



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

**EXPRESIÓN Y PRODUCCIÓN DE IL-10 EN CÉLULAS
MONONUCLEARES DE CERDO ESTIMULADAS CON
PROBIÓTICOS CULTIVADOS CON PREBIÓTICOS**

Por:

PABLO MARTÍNEZ LARA

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN 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 Pablo Martínez Lara, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestría en ciencias.



Dra. Verónica Mata Haro
Directora de Tesis



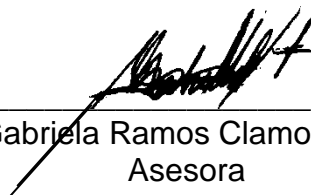
Dra. Ana María Calderón de la Barca
Asesora



Dr. Jesús Hernández López
Asesor



Dr. Adrián Hernández Mendoza
Asesor



Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort
Asesora

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

El primer agradecimiento es a CONACyT por el apoyo prestado durante el posgrado.

El segundo agradecimiento es para el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por aceptarme y permitirme realizar mis estudios así como a la Coordinación de Ciencias de los Alimentos.

El tercer agradecimiento es para el proyecto del CONACyT: CB-2008-01-105575 que financió este trabajo.

A mi directora de tesis, la Dra. Verónica Mata Haro por haberme abierto las puertas de su laboratorio y a su equipo de trabajo, su apoyo, paciencia y conocimientos para que ésta etapa de mi vida finalizara.

A los M.C. Leticia Félix, Marina Arenas y Anna González por su gran ayuda durante todo el proyecto hasta su conclusión.

A mis amigos Jorge Luis, Rogelio, Darío, Exiquio, Yolanda, Daniel, Arturo, Marlen y Lizeth por su apoyo brindado.

A mis compañeros de trabajo Alexis, Omar, Bernal, David, Bianca, Vladimir, Eduardo y mi supervisor Erick por su apoyo y sus burlas brindadas durante estos últimos meses.

A mi familia, en especial a mi madre Teresa y a mi tía Soledad que me han brindado apoyo incondicionalmente en todos los sentidos desde la licenciatura.

Para aquella persona que logró ser parte de esto y me brindó las fuerzas necesarias para terminar lo ya empezado.

DEDICATORIA

A Dios principalmente, sin Él no sería posible absolutamente nada.

A mi abuela, Josefina Ruiz Duarte y mi abuelo, Don Bernabé Lara Valenzuela quienes sé que desde el cielo me cuidan y se sienten orgullosos de ver en lo que me estoy convirtiendo.

Finalmente a mi primo, Bernabé de Jesús Lara Herrera que Dios le dió el llamado inesperadamente, mi primo, mi hermano, mi modelo a seguir.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. Probióticos como Herramienta Alternativa en el Mejoramiento de la Salud	3
II.1.1. Mecanismos de Acción de los Probióticos	4
II.1.2. <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb12	5
II.1.3. <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	6
II.2. Prebióticos	7
II.2.1. Uso de Prebióticos en la Modulación Inmunológica	8
II.3. Sinbióticos	9
II.4. Sistema Inmunológico	10
II.4.1. Estrategias de Inmunomodulación de los Probióticos	11
II.5. Receptores Tipo Toll (TLR)	12
II.5.1. Características y Funciones del Receptor TLR2	13
II.5.2. Interleucina 10	14
III. HIPÓTESIS	17
IV. OBJETIVO GENERAL	18
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	20
VI.1. Cepas Bacterianas y Oligosacáridos	20
VI.2. Curva de Crecimiento de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb12 y <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	21
VI.3. Animales de Experimentación	21
VI.4. Obtención de Células Mononucleares de Sangre Periférica de Cerdo	21
VI.5. Interacción Células – Probióticos	22
VI.6. Extracción de ARN Total	23
VI.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-qPCR) de IL-10	23
VI.8. Cuantificación de Citocinas por ELISA	24
VI.9. Análisis de los Datos	24

Contenido (continuación)

	Página
VII. RESULTADOS Y DISCUSION	26
VII.1. Curva de Crecimiento de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb12 y <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 Biogaia.....	26
VII.2. Cuantificación de IL-10 por ELISA.....	27
VII.3. Expresión de ARNm de IL-10 por RT-qPCR	29
VIII. CONCLUSIÓN	32
BIBLIOGRAFÍA	33

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de algunos oligosacáridos prebióticos	8
2. Expresión de IL-10 inducida por distintas vías de señalización	15
3. Esquema de la obtención de CMN	22
4. Curva de crecimiento de los probióticos <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> y <i>L. reuteri</i> DSM 17938	27
5. Cuantificación de IL-10 en sobrenadante de cultivo celular de 24 h	28
6. Expresión de ARNm de IL-10 en cultivo de CMN por 8 h	30

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Ejemplo de cepas probióticas que modulan diferencialmente citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.	12

RESUMEN

Los probióticos inducen efectos benéficos en quien los consume, siendo uno de los más importantes la modulación de la respuesta inmune. En humanos, los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son los más representativos, que con ayuda de los prebióticos (oligosacáridos) mejoran su efecto en procesos inflamatorios. Se ha observado que en conjunto pueden estimular la producción de IL-10 en células del sistema inmune como lo son las células mononucleares (CMN). El objetivo de la tesis fue evaluar la expresión del ARNm de IL-10 y la producción de la proteína en CMN de sangre periférica de cerdo estimuladas con los probióticos *Lactobacillus reuteri* 17938 (Biogaia) o *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (Bb12) cultivados previamente en un medio sin y con inulina u oligofruktosa con la finalidad de demostrar si los prebióticos inducen cambios en la producción de IL-10 sin interactuar directamente con las CMN. Se evaluó la concentración de IL-10 por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y la expresión de su transcrito ARNm mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). Después de 24 h de estímulo con la cepa Bb12, las CMN aumentaron significativamente ($p < 0.05$) la producción de IL-10, independientemente de la presencia de inulina u oligofruktosa previo al estímulo. Sin embargo, la mayor producción de IL-10 la indujo la cepa Biogaia cultivada en presencia de oligofruktosa, en comparación a células sin tratamiento (SE). Se encontró un aumento significativo ($p < 0.05$) en la expresión de ARNm de IL-10 de las CMN inducida por ambos probióticos previamente cultivados en presencia de glucosa e inulina, con respecto a la expresión cuando no hubo carbohidratos. En conclusión, la incubación de prebióticos no afectó la capacidad de Bb12 de producir IL-10 en CMN de sangre periférica de cerdo; pero sí influyó positivamente en la de Biogaia. Así, la producción de IL-10 por probióticos no solamente es cepa específica si no que depende de la presencia de los prebióticos en su desarrollo.

Palabras clave: Probióticos, Prebióticos, CMN, IL-10, sistema inmune

ABSTRACT

Probiotics induce beneficial effects in the consumer, being the most important the modulation of the immune response. In humans, the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are the most representative, and using them in combination with prebiotics (oligosaccharides) improve their effect in the alleviation of inflammatory processes. It has been observed, altogether can stimulate the production of IL-10 en peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The objective of this thesis was to evaluate mRNA expression and protein production of IL-10 on pig's PBMCs stimulated by the probiotics *Lactobacillus reuteri* 17938 (Biogaia) or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (Bb12) grown without and with inulin or oligofructose in the culture medium. The purpose of the study was to demonstrate if prebiotics induce changes in the IL-10 production without directly interacting with PBMCs. IL-10 concentration was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the expression of mRNA by quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). After 24 h of stimulation with strain Bb12, PBMCs significantly increase ($p < 0.05$) the production of IL-10, regardless of the presence of inulin or oligofructose before to stimuli. However, Biogaia grown in the presence of oligofructose induced the most production of IL-10, as compared to untreated PMBCs (SE), Significant differences ($p < 0.05$) were found in the expression of IL-10 mRNA in PMBCs induced by both probiotics when they were previously cultured with inulin and glucose compared to those from bacteria grown without carbohydrates. In conclusion, incubation of prebiotics does not affect the ability of Bb12 to produce IL-10 in pig's PBMCs; but it positively influenced Biogaia. Thus, the production of IL-10 by probiotics is not only strain-specific but it also depends on the presence of prebiotic in its development.

Keywords: Probiotics, Prebiotics, PBMC, IL-10, immune system

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente hay un gran interés científico y comercial en el uso de probióticos debido a la variedad de sus efectos benéficos. Son capaces de recuperar la microbiota intestinal y de combatir y prevenir infecciones producidas por patógenos. Uno de los efectos más importantes atribuidos a los probióticos es su habilidad para modular la respuesta inmunológica (Hill *et al.*, 2014), probada en diversos modelos animales (Villena *et al.*, 2012; Hardy *et al.*, 2013).

Por su parte, los prebióticos son componentes dietarios no digeribles que afectan benéficamente al hospedero estimulando selectivamente el crecimiento y la actividad de una o más especies de bacterias en el tracto gastrointestinal (TGI), mejorando la salud del hospedero (Pineiro *et al.*, 2008). Los prebióticos se utilizan como fuente de alimento beneficiando el crecimiento de los probióticos sobre otras bacterias (Svensson y Hakansson, 2014).

En los últimos años se ha estudiado el uso de sinbióticos, que son las mezclas de uno o más prebióticos con uno o más probióticos. Estas combinaciones puede no solo producir un estímulo benéfico para el hospedero si no mejorar el estímulo ya realizado por los factores de manera individual (Grimoud *et al.*, 2010). Se ha asociado el uso de sinbióticos para disminuir procesos de origen inflamatorio polarizando la concentración de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y disminuyendo otras de origen pro-inflamatorio (Osman *et al.*, 2006). Los géneros de probióticos mas estudiados en conjunto con prebióticos son *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Guarner y Malagelada, 2003).

La industria porcina se ha beneficiado utilizando probióticos para contrarrestar los padecimientos del tracto gastrointestinal (TGI), que afectan la

producción animal (Bazay-Dulanto, 2010). En cerdos, el uso de probióticos del género *Bifidobacterium* puede ayudar a reducir la carga bacteriana patógena y estimular el sistema inmune para combatir la infección. Herfel *et al.*, (2013) demostraron que *B. longum* aumentaba la expresión de interleucina 10 (IL-10), asociada a procesos anti-inflamatorios, en el TGI de lechones. Por su parte, el uso de prebióticos como la inulina aumenta la carga probiótica y reduce la concentración de bacterias patógenas en el TGI de lechones. Esto ayuda a dichos animales contra procesos inflamatorios (Patterson, *et al.*, 2010).

En nuestro grupo de trabajo se ha visto el incremento en la expresión y producción de IL-10 en células de ganglios mesentéricos de cerdo estimuladas únicamente con probióticos (Duarte-Gutiérrez, 2015). Por tal motivo en este estudio se evaluó el uso de prebióticos en la búsqueda por mejorar el efecto de los probióticos *Lactobacillus reuteri* 17938 y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 en la producción y expresión de IL-10 en células mononucleares de sangre periférica de cerdo.

II. ANTECEDENTES

II.1. Probióticos como Herramienta Alterna en el Mejoramiento de la Salud

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio significativo en la salud del hospedero (FAO, 2006). Por esto, hay un gran interés científico y comercial en su uso.

Los probióticos han sido seleccionados como posibles reemplazos de los antibióticos actuando directamente en el tracto gastrointestinal favoreciendo el equilibrio de la microbiota intestinal cuando son incluidos en la dieta (Hardy *et al.*, 2013). Además, se han encontrado una variedad de efectos benéficos en su uso como favorecer la digestión, por sus propiedades antidiarreicas y porque previenen infecciones por patógenos transmitidos a través de los alimentos (Butel, 2014). Para que sean efectivos por administración oral, dichos microorganismos deben permanecer viables durante el procesamiento y almacenamiento, además de ser resistentes a los fluidos gastrointestinales (Favaro-Trindade *et al.*, 2011).

Los probióticos benefician al hospedero mejorando el equilibrio de su microbiota y la homeostasis intestinal (Betoret *et al.*, 2003). Dentro de las propiedades atribuidas a los probióticos se encuentra el combate a las enfermedades asociadas a patógenos, ya que compiten con estos tanto por los sitios de unión como por nutrientes así reforzando las defensas mecánicas naturales del cuerpo (Gross *et al.*, 2008; Maltby *et al.*, 2013). Al modificar la microbiota intestinal pueden fortalecer la barrera mucosa y preservar su permeabilidad selectiva, inactivar patógenos y modificar la actividad enzimática de bacterias (Öhman y Simrén, 2013; Rijkers *et al.*, 2011). Para que esto se lleve a cabo, los probióticos deben ser habitantes normales del tracto

gastrointestinal, reproducirse en un tiempo corto y no inducir patogenicidad ni toxicidad (Maurice *et al.*, 2013). Además de sobrevivir al medio ácido del estómago deben ser capaces de atravesar la barrera gástrica y tener la habilidad de adherencia para realizar su función (Candela *et al.*, 2008).

II.1.1. Mecanismos de Acción de los Probióticos

Distintos mecanismos importantes se han descrito vinculados al efecto probiótico que tienen algunos microorganismos como lo son: los mecanismos antimicrobianos, bioquímicos y de modulación inmunológica (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Dentro de los mecanismos antimicrobianos se encuentra la capacidad para producir metabolitos benéficos para el hospedero como ácidos, peróxido de hidrogeno y bacteriocinas como lactocidina y acidofilina. Estos productos presentan propiedades antibióticas e inhiben el crecimiento de un amplio espectro de patógenos como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* y *Bacteroides* (Chen y Yao, 2002). Por ejemplo las bacterias ácido-lácticas inhiben el crecimiento de organismos patógenos produciendo cadenas cortas de ácidos grasos como ácido acético, propiónico, butírico y fórmico disminuyendo el pH intestinal. El ácido láctico producido por *Bifidobacterium* en cantidades adecuadas tiene actividad antimicrobiana contra levaduras y bacterias (Butel, 2014). Además de la producción de antimicrobianos, tienen la capacidad de alterar el comportamiento metabólico de bacterias comensales (Shanahan, 2010).

En los mecanismos bioquímicos los probióticos se han asociado a la prevención de algunos tipos de cáncer. La producción de ácidos grasos de cadena corta en colon durante la fermentación por la microbiota, es el principal proceso para prevenir cáncer colorectal (Wong *et al.*, 2006). Los ácidos grasos también reducen los niveles de enzimas de la microbiota como glucuronidasa, β -glucuronidasa, que se asocian a la conversión de procarcinógenos a carcinógenos como la nitrosamina o ácidos biliares secundarios (Chen y Yao, 2002). Los probióticos también tienen la capacidad para mejorar la digestión

como es el caso de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaris* y *Streptococcus salivaris* subsp. *thermophilus* utilizados en la industria del yogurt. Ambas bacterias producen la enzima β -galactosidasa ayudando a digerir la lactosa en personas que sufren de intolerancia hacia el carbohidrato (EFSA, 2010).

Además del uso contra bacterias patógenas y digestión de nutrientes de los probióticos para combatir bacterias patógenas y digerir nutrientes, los probióticos también se utilizan para modular la respuesta inmune. Pueden reducir procesos inflamatorios estimulando la producción de la inmunoglobulina A (IgA) en mucosa para disminuir el contacto con posibles alérgenos en intestino delgado y producir tolerancia a antígenos comunes (Hardy *et al.*, 2013; Rautava *et al.*, 2006). Durante las alergias, el sistema inmune se inclina a la producción de linfocitos T cooperadores Th₂ y linfocitos B con secreción de inmunoglobulina E (IgE). La estimulación por probióticos puede invertir la vía Th₂ activando el desarrollo del fenotipo Th₁ (Von der Weid *et al.*, 2001). Su acción conduce a la producción de IgA por células B, contribuyendo a la exclusión de alérgenos y a reducir la exposición del sistema inmune a antígenos (Galdeano *et al.*, 2009; Sakai *et al.*, 2014).

Los efectos inmunomoduladores inducidos por probióticos varían entre género e incluso entre especie, por lo que no es posible hablar de características generales de inmunomodulación debido a la cepa-dependencia y a la diversidad de efectos anti-inflamatorios estimulados.

II.1.2. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* Bb12 (Bb12) es una bacteria anaeróbica estricta Gram positiva, habitante común del tracto gastrointestinal de una variedad de mamíferos, incluyendo al humano (Turroni *et al.*, 2009). Bb12 juega un papel importante en el establecimiento y regulación de la microbiota intestinal. Ayuda en la producción de vitaminas, presenta actividad anticancerígena e inmunomoduladora, induce reducción del colesterol e inhibe crecimiento de patógenos (Collado *et al.*, 2007). Además, en niños promueve la

producción de IgA en intestino ayudando a su respuesta inmunológica (Ejtahed *et al.*, 2011). También se caracteriza por su capacidad de sobrevivir a pH de 3.5 y a diferencia de otras especies de bifidobacterias, tolera bajas concentraciones de oxígeno, lo que le da ventaja de adaptación en comparación con otras especies. Bb12 es reconocido como generalmente seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Administración de Alimentos y Fármacos (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos de Norteamérica (Solano-Aguilar *et al.*, 2008).

II.1.3. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938

Lactobacillus reuteri es una bacteria Gram positiva presente en algunos mamíferos atribuyéndole distintos beneficios en su consumo (Urbanska y Szajewska, 2014). Uno de los mecanismos mejores documentados es su actividad antimicrobiana. Las cepas de *L. reuteri* producen reuterina (Talarico *et al.*, 1988), sustancia antimicrobiana de amplio espectro que es capaz de inhibir el crecimiento de una amplia gama de microorganismos gram positivos y negativos, levaduras, hongos y parásitos (Urbanska y Szajewska, 2014). La cepa *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 ha demostrado reducir significativamente los niveles de IL-8 en la mucosa intestinal de ratas. También puede disminuir la inflamación intestinal en la enterocolitis necrotizantes vía señalización del TLR4. Algunos estudios *In vivo* han comprobado la actividad antiinflamatoria de esta cepa reduciendo los niveles de citocinas proinflamatorias como lo son IL-8, IL-1 β (Jones *et al.*, 2009), TNF- α (Liu *et al.*, 2010). Al igual que otros probióticos, *L. reuteri* DSM 17938 actúa a través de diversos mecanismos para el beneficio en el trato y prevención de enfermedades en humanos y animales.

II.2. Prebióticos

Varios estudios han indicado que el uso de prebióticos puede contribuir en el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades (Hardy *et al.*, 2013; Corzo *et al.*, 2015). Los prebióticos se definen como ingredientes alimentarios no digeribles que al llegar al colon sirven de sustrato a los microorganismos estimulando el crecimiento selectivo de determinadas especies beneficiosas de la microbiota intestinal (Corzo *et al.*, 2015). El gran interés en el desarrollo de prebióticos se ha enfocado en el uso de oligosacáridos y polisacáridos no digeribles (Roberfroid, 2007).

En la actualidad existen una gran variedad de prebióticos disponibles para su uso incluyendo a los fructooligosacáridos (FOS) y los galactosacáridos. Particularmente, a los oligosacáridos y polisacáridos de algunos alimentos se les ha atribuido actividad prebiótica pero no todos los carbohidratos de la dieta son considerados como tales (Ozer *et al.*, 2005).

La inulina es un fructooligosacárido encontrado en varias plantas con un gran número de aplicaciones farmacéuticas y alimentarias (Leroy *et al.*, 2010). Debido a su resistencia para ser hidrolizada en el intestino delgado en seres humanos y otros mamíferos es considerada un polisacárido no digerible. Se encuentra constituida por moléculas de fructosa unidas por enlaces β -(2 \rightarrow 1) fructosil-fructosa (Madrigal y Sangronis, 2007) oscilando entre los 3 y 60 grados de polimerización (Van De Wiele *et al.*, 2006). En varios estudios *in vitro* e *in vivo* ha demostrado tener un papel importante en la modulación del sistema inmune de naturaleza anti-inflamatoria (Seifert y Watzl, 2007). Comúnmente se ha utilizado como prebiótico para *Lactobacillus* y *bifidobacteria* provocando el incremento en la biomasa y la disminución del pH en el colon (Akin *et al.*, 2007). En la Figura 1 se muestran las estructuras de algunos prebióticos actualmente utilizados en la industria (Domínguez-Vergara *et al.*, 2009).

La oligofructosa es un oligosacárido de fructanos que resulta de la hidrólisis enzimática de la inulina (Aliasgharzadeh *et al.*, 2015). Las enzimas digestivas de humanos y cerdos no tienen la capacidad para digerir dicho prebiótico, lo que le permite llegar al TGI donde sirve como sustrato para la

microbiota intestinal. La oligofruktosa se asocia al incremento de la carga bacteriana de *bifidobacteria* y *Lactobacillus* (Waligora-Dupriet *et al.*, 2007) permitiéndole intervenir en la inmunomodulación de procesos inflamatorios. La oligofruktosa agregada en la dieta por más de 20 días puede estimular la producción de algunos marcadores anti-inflamatorios en humanos y ratas como la IL-10 así la elevación en la expresión de TLR2 y TLR4 (Lindsay *et al.*, 2006; Shastri *et al.*, 2015). Algunos estudios afirman que la combinación de inulina enriquecida con oligofruktosa puede incrementar la producción de algunos marcadores anti-inflamatorios favoreciendo la carga probiótica en el TGI (Dehghan *et al.*, 2014; Hachul *et al.*, 2013).

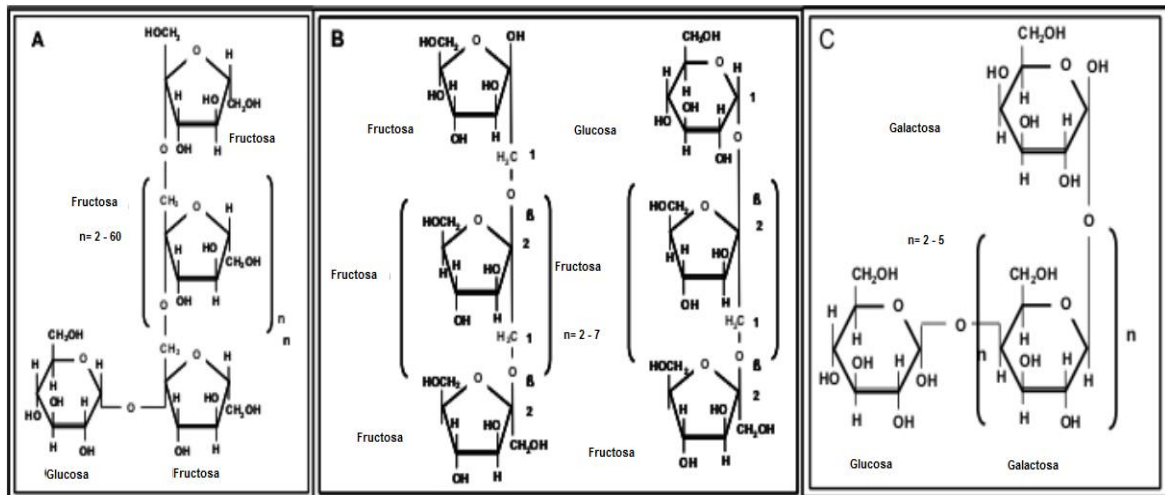


Figura 1. Estructura de algunos oligosacáridos prebióticos. A) Inulina, B) Fructooligosacáridos, C) Galactooligosacáridos. Referencia: Domínguez-Vergara *et al.*, 2009

II.2.1. Uso de Prebióticos en la Modulación Inmunológica

El uso de prebióticos se ha asociado con la disminución de la incidencia de diarrea hemorrágica y daño en la mucosa en modelos murinos con colitis (Seifert y Watzl, 2007). También se ha visto que tienen una mayor capacidad para reducir los síntomas de una colitis en comparación con una mezcla probiótica (Fukuda *et al.*, 2002). Hoentjen *et al.* (2005) publicaron que el uso de una mezcla de inulina y oligosacáridos puede reducir los niveles de citocinas

pro-inflamatorias como IL-1 β y aumentar las anti-inflamatorias como TGF- β , mientras aumenta la concentración de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Sin embargo, a veces el uso únicamente de prebióticos puede no bastar para obtener una modulación inmunológica lo suficientemente duradera para contrarrestar procesos inflamatorios (Osman *et al.*, 2006).

II.3. Sinbióticos

Los sinbióticos son una mezcla de probióticos y prebióticos que benefician al hospedero mejorando la supervivencia y la implantación de microorganismos vivos en el tracto gastrointestinal (Gibson y Roberfroid, 1995). El término sinbiótico proviene del inglés “Synbiotic”, y debe diferenciarse del término simbiótico, ya que éste último se refiere a la coexistencia benéfica de dos o más organismos. El concepto de sinbiótico considera un efecto sinérgico tanto del probiótico como del prebiótico y así la capacidad para ofrecer una serie de efectos en la salud, estimular el crecimiento de microbiota específica y mejorar el bienestar del hospedero (Awad *et al.*, 2006).

Los géneros de probióticos más utilizados para el uso en conjunto con prebióticos son *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. La combinación sinbiótica de *Lactobacillus paracasei* y maltodextrina llevó a una reducción en la colonización de *E. coli* en el yeyuno de lechones (Bomba *et al.*, 2002). *L. plantarum* en combinación con inulina puede reducir el proceso inflamatorio en la mucosa del TGI disminuyendo la producción de citocinas proinflamatorias y aumentando las antiinflamatorias como lo es IL-10 (Stofilova *et al.*, 2015). También se ha visto que los probióticos Bb12 y *L. rhamnosus* GG junto con inulina enriquecida con oligofruktosa pueden estimular la producción de IgA en la mucosa del Ileón promoviendo protección contra alérgenos (Roller *et al.*, 2004). La utilización de sinbióticos puede mejorar o aumentar la modulación de la respuesta inmunológica en comparación con el uso de prebióticos y probióticos por separado (Awad *et al.*, 2009).

El uso de inulina en conjunto con probióticos del género *Bifidobacterium* se ha asociado a la atenuación de procesos inflamatorios en el tracto gastrointestinal en modelos murinos (Osman *et al.*, 2006). La misma combinación ha presentado diferencias en la expresión de genes vinculados a procesos inflamatorios entre ratones control y ratones “knock-out” para IL-10 (Kuo *et al.*, 2014).

Actualmente se han descrito algunos sinbióticos que cuando pueden brindar un mayor beneficio a quien lo consume que cuando se utiliza el prebiótico y el probiótico de manera individual. Sin embargo, aún falta por describir diferentes combinaciones de sinbióticos que podrían mejorar o aumentar un estímulo inmunológico. La combinación de Bb12 en conjunto con inulina puede inducir una mayor respuesta anti-inflamatoria que la observada por separado como es el aumento de IL-10 (Kuo *et al.*, 2013; Kuo *et al.*, 2014).

II.4. Sistema Inmunológico

El sistema inmunológico le confiere protección al organismo detectando y eliminando microorganismos causantes de enfermedades (Abbas *et al.*, 2008). Durante una primera infección, la respuesta innata es la primera en activarse. Sin embargo, no es duradera y carece de especificidad contra antígenos específicos de patógenos individuales. Por su parte, la inmunidad adaptativa es una respuesta más específica, que produce anticuerpos y, células citotóxicas capaces de eliminar bacterias intracelulares. Si las infecciones perduran, la respuesta adaptativa es capaz de crear memoria, para eliminar rápidamente futuras exposiciones hacia patógenos (Murphy *et al.*, 2009).

Al igual que los probióticos, los microorganismos patógenos deben ser capaces de atravesar barreras físicas, químicas y celulares para montar un proceso infeccioso. El sistema inmune innato produce obstáculos que dificultan el desarrollo de infecciones y es capaz de reconocer patrones moleculares muy altamente conservados en microorganismos de diferentes géneros. En la respuesta inmune innata participan leucocitos como neutrófilos, macrófagos,

células dendríticas (DCs), basófilos y eosinófilos (Janeway y Mezhitov, 2002). En esta etapa, la respuesta reconoce estructuras antigénicas de menor tamaño y puede diferenciar un microorganismo de otro. Las principales células que actúan en la respuesta adaptativa son los linfocitos T y B. Las células B se encargan de producir anticuerpos para desactivar, opsonizar y facilitar la fagocitosis mientras que los linfocitos T son los encargados de coordinar la respuesta inmune celular. Estos se activan interactuando con células dendríticas o células infectadas por patógenos (Abbas *et al.*, 2008).

II.4.1. Estrategias de Inmunomodulación de los Probióticos

Los probióticos pueden estimular células del sistema inmune induciendo la activación y proliferación de linfocitos B finalizando con la secreción de IgA (Ejtahed *et al.*, 2011) o la activación de células NK (Natural Killer) (Ho *et al.*, 2014). Esto sucede en el intestino delgado para favorecer el rechazo de patógenos en esa área. Incluso se puede ver favorecida la actividad fagocítica de leucocitos intestinales como DCs, estimulando la producción de IL-2, IL-6 o TNF (Factor de Necrosis Tumoral) (Kaila *et al.*, 1992; Rinne *et al.*, 2005).

Diversas cepas de *Lactobacillus gasseri* pueden alterar la expresión antigénica de superficie de DCs maduras como moléculas de MHC II e inducir la producción de IL-12, TNF- α , IL-10 e IL-6 (Villena y Kitazawa, 2013). *L. sakei* puede inducir la producción de IL-10, una citocina anti-inflamatoria, y del factor de crecimiento tumoral (TGF): también reducir citocinas proinflamatorias como TNF, IFN (Interferon) o IL-8. Se ha demostrado que diferentes probióticos pertenecientes a diferentes especies pueden desarrollar distintos efectos inmunomodulatorios en DCs humanas (Hart *et al.*, 2004). Algunas bacterias gram positivas que contienen ácido lipoteicoico como *Bifidobacterium lactis* ayudan a unir antígenos a células epiteliales de la membrana facilitando la presentación de antígenos (Standiford *et al.*, 1994). En la Tabla 1 se muestra algunos estudios donde se ha documentado la producción de citocinas por diferentes células del sistema inmune inducido por distintos probióticos.

II.5. Receptores Tipo Toll (TLR)

Las células del epitelio intestinal y células del sistema inmune reconocen componentes bacterianos a través de sus Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs). Son responsables de mantener la tolerancia hacia la gran variedad de bacterias comensales que habitan el intestino delgado y de montar respuestas inflamatorias hacia patógenos.

Tabla 1. Cepas probióticas modulan diferencialmente citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

Citocinas	Células del sistema inmune	Probióticas	Referencias	
TNF- α e IL-1 β (pro-inflamatorias)	CMNs	<i>L. rhamnosus</i>	Miettinen <i>et al.</i> , 1998	
		<i>L. bulgaris</i>		
		<i>S. pyogenes</i>		
		<i>Bifidobacterium</i> sp.	Helwig <i>et al.</i> , 2006	
			<i>L. casei shirota</i>	Shida <i>et al.</i> , 2006
			<i>L. salivarius</i>	Perez-Cano <i>et al.</i> , 2010
			<i>L. fermentum</i>	
			<i>L. plantarum</i> spp.	Vissers <i>et al.</i> , 2010
	CMN-DCs	<i>L. rhamnosus</i> Lcr35	Evrard <i>et al.</i> , 2011	
	DC mieloides	<i>L. reuteri</i>	Mohamadzadeh <i>et al.</i> , 2005	
	Células epiteliales	<i>L. sakei</i>	Haller <i>et al.</i> , 2000	
	Línea celular THP-1	<i>L. reuteri</i>	Thomas <i>et al.</i> , 2012	
Interleucina 10 (anti-inflamatoria)	CMNs	ADN de Bifidobacteria	Hart <i>et al.</i> , 2004	
		<i>Bifidobacterium</i> sp.	Helwig <i>et al.</i> , 2006	
		<i>B. longum</i> W11	Medina <i>et al.</i> , 2007	
		<i>L. fermentum</i>	Perez-Cano <i>et al.</i> , 2010	
		<i>L. acidophilus</i>	Vissers <i>et al.</i> , 2010	
<i>L. plantarum</i> spp.				

CMN: Células mononucleares de sangre periférica; CMN-DCs: Células dendríticas derivadas de células mononucleares de sangre periférica; DC mieloides: Células dendríticas de origen mieloides. Modificado de Hardy *et al.*, 2013.

Los receptores tipo toll (TLR) son una clase de PRRs que se encuentran en células del epitelio intestinal y en células del sistema inmune, involucradas en la tolerancia y la inflamación (Villena y Kitazawa, 2013). Se encuentran en forma de proteínas transmembranales de la superficie celular y en compartimentos intracelulares de células del sistema inmune. Son capaces de

reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Janeway y Mezhitov, 2002).

Algunos ejemplos de PAMPs reconocidos por TLR son el ácido lipoteicóico hallado en bacterias gram positivas y reconocido por TLR2. TLR4 es capaz de reconocer lipopolisacáridos de algunas bacterias, mientras TLR3 que se encuentra en la membrana nuclear de DCs reconoce las cadenas bicatenarias de ARN de algunos virus. La proteína flagelina encontrada en los flagelos de algunas bacterias es reconocida por TLR5 (Takeda y Akira, 2005). Cuando los agonistas o ligandos de los TLRs son reconocidos, inician modificaciones funcionales y estructurales en las DCs induciendo cambios en su fenotipo. Ese reconocimiento produce cambios en la expresión de genes lo que desencadena la producción de citocinas como IL-10.

II.5.1. Características y Funciones del Receptor TLR2

Los receptores TLR2 reconocen una variedad de componentes microbianos como lo es el ácido lipoteicóico y el peptidoglucano, y se expresan principalmente en monocitos y DCs. Son capaces de reconocer lipoproteínas y lipopéptidos de patógenos como el peptidoglucano y ácido lipoteicóico de las bacterias gram-positivas. Como muchos de los reconocimientos de TLRs por su ligando, TLR2 induce la producción de citocinas y la apoptosis de fagocitos (Ruiz *et al.*, 2001). TLR2 en sinergia con otros receptores de superficie incluyendo co-receptores y receptores accesorios puede mejorar el reconocimiento de antígenos (Drage *et al.*, 2009). TLR2 trabaja en conjunto de forma dimérica con TLR1 y TLR6 además de estar relacionados estructuralmente (Mucha *et al.*, 2009). Debido a esto, TLR2 es capaz de reconocer una amplia gama de componentes microbianos.

El reconocimiento de lipopéptidos triacilados se encuentra asociado al reconocimiento de la dimerización TLR2/TLR1, mientras que la detección de lipopéptidos diacilados se realiza por vía TLR2/TLR6 (Leandro *et al.*, 2009; Drage *et al.*, 2009). Esto se ha observado en macrófagos de ratones deficientes

de TLR6 resultando en la disminución de la producción de citocinas inflamatorias en respuesta a lipopéptidos diacilados. Su respuesta ante lipopéptidos triacilados resulta en la producción normal de citocinas inflamatorias. En contraste, los macrófagos de ratones deficientes en TLR1 mostraron una respuesta normal a lipopéptidos diacilados, y una respuesta alterada a los lipopéptidos triacilados. Por lo tanto, TLR1 y TLR6 están asociados funcionalmente con TLR2 para discriminar entre lipopéptidos diacilados o triacilados (Takeuchi *et al.*, 2002).

La señalización de todos los TLR está ligada al adaptador MyD88 con excepción de TLR3, Esto conlleva a la activación de una cascada de señalización que culmina con la producción de citocinas como IL-1 β , IL-10, TNF- α e IL-12. En macrófagos derivados de médula ósea, el incremento en la producción de IL-10 en respuesta a peptidoglucano y ácido teicóico (estructuras presentes en bacterias gram positivas) es dependiente de MyD88. La vía TLR2-MyD88 es necesaria para la producción de IL-10, sin embargo, el receptor NOD2 también participa en la producción de dicha citocina (Moreira *et al.*, 2008). TLR2 y NOD2 inducen vías alternas, esto indica que la producción de citocinas como IL-10 puede ser inducida por la interacción de más de un tipo de receptor como se muestra en la Figura 2.

II.5.2. Interleucina 10

La IL-10 es una citocina fuertemente anti-inflamatoria producida por muchas células del sistema inmune, incluyendo a los monocitos. Esta citocina puede ser producida a través de la señalización de TLRs en células del sistema inmune al interactuar con sus agonistas (Saraiva y O'Garra, 2010).

Es importante una regulación adecuada entre la producción de IL-10 y la respuesta inmune pro-inflamatoria durante las infecciones para erradicar al patógeno causante, al mismo tiempo que se evita su cronicidad (Morre *et al.*, 2001). La producción de IL-10 se asocia a la interacción entre distintos TLRs y/o receptores al entrar en contacto con receptores bacterianos de diferente

naturaleza. El lipopolisacárido (LPS), antígeno presente en bacterias gram-negativas, interactúa con TLR4, mientras que el ácido lipoteicoico y el peptidoglicano presentes en bacterias-gram positivas se unen a TLR2 (Takeda *et al.*, 2003). Estos son los mecanismos propuestos en bacterias probióticas inductoras de IL-10.

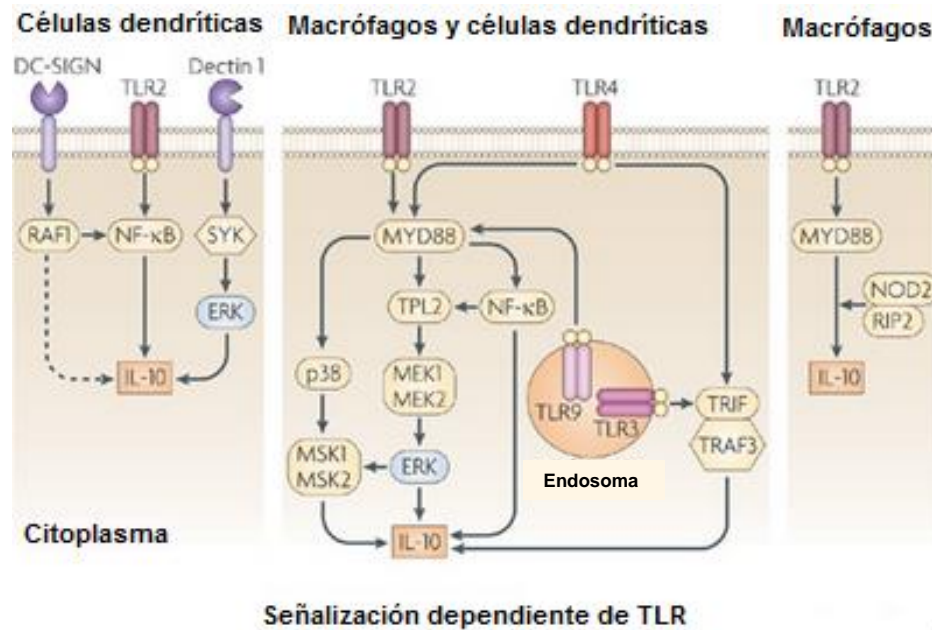


Figura 2. Expresión de IL-10 inducida por distintas vías de señalización. La señalización que da lugar a la producción de IL-10 puede ser dependientes o independientes de TLRs en macrófagos y en células mieloides como DCs y monocitos. Adaptado de Saraiva y O'Garra, 2010.

Un estudio reciente demostró que algunos metabolitos secundarios de la fermentación de prebióticos por bacterias probióticas son capaces de estimular la producción de IL-10 así como otros marcadores anti-inflamatorios en células mononucleares de sangre periférica humana (Asarat *et al.*, 2015). Esto indica que la elevación en la producción de IL-10 por sinbióticos está asociada a diferentes vías que convergen en la expresión y producción de la citocina anti-inflamatoria. Además, que estas respuestas son multifactoriales y dependerán del tipo de probiótico y prebiótico en juego así como el tipo de células estimuladas.

En nuestro grupo de trabajo se ha encontrado un incremento en la producción de IL-10 en células de ganglios mesentéricos de cerdo estimuladas con Bb12 en comparación con células sin estímulo (Duarte-Gutiérrez, 2015). Tomando en cuenta que los géneros de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son las bacterias probióticas más estudiadas y asociadas al uso de prebióticos, en este estudio se utilizaron los probióticos *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 y *Lactobacillus reuteri* 17938 y los prebióticos inulina u oligofruktosa. Se buscó diferencias en la expresión y producción de IL-10 en experimentos de estimulación con células mononucleares de sangre periférica de cerdo entre los probióticos cultivados sin y con prebióticos.

III. HIPÓTESIS

Los probióticos *Bifidobacterium lactis* subsp. *animalis* Bb12 y *Lactobacillus reuteri* 17938 cultivados en presencia de los prebióticos inulina u oligofruetosa inducen mayor expresión y producción de IL-10 en células mononucleares de sangre periférica de cerdo que en ausencia de los mismos.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión y producción de IL-10 en células mononucleares de sangre periférica de cerdo al ser estimuladas por los probióticos *Bifidobacterium lactis* subsp. *animalis* Bb12 y *Lactobacillus reuteri* 17938 cultivados previamente en presencia de inulina u oligofruktosa.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar IL-10 en células mononucleares de sangre periférica de cerdo estimulados con *Bifidobacterium lactis* subsp. *animalis* Bb12 o *Lactobacillus reuteri* 17938 cultivados en presencia de inulina u oligofruktosa mediante el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.
- Evaluar la expresión del ARNm de IL-10 en células mononucleares de sangre periférica de cerdo estimulados con *Bifidobacterium lactis* subsp. *animalis* Bb12 o *Lactobacillus reuteri* 17938 cultivados en presencia de inulina u oligofruktosa mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-qPCR).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Cepas Bacterianas y Oligosacáridos

Se utilizaron las cepas probióticas *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (Bb12) y *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (Biogaia) Biogaia® donada por el Dr. Adrián Hernández Mendoza provenientes del cepario del Laboratorio de Química de Alimentos del Dr. Hugo Sergio García del Instituto Tecnológico de Veracruz. Para el cultivo de ambas bacterias se utilizó el caldo agar Man Rogosa Sharpe (MRS) de la compañía EMD Millipore (Darmstadt, Alemania) suplementado con 0.05% de cisteína a 37 °C por 48 h en anaerobiosis. Así mismo, se utilizaron los oligosacáridos inulina de agave de Extrusiones Home S. de R.L. de C.V. (Guadalajara, Jalisco, México) y oligofruktosa de Orafiti (Pemuco, Chillan, Octava Región del Bio Bio, Chile). Para los experimentos con suplementación de prebióticos se preparó el medio MRS sin glucosa y se sustituyó por inulina u oligofruktosa como fuente de carbono.

Para los cultivos de bacterias suplementados con prebióticos, se partió de un cultivo de 24 h a 37 °C en MRS con glucosa, del cual se tomaron 20 µL y se agregaron a los medios MRS modificados y se cultivaron a 37 °C por 24 h. Simultáneamente se cultivaron las bacterias en medio MRS base (sin carbohidrato) y en medio MRS. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se centrifugaron a 5,000 rpm durante 10 min. El paquete celular obtenido se lavó en solución salina amortiguadora de fosfatos, PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 4.2 mM) finalizando con la resuspensión del mismo en PBS.

VI.2. Curva de Crecimiento de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 y *Lactobacillus reuteri* DSM 17938

Previo a cada experimento las bacterias fueron activadas inoculando 20 μ L en caldo MRS incubando durante 48 h. Posteriormente se realizaron 3 subcultivos. Para ello una alícuota (20 μ L) de las bacterias activas fue cultivada por 24 h a 37°C. Una vez concluido este periodo, se resembró en medio fresco y se cultivaron por 18 h y posteriormente por 12 h. En este último periodo se tomó una alícuota de 200 μ L cada h y la absorbancia de cada muestra se registró a 600 nm empleando un espectrofotómetro de la marca BMG LABTECH® tomando como blanco el medio MRS estéril.

VI.3. Animales de Experimentación

La sangre utilizada como fuente de CMN fue obtenida mediante exsanguinación de cerdos donados por una compañía productora de carne de cerdo. Los experimentos fueron realizados de cuatro cerdos obtenidos en fechas independientes.

VI.4. Obtención de Células Mononucleares de Sangre Periférica de Cerdo

La sangre fue obtenida en bolsas de plástico estériles (Nalgene®) a las cuales se les añadió heparina como anticoagulante. Se tomaron 10 mL de sangre y se diluyó 1:2 con PBS en un tubo Falcon de 50 mL. La suspensión anterior fue vertida con cuidado a través de las paredes de otro tubo Falcon de 50 mL conteniendo Ficoll-Paque finalizando en una proporción 1:3. Las células se centrifugaron a 1600 rpm durante 35 min para obtener un gradiente de densidad de Ficoll-Paque que se muestra en la Figura 3. Posteriormente la monocapa color grisácea se separó con una pipeta Pasteur y se colocó en otro tubo. Para lisis los eritrocitos contaminantes se agregaron 5 mL de NH_4Cl por 5 min. Posteriormente se agregó PBS y se centrifugó bajo las mismas condiciones. El

sobrenadante fue decantado y al botón celular se le agregó medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 20%. Las células se contaron en cámara de Neubauer y se ajustó la concentración celular resuspendiéndose en RPMI.

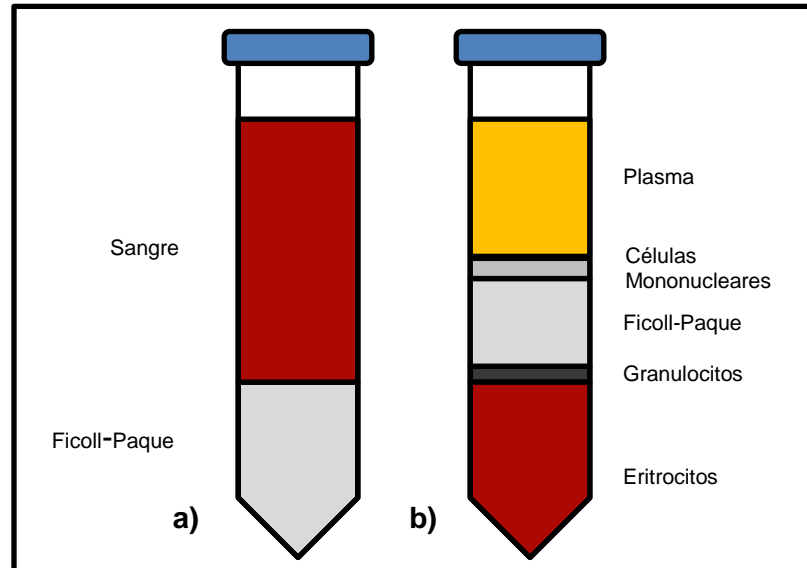


Figura 3. Esquema de la obtención de CMN. (a) Aspecto de la sangre total sobre la capa de Ficoll-Paque® antes de la centrifugación; (b) Capas obtenidas después de la centrifugación.

VI.5. Interacción Células – Probióticos

Para los experimentos (n=4) se utilizaron 100,000 células por pozo en una placa de 96 pozos y se agregaron las bacterias probióticas cultivadas previamente en ausencia y presencia de carbohidratos, en una relación de 100 bacterias por cada célula mononuclear, es decir, se agregaron 1×10^7 UFC bacterias probióticas a cada pocillo. Una vez que se colocaron las bacterias al cultivo celular se incubaron durante 8 y 24 h a 37 °C con atmósfera de 5 % de CO₂.

Para la cuantificación de IL-10 por ELISA se obtuvo el sobrenadante de las células estimuladas por 24 h y se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis. Para la determinación de la expresión de los ARNm de IL-10 se utilizaron células estimuladas por 8 h. Una vez transcurrido el tiempo de

incubación, se retiró el sobrenadante y a las células remanentes en el pozo se le agregaron 200 μL de buffer de lisis celular (RLT). Se homogenizó el contenido, se recolectaron y almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

VI.6. Extracción de ARN Total

La extracción del ARN se realizó utilizando el kit comercial RNeasy® Mini Kit (QIAGEN®, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se analizó su concentración y pureza midiendo la absorbancia a 260/280 nm en un espectrofotómetro (NanoDrop, ND-1000), donde una proporción de 2 se consideró de buena calidad así como una concentración de 8 ng/ μL como mínimo.

VI.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-qPCR) de IL-10

Para la mezcla de reacción de IL-10, se utilizó el kit comercial One-Step RT-qPCR Core Reagent Brilliant® Mater Mix (Stratagene, La Jolla, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo en el sistema Applied Biosystems® StepOne (Foster City, CA). Las condiciones de amplificación fueron de un ciclo a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min y $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min, seguidos de 40 ciclos de $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 s y $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min.

Se registró el ciclo umbral (Ct por sus siglas en inglés) para cada gen de interés. Los valores de Ct de los tratamientos se normalizaron contra un gen constitutivo y los valores de Ct entre los diferentes tratamientos fueron evaluados con la fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, según se describe a continuación:

$$\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct gen de interés} - \Delta\text{Ct gen constitutivo}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct células tratadas} - \Delta\text{Ct células sin tratamiento}$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

Los resultados se expresaron como el incremento relativo de ARN mensajero (ARNm) entre células estimuladas con probióticos cultivados en presencia de prebióticos y células estimuladas con probióticos cultivados sin ellos.

VI.8. Cuantificación de Citocinas por ELISA

El sobrenadante obtenido de las interacciones de 24 h entre las CMN con bacterias probióticas se centrifugó a 5,000 rpm a 18°C para remover las bacterias. El sobrenadante restante se utilizó para determinar IL-10 mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se cuantificó IL-10 utilizando el kit comercial Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se agregaron 100 µL del anticuerpo de captura por pozo y se incubó durante toda la noche a 24°C. Al día siguiente se lavaron los pozos con PBS con 0.1% de Tween20, se cubrieron con 300 µL de PBS suplementado al 0.5% de BSA (albumina sérica bovina) y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente. Se utilizaron 50 µL de la muestra por pozo y se incubaron 1.5 h, después se lavaron con PBS y se añadió 50 µL del anticuerpo de detección por pozo y se incubó 1 h. Se hicieron 3 lavados con PBS y se añadió 50 µL por pozo de la solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa y se incubó por 45 min en la oscuridad y a temperatura ambiente. Por último se agregó el sustrato 3,3',5,5' tetrametil-bencidamida (TMB) y se incubó por 20 min en la oscuridad y a temperatura ambiente. Para detener la reacción se acidificó con H₂SO₄ 1.8N. La lectura se realizó dentro de los primeros 30 min de reacción a una absorbancia de 450nm.

VI.9. Análisis de los Datos

Los datos obtenidos se analizaron en el paquete estadístico NCSS 2007, mediante un arreglo factorial 2⁴ para la expresión relativa de ARNm de IL-10 y para la proteína IL-10, considerando como factores los tratamientos con los

probióticos Bb12 y Biogaia en incubación con CMN de sangre periférica de cerdo junto con los prebióticos inulina u oligofruetosa. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Fisher y las diferencias se determinaron con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

VII.1. Curva de Crecimiento de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 y *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 Biogaia

Los probióticos Bb12 y Biogaia al igual que otras bacterias presentan un periodo de latencia durante su cultivo. En esta etapa las bacterias se adaptan al medio de crecimiento realizando modificaciones metabólicas necesarias para utilizar los nutrientes disponibles a su alcance. Una vez que las bacterias se han adaptado al medio, comienza la fase logarítmica donde el microorganismo aumenta su número de manera exponencial, siendo la etapa más activa metabólicamente hablando. Durante la fase estacionaria la tasa de crecimiento de las bacterias disminuye debido al agotamiento de nutrientes, acumulación de productos tóxicos o reducción del espacio. Durante la última fase el número de bacterias vivas ya es menor que las que se encuentran muertas, los nutrientes se han agotado y/o la concentración de compuestos tóxicos así como pH o el espacio reducido empieza afectar gravemente a los microorganismos (Novick, 1995).

En la Figura 4 se muestra una gráfica del crecimiento bacteriano de Bb12 y Biogaia durante 12 h con respecto a la absorción obtenida a cada h. La fase de latencia para ambas bacterias se observó a la primera 1 h. La fase de aceleración se observó entre la primera y segunda h siguiendo con el aumento de la masa bacteriana siendo esta su fase exponencial y concluyendo a las 7 para Biogaia. Por su parte, Bb12 continuó creciendo hasta las 12 h sin llegar a la fase estacionaria. Teniendo en cuenta que durante su fase exponencial las bacterias se encuentran en el estado metabólico más activo (Novick, 1995), se utilizó el punto de las 12 h de crecimiento para ambos probióticos en los ensayos de estimulación.

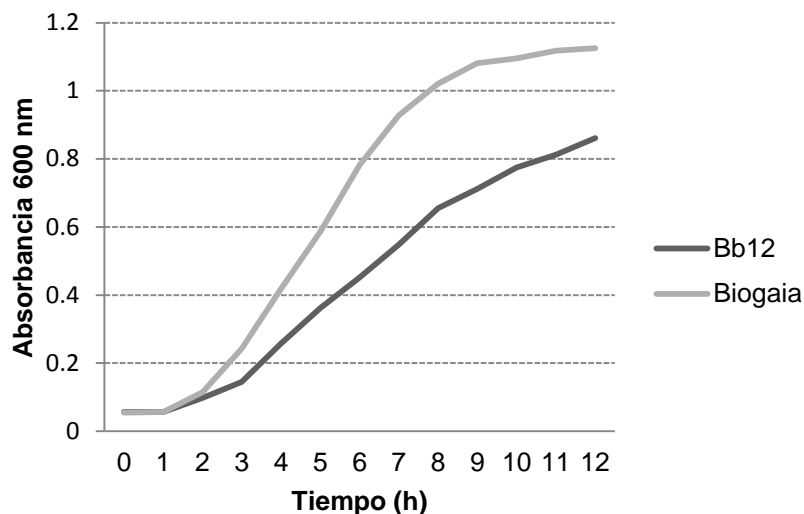


Figura 4. Curva de crecimiento de los probióticos *B. animalis* subsp. *lactis* (Bb12) y *L. reuteri* DSM 17938 (Biogaia). El monitoreo del crecimiento bacteriano se siguió durante 12 h en caldo MRS y cisteína al 0.05% en anaerobiosis.

VII.2. Cuantificación de IL-10 por ELISA

La interacción entre algunos probióticos y las células del sistema inmune puede desencadenar la producción y expresión de ciertas citocinas vinculadas a procesos inflamatorios. Este trabajo se enfocó en la evaluación de IL-10 debido a su alta capacidad para revertir procesos pro-inflamatorios modulando la respuesta inmune. En la Figura 5 se presentan las medias de la cuantificación de IL-10 en sobrenadante proveniente de la interacción de células mononucleares de sangre periférica de cerdo y las cepas probióticas *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb12) y *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (Biogaia), desarrolladas en presencia de distintos prebióticos.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la producción de IL-10 en células estimuladas con probióticos cultivadas en presencia de prebióticos en comparación con las células sin estímulo (SE). Bb12 en presencia de glucosa presentó una producción significativa de IL-10 (86.49 pg/ μ L) con respecto a SE (24.84 pg/ μ L) lo que coincide con los estudios realizados en nuestro grupo de trabajo por Duarte-Gutiérrez (2015). Bb12 indujo una producción significativa de IL-10 en células de ganglios mesentéricos de

cerdo en un experimento de estímulo durante 8 h con *L. reuteri* 1447 y 53608 con respecto a un testigo sin estímulo (Duarte-Gutiérrez, 2015). Sin embargo, Bb12 en presencia de los prebióticos inulina (47.21 pg/μL) u oligofruetosa (50.75 pg/μL) al igual que en ausencia de carbohidratos (57.9 pg/μL) no presentó un aumento significativo.

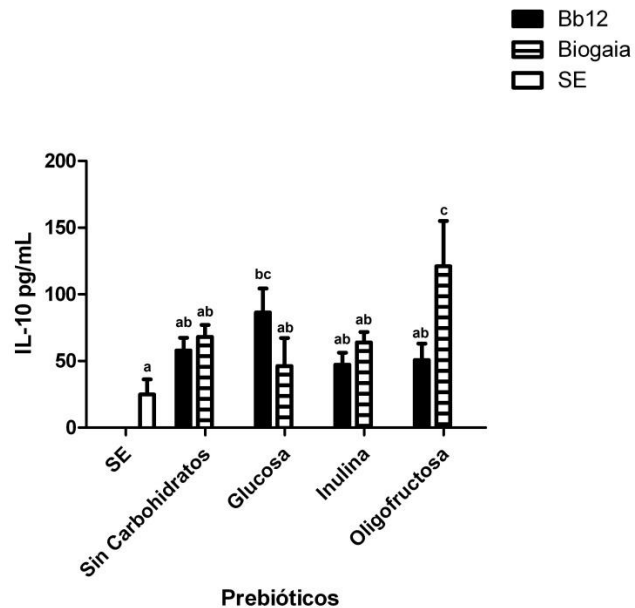


Figura 5. Cuantificación de IL-10 en sobrenadante de cultivo celular de 24 h. Las células mononucleares de sangre periférica de cerdo fueron estimulados durante 24 h con los probióticos *B. animalis* subsp. *lactis* (Bb12) y *L. reuteri* DSM 17938 (Biogaia) cultivados en presencia y ausencia de los prebióticos inulina u oligofruetosa, en el medio MRS, MRS modificado sin fuente de carbohidratos y un control sin estimular (SE). En la gráfica se muestran las medias y el error estándar de una n=4. Diferentes literales indican diferencias significativas por el método de Fisher ($p < 0.05$).

Esto indica que el desarrollo de Bb12 no se vio beneficiado por la adición de los prebióticos inulina u oligofruetosa y en consecuencia no tuvo efecto benéfico para estimular una respuesta anti-inflamatoria vinculada a la producción de IL-10. Bb12 es capaz de aumentar significativamente la producción de dicha citocina cultivado en medio MRS con glucosa pero la adición de cualquiera de los prebióticos no incrementa su producción. En contraste, en un trabajo realizado en células mononucleares de sangre periférica de ratas, Bb12 en conjunto con inulina enriquecida con oligofruetosa

fue capaz de incrementar la producción de IL-10 en comparación con el efecto individual de Bb12 y el control sin estímulo (Roller *et al.*, 2004). En este último estudio, Bb12 interactuó con las células del sistema inmune de ratas en conjunto con los prebióticos creando el efecto sinbiótico lo que no sucedió en nuestro estudio. Esto podría indicar que es necesaria la participación directa de los prebióticos en la estimulación para modular una respuesta anti-inflamatoria.

Por su parte, en el prebiótico Biogaia no se observó diferencia en la producción de IL-10 al ser cultivada en glucosa (46.2 pg/μL), inulina (63.8 pg/μL) y sin carbohidratos (68.1 pg/μL). Sin embargo, cultivada en presencia de oligofruktosa presentó la mayor producción de IL-10 comparado con los otros tratamientos. En contraste, el estímulo producido por Bb12 en presencia de glucosa fue estadísticamente de la misma magnitud que el antes descrito. Todo lo anterior indica que un mismo prebiótico puede tener efectos distintos en probióticos diferentes. Además, se podría inferir que el prebiótico oligofruktosa indujo un cambio en la composición estructural de la célula bacteriana. Se desconocen los mecanismos de alteración en la estructura celular del sistema inmune y bacterias probióticas inducidos por prebióticos (Seifert y Watzl, 2007). Sin embargo, hay información experimental que demuestra que la oligofruktosa ayuda a modular la respuesta inmune en mamíferos como lo es el cerdo (Shim *et al.*, 2005).

VII.3. Expresión de ARNm de IL-10 por RT-qPCR

La expresión de IL-10 fue evaluada a nivel de transcrito mediante la técnica de RT-qPCR. En la Figura 6 se muestran los resultados de la expresión de ARNm de IL-10 de CMN de cerdo estimuladas por 8 h con los probióticos Bb12 y Biogaia sin y con los prebióticos en estudio. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión del transcrito para IL-10 en células estimuladas con ambos probióticos tanto cultivados previamente con glucosa y con inulina comparado con la expresión producida en el estímulo sin carbohidratos. Sin embargo, no se encontró diferencias entre la respuesta

producida por los probióticos al ser cultivadas previamente en oligofruktosa con respecto al estímulo sin carbohidratos. No se observó beneficio en la adición de prebióticos para ninguno de los probióticos utilizados en nuestro estudio a nivel de transcrito. Bb12 y Biogaia produjeron una respuesta estadística de la misma magnitud al cultivarse en presencia de glucosa, sin embargo, los valores de la cuantificación de la proteína fue diferente posiblemente a las diferencias en las h de estímulo para cada experimento (8 h y 24 h).

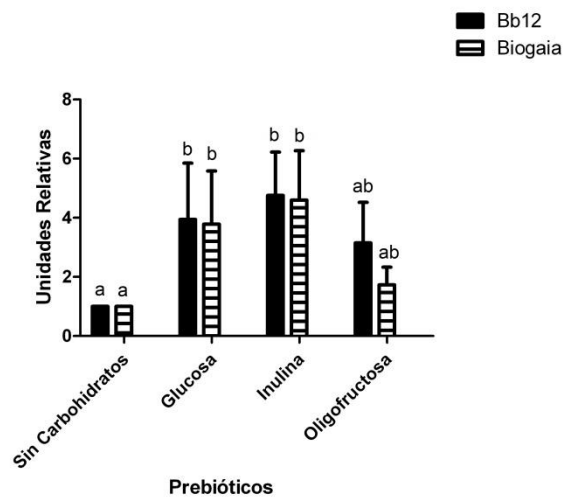


Figura 6. Expresión de ARNm de IL-10 en cultivo de CMN por 8 h. Las CMN de sangre periférica de cerdo se estimularon durante 8 h con los probióticos *B. animalis* subsp. *lactis* (Bb12) y *L. reuteri* DSM 17938 (Biogaia) desarrollados sin y en presencia de los prebióticos inulina u oligofruktosa, en el medio MRS tradicional y MRS modificado sin fuente de carbohidratos. En la gráfica se muestran las medias y el error estándar de una n=3. Diferentes literales indican diferencias estadísticas determinadas por el método de Fisher ($p < 0.05$).

En un estudio realizado en nuestro grupo de trabajo por Duarte-Gutiérrez (2015) se encontró un incremento significativo en la expresión de ARNm de IL-10 por células de ganglios mesentéricos estimuladas con Bb12 durante 8 h con respecto a un testigo sin estímulo (Duarte-Gutiérrez, 2015). Los probióticos por si solos fueron capaces de inducir una respuesta elevada en la expresión de IL-10 a las 8 h al igual que en nuestro estudio.

En un estudio realizado por Martínez-Abad (2014) se encontró que DCs derivadas de monocitos eran capaces de expresar significativamente ARNm de

IL-10 al ser estimuladas con cepas probióticas del género *Lactobacillus* en ausencia de prebióticos al igual que en nuestro estudio. Sin embargo, en contraste con su estudio obtuvimos que Bb12 aumentó significativamente la expresión del transcrito. La respuesta obtenida inducida por ambos probióticos fue suficiente para incrementar la expresión del transcrito de IL-10.

Se ha reportado que la interacción sinbiótica ocurre entre un probiótico y un prebiótico, no obstante en este estudio los probióticos se desarrollaron solamente en presencia de prebióticos. No se tomó en consideración los posibles productos generados con la interacción directa con las células del sistema inmune. Nuestros resultados sugieren que los probióticos presentaron posiblemente cambios estructurales de la superficie celular al desarrollarse en presencia de ciertos prebióticos, lo cual originó un impacto al interactuar directamente con células mononucleares de sangre periférica de cerdo. Por otro lado, probióticos como Bb12 tienen la capacidad de producir un estímulo anti-inflamatorio sin la necesidad de utilizar inulina u oligofruktosa como fuente de alimento. Sin embargo, faltan aún estudios que comprueben que el efecto sinbiótico entre los probióticos y prebióticos en estudio pueden producir un efecto sinérgico al interactuar con células mononucleares de sangre periférica de cerdo.

VIII. CONCLUSIÓN

Las células mononucleares de sangre periférica de cerdo aumentan la producción de IL-10 al ser estimuladas con probióticos como *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12. La presencia de prebióticos en el crecimiento de cepas probióticas ayudan a mejorar la respuesta inmune a través de la producción de IL-10, como se observó para *Lactobacillus reuteri* 17938 cultivado en presencia de oligofruktosa. Estos resultados sugieren posibles alteraciones en las estructuras celulares bacterianas. Sin embargo, aún faltan estudios que esclarezcan que tipo de modificaciones estructurales son realizadas por los prebióticos y si estas modificaciones afectan las vías de señalización involucradas en la producción de IL-10.

Además, es necesario realizar estudios para evaluar si el efecto conjunto entre los probióticos y prebióticos en células en cultivo, tienen la capacidad para producir un efecto sinérgico en la producción de IL-10 en células del sistema inmune.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas L, Andrew L, Shiv P. 2008. Inmunología celular y molecular. Madrid: Interamericana-McGraw Hill. Pp 3-4.
- Akin MB, Akin MS, Kirmaci Z. 2007. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. *Food Chem.* 104:93–99.
- Aliasgharzadeh A, Khalili M, Mirtaheri E, Gargari BP, Tavakoli F, Farhangi MA, Babaei H, Dehghan P. 2015. A combination of prebiotic inulin and oligofructose improve some of cardiovascular disease risk factors in women with type 2 diabetes: a randomized controlled clinical trial. *Adv Pharm Bull.* 5:507 – 514.
- Asarat M, Apostolopoulos V, Vasiljevic T, Donkor O. 2015. Short-chain fatty acids produced by synbiotic mixtures in skim milk differentially regulate proliferation and cytokine production in peripheral blood mononuclear cells. *Int J Food Sci Nutr.* 66:755-765.
- Awad WA, Bohm J, Razzazi-Fazeli E, Ghareeb K, Zentek J. 2006. Effect of addition of a probiotic microorganism to broiler diets contaminated with deoxynivalenol on performance and histological alterations of intestinal villi of broiler chickens. *Poult Sci.* 85:94–99.
- Awad WA, Ghareeb K, Abdel-Raheem S, Böhm J. 2009. Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poult Sci.* 88:49–56.
- Bazay-Dulanto G. 2010. Uso de los probióticos en la alimentación animal con énfasis en *Saccharomyces cerevisiae*. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos. 2-9
- Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. 2012. Probiotic mechanism of action. *Ann Nutr Metab.* 61(2): 160-74.
- Betoret N, Puente L, Díaz MJ, Pagán MJ, García MJ, Gras ML, Martínez-Monzó J & Fito P. 2003. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *J Food Eng.* 56:273-277.

- Bomba A, Nemcová R, Gancarcíkova S, Herich R, Guba P, Mudronová D. 2002. Improvement of the probiotic effect of microorganisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. *Br J Nutr.* 88:S95 – 99.
- Butel MJ. 2014. Probiotics, gut microbiota and health. *Med Mal Infect.* 44:1-8.
- Candela M, Perna F, Carnevali P, Vitali B, Ciati R, Gionchetti P, Rizzello F, Campieri M, Brigidi P. 2008. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol.* 125:286–292.
- Chen BH, Yao YQ. 2002. Beneficial microbe composition, new protective material or the microbes, method to prepare the same and uses thereof. US Patent 6368591.
- Collado MC, Grzeskowiak L, Salminen S. 2007. Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Curr Microbiol.* 55:260-5.
- Corzo N, Alonso JL, Azpiroz F, Calvo MA, Cirici M, Leis R, Lombo F, Mateos-Aparicio I, Plou FJ, Ruas-Madiedo P, Rúperez P, Redondo-Cuenca A, Sanz ML, Clemente A. 2015. Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutr Hosp.* 31:99-118.
- Dehghan P, Pourghassem GB, Asghari JM. 2014. Oligofructose-enriched inulin improves some inflammatory markers and metabolic endotoxemia in women with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled clinical trial. 30:418-423.
- Domínguez-Vergara AM, Vázquez-Moreno L, Ramos-Clamont G. 2009. Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. *Arch Latinoam Nutr.* 59:358- 368.
- Drage MG, Pecora ND, Hise AG, Febbraio M, Silverstein RL, Golenbock DT, Boom WH, Harding CV. 2009. TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Immunol.* 258:29-37.

- Duarte-Gutiérrez JL. 2015. Expresión de ARNm de TLR2, NF- κ B, e IL-10 en Células de Ganglios Mesentéricos de Cerdo Estimuladas con Probióticos. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. 2010. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA J. 8:1763.
- Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homoyouni-Rad A, Niafar M, Asghari-Jafarabadi M, Mofid V, Akbarian-Moghari A. 2011. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. J Dairy Sci. 94:3288-94.
- FAO. 2006. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation, FAO Food and Nutrition Paper No. 85. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations; Rome: Probiotics in food.
- Favaro-Trindade CS, Heinemann RJB, Pedroso DL. 2011. Developments in probiotic encapsulation. CAB Reviews: Perspec Agr Vet Sci Nutr Nat Resour. 6:1–8.
- Fukuda M, Kanauchi O, Araki Y, Andoh A, Mitsuyama K, Takagi K, Toyonaga A, Sata M, Fujiyama Y, Fukuoka M, Matsumoto, Bamba T. 2002. Prebiotic treatment of experimental colitis with germinated barley foodstuff: a comparison with probiotic or antibiotic treatment. Int J Mol Med. 65–70.
- Galdeano CM, de Leblanc Ade M, Carmuega E, Weill R, Perdigon G. 2009. Mechanisms involved in the immunostimulation by probiotic fermented milk. J Dairy Res. 76:446–454.
- Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J Nutr. 125:1401e12.
- Grimoud J, Durand H, Courtin C, Monsan P, Ouarné F, Theodorou V, Roques C. 2010. In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic

- glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe*. 16:493–500.
- Gross F, van der Meulen J, Snel J, van der Meer R, Kleerebezem M, Niewold TV, Hulst MM, Smiths MA. 2008. Mannose-specific interaction of *Lactobacillus plantarum* with porcine jejunal epithelium. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 54:215–223.
- Guarner F, Malagelada JR. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 9:361-512
- Hachul AC, Mennitti LV, de Oliveira JL, Moreno MF, Okuda MH, Dos Santos B, Oyama LM, Ribeiro EB, do Nascimento CM, Pisani LP. 2013. Oligofructose supplementation (10%) during pregnancy and lactation does not change the inflammatory effect of concurrent trans fatty acid ingestion on 21 day-old offspring. *Lipids Health Dis*. 1:12-59.
- Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. 2013. Probiotics, Prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients*. 5:1869-1912.
- 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*. 13:1602-1609.
- Herfel TM, Jacobi SK, Lin X, Jouni ZE, Chichlowski M, Stahl CH, Odle J. 2013. Dietary supplementation of *Bifidobacterium longum* strain AH1206 increases its cecal abundance and elevates intestinal interleukin-10 expression in the neonatal piglet. *Food Chem Toxicol*. 60:116-122.
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. 2014. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11:506-514.
- Ho YH, Lu YC, Chang HC, Lee SY, Tsai MF, Huang YT, Hsu TY. 2014. Daily intake of probiotic with high IFN- γ /IL-10 ratio increases the cytotoxicity of

- human natural killer cells: a personalized probiotic approach. *J Immunol Res.* e721505.
- Hoentjen F, Welling GW, Harmsen HJ, Zhang X, Snart J, Tannock GW, Lien K, Churchill TA, Lupicki M, Dieleman LA. 2005. Reduction of colitis by prebiotics in HLA-B27 transgenic rats is associated with microflora changes and immunomodulation. *Inflamm Bowel Dis.* 11 (11):977-85.
- Janeway CA, Mezhitov R. 2002. Innate Immune Recognition. *Annu Rev Immunol.* 20:197-216.
- Jones SE, Versalovic J. 2009. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiol.* 11:35.
- Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virtanen E, Laine S, Arvilommi H. 1992. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr. Res.* 32:141-144.
- Kuo SM, Merhige PM, Hagey LR. 2013. The effect of dietary prebiotics and probiotics on body weight, large intestine indices, and fecal bile acid profile in wild type and IL10^{-/-} mice. *PLoS One.* 8: e60270.
- Kuo SM, Chan WC, Hu Z. 2014. Wild-type and IL 10-null mice have differential colonic epithelial gene expression responses to dietary supplementation with synbiotic *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* and inulin. *J Nutr.* 144:245-251.
- Leandro AC, Rocha MA, Cardoso CS, Bonecini-Almeida MG. 2009. Genetic polymorphisms in vitamin D receptor, vitamin D-binding protein, Toll-like receptor 2, nitric oxide synthase 2, and interferon-gamma genes and its association with susceptibility to tuberculosis. *Braz J Med Biol Res.* 42:312-322.
- Leroy G, Grongnet JF, Mabeau S, Corre DL, Baty-Julien C. 2010. Changes in inulin and soluble sugar concentration in artichokes (*Cynara scolymus* L.) during storage. *J Sci Food Agri.* 90:1203–1209.
- Lindsay JO, Whelan K, Stagg AJ, Gobin P, Al-Hassi HO, Rayment N, Kamm MA, Knight SC, Forbes A. 2006. Clinical, microbiological, and

- immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut*. 55:348–355.
- Liu Y, Fatheree NY, Mangalat N, Rhoads JM. 2010. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* strains differentially reduce intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 299:G1087–G1096.
- Madrigal L, Sangronis E. 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Arch Latinoam Nutr*. 57(4): 387-396
- Maltby R, Leatham-Jensen MP, Gibson T, Cohen PS, Conway T. 2013. Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine. *PLoS One*. 8:e53957.
- Martínez-Abad B. 2014. Modulación de la inmunidad innata y adaptativa por probióticos. Universidad de Valladolid. Facultad de Medicina. 84-126.
- Maurice CF, Haiser HJ, Turnbaugh PJ. 2013. Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell*. 152:39-50.
- Moreira LO, Smith AM, DeFreitas AA, Qualls JE, El Kasmi KC, Murray PJ. 2008. Modulation of adaptive immunity by different adjuvant-antigen combinations in mice lacking Nod2. *Vaccine*. 26:5808–5813
- Morre KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 19:683-765.
- Mucha R, Bhide MR, Chakurkar EB, Novak M, Mikula Sr I. 2009. Toll-like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis infection in cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. 128; 381-388.
- Murphy K, Traves P, Walport M. 2009. Inmunobiología de Janeway. México: McGraw-Hill. Pp 2-3.
- Novick A. 1995. Growth of Bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 9:97–110.
- Öhman L, Simrén M. 2013. Intestinal microbiota and its role in irritable bowel syndrome (IBS). *Curr Gastroenterol Rep*. 15:323-9.

- Osman N, Adawi D, Molin G, Ahrne S, Berggren A, Jeppsson B. 2006. *Bifidobacterium infantis* strains with and without a combination of oligofructose and inulin (OFI) attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats. *Gastroenterol.* 6:31.
- Ozer D, Akin S, Ozer B. 2005. Effect of inulin on survival of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium* BB-02 in acidophilus-bifidus yogurt. *Food Res Int.* 11:19-24.
- Patterson JK, Yasuda K, Welch RM, Miller DD, Lei XG. 2010. Supplementation dietary inulin of variable chain lengths alters intestinal bacterial populations in young pigs. *J Nutr.* 140(12):2158-2161.
- Pineiro M, Asp NG, Reid G, Macfarlane S, Morelli L, Brunser O, Tuohy K. 2008. Technical meeting on prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 42:156-159.
- Rautava S, Arvilommi H, Isolaur E. 2006. Specific probiotics in enhancing maturation of IgA responses in formula-fed infants. *Pediatr Res.* 60: 221 – 224.
- Rijkers GT, de Vos WM, Brummer RJ, Morelli L, Corthier G, Mareau P. 2011. Health benefits and health claims of probiotics: bridging science and marketing. *Br J Nutr.* 106:1291-6.
- Rinne M, Kalliomaki M, Arvilommi H, Salminen S, Isolauri E. 2005. Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. *J Pediatr.* 147:186-91.
- Roberfroid M. 2007. Prebiotics: The concept revisited. *J Nutr.* 137:8305-8375.
- Roller M, Rechkemmer G, Watzi B. 2004. Prebiotic inulin enriched with oligofructosa in combination with the prebiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats. *J Nutr.* 134:153-156.
- Ruiz C, Rojas M, García LF. 2001. Expresión del receptor tipo toll 2 (TLR-2) en monocitos de pacientes con tuberculosis (TB) y controles sanos- informe preliminar. *IATREIA.* 14:272.

- Sakai F, Hosoya T, Ono-Ohmachi A, Ukibe K, Ogawa A, Moriya T, Kadooka Y, Shiozaki T, Nakagawa H, Nakayama Y, Miyazaki T. 2014. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 induces TGF- β expression in dendritic cells and activates TLR2 signal to produce IgA in the small intestine. PlosOne. 9: e105370.
- Saraiva M, O'Garra A. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. Nat Rev Immun. 10:170-181.
- Seifert S, Watzl B. 2007. Inulin and oligofrutose: review of experimental data on immune modulation. J Nutr. 137:2563S-2567S.
- Shanahan F. 2010. Probiotics in perspective. Gastroenterol. 139:1808-12.
- Shastri P, McCarville J, Kalmokoff M, Brooks SPJ, Green-Johnson JM. 2015. Sex differences in gut fermentation and immune parameters in rats fed an oligofrutosa-supplemented diet. Biol Sex Differ. 6:13.
- Shim SB, Verstegen MW, Kim IH, Kwon OS, Verdonk JM. 2005. Effects of feeding antibiotic-free creep feed supplemented with oligofrutose, probiotics or synbiotics to suckling piglets increases the preweaning weight gain and composition of intestinal microbiota. Arch Anim Nutr. 59:419-427.
- Solano-Aguilar G, Dawson H, Restrepo M, Andrews K, Vinyard B, Urban JF. 2008. Detection of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (Bb12) in the intestine after feeding of sows and their piglets. 74:6338-6347.
- Standiford TK, Arenberg DA, Danforth JM, Kunkel SL, Otterren Van GM, Strieter RM. 1994. Lipoteichoic acid induces secretion of interleukin-8 from human blood monocytes: a cellular and molecular analysis. Infect Immun. 62:119-125.
- Stofilova J, Szabadosova V, Hrcjová G, Salaj R, Bertkova I, Hijova E, Strojny L, Bomba A. 2015. Co-administration of a probiotic strain *Lactobacillus plantarum* LS/07 CCM7766 with prebiotic inulin alleviates the intestinal inflammation in rats exposed to N,N-dimethyldrazine. Int Immunopharmacol. 24:361 -368.

- Svensson UK, Hakansson J. 2014. Safety of Food and Beverages: Safety of Probiotics and Prebiotics. *Encyclopedia of food safety*. 3: 441-446.
- Takeda K, Akira S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17:1-14.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 21:335-376.
- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Akira S. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*. 169:10-4.
- Talarico TL, Casas IA, Chung TC, Dobrogosz WJ. 1988. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother*. 32:1854-1858.
- Turroni F, Foroni E, Pizzetti P, Giubellini V, Ribbera A, Merusi P, Cagnasso P, Bizzarri B, de'Angelis GL, Shanahan F, van Sinderen D, Ventura M. 2009. Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Appl Environ Microbiol*. 75:1534–1545.
- Urbanska M, Szajewska H. 2014. The efficacy of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in infants and children: a review of the current evidence. *Eur J Pediatr*. 173(10)1327-37.
- Van De Wiele T, Boon N, Possemiers S, Jacobs H, Verstraete W. 2006. Inulin-type fructanos of longer degree of polymerization exert more pronounced *in vitro* prebiotic effects. *J Appl Microbiol*. 102(2):452-460.
- Villena J, Susuki R, Fujie H, Chiba E, Takahashi T, Tomosada Y, Tomoyuki S, Aso H, Ohwada S, Suda Y, Ikegami S, Itoh H, Alvarez S, Saito T, Kitazawa H. 2012. Immunobiotic *Lactobacillus jenseii* modulates the toll-like receptor 4-induced inflammatory response via negative regulation in porcine antigen-presenting cells. *Clin Vaccine Immunol*. 19:1038-1053.
- Villena J, Kitazawa H. 2013. Modulation of Intestinal TLR4-Inflammatory Signaling Pathways by Probiotic Microorganisms: Lessons Learned from *Lactobacillus jensenii* TL2937. *Front Immunol*. 4:512.

- Von der Weid T, Bulliard C, Schiffrin EJ. 2001. Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4⁺ T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor β and interleukin-10. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8:695-701.
- Waligora-Dupriet AJ, Campeotto F, Nicolis I, Bonet A, Soulaines P, Dupont C, Butel MJ. 2007. Effect of oligofructosa supplementation on gut microflora and well-being in young children attending a day care centre. *Int J Food Microbiol.* 113(1):108-13.
- Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. 2006. Colonic Health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol.* 40(3): 235-243.