



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

**EXPRESIÓN DE ARNm DE TLR2, NF- κ B, E IL-10 EN
CÉLULAS DE GANGLIOS MESENTÉRICOS DE CERDO
ESTIMULADAS CON PROBIÓTICOS**

Por

Jorge Luis Duarte Gutiérrez

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIAS 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 del QBC. Jorge Luis Duarte Gutiérrez, 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



Dr. Jesús Hernández López
Asesor



Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort
Asesor




Dra. Erika Silva Campa
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 brindada durante la realización de este trabajo de maestría.

Al 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.

A mi directora de tesis la Dra. Verónica Mata Haro. Gracias por ayudarme tanto profesionalmente como académicamente con sus conocimientos, por su paciencia y comprensión, y por haberme aceptado en este proyecto.

A la M.C. Leticia Félix por su asesoramiento en el laboratorio y ayuda en la búsqueda de reactivos.

Al laboratorio de proteínas de la coordinación de Nutrición por ayudarme y facilitarme material y reactivos para la realización del proyecto.

Al laboratorio de inmunología por brindarme sus instalaciones para la realización del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio Karmen, Anna, Marina, Pablo por los apoyos brindados durante mi estancia en el laboratorio.

A los miembros de mi comité por el tiempo y la disponibilidad para brindarme su apoyo y consejos durante la realización del proyecto.

A mis abuelos, mis hermanos, mis tíos, mis primos y todas las personas que me acompañaron en el tiempo que se realizó este trabajo.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Jorge Luis Duarte y María Sara Gutiérrez, porque desde que empezó mi formación me apoyaron y he aquí una forma de agradecerse los.

A mis hermanos Manuel Alberto y Cristian David que he compartido toda una vida con ellos y que sea así durante mucho tiempo, y que vean si yo pude ustedes también pueden.

A mi Tía Bertha Alicia Duarte y mi mamita Norberta Duarte que siempre me han ayudado en todo desde que vivo y estudio en Hermosillo, por su ayuda muchas gracias que sin ustedes hubiera sido mucho más difícil llegar a donde estoy.

A una persona muy especial que sin duda me incito a llegar a esto y a más y siempre le estaré agradecido por todo lo que me brindo y me ayudo, tanto académico como personalmente con mucho amor y cariño Anna Judith Pérez Báez.

A los que sin duda me acompañaron en los dos años de maestría y son mis amigos en CIAD: el Warrior, el Perreo, al Pelikano y Angelina.

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABLAS.....	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Los Probióticos, una Alternativa para Mejorar la Salud.....	3
Características Generales de los Probióticos.....	4
Mecanismo de Acción de los Probióticos.....	5
Usos en la Industria Porcina.....	6
El Sistema Inmunológico.....	7
Receptores de Tipo Toll.....	8
Cascadas de Señalización por Receptores Tipo Toll.....	10
Características y Funciones del Receptor TLR2.....	13
Factor de Transcripción Nuclear kappa B (NF- κB).....	13
Efectos Moduladores de los Probióticos sobre el Sistema Inmune.....	15
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Animales de Experimentación.....	22
Cepas Probióticas.....	22
Obtención de Células de Ganglios Mesentéricos.....	23
Incubación con bacterias probióticas.....	24
Caracterización Celular por el Método de Citometría de Flujo.....	25
Cuantificación de Citocinas.....	25
Extracción de ARN Total.....	26

CONTENIDO (continuación...)

Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-qPCR) de IL-10, TLR2 y NF- κ B.....	26
Análisis de Datos.....	28
RESULTADOS y DISCUSIONES	29
Caracterización Celular por el Método de Citometría de Flujo.....	29
Cuantificación de IL-10 por ELISA y Expresión de ARNm de IL-10 por RT-qPCR.....	32
Detección de ARNm de TLR2 por RT-qPCR.....	34
Detección de ARNm de NF- κ B por RT-qPCR.....	36
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Pág.
1. TLRs extracelulares e intracelulares.....	10
2. Vía de señalización dependiente e independiente de MyD88.....	12
3. Señalización de NF- κ B, vía canónica y no canónica.....	15
4. Producción de IL-10 inducida en sobrenadantes de monocitos humanos derivados a DCs.....	17
5. Distribución de células de ganglios mesentéricos antes de la adhesión mediante citometría de flujo.....	30
6. Distribución de células de ganglios mesentéricos después de la adhesión.....	30
7. Porcentaje de células SWC3+ y MHC-II+ después de la adhesión.....	31
8. Cuantificación de IL-10 en sobrenadantes de cultivo celular.....	32
9. Expresión de ARNm de IL-10.....	34
10. Expresión de ARNm del receptor TLR2.....	35
11. Expresión de ARNm de NF- κ B.....	37

LISTA DE TABLAS

Tablas	Pág.
1. Ejemplos de microorganismos probióticos.....	3
2. Recomendación de usos de probióticos.....	5
3. Secuencias de iniciadores y sondas utilizadas para IL-10, TLR2 y NF- κ B.....	27

RESUMEN

Introducción: Los probióticos son microorganismos que mejoran el equilibrio de la microbiota intestinal al ser administrados en forma adecuada, ya que favorecen la respuesta inmune, previniendo trastornos gastrointestinales. Su uso se ha extendido a la suplementación de dietas de animales de granja, con el fin de ayudar en el combate de infecciones intestinales que afectan la producción animal. El mecanismo de inmunomodulación es a través de las células presentadoras de antígenos (CPA), mediante sus receptores tipo Toll (TLRs), que identifican patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), uno de los cuales es el TLR2. Este receptor media la respuesta inmune inducida por probióticos, aunque se desconoce por qué inducen diferentes respuestas inmunes. **El objetivo** de este estudio fue evaluar si las células de ganglios mesentéricos de cerdo estimuladas con los probióticos *L. reuteri* 1447 (1447), *L. reuteri* 53608 (53608) y *B. animalis subsp. lactis* Bb12 (Bb12), activan el factor de transcripción NF- κ B, a través de la vía TLR2.

Métodos y Resultados: Se determinó la proporción de células de ganglios mesentéricos mediante citometría de flujo que expresan SWC3 y MHC-II, marcadores que en conjunto, indican células CPAs y se encontró que el 1.1% expresaban ambos marcadores. Posteriormente, se estimularon las células de ganglios mesentéricos con las cepas probióticas y se evaluó la capacidad para producir IL-10. Mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR) se encontró que la cepa probiótica Bb12 indujo una mayor producción ($p < 0.05$) de esta citocina tanto a nivel de proteína como a nivel de ARNm en comparación con las cepas 1447 y 53608 ($p > 0.05$), y las células no tratadas (SE). Para determinar si las diferencias en la capacidad de inducir la producción de IL-10 se daban al inicio de la señalización, se cuantificó el transcrito de TLR2 en las células estimuladas con probióticos. Se encontró

que los niveles de TLR2 en células estimuladas con Bb12 estaba en niveles semejantes a las células sin estimular ($p>0.05$) mientras que las células estimuladas con los probióticos 1447 y 53608, se encontraban en mayor cantidad en comparación a las células SE ($p<0.008$). Finalmente se determinaron los niveles de transcrito de NF- κ B y se encontró que la cepa probiótica Bb12 induce un aumento de la expresión de ARNm de NF- κ B en comparación con las células SE, mientras que las células estimuladas con las cepas 1447 y 53608, no indujeron la expresión de este factor de transcripción ($p>0.05$). **Conclusión:** El probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 induce la producción de IL-10 activando el factor de transcripción NF- κ B mediante la vía de señalización de TLR2 en células de ganglios mesentéricos de cerdo, mientras que las cepas 1447 y 53608 tienen una baja producción de IL-10 y está relacionado con la baja expresión de NF- κ B.

Palabras clave: Probióticos, Células Presentadoras de Antígenos (CPA), Receptor tipo Toll (TLR 2), Interleucina-10 (IL-10), NF- κ B.

ABSTRACT

Introduction: Probiotics are microorganisms that improve the balance of the microbiota and favor the immune response by preventing gastrointestinal disorders affecting animal production. Its use has spread to the supplementation of diets of farms animals, in order to help combat intestinal infections that affect animal production. The mechanism of immunomodulation involves antigen presenting cells (APC), through their Toll-like receptors (TLRs), which identify microorganisms associated molecular patterns (MAMPs), one of which is TLR2. This receptor mediates the immune response induced by probiotics, although it is unknown why different immune responses are induced through TLR2. **The Objective** of this study was to evaluate whether swine mesenteric lymph node cells stimulated with the probiotic bacteria *L. reuteri* 1447 (1447), *L. reuteri* 53608 (53608) and *B. animalis* Bb12 subsp *lactis* (Bb12), activate the transcription factor NF- κ B, through the TLR2 pathway. **Materials and Results:** The proportion of mesenteric lymph cells was determined by flow cytometry expressing SWC3 and MHC-II, markers that in conjunction indicate swine APCs. It was found that 1.1 % of the cells expressed both markers. Next, the cells were stimulated with probiotic bacteria and the capacity to produce IL-10 was evaluated. It was found by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) that Bb12 induced more IL-10 ($p < 0.05$) both at the protein and messenger RNA (RNA_m) than strains 1447 and 53608 ($p > 0.05$), or untreated cells (SE). To determine is the differences in the capacity to produce IL-10 was at the beginning of the signaling cascade, TLR2 transcript was quantified by RT-qPCR in probiotic stimulated cells. It was found that the level of TLR2 in Bb12-stimulated cells were similar than SE cells ($p > 0.05$) while cells stimulated with probiotics 1447 or 53608 were increased in comparison to untreated cells ($p < 0.05$). Last, the transcript levels of NF- κ B were determined; it was found that Bb12 induced augmented expression in comparison to SE, while 1447- or 53608-stimulated cells did not ($p > 0.05$).

Conclusion: The probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 induces IL-10 production activating NF- κ B transcription factor by means of TLR2 signaling pathway in swine mesenteric lymph node cells, while 1447 and 53608 strains induce low production of IL-10 and is related to the low expression of NF- κ B.

Keywords: Probiotics, Antigen-Presenting cells (CPA) TLR2, IL-10, NF- κ B, qRT-PCR.

INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal juega un papel trascendental en la respuesta inmune de organismos superiores, ya que, la microbiota en conjunto con el sistema inmune actúan protegiendo al hospedero de los organismos oportunistas. Una alternativa para favorecer esta protección, es suplementar alimentos con microorganismos que tengan efecto benéfico sobre el hospedero que los ingiere, mejorando el equilibrio de su microbiota intestinal. A estos microorganismos que confieren beneficios a la salud, se les denomina probióticos (Fuller, 1989).

El uso de probióticos en la alimentación favorece el establecimiento y mantenimiento de la microbiota intestinal, reduciendo así la colonización de patógenos y estimulando el sistema inmune, por esta razón, se incluyen en la industria porcina para ayudar a prevenir trastornos gastrointestinales, que afectan la producción animal (Nava Sánchez et al., 1995; Bazay, 2010). Dentro de los efectos inmunológicos inducidos por probióticos se encuentra la activación de células dendríticas (DCs), ya que mediante sus receptores tipo Toll (TLRs), identifican patrones moleculares de microorganismos (MAMPs) (Jin et al., 2007). Uno de estos receptores es el TLR2 que tiene un amplio rango de reconocimiento porque se dimeriza con TLR1 y TLR6 (Jin et al., 2007).

TLR2 identifica estructuras de la pared celular como: peptidoglucano, ácidos teicoico y lipoteicoico, entre otros. Cuando el reconocimiento se lleva a cabo, se inicia una cascada de señalización que culmina con la producción de citocinas

entre las que se encuentran la Interleucina IL-6, IL-10 y TGF- β . La citocina IL-10 ha ganado atención puesto que es producida en respuesta a procesos inflamatorios; además, es importante para la diferenciación de células T reguladoras (Tregs). Las Tregs juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, ya que suprimen la respuesta inmune ante la microbiota, permitiendo así la co-existencia entre el hospedero y la propia microbiota. En estudios previos en nuestro grupo de trabajo utilizando DCs derivadas de monocito humano, se encontró que *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bb12 (Bb12), induce la producción de IL-10. Sin embargo, es necesario conocer la respuesta de células del sistema inmune adaptadas al tracto intestinal. Además, no se conocen diferencias en la señalización inducida por los probióticos. Por lo anterior, en este trabajo se estudió la respuesta de las células de ganglio mesentérico de cerdo estimuladas con diferentes probióticos determinando la producción de IL-10 y los niveles de expresión de ARNm del receptor tipo Toll 2, el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) e IL-10.

ANTECEDENTES

Los Probióticos, una Alternativa para Mejorar la Salud

El término probiótico fue utilizado por primera vez por Parker, significa “para la vida” o “en favor de la vida” definiéndolos como organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal (Parker, 1974). Algunos de estos probióticos utilizados en la industria, se pueden observar en la Tabla 1. En el 2012, la Organización para la Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definieron a un probiótico como un organismo vivo, que cuando se administran en cantidades adecuadas confiere un beneficio a la salud del huésped (FAO, 2006). Los probióticos en número suficiente tienen efecto benéfico sobre la salud del hospedero, a través de la colonización provisional del intestino, donde estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo (Gorbach, 2002; Schrezenmeir 2001). Estos microorganismos son conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos y se utilizan para prevenir infecciones entéricas y gástricas (Penna, 1998).

Tabla 1. Ejemplos de microorganismos probióticos

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. longum</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. lactis</i>

Fuente: Gorbach, 2002.

Los probióticos han sido señalados como posibles reemplazos de los antibióticos, debido a que pueden inhibir el crecimiento de patógenos a través de diferentes estrategias como competencia por desplazamiento de su sitio de unión al epitelio, inhibición de su crecimiento y/o muerte mediante la producción de compuestos antibacterianos o reducción del pH, mejora de la función de barrera intestinal e inmunomodulación (Delgado Fernández, 2013).

Los probióticos trabajan manteniendo y reforzando los mecanismos de defensa ante patógenos sin perturbar las funciones fisiológicas y bioquímicas normales (Lázaro et al., 2007). En la Tabla 2, se muestra la recomendación de usos de probióticos en diversas condiciones clínicas patológicas, se puede observar que su utilización es debatible, que aun cuando su efectividad es buena en ciertas condiciones clínicas, existen otras donde los resultados no son concluyentes.

Características Generales de los Probióticos

Para que un microorganismo se considere como probiótico debe ser habitante normal del intestino, tener un tiempo corto de reproducción, no ser patógeno ni toxigénico, sobrevivir al medio ácido del estómago y la bilis en el duodeno, tener capacidad de adhesión a células epiteliales y adaptarse a la microbiota intestinal, sin desplazar a la microbiota nativa. Una característica importante es que el probiótico tenga capacidad para aumentar de modo positivo las funciones inmunes y las actividades metabólicas del hospedero en donde residen (Young y Huffmans, 2003; Dunne et al., 2001).

Entre los probióticos utilizados en el consumo humano se encuentran las bacterias ácido-lácticas (BAL), algunas de las cuales son mostradas en la Tabla 2; también se utilizan otras cepas bacterianas no patógenas, como *Streptococcus*,

Enterococcus y algunas levaduras como *Saccharomyces boulardii* (Dunne et al., 2001)

Tabla 2. Recomendación de usos de probióticos.

Condición Clínica	Efectividad	Cepa y organismo de referencia
Diarrea		
Tratamiento de Infecciones en la infancia	A	<i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus</i> GG (LGG)
Prevención de la infección	B	<i>S. boulardii</i> , LGG
Prevención de AAD	A	<i>S. boulardii</i> , LGG
Prevención recurrente de CDAD	B/C	<i>S. boulardii</i> , LGG
Prevención de CDAD	B/C	<i>S. boulardii</i> , LGG y bacterioterapia
Alergia		
Eczema atópico asociado con alergia a la leche de vaca		
Tratamiento	A	LGG, <i>Bifidobacterium lactis</i>
Prevención	A	LGG, <i>B. Lactis</i>
Respuesta Inmune	A	<i>Lactobacilos acidophilus</i> , <i>Lactobacilos plantarum</i> , <i>B. lactis</i> ,

Fuente: Floch et al, 2014, modificada. La letra "A" significa que hay estudios concluyentes acerca del tratamiento y con resultados positivos en la literatura. La letra "B" se basa en estudios con control positivo, con la presencia de algunos estudios negativos. La letra "C" se basa en algunos estudios positivos, pero insuficiente cantidad de trabajo para establecer la certeza.

ADD: diarrea asociada a antibióticos; CDAD: *Clostridium difficile* asociado a diarreas

Mecanismo de Acción de los Probióticos

Es importante que los probióticos sean capaces de resistir el ácido estomacal y llegar al intestino delgado, posteriormente, deben adherirse, aunque sea

provisionalmente a células epiteliales del colon; lo anterior para sobrevivir y establecer una simbiosis con su hospedero que le permita producir metabolitos antimicrobianos, competir por nutrientes y sitios de adhesión para impedir la multiplicación de patógenos y producción de toxinas (Rolfe, 2000; Young y Huffmans, 2003).

Las cepas de lactobacilos y bifidobacterias producen ácido láctico, ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas, que afectan el metabolismo bacteriano patógeno o la producción de toxinas. Estos metabolitos antimicrobianos producidos son usados en la industria alimentaria como conservadores (Rolfe, 2000).

Una de las características que sobresalen en el uso de probióticos es su capacidad de modular el sistema inmunológico del hospedero. Aunque esta habilidad ha demostrado ser cepa-dependiente, es una característica deseable de estos microorganismos. A esta capacidad de modular el sistema inmune se le denomina inmunomodulación, por ejemplo, algunos probióticos pueden inducir un aumento en la producción de inmunoglobulinas (IgA principalmente), activar células presentadoras de antígenos, incrementar interferón gamma (IFN- γ), elevar la secreción de citocinas pro-inflamatorias (Reid et al., 2003; Isolauri et al., 2001), activación de células mononucleares y linfocitos (Penna, 1998), por lo anterior y muchos estudios más, es que los probióticos están siendo utilizados en diferentes sectores productores como el de la industria alimentaria.

Usos en la Industria Porcina

El uso de probióticos no solo se ha limitado a humanos. En animales también se ha implementado su uso para mejorar la producción animal. Por ejemplo, en aves se observó un incremento en la altura de las vellosidades del duodeno de casi 40%; mientras que la inclusión de probióticos en la dieta de cerdos aumenta su resistencia al ser sometidos a estrés (Bazay, 2010).

Por otra parte, la adición de *Enterococcus faecium* en la dieta de lechones se ha asociado con una disminución de diarreas después del destete, lo que permite reducir o incluso prescindir de los antibióticos (Reyes et al., 2012). Mediante el uso de probióticos, el productor porcino puede prevenir y combatir los trastornos gastrointestinales y diarreas que se pudieran presentar en los animales y que afectan la producción (Nava et al., 1995). La adición de este tipo de microorganismos a la dieta de los cerdos, favorece el establecimiento y mantenimiento de la microbiota intestinal, reduciendo así la colonización de patógenos por el mecanismo de la exclusión competitiva (Lázaro et al., 2007).

Hoy en día existen muchas investigaciones que evalúan efectos productivos por la administración de antibióticos en cerdos, pero hay muy pocos estudios sobre el efecto inmunológico que ejercen los probióticos al ser suministrados en la alimentación.

El Sistema Inmunológico

El sistema inmunológico es un conjunto de estructuras y procesos biológicos en un organismo, que le confiere protección contra infecciones causadas por microorganismos como virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos. Por lo tanto, este sistema se compone de moléculas y células dedicadas a la defensa contra patógenos, y es crucial para la sobrevivencia de los vertebrados (Abbas et al., 2008).

En una infección, los microorganismos patógenos deben ser capaces de superar barreras físicas, químicas y celulares que forman al sistema inmune innato. Éste no requiere un reconocimiento previo del agente patogénico. Si la infección persiste, actúa el sistema adaptativo, que se adquiere a lo largo de la vida de un organismo. Para que sea efectivo, es necesario un reconocimiento previo del antígeno que desencadene la respuesta inmune. Una vez que esto ocurre, se

establece la memoria inmunológica la cual permite que, cuando se presente una reinfección, el sistema inmune actúe más rápidamente (Abbas et al., 2008).

En la respuesta inmune innata participan leucocitos como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (DCs), mastocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos asesinos naturales (NK). Todos ellos expresan diversos receptores en su membrana como los receptores tipo Toll (TLR) (Janeway y Mezhitov, 2002). Por otro lado, entre las principales células del sistema inmune adaptativo están los linfocitos B y T. Las células B se encargan de la producción de anticuerpos. Los linfocitos T son los encargados de coordinar la respuesta inmune celular (Abbas et al., 2008).

Las CPA constituyen una población leucocitaria heterogénea, entre las que se incluyen los macrófagos, las células B y las células dendríticas. En las CPA hay diferentes receptores para el reconocimiento de Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos (MAMPs) como los receptores de lectinas tipo C (CLR) que pueden unirse a estructuras de glucanos presentes en patógenos, los receptores tipo "Scavenger" que reconocen lipoproteínas bacterianas y ADN no humano. Otros receptores importantes son NOD (Nucleotide-binding oligomerization domain por sus siglas en inglés) son moléculas al interior de células que detectan peptidoglicano, muramil dipéptido. Aunado a los anteriores, se encuentran los TLRs, que son de los receptores más importantes y estudiados ya que representan un vínculo importante entre la inmunidad innata y adaptativa (Sánchez et al., 2010; Collado et al., 2008).

Receptores de Tipo Toll

Los receptores tipo Toll son estructuras transmembranales que presentan homología con la proteína Toll de *Drosophila* y el receptor de la IL-1 (IL-1R). Los dos receptores anteriores fueron descritos en *Drosophila melanogaster* como moléculas necesarias para la protección contra infecciones por hongos porque estimulan la producción de péptidos anti-fúngicos (Mesa y Patiño, 2006).

Los receptores tipo Toll están presentes en la superficie celular y en compartimientos intracelulares de las CPA que identifican patrones moleculares presentes en microorganismos (o MAMPs por sus siglas en inglés). Los MAMPs son estructuras comunes entre los microorganismos tales como peptidoglucano y ácido lipoteicoico presentes en bacterias gram positivas, lipopolisacárido (LPS) presente en bacterias gram negativas, beta-glucano en levaduras, entre otras.

En contra parte, los TLRs reconocen dichos patrones moleculares sin importar el género o especie de microorganismos, como lo muestra la Figura 1, en donde se muestran algunos ligandos de los TLR, y se puede observar que hay TLRs tanto en la membrana plasmática como en membranas endosomales dentro de las células. A la fecha han sido descritos 13 TLR y este número tan pequeño de receptores tienen una amplia gama de patrones de reconocimiento. Así, por ejemplo, TLR4 reconoce LPS de bacterias gram negativas, proteínas de choque térmico, TLR2 reconoce glicolípidos, lipoproteínas, lipopeptidos, ácido lipoteicoico presentes en bacterias, zymosan en levaduras, (Janeway y Mezhitov, 2002).

Los agonistas, MAMPs o ligandos de TLRs inician modificaciones funcionales y estructurales en las CPA, éstas pasan de un estado inmaduro (inactivo) a un estado maduro (activo) en el caso de las DCs. El reconocimiento mediante los TLRs producen cambios en la expresión de genes que codifican proteínas, como citocinas, quimiocinas y moléculas co-estimuladoras, que hacen que las DCs migren a las áreas donde presentarán el antígeno a las células T para montar una respuesta inmune (Krawczyk et al., 2010).

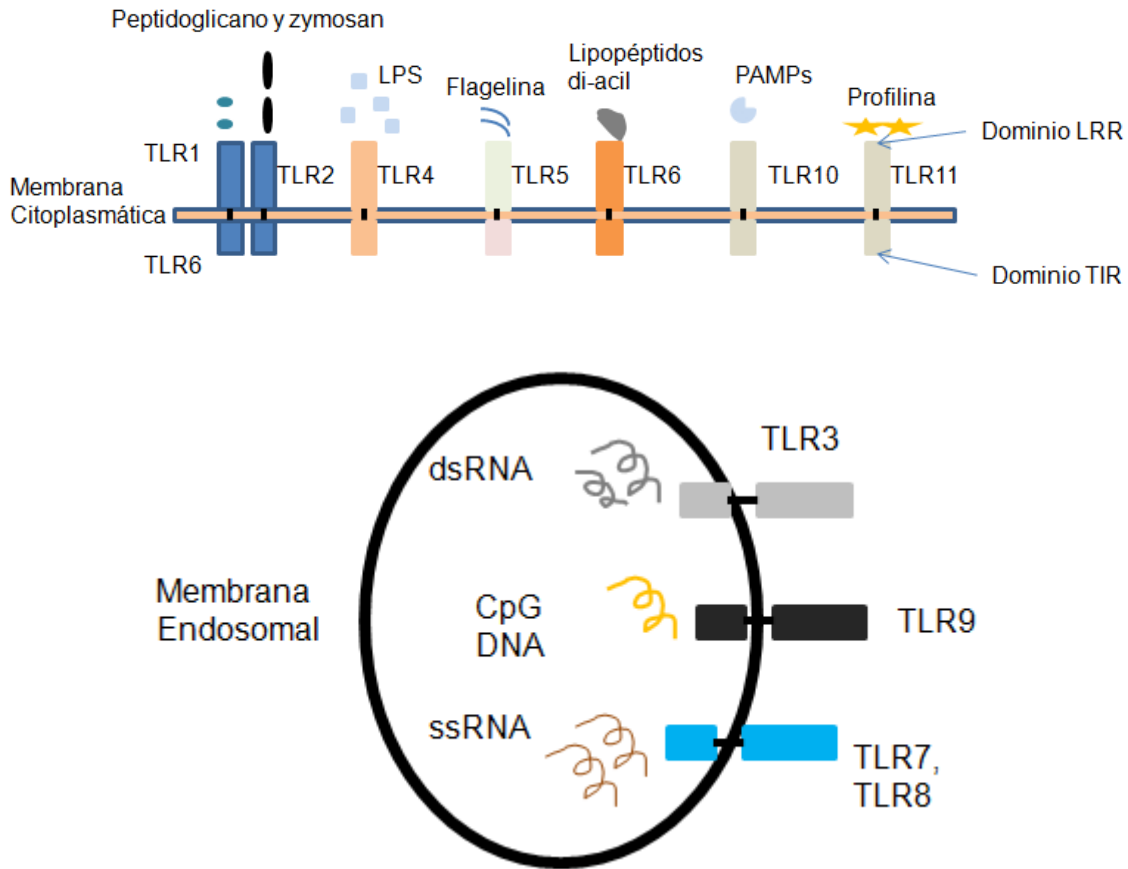


Figura 1. TLRs extracelulares e intracelulares. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, y TLR11 reconocen sus ligandos en la superficie celular. Por otro lado, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se localizan intracelularmente. Adaptado de Akira S. y Takeda K, 2004.

Cascadas de Señalización por Receptores Tipo Toll

La estimulación de TLRs por componentes microbianos, desencadena la expresión de varios genes que están involucrados en la respuesta inmune. Estos mecanismos moleculares por los que los TLRs inducen la expresión de genes, están siendo esclarecidos por medio del análisis de las vías de señalización mediadas por TLR (Akira y Takeda, 2004).

La dimerización de los TLR desencadena la activación de vías de señalización que se originan a partir de un dominio citoplasmático denominado Toll-IL-1R o TIR

(dada la homología con el de IL-1). Dicho dominio está formado por tres regiones box (1, 2 y 3) y se asocia a proteínas adaptadoras como la proteína MyD88 (gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide) en los TLR. En las vías de señalización corriente debajo de los dominios de TIR, MyD88, es una proteína que, en los seres humanos, está codificada por el gen MYD88 y es esencial para la inducción de citocinas pro-inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α e IL-12 a través del reconocimiento de componentes microbianos (Saitoh et al., 2004).

La activación de los TLR específicos induce patrones ligeramente diferentes de perfiles de expresión génica, por ejemplo la activación de TLR3 y TLR4 produce vías de señalización que dan como resultados la inducción de interferones tipo I (IFN- α e IFN- β). En contraste, la activación de TLR2 y TLR5 no produce las vías de señalización antes mencionadas. Por lo tanto, las vías de señalización de TLR individuales son divergentes. Existen dos vías de señalización: las independientes de MyD88 y las dependientes de MyD88 (como en el caso de TLR2) que se muestran en la Figura 2 (Doyle et al., 2002; Hoshino et al., 2002; Toshchakov et al., 2002).

La vía dependiente de MyD88 es análoga a las vías de señalización a través de los receptores de IL-1. MyD88, alberga una TIR de dominio C-terminal y un dominio N-terminal de muerte, asociado con el dominio TIR de TLRs. Tras la estimulación, MyD88 recluta proteínas cinasas asociadas al receptor de IL-1 -4 (IRAK por sus siglas en inglés IL-1 receptor-associated kinase), hacia los TLR a través de la interacción de los dominios N-terminal, y facilita la fosforilación de IRAK-4 mediada por IRAK-1. Una vez activado IRAK-1 se asocia con TRAF6 (por sus siglas en inglés TNF receptor associated factors), que lleva a la activación de dos vías de señalización distintas, activando a su vez factores de transcripción AP-1 (proteína activadora 1) y TAK1/TAB (Akira y Takeda, 2004).

La activación de AP-1 se da a través de la acción de MAP quinasas. La vía TAK1/TAB, aumenta la actividad de la quinasa inhibidora de kappa b (IKK). Una vez activado, el complejo IKK induce la fosforilación y posterior degradación de Ikb, lo que conduce a la translocación nuclear del factor de transcripción NF-κB.

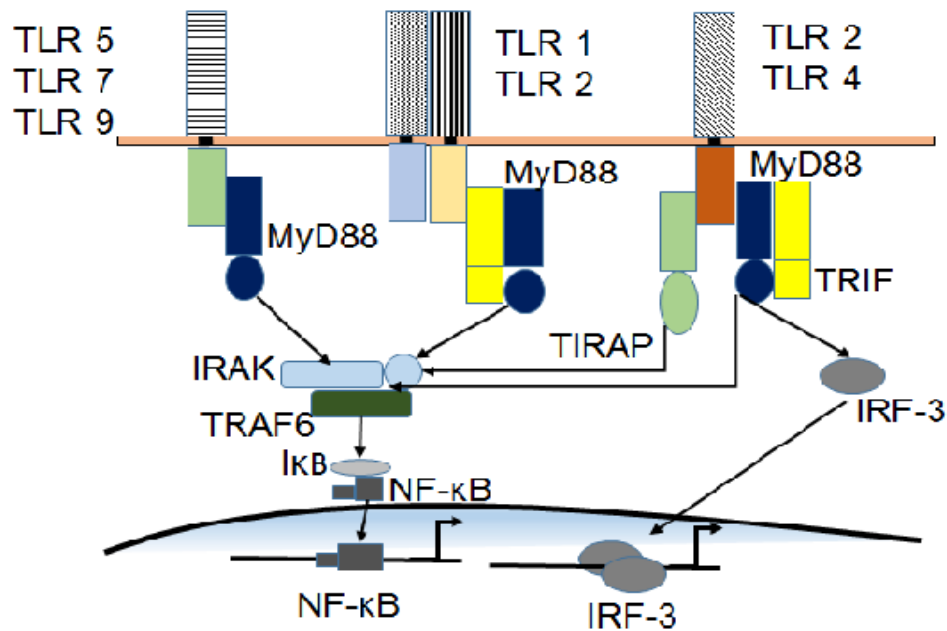


Figura 2. Vía de señalización dependiente e independiente de MyD88. El reconocimiento por medio de los receptores TLRs desencadena una cascada de señalización corriente abajo activando proteínas que va a culminar en la activación de factores de transcripción, NF-κB para la vía dependiente de MyD88 e IRF3 para la vía independiente de MyD88. Adaptado de Takeda K, y Akira S. 2005.

Moreira et al., 2008, mencionan que la producción de IL-10 en respuesta a fragmentos de pared celular estructuralmente complejos (PnCW) (peptidoglicano, ácido teicoico, ácido lipoteicoico) es dependiente de la vía MyD88, lo que sugiere que la vía TLR2-MyD88 es absolutamente necesaria para la producción de IL-10 inducida en macrófagos derivados de médula ósea. Además mencionan que el receptor NOD2 es responsable, junto con TLR2, de la producción de IL-10, por lo anterior se dice que la producción de IL-10 no está ligada a una sola vía ya que, TLR2 y NOD2 tiene vías alternas de señalización.

Características y Funciones del Receptor TLR2

Los receptores TLR2 reconocen una variedad de componentes microbianos. Estos incluyen lipoproteínas y lipopéptidos de patógenos, peptidoglicano y ácido lipoteicoico de las bacterias Gram-positivas, lipoarabinomanano de las micobacterias, uniones glicosilfosfatidilinositol de *Trypanosoma cruzi*, una modulina de *Staphylococcus epidermidis*, zimosano de hongos y glicolípidos de *Treponema maltophilum* (Alipantris et al., 1999; Bleharski et al., 1999; Campos et al., 2001;; Takeuchi et al., 1999; Takeuchi et al., 2000; Underhill et al., 1999).

El mecanismo propuesto que puede explicar por qué TLR2 reconoce una amplia gama de componentes microbianos, es debido a la formación de dímeros con otros TLRs como TLR1 y TLR6, los cuales están relacionados estructuralmente con TLR2. Por ejemplo, macrófagos de ratones deficientes en TLR6 no producen citocinas inflamatorias en respuesta a lipopéptidos diacilos, pero sí una producción normal de citocinas inflamatorias en respuesta a lipopéptidos triacilos. En contraste, los macrófagos de ratones deficientes en TLR1 mostraron una respuesta normal a lipopéptidos diacilos, pero una respuesta alterada a los lipopéptidos triacilos. Por lo tanto, TLR1 y TLR6 están asociados funcionalmente con TLR2 para discriminar entre lipopéptidos diacilos o triacilos (Takeuchi et al., 2002).

Factor de Transcripción Nuclear kappa B (NF- κB)

Las principales rutas que se activan a través de los TLR son las de NF-κB, este es un factor de transcripción nuclear que regula la expresión de numerosos genes involucrados con la apoptosis, replications virales, tumorigénesis, inflamación y en respuestas autoinmunes. Las estructuras de las proteínas de los NF-κB

comparten homología con la oncoproteína retroviral v-Rel, contienen un dominio N-terminal unido al dominio de unión al ácido desoxirribonucleico (ADN) que sirve como una interfaz entre los factores de transcripción NF- κ B. También se une a la proteína inhibidora I κ B α y tienen un dominio C-terminal de actividad de transrepresión o transactivación.

En condiciones de reposo, los dímeros de NF- κ B se unen a proteínas inhibidoras I κ B, y se encuentran inactivos en el citoplasma. Tras un estímulo en los receptores de la membrana de las células, se inicia la degradación de las proteínas I κ B, a través de la fosforilación del complejo IKK, que consta de dos quinasas catalíticamente activas, IKK α e IKK β , y la subunidad reguladora IKK γ (NEMO). Las proteínas fosforiladas I κ B son blanco de la ubiquitinación y degradación proteosomal, de este modo libera los dímeros NF- κ B para que puedan trasladarse al núcleo. La activación de NF- κ B se lleva a cabo por dos vías, la canónica y la no canónica (Figura 3).

La vía canónica es inducida por la mayoría de los estímulos fisiológicos hacia NF- κ B. La estimulación de receptores en las células, conduce a la unión de TRADD, que proporciona una plataforma de montaje para el reclutamiento de FADD y TRAF2, asociados con TRAF2 y RIP1 para la activación de IKK. En la vía canónica, I κ B es fosforilada de una manera IKK β - y NEMO-dependiente, dando como resultado la translocación nuclear de p65 que contienen principalmente heterodímeros, con actividad transcripcional. En contraste, la vía no canónica, implica la fosforilación mediada por IKK de p100 asociados con RelB, lo que conduce a la transformación parcial de p100 y la generación de los complejos p52-RelB transcripcionalmente activos (Oeckinghaus et al., 2011).

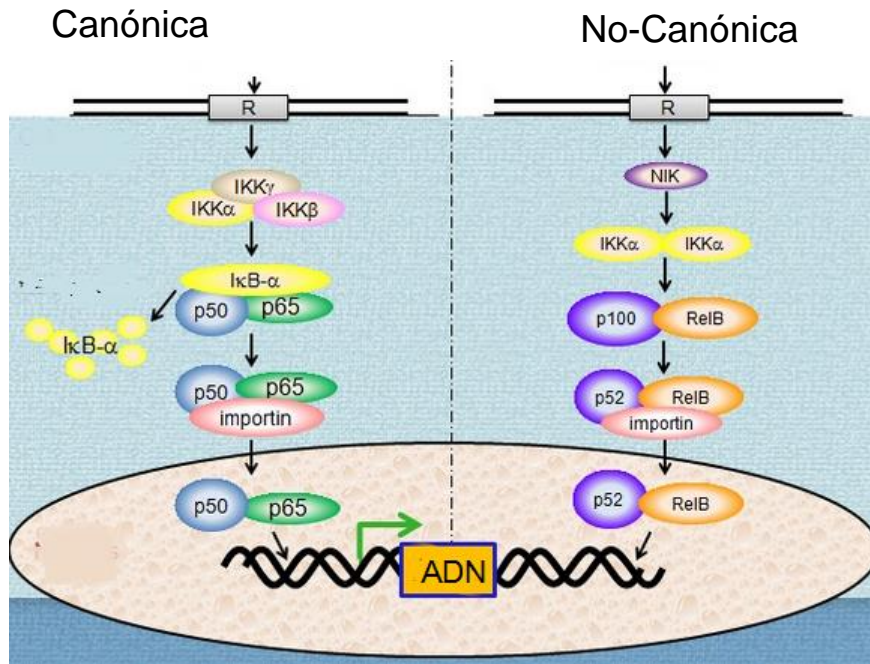


Figura 3. Señalización de NF-κB, vía canónica y no canónica. Receptores en la membrana de las células como TLR2 reconocen MAMPs, esto desencadena una cascada de fosforilación para activar distintas proteínas que se encuentran inactivas en el citoplasma como la subunidad p50-p65 (vía canónica) unida a su inhibidor IκB o p100-RelB (vía no canónica) para translocarse al núcleo mediante una importina como proteína activa para así traducir el ADN (Horie K. et al).

Martínez (2006) observó en células dendríticas de monocitos, que tras 90 minutos de estimulación con probióticos, se produce una activación de NF-κB. Sin embargo, para que esta activación sea continua, es necesaria la estimulación prolongada en el tiempo y síntesis de *novo* de proteínas, después de 6 horas observo que los incrementos de ARNm son un reflejo de la síntesis de *novo*.

Efectos Moduladores de los Probióticos sobre el Sistema Inmune

Los efectos inmunomoduladores que ejercen los probióticos son y han sido estudiados *in vitro* y en vivo en modelos animales como ratones, cerdos, aves. Estos estudios son de gran importancia puesto que ayudan a identificar los

mecanismos por los cuales los probióticos y el sistema inmune se relacionan (Wolwers, 2010).

La inmunomodulación en el sistema inmune del hospedero es el efecto más benéfico ocasionado por el consumo de probióticos ya que algunas cepas de probióticos inducen la producción de citocinas anti y pro-inflamatorias. Además se producen otros mediadores químicos de modulación como óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno, las cuales tienen una función antimicrobiana contra bacterias patógenas (Dos Santos et al., 2010)

Diversos estudios demuestran que numerosos probióticos pueden modificar el sistema inmune intestinal al favorecer el rechazo de patógenos. Esto lo pueden hacer mediante la estimulación de DCs, por ejemplo para producir una proliferación de linfocitos B que dé como resultado la producción de inmunoglobulinas de tipo A (Kaila et al., 1992; Rinne et al., 2005), o la activación de células NK (Gill et al., 2001). Los probióticos también aumentan la actividad fagocítica de los leucocitos intestinales, estimulan la producción de interleucina IL-2, IL-6 o factor de necrosis tumoral (TNF).

Asimismo *L. sakei* puede aumentar citocinas anti-inflamatorias como IL-10 en células mononucleares de sangre periférica humana (PMBC) o el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β) y reducir citocinas pro-inflamatorias como TNF (alfa o beta), IFN- γ o IL-8 en células-enterocitos humanos (CACO-2/leucocitos) (Haller et al., 2000). Es importante saber que no todos los probióticos ejercen los mismos efectos inmunológicos, existiendo una gran variabilidad entre especies e incluso entre cepas pertenecientes a las mismas especies. Por ejemplo *L. acidophilus* aumenta *in vivo* la proliferación de linfocitos aislados de bazo de ratón, en cambio cepas como *L. casei*, *L. gasseri*, la inhiben (Maassen et al., 2000; Madsen et al., 1999; Morita et al., 2002). Debido a esto es importante estudiar la respuesta del sistema inmune causada por los probióticos.

Zeuthen et al., 2006, utilizando sobrenadantes de cultivo de DC derivadas de monocitos de humanos estimulados con probióticos, observaron que la concentración de IL-10 varía dependiendo del probiótico utilizado, como se muestra en la Figura 4, donde la inducción de IL-10 puede estar activando diferentes vías de señalización que van a dar como resultado una mayor producción de IL-10 entre los distintos probióticos.

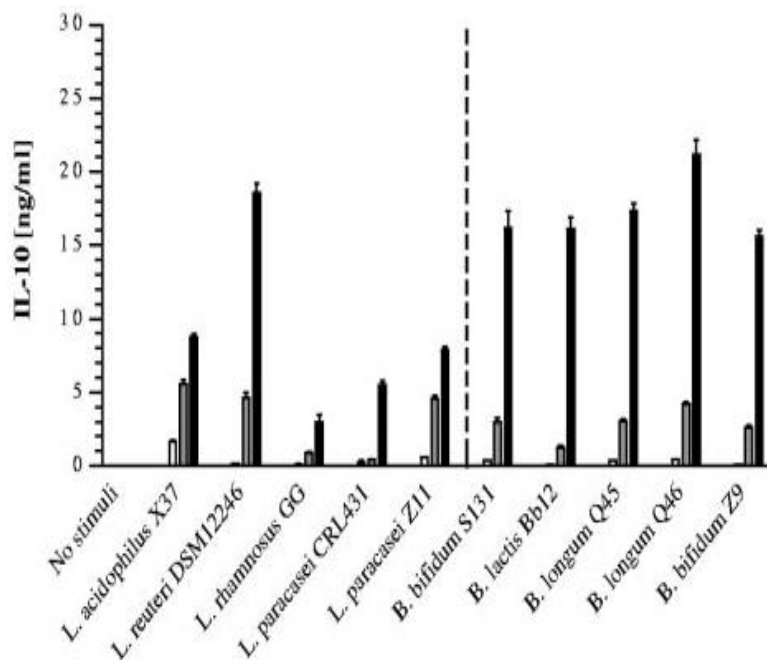


Figura 4. Producción de IL-10 inducida en sobrenadantes de DCs derivadas de monocitos humanos derivados a estimulados con 0.5, 5, o 50 g/mL de diferentes probióticos (6×10^5 células por pocillo) analizados por ELISA (Zeuthen et al., 2006)

En estudios previos, en nuestro grupo de trabajo, utilizando DCs derivadas de monocito, se encontró que *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bb12 (Bb12), induce la producción de IL-10, cuando se estimularon células de ganglios mesentéricos durante 12 horas, esta estimulación produce una respuesta anti-inflamatoria, que ayudaría a la regulación de la inflamación, como la que podría presentarse en una infección. En estos resultados se sabe que existen diferencias en la producción de IL-10 por lo tanto se asumen diferencias en la señalización,

pero no se sabe a qué nivel. Por lo anterior, en este trabajo se estudió la respuesta de las células de ganglio mesentérico de cerdo estimuladas con diferentes probióticos determinando la producción de IL-10 y los niveles de expresión de ARNm de TLR2, NF- κ B e IL-10.

HIPÓTESIS

La producción de IL-10 por células de ganglios mesentéricos de cerdo estimuladas con probióticos está determinada por la activación del factor de transcripción NF- κ B por la vía TLR2.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la activación del factor de transcripción NF- κ B y los niveles de TLR2 en células de ganglios mesentéricos de cerdo estimuladas con probióticos inductores de IL-10.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar la citocina IL-10 en sobrenadantes de células de ganglios mesentéricos de cerdo estimuladas con probióticos.
2. Determinar por reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa en tiempo real (RT-qPCR) la citocina IL-10 en células de ganglios mesentéricos de cerdo estimulados con probióticos.
3. Determinar los niveles de expresión de TLR2 por RT-qPCR de células de ganglios mesentéricos de cerdo estimulados con probióticos.
4. Determinar cambios en la expresión del factor de transcripción NF- κ B por RT-qPCR en células de ganglios mesentéricos de cerdo estimulados con probióticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de Experimentación

Se utilizaron 6 lechones de 6-9 semanas de edad de la raza Landrace, libres del virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino, ya que la infección por este virus, produce la disminución de la respuesta inmune. Cuatro lechones fueron utilizados para la determinación de IL-10 por ELISA, y los dos lechones restantes fueron utilizados para los experimentos de RT-qPCR de IL-10, TLR2 y NF- κ B. Los animales se alojaron en la granja experimental de CIAD Hermosillo y posteriormente se sacrificaron por exsanguinación, previa insensibilización mediante choque eléctrico de acuerdo a la NOM-033-ZOO-1995, *Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres*. Seguidamente, se tomaron los ganglios mesentéricos del cerdo en bolsas estériles conteniendo solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4 (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 10mM y KH₂PO₄ 4.2mM) estéril y frío para su transporte.

Cepas Probióticas

Se utilizaron los probióticos comerciales *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bb12 (Bb12) y *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608 (53608). Adicionalmente se utilizó la cepa *Lactobacillus reuteri* 1447 (1447) aislada de cerdo, caracterizada fenotípica y genotípicamente como probiótico en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Dra. Evelia Acedo en CIAD.

Bifidobacterium animalis Bb12 se cultivó en caldo agar Man Rogosa Sharpe (MRS) suplementado con 0.05% de cisteína a 37 °C por 48 horas en anaerobiosis. Las bacterias del género *Lactobacillus* se cultivaron en caldo MRS sin cisteína, en condiciones anaeróbicas a 37 °C por 18-24 horas (Mohamadzadeh et al., 2005). Posteriormente las bacterias se centrifugaron y se lavaron con PBS, después fueron re-suspendidas a una concentración correspondiente a la turbidez 2 de McFarland (6×10^8 UFC/mL).

Obtención de Células de Ganglios Mesentéricos

Se utilizó el método de Weigmann (2007) modificado. Una vez sacrificados los lechones, se obtuvieron los ganglios mesentéricos y se les removió el tejido mesentérico adiposo con la ayuda de un bisturí estéril. Se cortaron los ganglios mesentéricos en pedazos pequeños de 2-4 cm con un bisturí en una caja petri estéril. Se colocaron en un tubo de 50 mL, con una solución de PBS a 7.4 pH suplementado con antibióticos (penicilina /estreptomicina 10 mg/L, anfotericina B 20 mL/L y gentamicina 10 mL/L); se agitó manualmente por 1 minuto. Los lavados se repitieron 2 veces dando un total de tres lavados. Una vez hecho esto, los ganglios se transfirieron a un matraz Erlenmeyer con 50 mL medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich St Louis, MI, USA) suplementado con los antibióticos antes descritos y con un 2% suero fetal bovino (SFB). Se agregó colagenasa tipo I (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) con una concentración de 100 U/mL, se incubó por 2 h a 37 °C en agitación para homogenizar la muestra.

Después de 2 h, se colectaron los trozos de ganglios mesentéricos y se maceraron en un disociador celular con tamaño de poro de 100 μ m (BD Falcon). El filtrado celular se juntó con el líquido proveniente de la incubación con la colagenasa tipo 1. De esta suspensión se tomó muestra para la caracterización de la población celular por citometría de flujo (antes de la adhesión), y se procedió a realizar un conteo celular en la cámara de Neubauer. Posteriormente las células se colocaron en frascos de cultivo de 75 cm²

(Nunclon) a una concentración máxima de $85-100 \times 10^8$ células por frasco y se incubaron por 4 h a 37°C con atmósfera de 5% CO_2 para la eliminación de los macrófagos (células adherentes) ya que estos se adhieren al frasco de cultivo con más fuerza que otras células. Las células no adherentes se recolectaron en tubos de 50 mL, y el frasco de cultivo se lavó 3 veces con PBS frío para tomar todas las células, dando golpes suaves entre cada lavado con PBS frío y se recolectó la suspensión celular; de esta muestra se tomó una alícuota para el conteo de células y para citometría de flujo.

Incubación con bacterias probióticas

Para los experimentos se utilizaron 500,000 células por pozo en una placa de 96 pozos y se agregaron las bacterias probióticas, en una relación de 100 bacterias : 1 célula, es decir, se agregaron 5×10^7 UFC/mL bacterias probióticas a cada pocillo. Una vez que se colocaron las bacterias al cultivo celular se incubaron durante 2, 4 y 8 horas a 37°C con atmósfera de 5 % de CO_2 .

Para la cuantificación de IL-10 por ELISA, se obtuvo el sobrenadante de los cultivos de 8 h y se almacenó a -80°C . Para la determinación de la expresión de IL-10 y TLR2, se utilizaron cultivos de 8 h y para la determinación de NF- κ B se utilizaron cultivos de 2 y 4 h. A todos los tratamientos, una vez terminado el tiempo de incubación, se retiró el sobrenadante y a las células remanentes en el pozo se le agregaron 600 μL de buffer de lisis celular (RLT). Se homogenizó el contenido, se recolectaron y almacenaron a -80°C , hasta la determinación del ARNm de TLR2, IL-10 y NF- κ B por medio de la técnica de RT-qPCR.

Caracterización Celular por Citometría de Flujo

De las muestras de ganglios mesentéricos que se tomaron antes y después de la adhesión se tiñeron con anticuerpos anti-SWC3 marcado con el fluorocromo ficoeritrina (PE) y MHC-II marcado con el fluorocromo Alexa 488. Las células se incubaron por 30 min a 4 °C. Posteriormente se lavaron con PBS y se adquirieron en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences, USA) donde se caracterizaron de acuerdo a su tamaño, complejidad y se obtuvo el porcentaje de células SWC3+MHC-II+.

Cuantificación de Citocinas

El sobrenadante de las muestras de 8 h se utilizó para determinar IL-10 mediante ELISA utilizando el kit comercial de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente se colocaron 50 µL del anticuerpo de captura (2 µg/mL) por pozo y se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente (TA). Pasada esta incubación, se lavaron los pozos con PBS con 0.1% de Tween 20, se bloqueó con 300 µL de PBS suplementado al 0.5% de albúmina y se incubaron por 1 h a TA. Se utilizaron 50 µL de la muestra por pozo y se incubaron 1.5 h. Seguidamente se lavaron con PBS y se añadieron 50 µL de la dilución de trabajo (1200 ng/mL) del anticuerpo de detección por pozo y se incubaron 1 h. Se hicieron lavados con PBS y se añadió 50 µL de la solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (5 µg/mL) y se incubaron por 45 minutos en la oscuridad a TA. Por último se agregó el sustrato 3,3',5,5' tetrametil-bencidamida (TMB) y se incubaron 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 una absorbancia de 450 nm.

Extracción de ARN Total

La extracción del RNA de cada muestra se realizó mediante 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 entre la absorbancia medida a longitud de onda 260 sobre la medida a 280 igual a 2 se considera de buena calidad así como una concentración de 8 ng/μL como mínimo para su uso. Posteriormente, se almacenaron a -20 °C hasta su uso para RT-qPCR.

Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-qPCR) de IL-10, TLR2 y NF-κB.

Para la mezcla de reacción de TLR2, se utilizó el kit comercial Taqman RT-PCR kit (QIAGEN®, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo en el sistema SmartCycler system (Cepheid, Sunnyvale, CA). Las condiciones de amplificación fueron de un ciclo a 50 °C por 30 min, seguido de 95 °C por 15 min; 40 ciclos de 30 seg a 94 °C, para la extensión 1 min a 45 °C y la extensión final fue de 1 min a 72 °C. Los primers y sondas específicos utilizados son los descritos en la Tabla 3.

Para la mezcla de reacción de IL-10 y NF-κB, 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 °C por 30 min y 95 °C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 minuto. Los primers y las sondas

específicas para la expresión relativa de ARNm de IL-10 y NF-κB utilizados son los descritos en la Tabla 3.

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 $2^{-\Delta\Delta CT}$, según se describe a continuación:

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

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

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

Los resultados se expresaron como el incremento relativo de ARN mensajero (ARNm) entre células estimuladas con los probióticos y células sin estimulación.

Tabla 3. Secuencias de iniciadores y sondas utilizadas para IL-10, TLR2 y NF-κB

	Primer	Iniciador 5' – 3'
TLR 2 ^a	Reverso	TCACTGTGCTGGGTTTCATTG
	Antisentido	TTCAGGCCAAGGATTTCCAG
	Sonda	TCTTCACATGAGGCGGCC
NF-κB ^b	Reverso	CACGAGTCATCCAGGTCATACAG
	Antisentido	CTGGCAGCTCTCTCCTCAAAGC
	Sonda	CTCAAAGTTCTCCACCAGGGGATCTGCTC
IL-10 ^c	Reverso	TGAGAACAGCTGCATCCACTTC
	Antisentido	TCTGGTCCTTCGTTTGAAAGAA
	Sonda	CAACCAGCCTGCCCCACATGC

a. Sonda marcada con FAM y BHQ1 como "quencher" para TLR2, Thono et al., 2005 modificado. b. Sonda marcada con TET y BHQ1 como "quencher" para IL-10, Silva E et al, 2009. c. Sonda marcada con TET y BHQ1 como "quencher" para NF-κB.

Análisis de datos

Los datos obtenidos se analizaron en el paquete estadístico NCSS 2007, mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía para IL-10 y TLR2. Para NF- κ B se analizó mediante un factorial de 2^4 , considerando como factores los tratamientos con los probióticos *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12, *Lactobacillus reuteri* 1447 y *Lactobacillus* ATCC 53608 en incubación con las células de ganglios mesentéricos de cerdo, así como los diferentes tiempos de tratamiento. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Fisher. Las diferencias significativas se determinaron con un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Caracterización Celular por el Método de Citometría de Flujo

En la actualidad las CPAs de cerdo no han sido caracterizadas completamente, para esto se utilizan diversos marcadores para su reconocimiento. Existen diversas proteínas de superficie utilizadas para su caracterización, por ejemplo, SWC3 y MHC-II que en conjunto determinan el origen mielomonocítico de una célula. Por un lado, SWC3 es una proteína que se encuentra presente en monocitos, granulocitos, macrófagos y células dendríticas. Por otra parte, MHC-II, es la molécula de presentación de antígenos a células T CD4+. Por lo que la combinación de MHC y SWC3 nos indica CPAs de origen mielomonocítico. Con estos dos marcadores se puede obtener información sobre la naturaleza de las células en el cultivo.

En la Figura 5 se muestran las células antes de la adhesión, en donde se observa el perfil de las células encontradas y las cuales se dividieron para su caracterización de acuerdo a su tamaño y complejidad en cuatro regiones P1, P2, P3 y P4 con su porcentaje celular correspondiente de un total. La región P1 correspondiente a linfocitos con un porcentaje de 52.2%. La P2 representa células muertas y algunos eritrocitos con un porcentaje de 6.0%. La P3 representa algunas células B y algún otro tipo celular con un porcentaje de 27.9%. La P4, representa las posibles células presentadoras tales como macrófagos y células dendríticas con un porcentaje de 9.3%.

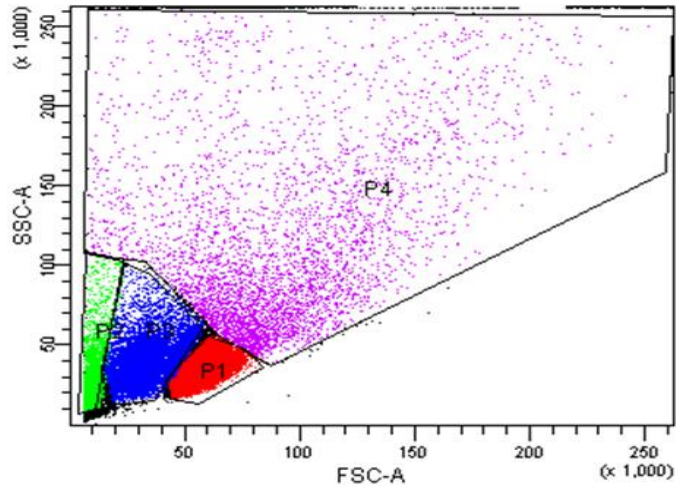


Figura 5. Distribución de células de ganglios mesentéricos antes de la adhesión mediante citometría de flujo.

En la Figura 6 se muestran las células después de la adhesión utilizando las mismas regiones ya establecidas y se encontró que para la región P4 disminuyó el porcentaje a 7.3%.

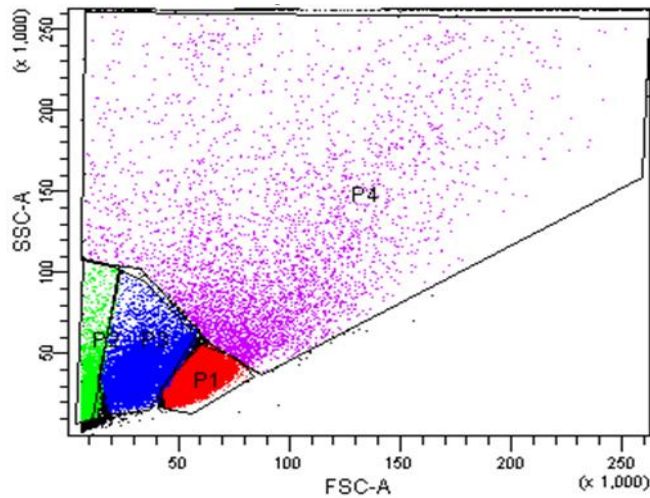


Figura 6. Distribución de células de ganglios mesentéricos después de adhesión. La región P4 es donde se ubican las células dendríticas de acuerdo a su tamaño y complejidad.

Una vez determinadas las posibles CPAs, se procedió a analizar la expresión de SWC3+ y MHC-II+ en las células después de la adhesión (Figura 6), de acuerdo a las regiones establecidas previamente en la Figura 5. Se muestra en

la Figura 7 con la letra B, la región P1, en donde no se encontraron células que expresan SWC3+ y MHC-II+ 0.0%. En la región P2 con la letra A el 0.3% expresan SWC3+ y MHC-II+. Con la letra C la región P3 el 2.1 % expresan SWC3+ y MHC-II+ y en la región P4 con la letra D, el 1.1% expresan SWC3+ y MHC-II+.

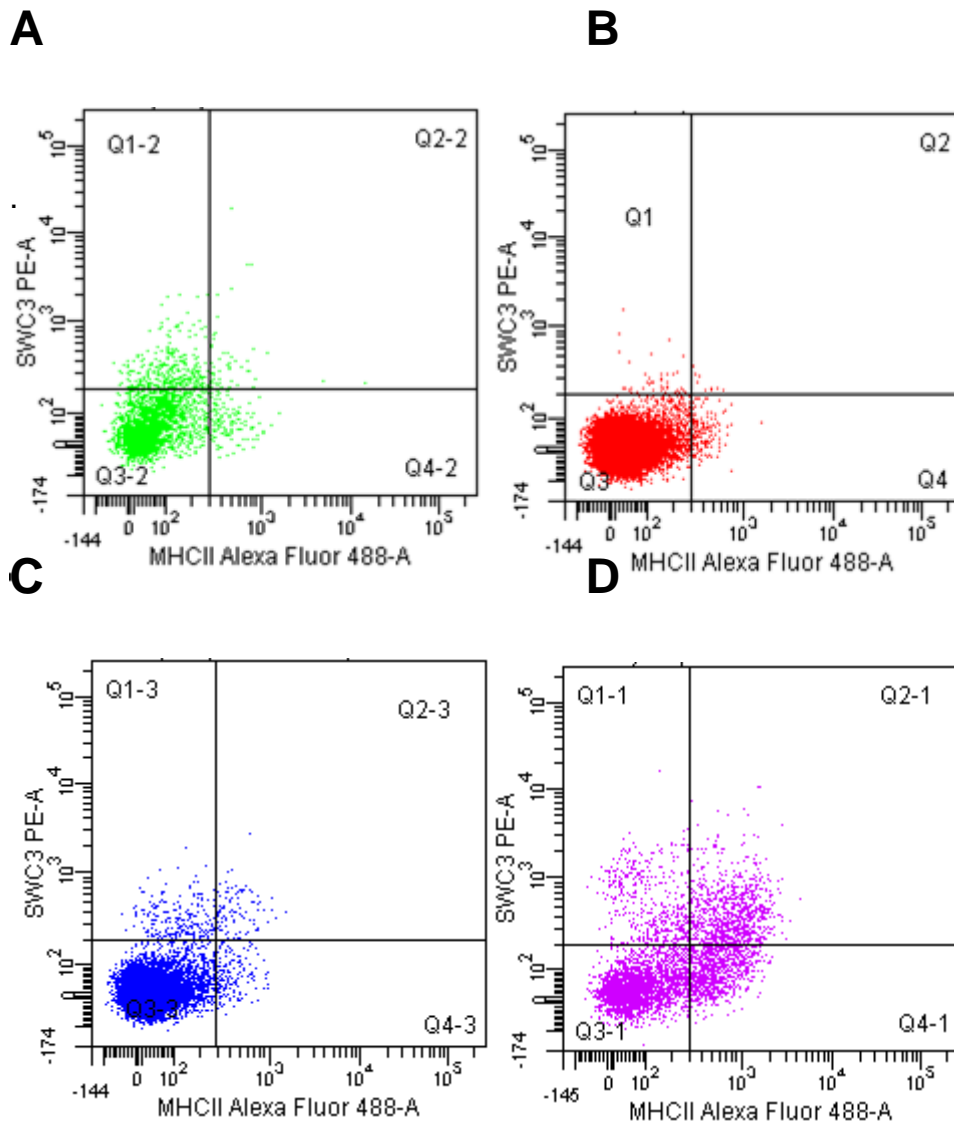


Figura 7. Porcentaje de células SWC3+ y MHC-II+ después de la adhesión. A, región P2 que representa células muertas y algunos eritrocitos; B, región P1 correspondiente a linfocitos; C, región P3 representa algunas células B y algún otro tipo celular y D, región P4, representa las posibles células presentadoras tales como macrófagos y células dendríticas.

Cuantificación de IL-10 por ELISA y Expresión de ARNm de IL-10 por RT-qPCR

Los tratamientos con probióticos inducen la producción de citocinas, este trabajo se centró en la evaluación de IL-10 porque se considera que el efecto probiótico tiene que ver con la acción anti-inflamatoria y reguladora del sistema inmune. En la Figura 8 se presentan las medias de la cuantificación de IL-10 en sobrenadante proveniente de un cultivo de células de ganglios mesentéricos de cerdo estimuladas durante 8 h con las distintas cepas probióticas y un control de células sin estímulo (SE).

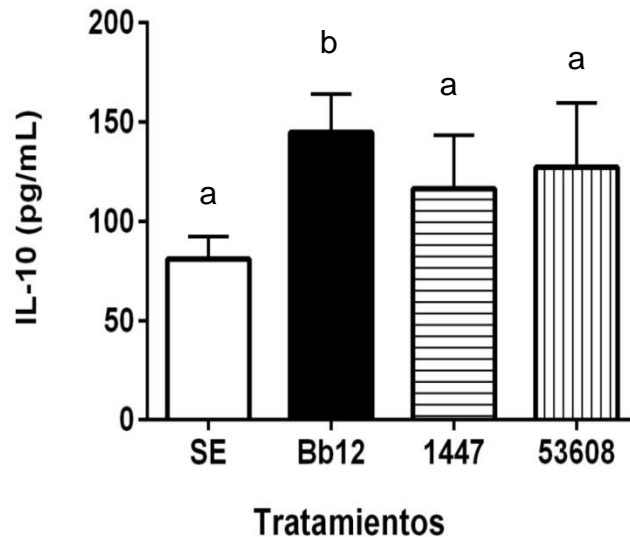


Figura 8. Cuantificación de IL-10 en sobrenadantes de cultivo celular. Las células de ganglios mesentéricos de cerdo se estimularon durante 8 h con los probióticos *L. reuteri* 1447 (1447), *L. reuteri* 53608 (53608), *B. animalis* subsp *lactis* (Bb12) y un control sin estimular (SE). En el gráfico se muestran las medias y el error estándar de una n=2. Diferentes literales indican diferencias estadísticas las cuales se determinaron por el método de Fisher ($p < 0.05$).

No hubo diferencias estadísticas ($p > 0.05$) entre la producción de IL-10 por los probióticos *L. reuteri* 1447 (1447) y *L. reuteri* 53608 (53608) y el control sin estimular SE. La cepa *B. animalis* subsp *lactis* Bb12 (Bb12) fue la única que

indujo significativamente la producción de IL-10 ($p < 0.05$), lo cual coincide con lo reportado con Zeuthen et al., 2006 observaron que indujo una alta producción de IL-10 en PMBC de humanos.

Estos resultados también son comparables con los obtenidos por Arenas (2013) donde Bb12 provoca una alta producción de IL-10 cuando se estimularon células de ganglios mesentéricos durante 12 horas, en comparación con nuestro estudio con una estimulación de 8 h se observa que Bb12 induce una mayor producción de IL-10 en células de ganglios mesentéricos de cerdo.

La producción de IL-10 se cuantificó también a nivel de transcrito mediante RT-qPCR. En la Figura 9 se muestran los resultados de expresión ARNm de IL-10 de células de ganglios mesentéricos de cerdo estimuladas por 8 h con las distintas cepas probióticas y un control sin estímulo (SE). Se encontró que las cepas 1447 y 53608 no tuvieron diferencias significativas con el tratamiento SE, en contraste, Bb12 sí indujo un incremento en la expresión de IL-10 ($p = 0.02$) respecto al tratamiento SE. Se observó que Bb12, induce alta producción de la citocina IL-10 y tiene la capacidad de mantener niveles altos de los transcrito de ARNm de IL10, con ello promover una alta concentración mediante una producción constante.

Martínez (2014) encontró que algunos de los lactobacilos utilizados, como *L. acidophilus*, *L. fermentum* y *L. salivarius*, incrementaron los niveles de expresión de ARNm de IL10 en las células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica (moDC), lo que difiere de nuestros resultados ya que las cepas de *Lactobacillus reuteri* 1447 y 53608 no incrementaron. Por tanto, nos comprueba que los efectos en el sistema inmune son cepa-específicos.

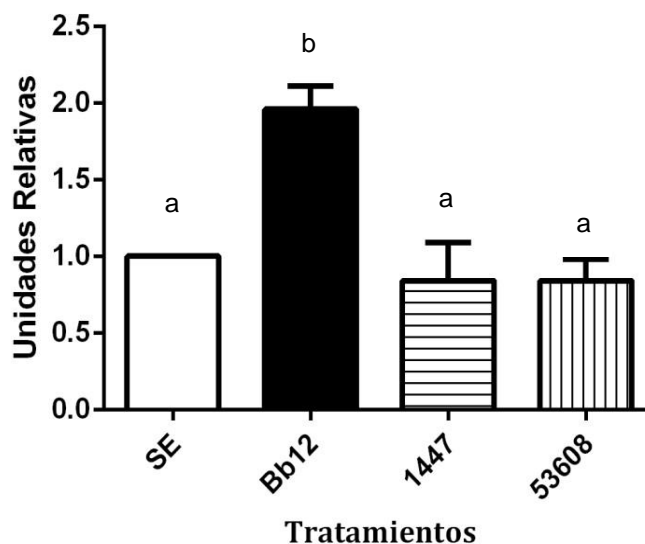


Figura 9. Expresión de ARNm de IL-10. Las células de ganglios mesentéricos de cerdo se estimularon durante 8 h con los probióticos *L. reuteri* 1447 (1447), *L. reuteri* 53608 (53608), *B. animalis* subsp *lactis* (Bb12) y un control sin estimular (SE). En el gráfico se muestran las medias y el error estándar de una n=2. Diferentes literales indican diferencias estadísticas las cuales se determinaron por el método de Fisher ($p < 0.05$).

Detección de ARNm de TLR2 por RT-qPCR

La estimulación con los probióticos induce la expresión de diferentes receptores en la membrana de las células, y esto da paso a que se produzcan diferentes reacciones intracelulares que van a culminar en la producción de diferentes proteínas con una función específica. Una de estas proteínas es el receptor de membrana TLR2. Para determinar si las diferencias en expresión y producción de IL-10 se daban en el inicio del proceso de señalización, se realizó la cuantificación de transcrito de TLR2. Se encontró que la expresión de ARNm de TLR2, en células estimuladas con el probiótico Bb12 no tuvo diferencias significativas, es decir mostró una menor expresión de ARNm en comparación con el tratamiento SE. Por el contrario, los probióticos 1447 y 53608 si tienen diferencias significativas ($p = 0.008$) con una mayor expresión de ARNm respecto al SE (Figura 10).

Martínez (2014) observó en moDC estimuladas con cepas de lactobacilos pocas diferencias en los niveles de expresión de ARNm en comparación con la condición basal. Los niveles de expresión del TLR2, cuyo principal ligando es el peptidoglicano (PGN) (componente mayoritario de las bacterias Gram-positivas), fueron ligeramente superiores en las moDC estimuladas por *L. fermentum*, mientras que en el resto de bacterias apenas modificaron su expresión. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro estudio, ya que probióticos del género *Lactobacillus* inducen una mayor expresión de ARNm de TLR2 que probióticos del genero *Bifidobacterium*.

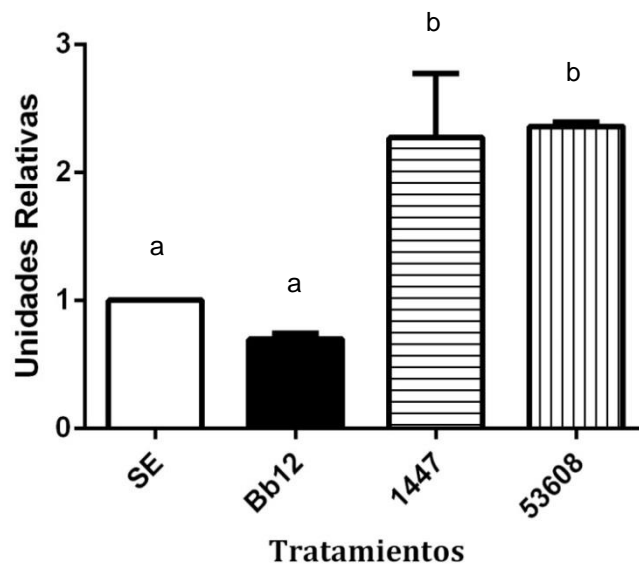


Figura 10. Expresión de ARNm del receptor TLR2. Las células de ganglios mesentéricos de cerdo se estimularon por 8h con los *L. reuteri* 1447 (1447), *L. reuteri* 53608 (53608), *B. animalis* (Bb12) y un control SE. Se muestran las medias y el error estándar de una n=2. Las diferentes literales indican diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos las cuales se determinaron por método de Fisher ($p < 0.05$).

Detección de ARNm de NF- κ B por RT-qPCR

NF- κ B es un factor de transcripción que reconocen y se une a secuencias concretas de ADN; es estimulado por señales citoplasmáticas y al activarse, adquiere la capacidad de regular la expresión génica. Por ejemplo la activación de genes que codifican la producción de distintas proteínas como las citocinas. Por esta razón, se determinó la expresión de NF- κ B en las células de estudio. El factor NF- κ B se activa mucho antes de darse la producción de proteínas, por lo cual su detección debe hacerse en tiempos de incubación anteriores a la determinación de éstas.

En base a lo anterior NF- κ B se determinó a las 2 y 4 horas de estimulación. En la Figura 11 se muestra la expresión relativa de ARNm de NF- κ B a 2 y 4 horas. Se observa que al estimular por 2 h, el probiótico Bb12 induce una producción mayor de ARNm de NF- κ B en comparación con el SE. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes probióticos y el SE en una estimulación de 4 h en la expresión de ARNm de NF- κ B. Se puede observar, sin embargo, que el probiótico 53608 sí se encuentra expresado en mayor nivel que el resto de las bacterias utilizadas comparadas con las células SE.

Aun cuando los otros probióticos no mostraron diferencias significativas a las 2 h de estimulación, se observa una expresión mayor de NF- κ B comparado con el mismo tratamiento a las 4 h. Esto reitera que la activación de NF- κ B es temprana. Otra observación es que 53608, activa NF- κ B a las 2 h y mantiene la expresión a las 4 h. Esto podría indicar que el probiótico 53608 induce la producción de otras citocinas que no fueron determinadas en este estudio.

Estos resultados son comparables con los estudios realizados por Martínez 2014, en moDC estimuladas con diferentes bacterias probióticas y observó que todas las bacterias probióticas incluyendo Bb12, produjeron ligeros cambios en la expresión de ARNm de precursores de NF- κ B (NFKB1, REL).

En resumen, se encontró que el probiótico *B. animalis subsp. lactis* Bb12 (Bb12) indujo un incremento en la producción y expresión de IL-10 en comparación con la muestra sin estímulo, por lo que se evidencia la capacidad inductora de IL-10 en células de ganglios mesentéricos.

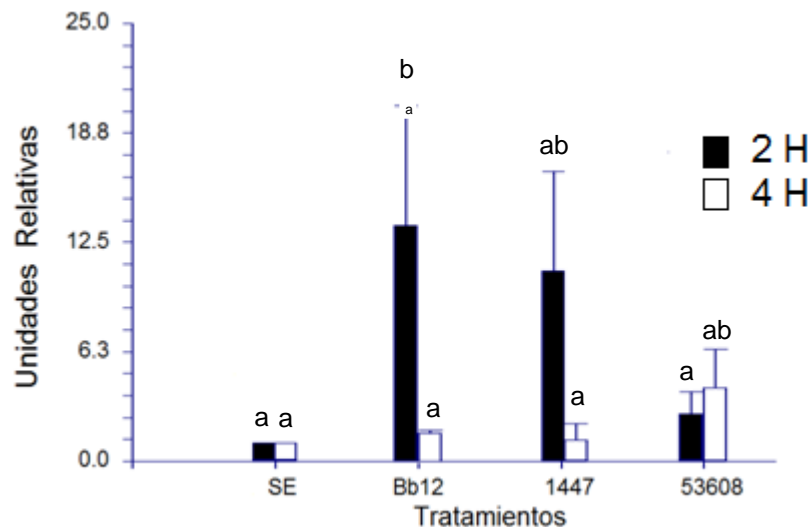


Figura 11. Expresión de ARNm de NF-κB. Las células de ganglios mesentéricos de cerdo se estimularon con los probióticos *L. reuteri* 1447 (1447), *L. reuteri* 53608 (53608), *B. animalis* (Bb12) y un control sin estimular (SE) por 2 y 4 horas. Se muestran las medias y el error estándar de una n=2. Las diferentes literales indican diferencias estadísticas entre tratamientos las cuales se determinaron por el método de Fisher ($p < 0.05$).

Así mismo, Bb12 provoca una baja expresión de TLR2; esto puede deberse a que la mayoría de los transcritos pudieron ser traducidos para la producción de más receptores o que esa alta producción de IL-10 este bloqueando la producción de ARNm para la producción de más receptores de TLR2.

Finalmente se observó que Bb12 en una estimulación de 2 h indujo significativamente la producción de ARNm de NF-κB, lo que indica que el factor de transcripción se está traduciendo a proteína activa. Al utilizar probióticos se beneficia la respuesta inmune, en este trabajo se observó cambios en las células a nivel inmunológico, todo esto inducido por las bacterias probióticas

con las que se estimularon, e indudablemente este es un efecto benéfico para el sistema inmunológico debido a la capacidad de inducir o inhibir la expresión o la supresión de distintas moléculas, para tener al sistema inmunológico en un estado activo y mantener balances entre las respuestas anti y pro inflamatorias.

CONCLUSIONES

En conclusión las células de ganglios mesentéricos de cerdo estimuladas con probióticos inductores de IL-10 activan el factor de transcripción NF- κ B en una estimulación de 2 h por la vía TLR2. Así pues la producción de IL-10 está relacionada con una mayor producción de transcritos de ARNm de NF- κ B como una menor producción de transcritos de ARNm de TLR2.

La diferencias en los tiempos de inducción de la expresión de ARNm de NF- κ B entre los probióticos Bb12 y 53608 podría deberse a la procedencia de la cepa, ya que 53608 al ser aislada del tracto gastrointestinal de cerdos puede ejercer un mecanismo de tolerancia en las células de ganglios mesentéricos que al paso del tiempo se va perdiendo dando así una expresión de ARNm de NF- κ B retardada, en cambio Bb12 al ser una cepa de origen humano induce una expresión de ARNm de NF- κ B más temprana. Sin embargo se requieren más estudios para confirmar esta hipótesis.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas L, Andrew L, Shiva P. 2008. Inmunología celular y molecular: Sexta Edición.
- Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 499-511.
- Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf J. D, Klimpel GR, Godowsk P, Zychlinsky A. 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2. *Science* 285:736.
- Alvarez B, Sanchez C, Bullido R, Marina A, Lunney J, Alonso F, Ezquerro A, Dominguez J. 2000. A porcine cell surface receptor identified by monoclonal antibodies to SWC3 is a member of the signal regulatory protein family and associates with protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *Tissue Antigens* 55(4): 342-51.
- Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Brière F, Galizzi JP, Van Kooten C, Liu YJ, Rousset F, Saeland S. 1994. The CD40 antigen and its ligand. *Annual Review of Immunology* 12: 881–922.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology* 18: 767–811.
- Vázquez B, Sureda M, Rebollo J. 2012. Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunología* 31-33: 21-30

- 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
- Bimczok D, Sowa EN, Faber-Zuscharatter 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(5):1418-1427
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science* 285(5428): 285-732.
- Blecha FT, Kielian T, McVey DS, Lunney JK, Walker K, Stokes CR, et al. (1994). Workshop studies on monoclonal antibodies reactive against porcine myeloid cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 43(1-3): 269-72.
- Bouso P, Robey E. 2003. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nature Immunology* 4: 579–585.
- Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, et al. 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *Journal of Immunology* 167(1):416-423.
- Close WH. 2000. Producing pigs without antibiotic growth promoters. *Advances in Pork Production* 11:47-56.
- Coombes JL, Powrie F. 2008. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature Reviews Immunology* 8:435-46.
- Collado VM, Porrás R, Cutuli T, Gómez, E, 2008. El Sistema inmune innato: sus mecanismos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2(1): 6-7.
- Delgado Fernández R. 2013. Probióticos y salud humana. *MediCiego* 19(2): 1-7.

- Granados D, Delgado G. 2008. Células Dendríticas (CDs) diferenciadas a partir de monocitos humanos como herramienta para el estudio de agentes anti leishmaniales. *Ciencias Biomédicas* 6: 1794-2470.
- Derek H. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations, which control the primary immune response. *Blood* 90(9): 3245–87.
- Dos Santos LM, Santos MM, de Souza SHP, Vieira LQ, Arantes RME, Nicoli JR, Viera LQ. 2010. Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2B20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. *Medical Microbiology and Immunology* 200(1): 29-38
- Doyle SE, Vaidya S, O’Connell R, Dadgostar H, Dempsey P, Wu T, et al. 2002. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 17(3): 251-263.
- Dunne C, O’Mahony L, Murphy E, Thornton G, Morrissey D, O’Halloran S. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73 (2): 386-392.
- Fagnoni FF, Takamizawa M, Godfrey WR, Rivas A, Azuma M, Okumura K, Engleman EG. 1995. Role of B70/B7-2 in CD4+ T-cell immune responses induced by dendritic cells. *Immunology* 85(3): 467–474.
- FAO. 2006. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Probióticos en los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Roma.
- Floch MH. 2014. Recommendations for probiotic use update. *Journal of Clinical Gastroenterology* 45: 168-171.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *The Journal of Applied Bacteriology* 66(5): 365-367.
- Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML. 2001. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-

- related immunological changes. *Journal of Clinical Immunology* 21(4): 264-271. Gorbach SL. 2002. Probiotics in the third millennium. *Digestive and Liver Disease* 34(2): 2-7.
- Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AM, Schiffrin EJ, Blum S. 2000. Non-pathogenic bacteria elicit differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 47(1): 79-87
- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, et al. 2002. Small antiviral compounds activate immune cells via TLR7 MyD88-dependent signalling pathway. *Nature Immunology* 3(2): 196-200.
- Horie K, Umezawa K. 2012. *Open Access Journal*.
- Hoshino K, Kaisho T, Iwabe T, Takeuchi O, Akira S. 2002. Differential involvement of IFN- β in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *International Immunology* 14(10): 1225-1231.
- Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. 2001. Probiotics: effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(2): 444-450.
- Janeway CA, Mezhitov R. 2002. Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology* 20: 197-216. Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, et al. 2007. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell Symposia* 130 (6): 1071-1082.
- Jorge-Buys DL, Lastra-Camacho G, Campos-Martínez J, Romero-Guadarrama M, Ortiz-Hidalgo Carlos. 2008. Sarcoma de células dendríticas foliculares de localización ganglionar y extra ganglionar. Estudio clínico patológico e inmunohistoquímico de cinco casos. *Cirugía y Cirujanos* 76(2): 145-152.
- 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. *Pediatric research* 32 (2): 141-144

Krawczyck CM, Holowka T, Sun J, Amiel E, DeBerardinis RJ, Cruz Jr, et al. 2010. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* 115(23): 4742-4749.

Lázaro C, Carcelén F, Torres M. 2005. Efecto de probióticos en el alimento de marranas sobre los parámetros productivos de lechones. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 16(2): 97-102.

Lien, E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, et al. 1999. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *The Journal of Biological Chemistry* 274(47): 33419- 33425.

Maassen C, Van Holten-Neelen C, Balk F, Heijne den Bak-Glashouwer MJ, Leer RJ, Laman JD, et al. 2000. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine* 18(23): 2613-2623.

Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. 1999. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 116(5): 1107-1114.

Martínez Abad B. 2014. Modulación de la inmunidad innata y adaptativa por probióticos. Universidad de Valladolid. Facultad de Medicina. 84-126.

Mesa M, Patiño PJ. 2006. Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro. *Inmunología* 25(2): 115-130.

Mitra R, Singh S, Khar A. 2003. Antitumour immune responses. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 5: 1-22.

Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina VW, Ruthel G, Demmin LG, Warfiel LK, Bavari S, Klaenhammer RT. 2005. *Lactobacilli* activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America 102(8): 2880-2885.

Morita H, He F, Fuse T, Ouwehand AC, Hashimoto H, Hosoda M, et al. 2002. Adhesion of lactic acid bacteria to caco-2 cells and their effect on cytokine secretion. *Microbiology and Immunology* 46(6): 293-297.

Nava Sánchez Y, Quintero A, Ventura M, Casanosa A. 1995. Uso de probióticos en la alimentación de cerdos en la fase post destete. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Zulia* 3: 193-198.

O'Dea E, Hoffmann A. 2009. NF- κ B signaling. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 1(1): 107-115.

O'Mahony L, O' Callaghan L, McCarthy J, Shilling D, Scully P, Sibartie S, et al. 2006. Differential cytokine response from dendritic cells to commensal and pathogenic bacteria in different lymphoid compartments in human. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 290 (4): 839-845.

Pardio VT, Krzysatof N, Waliszewski KN, Robledo G. 1994. Los probióticos y su futuro. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 46(1): 6-10.

Parker DS. 1974. Probiotics, the other half of antibiotic story. *Animal and Nutrition and Health* 29:4.

Penna FJ. 1998. Diarrea y probióticos. Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. *Revista de enfermedades infecciosas en pediatría* 9(6): 6-10.

Rajagopal D, Bal V, George A, Rath S. 2004. Diversity & overlap in the mechanisms of processing protein antigens for presentation to T cells. *Indian Journal of Medical Research* 120(2): 75-85.

Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews* 16(4): 658- 672.

- Rescigno M, Gianluca M. 2008. Lamina propria dendritic cells: For whom the bell TOLLs?. *European Journal of Immunology* 38(6): 1483-1486.
- Reyes I, Figueroa JL, Cobos MA, Sánchez-Torres MT, Zamora V, Cordero JL .2012. Probiótico (*Enterococcus faecium*) adicionado a dietas estándar y con baja proteína para cerdos. *Archivos de Zootecnia* 61(236): 589-598.
- Rinne M, Kalliomaki M, Arvilomm H, Salminen S, Isolauri E. 2005. Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. *The Journal of Pediatrics* 147(2): 186-191.
- Rolfe RD. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of Nutrition* 130(2): 396-402.
- Saitoh, S. I., Akashi, S., Yamada, T., Tanimura, N., Kobayashi, M., Konno, K., & Miyake, K. 2004. Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4) -MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *International immunology*.961-969.
- Sánchez Cordón PJ, Pedrera M, Pérez De Diego AC, Rodríguez Sánchez B, Ruiz-Villamor E, Pleguezuelos FJ. et al. 2010. Células presentadoras de antígeno: células dendríticas y su papel en la lengua azul. *Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental* 23(1): 1-3.
- Schrezenmeir J, De Vress M. 2001. Probiotics, prebiotics and symbiotic approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(2): 361-364.
- Silva-Campa E, Flores-Mendoza L, Reséndiz M, Pinelli-Saavedra A, Mata-Haro V, Mwangi W, et al. 2009. Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritics cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 387(2): 373-379.
- Solano-Aguilar GI, Vengroski KG, Beshah E, Douglass LW, Lunney JK. 2001. Characterization of lymphocyte subsets from mucosal tissues in

- neonatal swine. *Developmental & Comparative Immunology* 25(3): 245-263.
- Steinman, RM. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual Reviews Immunology* 9: 271-296.
- Stoll S, Delon J, Brotz TM, Germanin RN. 2002. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 296(5574): 1873–1876.
- Summerfield A, McCullough KC. 1997. Porcine bone marrow myeloid cells: phenotype and adhesion molecule expression. *Journal of Leukocyte Biology* 62(2): 176-185.
- Takeda K, Akira S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology* 17(1): 1-14.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa TK. et al. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11(4): 443- 451.
- Takeuchi, O., A. Kaufmann, K. Grote, T. Kawai, K. Hoshino, M. Morr, P. F. Muhlradt, and S. Akira. 2000. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasma lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *Journal of Immunology* 164(2): 554-557.
- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, et al. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *The Journal of Immunology* 169(1): 10-14.
- Thono M, Shimosato T, Kitazawa H, Kato S, Dimitrov L, Kawai Y, et al 2005. Toll-like receptor 2 is expressed on the intestinal M in cell in swine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330(2) 547-554.

- Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, et al. 2002. TLR4, but not TLR2, mediates IFN- β induced STAT1a/b-dependent gene expression in macrophages. *Natural Immunology* 3(4): 392- 398.
- Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, et al. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 410(6755): 811-815.
- Van Beek EM, Cochrane F, Barclay AN, Van den Berg TK. 2005. Signal regulatory proteins in the immune system. *Journal of Immunology* 175(12): 7781-7787.
- 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* 2:2307-2311
- Wolvers D., Antoine JM., Myllyluoma E., Schrezenmeir J., Szajewska H., Rijkers GT. 2010. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of infections by probiotics. *The Journal of Nutrition* 140(3): 698–712.
- Young RJ, Huffmans S. 2003. Probiotic use in children. *Journal of Pediatric Health Care* 17(6): 277-283.
- Zeuthen LH, Cristensen HR, Frokiaer 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(3): 365-375.