuantificar miR-155 (FWD 5'-GCAGTTAATGCTAATCGTGATAGG-3' REV 5'-GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTAAACC-3') y miR-199 (FWD 5'-CAGACAGTAGTCTGCACATTG-3' REV 5'-GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTAAACC-3') se diseñaron de acuerdo con la complementariedad de pares de bases y fueron sintetizados por IDT (IO, USA).

5.8. Determinación de Marcadores de Superficie de moDCs mediante Citometría de Flujo

Se determinaron las moléculas de superficie utilizando anticuerpos conjugados con fluorocromos: HLA-ABC (PE-Cy7), HLA-DR (APC), CD80 (APC-H7), CD11c (PE-Cy7), de BD Pharmingen; CD14 (Alexa Fluor 647) (Biorad), CD11c (PE-Cy7), y CD163 (Alexa Fluor 647) Novus Biologicals. Se recolectaron las células de los cultivos utilizando el buffer de disociación celular libre de enzimas basado en Hanks de Gibco, Termofisher (MA, USA) fueron centrifugadas y resuspendidas en 100 µL de buffer FACS (PBS, 2% SFB y 1mM EDTA), se les agregó 1 uL de anticuerpo conjugado con fluorocromos y se incubaron por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (TA). Por último, las células fueron lavadas y resuspendidas en 300 µL buffer FACS. Los análisis de citometría de flujo se realizaron en un citómetro de flujo FACS Canto II™ (BD Biosciences, San José, CA, USA) y el análisis de datos se llevó a cabo con el programa FACSDiva (BD Biosciences, San José, CA, USA).

5.9. Cuantificación de Citocinas mediante Citometría de Flujo.

Se utilizó el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines de BD Biosciences (CA, USA) para la cuantificación de las citocinas TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 mediante citometría de flujo. Se tomaron 50 µL del sobrenadante producido en el cultivo de

moDCs estimuladas con Bb12, y se le agregaron 50 μ L del buffer proporcionado por el kit que contiene el anticuerpo de captura. Se incubaron las muestras durante 3 h a TA. Se agregó 1 mL de buffer de lavado y se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Por último, se resuspendió el contenido en 300 μ L de buffer de lavado y se llevó al citómetro. Los análisis de citometría de flujo se realizaron en un citómetro de flujo FACS Canto II™ (BD Biosciences, CA, USA) y el análisis de datos se llevó a cabo con el programa FACSDiva (BD Biosciences, CA, USA).

5.10. Análisis Estadístico

Se realizó un análisis descriptivo para comprobar la normalidad de los datos por medio de la prueba de Kurtosis. Después se realizó un análisis de varianza de una vía con un nivel de significancia de 0.05, para determinar diferencias entre los diferentes tratamientos. En caso de haberlas, se utilizó la prueba de Tukey-Kramer. Se utilizó el paquete estadístico NCSS versión 11 para el análisis de los datos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Obtención y Caracterización de un Cultivo de Células Dendríticas Derivadas de Monocitos de Sangre Periférica

Los Los monocitos que fueron inducidos con IL-4 y GM-CSF por 5 días, lograron diferenciarse a iDCs, observando diferencias morfológicas entre el control (Figura 5a) y las células estimuladas (Figura 5b) en estas últimas se puede observar un aumento en el tamaño y el desarrollo de dendritas. Para la caracterización inicial se estimuló a las DCs con Bb12 en una relación 1:100 durante 24 horas. Se pudo comprobar que la maduración de estas células conlleva a cambios en su tamaño y morfología. Las mDCs (Figura 5c) presentan dendritas más prolongadas que las iDCs, además de presentar un mayor tamaño que estas (Swiecki & Colonna, 2015). Este comportamiento ya ha sido ampliamente reportado por otros investigadores (Berges *et al.*, 2005).

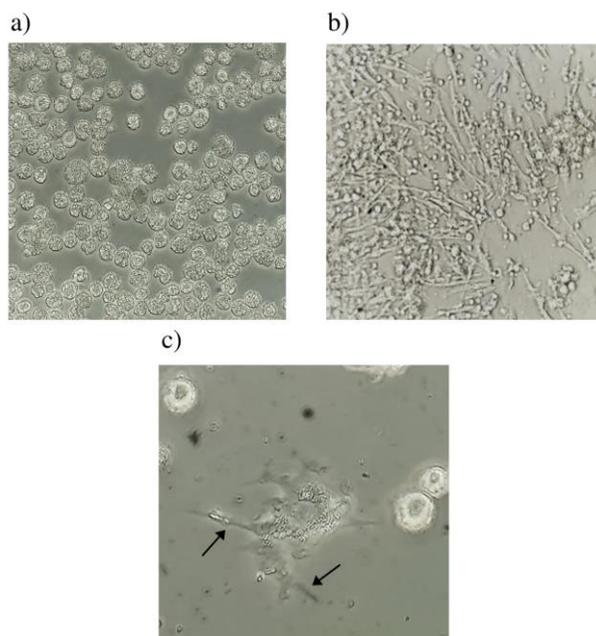


Figura 5. Micrografía de la diferenciación del cultivo de monocitos a células dendríticas. (a) cultivo de monocitos (20X); (b) células diferenciadas a moDCs mediante la utilización de GM-CSF e IL-4 y tras 5 días de incubación (20X); (c) Detalle de las dendritas (proyecciones) características, indicadas con flechas (40X).

El nivel de la diferenciación se comprobó mediante citometría de flujo, en donde se determinaron los marcadores de superficie MHC de clase I (HLA-ABC conjugado con el fluorocromo PE-Cy7) y II (HLA-DR conjugado con el fluorocromo PE-Cy5). La expresión de MHC-I es similar en ambos tipos celulares, tanto en estado inmaduro (84%) (Figura 6a) como cuando han madurado tras un estímulo (89%) (Figura 6b). MHC-I es una molécula constitutiva y ubicua, por lo que es independiente del estado de maduración de la célula. En contraste con este comportamiento, la molécula MHC-II se encuentra en menor proporción en las iDCs (29%) (Figura 6c) que en las mDCs (90%) (Figura 6d). Este comportamiento ya ha sido reportado en una gran cantidad de artículos, lo que nos permitió comprobar que contábamos con una población de moDCs viables para iniciar nuestra siguiente etapa experimental (Berges *et al.*, 2005).

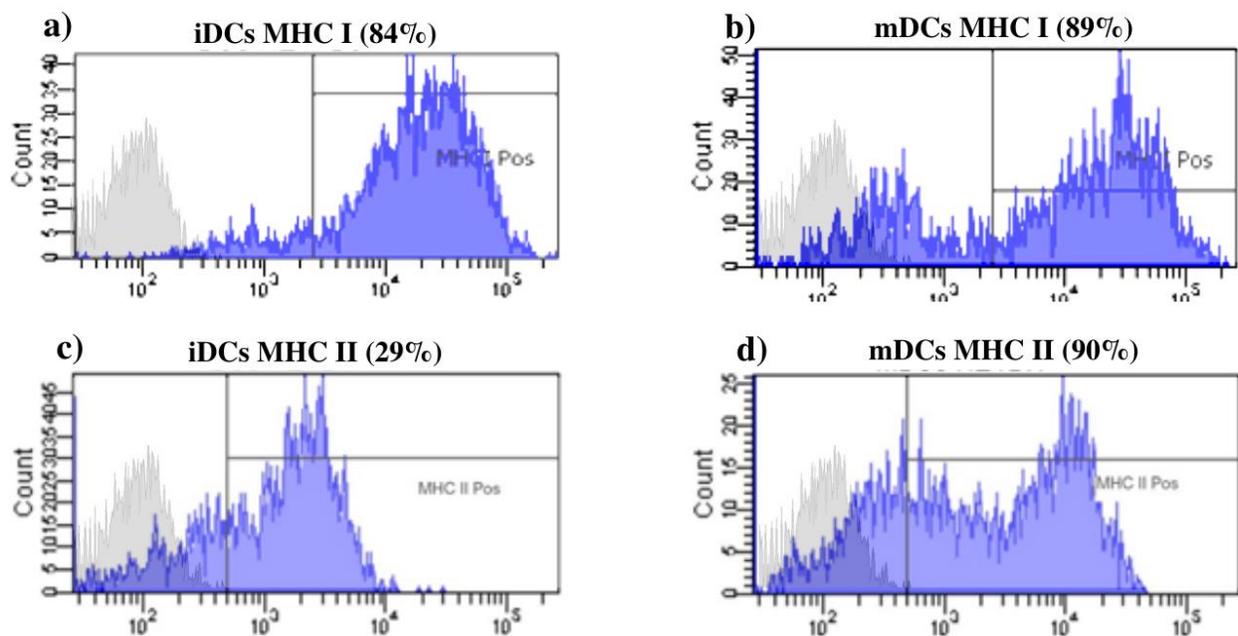


Figura 6. Histogramas de citometría de flujo realizado con las de moDCs en donde se muestra los marcadores de maduración MHC-I y MHC-II. un aumento en la expresión de la molécula MHC-I (HLA-ABC conjugado con el fluorocromo PE-Cy7) en iDCs (a) iDCs teñidas con anti-MHC-I (HLA-ABC conjugado con el fluorocromo PE-Cy7) y en mDCs (b), en donde el control negativo se representa de color gris. En contraste, la expresión de la molécula MHC-II (HLA-DR conjugado con el fluorocromo PE-Cy5), es menor en las iDCs (c) en comparación con las mDCs (d).

6.2. Inhibición de la Función de miR-155 en Células Dendríticas Derivadas de Monocitos de Sangre Periférica (moDCs) mediante Secuencias Anti-Sentido (ASO)

La transfección de las moDCs inmaduras se llevó a cabo al tercer día del cultivo con secuencias antisentido de miR-155 (5'- Am Cm Cm Cm Cm UAm Um CAAGAMUm Um AGm Cam Um UAA-3'). Se realizó una modificación en 2'MOE para darle mayor estabilidad a la secuencia, ya que puede ser degradada por las nucleasas de las células, además de aportarle mayor afinidad a la secuencia blanco. También se agregó una molécula de metioxietanol en el carbono 2 de cada base (Figura 5) (Post *et al*, 2019). La eficiencia de la transfección se llevó a cabo mediante una tinción intracelular, en la que se introdujo una secuencia a las células (5'- CAGUACUUUUGUGUAGUACAA- 3'), esta se eligió debido a que no presenta ningún tipo de carga y no altera la homeostasis celular, por esta razón fue utilizada como control de reactivos. Para la tinción se utilizó la molécula carboxifluoresceina, la cual se añadió a nuestra secuencia utilizada como control (5-FAM SCR). La comprobación se llevó a cabo de dos maneras: citometría de flujo y por microscopía de fluorescencia para obtener datos eficiencias más precisos (Zheng *et al*, 2012).

La comprobación mediante citometría de flujo se llevó a cabo utilizando el canal de FITC debido a la similitud de las propiedades espectrofotométricas de ambas moléculas. Como resultado, obtuvimos un 70% de células positivas a este fluorocromo. (Figura 7a). Mientras que en la microscopía de fluorescencia obtuvimos una eficiencia de transfección del 95% (Figura 7b). Así, comprobamos que la secuencia ingresó eficientemente a las células, dando paso a la siguiente etapa experimental.

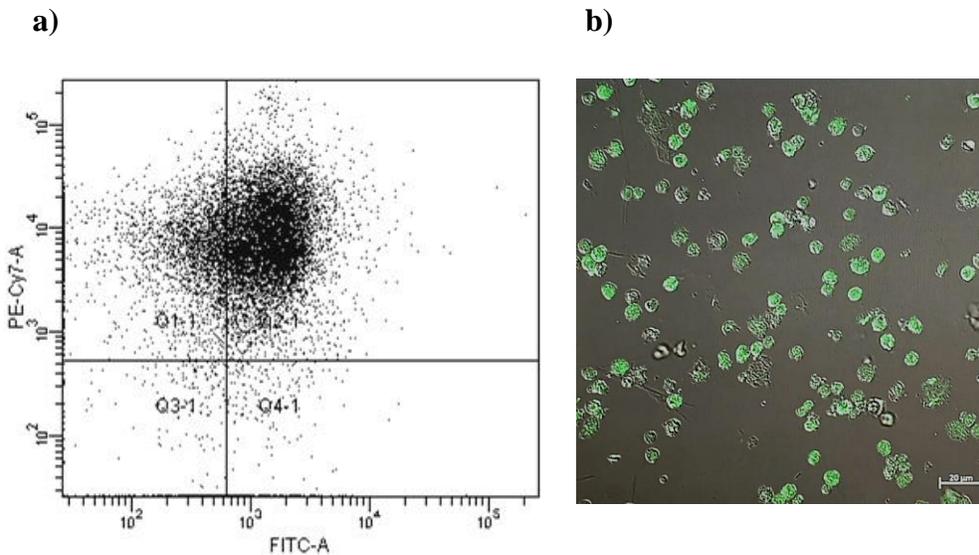


Figura 7. Resultados correspondientes a la tinción intracelular realizada con la secuencia SCR marcada con 5-FAM. (a) Dot plot representativo correspondiente a las citometrías de flujo de DCs llevadas a cabo utilizando dos marcadores PE-Cy7 (MHC II), el canal FTL-1 fue utilizado para la fluorescencia de FAM, similar a la de FITC. El 70% de las células fueron positivas a FAM. (b) Microscopía de fluorescencia llevada a cabo con las células transfectadas, en donde podemos ver más del 95% de eficiencia de transfección. Imágenes representativa de al menos 3 experimentos independientes.

6.3. Estimulación de DCs y Modelo Experimental

Como se mencionó anteriormente, en nuestro modelo experimental utilizamos 4 tratamientos: Control, que fueron moDCs inmaduras sin estímulo; T1, que fueron moDCs sin tratamiento y estimuladas con Bb12; T2, que fueron moDCs transfectadas con miR-155 ASO utilizando Lipofectamina RNAiMAX y estimuladas con Bb12; y T3: que fue un control de reactivos en donde se tuvieron moDCs transfectadas con 5'FAM-SCR utilizando Lipofectamina RNAiMAX. Utilizamos el control y la secuencia SCR para validar que el comportamiento de la célula se debe al estímulo y no a los reactivos o al estrés propio del procedimiento, ya que se ha visto que en algunas ocasiones estos factores pueden causar una respuesta por parte de la célula. (Kim *et al*, 2012).

6.4. Cuantificación de miR-155 mediante RT-qPCR

Se ha visto que miR-155 es crucial para el desarrollo de las células dendríticas, y como podemos ver, hubo un aumento significativo ($P < 0.05$) (Figura. 8) en la expresión relativa de las moDCs estimuladas con Bb12 (T1) en comparación con el control (5.12 y 1.02, respectivamente), es decir, el estímulo con Bb12 logró provocar un aumento en la expresión de miR-155. Se logró inhibir la función de miR-155, ya que no hubo diferencias ($P > 0.05$) entre las células transfectadas con miR-155 ASO (T2), las células sin transfectar (T3) y el control sin estímulo. Es decir, que la transfección de la secuencia antisentido se realizó con éxito, de no haber sido así, la expresión de miR-155 en T2 hubiera sido diferente al control, o se hubiera comportado similar a T1. Es decir, el estímulo con Bb12 en las células transfectadas con miR-155 ASO (T2) hubiera resultado en un aumento de expresión de miR-155, como sucedió en T1, sin embargo, se mantuvo al mismo nivel que las células inmaduras (control). Otro dato importante, es que la respuesta de las células transfectadas con miR-155 ASO se debe al estímulo proporcionado por Bb12 y no a los reactivos, ya que estas presentan diferencias significativas con las células transfectadas con SCR (Kim *et al*, 2012).

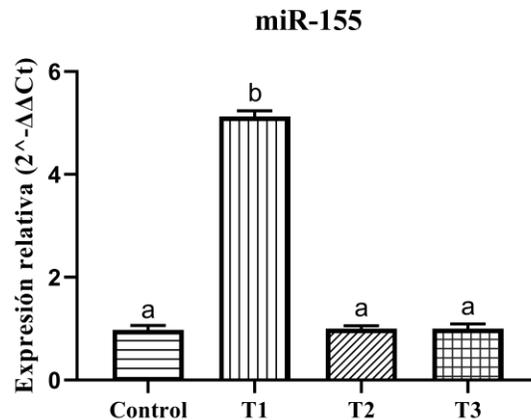


Figura 8. Expresión relativa de miR-155 por RT-qPCR en células transfectadas. Resultados de RT-qPCR presentados en expresión relativa. Los tratamientos utilizados fueron: un control (moDCs sin estímulo), T1 (moDCs + Bb12), T2 (moDCs + Bb12 + ASO) y T3 (moDCs + SCR). No se encontraron diferencias significativas entre el control, T2 y T3 ($P > 0.05$), mientras que T1 es diferente a todos los tratamientos ($P < 0.05$). Datos presentados como la media \pm DE de al menos 3 experimentos independientes. Literales diferentes expresan diferencias significativa

6.5. Determinación de Marcadores de Superficie: HLA-DR, HLA-ABC, CD14, CD11C, CD80, y CD163 mediante Citometría de Flujo

Se utilizaron seis marcadores conjugados con sus respectivos fluorocromos: CD14 (Alexa 647), CD11c (PE-Cy7), MHC I (PE-Cy7), MHC II (APC), CD80 (APC-H7) y CD163 (Alexa 647). La molécula CD11c es una proteína trans-membrana que se expresa en monocitos, granulocitos, células B y macrófagos, pero principalmente en DCs, más del 90% de las DCs presentan este marcador (Collin et al, 2013). Nuestra población expresó altos porcentajes de esta molécula (Figura 9a) (Control: 64%, T1:76%, T2: 79% y T3 61%) sin diferencias ($P>0.05$) entre los tratamientos. Las DCs que son CD11c+ (Figura 9a) son conocidas como DCs inflamatorias, ya que provienen de monocitos que se encuentran en circulación (Collin et al, 2013; Lewis 2012). CD14 es un marcador que se presenta en mayor cantidad en monocitos, conforme se van diferenciando a DCs y durante la maduración se va perdiendo este marcador, por lo tanto, es de esperar que su expresión en DCs maduras no sea tan alta. En nuestra población, la expresión de CD14 fue menor al 40% (Figura 9b), sin mostrar diferencias significativas entre los tratamientos (Control: 30.5%, T1: 30.9%, T2: 30.9% y T3: 32.9%) ($P>0.05$) (Collin et al, 2013; Péguet-Navarro et al, 2010). La molécula CD11c es una proteína trans-membrana que se expresa en monocitos, granulocitos, células B y macrófagos, pero principalmente en DCs, más del 90% de las DCs presentan este marcador (Collin et al, 2013). Nuestra población expresó altos porcentajes de esta molécula (Figura 9a) (Control: 64%, T1:76%, T2: 79% y T3 61%) sin diferencias ($P>0.05$) entre los tratamientos. Las DCs que son CD11c+ (Figura 9c) son conocidas como DCs inflamatorias, ya que provienen de monocitos que se encuentran en circulación (Collin et al, 2013; Lewis 2012). Debido a que, para CD14 no encontramos diferencias entre los tratamientos (Figura 9b y 9d) y hubo altos porcentajes de CD11c (Figura 9a y 9c), indica que se llevó a cabo correctamente la diferenciación a DCs.

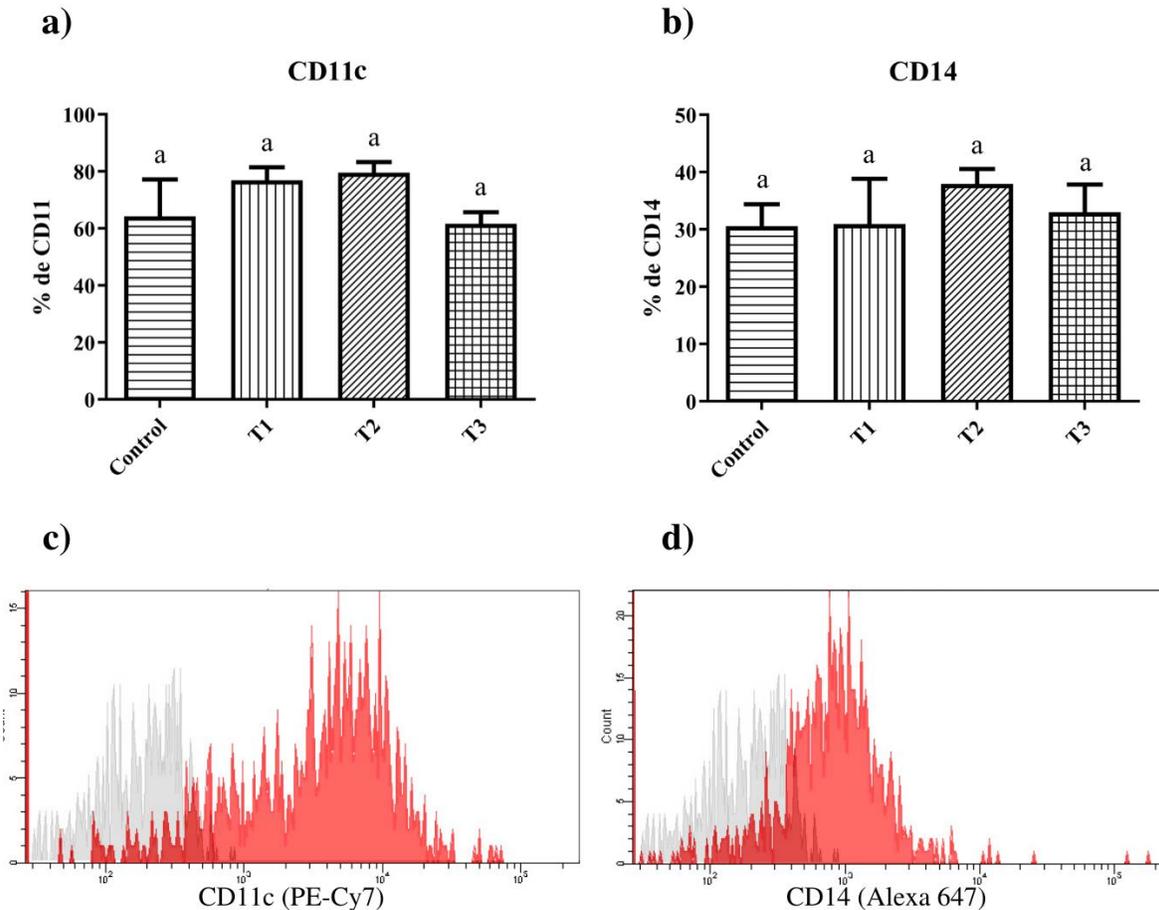


Figura 9. Expresión de CD11c y CD14 en iDCs y mDCs mediante Datos de citometría de flujo realizada con las DCs con diferentes tratamientos representados en porcentajes. Se presentan los datos de CD11c conjugado con PE-Cy7 (a) y CD14 conjugado con Alexa 647 (b). Los tratamientos utilizados fueron: un control (moDCs sin estímulo), T1 (moDCs + Bb12), T2 (moDCs + Bb12 + ASO) y T3 (moDCs + SCR). Se presentan también los histogramas de la expresión de CD11c (c) y CD14 (d) en donde el control negativo se representa de color gris. Datos presentados como la media \pm DE de al menos 3 experimentos independientes. Literales diferentes expresan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Por otro lado, MHC de clase I (HLA-ABC) es una molécula ubicua que se encuentra en todas las APCs, mientras que MHC de clase II (HLA-DR) es un marcador de maduración en este tipo de células, ya que su expresión aumenta tras la maduración de la célula, al presentar el antígeno. La citometría demostró que para MHC I (Figura 10a y 10c), la población muestra diferencias significativas ($P > 0.05$) entre el control (46.9%) y los demás tratamientos (T1: 92.7%, T2: 82.7% y T3: 77%) (Rock *et al*, 2016). La molécula MHC de clase II (HLA-DR) se presentó en mayor

porcentaje en T1 y T2 (78% y 81%, respectivamente) (Figura 10b y 10d), que fueron los estimulados con Bb12 y los cuales no presentaron diferencias significativas entre ellos ($P>0.05$) y en contraste, el control (24.4%) presentó diferencias significativas ($P<0.05$) con todos los demás tratamientos. Los resultados de la determinación de estos marcadores nos dicen que nuestra población es capaz de madurar después de un estímulo, lo cual ya ha sido ampliamente reportado para estas subpoblaciones (Rock *et al*, 2016; Martínez-Abad *et al*, 2016).

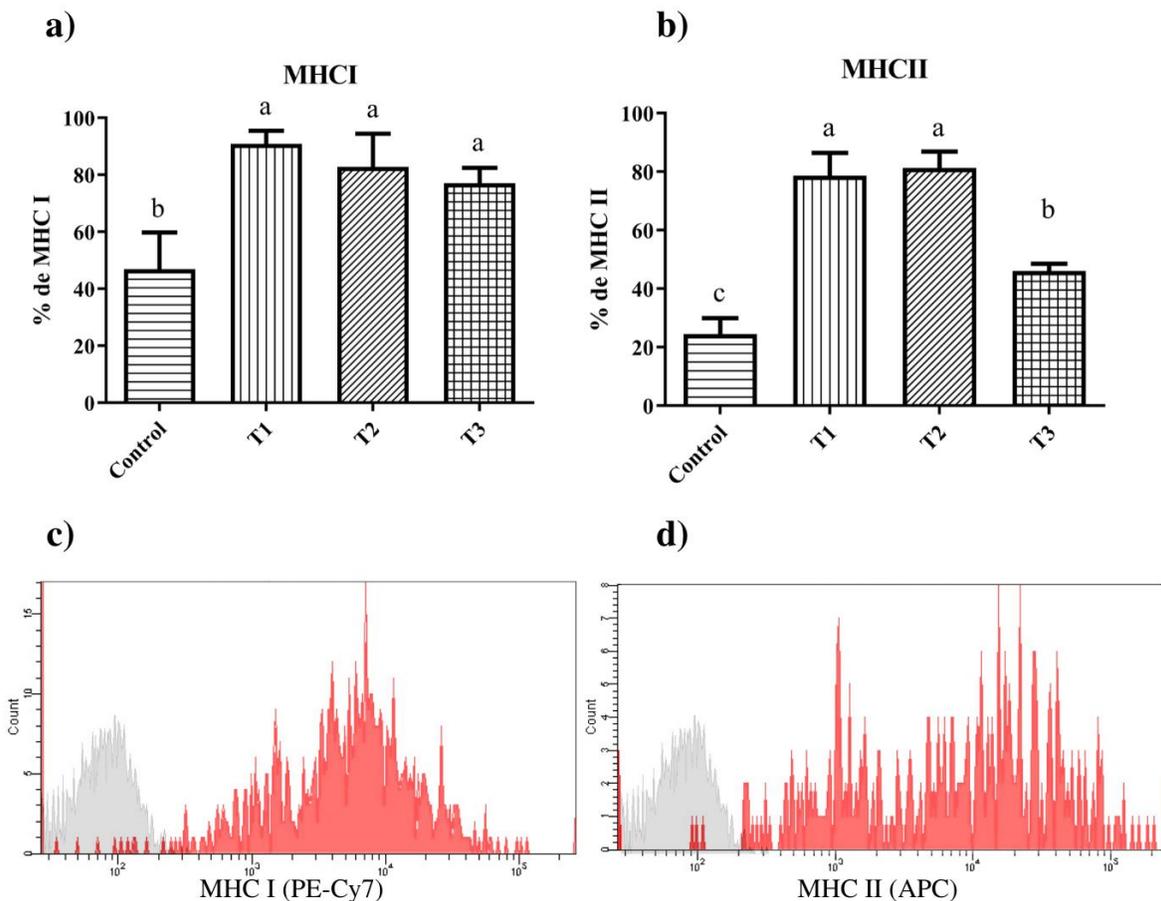


Figura 10. Expresión de MHC-I y MHC-II mediante citometría de flujo en DCs con diferentes tratamientos representados en porcentajes. Se presentan los datos de MHC I conjugado con PE-Cy7(a) y MHC II conjugado con APC(b). Los tratamientos utilizados fueron: un control (moDCs sin estímulo), T1 (moDCs + Bb12), T2 (moDCs + Bb12 + ASO) y T3 (moDCs + SCR). Se presentan también los histogramas de la expresión de MHC I (c) y MHC II (d) en donde el control negativo se representa de color gris. Datos presentados como la media \pm DE de al menos 3 experimentos independientes. Literales diferentes expresan diferencias significativas ($p<0.05$).

Además, se midió la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. CD80 es una molécula necesaria para la presentación de antígeno, ya que forma el complejo B7 junto con CD86 para unirse al receptor CD28 de las células T. Mientras que CD163 es un marcador mediado por citocinas inflamatorias como TNF α . Por dicha razón, utilizamos este marcador ya que a pesar de que la maduración de la célula es necesaria, también es importante determinar el nivel de activación para inferir en su capacidad de estimular a otras células. En nuestros resultados, la población de células presentó un aumento ($P < 0.05$) en la expresión de CD80 (Figura 11a y 11b) en el T1 (30.5%) y en el T2 (29.8%) respecto al control (15.1%) (Etzerodt & Moestrup, 2013; Martínez-Abad et al, 2016). El marcador CD163 (Figura 11c y 11d) presentó un bajo nivel de expresión (Control: 11.03%, T1: 32.6, T2: 15% y T3: 13.3%), sin diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos, CD163 es un marcador principalmente de macrófagos inflamatorios, por lo que este resultado era de esperarse, esto se puede deber a los bajos niveles de expresión TNF α , ya que se ha visto que la expresión de dichas moléculas está relacionada (Etzerodt & Moestrup, 2013).

Como se mencionó anteriormente, la población expresa CD80+ (Figura 11c y 11d) y al no haber diferencias entre las moDCs + Bb12 y moDCs + Bb12 + ASO, podemos decir que Bb12 fue capaz de activar a la célula a pesar de haber inhibido a miR-155. De hecho, estos valores son muy similares a los ya reportados anteriormente, donde se han visto expresiones similares de CD80 al estimular con una serie de probióticos (Martínez-Abad et al, 2016).

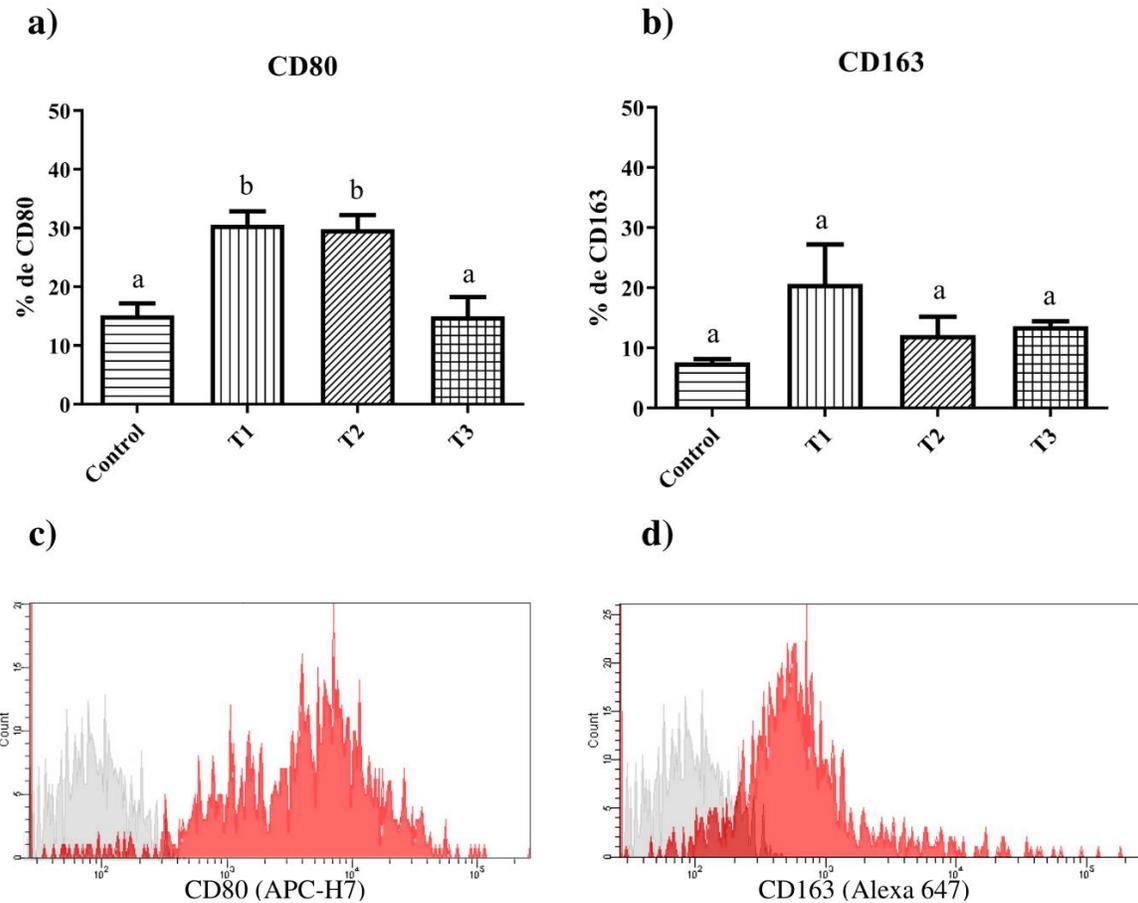


Figura 11. Expresión de CD80 y CD163 mediante Datos de citometría de flujo realizada con las DCs con diferentes tratamientos representados en porcentajes. Se presentan los datos de CD163 conjugado con Alexa 647 (a) y CD80 conjugado con APC-H7 (b). Los tratamientos utilizados fueron: un control (moDCs sin estímulo), T1 (moDCs + Bb12), T2 (moDCs + Bb12 + ASO) y T3 (moDCs + SCR). Se presentan también los histogramas de la expresión de CD80 (c) y CD163 (d) en donde el control negativo se representa de color gris Datos presentados como la media±DE de al menos 3 experimentos independientes. Literales diferentes expresan diferencias significativas.

La expresión de la molécula MHC II aumenta tras un estímulo, en este caso, las moDCs estimuladas con Bb12 y transfectadas con miR-155 ASO fueron capaces de madurar, ya que presentaron un aumento ($P < 0.05$) en comparación con el control, pero no muestran diferencias con las moDCs de T1. De la misma manera, la expresión de CD80 no se vio afectada con la transfección. Los valores de CD80 y MHC II tanto en T1 como en T2 coinciden con los resultados de Martínez-Abad (2016) en donde determinaron la maduración y activación de las moDCs al estimular con una serie de probióticos, entre ellos Bb12.

Mientras que algunas cepas bacterianas como *Streptococcus* desencadenan una respuesta aguda, Bb12 lo hace de una manera débil pero sostenida y efectiva (Martinez-Abad *et al.*, 2016). Esto es favorable, ya que Bb12 puede provocar un estímulo sin producir un proceso inflamatorio agudo. Es importante señalar que el análisis de los marcadores de superficie muestra que, al inhibir a miR-155, Bb12 son capaces de rescatar el silenciamiento producido por el este miRNA, provocando que las moDCs se activen y maduren.

Estos resultados demuestran que Bb12 es capaz de activar a las DCs y de permitir su diferenciación, esto lo demostramos con el aumento en la expresión de los marcadores de superficie CD80, MHCII, MHCI y CD11c. Además, las células cuya función de miR-155 ha sido inhibida son capaces de madurar ante el estímulo de Bb12. Los marcadores de superficie indican que la célula ha madurado y se ha activado.

6.6. Cuantificación de Citocinas IL-12, TNF α , IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8 mediante Citometría de Flujo

IL-12 y TNF α son citocinas pro-inflamatorias muy importantes en la activación de las DCs. En nuestro trabajo no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos, tanto de IL-12 (Figura 12a) como para TNF α (Figura 12b). En este caso, no hubo producción de estas citocinas. Ya se ha reportado que Bb12 es capaz de estimular a las DCs no tan fuertemente como otras cepas patógenas, quizá por esta razón no encontremos una producción tan elevada de IL-12 y TNF α . Otra razón puede ser que miR-155 se ha visto involucrado en la regulación de estas citocinas (Lu *et al.*, 2011). Sin embargo, Bb12 puede utilizar otros mecanismos para activar a las DCs, por ejemplo, la producción de otras citocinas o la activación de otras moléculas, esto puede sugerir uno de los mecanismos de regulación de Bb12.

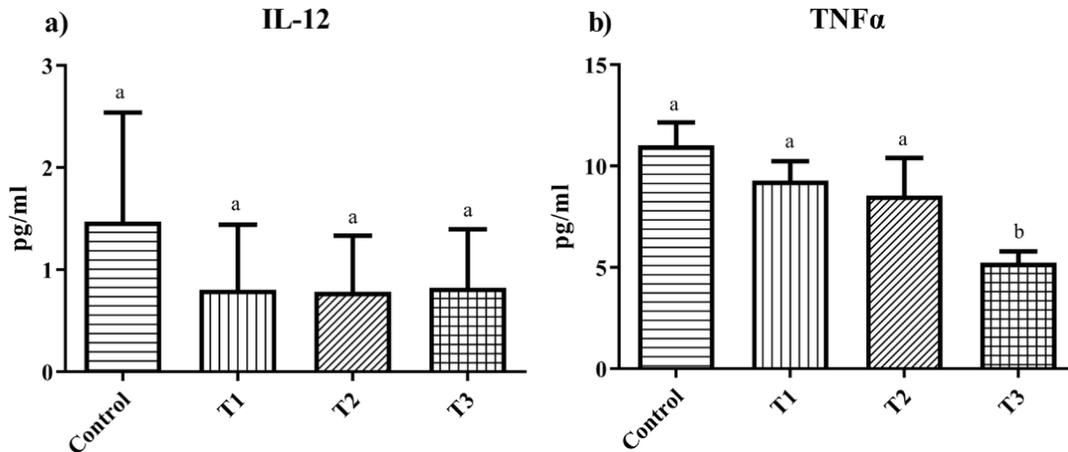


Figura 12. Cuantificación de la producción de las citocinas IL-12 y TNF α por citometría de flujo en DCs estimuladas con Bb12 durante 24h, en donde los tratamientos utilizados fueron: un control (moDCs sin estímulo), T1 (moDCs + Bb12), T2 (moDCs + Bb12 + ASO) y T3 (moDCs + SCR). Datos presentados como la media \pm DE de al menos 3 experimentos independientes.

Los resultados de la producción de IL-10 se muestran en la figura 13, en donde se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos, el valor más alto se obtuvo en T1, lo que podría indicar que, Bb12 actúa como un regulador positivo en la producción de esta citocina incluso al inhibir la función de miR-155. A su vez, miR-155 podría ser un regulador negativo en la producción de IL-10 en mDCs ya que al inhibir a este miRNA aumenta la producción de IL-10. Esta es una citocina anti-inflamatoria que juega un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria. Regula infecciones contra virus, bacterias, hongos, protozoarios. etc. Una de sus principales funciones es inhibir la síntesis de algunas interleucinas inflamatorias (Couper *et al.*, 2008).

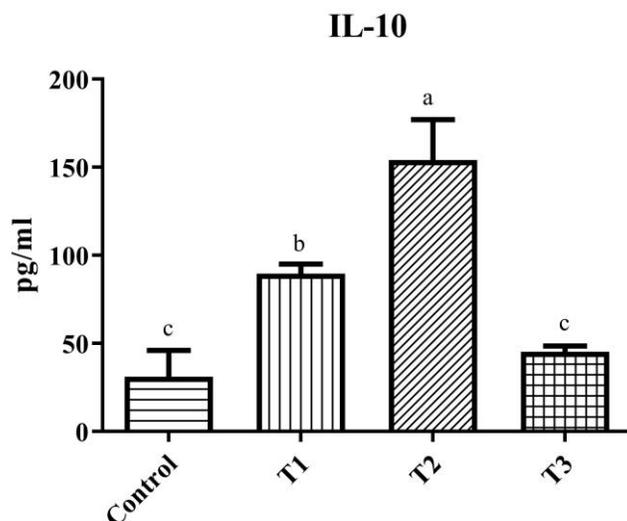


Figura 13 Cuantificación de la producción de la citocina IL-10 por citometría de flujo en DCs estimuladas con Bb12 durante 24h, en donde los tratamientos utilizados fueron: un control (moDCs sin estímulo), T1 (moDCs + Bb12), T2 (moDCs + Bb12 + ASO) y T3 (moDCs + SCR). Datos presentados como la media \pm DE de al menos 3 experimentos independiente

La producción de IL-6 se muestra en la Figura 14. Se observa que hubo un aumento significativo ($P < 0.05$) en T1 y T2 en comparación con el control. Esto demuestra que este probiótico fue capaz de estimular a las DCs y producir esta citocina a pesar de inhibir la función de miR-155. Estos resultados sugieren que esta citocina es muy importante en la cascada de señalización ya que es una citocina relacionada en algunos procesos inflamatorios, participa en la diferenciación y supervivencia de las células B y proliferación de células T (Akdis *et al.*, 2011). IL-6 es una citocina inflamatoria que participa en procesos de infección y lesiones tisulares, contribuyendo a la defensa del huésped mediante la estimulación de respuestas de fase aguda, hematopoyesis y reacciones inmunes (Tanaka *et al.*, 2014). También se encuentra relacionada en procesos de inflamación crónica.

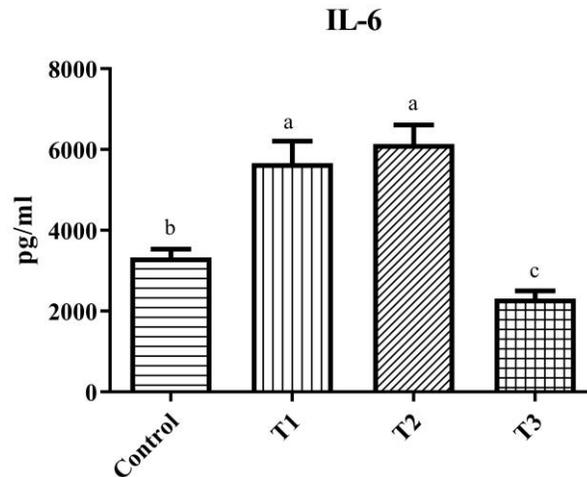


Figura 14. Cuantificación de la producción de la citocina IL-6 por citometría de flujo en DCs estimuladas con Bb12 durante 24h, en donde los tratamientos utilizados fueron: un control (moDCs sin estímulo), T1 (moDCs + Bb12), T2 (moDCs + Bb12 + ASO) y T3 (moDCs + SCR), Datos presentados como la media \pm DE de al menos 3 experimentos independiente

La producción de IL-1 β se muestra en la figura 15, en donde los valores más altos se obtuvieron en T1 y T2, lo que nos dice que Bb12 es capaz de estimular a las células para producirla. La IL-1 β es importante ya que actúa como un pirógeno endógeno, es un potenciador de la proliferación celular, diferenciación y función de células de la inmunidad innata y adaptativa, es mediador de algunas enfermedades inflamatorias iniciando y potenciando respuestas inmunes (Akdis *et al.*, 2011). IL-1 β es una citocina inflamatoria esencial en la respuesta del huésped y la resistencia a los patógenos y es liberada principalmente durante la lesión celular, invasión, infección y la inflamación (Oliveira *et al.*, 2011). Se ha visto que es capaz de regular a otros miRNAs, incluyendo a miR-155, en un proceso de retroalimentación (Ceppi, 2009).

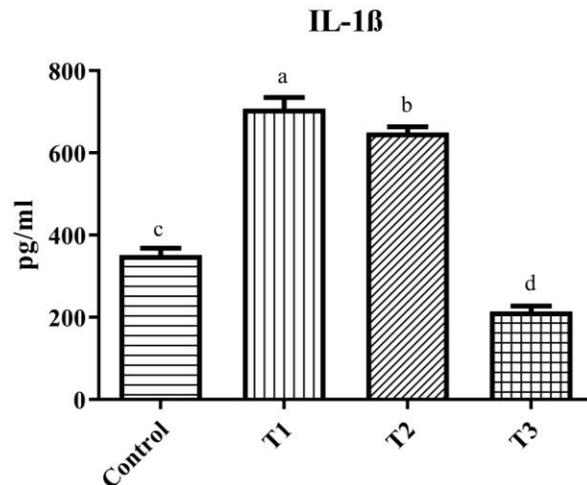


Figura 15. Cuantificación de la producción de la citocina IL-1 β por citometría de flujo en DCs estimuladas con Bb12 durante 24h, en donde los tratamientos utilizados fueron: un control (moDCs sin estímulo), T1 (moDCs + Bb12), T2 (moDCs + Bb12 + ASO) y T3 (moDCs + SCR). Datos presentados como la media \pm DE de al menos 3 experimentos independiente

La producción de IL-8 se muestra en la figura 16, en donde se observa un aumento ($P < 0.05$) en la concentración de esta citocina en T1 y en T2, sin diferencias entre ellas. Esto sugiere que las DCs son capaces de producir esta citocina al estimular con Bb12 a pesar de inhibir la función de miR-155. Bhattacharyya *et al.*, 2011, sugieren que la sobreexpresión de miR-155 regula la producción de IL-8 en células epiteliales de pulmón, ya que la regulación negativa de este miRNA suprime la expresión de IL-8. Esto sugiere que el estímulo provocado por Bb12 puede ser capaz de revertir este efecto en las células en las que se inhibió la función de miR-155. IL-8 es una quimiocina inflamatoria, una de sus funciones principales es el reclutamiento y activación de neutrófilos al sitio de infección o lesión. También atrae a eosinófilos, basófilos, células NK y células T (Akdis *et al.*, 2011).

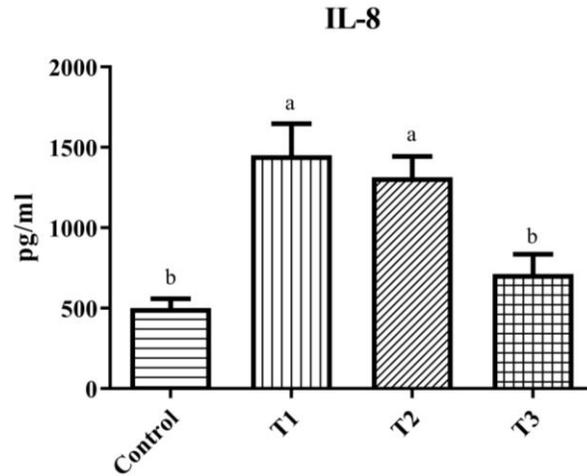


Figura 16. Cuantificación de la producción de la citocina IL-8 por citometría de flujo en DCs estimuladas con Bb12 durante 24h, en donde los tratamientos utilizados fueron: un control (moDCs sin estímulo), T1 (moDCs + Bb12), T2 (moDCs + Bb12 + ASO) y T3 (moDCs + SCR). Datos presentados como la media \pm DE de al menos 3 experimentos independiente

7. CONCLUSIÓN

El probiótico *Bifidobacterium animalis ssp lactis Bb12* activa a las células dendríticas derivadas de monocito en cultivo, demostrado por el aumento en la expresión de los marcadores de superficie CD80, MHCII, MHCI y CD11c y en la producción citocinas, IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8. Además, Bb12 restituye la función de miR-155, demostrado por la expresión de marcadores de co-estimulación y maduración así como por el perfil de citocinas. También nos indica que Bb12 es un probiótico capaz de regular el mecanismo de maduración de las células activando a miR-155, sin embargo, al inhibir la función de miR-155, Bb12 también es capaz de madurar a las DCs posiblemente mediante la activación de otras moléculas que regulan estos procesos.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar un micro arreglo para determinar los miRNAs que se regulan positiva o negativamente al estimular con Bb12.
- Bloquear los receptores TLR2 y TLR4 para determinar el nivel de activación de las células al estimular con Bb12 después de haber transfectado con miR-155 ASO.
- Realizar un ensayo de reacción linfocitaria múltiple para determinar la capacidad de las moDCs estimuladas con Bb12 y transfectadas con miR-155 ASO de activar a las células B y T

9. REFERENCIAS

- Abbas A.K., Lichtman A.H. Pillai S. 2014. Basic Immunology: functions and disorders of the immune system. Elsevier/Saunders. United States.
- Akdis M., Burgler S. Cramer R. Eiwegger T. Fujita H. Gomez E. Klunker S. Meyer N. O'Mahony, L. Palomares O. Rhyner C. Quaked N. Schaffartzik A. Van De Veen W. Zeller S. Zimmermann M. and Akdis C. 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 127(3):701-721.
- Almeida, A., Mitchell, A. L., Boland, M., Forster, S. C., Gloor, G. B., Tarkowska, A., Finn, R. D. 2019. A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature*, 568(7753), 499–504.
- Anderson J.W., and Gilliland S. E. 1999. Effect of Fermented Milk (Yogurt) Containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on Serum Cholesterol in Hypercholesterolemic Humans. *Journal of the American College Nutrition*. 18(1):43–50.
- Arthur J.S.C., and Ley S.C. 2013. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*. 13(9):679–92.
- Auffray C., Sieweke M.H. and Geissmann F. 2009. Blood Monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 27(1):669–92.
- Berges C., Naujokat C. Tinapp S. Wieczorek H. Höh A. Sadeghi M. and Daniel V. 2005. A cell line model for the differentiation of human dendritic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 333(3):896–907.
- Bhattacharyya S., Balakathiresan N. Dalgard C. Gutti U. Armistead D. Jozwik C. Srivastava M. Pollard H. and Biswas R. 2011. Elevated miR-155 Promotes Inflammation in Cystic Fibrosis by Driving Hyperexpression of Interleukin-8. *Journal of Biological Chemistry*. 286(13):11604-11615.
- Brubaker SW., Bonham K.S. Zanoni I. and Kagan J.C. 2015. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annual Review of Immunology* 5:1-34.
- Ceppi M., Pereira A.M. Dunand-Sauthier I., Barras E. Reith W. Santos M.A. and Pierre P. 2009. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(8):2735–2740.
- Collin M., McGovern N. and Haniffa M. 2013. Human dendritic cell subsets. *Immunology*. 140(1): 22–30.
- Couper K., Blount D. and Riley E. 2008. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*. 180(9):5771-5777.
- Dalod M., Salazar-Mather T.P. Malmgaard L. Lewis C. Asselin-Paturel C. Brière F.. 2002. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*. 195(4):517–28.

- Dalod M., Chelbi R. Malissen B. and Lawrence T. 2014. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *The EMBO Journal*. 3:1–13.
- Delves P.J., Martin S.J. Burton D.R. and Roitt I.M. 2017. *Essential immunology*. Essentials (Wiley-Blackwell Firm).
- Etzerodt A., and Moestrup, S. K. 2013. CD163 and inflammation: Biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxidants and Redox Signaling*. 18(17):2352–2363.
- FAO/WHO. 2006. *Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation*. FAO Food and Nutritional. Paper No. 85.
- Fan, D., & Wang, J. 2016. microRNA-155 is a master regulator of dendritic cell function in breast cancer.
- Faraoni, I., Antonetti, F. R., Cardone, J., & Bonmassar, E. 2009. miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1792(6), 497–505.
- González-Rascón, A.A. 2017. *Regulación de la vía de señalización de TLR2/NF-κB por los microRNAs mir-146a y mir-155 en células dendríticas*. (Tesis de Doctorado). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C, Hermosillo, Sonora.
- González-Rascón A., and Mata-Haro V. 2015. MicroRNAs: Regulators of TLR2-Mediated Probiotic Immune Responses. *microRNA*. 4(3):168–74.
- Havenaar R., Brink B. T. Huis In't Veld J.H.J. 1992. Selection of strains for probiotic use. *Probiotics*. 209–24.
- He, X., Jing, Z., & Cheng, G. 2014. MicroRNAs: New regulators of toll-like receptor signalling pathways. *BioMed Research International*.
- Hemmer B., Kerschensteiner M. and Korn T. 2015. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 14(4):406–19.
- Holma R., Kekkonen R.A. Hatakka K. Poussa T. Vaarala O. Adlercreutz H. and Korpela R. 2011. Consumption of Galactooligosaccharides together with Probiotics Stimulates the In Vitro Peripheral Blood Mononuclear Cell Proliferation and IFN γ Production in Healthy Men. *ISRN Immunology*. doi:10.5402/2011/584682
- Holscher H.D., Czerkies L.A. Cekola P. Litov R. Benbow M. Santema S. et al. 2012. *Bifidobacterium lactis* Bb12 enhances intestinal antibody response in formula-fed infants: A randomized, double-blind, controlled trial. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 36:106S-117S.
- Islam M.N., Masud M.K. Haque M.H. Hossain M.S.A. Yamauchi Y. Nguyen N.T. and Shiddiky M.J.A. 2017. RNA Biomarkers: Diagnostic and Prognostic Potentials and Recent Developments of Electrochemical Biosensors. *Small Methods*. 1(7):1700131.
- Iwanaszko M., Kimmel M. 2015. NF-kappaB and IRF pathways cross-regulation on target genes promoter level. *BMC Genomics*, 16, p. 307
- Iwasaki A., and Medzhitov R. 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*. 2015. 16:343–53.

- Kabeerdoss J., Shobana D.R. Regina M.R. Prabhavathi D. Vidya R. Mechenro J. Ramakrishna B.S. 2011. Effect of yoghurt containing *Bifidobacterium lactis* Bb12 on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers. *Nutrition Journal*. 10:138. doi:10.1186/1475-2891-10-138.
- Kim H.K., Wei H. Kulkarni A. Pogradichny R.M. and Thompson, D. H. 2012. Effective targeted gene delivery to dendritic cells via synergetic interaction of mannosylated lipid with DOPE and BCAT. *Biomacromolecules*.13(3):636–644.
- Latvala S., Pietilä T.E. Veckman V. Kekkonen R.A. Tynkkynen S. Korpela R. et al. 2008. Potentially probiotic bacteria induce efficient maturation but differential cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells. *World Journal of Gastroenterol*. 14(36):5570–83.
- Lee RC., Feinbaum R.L. and Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75(5):843–54.
- Lewis D. 2012. *Hematology, Immunology and Infectious Disease: Neonatology Questions and Controversies* Second Edition. Elsevier.12:189-217.
- Li Q., and Verma I.M. 2002. NF- κ B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2(10):725–34.
- Lourens-Hattingh A., and Viljoen B.C. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*. 11:1–17.
- Lu, C., Huang, X., Zhang, X., Roensch, K., Cao, Q., Nakayama, K. I., Zhou, X. 2011. IL-12 production through targeting of p27 kip1, KPC1, and SOCS-1. *Proteins*, 117(16), 1–4.
- Luoto R., Ruuskanen O. Waris M. Kalliomaki M. Salminen S. and Isolauri E. 2014. Prebiotic and probiotic supplementation prevents rhinovirus infections in preterm infants: a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 133(2):405–13.
- Martínez-Abad B., Garrote J.A. Bernardo D. Montalvillo E. Escudero-Hernández C. Vázquez E. and Arranz E. 2016. Differential immunomodulatory effects of *Lactobacillus rhamnosus* DR20, *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Functional Foods*. 22:300–312.
- Mashima R. 2015. Physiological roles of miR-155. *Immunology*. 145(3):323–333.
- Mehta A., and Baltimore D. 2016. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. *Nature Reviews Immunology*. 16(5):279–94.
- Meile L., Ludwig W. Rueger U. Gut C. Kaufmann P. Dasen G. et al. 1997. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Systematic and Applied Microbiology*. 20(1):57–64.
- Netea M.G., van de Veerdonk F.L. van der Meer J.W.M. Dinarello C.A. and Joosten L.A.B. 2015. Inflammasome-Independent Regulation of IL-1-Family Cytokines. *Annual Review of Immunology*. 33(1):49–77.
- Ng J.H.J., Tachedjian M. Wang L.F. and Baker M.L. 2017. Insights into the ancestral organisation of the mammalian MHC class II region from the genome of the pteropid bat, *Pteropus alecto*. *BMC Genomics*. 18(1):19–21.

- Nicholas D.A., Zhang K. Hung C. Glasgow S. Aruni A. W. Unternaehrer J. and De Leon M. 2017. Palmitic acid is a toll-like receptor 4 ligand that induces human dendritic cell secretion of IL-1 β . PLoS ONE. 12(5):1–24.
- O’Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D.2007. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. Proc Natl Acad Sci USA;104:1604–1609
- O’Connell RM. 2010. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. Immunity 2010;33:607–619.
- Oliveira C. M. R. K., Sakata A.M. Issy L.R. y Gerola R. 2011. Citocinas y dolor. Revista Brasileira de Anestesiología. 61(2):137-142.
- Péguet-Navarro J., Furio L. Briotet I. Journeaux A. and Billard H. 2010. Human langerhans cells are more efficient than CD14⁻ CD1c⁺ dermal dendritic cells at priming naive CD4⁺ T cells. Journal of Investigative Dermatology. 130(5):1345–1354.
- Peña F., Luisa-Mizgier M. Morales P. Rios I. Carrasco-Pozo C. Diaz E. and Gotteland M. 2014. Effect of the Synbiotic (*B. animalis* spp. *lactis* Bb12 + Oligofructose) in Obese Subjects. A Randomized, Double-Blind, Controlled Clinical Trial. Journal of Food and Nutrition Research. 2(8):491–498.
- Post N., Yu R. Greenlee S. Gaus H. Hurh E. Matson J. and Wang Y. 2019. Metabolism and disposition of volanesorsen, a 29-O-(2 methoxyethyl) antisense oligonucleotide, across species. Drug Metabolism and Disposition. 47(10):1164–1173.
- Rock K.L., Reits E. and Neefjes J. 2016. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. Trends in Immunology. 37(11):724–737.
- Saxelin M., Tynkkynen S. Mattila-Sandholm T. and De Vos W.M. 2005. Probiotic and other functional microbes: From markets to mechanisms. Current Opinion in Biotechnology. 16(2):204–11.
- Soares-Silva M., Diniz F.F. Gomes G.N. and Bahia D. 2016. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway: Role in immune evasion by trypanosomatids. Frontiers in Microbiology. 7(FEB):1–9.
- Socol C.R., Vandenberghe L. P de S. Spier M.R. Medeiros A.B.P. Yamaguishi C.T. De Dea Lindner J. et al. 2010. The potential of probiotics: A review. Food Technology and Biotechnology. 48(4):413–34.
- Su X.W., Lu G. Leung C.K. Liu Q. Li Y. Tsang K.S. et al. 2017. miR-181d regulates human dendritic cell maturation through NF- κ B pathway. Cell Proliferation. 50(5):1–12.
- Sun S. 2017. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. Nature Reviews Immunology. 17:545–558.
- Schiffrin, E. J., Rochat, F., Link-Amster, H., Aeschlimann, J. M., & Donnet-Hughes, A. 1995. Immunomodulation of Human Blood Cells Following the Ingestion of Lactic Acid Bacteria. Journal of Dairy Science, 78(3), 491–497.
- Swiecki M., and Colonna M. 2015. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. Nature Reviews Immunology. 15(8):471–85.
- Tanaka T., Narazaki M. and Kishimoto T. 2014. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease.

Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 6(10): a016295.

- Tétreault N., and De Guire V. 2013. MiRNAs: Their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clinical Biochemistry*. 46(10–11):842–5.
- Testa U., Pelosi E. Castelli G. and Labbaye C. 2017. miR-146 and miR-155: Two Key Modulators of Immune Response and Tumor Development. *Non-Coding RNA*. 3(3):22.
- Vidigal J.A., and Ventura A. 2015. The biological functions of miRNAs: Lessons from in vivo studies. *Trends in Cell Biology*. 25(3):137–47.
- Vigorito E., Kohlhaas S. Lu D. and Leyland R. 2013. miR-155: An ancient regulator of the immune system. *Immunological Reviews*. 253(1):146–57.
- Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2010; 1803(11):1231–43.
- Williams N.T. 2010 Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 67(6):449–58.
- Wynn T.A. 2015. Type 2 cytokines: Mechanisms and therapeutic strategies. *Nature Reviews Immunology*. 15:271–82.
- Yang L., Li R. Xiang S. and Xiao W. 2016. MafB, a Target of MicroRNA-155, Regulates Dendritic Cell Maturation. *Open Life Sciences*. 11(1):46–54.
- Zhang Y, et al. 2012. LNA-mediated anti-miR-155 silencing in low-grade B-cell lymphomas. *Blood*; 120:1678–1686.
- Zech A., Ayata C.K. Pankratz F. Meyer A. Baudiß K. Cicko S. et al. 2015. MicroRNA-155 modulates P2R signaling and Th2 priming of dendritic cells during allergic airway inflammation in mice. *Allergy*. 70(9):1121–1129.
- Zheng S. R., Guo G. L. Zhang W. Huang G. L. Hu X. Q. Zhu J. Zhang X. H. 2012. Clinical significance of miR-155 expression in breast cancer and effects of miR-155 ASO on cell viability and apoptosis. *Oncology Reports*. 27(4):1149–1155.
- Zarrati M., Shidfar F. Nourijelyani K. Mofid V. Hossein zadeh-Attar M.J. Bidad and K. Salehi E. 2013. *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium* BB12, and *Lactobacillus casei* DN001 modulate gene expression of subset specific transcription factors and cytokines in peripheral blood mononuclear cells of obese and overweight people. *BioFactors*. 39(6):633–643.