



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

**“UTILIZACIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS PARA
MODULAR LA RESPUESTA A *Salmonella choleraesuis* EN
CÉLULAS DENDRÍTICAS INTESTINALES DE CERDO”**

por:

Marina Arenas Padilla

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACION DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Marina Arenas Padilla 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
Asesor



Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort
Asesor

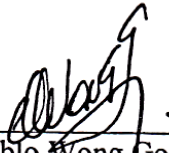


Dra. Evelia Acedo Félix
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director 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, además por el apoyo económico del proyecto 105575.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por aceptarme para realizar mis estudios de posgrado en su reconocida institución.

A mi directora de tesis la Dra. Verónica Mata Haro. Gracias ser una excelente maestra y excelente ser humano. Por todas sus enseñanzas, por compartir sus conocimientos, por su infinita paciencia, comprensión, por hacer ameno el día a día en el ambiente de trabajo.

A los miembros de mi comité por su tiempo y disponibilidad para brindarme su ayuda, apoyo y consejo.

A los investigadores de los laboratorios que facilitaron la realización de este trabajo; Dra. Ana María Calderón, Dr. Jesús Hernández, Dra. Evelia Acedo.

A la M.C. Leticia Félix, por sus enseñanzas y apoyo en el trabajo del laboratorio, gracias por compartir pláticas, risas, gustos y disgustos, comida, verbenas, etcétera.

A los compañeros del laboratorio de inmunología: Erika, Mony, Mary, Lupita, Edgar, Eli, Alex por compartir sus conocimientos, por su apoyo y buenos momentos.

A mis compañeros de laboratorio (Melvin y Anna) y de maestría. Claudia y Anna, gracias por brindarme su amistad, por todos los momentos que pasamos desde el inicio; vecina,

gracias por todo el tiempo que pasamos, porque aprendimos juntas, por las cosas que yo creo nomas a nosotras nos pasan. A Rocío mi comadre, por animarme a estudiar la maestría en CIAD, creo que fue el mejor momento, gracias.

A mis papás, por ser un ejemplo de vida y una motivación a seguir adelante, por su comprensión y apoyo en todo momento, por hacer de mí la persona que soy.

A Marlenne por sus consejos, por su apoyo y motivación.

Por último, agradezco infinitamente a Dios, por estar siempre conmigo por darme bendiciones durante toda mi vida, por darme fortaleza, perseverancia y paciencia para seguir siempre adelante.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mi papá Marco Antonio y a mi mamá Marina del Carmen, porque el esfuerzo y superación será una forma de pagar todo lo que me han dado a lo largo de mi vida, sigo construyendo lo que ustedes empezaron. Los Amo.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Probióticos	3
Descripción	3
Beneficios en la Salud del Hospedero	4
Modulación del Sistema Inmune	6
Células Dendríticas	7
Moléculas de Membrana en Células Dendríticas de Cerdo	9
Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)	10
Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I (MHC-I)	10
Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II (MHC-II)	10
Moléculas co-estimuladoras	11
B7	11
CD40	11
Otras moléculas de superficie	11
CD1	11
CD163	12
Efecto de Microorganismos Probióticos en la Maduración y Producción de Citocinas en Células Dendríticas	12

CONTENIDO (continuación)

	Página
Probióticos como Alternativa de Prevención contra Microorganismos	
Patógenos	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Animales de experimentación	18
Origen de cepas bacterianas	18
Cultivo de bacterias	18
Diseño Experimental	19
Obtención de Células Dendríticas de Ganglios Mesentéricos	20
Análisis de Moléculas de Membrana por Citometría de Flujo	20
Cuantificación de Citocinas en Sobrenadante de Cultivo Celular por ELISA	20
Análisis de Datos	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Análisis de Células Dendríticas de Ganglios Mesentéricos por Citometría de Flujo	23
Análisis del porcentaje de células SWC3 en suspensión celular de ganglios mesentéricos	23
Análisis de moléculas de membrana de células dendríticas estimuladas con bacterias probióticas y ante <i>Salmonella choleraesuis</i>	24
MHC-II	26
CD1	30
CD163	30
Cuantificación de Citocinas por el Método ELISA	36
CONCLUSIÓN	39
BIBLIOGRAFÍA	40

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fotografía de células dendríticas de ganglios mesentéricos	9
2	Principales moléculas co-estimuladoras en células presentadoras de antígeno	10
3	Diagrama general del experimento	19
4	Marcaje de células SWC3+ después de la eliminación de macrófagos por adherencia	24
5	Análisis de moléculas de membrana por citometría de flujo	25
6	Diferencias del porcentaje de células dendríticas MHC-II+ con respecto al control sin estímulo	27
7	Diferencia de porcentajes de células dendríticas de ganglios mesentéricos MHC-II+, estimuladas con probióticos y retadas con <i>Salmonella choleraesuis</i>	28
8	Diferencias del porcentaje de células dendríticas CD1+ con respecto al control sin estímulo	29
9	Diferencia de porcentajes de células dendríticas de ganglios mesentéricos CD1+, estimuladas con probióticos y retadas con <i>Salmonella choleraesuis</i>	31
10	Diferencias del porcentaje de células dendríticas CD163+ con respecto al control sin estímulo	32
11	Diferencia de porcentajes de células dendríticas de ganglios mesentéricos CD163+, estimuladas con probióticos y retadas con <i>Salmonella choleraesuis</i>	33
12	Cuantificación de IL-10 e IFN- γ en sobrenadantes de cultivo	35

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Efecto de bacterias probióticas y comensales vivas en la maduración y producción de citocinas en MDCC de humano.....	14
2	Datos de porcentajes de poblaciones celulares representativa del programa FACsDiva	26

RESUMEN

Introducción. Los microorganismos probióticos han sido utilizados ampliamente por sus beneficios en la salud del hospedero. Tienen la capacidad de influir en la maduración de células dendríticas (DC), lo que implica la expresión de moléculas de membrana y producción de citocinas. Por otro lado, en la industria porcina, *Salmonella choleraesuis* es uno de los principales agentes etiológicos causantes de diarreas en lechones, para su control y tratamiento tradicionalmente se han utilizado antibióticos, por lo que los probióticos se proponen como una medida preventiva para disminuir el suministro de antibióticos. **Objetivo:** Analizar la respuesta inmunológica de DC de ganglios mesentéricos de cerdo estimuladas con bacterias probióticas y *Salmonella choleraesuis*. **Métodos:** Se obtuvieron DC a partir de ganglios mesentéricos de cerdo y se cultivaron y estimularon por 12 h con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12, *Bifidobacterium thermophilum* 108, *Lactobacillus reuteri* 703, *Lactobacillus reuteri* 1447 o *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608. Los cultivos se lavaron para retirar los probióticos, las DC se incubaron con *Salmonella choleraesuis* durante 12 h. Se analizó por citometría de flujo la expresión de moléculas de membrana como el MHC-II, CD1 y CD163 en las DC estimuladas con los distintos probióticos y en presencia de *S. choleraesuis*. Finalmente se determinó la producción de IL-10 e IFN- γ en los sobrenadantes de estos cultivos por ELISA. **Resultados:** Las cepas utilizadas mostraron distintos efectos sobre la expresión de MHC-II, CD1 y CD163. Todas las cepas incrementaron significativamente ($p < 0.05$) el número de células positivas MHC-II. *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608 incrementó significativamente el porcentaje de MHC-II+ y CD163+ en presencia de *Salmonella choleraesuis* ($p < 0.05$). No hubo diferencia significativa entre los tratamientos sobre CD1 ($p < 0.05$). Únicamente se detectó producción de IL-10 por efecto de la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 ($p < 0.05$), pero no al agregar *S. choleraesuis*. **Conclusiones:** *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608 podría modular la respuesta ante una infección con *Salmonella choleraesuis*, ya que aumenta la expresión de moléculas asociadas con la presentación de antígenos. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 podría inducir una respuesta anti-inflamatoria, lo que ayudaría a la regulación de la inflamación; como la que podría presentarse en una infección.

Palabras clave: Células dendríticas, probióticos, *Salmonella choleraesuis*

ABSTRACT

Introduction. Probiotic microorganisms have been used widely, they confer health benefits to the host. Probiotics are able to influence the maturation of dendritic cells (DC), this includes the expression of different membrane molecules and cytokine production. On the other hand, in the swine industry, *Salmonella choleraesuis* is one of the main etiological agents of infectious diarrhea in piglets, for which antibiotics have traditionally been used for control and treatment, therefore probiotics are proposed as a preventive measure to reduce the use of antibiotics. **Aim:** To analyze the immune response of swine mesenteric lymph node dendritic cells stimulated with probiotic bacteria and *Salmonella choleraesuis*. **Methods:** DC were obtained from swine mesenteric lymph nodes and cultured for 12 h with: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12, *Bifidobacterium thermophilum* 108, *Lactobacillus reuteri* 703, *Lactobacillus reuteri* 1447 or *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608. The cultures were washed to remove probiotics and DC were incubated with *Salmonella choleraesuis* for additional 12 h. The surface membrane molecules expression of MHC-II, CD1 and CD163 on DC stimulated with different probiotics and infected with *S. choleraesuis* was analyzed by flow cytometry. Finally, IL-10 and IFN- γ production were determined on supernatants from these cultures by ELISA. **Results:** Probiotic strains used had different effects on MHC-II, CD1 and CD163 expression. All strains significantly increased ($p < 0.05$) the number of MHC-II positives cells. *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608 significantly increased ($p < 0.05$) the mean expression of MHC-II+ and CD163+ on DC in *Salmonella choleraesuis* presence. There was no significant difference ($p < 0.05$) among treatments on CD1 molecule. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 ($p < 0.05$) was the only probiotic bacteria able to increase IL-10 production, but not after inoculation with *S. choleraesuis*. **Conclusion:** *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608 could modulate the response to infection with *Salmonella choleraesuis* as shown by the increase of the expression of molecules associated with antigen presentation. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 could induce an anti-inflammatory response, this would help in the regulation of inflammation as might occur in an infection.

Key words: Dendritic cells, probiotics, *Salmonella choleraesuis*

INTRODUCCIÓN

Etimológicamente el término probiótico procede del griego “probios”, que significa “por la vida”. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido un probiótico como “organismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto benéfico sobre la salud del hospedero”. (FAO/WHO, 2002).

Los probióticos se han utilizado desde tiempos antiguos y hasta hoy en día, tienen aplicación tanto a nivel industrial como científico. Se han utilizado adicionados en yogurts y suplementos alimenticios. Inclusive algunos de ellos, como *Streptococcus lactis*, han sido utilizados también para la elaboración de productos lácteos (Sanders, 1993).

Al modificar la microbiota intestinal los probióticos influyen directa e indirectamente en el estado de la salud. Algunos de sus beneficios incluyen la prevención de diarreas (Duffy et al., 1994), disminución del colesterol por modulación del metabolismo de lípidos (Gilliland y Walker, 1989), prevención de cáncer y tumores (Aso y Akazan, 1992), entre otros. Además, es de gran importancia su capacidad de estimular la respuesta inmune y defensa frente a microorganismos enteropatógenos (Lee y Salminen, 1995). Se han realizado varios estudios sobre esta capacidad de los probióticos que incluye la activación de células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés), los cuales más adelante se describirán a detalle.

Las DC son las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés) más especializadas, se encuentran distribuidas ampliamente en todo el organismo, incluyendo la mucosa intestinal. Son las iniciadoras de la respuesta inmune adaptativa, esto es cuando son activadas ante un estímulo, al ser estimuladas expresan distintas moléculas de activación, algunas moléculas co-estimuladoras y de adhesión, además producen

citocinas. Los probióticos interactúan directamente con las DC activándolas y promoviendo la estimulación específica de células T vírgenes, esto las distingue de otras APC como células B y macrófagos (Banchereau y Steinman, 1998).

El efecto de los probióticos de activar la respuesta inmune está evidenciado en múltiples trabajos realizados principalmente en modelos murinos (Borchers et. al., 2009), pero poco se sabe sobre el efecto específicamente en el cerdo. El estudio inmunológico de DC intestinales es de gran relevancia, ya que el tracto gastrointestinal representa un sitio importante de entrada de microorganismos patógenos (Coombes y Powrie, 2008). Por todo lo anterior, es fundamental analizar la respuesta de la DC intestinales de cerdo estimuladas con probióticos y el efecto inmunológico que presentan frente a un reto con *Salmonella choleraesuis*, por lo que el género *Salmonella* es de gran interés para la industria porcícola, debido a que es uno de los principales agentes etiológicos causante de diarreas en lechones (Berends et al., 1996).

ANTECEDENTES

Probióticos

Descripción

La OMS ha definido un probiótico como “organismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedero”. (FAO/WHO, 2002). Para que una bacteria sea calificada como probiótico debe cumplir con algunos criterios. Entre ellos, ser habitante normal del tracto gastrointestinal, no ser patógeno o tóxico para el hospedero, tener un tiempo corto de reproducción. Así mismo, ser estables ante el contacto con bilis, ácido, enzimas y oxígeno; tener capacidad de adherencia a la mucosa intestinal, capacidad de colonización del tracto y de producir sustancias antimicrobianas (Kailasaphaty y Chin, 2000).

Los microorganismos probióticos han sido clasificados ampliamente, los que cumplen con estos criterios son generalmente las bacterias ácido lácticas (LAB, por sus siglas en inglés) como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y cepas del género *Bifidobacterium*. Aunque algunas cepas no patogénicas de *Escherichia coli* y levaduras, también presentan características probióticas (Borchers et al., 2009).

Las bifidobacterias son habitantes normales del tracto intestinal en mamíferos, aves e insectos. Están caracterizadas como bacterias Gram-positivas, catalasa negativa y anaerobias estrictas. Existen alrededor de 47 especies incluidas en el género *Bifidobacterium* que fueron aisladas de diferentes fuentes como caries dental, heces y vagina. Ejercen una variedad de efectos benéficos para la salud, incluyendo regulación de la homeostasis de la microbiota intestinal, inhibición de patógenos y bacterias dañinas que colonizan y/o infectan la mucosa del intestino, modulación de la respuesta inmune local y sistémica y la producción de vitaminas (Mayo y van Sinderen, 2010).

Los lactobacilos son bacterias Gram-positivas, catalasa negativa, anaerobias facultativas y estrictamente fermentativas. Se conocen más de 50 especies de este género distribuidas en la cavidad oral, en tracto gastrointestinal y en tracto uro-genital femenino, constituyendo parte importante de la flora endógena en el humano. Su distribución se ve afectada por varios factores ambientales, como pH, oxígeno, nivel de sustratos específicos e interacción bacteriana (Gomes y Malcata, 1999).

Muchas cepas de este género son utilizadas como probióticos, en su mayoría porque tienen la habilidad de fermentar sacáridos a ácido láctico. El ácido láctico en conjunto con otros productos del lactobacilo, son responsables de la actividad antimicrobiana que caracteriza a esta cepa (Ljung y Wadström, 2006). También pueden secretar otras sustancias como ácido acético, propiónico, butírico o fórmico; dióxido de carbono, peróxido de hidrogeno, lactocina, reuterina y otras bacteriocinas que actúan en contra de microorganismos patógenos (Savagodo et al., 2006).

Otras bacterias lácticas también aportan efectos benéficos en la salud, algunas cepas de *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*. *Streptococcus thermophilus* administrado en conjunto con *Bifidobacterium lactis* reduce las diarreas asociadas a antibióticos en niños (Corrêa et al., 2005). *Streptococcus thermophilus* han sido utilizada también como iniciadora en la producción de queso (Michel and Martley, 2001).

Beneficios en la Salud del Hospedero

Los probióticos, son microorganismos con la capacidad de colonizar las mucosas del tracto respiratorio, gastrointestinal y genitourinario; pero sin tener un efecto patogénico sobre el hospedero. Por lo tanto, hay una competitividad de las bacterias benéficas con las bacterias patógenas por los sustratos disponibles y por los sitios de adhesión. Esta competencia física impide la adherencia y reproducción del patógeno. Un ejemplo de esto es el efecto competitivo que se ha observado *in vitro* e *in vivo* de *Bifidobacterium infantis* en el crecimiento de *Bacteroides vulgatus*, un patógeno putativo en enfermedades inflamatorias intestinales (IBD, por sus siglas en inglés) (Shiba et al., 2003).

Los probióticos también utilizan mecanismos bacteriostáticos o bactericidas, como la modificación del pH del lumen intestinal al producir metabolitos; como lactato y otros ácidos grasos de cadena corta; como acetato, propionato y butirato (Le Blay et al., 1999; Morrison, 2006). Otro mecanismo con el cual los probióticos combaten con microorganismos patógenos es por la producción de compuestos antibacterianos como peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Jack et al., 1995).

Los probióticos juegan un papel clave en la salud intestinal. En muestras fecales de pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales se encontró una disminución de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, en comparación con las muestras obtenidas de individuos sanos. Este mismo patrón se observó en pacientes con Síndrome de colon irritable que presentaron una microbiota intestinal desbalanceada o disbiosis (Borchers et al., 2009). La influencia del medio ambiente, por ejemplo, la dieta, exposición a los antibióticos y distintas infecciones intestinales, pueden contribuir a condiciones inflamatorias patológicas y desencadenar disbiosis. La sinergia de una dieta balanceada, estilo de vida saludable y los probióticos son indispensables para el mantenimiento de una microbiota balanceada y de esta manera preservar la homeostasis (Littman y Pamer, 2011).

Así mismo, existen estudios sobre la efectividad del uso de probióticos para el tratamiento clínico de colitis ulcerosa. Se han utilizado *E. coli* Nissle 1917, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (LGG) y una mezcla probiótica VSL#3 (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. infantis* y *Streptococcus thermophilus*), dando como resultado un efecto similar al de la mesalazina, que es el fármaco frecuentemente utilizado en esta patología (Zigra et al., 2007). Por otra parte la combinación de cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* suplementadas en pacientes con colitis ulcerosa presentaron actividad clínica poco significativa (Mallon et al., 2007).

Entre otros beneficios, los probióticos se han utilizado en la prevención y tratamiento de infecciones como diarreas, mostrando una mejoría al ser administrados. En un estudio en lactantes con una alta tasa de diarreas donde se administró LGG, el grupo que recibió el

tratamiento presentó menos episodios de diarrea por año, en relación al grupo placebo (Oberhelman et al., 1999). Otro estudio, demostró la eficacia de esta misma bacteria probiótica en el tratamiento de gastroenteritis aguda causada por rotavirus (Szajewska y Mrukowicz, 2001). Por otro lado, los probióticos *Lactobacillus casei* BL23 y *Lactobacillus paracasei* CNCM I-3689, administrados en ratones modulan la infección por *Listeria monocytogenes* disminuyendo su diseminación (Archambaud et al., 2012).

Algunos investigadores han evaluado los efectos terapéuticos de las LAB contra diferentes enfermedades como cáncer y desordenes gastrointestinales. Han descrito un incremento en la actividad inmune celular en la prevención del cáncer por el consumo de LAB (De Moreno de LeBlanc et al., 2007).

Modulación del Sistema Inmune

Uno de los beneficios más importantes de los probióticos, es su capacidad de activar al sistema inmune. Influyen tanto en la inmunidad innata, que son las primeras reacciones del organismo, como en la inmunidad adaptativa, que son las respuestas posteriores. Ambas respuesta integran el sistema encargado de defender al hospedero (Hammad y Lambrecht, 2008).

La inmunidad innata o natural, está constituida de barreras químicas, mecánicas y mecanismos de defensa celulares, algunas proteínas sanguíneas, como los factores del complemento y otros mediadores de la inflamación. La acción de los organismos probióticos sobre la inmunidad innata se ha analizado en varios trabajos. Un ejemplo es *Lactobacillus casei* GG, que actúa sobre las células del tracto gastrointestinal incrementando la expresión del gen de mucina MUC2, la mucina del epitelio intestinal que impide la translocación de bacterias. (Mattar et al., 2002).

Desde hace algunos años se ha demostrado que administrar *Lactobacillus casei* a ratones por vía intravenosa aumenta la actividad de células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés) del bazo (Kato et al., 1984). De igual manera, administrado oralmente junto

con *L. acidophilus* activa la fagocitosis y en conjunto con *L. bulgaricus* induce la activación de macrófagos (Perdigón et al., 1986; Perdigón et al., 1998).

La inmunidad humoral, es aquella que está mediada por anticuerpos producidos por células plasmáticas, es decir, linfocitos B especializados y específicos. Existen estudios donde se muestra la capacidad de los probióticos de estimular células plasmáticas e incrementar la producción de inmunoglobulina A. En uno de ellos, se administró *Bifidobacterium bifidum* a ratones y se observó un aumento en el número de células secretoras de IgA presentes en bazo y nódulos linfáticos mesentéricos, además de un incremento de IgA sistémica e intestinal (Park et al., 2002).

También se observó que la administración oral de *L. johnsonii* NCC 533 indujo un cambio de isotipo hacia IgG1, este isotipo está asociado con la inducción de IL-4 de células B y una respuesta Th2 predominante. Por otro lado, *L. paracasei* NCC 2461 indujo en gran proporción el cambio hacia IgG2a, con inducción de IFN- γ , que se asocia a una respuesta Th1 predominante (Ibnou et al., 2003). Así también, en ratones con asma y rinitis alérgica, se observó una disminución significativa de la producción de IgE contra el alérgeno en específico (Forsythe et al., 2007). De igual manera, se observó que *L. reuteri* ATCC 55730 disminuyó la incidencia de reactividad cutánea en infantes con madres alérgicas (Abrahamsson et al., 2007).

Células Dendríticas

El sistema inmunitario es fundamental para la supervivencia de los vertebrados. En ausencia de un sistema inmunitario activo hasta las infecciones menores pueden prosperar y resultar mortales. El propósito del sistema inmunitario de los vertebrados es reconocer los microorganismos extraños invasores, impedir su diseminación y eliminarlos del organismo. Este sistema consiste en varias estructuras, procesos y miles de millones de células de varios tipos que interactúan con el agente infeccioso y entre sí para combatir la infección (Parham, 2006).

La respuesta inmune innata, también llamada inmunidad natural, es la primera línea de defensa. Está constituida por los mecanismos de defensa celulares y bioquímicos ya instaurados desde el nacimiento. (Abbas et al., 2008).

El inicio de las respuestas inmunitarias adaptativas y su desarrollo requieren la captación de los antígenos y su exposición ante los linfocitos; esto es por medio de las células presentadoras de antígeno, siendo las células dendríticas las más potentes y especializadas, se consideran el vínculo entre la respuesta innata y adaptativa (Haverson et al., 2001b). Las vías habituales a través de las cuales los antígenos extraños (por ejemplo microorganismos patógenos) entran en el hospedero, es por medio de la piel y los epitelios de los aparatos digestivos y respiratorios. Los antígenos penetran desde el medio externo, son transportados hacia los órganos linfáticos y presentados a linfocitos T vírgenes para desencadenar las respuestas inmunitarias (Randolph et al., 2008).

Las respuestas inmunes que pueden desencadenarse a partir de la activación de DC son: inducción y diferenciación de linfocitos CD4+ a tipo 1 y 2 (Maldonado y Moser, 2001), activación de linfocitos CD8+ (Smith et al., 2004) y maduración de linfocitos B, así como cambio de isotipo y producción de anticuerpos (Le Bon et al., 2001).

Las DC se encuentran distribuidas en los órganos linfáticos, epitelios de la piel, mucosas del aparato digestivo y respiratorio, así como en la mayoría de los órganos parenquimatosos. Se caracterizan por la presencia de proyecciones citoplasmáticas y un núcleo grande. Estas proyecciones se pueden observar como dendritas, pseudópodos o vellos (Figura 1). Se pueden subdividir de acuerdo a su función, fenotipo y localización anatómica (Dudziak, et al., 2007). Derivan de precursores de la médula ósea y juegan un papel muy importante en la iniciación y regulación de la respuesta inmune (Banchereau et al., 2000). Las células dendríticas epiteliales y tisulares, cuando no han estado en contacto con ningún antígeno se encuentran en estado inmaduro. Al interactuar con algún antígeno, migran a los órganos linfoides secundarios para someterse a un proceso de maduración (Janeway et al., 2001).

En la activación de DC ocurren cambios fenotípicos y funcionales, incluyendo la expresión de moléculas de membrana con distintas funciones; activación, co-estimuladoras, de adhesión, además de la producción de quimiocinas y citocinas (Mohamadzadeh et al., 2005). A partir de este hecho se desencadena la respuesta adaptativa; es por eso que las DC se consideran un vínculo entre la inmunidad innata y adaptativa (Thomas y Versalovic, 2010).

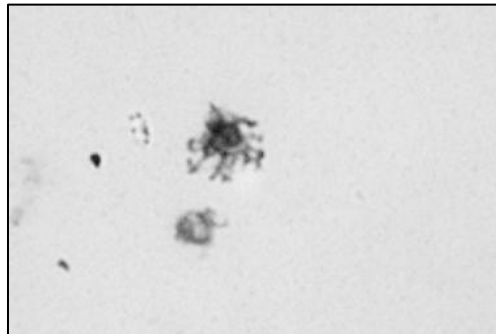


Figura 1. Fotografía de células dendríticas de ganglios mesentéricos. Teñidas con colorante Giemsa, imagen por microscopia óptica con aumento 40x. Imagen tomada en el laboratorio.

Moléculas de Membrana en Células Dendríticas de Cerdo

La identificación específica de moléculas de membrana en varias subpoblaciones de leucocitos permite conocer más a fondo la respuesta inmune ante varias infecciones en el cerdo. Las moléculas en la membrana celular o también llamadas marcadores de membrana, desempeñan distintas funciones inmunológicas. Por ejemplo: el proceso de activación de las DC implica la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad, (MHC, por sus siglas en inglés) tipo II, molécula presentadora de antígeno a las células T CD4+; además moléculas de maduración, CD83; moléculas co-estimuladoras, CD40 y CD80/CD86 para una estimulación efectiva de células T (Figura 2); moléculas de adhesión, CD54 y CD58; moléculas marcadoras de linaje, por ejemplo linaje

monocito/macrófago como SWC3, CD14; receptores de citocinas entre otras (Piriou-Guzylack y Salmon, 2008).

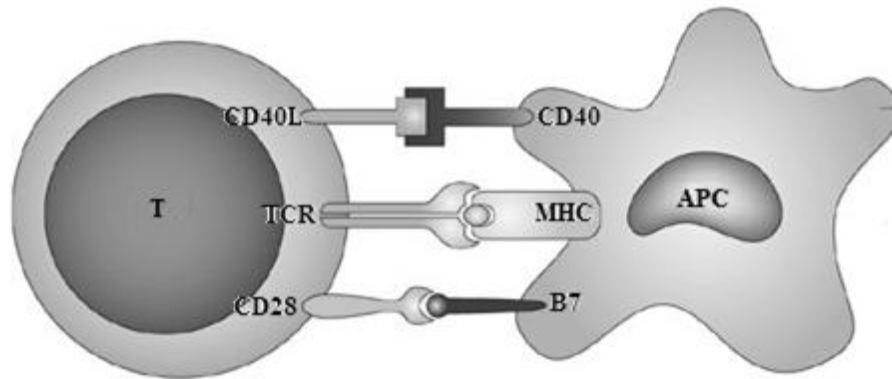


Figura 2. Principales moléculas co-estimuladoras en células presentadoras de antígeno. Adaptada de O'Hagan y Valiante, 2003.

Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)

Los linfocitos T $\alpha\beta$ CD3+, reconocen antígenos solo si son presentados por medio del MHC de APC. El receptor de células T reacciona simultáneamente con el MHC y el péptido antigénico y con las moléculas CD4 o CD8. Dependiendo de su origen y tamaño, los péptidos antigénicos se presentan ya sea por MHC de clase II, reconocidos por Linfocitos T cooperadores CD4; o por MHC clase I, reconocidos por linfocitos T citotóxicos CD8 (Piriou-Guzylack y Salmon, 2008).

Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I (MHC-I). También se le conoce como antígeno leucocitario porcino tipo I (SLA, por sus siglas en inglés), presenta antígenos de 8 a 9 aminoácidos provenientes del citosol, se expresa en todas las células del organismo a excepción de las del sistema neural y eritrocitos (Piriou-Guzylack y Salmon, 2008).

Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II (MHC-II). También llamado SLA II, su función es la presentación de antígeno a linfocitos CD4+, presenta péptidos de 12 a 25

aminoácidos de longitud que han sido captados y procesados por la APC. Se expresa principalmente en las células presentadoras de antígeno, macrófagos y células dendríticas; y en linfocitos B (Piriou-Guzylack y Salmon, 2008; Sinkora et al., 2002).

Moléculas co-estimuladoras

B7. Es la molécula co-estimuladora más relevante. Se encuentra en la superficie de APC, se describen 2 tipos, B7-1(CD80) y B7-2(CD86) ambas comparten un ligando común 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 y además la expresión del receptor de IL-2 (IL-2R), de ésta forma, los linfocitos activados producirán IL-2 la cual de forma endocrina, paracrina o autocrina induce la expansión clonal de linfocitos T (Janeway et al., 2001).

CD40. Se encuentra en células dendríticas y se une al ligando de CD40 (CD154; CD40L). La interacción CD40/CD154 inicia una señalización en ambos sentidos (célula T y DC), transmite señales activadoras al linfocito T y también induce a la APC a expresar moléculas B7, con lo que se estimula aún más la proliferación de células T (Janeway et al., 2001).

Otras moléculas de superficie

CD1. Tiene similitud con la molécula MHC tipo I, presenta antígenos predominantemente de naturaleza lipídica o glicolipídica (Schiefner y Wilson, 2009). Se expresa en timocitos, linfocitos B, células dendríticas, algunos macrófagos y células de Langerhans. Summerfield y colaboradores (2003), describieron 2 subpoblaciones de DC de sangre periférica de cerdo: SWC3+CD4-CD14-, SWC3+CD4-CD14-CD1+ y SWC3+CD4-CD14-CD1-; y proponen que la población SWC3+ CD4-CD14-CD1+ corresponde a la subpoblación de DC CD11c+ en humano, que se caracteriza por su alta expresión de MHC-II, CD80/86 y estimular fuertemente la actividad de células T.

También se midió la expresión relativa de CD1 por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcriptasa reversa (RT-qPCR, por sus siglas en inglés), utilizando tratamientos anti-inflamatorios y observaron una disminución de CD1 al utilizar fluxinin meglumina, un anti-inflamatorio comúnmente utilizado en cerdo, por lo que estos resultados demuestran el potencial de CD1 de ser utilizado como biomarcador del proceso inflamatorio y en la eficacia de anti-inflamatorios (Peters et al., 2012).

CD163. Es un receptor específico de células de linaje monocito/macrófago, específicamente de macrófagos y células dendríticas de tejido. Esta molécula se ha relacionado con la presentación de antígeno. Estudios demuestran que al derivar DC de sangre periférica de cerdo, la población CD163+ expresa altos niveles de MHC-II y CD80/86, además de inducir más eficientemente la proliferación de células T que las células CD163- (Chamorro et al., 2004). Otro estudio muestra que células monocíticas CD163+ expresan mayores niveles de moléculas de adhesión y son más eficientes en la presentación de antígeno que las células CD163 negativas (Chamorro et al., 2005). Además juega un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria, se propone como un punto de estudio en enfermedades inflamatorias (Kowal et al., 2011).

Efecto de Microorganismos Probióticos en la Maduración y Producción de Citocinas de Células Dendríticas

Las células dendríticas juegan un papel fundamental en la funcionalidad de los microorganismos probióticos (Foligne et al., 2007). Las bacterias probióticas han mostrado tener la capacidad de modular el fenotipo y la función de las células dendríticas (Hart et al., 2004).

Administrados oralmente, algunos probióticos como *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum* tienen el potencial de activar a las DC de la mucosa intestinal y desencadenar una respuesta inmune (López et al., 2010). Varias especies de probióticos pueden inducir la producción de IL-12 en macrófagos y células dendríticas; a su vez IL-12 induce la producción de IFN- γ , promueve la diferenciación hacia Th1 y suprime la

producción de IL-4, atenuando la respuesta por Th2 (Banchereau et al., 2000). Cepas de bifidobacterias estimulan la producción de altos niveles de IL-10, pero niveles moderados de IL-12 y TNF- α . *Bifidobacterium longum* BB536 indujo producción de IL-12, sin embargo, niveles muy bajos comparados con *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (Iwabuchi et al., 2007). Algunos probióticos, al estar en contacto con las DC, inducen la liberación de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-12, y un aumento en los niveles de IL-10, una citocina anti-inflamatoria (Fink et al., 2007). La maduración fenotípica de las DC por un estímulo específico, está acompañada de la producción de varias citocinas que mejoran la respuesta subsecuente de células T, B y NK (Borchers et al., 2009).

En la Tabla 1 se muestra una recopilación de varios trabajos realizados donde se ha demostrado que la incubación de probióticos (vivos o inactivados con UV) y otras bacterias ácido lácticas inducen distintos patrones de maduración y producción de citocinas en DC obtenidas de sangre periférica humana. Se puede observar que el efecto en la expresión de moléculas co-estimuladoras y citocinas la respuesta generada en las DC es variable, aun tratándose de cepas probióticas del mismo género.

Numerosos estudios han examinado el potencial de los probióticos para influir en la maduración de células dendríticas y secreción de citocinas. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han realizado en DC derivadas de monocitos de sangre periférica (MDDC, por sus siglas en inglés) o médula ósea (BMDC, por sus siglas en inglés) de humano y ratón. Hay indicios de que las DC obtenidas de sangre periférica responden de manera distinta a las DC de nódulos linfoides mesentéricos (O'Mahony et al., 2006).

Tabla 1. Efecto de bacterias probióticas y comensales vivas en la maduración y producción de citocinas en MDDC de humano.

	Cepa	CD80	CD83	CD86	CD40	MHC-II	IL-10	IL-12
<i>L. acidophilus</i>	X37	↑	↑	↑		↑	↑	↑
<i>L. reuteri</i>	DSM 12246	↑	↑	↑		↑	↑	L↑
<i>L. paracasei</i>	DSM 12246	↑	↑		±	±	↑	L↑
<i>L. rhamnosus</i>	GG		↑	↑	↑	↑	L↑	±
<i>B. bifidum</i>	S131	↑	↑	↑		↑	↑	↑
<i>B. lactis</i>	Bb12	↑	↑	↑	↑	↑	↑	±
<i>B. longum</i>	Q46	↑	↑		±	±	↑	L↑

L↑ Aumenta ligeramente, ↑ Aumento, ± sin efecto

Adaptada de Borchers et al., 2009.

Al tener esta influencia sobre ciertas moléculas de maduración y co-estimulación y producción de citocinas, es posible que CD1 y CD163 jueguen un papel importante en la maduración y en la respuesta de las células dendríticas. La expresión de CD163 y está fuertemente regulada por factores mediadores de inflamación. IL-10 e IL-6 inducen significativamente la producción de mRNA CD163 en células mononucleares (Buechler et al., 2000).

Probióticos como Alternativa de Prevención contra Microorganismos Patógenos

Generalmente las infecciones de patógenos se tratan con antibióticos. Sin embargo, en la actualidad se requiere prevenir la enfermedad más que tratarla, ya que el abuso de antibióticos promueve la resistencia bacteriana (Cunha, 2000).

Se ha observado que cepas de *Lactobacillus* producen distintas sustancias en medio de cultivo que reducen e interfieren con la adhesión de *Escherichia coli* K88 a la mucosa intestinal en cerdo (Blomberg et al., 1993). Otros estudios han reportado que *Lactobacillus plantarum* tiene actividad bacteriostática en *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* y *Pseudomonas aeruginosa* (Bradley et al., 2005). También se observó inhibición de *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium* y *Listeria monocytogenes* por bacteriocinas producidas por cepas de lactobacilos aisladas de ciegos e intestino de pollos (Lima et al., 2007).

Las especies *Lactobacillus salivarius* (WB1004) y *Lactobacillus brevis* (WB1005) han demostrado tener efecto inhibitorio en la unión *in vitro* de *Helicobacter pylori* a las células gástricas (Kabir et al., 1997). Se han utilizado también adicionados en yogurt (lactobacilos y bifidobacterias), acompañado de anzoprazol y amoxicilina, este último utilizado comúnmente para la erradicación de *H. pylori* y se observó que esta triple terapia tiene efecto significativo, incrementando la acción del fármaco (Sheu et al., 2002).

En la industria avícola se han utilizado diversas cepas de *Lactobacillus spp*, se adicionaron en los bebederos de las aves y se observó una disminución bastante significativa en la mortalidad, lo que indica la acción benéfica de los probióticos ante la amenaza de los microorganismos patógenos que causan la muerte en aves (Vicente et al., 2007).

Las diarreas de origen infeccioso son uno de los padecimientos más frecuentes en cerdos neonatos y recién destetados. Es muy común que estas infecciones ataquen a los lechones más débiles y se corre el riesgo de que la infección se propague al resto de los cerdos. Es por ello que no prevenir las o no tratarlas cuando aparecen, conduce, en la mayoría de los

casos, a la muerte de los animales. De cualquier manera, su organismo inmunodeprimido es susceptible a cualquier otra enfermedad (Brent, 2000).

Se han administrado probióticos en la dieta de cerdos, con el fin de prevenir enfermedades diarreicas causadas por patógenos. El uso de probióticos sería una alternativa para prevenir la infección de *E. coli* K88 en cerdos. Se ha demostrado que una cepa de *Enterococcus faecium* impide que la bacteria se adhiera a la mucosa intestinal (Jin et al., 2000). Por otra parte, la salmonelosis es una de las enfermedades económicamente más importantes que afectan al cerdo. Se realizó un estudio en cerdo utilizando suplementación con una mezcla de probióticos Ferlac-2 (*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *Spreptococcus thermophilus*), para reducir infecciones por *Salmonella* y se observó activación de fagocitosis (Letellier et al., 2001).

En el presente trabajo, se probaron los efectos de bacterias probióticas sobre DC de cerdo y su comportamiento ante *S. choleraesuis*, ya que las DC dirigen la polarización de la respuesta de células T en el control de patógenos (Kapsenberg, 2003).

HIPÓTESIS

La estimulación de células dendríticas de ganglios mesentéricos porcinos con cepas probióticas, puede modular la respuesta inmunológica a *Salmonella choleraesuis*.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la respuesta inmunológica de células dendríticas de ganglios mesentéricos de cerdo estimuladas con bacterias probióticas y *Salmonella choleraesuis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar por citometría de flujo la expresión de moléculas de superficie de membrana MCH-II, CD1, CD163 en células dendríticas de ganglios mesentéricos de cerdo estimuladas con los probióticos *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12, *Bifidobacterium thermophilum* 108, *Lactobacillus reuteri* 703, *Lactobacillus reuteri* 1447 y *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608.
2. Analizar por citometría de flujo la expresión de MHC-II, CD1 y CD163 de células dendríticas estimuladas e infectadas con *Salmonella choleraesuis*.
3. Determinar por ELISA la producción de citocinas IL-10 e IFN- γ en sobrenadantes obtenidos de estos cultivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de Experimentación

Se utilizaron 6 lechones de 3 a 4 semanas de edad de raza *Landrace* libres del virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino.

Origen de las Cepas Bacterianas

Las cepas probióticas utilizadas en el presente estudio fueron *Bifidobacterium thermophilum* 108, *Lactobacillus reuteri* 1447 y *Lactobacillus reuteri* 703, las cuales fueron aisladas y caracterizadas fenotípica y genotípicamente como probióticos por el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., (CIAD A.C.); se utilizaron las cepas de referencia *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 y *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608, así como la cepa patógena *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *choleraesuis* (para fines prácticos *Salmonella choleraesuis*).

Cultivo de Bacterias

Las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* fueron cultivadas en caldo Man Rogosa Sharpe, MRS (BD Difco, Sparks, MD, USA); en condiciones anaeróbicas, a 37 °C por 24 horas. El cultivo de *Bifidobacterium* se realizó en caldo MRS suplementado con 0.05 % de cisteína (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), a 37 °C por 48 horas en condiciones anaerobias estrictas. *Salmonella choleraesuis* se cultivó en caldo tripticasa

soya, TBS (BD Difco); a 37 °C por 18 a 24 horas. Las bacterias una vez cultivadas, fueron centrifugadas a 5,000 rpm durante 10 minutos (Centrifuge 5424, eppendorf), el precipitado se lavó en bufer salino de fosfatos (PBS, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 4.2 mM). La concentración de las suspensiones bacterianas se determinó realizando un ajuste de turbidez con la escala de McFarland.

Diseño experimental

El desarrollo del experimento de este trabajo se realizó de acuerdo al diagrama presentado en la Figura 3.

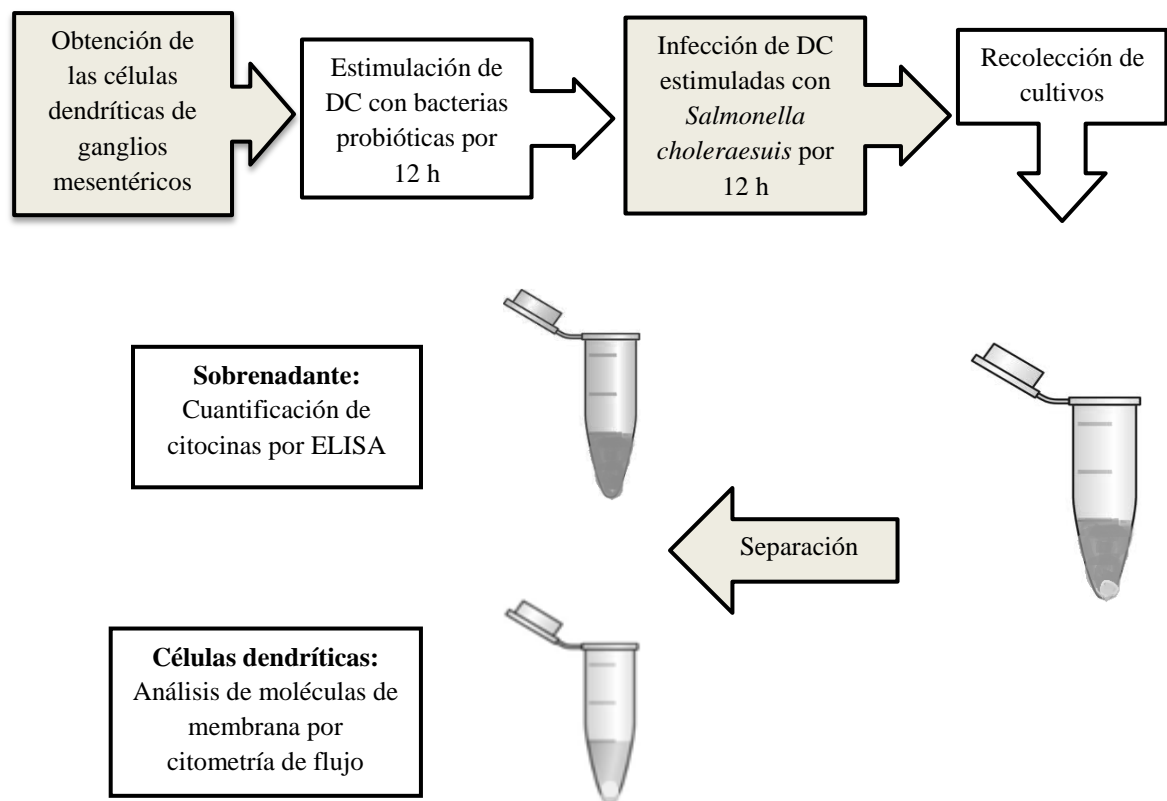


Figura 3. Diagrama general del experimento.

Obtención de Células Dendríticas de Ganglios Mesentéricos

Para la obtención de las DC se modificó el protocolo descrito por Weigmann (2007). Una vez sacrificado el cerdo, se obtuvo el intestino y se removieron los ganglios mesentéricos. Utilizando bisturí y pinzas estériles se retiró el tejido adiposo, y los ganglios fueron cortados en trozos pequeños para facilitar el macerado a través del disociador celular (BD Falcon, San José, CA, USA). La suspensión celular obtenida se lavó con PBS frío y se resuspendió en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) suplementado con gentamicina 50 µg/mL, penicilina 5000 UI/mL, estreptomina 5 µg/mL (antibióticos de Sigma-Aldrich) y 10 % de suero fetal bovino (SFB), se colocó en caja de cultivo de 75 cm² (Corning Inc., Corning, NY, USA) en concentración 10-15 x 10⁶ cel/mL, se incubó durante 2 horas para la eliminación de macrófagos por adhesión a 37°C y 5% de CO₂. Para evaluar el porcentaje de pureza se analizó por citometría de flujo en citómetro FACSCanto II™ (BD Biosciences, San José, CA, USA) utilizando anticuerpos anti-SWC3 conjugado con ficoeritrina (PE, VMRD, Seattle, WA, USA). Las DC se colocaron en placas para cultivo celular de 96 pozos (Corning Inc.) en concentración de 1 x 10⁶ células por pozo.

Análisis de Moléculas de Membrana por Citometría de Flujo

Las DC fueron estimuladas durante 12 horas con distintos tratamientos de bacterias probióticas, mencionadas anteriormente, en proporción 1:100 célula:bacteria. Posteriormente se infectaron con un inóculo de *Samonella choleraesuis* en proporción 1:10 célula:bacteria y se incubaron por 12 horas a 37°C y 5 % de CO₂. Al término de la incubación el sobrenadante fue recolectado y almacenado para la cuantificación de citocinas producidas. Las células a analizar fueron centrifugadas y posteriormente resuspendidas para el marcaje con anticuerpos específicos conjugados con fluorocromos. Se utilizaron anticuerpos anti-SWC3 conjugado con PE, anti-SLA clase II conjugado con Alexa488, anti-CD1 y anti-CD163 (VMRD), con los cuales se emplearon anticuerpos secundarios anti-IgG conjugados con Alexa488 (VMRD) y Alexa647 (AbDserotec,

Raleigh, NC, USA), respectivamente. Se incubaron por 30 minutos en oscuridad a 4°C. Para los lavados se utilizó PBS suplementados con 0.1 % de albúmina sérica bovina (Research Organics, Cleveland, OH, USA) para evitar uniones inespecíficas. Previo al análisis, las muestras se resuspendieron en 200 µL de PBS. Para el análisis de datos se utilizó el programa FACSDiva Ver 2.9 (BD Biosciences).

Cuantificación de Citocinas en Sobrenadante de Cultivo Celular por ELISA

El sobrenadante de los cultivos celulares con bacterias se colectó y centrifugó para remover bacterias, el sobrenadante restante se utilizó para determinar citocinas mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Las citocinas que se cuantificaron fueron IL-10 e IFN- γ ; se usaron kits comerciales de Invitrogen, usando placas de 96 pozos y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se colocaron 50 µL de dilución de anticuerpo de captura por pozo y se incubó durante toda una noche a temperatura ambiente (TA). Al día siguiente se lavaron los pozos con PBS conteniendo 0.1% de Tween 20, se cubrieron con 300 µL de PBS suplementado al 0.5% de albúmina (Research Organics), se incubó durante 1 h a TA. Se utilizaron 50 µL de muestra por pozo y se incubó por 1 h y media, se lavó y se añadieron 50 µL de la dilución del anticuerpo de detección por pozo, se incubó por 1 h. Se hicieron lavados y se añadieron 50 µL de solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) y se incubó por 45 minutos en la oscuridad y a TA. Por último se agregó el sustrato 3,3',5,5' tetrametil-bencidina (TMB) y se incubó por 20 minutos en la oscuridad y a TA. Para detener la reacción se acidificó con H₂SO₄ 1.8 N. La lectura se realizó dentro de los primeros 30 minutos a 450 nm en un lector de Microplacas Benchmark (Bio-Rad, Hércules, CA, USA).

Análisis de Datos

Los datos obtenidos se analizaron en el paquete estadístico NCSS 2007 (Hintze, 2009). Se realizó un análisis descriptivo de los datos, encontrándose un comportamiento normal (Kurtosis). Se buscaron efectos significativos de los tratamientos por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de tipo modelo lineal general (GLM), considerando como factores el tratamiento con probiótico y el reto con *Salmonella choleraesuis* y si se encontraron diferencias significativas se hizo una comparación de medias por Fisher-LSD, considerando como diferencia significativa un valor de p menor a 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de Células Dendríticas de Ganglios Mesentéricos por Citometría de Flujo

Análisis del Porcentaje de Células SWC3 en Suspensión Celular de Ganglios Mesentéricos

Los ganglios o nodos linfáticos son estructuras que forman parte del sistema linfático y son una parte importante del sistema inmunitario; éstos almacenan a linfocitos y células presentadoras de antígeno, como células dendríticas y macrófagos (Abbas et al., 2008). Por lo anterior para el aislamiento de células dendríticas, se hizo una incubación para la adhesión y eliminación de macrófagos, ya que el marcaje con anti-SWC3 discrimina solo linfocitos. Además, para la selección de DC se tomó en cuenta el tamaño celular, ya que este marcador es específico de células de linaje mielomonocítico; granulocitos, monocitos, macrófagos y DC (Figura 4) (Bimczok et al., 2005; Haverson et al., 2001a).

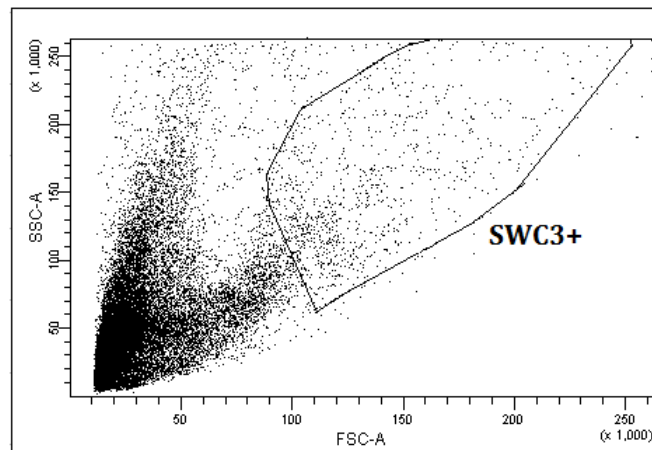


Figura 4. Marcaje de células SWC3+ después de la eliminación de macrófagos por adherencia. La grafica de puntos que se muestra es de un experimento realizado para confirmar la presencia de células SWC3+ no adherentes, en la cual el área seleccionada corresponde a la región donde se ubican las células dendríticas de acuerdo a su tamaño.

En este experimento, en el conteo celular por citometría de flujo antes de la adhesión en placa se obtuvo un 0.4% de células SWC3+ del total, después de una incubación de 2 h se observó una disminución del 0.1% en la cantidad de células positivas a este marcador de linaje, además de la observación de células adherentes en el frasco de cultivo, con todo esto aseguramos que la población SWC3+ aislada fue en su mayoría células dendríticas.

Análisis de Moléculas de Membrana de Células Dendríticas Estimuladas con Bacterias Probióticas y ante *Salmonella choleraesuis*

Para llevar a cabo el análisis de las distintas moléculas de membrana se realizó doble marcaje para contraponer las poblaciones positivas a SWC3 a las distintas moléculas analizadas: MHC-II, CD1 y CD163. Se analizaron estos marcadores en células tratadas solo con la bacteria probiótica y posterior a 12 horas de infección con *Salmonella choleraesuis*. El tiempo de infección se determinó por experimentos previos, donde se observó que transcurridas 12 horas de infección el índice de mortalidad celular era mayor del 40%. Por lo tanto, se determinó este período como el tiempo máximo de incubación con el patógeno.

En las siguientes graficas de puntos se muestra un ejemplo representativo del análisis por citometría de flujo de la expresión de los marcadores realizado en el programa FACsDiva (Figura 5). Primeramente se obtuvo una gráfica de puntos (dot plot) contraponiendo tamaño (FSC-A) contra SWC3+, se seleccionó el área donde se encontraba la población SWC3+ de mayor tamaño (Figura 5A), esta región fue seleccionada comparando con los controles de tinción. Una vez seleccionada esta región, se elaboró una nueva grafica de puntos de complejidad (SSC-A) contra tamaño (FSC-A) indicando mostrar solo la población seleccionada, esto para comprobar que las células seleccionadas se encontraban en la región correspondiente de DC según su tamaño y complejidad (Figura 5B). Se analizó la población SWC3, graficando cada molécula contra SWC3 (Figuras 5C, 5D y 5E).

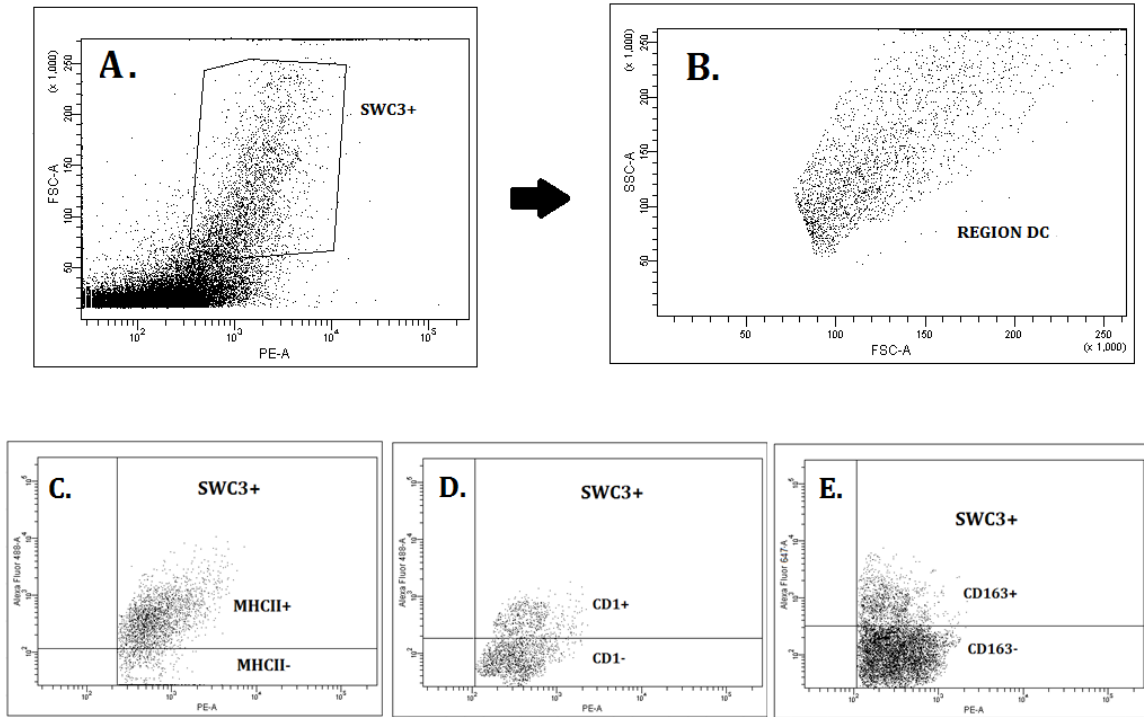


Figura 5. Análisis de moléculas de membrana por citometría de flujo. Las gráficas muestran un ejemplo representativo de cómo se llevó a cabo la selección de la población y el análisis de cada molécula. A) Total de células adquiridas y área seleccionada SWC3+. B) Comprobación de la población seleccionada de acuerdo a tamaño y complejidad. C) Análisis de MHC-II en la población SWC3+. D) Análisis de CD1 en la población SWC3+. E) Análisis de MHC-II en la población SWC3+.

Una vez que se realizó el análisis por citometría, se obtuvieron las tablas estadísticas de cada muestra con los porcentajes correspondientes (Tabla 2). Para elaborar las gráficas de barras y lograr normalizar los datos, se restó el porcentaje de las DC sin estímulo (s/E) correspondiente de cada experimento a cada uno de los resultados obtenidos. Por lo tanto, las gráficas muestran el porcentaje de incremento o disminución por efecto de los tratamientos en cada molécula analizada. Esto se debe a que resulta variable la expresión basal entre cada cerdo por tratarse de DC de ganglios mesentéricos, ya que por ser de nódulos linfáticos su fenotipo no es igual al de una célula inmadura (Willing et al., 2010).

Tabla 2. Datos de porcentajes de poblaciones celulares representativa del programa FACsDiva. La tabla muestra un ejemplo de los datos obtenidos en de una de las muestras.

Nombre del experimento: Marcaje SWC3/MHCII		
Nombre del tubo: SE		
Población	Número de eventos	% Población progenitora
Todos los eventos	271,434	-----
SWC3+	4,275	1.6
SWC3+MHC-II+	3,016	70.5
SWC3+MHC-II-	1,256	29.4
Nombre del experimento: Marcaje SWC3/CD1/CD163		
Nombre del tubo: SE		
Población	Número de eventos	% Población progenitora
Todos los eventos	63,099	-----
SWC3+	608	1.0
SWC3+CD1+	136	22.4
SWC3+CD1-	466	76.6
SWC3+CD163+	89	14.6
SWC3+CD163-	514	84.5

MHC-II. Se analizó la población SWC3+ buscando algún efecto sobre el porcentaje de células MHC-II+. En la Figura 6 se muestran los porcentajes de células dendríticas MHC-II+ inducidos por los distintos tratamientos. Se observó un incremento significativo por efecto de los tratamientos con lactobacilos y bifidobacterias, entre el 3 y 6% de células MHC-II+, con respecto al porcentaje basal ($p < 0.05$). Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre tratamientos. Estos resultados concuerdan con la bibliografía, ya que en numerosos estudios se muestra la capacidad de los microorganismos probióticos de inducir la expresión de MHC-II en células dendríticas de distintos orígenes.

Se ha descrito anteriormente la capacidad de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* de inducir la expresión de MHC-II en DC. *Bifidobacterium bifidum* incrementa la expresión de MHC-II y CD86 e induce la polarización hacia una respuesta Th1 en DC de recién nacido (Niers et al., 2007), *Lactobacillus reuteri* induce la expresión de MHC-II, CD80, CD86, CD40 y polarización hacia una respuesta Th1 en DC derivadas de monocitos de sangre periférica (Mohamadzadeh et al., 2005). Sin embargo, también se ha descrito la capacidad de *Lactobacillus reuteri* de inducir una respuesta Th2 en DC derivadas de médula ósea de ratón, por lo que la respuesta inducida por probióticos

dependerá de la cepa utilizada y del origen celular. En este trabajo se obtuvieron resultados favorables, las cepas utilizadas tienen la capacidad de incrementar el porcentaje de células MHC-II+, por lo que podría favorecer la presentación de antígeno.

Se evaluó el efecto de cada cepa en conjunto con *Salmonella choleraesuis*. Al realizarse el reto con *S. choleraesuis* el efecto en la expresión de MHC-II en las DC fue distinto para cada tratamiento. En la Figura 7 se muestra la gráfica del porcentaje de células MHC-II+, ante la presencia del patógeno. El tratamiento con *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608 y *S. choleraesuis* resultó tener un efecto significativo con respecto al tratamiento con solo probiótico. Se observó un aumento significativo en el porcentaje de DC MHC-II+, lo que podría indicar la capacidad de esta cepa de activar la respuesta de células T ante la presencia del patógeno. Las cepas *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 *Bifidobacterium thermophilum* 108, *Lactobacillus reuteri* 703 y *Lactobacillus reuteri* 1447 no tuvieron efecto ($p < 0.05$).

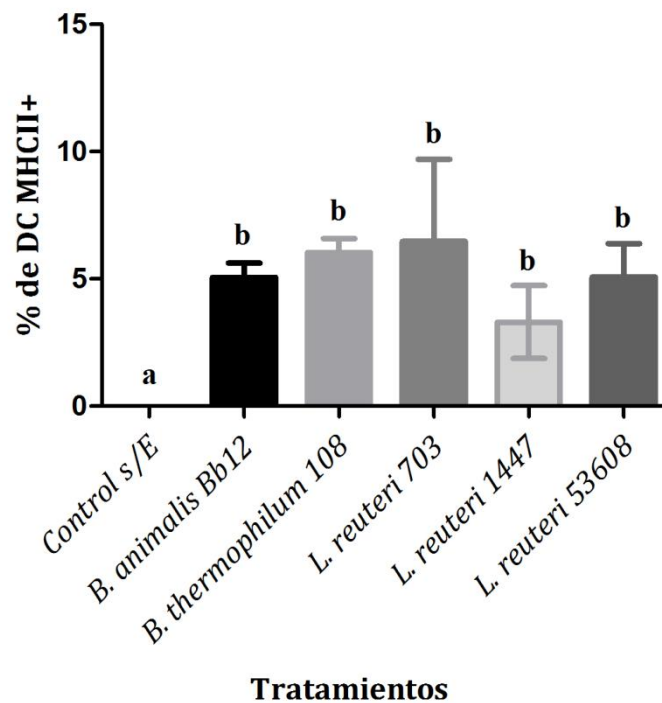


Figura 6. Diferencias del porcentaje de células dendríticas MHC-II+ con respecto al control sin estímulo. Los porcentajes fueron determinados por citometría de flujo. Las DC fueron estimuladas por 12 h y se recolectaron para analizar la expresión de MHC-II inducido por los distintos tratamientos. Los gráficos representan la media y el SEM de una $n=4$. Para determinar diferencias entre tratamientos se utilizó Fisher-LSD, ($p < 0.05$).

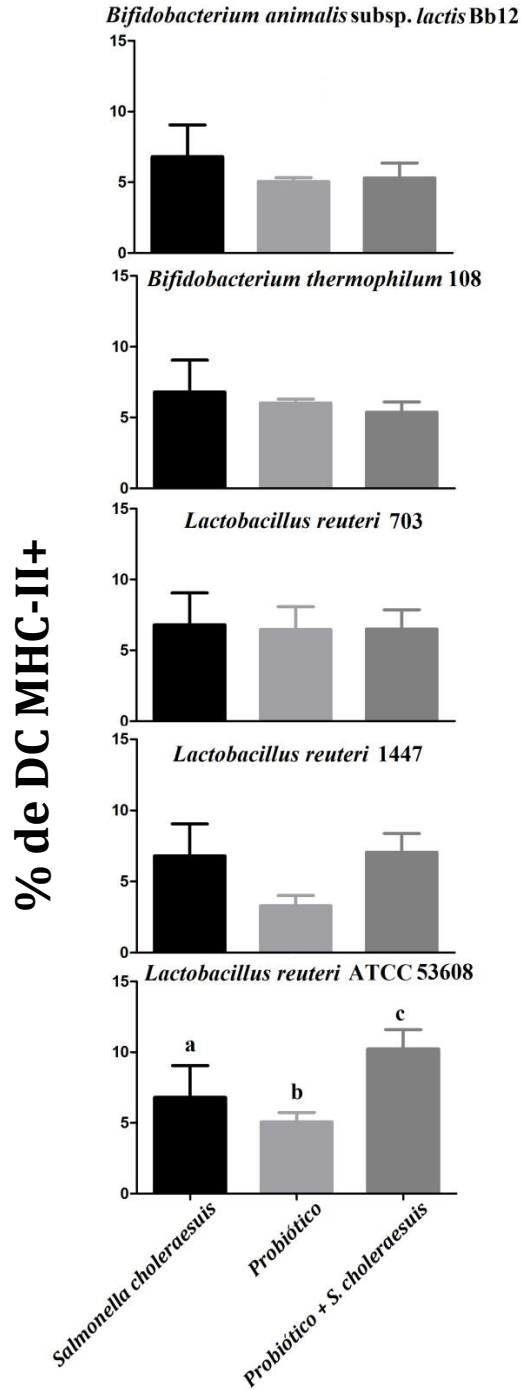


Figura 7. Diferencia de porcentajes de células dendríticas de ganglios mesentéricos MHC-II+, estimuladas con probióticos y retadas con *Salmonella choleraesuis* con respecto al control sin estímulo. Los gráficos representan las medias y el SEM (n=4) del porcentaje inducido por los distintos tratamientos y el comportamiento ante el reto con *S. choleraesuis*. Para determinar diferencias se utilizó Fisher LSD, (p<0.05).

CD1. En la Figura 8 se observa el efecto sobre los porcentajes de SWC3+CD1+ inducido por los distintos tratamientos. Se encontró efecto significativo de los tratamientos con respecto al control, a excepción de la cepa *L. reuteri* 1447. Se puede observar disminución en el porcentaje de células al utilizar los distintos tratamientos, esto concuerda con lo reportado con López y colaboradores (2010), donde se observó una disminución de la expresión de CD1 al utilizar distintas cepas probióticas en MDCC de humano, sin embargo por la variabilidad de los resultados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

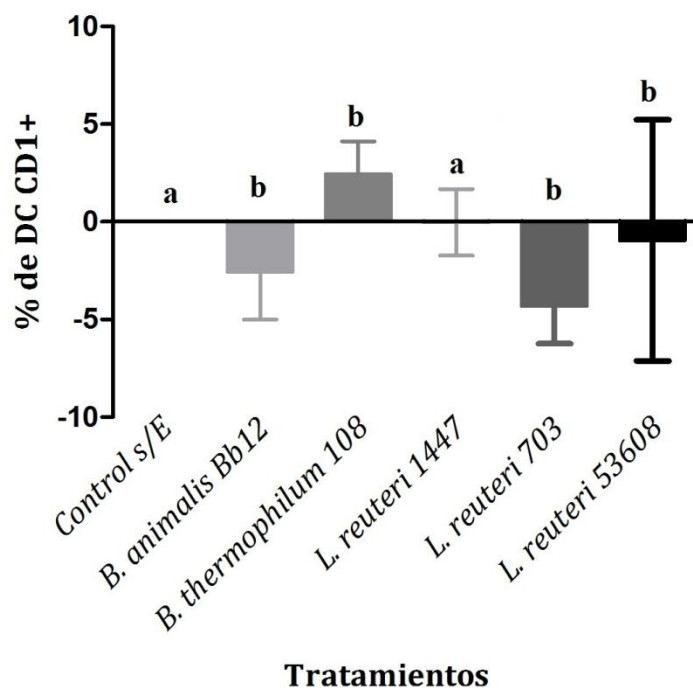


Figura 8. Diferencias del porcentaje de células dendríticas CD1+ con respecto al control sin estímulo. Los porcentajes fueron determinados por citometría de flujo. Las DC fueron estimuladas por 12 h y se recolectaron para analizar la expresión de CD1 inducido por los distintos tratamientos. Los gráficos representan la media y el SEM de una $n=4$. Para determinar diferencias entre tratamientos se utilizó Fisher-LSD, ($p < 0.05$).

Se han descrito subpoblaciones CD1+ de DC de sangre periférica de cerdo, en las cuales la expresión de CD1 implica una mayor expresión de MHC-II, CD80/86 (Summerfield et al., 2003), sin embargo nuestros resultados no concuerdan con estos antecedentes, lo que indica que en DC de ganglios mesentéricos esta subpoblación es distinta. Aunque estos

resultados también podrían estar relacionados con la maduración, también se ha reportado que células dendríticas derivadas de monocitos de humano inmaduras expresan altos niveles de CD1 (Leslie et al., 2002).

En la Figura 9 se muestran las gráficas del porcentaje de células CD1+ ante el reto con el patógeno, el inóculo de control con solo *Salmonella choleraesuis* muestra una disminución en el porcentaje de células CD1+, pero no se encontró diferencia significativa al inocular con *Salmonella choleraesuis* en las células previamente estimuladas con probióticos ni con respecto al control con solo *S. choleraesuis*, sin embargo se puede observar que la cepa *B. thermophilum* 108 no tiene efecto en la disminución del porcentaje de células CD1+, por lo que se podría pensar en una menor capacidad de esta con respecto a las demás cepas de inducir la maduración de DC.

CD163. Se evaluó la expresión de la molécula CD163 sobre las células SWC3+, esta molécula es exclusiva de células de linaje monocito/macrófago, específicamente macrófagos y células dendríticas de tejido (Chamorro et al., 2005), la gráfica del efecto de los probióticos sobre la expresión de CD163 (Figura 10), indica que los tratamientos con *B. animalis* Bb12 y *L. reuteri* 703 no mostraron efecto significativo con respecto al control, mientras que las cepas *B. thermophilum* 108, *L. reuteri* 1447 y *L. reuteri* ATCC 53608 mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

La molécula CD163 está implicada en la presentación del antígeno, Chamorro y colaboradores (2004) reportaron que DC derivadas de monocitos CD163+ son más eficientes en la presentación de antígeno que las CD163-, además de expresar altos niveles de MHC-II y CD80/86.

Al inocular las células solo con *S. choleraesuis* se puede observar un incremento en el porcentaje de expresión de la molécula, este comportamiento fue similar a estudios previos donde se trató a los monocitos de sangre periférica de cerdo con lipopolisacárido (Hintz et al., 2002).

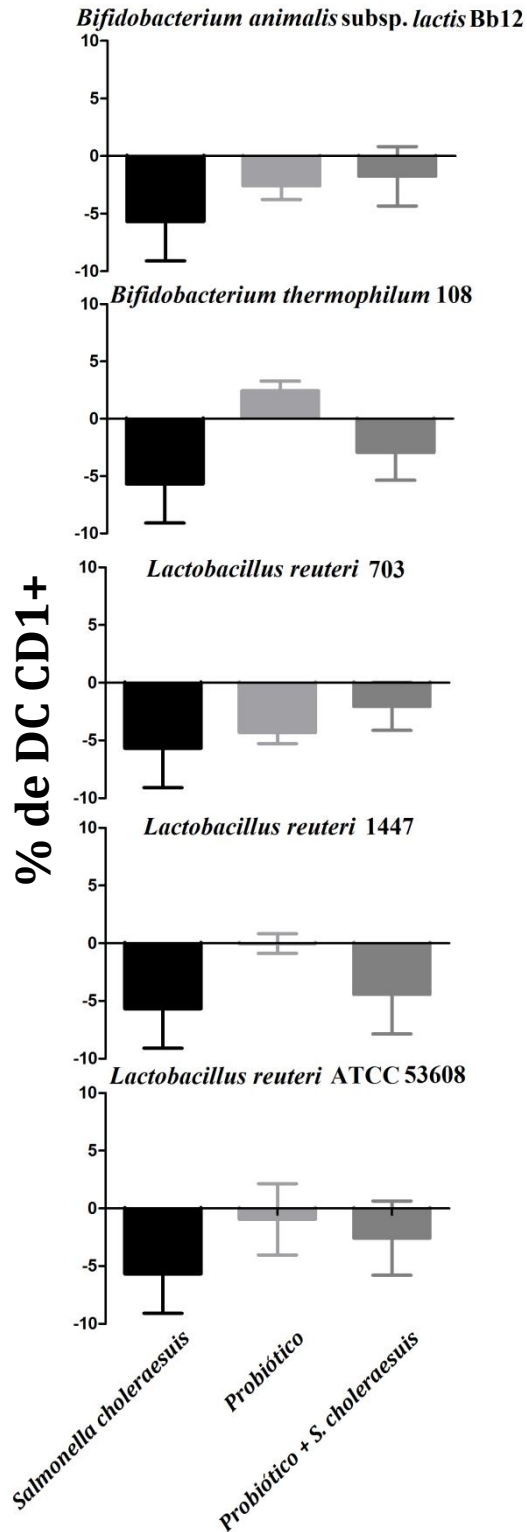


Figura 9. Diferencia de porcentajes de células dendríticas de ganglios mesentéricos CD1+, estimuladas con probióticos y retadas con *Salmonella choleraesuis* con respecto al control sin estímulo. Los gráficos representan las medias y el SEM (n=4) del porcentaje inducido por los distintos tratamientos y el comportamiento ante el reto con *S. choleraesuis*. Para determinar diferencias se utilizó Fisher LSD, (p<0.05).

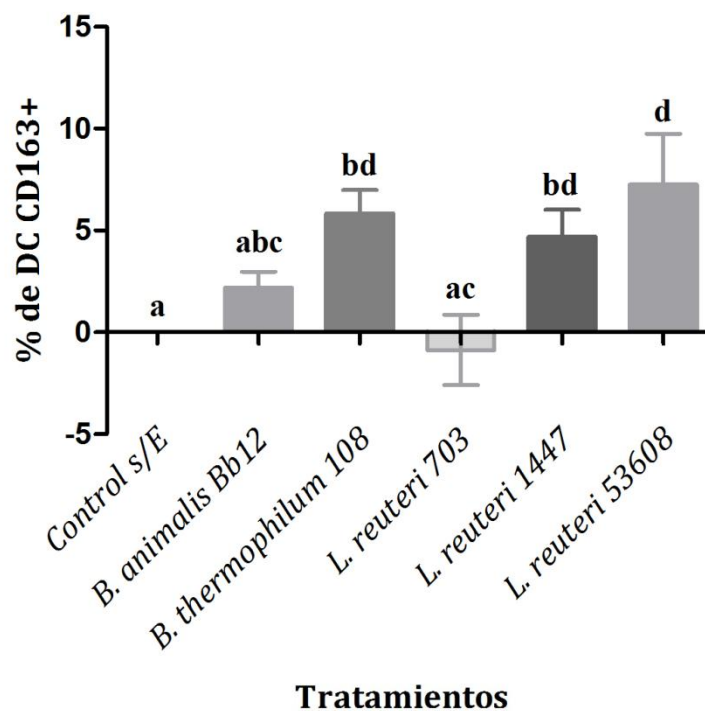


Figura 10. Diferencias del porcentaje de células dendríticas CD163+ con respecto al control sin estímulo. Los porcentajes fueron determinados por citometría de flujo. Las DC fueron estimuladas por 12 h y se recolectaron para analizar la expresión de CD163 inducido por los distintos tratamientos. Los gráficos representan la media y el SEM de una n=3. Para determinar diferencias entre tratamientos se utilizó Fisher-LSD, ($p < 0.05$).

Tras la adición de *Salmonella choleraesuis*, en todos los tratamientos a excepción de *B. thermophilum* 108 se encontró efecto significativo con respecto al control con solo *S. choleraesuis*, sin embargo, se buscaron diferencias entre células con solo probiótico y células con probiótico e infección. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos con *B. animalis* Bb12 y *L. reuteri* 1447. Se observó que al retar las células tratadas con estos probióticos el porcentaje de CD163+ disminuyó. Como se puede observar el comportamiento ante *S. choleraesuis* de las cepas es muy variable (Figura 11), contrario a esto, la cepa *L. reuteri* 53608 induce un incremento de CD163+, esto puede deberse a los distintos perfiles de citocinas inducidos por estas bacterias. La molécula CD163 tiene un papel importante en la respuesta inflamatoria y en la respuesta a bacterias, su expresión es modulada por las citocinas de su ambiente.

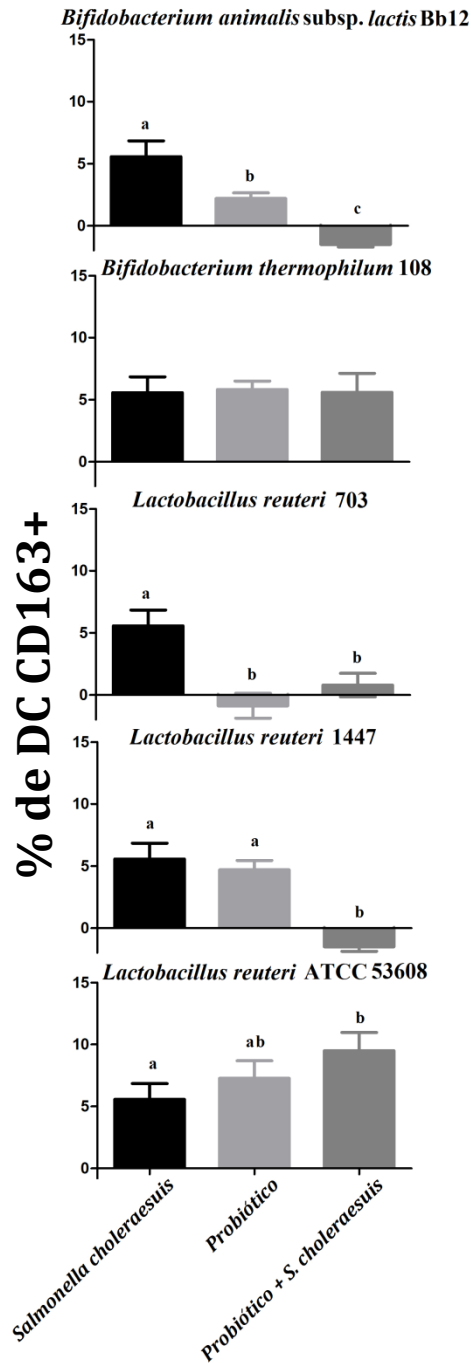


Figura 11. Diferencia de porcentajes de células dendríticas de ganglios mesentéricos CD163+, estimuladas con probióticos y retadas con *Salmonella choleraesuis* con respecto al control sin estímulo. Los gráficos representan las medias y el SEM (n=3) del porcentaje inducido por los distintos tratamientos y el comportamiento ante el reto con *S. choleraesuis*. Para determinar diferencias se utilizó Fisher LSD, (p<0.05).

Citocinas como IFN- γ y TNF- α suprimen CD163 mientras que IL-6 e IL-10 inducen la expresión de CD163 (Buechler et al., 2000), además de estar involucrados receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés) (Weaver et al., 2007).

Se puede observar como el tratamiento con *L. reuteri* 53608 induce mayor porcentaje de DC CD163+ ante la presencia de *S. choleraesuis*, esto puede estar relacionado con la eficiencia en la presentación de antígeno, ya que esta misma cepa tuvo el mismo comportamiento sobre el porcentaje de DC MHC-II+.

Cuantificación de Citocinas por el Método ELISA

Además de la evaluación de las moléculas de membrana se analizó por el método de ELISA si los tratamientos probióticos inducen la producción de citocinas, se evaluó la producción de IL-10 e IFN- γ , ya que a través del perfil de citocinas se podría conocer acerca de la polarización de la respuesta celular.

La Figura 12 muestra las gráficas de la cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo de DC estimuladas con las distintas cepas probióticas y además ante el reto con *Salmonella choleraesuis*. No se detectó producción de IFN- γ , con ninguna de las cepas probadas. Mata-Haro y colaboradores (2010), evaluaron la producción relativa de citocinas por medición de transcritos por RT-qPCR a las 72 h de estimulación y se encontró producción de IFN- γ por la cepa *B. thermophilum* 108. Estas diferencias entre los resultados se pueden atribuir a los distintos tiempos en los que se realizó el muestreo, ya que en este estudio el estímulo fue por 12 h. La cepa *B. animalis* Bb12 fue la única cepa que indujo significativamente producción de IL-10 ($p < 0.05$). Esto concuerda con lo reportado por Zeuthen y colaboradores (2006) donde esta cepa induce producción de IL-10 en MDDC de sangre periférica humana.

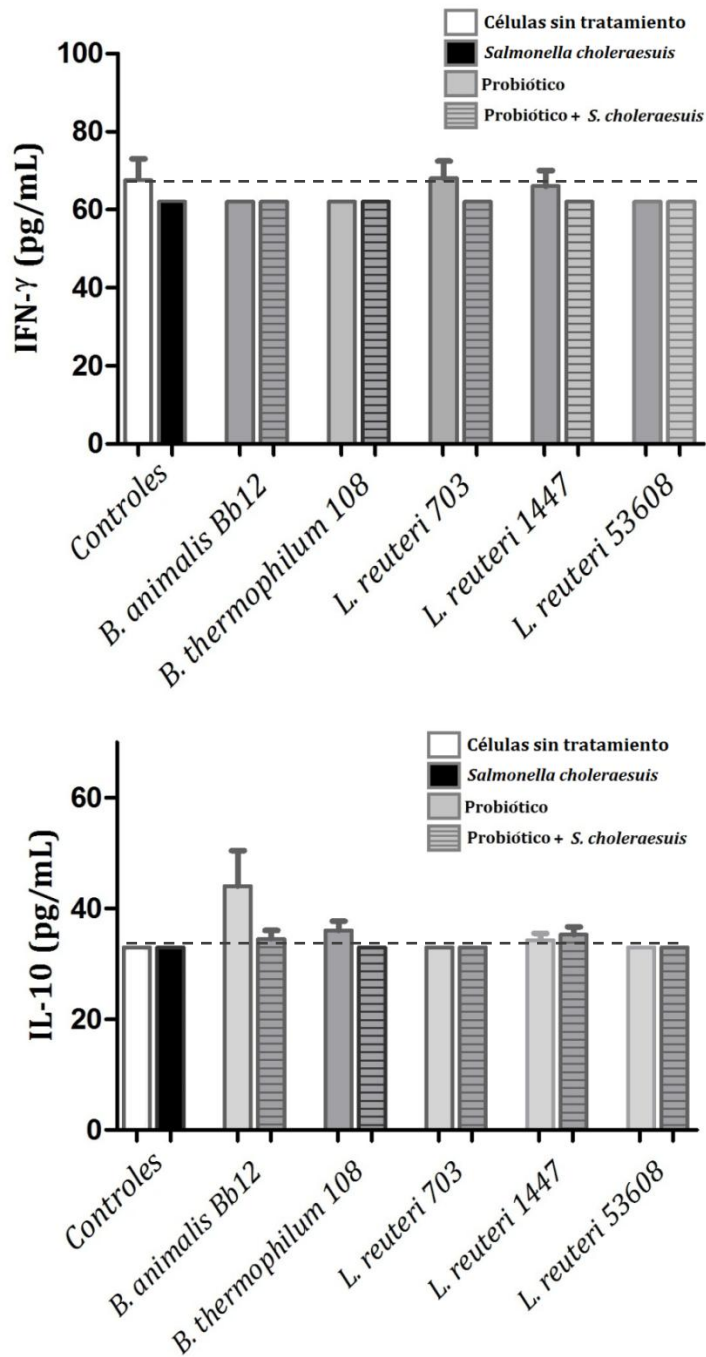


Figura 12. Cuantificación de IL-10 e IFN- γ en sobrenadantes de cultivos. Las DC fueron estimuladas por 12 h con el probiótico e inoculadas con *Salmonella choleraesuis* por 12 h se recolectaron y se analizaron por ELISA. Los gráficos muestran las medias y el SEM de una n=4. Se buscaron diferencias estadísticas por el método de Fisher-LSD, ($p < 0.05$).

En resumen, son muchos los factores que intervienen en la respuesta inmunológica ante un patógeno, no podemos establecer el tipo de respuesta que se obtiene al realizar un reto con *Salmonella choleraesuis*, ya que intervienen otras citocinas, que no se analizaron en este estudio; proteínas del medio, la interacción con las células epiteliales del intestino, etcétera. Es importante tomar en cuenta el origen celular del experimento, los resultados obtenidos no pueden ser similares a estudios realizados en DC de otros orígenes; derivadas de monocito de sangre periférica humana principalmente. Las DC que migran a ganglios mesentéricos se originan primordialmente en lámina propia, son células que contribuyen a la presentación de antígeno para la inducción a la tolerancia oral. Se plantea que las funciones estimuladoras fueron moduladas por microorganismos ya que se ha observado una menor capacidad estimuladora en DC de ganglios mesentéricos de ratones libres de gérmenes (Stagg et al., 2007).

Evidentemente el utilizar microorganismos probióticos beneficia la respuesta ante microorganismos patógenos. En este trabajo pudimos observar los cambios en las células a nivel inmunológico inducidos por bacterias probióticas y su comportamiento ante la presencia de un patógeno, indudablemente este efecto benéfico en el sistema inmunológico se debe a estas capacidades de inducir o inhibir la expresión o supresión de distintas proteínas en las células, con el fin de conservar el sistema inmunológico alerta y mantener un balance entre señales pro y anti-inflamatorias, dado que al presentarse una amenaza el sistema pueda responder adecuadamente.

CONCLUSIÓN

La estimulación de DC de ganglios mesentéricos con *L. reuteri* ATCC 53608, podría combatir la infección ante *S. choleraesuis* modulando la respuesta inmunológica, llevando a cabo una correcta presentación de antígeno y por lo tanto obtener una respuesta adaptativa efectiva. El tratamiento con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 podría inducir una respuesta anti-inflamatoria, lo que ayudaría la regulación de la inflamación, como la que podría presentarse en una infección.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. 2008. *Inmunología celular y molecular*. Sexta Edicion. Elsevier; Madrid:España.
- Abrahamsson TR, Jakobsson T, Böttcher MF, Fredrikson M, Jenmalm MC, Björkstén B, Oldaeus G. 2007. Probiotics in prevention of IgE associated eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 119:1174–1180.
- Archambaud C, Nahori MA, Soubigou G, Becavin C, Laval L, Lechat P, Smokvina T, Langella P, Lecuit M, Cossart P. 2012. Impact of lactobacilli on orally acquired listeriosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 109:16684-9.
- Aso Y, Akazan H. 1992. Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. *Urology International*; 49:125–129.
- Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*; 392: 245-252.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. 2000. *Immunobiology of Dendritic Cells*. *The Annual Review of Immunology*; 18:767-811.
- Berends BR, Urlings HA, Snijders JM, Van Knapen F. 1996. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *International Journal of Food Microbiology*; 30: 37–53.
- Bimczok D, Sowa EN, Faber-Zuschratter H, Pabst R, Rothkotter HJ. 2005. Site-specific expression of CD11b and SIRPalpha (CD172a) on dendritic cells: implications for their migration patterns in the gut immune system. *European Journal of Immunology*; 35:1418–1427.
- Blomberg L, Henriksson A, Conway PL. 1993. Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus spp*; *Applied and Environmental Microbiology*; 59:34-39.
- Borchers A, Selmi C, Meyers F, Keen C, Gershwin E. 2009. Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology*; 44:26–46.
- Bradley WL, Mysliwiec TH, Gourama H. 2005. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbiology*; 22:199-204.

- Brent G. 2000. *Manejo de los lechones en producción porcina*. Primera edición. Manual moderno; DF:México.
- Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. 2000. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *Journal of Leukocyte Biology*; 67:97-103
- Chamorro S, Revilla C, Gómez N, Álvarez B, Alonso F., Ezquerro A, Domínguez J. 2004. In vitro differentiation of porcine blood CD163- and CD163+ monocytes into functional dendritic cells, *Immunobiology*; 209:57–65.
- Chamorro S, Revilla C, Álvarez B., Alonso F, Ezquerro A, Dominguez J. 2005. Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation. *Immunology*; 114:63–71.
- Coomes JL, Powrie F. 2008. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature Reviews Immunology*; 8:435 - 446.
- Corrêa NB, Peret LA, Penna FJ, Lima FM, Nicoli JR. 2005. A randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. *Journal of Clinical Gastroenterology*; 39:385-389.
- Cunha BA. 2000. Antibiotic Resistance. *Medical Clinics of North America*; 84:1407-1429.
- De Moreno de LeBlanc A, Matar C, Perdigon G. 2007. The application of probiotics in cancer. *British Journal of Nutrition*; 9:105–110.
- Duffy LC, Zielesny MA, Riepenhoff-Talty M, Drija D, Sayahtheri-Altai S, Griffiths E, Ruffin D, Barrett H, Ogra PL. 1994. Reduction of virus shedding by *B. bifidum* in experimentally induced MRV infection. *Digestive Diseases and Sciences*; 39:2334–2340.
- Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkam GF, Buchholz VR, Trumfheller C, Yamazaki S, Cheong C, Lui K, Lee HW, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC. 2007. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science*; 315:107-11.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada.
- Fink LN, Zeuthen LH, Ferlazzo G, Frøkiær H. 2007. Human antigen presenting cells respond differently to gut-derived probiotic bacteria but mediate similar strain-dependent NK and T cell activation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*; 51:535–46.
- Foligne B, Zoumpoulou G, Dewulf J, Ben Younes A, Chareyre F, Sirard JC, Pot B, Grangette C. 2007. A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *Public library of Science One*; 2:313.
- Forsythe P, Inman MD, Bienenstock J. 2007. Oral treatment with live *Lactobacillus reuteri* inhibits the allergic airway response in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 175:561–569.

- Gilliland SE, Walker DK. 1989. Factor to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *Journal of Dairy Science*; 73:905-911.
- Gomes M, Malcata F. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*; 10:139-157.
- Hammad H, Lambrecht BN. 2008. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nature Reviews Immunology*; 8:193-204.
- Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA, Knight SC, Stagg AJ. 2004. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*; 53:1602-1609.
- Haverson K, Bailey M, Stokes CR, Simon A, LeFlufy L, Banfield G, Chen Z, Hollemweguer E, Ledbetter JA. 2001. Monoclonal antibodies raised to human cells—specificity for pig leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 80:175–186.
- Haverson K, Singha S, Stokes CR, Bailey M. 2001. Professional and non-professional antigen-presenting cells in the porcine small intestine. *Immunology*; 101:492–500.
- Hintz KA, Rassias AJ, Wardwell K, Moss ML, Morganelli PM, Pioli PA, Givan AL, Wallace PK, Yeager MP, Guyre PM. 2002. Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163. *Journal of Leukocyte Biology*; 72:711-717
- Hintze J. 2009. NCSS. NCSS, LLC.
- Ibnou N, Blum S, Schiffrin EJ, Von der Weid T. 2003. Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties in vitro. *Infection and Immunity*; 71:428-436.
- Iwabuchi N, Takahashi N, Xiao J, Miyaji K, Iwatsuki K. 2007. In vitro Th1 cytokine-independent Th2 suppressive effects of bifidobacteria. *Microbiology and Immunology*; 51:649-660.
- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. 2001. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. Quinta edicion. Garland Science; New York:USA.
- Jack RW, Tagg JR, Ray B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*; 59:171-200.
- Jin LZ, Marquardt RR, Zhao X. 2000. A Strain of *Enterococcus faecium* (18C23) Inhibits adhesion of Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Applied and Environmental Microbiology*; 6:4200-4204.
- Kabir AM, Aiba Y, Takagi A, Kamiya S, Miwa T, Koga Y. 1997. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut*; 41: 49–55.

- Kailasapathy K, Chin J, 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunology and Cell Biology*; 78: 80-88.
- Kapsenberg ML. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews Immunology*; 3:984-993.
- Kato I, Yokokura T, Mutai M. 1984. Augmentation of mouse natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* and its surface antigens. *Microbiology and Immunology*; 28:209-17.
- Kowal K, Silver R, Slawinska E, Bieleck M, Chyczewski L, Kowal-Bielecka O. 2011. CD163 and its role in inflammation. *Folia Histochemica et Cytobiologica*; 49: 365-374.
- Le Blay G, Michel C, Blottiere HM, Cherbur C. 1999. Prolonged intake of fructooligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. *Journal of Nutrition*; 129:2231-2235.
- Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, Tough DF. 2001. Type I Interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity*; 14:461-470.
- Lee YJ, Salminen S. 1995. The coming age of probiotic. *Trends in food Science and Technology*; 6:241-245.
- Leslie DS, Vincent MS, Spada FM, Das H, Sugita M, Morita CT, Brenner MB. 2002. CD1-mediated γ/δ T cell maturation of Dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*; 12:1575-1584.
- Letellier A, Messier S, Lessard L, Chenier S, Quessy S, 2001. Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine. *The Canadian Journal of Veterinary research*; 65:168-172.
- Lima ET, Andreatti RL, Okamoto AS, Noujaim JC, Barros MR, Crocci AJ. 2007. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus spp.* isolated from chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research*; 7:103-107.
- Littman DR, Pamer EG. 2011. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell Host & Microbe*; 10:311-323.
- Ljung A, Wadström T. 2006. Lactic acid bacteria as probiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*; 7:73-89.
- López P, Gueimonde M, Margolles A, Suarez A. 2010. Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses in vitro. *International Journal of Food Microbiology*; 138:157-165.
- Maldonado R, Moser M. 2001. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Seminars in Immunology*; 13:275-282.

- Mallon P, McKay D, Kirk S, Gardiner K. 2007. Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*; 4:CD005573.
- Mata-Haro V, Reséndiz-Sandoval M, Pérez-Morales R, López-Robles MG, Hernández J. 2010. Expresión de citocinas inducidas por probióticos en células dendríticas de cerdo. *IX congreso Nacional de inmunología*; Presentación de cartel.
- Mattar AF, Teitelbaum DH, Drongowski RA, Yongyi F, Harmon CM, Coran AG. 2002. Probiotics upregulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatric Surgery International*; 18:586-590.
- Mayo B, van Sinderen D. 2010. *Bifidobacteria: Genomics and molecular aspects*. Primera edición. Caister Academic Press; Norfolk:UK.
- Michel V, Martley FG. 2001. *Streptococcus thermophilus* in Cheddar cheese –production and fate of galactose. *Journal of Dairy Research*; 68:317-325.
- Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, Ruthel G, Demmin GL, Warfield KL, Bavari S, Klaenhammer TR. 2005. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 102: 2880-2885.
- Morrison DJ, Mackay WG, Edwards CA, Preston T, Bodson B, Weaver LT. 2006. Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora. *British Journal of Nutrition*; 96:570-577.
- Niers LEM, Hoekstra MO, Timmerman HM, van Uden NO, de Graaf PMA, Smits HH, Kimpen JLL, Rijkers GT. 2007. Selection of probiotic bacteria for prevention of allergic diseases: immunomodulation of neonatal dendritic cells. *Clinical and Experimental Immunology*; 149:344-352.
- Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P, Taylor DN, Black RE, Cabrera L, Lescano AG, Meza R, Madico G. 1999. A placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *Journal of Pediatrics*; 134:15-20.
- O'Hagan DT, Valiante NM. 2003. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*; 2:727-735.
- O'Mahony L, O'Callaghan L, McCarthy J, Shilling D, Scully P, Sibartie S, Kanavagh E, Kirwan WO, Redmond HP, Collins JK, Shanahan F. 2006. Differential cytokine response from dendritic cells to commensal and pathogenic bacteria in different lymphoid compartments in humans. *American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology*; 290:839-45.
- Parham P. 2006. *Inmunología*. Segunda edición. Medica panamericana; Buenos Aires:Argentina.
- Park JH, Um JI, Lee BJ, Goh JS, Park SY, Kim WS, Kim PH. 2002. Encapsulated *Bifidobacterium bifidum* potentiates intestinal IgA production. *Cellular Immunology*; 219:22-27.

- Perdigón G, de Macías ME, Álvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AP. 1986. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infection and Immunity*; 53:404–410.
- Perdigón G, de Macías ME, Álvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AP. 1998. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology*; 63:17–23.
- Peters SM, Yancy H, Deaver C, Jones YL, Kenyon E, Chiesa OA, Esparza J, Screven R, Lancaster V, Stubbs JT 3rd, Yang M, Wiesenfeld PL, Myers MJ. 2012. In vivo characterization of inflammatory biomarkers in swine and the impact of flunixin meglumine administration. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 148:236–42.
- Piriou-Guzylack L, Salmon H. 2008. Membrane markers of the immune cells in swine: an update. *Veterinary Research*; 39:54.
- Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sanchez S. 2008. Migration of Dendritic Cell Subsets and their Precursors. *Annual Review of Immunology*; 26:293–316.
- Sanders ME. 1993. Summary of conclusions from a consensus panel of experts on health attributes of lactic cultures: significance to fluid milk products containing cultures. *Journal of Dairy Science*; 76:1819–1828.
- Savagodo A, Ouattara C, Bassole I, Traore A. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. *African Journal of Biotechnology*; 5:678–83.
- Schiefner A, Wilson IA. 2009. Presentation of lipid antigens by CD1 glycoproteins. *Current Pharmaceutical Design*; 15:3311–3317.
- Sheu BS, Wu JJ, Lo CY, Wu HW, Chen JH, Lin YS, Lin MD. 2002. Impact of supplement with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yogurt on triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*; 16:1669–1675.
- Shiba T, Aiba Y, Ishikawa H, Ushiyama A, Takagi A, Mine T, Koga Y. 2003. The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacteroides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. *Microbiology and Immunology*; 47: 371–378.
- Smith CM, Wilson NS, Waithman J, Villadangos JA, Carbone FR, Heath WR, Belz GT. 2004. Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nature Immunology*; 5:1143–1148.
- Sinkora M, Sinkorova J, Butler JE. 2002. B cell development and VDJ rearrangement in the fetal pig. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 87:341–346.
- Straw BD, Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. 1999. Enfermedades del cerdo. Octava edición. Inter-Médica; Bogotá:Colombia.
- Summerfield A, Guzylack-Piriou L, Schaub A, Carrasco CP, Tache V, Charley B, McCullough KC. 2003. Porcine peripheral blood dendritic cells and natural interferon-producing cells. *Immunology*; 110:440–449.

- Stagg AJ, Norin KE, Midtvedt T, Kamm MA, Knight SC, Björkstén B. 2007. Mucosal dendritic cells from germ-free mice cause less T-cell stimulation but still induce $\alpha 4\beta 7$ integrin. *Microbial Ecology in Health and Disease*; 19:171-183.
- Szajewska H, Mrukowicz JC. 2001. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Journal of Pediatrics Gastroenterology and Nutrition*; 33:17-25.
- Thomas CM, Versalovic J. 2010. Probiotics-host communication modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes*; 1:148-163
- Vicente JL, Aviña L, Torres A, Hargis B, Tellez G. 2007. Effect of a *Lactobacillus Spp*-based probiotic culture product on broiler chicks performance under commercial conditions. *International Journal of Poultry Science*; 6:154-156.
- Weaver LK, Pioli PA, Wardwell K, Vogel SN, Guyre PM. 2007. Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors. *Journal of Leukocyte Biology*; 81:663-671.
- Weigmann B, Tubbe I, Seidel D, Nicolaev A, Becker C, Neurath M. 2007. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nature*; 2:2307-11.
- Willing B, Gill N, Finlay B. 2010. The role of the immune system in regulating the microbiota. *Gut Microbes*; 1:1-11.
- Zeuthen LH, Christensen HR, Frøkiær H. 2006. Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with Gram-negative bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology*; 13:365-75.
- Zigra PI, Maipa VE, Alamanos YP. 2007. Probiotics and remission of ulcerative colitis: a systematic review. *Netherlands Journal of Medicine*; 65:411-418.