



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

**ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA VÍA
TLR2 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE
MONOCITOS DE CERDO ESTIMULADAS CON *Bifidobacterium
animalis ssp. lactis* Bb12**

Por:

Valeria Bárcenas Preciado

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

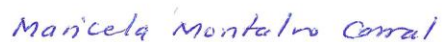
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Valeria Bárcenas Preciado, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. Verónica Mata Haro
Directora de Tesis



Dr. Jesús Hernández López
Integrante del comité de tesis



Dra. Maricela Montalvo Corral
Integrante del comité de tesis



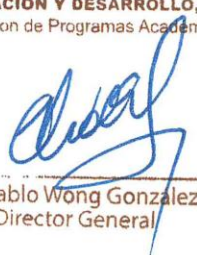
Dr. Elí Terán Cabanillas
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Análisis de Proteínas de Señalización de la Vía TLR2 en Células Dendríticas Derivadas de Monocitos de Cerdo Estimuladas con *Bifidobacterium animalis ssp. 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 Valeria Bárcenas Preciado, 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



Dr. Pablo Wong Gonzalez
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 Dra. Verónica Mata Haro por aceptarme como su alumna, gracias por guiarme en este proceso, por sus enseñanzas, consejos y su apoyo en cada etapa del desarrollo de esta tesis. Gracias por el aprendizaje dentro y fuera del laboratorio.

A los miembros de mi comité el Dr. Jesús Hernández López, la Dra. Maricela Montalvo Corral y al Dr. Elí Terán Cabanillas por su ayuda y apoyo en la realización de esta tesis.

Al Laboratorio de Bioquímica de Proteínas de la Dra. Luz Vázquez por permitirme el uso de equipo de fotodocumentación.

Un agradecimiento especial al Dr. José Ángel Huerta Ocampo por el apoyo incondicional en la detección de proteínas y la asesoría constante a lo largo de mi tesis.

A la M.C. Leticia Félix por su ayuda, apoyo y consejos en el laboratorio.

A Isaac mi mejor amigo que siempre está para mí, por formar parte de esta etapa. Gracias por tu confianza, ayuda y apoyo en todo momento.

A la Dra. Anna González, la Dra. Marina Arenas, a Marlene y Carito por su amistad, apoyo y su disponibilidad para ayudarme en el experimental y a resolver problemas.

A mis padres que siempre me han apoyado en mis decisiones y están cuando los necesito.

A mis abuelos Graciela, Ma de Jesús y Alessio que siempre están al pendiente de mí y por cuidarme desde pequeña.

A mi tíos Denia y Rogelio por apoyarme desde que inicié mis estudios de licenciatura y de posgrado.

A mi hermana Mariela y a mis primas Karen y Giselle por apoyarme en este proceso.

DEDICATORIA

A mis padres María Eugenia y Víctor Alessio.

A mis abuelos María de Jesús, Graciela y Alessio.

A mis tíos Norma Denia y Rogelio.

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1. Probióticos.....	13
2.1.1. <i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i> (Bb12).....	14
2.2. Sistema Inmune.....	15
2.2.1. Inmunidad Innata.....	15
2.2.2. Reconocimiento de Microorganismos por TLR2	16
2.2.3. Efecto de probióticos en la Respuesta Inmune.....	16
2.3. Células Dendríticas	18
2.4. Balance de la Respuesta Th1, Th2	20
2.4.1. Respuesta Th1	20
2.4.2. Respuesta Th2	21
2.5. Citocinas	21
2.5.1. Interleucina-10.....	22
2.5.2. Interleucina-12.....	23
2.6. Proteínas de Señalización Involucradas en la vía TLR.....	24
2.6.1. Supresor de Señalización de Citocinas (SOCS)	25
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
4.1. Objetivo General.....	28
4.2. Objetivos Específicos.....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1. Cultivo de Bacterias	29
5.2. Obtención de Monocitos de Sangre Periférica Porcina.....	29
5.3. Derivación y Maduración de Monocitos a Células Dendríticas	30
5.4. Estimulación de Células Dendríticas con el Probiótico Bb12	30
5.5. Western Blot	300
5.6. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).....	32
5.7. Análisis Estadístico	32

CONTENIDO (continuación)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6.1. Establecimiento de un Cultivo de moDCs.....	33
6.2. Análisis de las Proteínas.....	35
6.3. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas	40
7. CONCLUSIONES	43
8. RECOMENDACIONES.....	44
9. REFERENCIAS	45

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Interacción de probióticos con células epiteliales intestinales y células dendríticas.....	18
2	Cascada de señalización iniciada por TLR2.....	25
3	Diferenciación de monocitos a células dendríticas. Fotografías de monocitos en microscopio óptico invertido a 40x.....	33
4	Análisis de citometría de flujo de marcadores de superficie en moDCs.....	34
5	Análisis de la proteína TRAF6 por western blot a diferentes tiempos.....	36
6	Análisis de la proteína pERK por western blot a diferentes tiempos.....	38
7	Análisis de la proteína SOCS1 por western blot a diferentes tiempos.....	39
8	Cuantificación de las citocinas IL-10 e IL-12 por el método de ELISA.....	40

RESUMEN

Los probióticos son microorganismos benéficos para la salud del huésped. Estos pueden ser reconocidos por células dendríticas (DCs) a través de receptores de membrana, activando vías de señalización intracelulares. El probiótico *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 es capaz de estimular a DCs a través de la vía de señalización de TLR2, activando proteínas involucradas en la cascada de señalización y finalmente a factores de transcripción para producir citocinas. El objetivo del estudio es analizar la expresión de las proteínas TRAF6, ERK1/2 y SOCS1 en DCs porcinas estimuladas con Bb12. Primero se estableció un cultivo de monocitos que fue suplementado con IL-4 y GM-CSF para derivar a DCs. Su fenotipo se comprobó mediante tinción con los anticuerpos anti-CD1, anti-MHC II y anti-CD14 y se analizó por citometría de flujo. Para la determinación de proteínas de señalización, se estableció un inóculo de Bb12 y las moDCs se estimularon durante 0, 0.5, 1, 2 y 24 horas, adicionalmente, se bloqueó al receptor TLR2 previo a la estimulación con el probiótico. Posteriormente se extrajeron las proteínas celulares con buffer de lisis RIPA enriquecido con una mezcla de inhibidores de proteasas, seguido de electroforesis SDS-PAGE, e inmunodetección en una membrana de PVDF de las proteínas ERK1/2 y pERK 1/2, TRAF6, SOCS1 y β -actina. Por último, se cuantificó la producción de las citocinas IL-10 e IL-12 en moDCs estimuladas con el probiótico durante 24 h mediante el método de ELISA.

En los resultados de citometría de flujo, se obtuvo una población celular que expresó un 73% de los marcadores de superficie anti-CD1 y anti-MHC II en células inmaduras, dichos marcadores aumentaron a un 90% en células estimuladas con LPS. El análisis de inmunodetección mostró que Bb12 induce la expresión constante de TRAF6 aun cuando se bloquea al receptor TLR2. A diferencia de ERK, este aumenta su expresión a partir de las 2 h de estímulo y disminuye cuando se bloquea TLR2. SOCS 1 se mantiene constante y también disminuye a partir de las 2 h al bloquear el receptor. Bb12 induce principalmente a IL-10 y también se produce aun cuando se bloquea TLR2, sin cambios en IL-12 en ninguno de los tratamientos. Estos resultados muestran que el probiótico Bb12 modula la expresión de proteínas de señalización a través de la vía de TLR2. A su vez, se sugiere la activación de vías alternas.

Palabras clave: Bb12, células dendríticas, proteínas de señalización, TLR2.

ABSTRACT

Probiotics are microorganisms that result in benefits for the health of the host. They can be recognized by dendritic cells (DCs) through membrane receptors, activating intracellular signaling pathways. The probiotic *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 (Bb12) can stimulate DCs through the TLR2 signaling pathway, activating proteins involved in the signaling cascade and finally transcription factors to produce cytokines. The study aimed to analyze the expression of TRAF6, ERK 1/2 and SOCS1 proteins in porcine DCs stimulated with Bb12 at 0, 0.5, 1, 2 and 24 h. First, porcine monocytes were cultured in the presence of IL-4 and GM-CSF to derive to DCs. Its phenotype was checked by fluorescence staining with anti-CD1, anti-MHC II and anti-CD14 antibodies by flow cytometry. For the determination of signaling proteins, moDCs were cultured with Bb12 at different times. Subsequently, the cellular proteins were extracted with RIPA lysis buffer enriched with a protease inhibitor cocktail, followed by SDS-PAGE electrophoresis, to finally perform a semi-dry transfer to a nitrocellulose membrane to immunodetect with anti-ERK 1/2 and anti-pERK 1/2, TRAF6, SOCS1, in addition to the control of β -actin. Finally, the production of the cytokines IL-10 and IL-12 was quantified in moDCs stimulated with the probiotic at 24 h by the ELISA method.

The results showed a cell population that expressed 73% of the cell surface markers anti-CD1 and anti-MHC II in immature moDCs and 90% in mature moDCs. The presence of ERK 1/2 and pERK 1/2 was confirmed. The immunodetection analysis showed that TRAF6 remains constant during all periods even when the TLR2 receptor is blocked. ERK increases its expression after 2 h of stimulus and decreases when TLR2 is blocked and SOCS 1 remains constant and decreases after 2 h when blocking the receptor. IL-10 occurs even when TLR2 is blocked, without changes in IL-12 in no one of the treatments. In conclusion, it shows that probiotic Bb12 modulates the expression of signaling proteins by the TLR2 pathway. However, this suggest the activation of other pathways.

Keywords: Bb12, dendritic cells, signaling proteins, TLR2.

1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se ingieren en cantidades adecuadas, proporcionan beneficios a la salud del huésped. Entre los efectos positivos en el huésped se han descrito la estimulación del sistema inmune de mucosas y la regulación de la microbiota intestinal. La elucidación de los mecanismos por los cuales los probióticos modulan el sistema inmune puede facilitar la implementación de suplementos terapéuticos con propiedades inmunoregulatoras (Borchers *et al.*, 2009; Christensen *et al.*, 2002).

El probiótico *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (Bb12) es capaz de estimular a células dendríticas (DCs) a través de la vía de señalización de TLR2 activando a factores de transcripción, como el factor nuclear kappa B (NF- κ B) y AP-1, lo que lleva a la producción de citocinas. Esto se logra activando una cascada de señalización, donde están involucradas proteínas como TRAF6 (factor 6 asociado a receptor de TNF), JNK (quinasas c-Jun N-Terminal) y ERK1 y ERK2 (quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2, respectivamente), así como p38, las cuales están directamente involucradas en la producción de proteínas de respuesta. Por otro lado, existen proteínas que regulan esta vía, tal es el caso de SOCS1 (Supresor de señalización de citocinas 1) el cual es un regulador negativo en la producción de citocinas, al bloquear moléculas necesarias en la cascada de señalización. Además, también está implicado en la regulación de proteínas que participan en la vía iniciada por TLR.

Se cree que Bb12 posee un efecto regulador sobre la expresión de proteínas involucradas en la vía de señalización de TLR2 en la activación de células dendríticas porcinas. En este trabajo se estudió la participación de las proteínas de señalización TRAF6, SOCS1, ERK1/2 y fosfo-ERK 1/2 en células dendríticas derivadas de monocitos porcinos estimuladas con Bb12 para elucidar su papel en la producción de citocinas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Probióticos

Los probióticos, en su mayoría, son bacterias Gram positivas con capacidad de cambiar la actividad metabólica de la microbiota intestinal, modular el sistema inmune y regular positivamente la homeostasis intestinal (Latvala *et al.*, 2011). Algunos de los beneficios que confieren a la salud del huésped, son la mejora de la función intestinal, modulación de la respuesta inmune, reducción del colesterol sérico y la prevención del cáncer, los cuales varían según la cepa y tienen diferentes mecanismos. Estos beneficios se pueden dar directamente a través de las interacciones del probiótico ingerido vía oral con el huésped (Kechagia *et al.*, 2013; Linares *et al.*, 2017).

La suplementación con probióticos en modelos animales puede proteger contra la colitis espontánea e inducida químicamente mediante la regulación negativa de las citocinas proinflamatorias o por la inducción de mecanismos reguladores por una cepa específica. En cuanto a la sensibilización a alérgenos, asma y rinitis alérgica, los probióticos administrados por vía oral pueden disminuir de forma independiente la producción de IgE específica mediada en parte por la acción de citocinas (Borchers *et al.*, 2009).

Los probióticos son muy utilizados en la industria alimentaria, tanto por sus propiedades tecnológicas en la fabricación de productos lácteos como leches fermentadas, queso, y yogur, o añadidos a estos y otros productos lácteos como leche en polvo o suero de leche. También se añaden a productos no lácteos como alimentos a base de soya, barras de cereales y jugos (Kechagia *et al.*, 2013). El aumento de la demanda del consumidor por la obtención de beneficios adicionales en la comida, en algunos mercados como EUA, Europa y Japón, ha incentivado la producción de alimentos funcionales, que son productos alimenticios tradicionales con efectos benéficos agregados (Linares *et al.*, 2017). Dichos efectos se deben a las características estructurales y metabólicas de los microbios (Veiga *et al.*, 2010). Por lo tanto, se han utilizado varias cepas de

probióticos para fabricar productos funcionales, enfocados a mantener la homeostasis inmunológica del huésped (Kaji *et al.*, 2010).

2.1.1. *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* (Bb12)

El intestino humano está colonizado por una amplia variedad de microorganismos de diferentes especies, entre ellas las del género *Bifidobacterium*. Entre los efectos benéficos que le confieren al huésped se encuentran, la disminución de los niveles de enzimas carcinogénicas, producidas por microbiota colónica, normalizando la permeabilidad intestinal y equilibrando la microbiota. Así mismo, la producción de ácidos orgánicos anti-mutagénicos y mejoramiento del sistema inmune (Fukuda *et al.*, 2011; Kechagia *et al.*, 2013).

El probiótico Bb12 es conocido por ser un producto comercial utilizado en diferentes alimentos, entre ellos productos lácteos, y como suplemento (Ventura y Zink, 2002). Se adhiere con mucha eficiencia al moco humano en comparación con otras cepas de bifidobacteria, por lo cual su capacidad de colonización es elevada y por esto, al suplementar con Bb12, incrementa su número de células rápidamente y se reduce el de otras cepas patógenas como *Enterobacteriaceae* y *Clostridium* spp (Mohan *et al.*, 2006).

Veiga *et al.*, 2010, encontraron que en ratones que consumieron un producto lácteo fermentado con Bb12, redujo la inflamación intestinal. Durante el consumo se presentaron algunos cambios metabólicos como la disminución del pH cecal, cambios en los perfiles de ácidos grasos, aumento de bacterias consumidoras de lactato y productoras de butirato.

Si bien se sabe que la ingesta de Bb12 aporta beneficios al consumidor, es interesante conocer algunos de los mecanismos por los cuales este probiótico actúa a nivel celular y molecular, para ayudar a comprender como funciona la regulación de la respuesta inmune.

2.2. Sistema Inmune

El sistema inmune está constituido por diferentes tipos de células y moléculas que otorgan protección contra agentes endógenos y exógenos. La inmunidad innata y adaptativa están fuertemente vinculadas, pero cada una presenta características distintivas, como los efectos específicos y el tipo de células que participan, el tiempo de respuesta y su permanencia, etc. Son también componentes del sistema inmune, una serie de barreras, que son el primer obstáculo contra el patógeno, estas son físicas (piel), mecánicas (movimiento), biológicas (microbiota) y químicas (pH, acidez). Cuando el patógeno logra atravesar estas barreras, entra en juego la inmunidad innata empleándose principalmente la fagocitosis y liberación de sustancias tóxicas para eliminarlo, si no lo logra, se inicia una respuesta adaptativa, mucho más específica (Abbas *et al.*, 2018).

2.2.1. Inmunidad Innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra microorganismos. Es un conjunto de mecanismos de defensa existentes antes de la infección y son de respuesta rápida, reaccionan con los productos de los microbios y de las células dañadas. Los mecanismos de la inmunidad innata poseen especificidad a las estructuras que son comunes a grupos de microbios relacionados; sin embargo, no pueden distinguir diferencias finas entre ellos (Abbas *et al.*, 2018). Las células poseen receptores que reconocen esas estructuras, entre ellos se encuentran los de tipo toll (TLR), lectinas, receptores scavenger, etc. Algunos de los mecanismos que utilizan para atacar a agentes extraños, son la producción de citocinas, óxido nítrico, anticuerpos; esto lo hacen al reconocer dichas estructuras.

Las células que cumplen funciones especializadas en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, son los fagocitos, las células dendríticas (DCs) y linfocitos. La mayoría de estas derivan de células madre hematopoyéticas en la médula ósea, las cuales se diferencian a diferentes linajes. Según sus precursores comunes, las células inmunes se clasifican en células mieloides, que

incluyen a los fagocitos y la mayoría de las DCs, o en células linfoides, que incluyen todos los linfocitos (Abbas *et al.*, 2018).

2.2.2. Reconocimiento de Microorganismos por TLR2

Los productos microbianos que estimulan la respuesta inmune innata son compartidos por diferentes tipos de microbios y se les conoce como patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs). Estos, son expresados por virus, bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos, etc. (Abbas *et al.*, 2018). El reconocimiento se da por medio de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que se encuentran en la membrana celular o dentro de la célula en vesículas, los cuales están conservados evolutivamente, y que son expresados por células dendríticas, macrófagos y neutrófilos e incluyen diferentes tipos de receptores. Entre ellos se encuentran los TLR (Mair *et al.*, 2014).

El reconocimiento de bacterias Gram positivas es mediado por los receptores TLR1, TLR2 y TLR6. Los ligandos de TLR2 son peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, lipoproteínas, lipoarabinomano y zimosano (Borchers *et al.*, 2009; Li y Verma, 2002). Después de la unión del ligando, los receptores activan vías de señalización intracelulares como NF- κ B y AP-1. La activación de estas vías conduce a la producción de citocinas pro y antiinflamatorias (Latvala *et al.*, 2011).

2.2.3. Efecto de probióticos en la Respuesta Inmune

Los efectos inmunoreguladores de los probióticos son variados y algunos han sido estudiados *in vitro* e *in vivo* en modelos animales como ratones, cerdos y aves. Es importante identificar los mecanismos moduladores entre los probióticos y el sistema inmune. El efecto inmunoregulador que proporciona el consumo de probióticos se debe en parte a la producción de citocinas inflamatorias y otras moléculas como el óxido nítrico (ON) y especies reactivas de oxígeno, las

cuales tienen efectos tóxicos sobre microorganismos patógenos (Dos Santos *et al.*, 2010). Al reducir la concentración de citocinas inflamatorias, el organismo regresa a una homeostasis, esto se puede lograr a través de la producción de las citocinas antiinflamatorias. La inflamación crónica se caracteriza por una sobreexpresión de mediadores inflamatorios y por un tiempo prolongado, la ingesta de probióticos podría llegar a contrarrestar esta sobreproducción.

Algunas bacterias asociadas al intestino pueden afectar a la inmunidad innata, humoral y celular (Christensen, 2002). Así, la manera en que los probióticos regulan la respuesta inmune involucra a mecanismos moleculares y celulares. Entre ellos, el estímulo de células de la inmunidad innata y adaptativa, induciendo fagocitosis, secreción de IgA, mejorando las respuestas Th1 y atenuando las respuestas Th2 (Kechagia *et al.*, 2013). Algunos probióticos estimulan a macrófagos y células dendríticas para secretar proteínas mensajeras. Por ejemplo, la producción de interleucina-10 (IL-10) es crítica en la regulación de enfermedades inflamatorias, aunque la respuesta varía según el probiótico (Kaji *et al.*, 2010).

Arenas-Padilla *et al.*, 2018, encontraron que, al bloquear TLR2 antes de estimular monocitos de cerdo con Bb12, el transcrito de IL-10 disminuyó significativamente. Estos resultados sugieren que la expresión de IL-10 es inducida por Bb12 a través de TLR2. Además, se cuantificó la producción de IL-10 en monocitos y células de ganglio mesentérico de cerdo y se observó que aumentó al estimularla con Bb12.

Hay una interacción sinérgica entre el epitelio intestinal y el sistema inmune que incluye a la microbiota, considerada como un tercer factor indispensable para la correcta función gastrointestinal (Figura 1). El interés por conocer la capacidad de los probióticos de modular el sistema inmune es motivo de investigación, así como también la interacción directa entre estas bacterias y el epitelio gastrointestinal, por su efecto a nivel celular con impacto sistémico. Se ha demostrado *in vitro* que distintas bacterias del sistema gastrointestinal con potencial colonizador son capaces de estimular líneas celulares intestinales, generando un perfil de citocinas característico (Alarcón *et al.*, 2016).

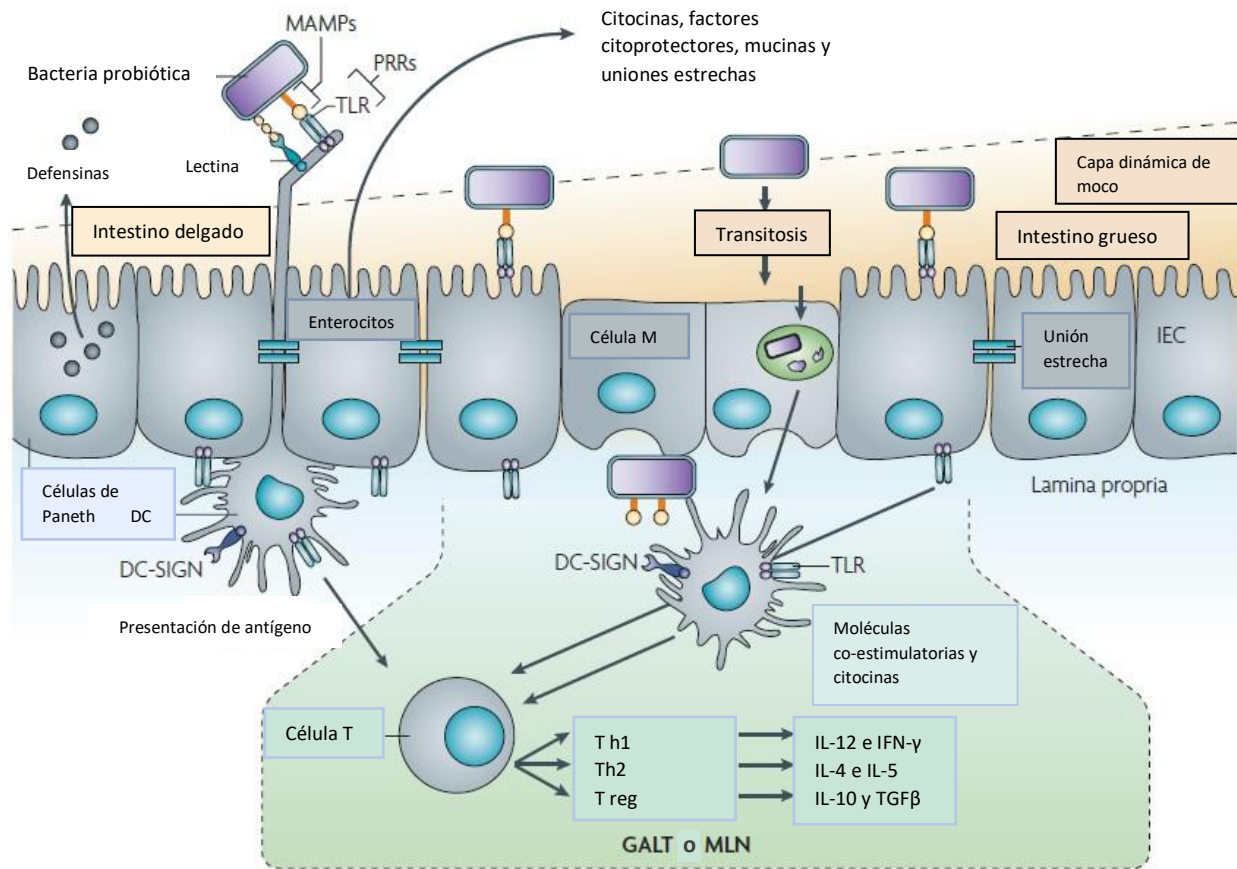


Figura 1. Interacción de probióticos con células epiteliales intestinales y con células dendríticas. Los MAMPs son reconocidos por las células que se encuentran en el GALT. Las DCs son importantes en la producción de citocinas y la polarización de las células T efectoras. (Lebeer S *et al.*, 2010). GALT: Tejido linfático asociado a intestino, MLN: ganglio linfático mesentérico.

2.3. Células Dendríticas

Las células dendríticas (DCs) son un grupo heterogéneo de células que juega un papel importante en el sistema inmune. Son células presentadoras de antígeno (APCs), cuya función principal es capturar, procesar y presentar antígenos a linfocitos T, generando respuestas inmunes específicas. Se han descrito subconjuntos de DCs que difieren considerablemente en ontogenia, localización, producción de citocinas y función inmunológica. Las DCs se encuentran en un estado inmaduro (iDCs) y otro maduro (mDCs) (Vázquez *et al.*, 2012; Mellman, 2013; Lannes y Summerfield, 2013; Mildner y Jung, 2014). Otra de sus funciones es secretar moléculas, como las citocinas, por lo que

poseen la capacidad de regular las respuestas adaptativas e innatas. Las DCs reconocen MAMPs a través de sus TLRs y otros PRRs, el estímulo de estos receptores puede inducir a la maduración de estas células y también la producción de citocinas como IL-10, IL-12, IL-13 e IFN- γ , dependiendo del ligando que sea reconocido y el PRR que lo reconozca (Summerfield y McCullough, 2009).

Las DCs se dividen en dos poblaciones celulares principales, DC convencionales (cDC) y DC plasmocitoides (pDC). En el estado estacionario, los cDC presentan características típicas de DCs (dendritas citoplasmáticas) y función (captación, procesamiento y presentación de Ag). Las DCs convencionales/clásicas se pueden dividir en al menos dos subconjuntos principales caracterizados, en humanos, por la expresión de CD8 α y CD103 o CD11b. Ambas subpoblaciones se pueden encontrar en el tejido linfoide, incluido el bazo, LN y la médula ósea (BM), así como en la mayoría del tejido no linfoide (Mildner y Jung, 2014; Al-Ashmawy G, 2019)

Dentro de las DCs no convencionales se encuentran las DC plasmocitoides (pDC) que son un subconjunto de DC precursoras que en estado estacionario poseen un fenotipo inmaduro y la morfología de células plasmáticas (carecen de dendritas). En la activación, las pDC coinciden estrictamente con las cDC en forma y función (Al-Ashmawy G, 2019). Como consecuencia de la inflamación o infección, los órganos linfoides y no linfoides pueden albergar DCs que se originan a partir de monocitos las cuales se han denominado DCs derivadas de monocitos (moDCs). Estas son fenotípicamente difíciles de distinguir de los cDC porque comparten patrones de expresión similares de MHC-II, CD11b y CD11c; sin embargo, las moDC expresan CD64, el receptor Fc-gamma 1 (Fc γ RI), indicativos de su pasado monocítico (Mildner y Jung, 2014).

Sin embargo, los marcadores de superficie difieren según especies de animales. Se observa una considerable heterogeneidad sobre el uso de los términos monocito, macrófago o DC para describir las células inflamatorias derivadas de monocitos. Por ejemplo, Los monocitos inflamatorios humanos expresan CD13, CD33, CD11b, CD11c y CD172a. La evidencia de diferenciación DC está respaldada por la expresión de CD1c, CD1a, Fc ϵ R1, IRF4 y ZBTB46 (Collin y Bigley, 2018). Mientras que el fenotipo de DCs porcinas se caracteriza por poseer los marcadores CD1⁺CD14⁺CD16⁺CD80/86⁺CD172a⁺ y MHC II (Summerfield y McCullough, 2009).

2.4. Balance de la Respuesta Th1, Th2

Las células dendríticas son un puente entre la inmunidad innata y adaptativa, activando a células T $CD4^+$ mediante la producción de citocinas, las cuales dirigen la polarización de las células T vírgenes a células T efectoras, es decir, las citocinas producidas son esenciales para el tipo de respuesta. Tras la estimulación ya sea por agentes infecciosos, alérgenos o diversas señales inflamatorias, las DCs producen diversos tipos de citocinas como IL-1, IL-6, IL-10, IL-27, TNF- α , etc, las cuales actúan como señal. Por ejemplo, IL-12 induce a la polarización a células Th1, en cambio, IL-4 a Th2. La señalización de TLR promueve la inducción a la polarización de células Th1 o Th2, lo cual depende del tipo de estímulo, por ejemplo, LPS proveniente de *Escherichia coli* induce una respuesta de tipo Th1, mientras que LPS de *Porphyromonas gingivalis* a una de tipo Th2, es decir, la respuesta depende del tipo de microorganismo (Na *et al.*, 2016).

2.4.1. Respuesta Th1

La diferenciación de las células T $CD4^+$ a células efectoras Th1 es estimulada por bacterias intracelulares, virus, y protozoos mediante la estimulación propiciada por la respuesta inmune innata, a través de las citocinas IFN- γ e IL-12, sus inductores más potentes. La función principal de estas células es la de activar macrófagos para incrementar la fagocitosis y eliminar microbios en el fagolisosoma. También producen TNF- α el cual activa a neutrófilos y promueve la inflamación. Además, activan a células NK y T $CD8^+$ citotóxicas, estas últimas participan principalmente en la defensa contra virus. El IFN- γ inhibe la diferenciación de T $CD4^+$ en células Th2 y Th17, es decir, esto promueve la polarización de la respuesta inmune en una dirección (Abbas *et al.*, 2018; Na *et al.*, 2016).

2.4.2. Respuesta Th2

Las células Th2 son el mediador de la defensa independiente de los fagocitos, en la que los eosinófilos y los mastocitos juegan un papel central. Estas reacciones son importantes para la erradicación de las infecciones helmínticas y en algunos casos para la eliminación de otros microbios en los tejidos de la mucosa. También son fundamentales para el desarrollo de enfermedades alérgicas. Las células Th2 producen principalmente IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Los receptores TLR también inducen respuestas de células Th2 a través de DCs. Por ejemplo, Pam3-Cys4, un ligando sintético de TLR2, favorece la polarización de células Th2. A su vez, este ligando activa a la proteína ERK, que posteriormente fosforila el factor de transcripción c-Fos, lo que conduce a la inhibición de la producción de IL-12p70 y por ende a la respuesta de las células Th1 (Na *et al.*, 2016; Abbas *et al.*, 2018).

2.5. Citocinas

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular (de 10 a 40 KD), secretadas por células del sistema inmune en respuesta a estímulos de diversa naturaleza (biológicos, químicos y físicos), son de acción paracrina, endocrina y autocrina. Diferentes tipos de células secretan la misma citocina o una sola actúa en diferentes tipos de células (pleiotropía). Las citocinas son redundantes en su actividad, lo que significa que funciones similares pueden ser estimuladas por diferentes citocinas. A menudo se producen en cascada, ya que una citocina estimula a las células blanco para producir otras. También pueden actuar de forma sinérgica o antagónica (Zhang y An, 2009). Este trabajo se basa en dos citocinas en particular: IL-12 como precursora de la respuesta proinflamatoria e IL-10 de la respuesta antiinflamatoria.

2.5.1. Interleucina-10

La IL-10 es una proteína con efectos antiinflamatorios que juega un papel importante en la prevención de patologías inflamatorias y autoinmunes. Inicialmente, se describió como una citocina de tipo Th2, sin embargo, estudios mostraron que también es producida por células Th1 y T reguladoras (Treg). Ahora se sabe que la expresión de IL-10 no es específica para linfocitos T, sino que es una citocina que es ampliamente expresada. Es secretada por otras células del sistema inmune adaptativo como Th17, T CD8⁺ y linfocitos B y también por células del sistema inmune innato como DCs, mastocitos, NK, eosinófilos y neutrófilos. IL-10 es conocida como factor inhibidor de síntesis de citocinas (CSIF), posee efectos pleiotrópicos y es de acción autocrina y paracrina (Saraiva y O 'Garra, 2010; Trinchieri, 2007; Verma *et al.*, 2015).

Los monocitos y macrófagos secretan IL-10 después de la activación con diversos mediadores endógenos y exógenos, como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), a través de la activación de TLR, TRAF3 y NF- κ B (Sabat *et al.*, 2010). Además, la interacción con las DCs promueve la producción de IL-10 en células T reguladoras, células B y neutrófilos (Mittal y Roche, 2015).

En células dendríticas, la señalización autocrina de IL-10, en algunos casos de infección, puede inhibir la producción de quimiocinas y prevenir su traslado a los ganglios linfáticos (Couper *et al.*, 2008). Esta citocina regula el sistema inmune, es un potente supresor de las células NK y de linfocitos al evitar que las APCs produzcan citocinas proinflamatorias como la IL-12. La mayoría de las cepas de *Bifidobacterium* estimulan la producción de niveles elevados de IL-10 (Wilbers *et al.*, 2017; Trinchieri, 2007; Borchers *et al.*, 2009)

Una de las formas por la cual IL-10 controla los procesos inflamatorios es mediante la supresión de la expresión de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión, moléculas presentadoras de antígeno y co-estimuladoras en monocitos, macrófagos, neutrófilos y células T. La mayoría de estas proteínas inflamatorias están controladas transcripcionalmente por NF- κ B. Una de las propiedades antiinflamatorias de IL-10 es inhibiendo a este factor de transcripción (Asadullah *et al.*, 2003). También, es un potente supresor de la expresión génica inducida por TLR

y la producción de citocinas inflamatorias y puede suprimir las respuestas inducidas por IFN- γ . Muchos de los efectos supresores conocidos de IL-10 dependen de STAT3 (Hu *et al.*, 2007).

De los mecanismos de regulación, se ha sugerido que las células Th1 producen IL-10 como un medio de prevención del daño inmune colateral, es decir, un mecanismo de autocontrol. Por otro lado, IL-10 actúa directamente sobre macrófagos, disminuyendo la expresión de IL-12 y por ende la diferenciación a células Th1 (Trinchieri, 2007).

2.5.2. Interleucina-12

La IL-12 es una citocina inflamatoria producida principalmente por macrófagos, monocitos, células dendríticas y células B y es responsable de la generación de células Th1 (Gee, 2009). A pesar de ser inflamatoria, ha demostrado tener actividad inmunomoduladora, antitumoral y antiinfecciosa de manera *in vitro* e *in vivo* (Wang *et al.*, 2012). Posee capacidad protectora y se cree que es debido a su interacción con otras interleucinas. Es capaz de potenciar la proliferación de células T y NK y aumentar su actividad citolítica, también estimula la producción de otras citocinas. Desempeña un papel importante en definir las respuestas inmunitarias durante la presentación de antígeno (Metzger, 2010; Sun *et al.*, 2015).

IL-12, a través de su receptor (IL-12R), induce la fosforilación y la translocación nuclear de STAT4 en células B primarias. La fosforilación de la serina STAT4 dependiente de IL-12 es mediada por la estimulación de p38, y no por ERK1/2 o JNK. La fosforilación de la serina es necesaria para la actividad transcripcional completa de la producción de STAT4 e IFN- γ (Vogel *et al.*, 1996). Una función importante de esta interleucina es inducir la producción de IFN- γ (Yan *et al.*, 2017).

Es importante esclarecer el balance de las células Th1 y Th2, ya que el tipo de citocinas que se producen es esencial para dictaminar la respuesta de las células T efectoras. Por ejemplo, la IL-10 que es producida por las células Th2, es capaz de inhibir la activación de las células Th1, a su vez, la producción de IL-4 por Th1 inhibe la generación de células Th2.

2.6. Proteínas de Señalización Involucradas en la vía TLR

Después de la unión del ligando con el TLR, el dominio TIR inicia la cascada de señalización (Figura 2), a través de moléculas adaptadoras como MYD88 y TRAF6, a su vez dirigen la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y NF- κ B (Saraiva y O 'Garra, 2010), que son requeridos para la expresión de genes que codifican moléculas en las respuestas inflamatorias, entre ellas, la producción de citocinas pro y antiinflamatorias (Saraiva y O 'Garra, 2010; Abbas *et al.*, 2018). TRAF6 es una proteína adaptadora que media una gran variedad de interacciones proteína-proteína a través de su dominio TRAF y RING (Really Interesting New Gene) que tiene una actividad de ligasa de ubiquitina E3 no convencional (Walsh *et al.*, 2015).

Los agonistas de TLR2 inician una cascada de señalización a través de MYD88, que se une con la molécula adaptadora TIRAP y recluta a TRAF6 seguido de la asociación con IRAK1 Y MYD88. IRAK4 fosforila a IRAK1 el cual se disocia del receptor junto con TRAF6, después, este interactúa con TAK1, TAB1 y TAB2. Este complejo se asocia con Ubc13 y Uev1A e induce la activación de TAK1, y este una vez activado, fosforila al complejo IKK permitiendo la activación de NF- κ B. (González-Rascón y Mata-Haro, 2015; Hammer *et al.*, 2005).

La cascada MAPK está compuesta por tres grupos de proteínas: ERK1/2, JNK y p38, su activación modula la expresión de citocinas (Saraiva y O 'Garra, 2010). La cascada ERK1/2 es iniciada en los receptores de membrana como Tyr cinasas (RTKs), TLR, entre otros, los cuales reclutan a proteínas adaptadoras y transmiten la señal directamente o a través de un mediador cinasa (MAP4K) a nivel MAPK cinasa cinasa (MAP3K). Esta cascada se caracteriza por transmitir principalmente señales mitogénicas. (Wortzel y Seger, 2011). Después de la estimulación de TLR en células dendríticas, la activación de ERK modula la expresión de IL-10 y en presencia de inhibidores químicos o en células deficientes en ERK, la producción de IL-10 disminuye (Saraiva y O 'Garra, 2010).

Por otra parte, la señalización de IL-10R, involucra al complejo JAK/STAT. Esta inicia una interacción con la familia de las tirosinas cinasas (JAK) y Tyk2, a su vez, la IL-10 induce la fosforilación de las tirosinas y la activación de los factores de transcripción STAT 1 y STAT 3.

Este último está fuertemente implicado como mediador de las respuestas de IL-10 (Moore *et al.*, 2001).

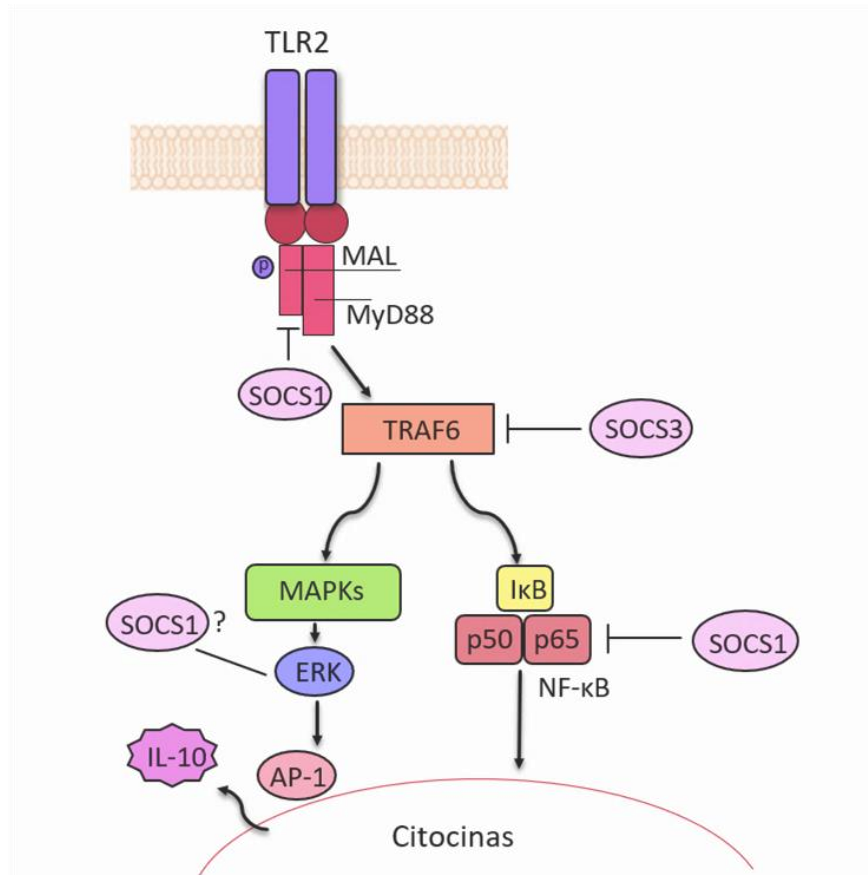


Figura 2. Cascada de señalización iniciada por TLR2. Moléculas adaptadoras como MyD88 y TRAF6 ayudan a la activación de otras proteínas intracelulares como las MAPKs y NF-κB. Las proteínas SOCS pueden actuar en diferentes niveles de la cascada (Adaptado de Yoshimura, 2007).

2.6.1. Supresor de Señalización de Citocinas (SOCS)

SOCS es una familia de proteínas regulada transcripcionalmente por un amplio rango de ligandos extracelulares. Su función es regular negativamente la señal de transducción de citocinas y factores de crecimiento. La familia está formada por 8 tipos de proteínas con una región homóloga de 70

aminoácidos llamada caja SOCS y por un dominio SH2. SOCS1 y SOCS2 poseen un dominio SH2 extendido a 12 aminoácidos llamado región inhibidora de cinasas (KIR) (Qasimi *et al.*, 2005). Ratones deficientes de SOCS1 son hipersensibles a LPS, llevando a una elevada producción de IL-12. Se ha propuesto un efecto directo de SOCS1 en la vía TLR-NF- κ B (Figura 2), en donde se une a p65 facilitando su ubiquitinación y degradación. También puede activar a las proteínas JNK y p38 mediante la unión a la quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis (ASK1), el cual es un activador corriente arriba de ambas cascadas (Yoshimura *et al.*, 2007). Por otro lado, IL-10 induce fuertemente a SOCS3 y es uno de los principales factores que intervienen en el efecto antiinflamatorio de IL-10 (Wilbers *et al.*, 2017). Esta inducción ocurre probablemente vía JAK/STAT, la cual es una proteína transductora de señal y activadora de la transcripción (Asadullah *et al.*, 2003).

Se ha descrito el reconocimiento de Bb12 por TLR2 en DCs y se ha visto la producción de IL-10. En este trabajo se pretende determinar las proteínas involucradas en esta señalización. Por una parte, se buscará a TRAF6 que es una proteína común a varias vías tanto MAPK como NF- κ B. Además, se determinará a las proteínas ERK así como SOCS1, para de esta manera tratar de elucidar el mecanismo iniciado por Bb12 a través de la interacción con TLR2.

3. HIPÓTESIS

El probiótico *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* modula la expresión de las proteínas TRAF6, SOCS1 y ERK, de la vía de señalización del TLR2 en células dendríticas derivadas de monocitos de cerdo.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Determinar la expresión de las proteínas TRAF6, SOCS1, ERK1/2 y fosfo-ERK 1/2 de la vía TLR2 en células dendríticas derivadas de monocitos de cerdo estimuladas con Bb12.

4.2. Específicos

1. Establecer condiciones para el cultivo de células dendríticas derivadas de monocitos y determinar la expresión de los marcadores CD1, CD14 y MHC II mediante citometría de flujo.
2. Analizar la expresión de las proteínas TRAF6, SOCS1, ERK1/2 y fosfo-ERK 1/2 mediante western blot en células dendríticas derivadas de monocitos de cerdo estimuladas con Bb12 con y sin bloqueo de TLR.
3. Cuantificar la producción de IL-10 e IL-12 por ELISA en células dendríticas derivadas de monocitos de cerdo estimuladas con Bb12 con y sin bloqueo de TLR2.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cultivo de Bacterias

El probiótico comercial *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* Bb12, fue cultivado en caldo Man-Rogosa Sharpe (MRS, Merck, Alemania) suplementado con 0.05% de cisteína y se incubó a 37°C por 24 h en condiciones anaerobias. La siembra se realizó al 4% del inóculo. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se realizó una lectura de absorbancia en un NanoDrop ONE para determinar la turbidez del cultivo, y así establecer una relación con la concentración de bacterias en cultivo.

5.2. Obtención de Monocitos de Sangre Periférica Porcina

Se colectó sangre de la vena yugular de cerdos de línea de sacrificio de una planta tipo inspección federal (TIF). Para la recolección se utilizaron frascos de 500 mL utilizando ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Sigma USA) como anticoagulante. Posteriormente fue trasladada en hielo al Laboratorio de Microbiología e Inmunología de CIAD. Se aislaron células mononucleares (CMN) mediante gradiente de densidad. Primero se colocó Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences, Suecia) a una relación 1:3 en tubos de 50 mL, después se vertió cuidadosamente la sangre diluida en PBS (1:2), 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 a 1200 rpm por 10 min, y fueron resuspendidas en medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Invitrogen Co., USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB). Por último, se realizó un conteo celular con azul tripán en una cámara de Neubauer con el fin de discriminar las células vivas de las muertas. Para obtener la población de monocitos, se realizó una separación por adherencia en placa durante 24 h, para lo cual se colocaron 4×10^6 células en frascos de cultivo de 25 cm², se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ y se dejaron adherir por 24 h. Posteriormente, se descartaron las células no

adheridas y las que quedaron adheridas al frasco después de 2 lavados con PBS, se emplearon para derivar a células dendríticas.

5.3. Derivación y Maduración de Monocitos a Células Dendríticas

El cultivo de monocitos se suplementó con IL-4 (25 ng/mL) y GM-CSF (20 ng/mL) (Kingfisher Biotech, Saint Paul MN USA) para derivarlas a células dendríticas. Se incubaron por cinco días, con suplementación de citocinas al tercer día. Para determinar marcadores de maduración, en el quinto día, se agregó lipopolisacárido (LPS) (100 ng/ml) y se incubó por 24 h. Para determinar el fenotipo de las células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs), se tiñeron con los anticuerpos anti-CD1 conjugado con ficoeritrina (VMRD No. cat 7674), anti-MHC II conjugado con Alexa®488 (BD Pharmigen No. cat 553642) y anti-CD14 conjugado con Alexa®647 (BioRad No. cat MCA1568A647T) y posterior análisis por citometría de flujo, en un equipo FACS Canto II (Becton Dickinson).

5.4. Estimulación de Células Dendríticas con el Probiótico Bb12

Las moDCs con 5 días de cultivo se despegaron del frasco utilizando PBS con 0.1% de EDTA y se colocaron 2×10^5 células en 200 μ L de medio DMEM en microplacas de 96 pozos, después se agregó Bb12 en una proporción 1:100 (moDCs:Bacterias). Transcurridas 24 h, se realizó un lavado con PBS para remover a las bacterias.

5.5. Western Blot

Se analizaron las proteínas de señalización SOCS1, ERK1, ERK2, fosfo-ERK1, fosfo-ERK2 y

TRAF6, además de β -actina como control. Para la obtención de los extractos celulares se utilizó buffer de lisis RIPA y una mezcla de inhibidores de proteasas. Una porción del extracto celular fue combinada en partes iguales con buffer de Laemmli 2x y en condiciones desnaturalizantes y reductoras se corrieron geles de poliacrilamida al 12%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (GE HealthcareLifeSciences Co, Piscataway NJ), utilizando un sistema de transferencia semi-seca (BioRad USA) por 15 min a 25 V.

Las membranas fueron bloqueadas en solución al 5% de leche baja en grasa en buffer TBST (Tween 20 0.1 %, Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) por 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados de 5 minutos cada uno en TBST. Después fueron incubadas con un anticuerpo primario (dilución 1:2000) toda la noche a 4 °C, seguido de 4 lavados con TBST. Los anticuerpos utilizados fueron pERK 1/2 (No. cat MA5-15174, Thermo Fisher Scientific, Rockford USA), ERK 1/2 (No. cat MA5-15134, Thermo Fisher Scientific, Rockford USA), TRAF6 (No. cat SAB2108734, Sigma, Saint Louis USA), SOCS1 (No. cat MBS8231121, MyBioSource, San Diego California USA) y β -actina (No cat A2228, Sigma, Saint Louis USA). Posteriormente, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario (dilución 1:2000) conjugado a peroxidasa (HRP) (No cat A0545, Sigma, Saint Louis USA) por 2 h a temperatura ambiente, seguido de 4 lavados con TBST. Finalmente, las bandas fueron visualizadas por exposición de la membrana utilizando el reactivo ECL (Bio-Rad USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El revelado se realizó utilizando el sistema de fotodocumentación para quimioluminiscencia ChemiDoc MP system (BioRad USA). Se utilizaron la proteína β -actina y ERK como referencia de proteína constitutiva. Para lo cual las membranas analizadas para los anticuerpos anteriormente mencionados, una vez revelados, se llevó a cabo un proceso de “stripping” en donde las membranas se lavaron y se prosiguió con el mismo procedimiento de revelado esta vez para la detección de la proteína constitutiva. Una vez obtenidas las bandas, se analizó la intensidad de las mismas mediante el programa Image Lab (BioRad USA). Estas se graficaron y se presenta como la proporción de proteína de interés/ β actina o ERK.

5.6. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

El sobrenadante de los cultivos se recolectó y fue utilizado para cuantificar la producción de las citocinas IL-10 e IL-12, para lo cual se utilizaron los kits ELISA Duo Set para IL-10 (No. cat DY693B) e IL-12 (No. cat DY912), ambos de R&D Systems, USA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se colocó el anticuerpo de captura (4 µg/mL) y se dejó incubar durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se lavó 3 veces con buffer fosfato salino con Tween 20 (PBST) para eliminar excesos. Después se bloqueó con Albúmina de suero bovino (BSA) durante 1 h a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados con PBST; después se añadió la muestra o estándar y se dejó incubar durante 2 h a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados con PBST; luego se añadió el anticuerpo de detección (IL-10: 50 ng/mL; IL-12: 162 ng/mL) y se dejó incubar durante 2 h a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados con PBST. Después se añadió la enzima peroxidasa conjugada con estreptavidina (dilución 1/200) y se dejó incubar durante 20 min a temperatura ambiente en la oscuridad, seguido de 3 lavados con PBST y por último se reveló con el sustrato 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB) y se utilizó ácido sulfúrico para detener la reacción. Fue leído a 450 nm en un espectrómetro de placas ELISA (BioRad, USA).

5.7. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa NCSS versión 11. Primero se realizó un estadístico descriptivo para comprobar la normalidad de los datos, para después realizar un análisis de varianza de una vía con un nivel de significancia de 0.05. Posteriormente, se realizó un análisis de Tukey-Kramer para comparar medias y comprobar diferencias entre tratamientos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Establecimiento de un Cultivo de moDCs

Los monocitos son células que se encuentran en circulación en sangre periférica y tienen la capacidad de diferenciarse a DCs. Para obtener monocitos, células mononucleares de sangre periférica porcina fueron adheridos en placa durante 24 h. Una vez obtenidos fueron tratados con IL-4 y GM-CSF por cinco días para su diferenciación a células dendríticas. Se observaron cambios morfológicos (Figura 3), como la formación de un citoplasma lobulado y el desarrollo de dendritas, similar a lo descrito por Berges et al., 2005. Para observar las diferencias entre células maduras e inmaduras, se estimularon con LPS por 24 h. Esto concuerda con la bibliografía donde se ha logrado obtener células dendríticas porcinas estimulando a monocitos con IL-4 y GM-CSF durante 3-7 días (Summerfield y McCullough 2009), y de manera similar a humanos.

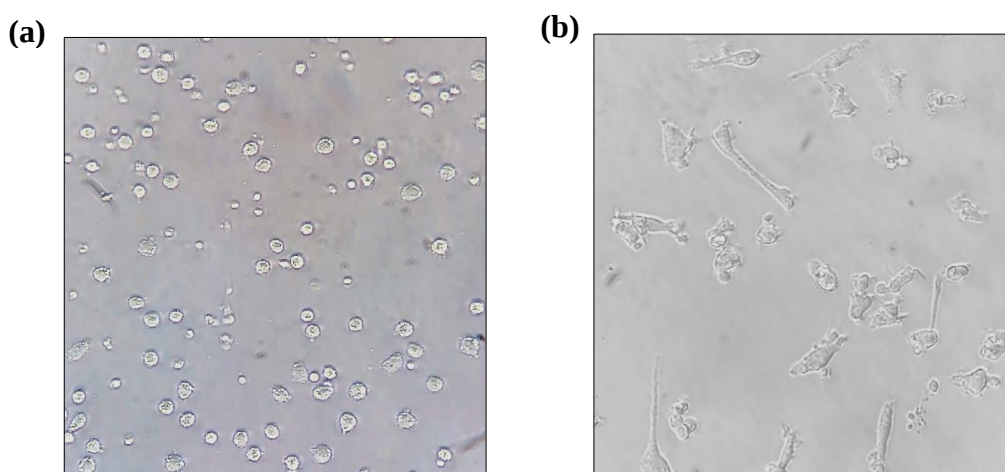


Figura.3. Diferenciación de monocitos a células dendríticas. Fotografías en microscopio óptico invertido a 40x. **(a)** Monocitos sin diferenciar, al día 0 de cultivo. **(b)** Células dendríticas derivadas de monocito a los 5 días de incubación con IL-4 y GM-CSF.

Para validar la derivación y maduración de las moDCs se llevó a cabo un análisis por citometría de flujo y se midieron los marcadores CD1, MHC II, y CD14 (Figura 4). Las moDCs inmaduras,

tuvieron baja expresión de MHC II y CD1 (73%) (Figura 4a); en contraste, hubo una alta expresión de CD14 (22%). El marcador CD14 es específico para monocitos y se puede encontrar en células dendríticas inmaduras (Figura 4b). Sin embargo, al madurar pierden este marcador, como se aprecia en las células estimuladas con LPS en donde CD14 disminuyó a un 4% (Figura 4d). En las células maduras con LPS, se observa un incremento a 90% en la expresión de MHC II y CD1 (Figura 4c). De acuerdo con la literatura, las moDCs porcinas presentan como fenotipo alta expresión de $CD1^+CD14^+CD16^+CD80/86^+CD172a^+$ y $MHC\ II^+$ (Summerfield y McCullough, 2009). Esto concuerda con los resultados, ya que en células estimuladas con LPS se observó una disminución de CD14 y un aumento en la expresión de CD1 y MHC II. Una de las respuestas importantes por la estimulación de los receptores TLR es la maduración de las células dendríticas, por ejemplo, con LPS el cual tiene como receptor a TLR4, esta inducción en DCs presenta niveles elevados de MHC II y CD80/86 (Summerfield y McCullough, 2009). En nuestro caso, se utilizó LPS solamente con el fin de determinar diferencias en el fenotipo por citometría de flujo, pero se trabajó con células dendríticas inmaduras para los experimentos con Bb12.

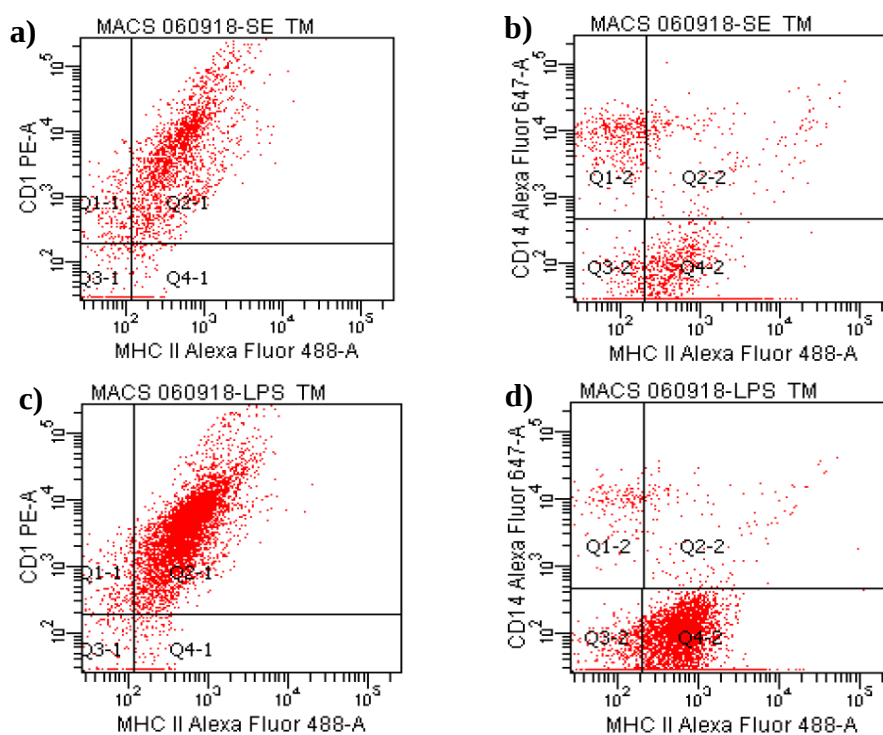


Figura. 4. Análisis de citometría de flujo de los marcadores de superficie en moDCs. (a) Marcadores MHC II y CD1 en células sin estimular. (b) Marcadores MHC II y CD14 en células sin estimular. (c) Marcadores MHC II y CD1 en células estimuladas con LPS. (d) Marcadores

MHC II y CD14 en células estimuladas con LPS. Las gráficas son representativas de un experimento, n=3.

6.2. Análisis de las Proteínas

Gracias a los mecanismos de señalización que poseen las células, estas son capaces de interactuar con otras células y con moléculas para poder llevar a cabo funciones como regulación, proliferación, apoptosis, supervivencia, etc. Las proteínas de señalización intracelulares juegan un papel muy importante dentro de la transducción de señal. En este trabajo se analizaron las proteínas TRAF6, ERK, pERK y SOCS1 por western blot, y debido a que estas proteínas están ubicadas en diferente lugar de la cascada de señalización, las moDCs se estimularon con el probiótico Bb12 durante 0.5, 1, 2 y 24 h. Para determinar el papel de TLR2, algunos cultivos de moDCs fueron tratados con anti-TLR2 previamente al estímulo con Bb12, para bloquear dicha señalización.

Para la proteína TRAF6 no hubo diferencias ($P < 0.05$) en la expresión de la proteína en los diferentes tiempos, manteniéndose constante hasta las 24 h (Figura 5a). Este patrón se mantuvo incluso con el tratamiento con anti-TLR2 (Figura 5b), ya que no se presentaron cambios ($P > 0.05$) en los diferentes tiempos. TRAF6 al ser una molécula adaptadora, es una de las primeras en activarse corriente abajo, por lo que su expresión constante es de esperarse. También es posible que, en condiciones basales, en su mayoría se encuentre expresada, ya que es requerida en múltiples vías de señalización, lo que demuestra la importancia de esta proteína. Por ejemplo, se ha reportado que TRAF6 es una molécula crucial en la supervivencia de ratones recién nacidos, también en el metabolismo óseo, en respuestas de inmunidad innata y en la señalización de citocinas (Dainichi Teruki *et al.*, 2019).

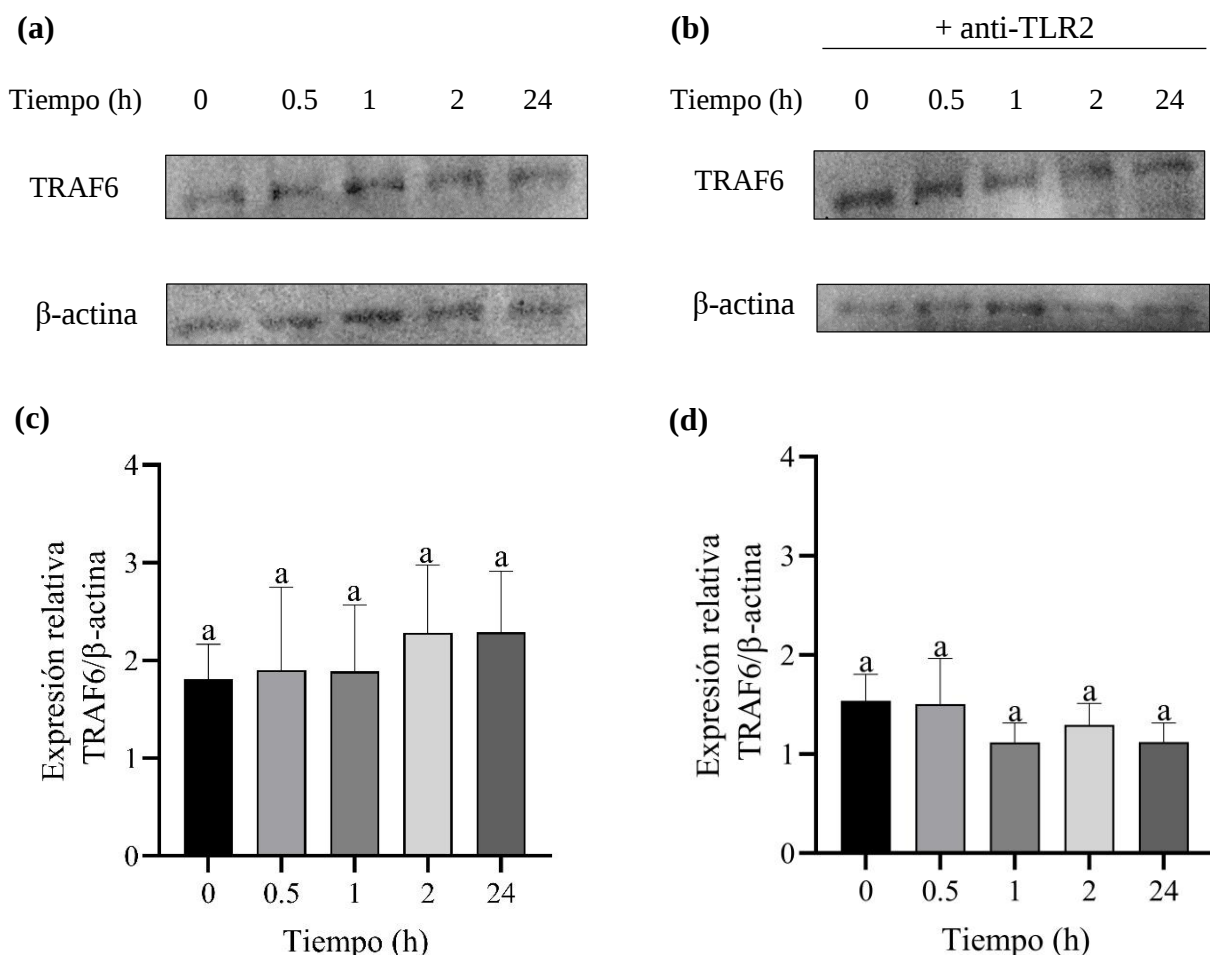


Figura 5. Inmunodetección de TRAF6 de moDCs porcinas. **(a)** Células estimuladas con Bb12. **(b)** Células tratadas previamente con anti-TLR2. **(c)** Expresión relativa de TRAF6 en comparación de β -actina en células estimuladas con Bb12. **(d)** Expresión relativa de TRAF6 en comparación de β -actina en células tratadas previamente con anti-TLR2. Datos presentados como la media $\pm$ DE de $n=3$. Literales diferentes indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre los tiempos.

Por otra parte, en el análisis de las proteínas involucradas en la vía de MAP cinasas, se observaron cambios en la expresión de pERK ($P<0.05$) a partir de 1 h de estímulo con respecto al tiempo 0 (Figura 6a), en donde la expresión más alta se observó a las 24 h. Es decir, la expresión de pERK aumenta conforme transcurre el tiempo. Esta activación es dependiente de TLR2, ya que al bloquear este receptor con anti-TLR2 (Figura 6b), se observaron cambios en la activación, la expresión más alta se obtuvo a las primeras horas de estímulo, disminuyendo significativamente ($P<0.05$) a las 24 h. Esto comprueba que, efectivamente, la expresión de la proteína pERK está

relacionada con la activación por parte de TLR2 y en este caso es la respuesta que se obtiene al estimular con Bb12. Es decir, que al bloquear TLR2, se disminuye la señal de pERK.

Estudios sobre la activación de ERK señalan que existe una activación transitoria de ERK que dura aproximadamente 20 min y la activación sostenida hasta 2 o 3 h (Wortzel y Seger, 2011). Sin embargo, la regulación negativa de ERK no es menos importante que su activación. ERK puede ser activada por pequeñas proteínas de unión a GTP o por moléculas adaptadoras como TRAF6, esta transmite la señal directamente o mediante mediadores cinasas (Wortzel y Seger, 2011). Un estudio realizado por Hacker *et al.*, 2006 con ratones TRAF6^{-/-} en macrófagos derivados de médula ósea, al estimular con Pam₃CyS₄, un ligando de TLR2, se observó que no indujo a la fosforilación de pERK, es decir, la estimulación de TLR requiere a proteínas adaptadoras, por lo que el reclutamiento de TRAF6 es necesario para la activación de ERK. Otro estudio realizado por Kaji *et al.*, 2010, en macrófagos de ratón, estimularon con diferentes cepas de lactobacilos, entre ellos *L. plantarum*, *L. casei* y *L. johnsonii*, en donde observaron diferencias en la activación de pERK según el probiótico, siendo *L. plantarum* el que indujo más intensamente la fosforilación de pERK. Es decir, que la activación de pERK depende del estímulo utilizado.

En un estudio realizado por Teixeira-Coelho *et al.*, 2014, en macrófagos derivados de médula ósea (BMMs) de ratón, estimularon con Pam₃CSK₄ y LPS para observar la diferencia en la producción de IL-10 entre estimular a TLR2 y TLR4 durante 6 h, en donde con el ligando de TLR2 obtuvieron aproximadamente una concentración de 1000 pg/mL, mientras que para TLR4 obtuvieron 4000 pg/mL; sin embargo, las dosis de los ligandos utilizadas correspondieron a la máxima de IL-10 por BMM estimulados. Este estudio sugiere que la producción de IL-10 es mucho menor al estimular con un ligando de TLR2. Adicionalmente, analizaron la expresión de pERK por inmunodetección en membrana, estimularon con Pam₃CSK₄ durante 0, 15, 30, 60, 90 y 120 min, en donde a los 30 min obtuvieron la expresión más alta con una disminución a partir de los 60 min. En ese mismo estudio, se cuantificó la producción de IL-10 con bloqueo de ERK al estimular con LPS durante 6 h en donde su producción disminuyó respecto al control. Estos datos sugieren que la producción de IL-10 está relacionada con ERK y los receptores TLR.

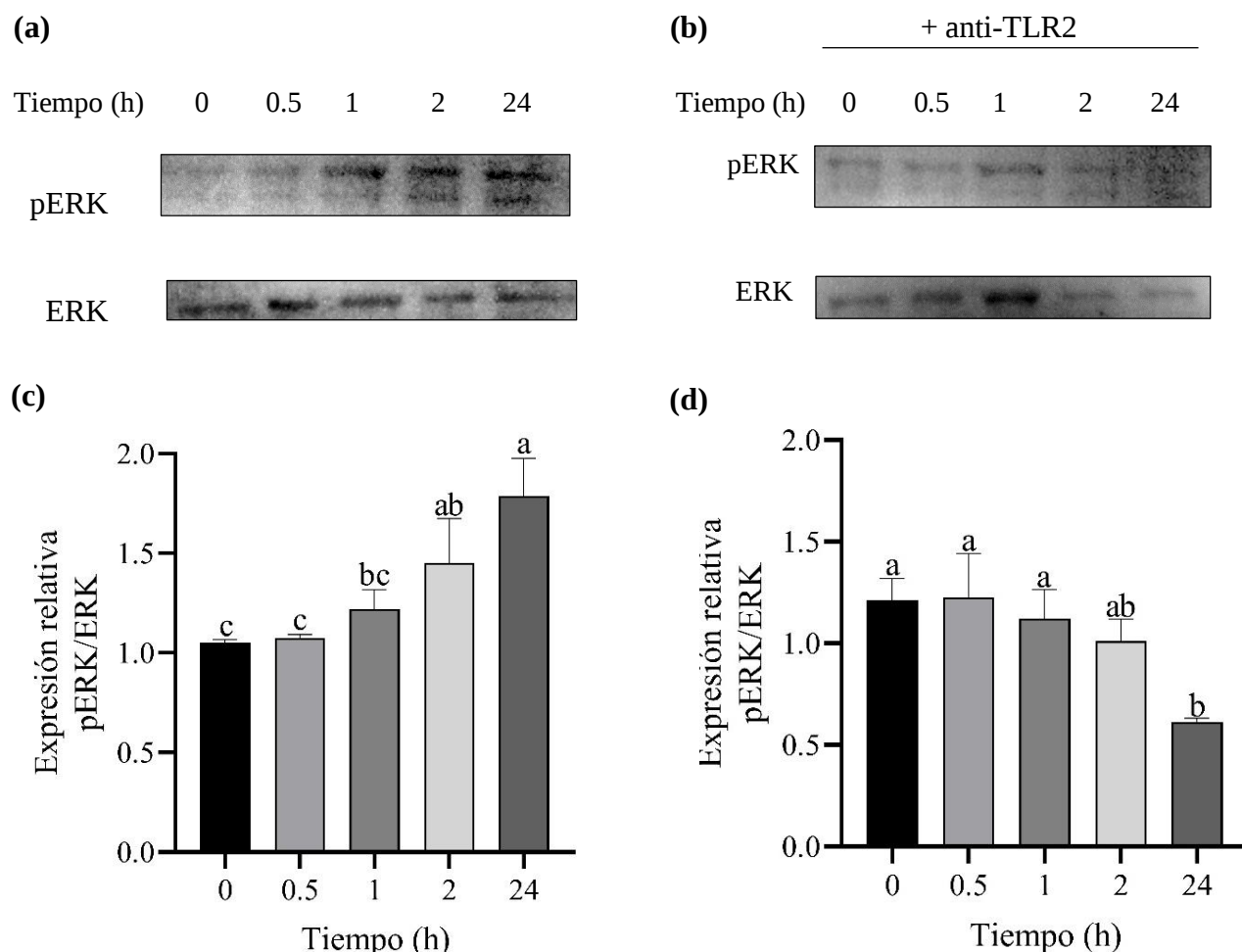


Figura 6. Inmunodetección de pERK de moDCs porcinas. **(a)** Células estimuladas con Bb12. **(b)** Células tratadas previamente con anti-TLR2. **(c)** Expresión relativa de pERK en comparación de ERK en células estimuladas con Bb12. **(d)** Expresión relativa de pERK en comparación de ERK en células tratadas previamente con anti-TLR2. Datos presentados como la media $\pm$ DE de $n=3$. Literales diferentes indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre los tiempos.

Para SOCS1 no se encontraron diferencias ($P>0.05$) en su expresión entre los diferentes tiempos (Figura 7a). Sin embargo, en el tratamiento previo con anti-TLR2 (Figura 7b), sí se observaron cambios ($P<0.05$) a las 2 y 24 h de estímulo con Bb12, en donde hubo una disminución en su expresión. Esto comprueba que el estímulo de Bb12 es capaz de mantener una expresión constante de SOCS1 en DCs a los diferentes tiempos y que la expresión de SOCS1 es dependiente de TLR2, ya que al bloquear TLR2 se disminuye su expresión desde las 2 h de estímulo. Estos resultados sugieren que Bb12 induce la expresión de SOCS1 y esto podría explicar alguno de sus mecanismos reguladores. También indica que la señalización iniciada por TLR2 es importante para la expresión

de esta proteína. Sun et al., 2017, realizaron un estudio en células THP1 estimuladas con *L. paracasei*, en donde la expresión relativa de SOCS1 más alta se observó hasta las 12 h. SOCS1 juega un papel importante en la diferenciación, maduración y activación de DCs (Sun *et al.*, 2017).

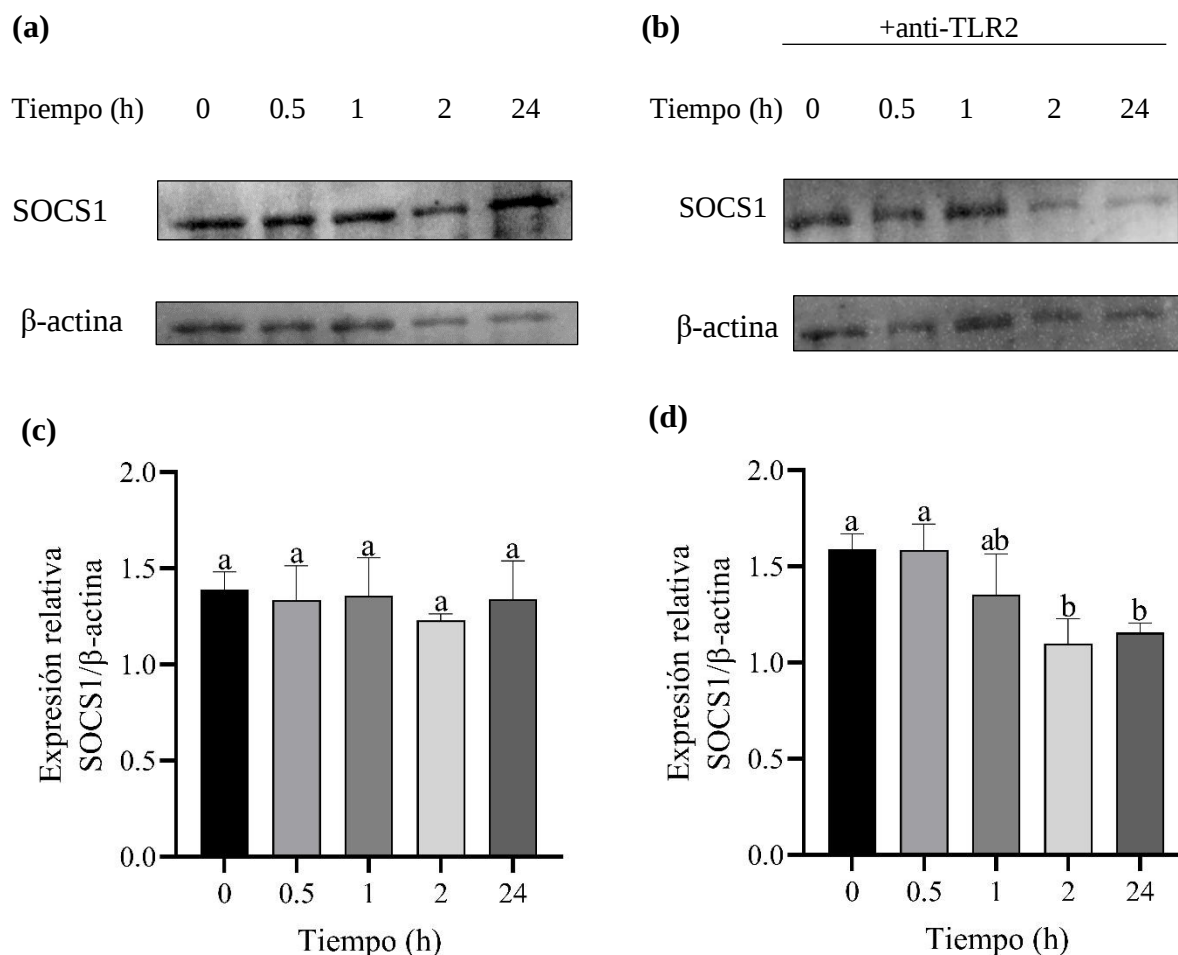


Figura 7. Inmunodetección de SOCS1 de moDCs porcinas. **(a)** Células estimuladas con Bb12. **(b)** Células tratadas previamente con anti-TLR2. **(c)** Expresión relativa de TRAF6 en comparación de β-actina en células estimuladas con Bb12. **(d)** Expresión relativa de TRAF6 en comparación de β-actina en células tratadas previamente con anti-TLR2. Datos presentados como la media ± DE de n=3. Literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tiempos.

Tomando nuestros resultados en conjunto, tenemos que al estimular con el probiótico Bb12, la expresión de TRAF6 y SOCS1 se mantiene constante, la expresión de ERK aumenta. Por otro lado,

al bloquear el receptor TLR2, la expresión de TRAF6 también se mantiene constante, mientras que la expresión de ERK y de SOCS1 disminuyen.

6.3. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

Se cuantificó la producción de las citocinas IL-10 e IL-12 mediante el método de ELISA. Para ello, las moDCs porcinas fueron estimuladas con el probiótico Bb12 durante 24 h. Se observó un aumento en IL-10 ($P < 0.05$) a las 24 h de estímulo en donde se obtuvo una concentración de 236.5 pg/mL (Figura 8a). El cultivo de moDCs fue adicionado previamente con anticuerpo anti-TLR2, en donde a las 24 h también se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) con una concentración de 321.7 pg/mL (Figura 8a). A su vez, se observó diferencia ($P < 0.05$) entre la producción de IL-10 estimuladas solo con Bb12 en comparación a la estimulación de Bb12 + anti-TLR2 (Figura 8a). Por otro lado, para la citocina IL-12, no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) en ninguno de los tratamientos (Figura 8b) y se obtuvo una producción menor (49 pg/mL) que IL-10.

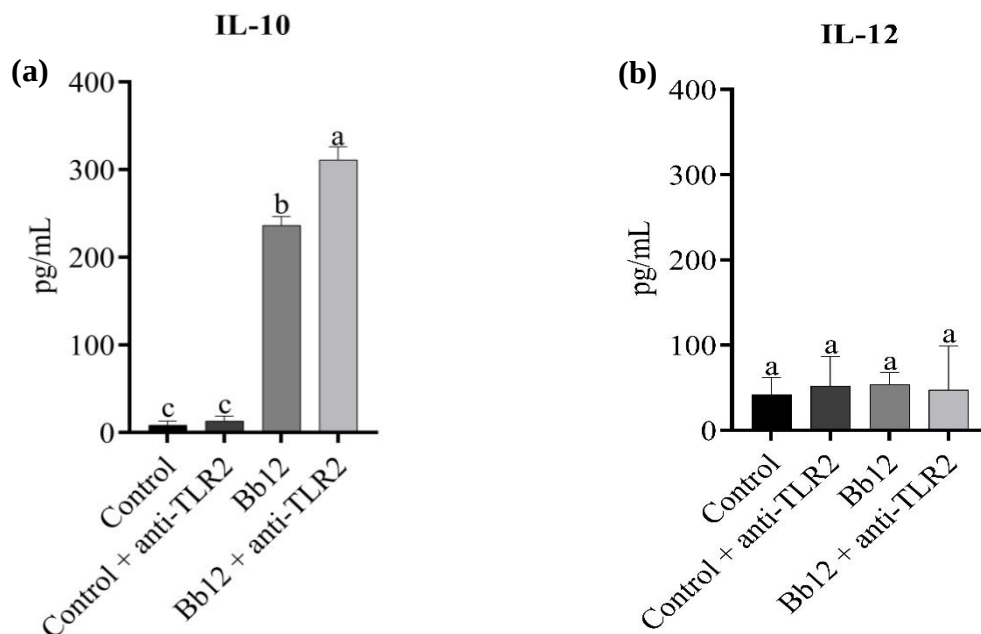


Figura 8. Cuantificación de la producción de las citocinas en moDCs estimuladas con el probiótico Bb12 por 24 h. **(a)** Producción de IL-10 y **(b)** IL-12. Los datos son presentados como la media $\pm$ DE. Literales diferentes indican diferencias significativas $P < 0.05$.

Al tomar en conjunto los resultados de las proteínas de la señalización, tenemos que el probiótico Bb12 estimula a células dendríticas, evidenciado por la producción de IL-10. Sin embargo, la señalización involucra otros receptores, no solo a nivel de receptor TLR2, ya que la producción de IL-10 se mantuvo incluso al bloquear este receptor. Esto se evidencia por la expresión de TRAF6 que se mantiene constante con y sin bloqueo de TLR2. La vía que es dependiente de TLR2 son las MAPK, ya que la expresión de ERK aumenta; sin embargo, al bloquear el receptor TLR2, su expresión disminuye. Este mismo comportamiento se observa con la proteína SOCS1, al disminuir cuando se bloquea a TLR2.

Cepas de bifidobacteria son capaces de inducir a la maduración, la producción de IL-10 y prolongación de la supervivencia de DCs. También se ha demostrado que en DCs TLR2^{-/-} se aumenta la producción de IL-12 y disminuye la de IL-10 (Plaza-Díaz *et al.*, 2019). Lo que sugiere que, efectivamente, la producción de IL-10 está relacionada con TLR2 y siendo estimulado en este caso por bifidobacteria. Lo que concuerda con los resultados de este trabajo ya que se obtuvo más producción de IL-10 que de IL-12. Sin embargo, se sugiere un efecto regulador por parte de Bb12 ya que la concentración más alta de IL-10 se obtuvo al bloquear TLR2.

Arenas-Padilla *et al.*, 2018 analizaron la expresión del transcrito de IL-10 en monocitos de cerdo estimulados con el probiótico Bb12, se observó que a las 4 h hubo un aumento en su expresión relativa (2). Adicionalmente, las células fueron tratadas con anti-TLR2 previo a la estimulación con el probiótico, en donde hubo una disminución en su expresión (1). Esto quiere decir, que Bb12 es capaz de estimular a las células a través de la vía TLR2 y producir IL-10, ya que al bloquear a este receptor disminuye el transcrito de IL-10. Dichos resultados difieren a los nuestros en lo obtenido con el bloqueo del receptor. Sin embargo, para observar una producción de citocinas por el método de ELISA es fundamental un tiempo de estímulo mínimo de 12 h. Si bien, para la activación de proteínas de señalización son cruciales las primeras horas de estímulo, para observar una secreción de citocinas es necesario más tiempo de estímulo.

Es importante establecer el perfil de citocinas, ya que, al ser mediadoras de respuestas inmunes, estas pueden dictar la polarización de las células T efectoras. En este caso, la producción de IL-10 puede dirigir la polarización hacia células Th2, éstas se caracterizan por mediar respuestas

antiinflamatorias ya que producen citocinas como IL-10 e IL-4. Debido a que, para que las TCD4⁺ se polaricen a Th1, es necesaria la producción de IL-12 e IFN- γ como inductores. Los resultados muestran una producción más elevada de IL-10 en comparación con IL-12, se sugiere que el probiótico Bb12 dirige la respuesta hacia un proceso antiinflamatorio, sin haber obtenido una sobreexpresión de esta citocina. Los niveles bajos de IL-12 pudieran deberse a que IL-10 es uno de los reguladores negativos más importantes en la producción de IL-12 inducida por TLR.

Por otro lado, la deficiencia en la expresión de IL-10 puede potenciar la respuesta inflamatoria al desafío microbiano y también conducir al desarrollo de enfermedad inflamatoria intestinal y enfermedades autoinmunes. Los niveles de IL-10 secretados dependen de la fuerza de activación de ERK en DCs y macrófagos. Se considera que IL-10 posee múltiples funciones en la regulación del sistema inmune. Se ha demostrado que inhibe la producción de moléculas inflamatorias como IL-12, MHC y moléculas co-estimuladoras de DCs y macrófagos. IL-10 se considera un candidato potencial para el uso de terapias contra enfermedades inflamatorias, infecciones crónicas, cáncer y autoinmunidad. Además, participa en la regulación mediante un proceso de retroalimentación en respuestas Th1 y Th2. Se ha reportado que los niveles de secreción de IL-10 e IFN- γ en células Th1 es un factor decisivo entre la eliminación y la persistencia de infecciones (Bhurani y Dalai, 2019).

La IL-12 se caracteriza por estar relacionada con la inmunidad innata y adaptativa ya que induce la producción de IFN- γ y, por lo tanto, ayuda a polarizar a las células TCD4⁺ a células Th1. A su vez, el IFN- γ actúa sobre las APCs para promover la secreción de IL-12 en un proceso de retroalimentación positiva. Debido a sus propiedades pleiotrópicas, esta citocina es utilizada en la terapia contra tumores e infecciones. La mayoría de los efectos de IL-12 están mediados por IFN- γ . Contrario a una de las funciones de IL-10, la interleucina IL-12 actúa sobre las APC para promover la presentación cruzada del antígeno y mejorar la actividad citotóxica (Bhurani y Dalai, 2019)

7. CONCLUSIONES

El probiótico *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 es capaz de estimular a moDCs porcinas mediante el receptor TLR2, produciendo IL10 y activando la expresión de las proteínas de señalización TRAF6, ERK y SOCS1. Sugiriendo posibles mecanismos reguladores por parte de Bb12 ya que la expresión de ERK es importante para la producción de IL-10, siendo esta última una citocina con potentes propiedades antiinflamatorias y la cual ayuda a dirigir la polarización de las células T efectoras. Se sugiere también el efecto regulador por parte de la proteína SOCS1 al ser importante en la señalización de TLR2 ya que, al bloquear este receptor, se disminuyó la expresión de esta proteína. Sin embargo, otras vías también se ven activadas con Bb12, ya que la producción más alta de IL-10 se obtuvo al bloquear TLR2.

El probiótico Bb12 modula la expresión de las proteínas SOCS1 y ERK, involucrando la vía de señalización de TLR2 en células dendríticas de cerdo. La interacción de Bb12 con las células dendríticas induce la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10, la cual no se inhibe al bloquear la señalización de TLR2, por lo que otras vías pueden estar activadas.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar experimentos con más tiempos de estímulo y utilizar otros controles como LPS.
- Aumentar el perfil de citocinas.
- Buscar otras proteínas de señalización involucradas en rutas alternas.
- Utilizar otros bloqueadores de TLRs y PRRs.
- Medir SOCS3 y otros reguladores de citocinas.

9. REFERENCIAS

- Abbas A.K., Lichtman A.H. and Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular* Novena Edición. 2018. Elsevier Saunders. Philadelphia.
- Al-Ashmawy G.M.Z. 2019. Dendritic Cell Subsets, Maturation and Function. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.79926>
- Alarcón P., González M. y Castro É. Rol de la microbiota gastrointestinal en la regulación de la respuesta inmune. 2016. *Rev Med Chil.* 144(9):10–6.
- Arenas-Padilla M., Duarte-Gutierrez J.L. and Mata-Haro V. 2018. *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 induces IL-10 through cell membrane-associated components via TLR2 in swine. *Journal of Applied Microbiology.* 125: 1881–1889
- Asadullah K., Sterry W. and Volk H.D. 2003. Interleukin-10 Therapy—Review of a New Approach *Pharmacol Rev.* 55(2):241–69.
- Bhurani V, Dalai S. Therapeutic Potentials of IL-10 versus IL-12. 2019. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76914>.
- Borchers A.T., Selmi C. Meyers F.J. Keen C.L. 2009. Gershwin ME. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol.* 44(1):26–46.
- Christensen H.R., Frokiaer H. Pestka J.J. 2002. Lactobacilli Differentially Modulate Expression of Cytokines and Maturation Surface Markers in Murine Dendritic Cells. *J Immunol.* 168(1):171–8.
- Collin M., and Bigley V. 2018. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 154(1):3–20.
- Couper K.N., Blount D.G. Riley E.M. 2008. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol.* 180(9):5771–7.
- Dainichi T., Matsumoto R. Mostafa A. and Kabashima, K. 2019. Immune Control by TRAF6-Mediated Pathways of Epithelial Cells in the EIME (Epithelial Immune Microenvironment). *Frontiers in Immunology*, 10. doi:10.3389/fimmu.2019.01107
- Dos Santos L.M., Santos M. M. de Souza S.H.P. Vieira L.Q, Arantes R.M.E. Nicoli J.R. Viera LQ. 2010. Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2B20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. *Medical Microbiology and Immunology.* 200(1):29–38.
- Fukuda S., Toh H. Hase K. Oshima K. Nakanishi Y. Yoshimura K. et al. 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *469(7331):543–7.*
- González-Rascón A., Mata-Haro V. 2015. MicroRNAs: Regulators of TLR2-Mediated Probiotic Immune Responses. *MicroRNA.* 4(3):168–74.
- Häcker H., Redecke V. Blagoev B. Kratchmarova I. Hsu L. Wang G et al. 2006. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature.* 439(7073):204–207.

- Hammer M., Mages J. Dietrich H. Schmitz F. Striebel F. Murray P.J. et al. 2005. Control of dual-specificity phosphatase-1 expression in activated macrophages by IL-10. *Eur J Immunol.* 35(10):2991–3001.
- Hu X., Chen J. Wang L. Ivashkiv L.B. 2007. Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 82(2):237–43.
- Kechagia M., Basoulis D. Konstantopoulou S. Dimitriadi D. Gyftopoulou K. Skarmoutsou N. et al. 2013. Health Benefits of probiotics: A Review. *ISRN Nutrition.*
- Kaji R., Kiyoshima-Shibata J. Tsujibe S. Nanno M. Shida K. 2010. Short communication: Probiotic induction of interleukin-10 and interleukin-12 production by macrophages is modulated by co-stimulation with microbial components. *J Dairy Sci. American Dairy Science Association.* 1–4.
- Lannes N., and Summerfield A. 2013. Regulation of Porcine Plasmacytoid Dendritic Cells by Cytokines. *PLoS One.* 8(4):1–9.
- Latvala S., Miettinen M. Kekkonen R.A, Korpela R. Julkunen I. 2011. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* induce suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) gene expression directly and indirectly via interleukin-10 in human primary macrophages. *Clin Exp Immunol.* 165(1):94–103.
- Lebeer S., Vanderleyden J. and De Keersmaecker S. 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology.* 8(3):171-184.
- Li Q., and Verma I.M. 2002. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2(10):725–34.
- Linares D.M., Gómez C. Renes E. Fresno J.M. Tornadijo M.E, Ross R.P. et al. 2017. Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria with Potential to Design Natural Biofunctional Health-Promoting Dairy Foods. *Front Microbiol.* 8:1–11.
- Mair K.H., Sedlak C. Käser T. Pasternak A. Levast B. Gerner W. et al. 2014. The porcine innate immune system: An update. *Dev Comp Immunol. Elsevier Ltd.* 45(2):321–43.
- Mellman I. 2013 Dendritic Cells: Master Regulators of the Immune Response. *Cancer Immunol Res.* 1(3):145–149.
- Metzger D.W. 2010. Interleukin-12 as an adjuvant for induction of protective antibody responses. *Cytokine.* 102–107.
- Mildner A., and Jung S. 2014. Development and Function of Dendritic Cell Subsets. *Immunity.* 40(5):642–656.
- Mittal S.K., and Roche P.A. 2015. Suppression of antigen presentation by IL-10. *Curr Opin Immunol. Elsevier Ltd.* 34:22–7.
- Mohan R., Koebnick C. Schildt J. Schmidt S. Mueller M. Possner M. et al. 2006. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: A double-blind, placebo-controlled, randomized study. *J Clin Microbiol.* 44(11):4025–4031.
- Moore K.W., de Waal Malefyt R. Coffman R.L. O’Garra A. 2001. Interleukin -10 and the Interleukin -10 Receptor. *Annu Rev Immunol.* 19(1):683–765.

- Na H., Cho M. and Chung Y. 2016. Regulation of Th2 Cell Immunity by Dendritic Cells. *Immune Network*. 16(1):1–12.
- Plaza-Díaz J., Ruiz-Ojeda F. Gil-Campos M. Gil A. 2019. Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv Nutr*. 10:S49–S66.
- Qasimi P., Ming-Lum A. Ghanipour A. Ong C.J. Cox M.E. Ihle J. et al. 2005. Divergent mechanisms utilized by SOCS3 to mediate interleukin-10 inhibition of tumor necrosis factor and nitric oxide production by macrophages. *J Biol Chem*. 281(10):6316–6324.
- Sabat R., Grütz G. Warszawska K. Kirsch S. Witte E. Wolk K. et al. 2010. Biology of interleukin-10. *Cytok Gro Fac Rev*. 21(5):331–44.
- Saraiva M., and O’Garra A. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev*. 10(3):170–81.
- Summerfield A., and McCullough K.C. 2009. The porcine dendritic cell family. *Dev Comp Immunol*. 33(3):299–309.
- Sun L., He C. Nair L. Yeung J. and Egwuagu C.E. 2015. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. *Cytokine*. 75(2): 249–255.
- Sun K., Xu D, Xie C, Plummer S. Tang J. Yang X et al. 2017. *Lactobacillus paracasei* modulates LPS-induced inflammatory cytokine release by monocyte-macrophages via the up-regulation of negative regulators of NF-kappaB signaling in a TLR2-dependent manner. *Cytokine*. 92:1–11.
- Teixeira-Coelho M., Guedes J. Ferreirinha P. Howes A. Pedrosa J. Rodrigues F. et al. 2014. Differential post-transcriptional regulation of IL-10 by TLR2 and TLR4-activated macrophages. *European Journal of Immunology*. 44(3):856-866.
- Trinchieri G. 2007. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *The Journal of Experimental Medicine*. 04(2):239-243.
- Vázquez M.B., Sureda M. Rebollo J. 2012. Células dendríticas I: Aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunologia*. 31(1):21–30.
- Veiga P., Gallini C. Beal C. Michaud M. Delaney M. DuBois A. et al. 2010. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* fermented milk product reduces inflammation by altering a niche for colitogenic microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(42):18132–18137.
- Ventura M., and Zink R. 2002. Rapid identification, differentiation, and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*. *Appl Env Microbiol*. 68(12):6429–6434.
- Verma R., Balakrishnan L. Sharma K. Khan A.A. Advani J. Gowda H. et al. 2015. A network map of Interleukin-10 signaling pathway. *J Cell Commun Signal*. 10(1):61–67.
- Vogel L.A., Showe L.C, Lester T.L. McNutt R.M. Van Cleave V.H. Metzger D.W. 1996. Direct binding of IL-12 to human and murine B lymphocytes. *Int Immunol* 8:1955–1962.
- Wilbers R.H.P., Van Raaij D.R. Westerhof L.B. Bakker J. Smant G. Schots A. 2017. Re-evaluation of IL-10 signaling reveals novel insights on the contribution of the intracellular domain of the IL-10R2 chain. *PLoS One*. 12(10):1c17.

- Wortzel I., and Seger R. 2011. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes & cancer*. 2(3):195–209.
- Walsh M.C., Lee J.E., Choi E. 2015. Tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. *Immunol Rev*. 266(1):72–92.
- Wang Y., Fan K T. Li J.M. Waller E.K. 2012. The regulation and activity of interleukin-12. *Frontiers in Bioscience*. 888-899.
- Yan J., Smyth M.J., Teng M.W.L. 2017. Interleukin (IL)-12 and IL-23 and Their Conflicting Roles in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. doi:10.1101/cshperspect.a028530
- Yoshimura A., Naka T. Kubo M. 2007. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol*. 7(6):454–65.
- Zhang J. M., An J. 2009. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin*. 45(2): 27–37.