



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**RESPUESTA INMUNE INNATA A PROBIÓTICOS  
DE BACTERIAS LÁCTICAS EN MACRÓFAGOS HUMANOS  
VÍA RECEPTORES TIPO TOLL (TLRs)**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:  
**ROSA ADRIANA PÉREZ SOLANO**



**MÉXICO, D.F.**

**2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: RODOLFO PASTELIN PALACIOS

**VOCAL:** Profesor: JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ

**SECRETARIO:** Profesor: LUZ MARÍA ROCHA RAMÍREZ

**1er. SUPLENTE:** Profesor: GIBRÁN PÉREZ MONTESINOS

**2° SUPLENTE:** Profesor: LUZ MARÍA MORA VELANDIA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

El presente trabajo fue realizado en el **Departamento de Infectología-Investigación** del Hospital Infantil de México "Federico Gómez" en colaboración con el **Departamento de Inmunoquímica y Biología Celular** bajo la dirección y asesoría de la **Dra. Luz María Rocha Ramírez**.

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**DRA. LUZ MARÍA ROCHA RAMÍREZ**

**SUSTENTANTE:**

---

**ROSA ADRIANA PÉREZ SOLANO**

El desarrollo del presente trabajo de investigación fue financiado por el apoyo a proyectos de investigación (**Fondos Federales**) de la Secretaría de Salud con número de registros: **HIM-2010-010 y HIM-2011-007**

**CONTENIDO.**

I.	<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	i
II.	<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	iii
iii.	<b>ABREVIATURAS</b> .....	iv
1.	<b>RESUMEN</b> .....	1
2.	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
2.1	La organización del sistema inmunitario.....	2
2.2	La nueva era de la inmunidad innata ( PAMPs, DAMPs, PRRs, TLRs).....	6
2.3	La respuesta inflamatoria, mecanismo de activación del sistema inmunitario innato.....	13
2.3.1	Mediadores de la respuesta inflamatoria (citocinas).....	17
2.3.2	El estallido respiratorio ( secreción de ROS) otros mediadores importantes de la respuesta inflamatoria.....	19
3.	<b>ANTECEDENTES</b> .....	22
4.	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	28
5.	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	29
6.	<b>HIPÓTESIS</b> .....	30
7.	<b>OBJETIVOS</b> .....	31
7.1	Objetivo general.....	31
7.2	Objetivos específicos.....	31
8.	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	32
8.1	Cepas probióticas aisladas de productos comerciales.....	32
8.2	Crecimiento bacteriano y cuantificación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de probióticos de <i>Lactobacillus</i> .....	34
8.3	Cepas probióticas inactivadas por calor.....	37

8.4	Obtención de células mononucleares (MN) de sangre periférica humana.....	37
8.5	Purificación de monocitos por adherencia a vidrio y cultivo <i>in vitro</i> para su diferenciación a macrófagos (MDM).....	40
8.6	Evaluación del estallido respiratorio de macrófagos derivados de monocito de sangre periférica humana (MDM).....	42
8.7	Producción de citocinas pro (IL-8, TNF- $\alpha$ ) y anti-inflamatorias (IL-10) en MDM estimulados con bacterias probióticas de <i>Lactobacillus</i> .....	45
8.8	Evaluación de citocinas pro (IL-8, TNF- $\alpha$ ) y anti-inflamatorias (IL-10)...	45
8.9	Análisis de NF- $\kappa$ B (p65) por inmunofluorescencia indirecta.....	48
8.10	Participación del receptor de TLR2 a la estimulación de bacterias probióticas por modelo de transfección estable a la molécula de TLR2 en línea celular HEK-293-hTLR2.....	49
8.11	Análisis Estadístico.....	51
9.	<b>RESULTADOS</b> .....	52
9.1	Actividad oxidativa de los MDM (Quimioluminiscencia) en respuesta a bacterias probióticas de <i>Lactobacillus</i> .....	52
9.2	Producción de IL8, TNF- $\alpha$ e IL-10 inducida por probióticos de bacterias lácticas en MDM.....	55
9.3	Interacción <i>in vitro</i> de probióticos de <i>Lactobacillus</i> en MDM.....	58
9.4	Activación y translocación del factor nuclear NF- $\kappa$ B en MDM estimulados con probióticos de <i>Lactobacillus</i> .....	59
9.5	Participación de TLR2 en la producción de IL-8 en la estimulación de MDM con probióticos de bacterias lácticas en el modelo de cultivo de células HEK-293-hTLR2 transfectadas.....	61
10.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	62
11.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	70
12.	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	71
13.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	72
14.	<b>ANEXO</b> .....	87

## I. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Organización del sistema inmunitario del hospedero.....	4
<b>Figura 2.</b>	Moléculas PAMPs expresadas en diferentes patógenos....	6
<b>Figura 3.</b>	DAMPs (señales de peligro o alarminas).....	7
<b>Figura 4.</b>	Receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) y otras moléculas de los PRRs atípicos, en modelo propuesto de células de mamíferos.....	9
<b>Figura 5.</b>	Reconocimiento PAMP por TLRs de superficie celular.....	12
<b>Figura 6.</b>	Las vías de la respuesta inflamatoria.....	15
<b>Figura 7.</b>	Células y mediadores de la respuesta inflamatoria.....	16
<b>Figura 8.</b>	Las citoquinas sostienen los signos cardinales de la inflamación.....	18
<b>Figura 9.</b>	La anatomía de la NADPH oxidasa del fagocito.....	19
<b>Figura 10</b>	Secreción de intermediarios de oxígeno reactivo.....	20
<b>Figura 11.</b>	Modulación de la barrera intestinal y respuesta inmune por pre-bióticos y probióticos.....	27
<b>Figura 12.</b>	Cepas probióticas de productos comerciales.....	32
<b>Figura 13.</b>	Características generales de probióticos de <i>Lactobacillus</i> ...	33
<b>Figura 14.</b>	Cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC) de probióticos de bacterias lácticas.....	36
<b>Figura 15.</b>	Obtención de células MN de sangre periférica humana.....	38
<b>Figura 16.</b>	Conteo y determinación de viabilidad celular por método de exclusión (azul de tripano) en cámara de Neubauer (hematocitómetro).....	39
<b>Figura 17.</b>	Purificación de monocitos por adherencia a discos de vidrio en placas de 24 pozos.....	40
<b>Figura 18.</b>	Diferenciación celular de monocitos a macrófagos.....	41
<b>Figura 19.</b>	Evaluación del estallido respiratorio por método de Quimioluminiscencia amplificada con luminol.....	43

<b>Figura 20.</b>	Determinación de citocinas por método de ELISA (Kit del sistema Pharmingen OptEIA®).....	47
<b>Figura 21.</b>	Línea celular HEK-293 ( <i>human embryonic Kidney</i> ).....	50
<b>Figura 22.</b>	Producción del estallido respiratorio (quimioluminiscencia) por MDM estimulados con probióticos de <i>Lactobacillus</i> .....	53
<b>Figura 23.</b>	Análisis de la cinética oxidativa de MDM inducida por probióticos de bacterias lácticas.....	54
<b>Figura 24.</b>	Producción de IL-8 en MDM estimulados con bacterias lácticas y otros estímulos (Zymosán).....	55
<b>Figura 25.</b>	Síntesis de TNF- $\alpha$ en MDM estimulados con probióticos de bacterias lácticas.....	56
<b>Figura 26.</b>	Síntesis de IL-10 en MDM estimulados con probióticos de bacterias lácticas.....	57
<b>Figura 27.</b>	Interacción <i>in vitro</i> de macrófagos y probióticos de <i>L. casei</i>	58
<b>Figura 28.</b>	Activación del factor NF- $\kappa$ B por probióticos de <i>Lactobacillus</i> .....	59
<b>Figura 29.</b>	Microscopía confocal a la translocación de NF- $\kappa$ B.....	60
<b>Figura 30.</b>	Participación de TLR2 en la activación de MDM por probióticos de bacterias lácticas.....	61
<b>Figura 31.</b>	Efectos inmunes de probióticos de bacterias lácticas en macrófagos humanos.....	69
<b>Figura 32.</b>	Opsonización de Zymosán e inactivación de suero activado por Zymosán.....	94



## II. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Antecedentes históricos de la inflamación (entre el primero a veinteavo siglos AC).....	14
<b>Tabla 2</b>	Unidades Formadoras de Colonias (UFC).....	35
<b>Tabla 3</b>	Estimulación de MDM con probióticos de <i>Lactobacillus</i> para evaluar el estallido respiratorio.....	42
<b>Tabla 4.</b>	Programación del luminómetro ( protocolo de quimioluminiscencia, parámetros del Menú).....	44

### III. ABREVIATURAS

<b>AMP</b>	Péptidos antimicrobianos.
<b>APC</b>	Células Presentadoras de Antígeno.
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CLRs</b>	Receptor de lectina tipo C
<b>DAI</b>	Activador de factores reguladores de interferón dependientes de DNA
<b>DAMPs</b>	Receptores de Patrones Moleculares Asociado a Daño
<b>DAMPs</b>	Patrones Moleculares Asociado a Daño.
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>GALT</b>	Tejido linfoide asociado a intestino
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HEK</b>	Células de riñón embrionarias humanas
<b>HEK-293hTLR2</b>	Línea celular de células embrionarias de riñón humano transfectadas con TLR2
<b>HMGB-1</b>	Proteína nuclear de alta movilidad electroforética box1 o anfoterina
<b>EC</b>	Enfermedad de Crohn
<b>EII</b>	Enfermedad inflamatoria del intestino
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-8</b>	Interleucina – 8
<b>IL-10</b>	Interleucina – 10
<b>LBP</b>	Proteína Unidora de Manosa
<b><i>L. GG</i></b>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LRRs</b>	dominio extracelular rico en secuencias de leucina
<b>MAMPs</b>	Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos.
<b>MBL</b>	Lectina unidora de manosa.

<b>MBP</b>	Proteína de unión a manosa
<b>MDM</b>	Macrófagos Derivados de Monocitos
<b>MN</b>	Células mononucleares
<b>MRS</b>	Medio de Man-Rogosa-Sharpe
<b>MyD88</b>	Factor de diferenciación mieloide 88
<b>NALPs</b>	Natch domain-, leucine-rich repeat-, and pyrin-containing domain de las siglas en inglés
<b>NF-κB</b>	Factor de transcripción nuclear kappa B
<b>NLRs</b>	Receptores tipo NOD
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>NOD</b>	Dominio de oligomerización de nucleotidos
<b>O<sup>2-</sup></b>	Anión superóxido
<b>PAF</b>	Factor activador de plaquetas
<b>PAMPs</b>	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
<b>PBS</b>	Solución buffer de fosfatos.
<b>PGE</b>	Prostaglandinas
<b>PMB</b>	Polimixina B
<b>PRRs</b>	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares de patógenos
<b>PSH</b>	Pool de Suero Humano
<b>RAGE</b>	Receptor para compuestos de glicosilación avanzada
<b>RIG-1</b>	Receptor ácido retinoico inducible del gen 1
<b>RLRs</b>	receptor similar a RIG-1
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SAv-HRP</b>	Streptavidina-peroxidasa
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SSF</b>	Solución Salina fisiológica
<b>TLRs</b>	Receptores tipo Toll.
<b>TNF-α</b>	Factor de Necrosis Tumoral alfa
<b>TRIF</b>	Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR e induce IFN-β

## 1. RESUMEN

Los macrófagos son orquestadores importantes de la respuesta inmune innata del hospedero, desarrollan funciones especializadas como fagocitosis, síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la secreción de citocinas pro y anti-inflamatorias. El conocimiento de la interacción molecular entre bacterias no-patógenas (*Lactobacillus*) y macrófagos está limitado actualmente. En este trabajo utilizando un modelo *in vitro* con macrófagos primarios derivados de monocitos de sangre periférica humana (MDM), se analizó el efecto inmune de diferentes probióticos de *Lactobacillus* muertos por calor (*LGG*, *rhamnosus*, *helveticus* y *casei*) en la síntesis de ROS (ensayo de la quimioluminiscencia amplificada-luminol), producción de citocinas (IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-10) por método de ELISA. Así también, la activación de p65 a NF- $\kappa$ B por inmunofluorescencia y la participación del receptor de TLR2 humano en la señalización a través de la producción de IL-8 en modelo de células transfectadas estables de la línea HEK-293hTLR2. Los resultados del presente trabajo demostraron que cepas de *Lactobacillus* (*LGG*, *rhamnosus*, *helveticus* y *casei*) inducen síntesis de ROS (190.1 $\pm$ 15, 196.24 $\pm$ 10, 175.86 $\pm$ 12, y 200.12 $\pm$ 14 mV) respectivamente. La cinética de producción de los ROS fue dependiente a la cepa y concentración de las bacterias lácticas. *Lactobacillus casei* produjo la mayor producción, sin embargo; fue dos veces menor a la observada con Zymosan (567.5 $\pm$ 35 mV). Además, todas las cepas estimulan la producción de las citocinas IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-10. En las fases tempranas (6 horas) se detectaron IL-8 (5,860.25 $\pm$ 100, 5851 $\pm$ 100, 5709 $\pm$ 100, 5114.75 $\pm$ 100 pg/ml) y TNF- $\alpha$  (2131.1 $\pm$ 100, 2256.3 $\pm$ 100, 1575.4, 1339.5 $\pm$ 100 pg/ml) respectivamente. Por otro lado, la síntesis de IL-10 se observó tardíamente (a las 24 horas) (200 $\pm$ 40, 180 $\pm$ 40, 100 $\pm$ 12, 120 $\pm$ 10 pg/ml). Así mismo, los probióticos de *Lactobacillus* activaron la proteína p65 NF- $\kappa$ B (> al 50% de células positivas) e indujeron la activación de la molécula del TLR2 humano observado por la síntesis de IL-8 (285 $\pm$ 35, 281, 363 $\pm$ 35 y 187.48 pg/ml) en modelo de células HEK-293hTLR2. Estos resultados demuestran las propiedades inmunoestimuladoras de los probióticos de productos de leches fermentadas comerciales que contienen *Lactobacillus* vía TLR2 en los macrófagos y su posibilidad como adyuvantes potenciales a la respuesta inmune innata del hospedero.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 La organización del sistema inmunitario.

El sistema inmunitario del hospedero funciona como órgano sensorial y forma parte de una red de homeostasis relacionada directamente a otros sistemas (nervioso central y endocrino) (**Esther M. Sternberg, 2006; Capuron L, et al, 2011**).

En los mamíferos, el sistema inmunitario está formado de diversas moléculas y células especializadas; su función primordial es la protección a la infección causada por distintos patógenos (por ejemplo hongos, virus, parásitos y bacterias). Dicho sistema está integrado en dos líneas principales de protección: la inmunidad natural (**sistema innato**) y la respuesta inmune específica (**sistema adaptativo**) (**Chaplin DD, 2010**).

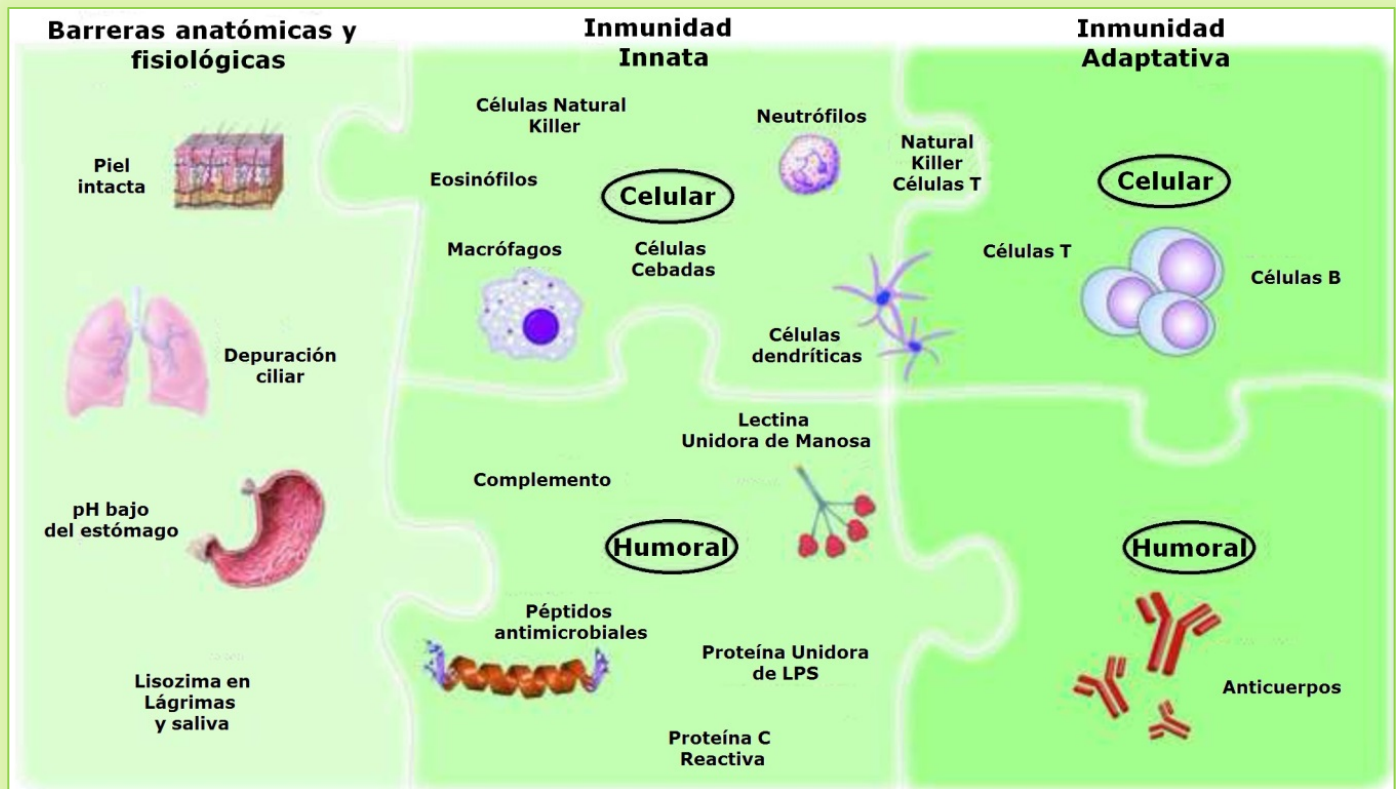
El sistema inmunitario innato, constituye la primera línea de defensa del hospedero, su activación al reconocimiento de patógenos es rápida, inmediata y temprana. Las moléculas-receptores que participan en el reconocimiento son expresados desde la línea germinal en las células inmunes (innatas) (**Turvey SE et al, 2010**). Asimismo, la inmunidad natural integra múltiples fuentes de señalización al procesamiento de los antígenos, expresión de moléculas coestimuladoras y secreción de citocinas; estas moléculas con efectos directos al sistema inmunitario adaptativo (**Akira S et al, 2006**).

Al sistema inmune innato también se adicionan diversas proteínas solubles entre ellas; los denominados péptidos antimicrobianos (AMP) (por ejemplo, la familia de las defensinas). Estas moléculas tienen acción microbicida sobre ciertos patógenos, están solubles en el plasma y también son productos de secreción de células inmunes activadas). Otras proteínas innatas incluyen a las colectinas (MBL-lectina unidora de manosa), la lisosima y lactoferrina (**Jarczak J et al, 2013**).

Por el contrario, el sistema inmunitario adaptativo es sostenido por la activación de los linfocitos T y B. Su activación es el resultado del procesamiento de los antígenos por las células presentadoras de antígenos (**APC**) en conjunto a mecanismos de cooperación celular asociados a las moléculas efectoras: las inmunoglobulinas (anticuerpos) en sus diferentes isotipos (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE) (**Bonilla FA et al 2010**).

En fases tardías de la infección, el sistema inmunitario adaptativo es el responsable de la eliminación del patógeno, su proceso de activación es más lento entre la exposición del antígeno y la máxima respuesta producida (generalmente días); además es capaz de generar memoria inmunológica en el hospedero (**Turvey SE et al, 2010**).

Así también, la organización del sistema inmunitario del hospedero se agrupa en tres niveles importantes de protección: **1)** Las barreras anatómicas y/o fisiológicas que forman compartimentos estructurales muy definidos como: la piel y las mucosas **2)** el sistema inmunitario innato y **3)** la respuesta inmunitaria adaptativa. Las respuestas inmunitarias a los tres niveles están constituidas por varios componentes inmunológicos clasificados como humorales y celulares. (**Figura 1**)



**Figura 1. Organización del sistema inmunitario del hospedero.** Las respuestas inmunitarias activadas a los microorganismos agresores pueden clasificarse en tres niveles importantes: **1)** Barreras mecánicas y fisiológicas, como la piel y mucosas **2)** sistema inmunitario innato, constituido por varios componentes humorales, por ejemplo péptidos antimicrobianos (defensinas), las colectinas (MBL), la proteína unidora de manosa (LBP) y celulares: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, NK. **3)** Sistema inmune adquirido, conformado también por componentes humorales (principalmente anticuerpos) y celulares (linfocitos B y T). En ambos sistemas (innato y adquirido) se presentan vías comunes a ciertos componentes celulares que son difíciles de categorizar entre una u otra inmunidad entre ellos: las células NK, linfocitos T, dendríticas y los macrófagos.

**Tomado de: Turvey SE, Broide DH. J Allergy Clin Immunol. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S24-32.**

La función inmunitaria de las barreras mecánicas (la piel y mucosas) es muy importante y está acompañada de factores de diversa composición: **físicos, químicos y biológicos** (por ejemplo, la viscosidad, condiciones de pH, ácidos grasos, enzimas y la biota residente de cada mucosa) (**Borkowski AW et al, 2011**). Estos factores forman parte de los mecanismos **“inespecíficos”** del sistema inmunitario innato (**Turvey SE et al, 2010**).

Otra de las características atribuibles al sistema inmunitario del hospedero es que ambas líneas de protección: innata y adquirida no son mutuamente excluyentes, tienen sinergismo y respuestas inmunes complementarias (**Chaplin DD et al, 2010**). Por lo tanto, las alteraciones y/o defectos funcionales en uno y otro sistema causan vulnerabilidad al hospedero y provocan alteraciones inmunológicas como enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias, reacciones de hipersensibilidad y desordenes inflamatorios crónicos (**Warrington R et al, 2011**).

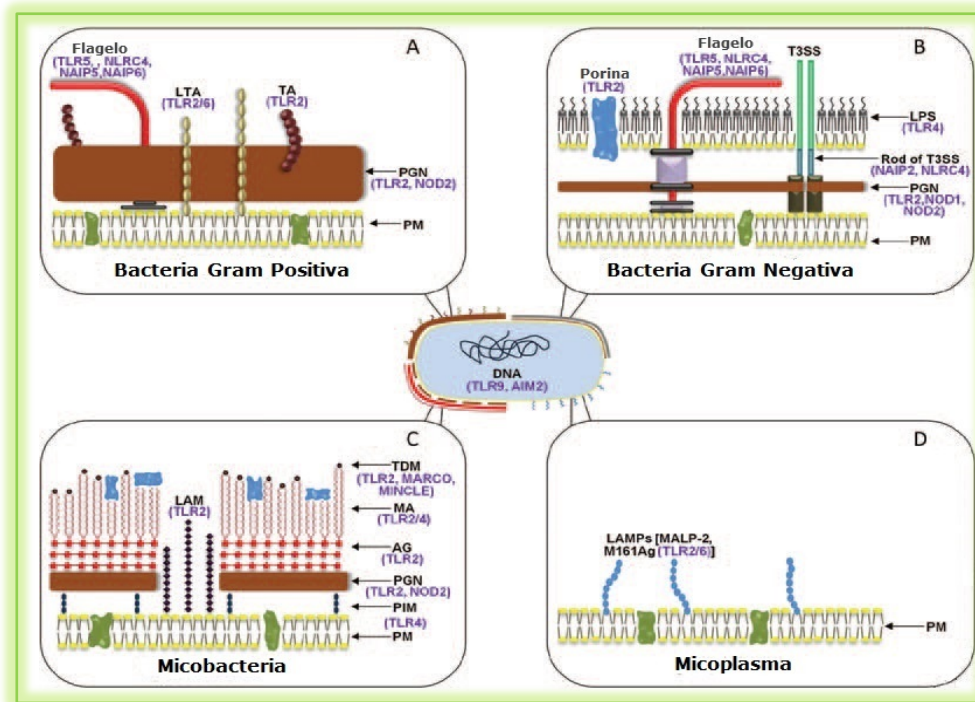
Por otro lado, los conceptos de la naturaleza *“inespecífica”* de la inmunidad innata ha cambiado; esto se ha destacado recientemente por varias investigaciones claves: 1) la identificación de los receptores agrupados como *“Pattern Recognition Receptors”* (PRRs), particularmente los receptores similares a la proteína Toll (TLRs) 2) las moléculas ligando a estos receptores *“Microbe-associated-Molecular Patterns”* (MAMPs) y 3) la importancia del sistema inmune innato para activar a un estado de *“alerta”* del hospedero por moléculas *“Damage-associated Molecular Patterns”* (DAMPs) (**Montero Vega MT, et al 2008**).

Así mismo, los avances en la comprensión de los eventos moleculares que inician la respuesta protectora del sistema inmunitario innato del hospedero por estas moléculas receptoras y sus ligandos ha derivado en la denominación de *“La nueva era de la inmunidad innata”* (**Montero Vega MT, 2008**).



## 2.2 La nueva era de la inmunidad innata (PAMPs, DAMPs, PRRs, TLRs).

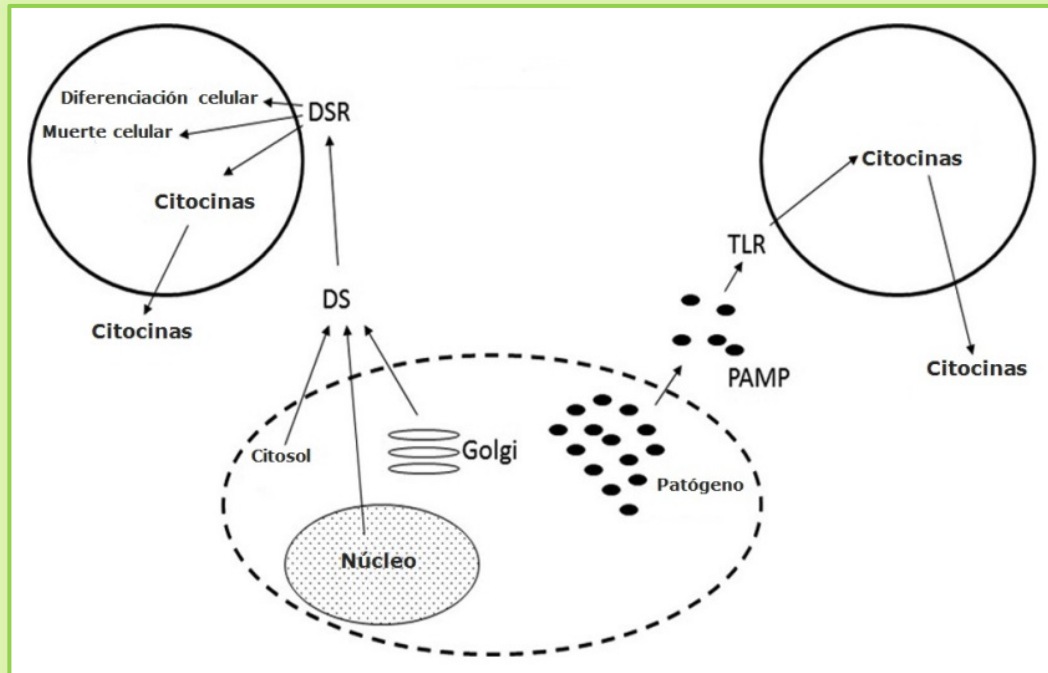
El desarrollo actual, en los mecanismos específicos del sistema inmunitario innato involucra la participación de moléculas “Pathogen associated molecular patterns” (PAMPs) definidas como estructuras invariantes, compartidas en grupos importantes de microorganismos patógenos (Suresh R et al, 2013). Entre las moléculas tipo PAMPs reportadas están la estructura del LPS (de las bacterias Gram negativas); las peptidoglicanas (Gram positivas); ácidos micólicos (Micobacterias); flagelinas, los ácidos lipoteicoicos entre otras (Kumar S et al, 2013) (Figura 2). La mayoría de las moléculas definidas como PAMPs son estructuras importantes de la pared celular de los microorganismos patógenos, tienen papel esencial en patogénesis de la infección, son vitales al patógeno y son moléculas estimuladores a la respuesta inflamatoria en el hospedero (Sirisinha S et al, 2011).



**Figura 2. Moléculas PAMPs expresadas en diferentes patógenos. A)** Bacterias Gram positivas, (PGN, peptidoglicana, [TLR2, NOD2]), ácidos teicoicos (TA) [TLR2]. **B)** Bacterias Gram negativas, (LPS, lipopolisacárido, [TLR4]), PGN (TR2, NOD1, NOD2), porinas [TLR2], flagelina [TLR5], sistemas de secreción tipo III. **C)** Micobacterias (LAM lipoarabinomananas [TLR2], manosidos de fosfatil inositol (PIM) [TLR2] y **D)** Micoplasma LAMPs [TLR2].

Tomado de: Kumar S. et al. *Crit Rev Microbiol.* 2013 Aug;39(3):229-46.

Además de la participación de las moléculas tipo PAMPs, o tras moléculas activadoras del sistema inmune innato se han citado; las moléculas denominadas tipo DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*) y sus receptores moleculares correspondientes (*DAMPs*) (**Figura 3**).



**Figura 3. DAMPs (señales de peligro o alarminas).** Estas moléculas son liberadas por células sometidas a estrés o infectadas. Las moléculas **DAMPs** extracelulares se unen a receptores específicos de señal de peligro (**DAMPs**), esta unión conlleva a diferentes procesos entre ellos diferenciación, muerte celular o secreción de citocinas inflamatorias. Esta señal es dependiente de la molécula de **DAMP**, célula blanco y tipo de receptor de **DAMPs**, por ejemplo, el receptor de adenosina (está asociado a mecanismos de inhibición de la respuesta inflamatoria).

**Tomado de: Saïd-Sadier N, et al. *Biomed J.* 2012 Nov-Dec;35(6):437-49.**

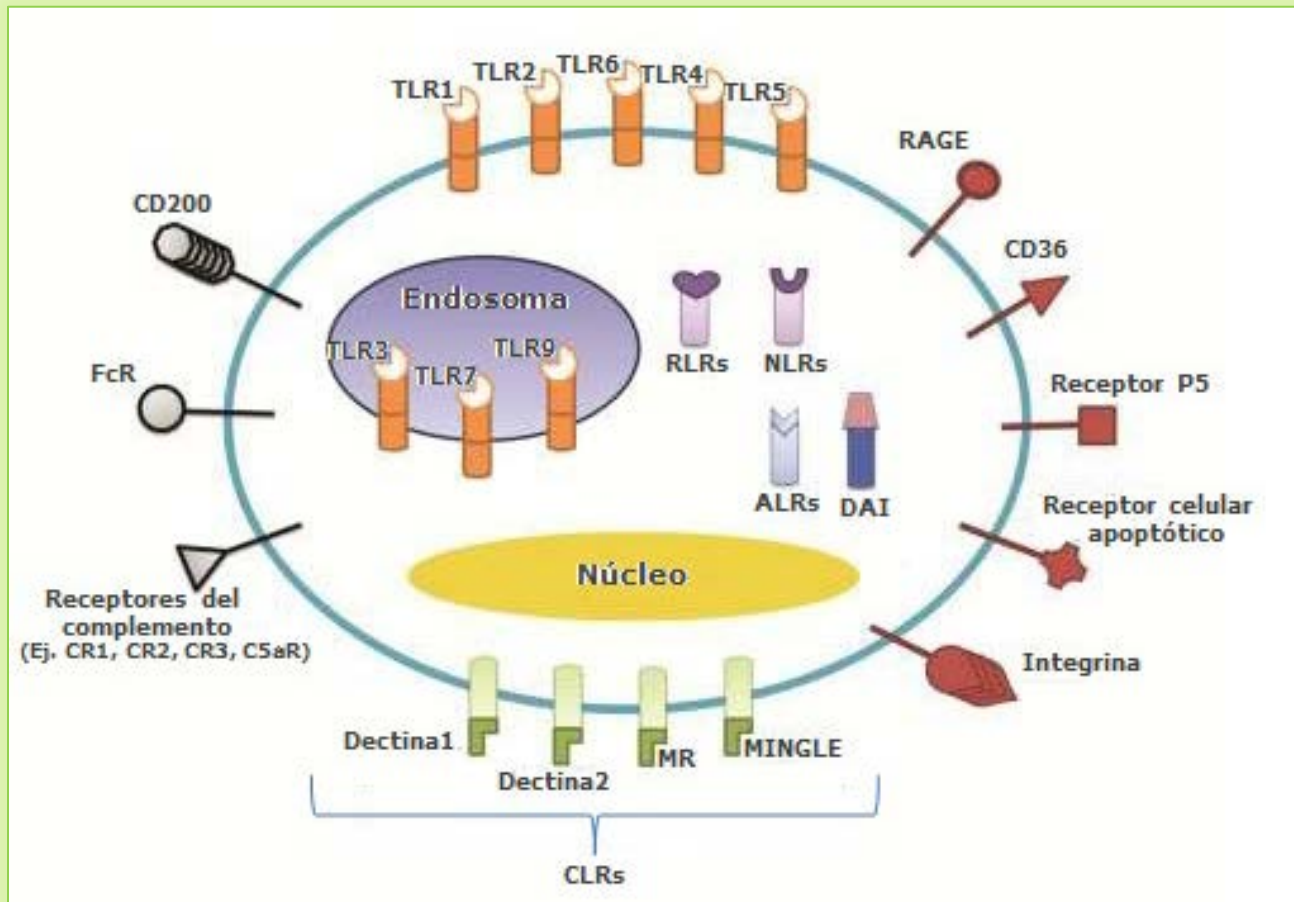
Estudios recientes han demostrado que las moléculas del grupo de PRRs, también intervienen al reconocimiento de estas moléculas endógenas (DAMPs). Este tipo de moléculas, las DAMPs son liberadas de forma endógena por traumas, daño tisular o en respuesta a la síntesis de diferentes mediadores inflamatorios (**Saïd-Sadier N et al 2012**). Parte de las moléculas DAMPs incluyen al DNA, ATP, ácido úrico, y las proteínas unidoras de calcio (S-100), entre otras. Así mismo, algunas DAMPs también son denominadas con el término “*alarminas o señales de peligro*” y tienen funciones de adyuvantes endógenos, tal es el caso de la proteína unidora a DNA (HMGB-1). En estudios recientes, estas moléculas se han considerado importantes blancos de terapia al control de algunos desordenes inflamatorios crónicos.

Por otro lado, las moléculas “*Pattern Recognition Receptors*” (PRRs) del sistema inmune innato, es también considerados como grupos restringidos de receptores presentes en las células inmunes, particularmente de la inmunidad innata (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas). Estas moléculas son altamente conservadas codificadas desde línea germinal y son considerados “prototipos” al reconocimiento de moléculas tipo PAMPs. (**Akira S. et al, 2009**).

En la actualidad, cuatro familias de moléculas de PRRs son descritas en la literatura; algunas de ellas incluyen a las proteínas similares a Toll (*Toll-like receptors-TLRs*), los receptores similares a NOD (*NLRs*), las moléculas parecidas a RIG-1 (*RLRs*), lectinas tipo C (*CLRs*) y moléculas detectoras de DNA bacteriano (**Kumar S. et al, 2013**).

Las moléculas del grupo de PRRs pueden detectar a las diferentes moléculas PAMPs tanto en compartimentos como vesículas endocíticas y citoplasma (intracelulares), incluida la superficie celular (extracelulares), (**Kumar S. et al, 2013**).

Además, de otros grupos de receptores considerados “atípicos” que no presentan la estructura similar del “*Molecular Patterns*”, por ejemplo la molécula HMGB-1 o proteínas de choque térmico (Tian J et al, 2007). Este grupo de proteínas, están predominantemente expresadas en la membrana celular; y tienen un papel importante a la regulación homeostática, por ejemplo RAGE (Yanai H et al, 2009) (Figura 4).



**Figura 4 . Receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) y otras moléculas de los PRRs atípicos, en modelo propuesto de células de mamíferos.** Receptor de Fosfatidilserina (PS), a la fracción c de las inmunoglobulinas (FcR), a las proteínas del complemento CR1, CR2, y CR3) entre otras como el receptor a manosa (MR).

**Tomado de: Sirisinha S. et al. Asian Pac J Allergy Immunol. 2011 Mar;29(1):1-14.**

Otros grupos de *PRRs* están en forma soluble en el plasma y son comunes a las proteínas del sistema del complemento, por ejemplo la molécula C1q, MBP y las proteínas de fase aguda (**Akira S. et al, 2009**).

Las moléculas de los *PRRs* no solamente son expresados en los macrófagos y las células dendríticas; sino también en varias células inmunitarias no profesionales, a excepción de algunos de los *NLRs* (**Barbalat R et al, 2011**).

La distribución de los *TLRs*, sin embargo difiere entre una y otra célula; estos receptores generan señales específicas vía distintas cascadas de señalización y activación de sitios promotores de genes en el núcleo. (**Akira S et al, 2009**; **Barbalat R et al, 2011**; **Sirisinha S et al, 2011**).

La detección de moléculas **PAMP** o **DAMPs** por los grupos de **PRRs** puede regularse positivamente por la expresión de genes de transcripción involucrados en la respuesta inflamatoria, dichos genes involucran citocinas pro-inflamatorias, interferones tipo I, quimiocinas y proteínas anti-microbianas (**Barton G M, 2008**; **Monie TP et al, 2009**).

Los patrones de expresión de estos genes inducibles por la activación de los *PRRs* difieren entre ellos. La mayoría de la familia de los receptores de *TLRs* y *NLRs* desarrollan una función muy importante al reconocimiento de patógenos bacterianos, mientras que los receptores del grupo de *RLR* y los sensores de DNA están encaminados más a patógenos virales (**Jacobs SR et al, 2012**).

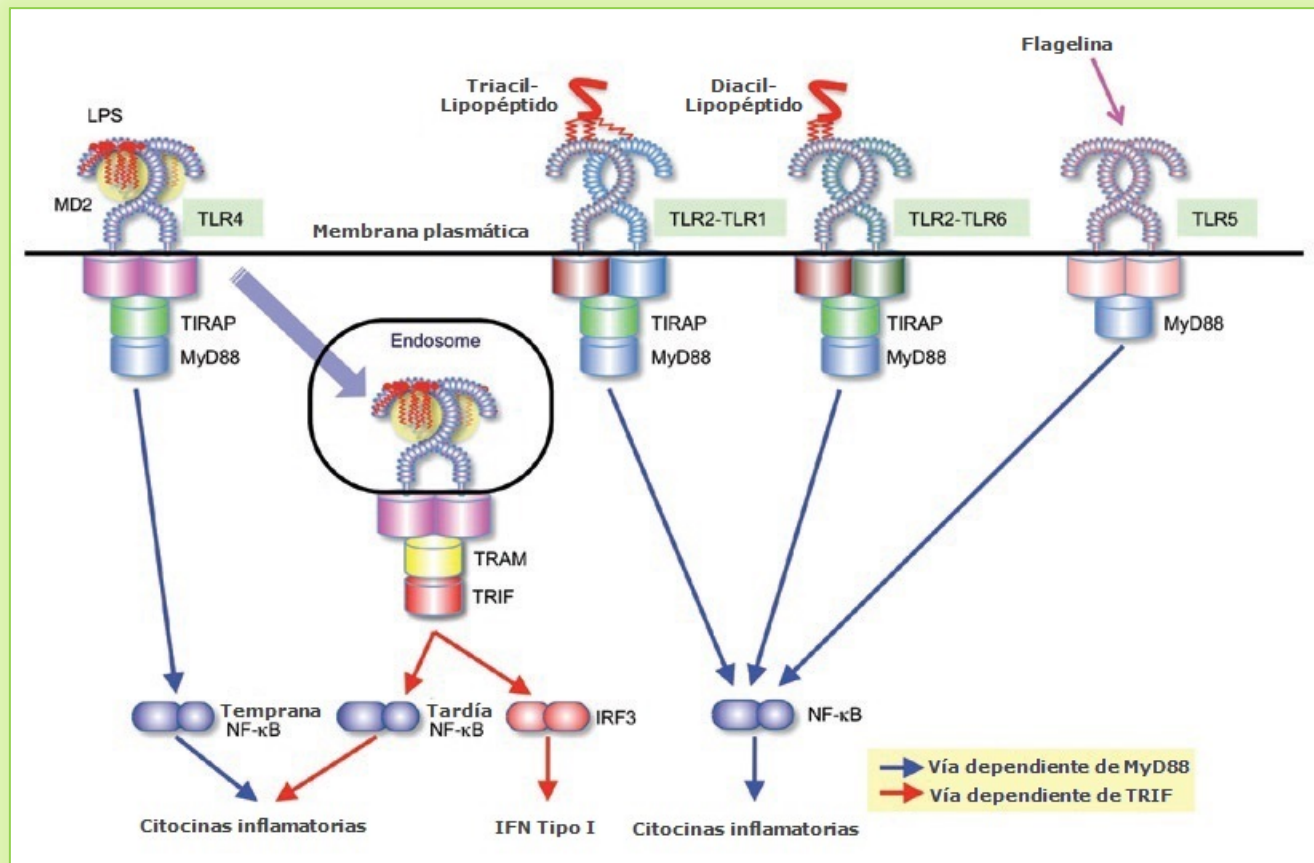
Así mismo, dentro del grupo de receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), la familia de los receptores tipo Toll (TLRs), es de los más estudiados del sistema inmunitario innato. Los avances científicos al estudio de estas moléculas han demostrado que desarrollan un papel central al activarse de manera inmediata al reconocimiento de distintas moléculas tipo **PAMPs (Sasai M et al, 2013)**.

La familia de *TLRs*, está estructurada como proteínas transmembranales de tipo I, con un dominio extracelular rico en secuencias de leucina (LRRs) y un dominio conservado citoplasmático. Este es homólogo a la región intra-citoplasmática del receptor IL-1 y del receptor de IL-18, el denominado dominio TIR (receptor de IL-1/Toll) (**Broz P et al, 2013**).

Las moléculas de los distintos TLRs son expresados por células mielomonocíticas, endoteliales, epiteliales y por varios sistemas de órganos. La mayoría de TLRs son constitutivos con capacidad para ser modulados en respuesta a diferentes estímulos, la literatura reporta 10 en el humano y 12 miembros en ratón (**Kawai T et al, 2010**).

En el caso de TLR1 al 9, son moléculas muy conservadas (humano - murino). Sin embargo, el ligando de TLR8 en el caso del ratón es desconocido. Los TLRs al reconocer a sus PAMPs específico, inician el reclutamiento de un set de moléculas adaptadoras, entre ellas MyD88 y TRIF que participan en la señalización río abajo y conducen a la secreción de citocinas inflamatorias (TH1, por ejemplo IFN- $\gamma$ ), quimiocinas y péptidos antimicrobianos (**AMP**) (**Hayashi et al, 2011**).

Por otra parte, la activación de los TLRs favorece la migración de neutrófilos, activación de macrófagos e inducción de genes estimulados por el interferón; esta fase es muy importante a la activación de mecanismos microbicidas y control de la infección (**Kay E et al, 2013**) (**Figura 5**).



**Figura 5. Reconocimiento PAMP por TLRs de superficie celular.** TLR4 en el complejo con MD2 acopla LPS. Cinco de las seis cadenas lipídicas de LPS se unen MD2 y los restantes asociados con el lípido de cadena TLR4. TLR2-TLR1 y TLR2-TLR6 heterodímeros reconocen lipopéptido triacilado y diacilado, respectivamente. Dos de las tres cadenas de lípidos de lipopéptido triacilado interactúan con TLR2, y la tercera cadena se une al canal hidrofóbico de TLR1 (ausente de TLR6). TLR2-TLR1 y TLR2-TLR6 inducen la activación de NF-κB a través del reclutamiento de TIRAP y MyD88. TLR5 reconoce flagelina y activa NF-κB a través de MyD88.

**Tomado de: Kawai T, et al. Nat Immunol. 2010 May;11(5):373-84.**

### **2.3 La respuesta inflamatoria, mecanismo de activación del sistema inmunitario innato.**

El sistema inmunitario innato es el principal contribuyente de la respuesta inflamatoria aguda inducida por infección o daño tisular; influyendo también en la estimulación de la respuesta inmunitaria adquirida. La inflamación es definida por una reacción compleja y fisiológica del hospedero que puede producirse a causa de varios estímulos y factores; por ejemplo, las infecciones, traumas, daño tisular, e infarto cardiaco entre otros (**Nathan C, 2002**).

La inflamación de tipo clásica se caracteriza por los cinco puntos cardinales de la inflamación del latín: ***rubor – calor – dolor – tumor y pérdida de la función***. Por definición, la inflamación implica un proceso que involucra eventos de destrucción a través de moléculas secretadas con activación de células inflamatorias del hospedero y que conllevan a la reparación del tejido dañado (**Ricciotti E et al, 2011**).

A lo largo del tiempo, varias aportaciones científicas han contribuido a establecer las bases moleculares de la vía inflamatoria, entre ellas; la explicación de los síntomas macroscópicos (aumento de la permeabilidad vascular del endotelio, extravasación de componentes del suero y activación de las células inmunes inflamatorias por ejemplo, los fagocitos profesionales) (**Rocha e Silva M, 1978; A Scott et al, 2004**) (Tabla 1).

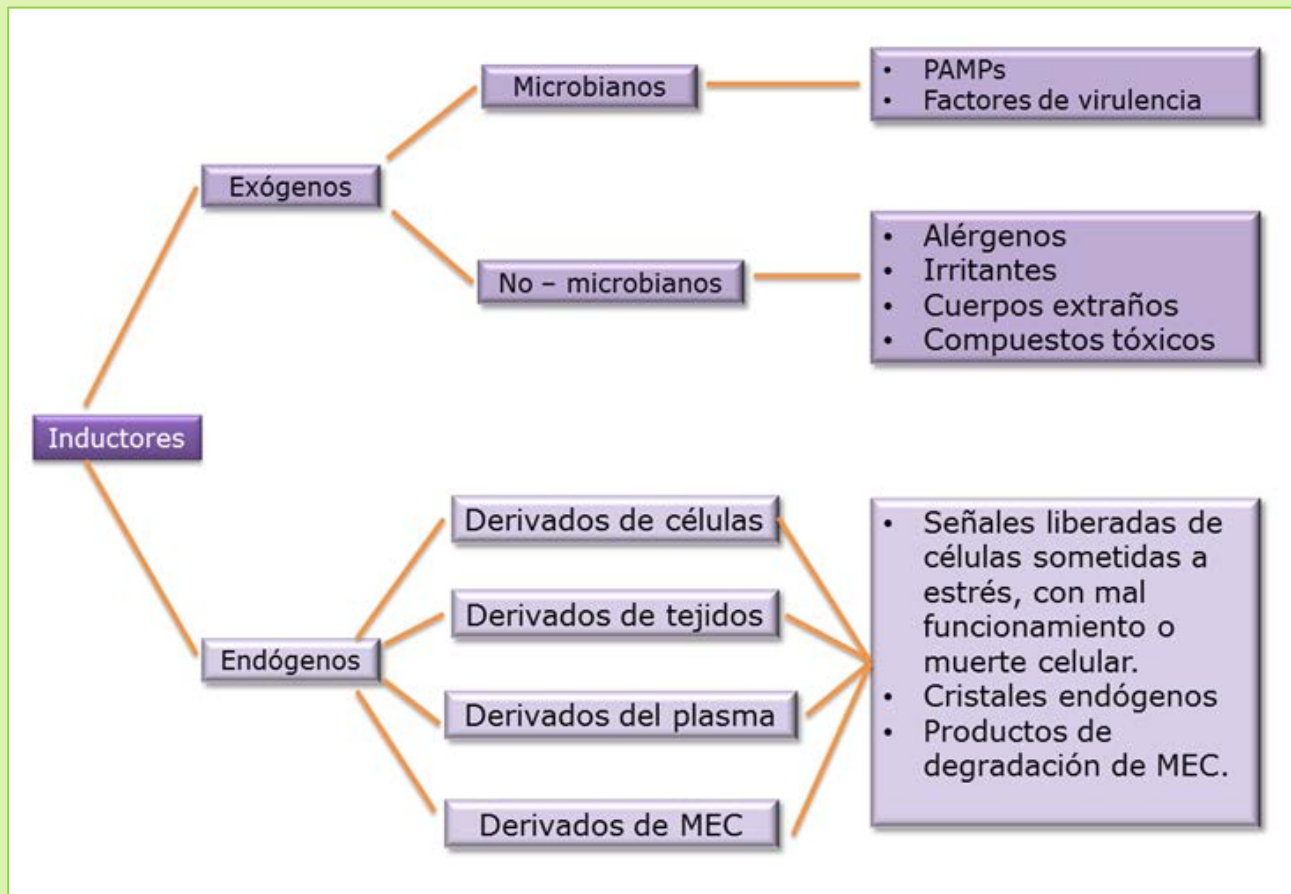


Tabla 1. Antecedentes históricos de la inflamación (entre el primero a veinteavo siglos AC).

Autor, año	Contribución	Interpretación histórica	Interpretación hoy en día
<b>Celsus, 1er siglo AC</b>	Del latín “ <i>rubor et tumor cum calore et dolore</i> ”	Primer documentación de los signos cardinales de la inflamación	Se ha destacado la importancia de las observaciones clínicas en lugar de la medicina basada en la filosofía.
<b>Galeno, 3er siglo AC</b>	“secreción de pus”	Infección e inflamación es benéfico para reparar las lesiones	La inflamación fue vista como una expresión de la teoría humoral en el siglo XIX.
<b>Virchow, 1871</b>	“La reacción inflamatoria es una consecuencia de una excesivo entrada de células intersticiales, de fagocitos... filtrados a través de la pared de los vasos”	Inflamación como una proliferación patológica de células debido a la fuga de nutrientes a través de los vasos”	Reconocimiento celular natural de la respuesta inflamatoria.
<b>Cohnheim, 1873</b>	“finalmente...estos se encuentran fuera del vaso...un corpúsculo de sangre incolora”	Corpúsculos de sangre fueron vistos como mecanismos patológicos por los que las infecciones se propagan, secundarios a la lesión vascular.	Primera descripción de diapédesis.
<b>Metchnikoff, 1908</b>	El primer movimiento de la reacción inflamatoria es una acción digestiva...hacia el agente nocivo”	La inflamación como una respuesta celular de defensa contra los patógenos, guiado por los vasos en lugar de un aspecto de la misma patología.	Primero en expresar la opinión de que los fagocitos fueron protectores, no patológico.
<b>Lewis, 1927</b>	La inflamación cómo la “triple respuesta” al daño	La inflamación se caracteriza por eventos vasculares mediados tanto por los productos químicos locales y por los axones.	Primer reconocimiento de la inflamación neurogénica; primera caracterización fisiológica de eventos vasculares.
<b>Rocha e Silva, 1974</b>	La inflamación como un “fenómeno multimediado, con un patrón en la que todos los mediadores van y vienen en el momento oportuno...incremento en la permeabilidad vascular, la atracción de leucocitos, la producción de dolor, edema local y la necrosis”	Inflamación definida por los mediadores.	Definición bioquímica de la inflamación

Tomado de: A Scott, K Khan et al, 2004, Br J Sports Med. Jun 2004; 38(3):248-9

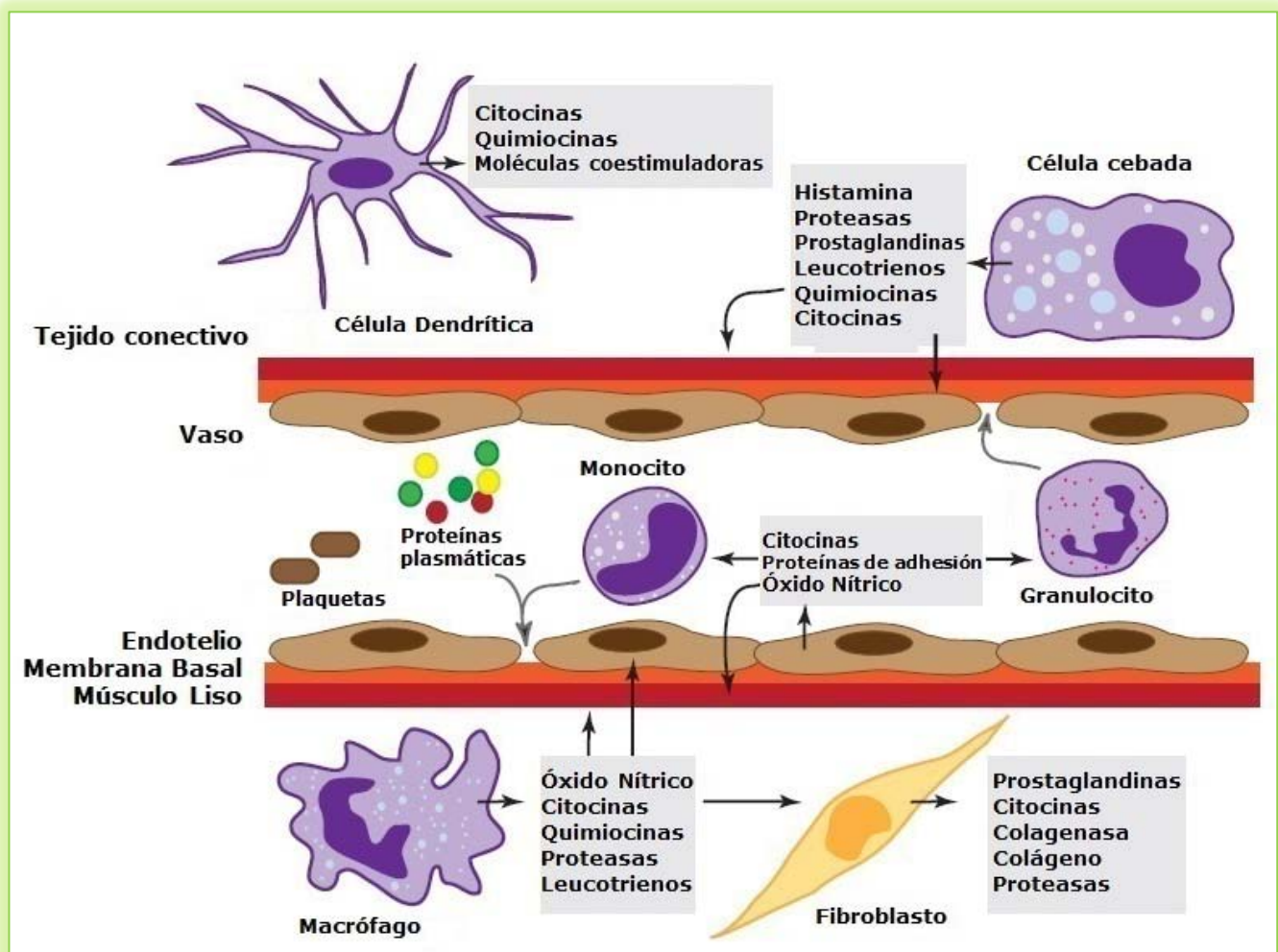
En la actualidad la vía de la respuesta inflamatoria es coordinada por varios elementos importantes: los **inductores**, **sensores**, **mediadores** y las acciones de las *moléculas efectoras* sobre los *órganos blanco* (Medzhitov R, 2008; Medzhitov R, 2010) (Figura 6).



**Figura 6. Las vías de la respuesta inflamatoria.** En un esquema genérico de la inflamación son 4 componentes importantes: los inductores, sensores, mediadores y efectoras. Los inductores de la inflamación pueden clasificarse en exógenos y endógenos, en estos grupos están incluidas las moléculas tipo PAMPs y las moléculas de DAMPs.

**Tomado de: Medzhitov R 2008; Nature 454:428-535**

La activación de los **PRRs-PAMPs** involucra la síntesis de una gran cantidad de mediadores inflamatorios, por ejemplo citoquinas, quimiocinas, leucotrienos, liberación de proteasas y prostaglandinas por los leucocitos polimorfonucleares, sistema monocito-Macrófago y células cebadas (**Newton K et al, 2012**) (**Figura 7**). La activación de las células inflamatorias por los inductores endógenos, (por ejemplo, las moléculas *PAMPs*, como LPS) conducen a la síntesis de diversos mediadores pro- y anti-inflamatorios (**Newton K et al, 2012**).



**Figura 7. Células y mediadores de la respuesta inflamatoria.** Moléculas derivadas del plasma y células en respuesta al daño tisular o infección por patógenos median la inflamación. Este proceso involucra cambios vasculares, adición de migración y activación de leucocitos: Granulocitos incluidos, basófilos y eosinófilos, así también la participación de macrófagos.

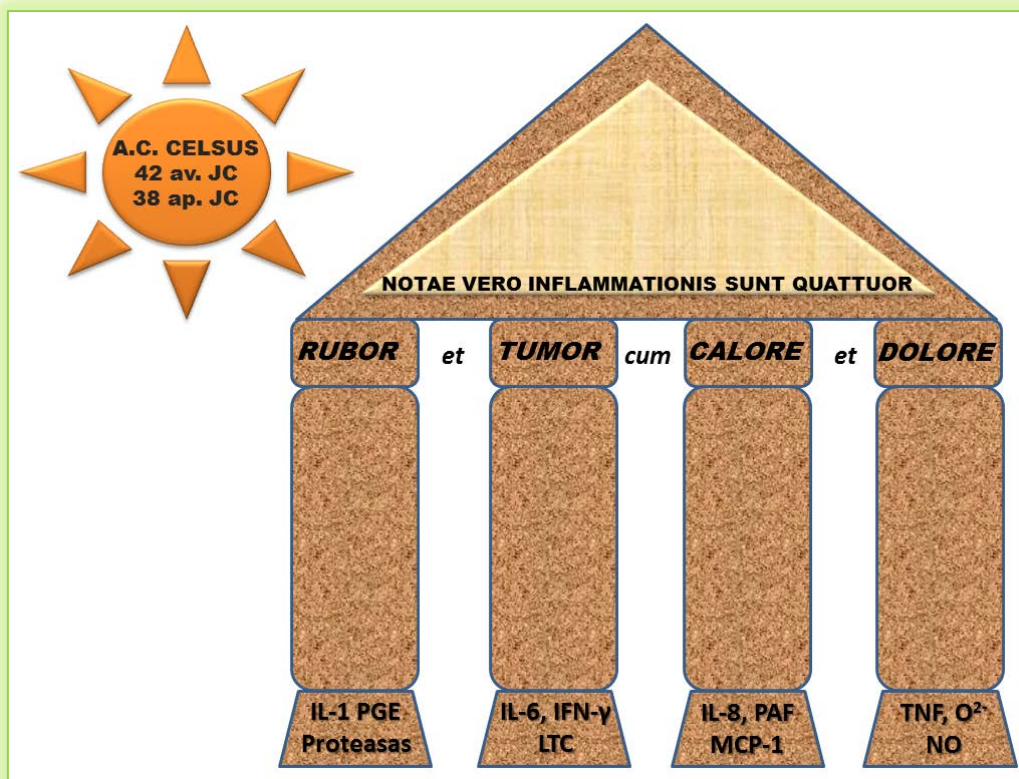
**Tomado de: Newton K et al: 2012 Cold Spring Harb Perspect Biol; 4:1-19.**

### **2.3.1 Mediadores de la respuesta inflamatoria (citocinas).**

La migración y activación de neutrófilos y monocito-macrófago favorece a la síntesis de mediadores inflamatorios, entre ellos, la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-12) (**Montero Vega MT et al, 2008; Lippolis J Ded et al, 2008**).

Varias de estas proteínas (**las citocinas**) pueden regular la activación de la inmunidad innata con capacidad de inducir señales biológicas e intervenir en la activación y diferenciación de células T, en funciones cooperadoras (TH) (**Newton K et al, 2012**). La síntesis de citocinas además mantiene la comunicación intercelular y constituye un evento importante a la regulación de las respuestas inmunes del hospedero. Varias de las citocinas están involucradas en los signos clínicos de la inflamación ya mencionados; *rubor, calor, dolor, tumor y pérdida de la función* (**Borish LC et al, 2003; Akdis M et al, 2011**) (**Figura 8**).

Por ejemplo, citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (**TNF- $\alpha$** ), la interleucina 1 (**IL-1**) e **IL-6** son proteínas pleiotrópicas que regulan la muerte celular de los tejidos inflamados, modifican la permeabilidad del endotelio vascular, reclutamiento de células hacia tejidos inflamados e inducen la síntesis de proteínas de fase aguda (**Commins SP et al, 2010**).



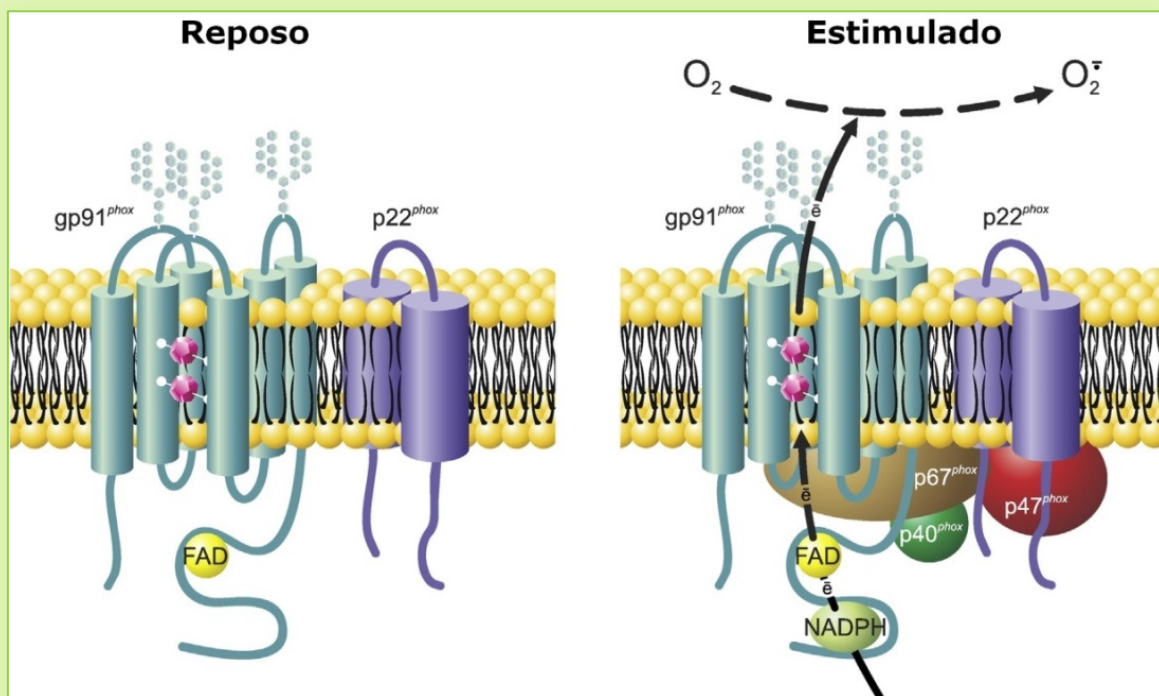
**Figura 8 . Las citoquinas sostienen los signos cardinales de la inflamación.** Parte de las moléculas mediadoras de la respuesta inflamatorias incluyen a citoquinas como (IL-1) interleucina-6 (IL-6), IL-8, factor activador de plaquetas (PAF), TNF- $\alpha$ , entre otros mediadores como: Prostaglandinas (PGE), proteasas, intermediarios de oxígeno (por ejemplo anión superóxido (O<sup>2-</sup>) óxido nítrico (NO)).

Durante los eventos moleculares de la respuesta inflamatoria también se sintetizan otros mediadores distintos a las citoquinas, entre ellos la secreción de especies oxidativas (ROS, intermediarios de oxígeno reactivo, entre ellos anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), radicales hidroxilo ( $\bullet$ OH), anión hipoclorito (ClO<sup>-</sup>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)) también denominados bajo el término de “**estallido respiratorio**”.

La producción de ROS representa uno de los principales mecanismos microbicidas de los fagocitos profesionales, considerados también eventos bioquímicos dependientes de consumo de oxígeno molecular. Por ejemplo, en neutrófilos al activarse generan grandes cantidades de estos intermediarios, y en menor grado los macrófagos, siendo la participación de las enzimas contenidas en los compartimentos vesiculares como la mieloperoxidasa, importantes en la generación del ion hipoclorito por los fagocitos (Suzuki N, Mittler R. 2012).

### 2.3.2 El estallido respiratorio (secreción de ROS) otro de los mediadores importantes de la respuesta inflamatoria.

Los fagocitos profesionales neutrófilos y el sistema monocito-macrófago, inducen el “**estallido respiratorio**”. Las especies reactivas del oxígeno (**ROS**) liberadas por los fagocitos son importantes mecanismos microbicidas. Sin embargo, también en cierto grado se han considerado como moléculas tipo **DAMPs**. La principal fuente de estas especies oxidativas es la activación de la enzima NADPH oxidasa de los fagocitos (Torres MA et al, 2006) (Figura 9).

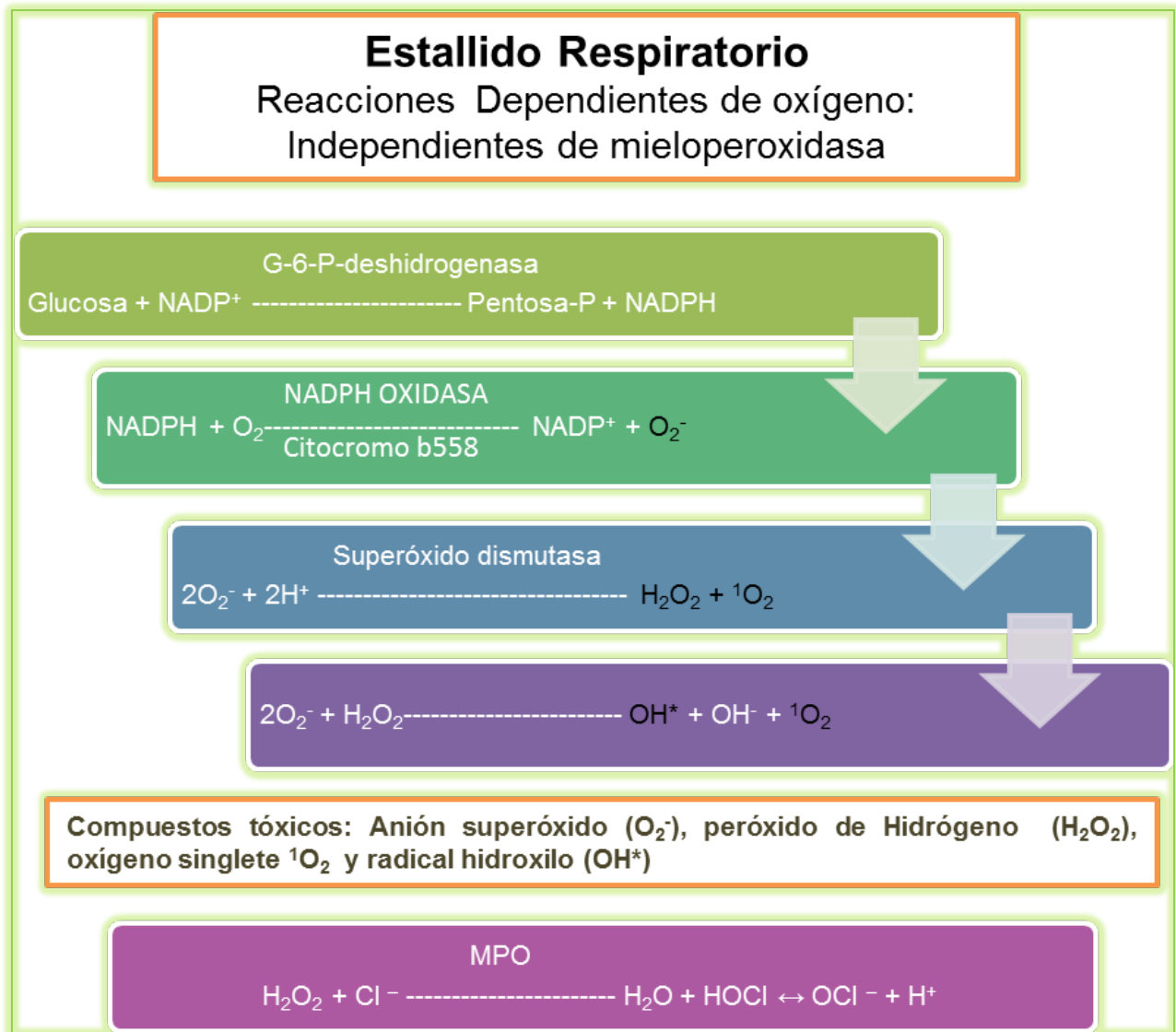


**Figura 9. La anatomía de la NADPH oxidasa del fagocito.**

El componente de membrana de la NADPH del fagocito, involucra al citocromo B-558 junto al complejo de proteínas denominadas proteínas (phox) como la glicoproteína de 91Kd y gp22 entre otras. En células estimuladas, la enzima NADPH oxidasa es reclutada y expuesta a la membrana del fagocito y la gp91 de la NADPH oxidasa toma el oxígeno molecular y produce una de las primeras especies de los ROS (el anión superóxido, O<sub>2</sub><sup>-</sup>).

*Tomado de: Nauseef WM. Biochim Biophys Acta. 2014 Feb;1840(2):757-67.*

La activación de la enzima NADPH oxidasa en el fagocito incluye la generación de varios productos oxidantes (Maghzal GJ, et.al, 2012). Los eventos bioquímicos asociados al estallido respiratorio se agrupan en las siguientes reacciones:



**Figura 10. Secreción de intermediarios de oxígeno reactivo.** Reacciones dependiente de oxígeno

Estas diferentes reacciones se clasifican como mecanismos microbicidas dependiente de oxígeno, así como las dependientes de mieloperoxidasa, tal es el caso del ion hipoclorito. Esta última es una molécula altamente reactiva. En estos eventos bioquímicos también interviene la superóxido dismutasa, la cual dismuta el anión superóxido en peróxido de hidrógeno **(Maghzal GJ, et al 2012)**.

El papel de las moléculas oxidativas como segundas señales se ha asociado al daño en el DNA, modificación de proteínas y muerte celular **(Torres MA et al, 2006)**. En algunos estudios se ha demostrado que bajas concentraciones de estas especies median señalización a través de receptores de tirosina cinasas en subdominios celulares específicos **(Dostert C et, 2008)**.

Estudios recientes, también han demostrado la participación de ROS en la activación de *NALP3* en el inflamosoma. Varios estímulos como las moléculas de ATP, toxinas de bacterias (formadoras de poros), asbestos y sílica inducen la generación (corta y rápida) de ROS vía la activación de *NLRP3*, la cual se ve afectada cuando se emplean secuestrantes de ROS **(Martinon F et al, 2009)**.

Esto sugiere a los ROS como reguladores de la homeostasis del hospedero y se proponen como posibles candidatos de control a la desregulación de desórdenes inflamatorios crónicos del intestino (enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa) **(Alzoghaibi MA, 2013)**.

Por otro lado, en la inmunidad innata el papel fisiológico de la microbiota intestinal (ecosistema formado por una variedad de nichos ecológicos ocupados por diferentes especies y cepas bacterianas) se ha considerado importante para la homeostasis y metabolismo del intestino. **(Klaenhammer TR et al, 2012)**. Estas funciones básicas han llevado a la preparación de formulaciones apropiadas (por ejemplo las leches fermentadas con microorganismos derivados de microbiota, los lactobacilos **(Aureli P et al, 2011)**). Los microorganismos con funciones de probióticos son parte importante de las terapéuticas alternativas en la medicina moderna.



### 3. ANTECEDENTES

El concepto de los probióticos probablemente se remonta a 1908 cuando Eli Metchnikoff (Premio Nobel) sugirió que la larga vida de los agricultores de Bulgaria era debido al consumo de productos de leche fermentados. Posteriormente, un grupo experto de la comisión de la FAO/WHO en el 2002, definió a los probióticos como: “ Microorganismos vivos” que pueden ser consumidos en la dieta suplementaria y que son capaces de sobrevivir en el tracto gastrointestinal humano **(Delcenserie V et al, 2008)**.

Otros autores, Lilly y Sellwell citan a los probióticos como microorganismos selectivos vivos no patógenos, incluida la biota microbiana. Los probióticos usados comúnmente incluyen a los grupos de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* y *Saccharomyces*. La mayoría de los probióticos contienen grupos de bacterias de cepas no patógenas que es tan propuestos para la modulación de sistemas fisiológicos del hospedero entre ellos, el sistema inmunitario **(Morais MB et al, 2006)**.

Estudios clínicos en modelos murinos y estudios *in vitro* demuestran que la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias ( IL-4, IL -10 e IL-13) pueden modularse por la presencia de bacterias probióticas. Varios estudios demostraron un efecto positivo de la secreción del isotipo de inmunoglobulina IgA y de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas) con acción inhibitoria sobre patógenos del tracto gastrointestinal (causantes de diarrea) **(Gillor O, et al. 2008)**.

Microorganismos probióticos, especialmente de las bacterias que producen ácido láctico (LAB, por sus siglas en inglés) han sido de utilidad para el tratamiento de diarrea asociada al uso de antibióticos, diarrea del viajero y las causadas por rotavirus en niños, así como diarreas en adultos jóvenes **(Szajewska H et al, 2001)**. Probióticos, lactobacilos y bifidobacterias, presentes en los alimentos fermentados pueden tener un papel muy importante en el riesgo de cáncer de colon **(Wollowski I et al, 2001, De Moreno de LeBlanc A. et al, 2007)**.

El mecanismo molecular por el cual bacterias probióticas afectan al sistema inmune no está determinado siendo punto de interés para diversos estudios. Sin embargo, existen fuertes evidencias del efecto biológico en el aumento de respuesta inmune innata y adquirida **(Borchers AT et al, 2009, Gupta V. et al, 2009)**.

Una de las bacterias probióticas conocidas es *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) descrito en 1985, produce aumento de las células productoras de IgA en la mucosa intestinal. También la liberación local de interferones, facilita el transporte y la captura de los antígenos por las células linfoides en las placas de Peyer **(Reid G. et al, 2003)**.

En trabajos previos, la administración oral de *Lactobacillus casei* en ratones de la cepa BALB/c favorece la síntesis de IgA y el aumento en la expresión de los receptores de inmunidad innata, además de la producción de citocinas IL-5 y de IL-6 **(Galdeano CM et al, 2006)**.

Muchas de las cepas bacterianas consideradas probióticas pueden influir en los mecanismos inmunitarios innatos, por ejemplo en la fagocitosis. Perdígón y colaboradores en 1988, demostraron que *L. acidophilus* y *L. casei* aumentan la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales. Además se demostró que tienen efecto biológico al aumentar la adherencia de los leucocitos al epitelio **(Perdígón G et al, 1988)**. Así también, *B. lactis* HN019 aumenta también la fagocitosis de células mononucleares de sangre periférica **(Arunachalam K et al, 2000)**.

En otros estudios, el uso de *L. rhamnosus* GG regula positivamente la expresión de los receptores de fagocitosis como CR1, CR3, FcγRIII y FCαR en los neutrófilos **(Pelto L. et al, 1998)**. Así mismo, la estimulación de línea celular de macrófagos J744A.1, por *Lactobacillus casei* Shirota (probiótico de bacterias Gram positivas) induce la activación para la liberación de citocinas inflamatorias **(Cross ML. et al, 2004)**.

Por otro lado, las bifidobacterias tienen efecto anti-inflamatorio por inhibición del factor nuclear NF- $\kappa$ B, en células estimuladas por LPS, y se sugiere que dicho efecto es dependiente de la cepa probiótica usada **(Riedel CU. et al, 2006)**. Además en epitelio inflamado se ha observado que las *Bifidobacterium* tienen la capacidad de inhibir la inflamación inducida por LPS. En este proceso, las células epiteliales del tracto gastrointestinal expresan niveles alterados del receptor de TLR4 y la molécula de CD14 (molécula de fosfatidilinositol).

Por el contrario, bajo condiciones normales del epitelio intestinal (no inflamado) ambas moléculas TLR4 y CD14, tienen una expresión baja y están restringidas a las criptas. Así también, la expresión de estas moléculas CD14 y TLR4 aumenta en las células epiteliales intestinales de pacientes con colitis ulcerativa y enfermedad inflamatoria del intestino, se atribuye este aumento a dos posibles hipótesis: 1) el fondo genético asociado al polimorfismo de la molécula de TLR4 y 2) la desregulación de citocinas inflamatorias dependientes de receptores de la inmunidad innata **(Cario E. et al, 2000, Furrir E. et al, 2005)**.

En estudios previos, sobre la interacción de células epiteliales de intestino y LAB, se determinó que el tratamiento con anti-TLR4 no interfiere en la respuesta de *L. casei* CRL431. Sin embargo, el efecto de la producción de IL-6 por *L. helveticus* R389 (viable y no viable) es parcialmente bloqueada por anti-TLR4. Estos resultados sugieren que las estructuras de la pared celular de estas bacterias parcialmente asemejan a los ligandos que se unen al receptor de TLR4. Esta inhibición parcial de la síntesis de IL-6 en células epiteliales tratadas con anti-TLR4 y después de la estimulación con LPS, puede ser a un reconocimiento independiente de TLR4 **(Triantafyllou K. et al, 2001)**.

En contraste, en el modelo de colitis provocada por la administración de dextran sulfato de sodio en murinos, el probiótico como *Lactobacillus casei* previene el desarrollo de la inflamación y regula de forma negativa el infiltrado de neutrófilos; y la acción de dicho probiótico es dependiente de la expresión de TLR4 (**Chung YW et al, 2008**).

Otros reportes, describen que el probiótico de *Lactobacillus casei* DN-114 001 disminuye la secreción de TNF- $\alpha$  de células infectadas con *Shigella* a través de un proceso que involucra la participación de una vía de ubiquitina/proteosoma) ríobajo que permite la expresión de la molécula I-kB $\alpha$  (**Tien MT. et al, 2006**).

Asimismo, estudios clínicos han sugerido a los probióticos como una terapia potencial importante al control de ciertas enfermedades inflamatorias como la enfermedad inflamatoria crónica intestinal (EII), la cual agrupa a dos principales enfermedades: la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerativa (CU); en estas enfermedades la condición en el hospedero es una inflamación crónica del tracto gastrointestinal que se mantiene a lo largo de la vida (**Bouma G, et al, 2003**).

En adición a la predisposición genética, se ha discutido que el balance de citocinas pro-y anti-inflamatorias juega un papel muy importante en padecimientos gastrointestinales (IBD e CD) causando daños severos al epitelio gastrointestinal, y se propone que los probióticos pueden intervenir en la expresión de la inmunidad innata.

Así también, se ha sugerido que los probióticos pueden intervenir en la regulación de la función del macrófago por activación de TLR2 y TLR4. Los mecanismos moleculares y celulares propuestos de probióticos benéficos en la EII incluyen 4 puntos importantes:

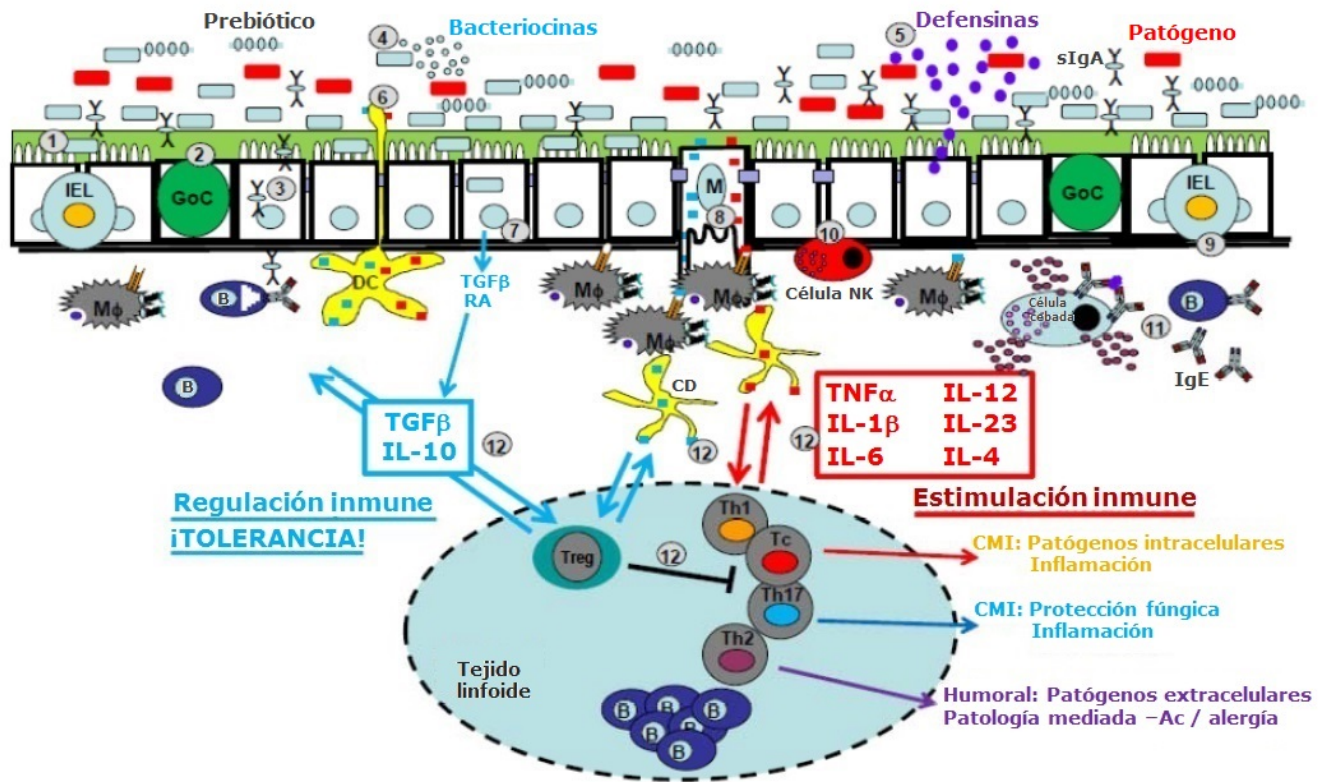
1) Los probióticos bloquean el efecto de bacterias patógenas por la síntesis de sustancias bactericidas y compiten por la adherencia del microorganismo patógeno al epitelio gastrointestinal.

2) Los probióticos regulan la respuesta inmunitaria, por el aumento de la inmunidad innata y la modulación de la inflamación inducida por microorganismos patógenos vía las proteínas tipo Toll (TLRs) regulando la señalización de estos receptores.

3) Los probióticos regulan la homeostasis del epitelio por aumento de la resistencia de las células epiteliales que proveen una barrera funcional y estimulan la respuesta protectora.

4) Los probióticos modulan a través de las vías de señalización en las células del hospedero vía NF- $\kappa$ B para mediar las funciones del epitelio gastrointestinal. **(Vanderpool C. et al, 2008).**

En combinación a los efectos biológicos de probióticos también se han considerado a los prebióticos definidos como alimentos funcionales naturales que contienen componentes biológicos activos como efectos benéficos a la salud, así como la prevención de infecciones bacterianas y virales **(Roberfroid M. et al, 2010) (Figura 11).**



**Figura 1. Modulación de la barrera intestinal y respuesta inmune por prebióticos y probióticos.** Los prebióticos y probióticos tienen diferentes efectos sobre la mucosa intestinal y en la respuesta inmune del tejido linfático asociado a mucosa intestinal (GALT). Entre los efectos están aumentar la expresión de mucina y secreción de moco e inducir péptidos antimicrobianos, transferencia de antígenos por células M. Activación de CD8+, NK, APC con producción de IL-12 e IL-15; y mantenimiento de tolerancia por  $TGF-\beta$  e IL-10 (regulación inmune).

Tomado de: Hardy H, et al. *Nutrients*. 2013 May 29;5(6):1869-912.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La biota intestinal en interacción con los componentes inmunitarios constituye un factor muy importante para mantener la homeostasis y protección del hospedero a la infección por diferentes grupos de patógenos.

Los macrófagos, son parte importante del sistema inmunitario innato, al activarse pueden liberar diferentes moléculas por ejemplo, citocinas (pro y anti-inflamatorias), el efecto inmune de los microorganismos benéficos conocidos como probióticos podrían mantener un estado de “alerta” en el hospedero y desarrollar un papel potencial en la función efectora de estas células. Por lo tanto, se propone que los probióticos activan a los macrófagos vía la participación de los receptores de la inmunidad innata principalmente la molécula de TLR2.

## **5. JUSTIFICACIÓN**

Estudios realizados en modelos animales han de mostrado a las bacterias probióticas como moléculas que estimulan la producción de citocinas pro- y anti- inflamatorias, que aumentan la secreción del isotipo de inmunoglobulina IgA y también de sustancias antimicrobianas ( bacteriocinas) con efecto específico sobre patógenos del intestino. El entender la contribución de estas bacterias probióticas en la función inmunitaria de macrófagos y el papel de los receptores tipo Toll ( TLRs), nos permitirá obtener información de sus propiedades como adyuvante capaces de estimular y regular respuestas inmunitarias en el hospedero.



## **6. HIPÓTESIS**

Las bacterias lácticas utilizadas como probióticos activan la respuesta inmunitaria en MDM de sangre periférica humana dependiente de la concentración, tiempo y cepa probiótica empleada. Además induce la producción del esmalto respiratorio y la secreción de citoquinas pro y anti-inflamatorias vía la participación de TLR2, siendo los efectos biológicos relacionados a la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B.

## 7. **OBJETIVOS**

### 7.1. **Objetivo general**

Analizar por ensayos *in vitro*, si las bacterias probióticas de cuatro productos comerciales activan a los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de origen humano, con el propósito de conocer su función biológica en el hospedero.

### 7.2. **Objetivos específicos**

- 7.2.1. Medición del estallido respiratorio (quimioluminiscencia) *in vitro* en los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana en respuesta a la estimulación de bacterias probióticas.
- 7.2.2. Determinar la producción de citocinas pro (IL-8 y TNF- $\alpha$ ) y anti-inflamatorias (IL-10) por el estímulo de las bacterias probióticas
- 7.2.3. Estudiar la translocación nuclear NF- $\kappa$ B a la estimulación con las cepas probióticas en los macrófagos derivados de sangre periférica humana.
- 7.2.4. Analizar la participación del receptor de TLR2 en la producción de citocinas producidas a la estimulación con las cepas probióticas.

## 8. MATERIAL Y MÉTODOS.





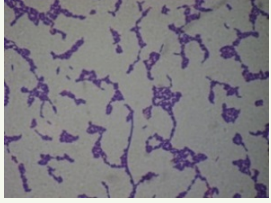
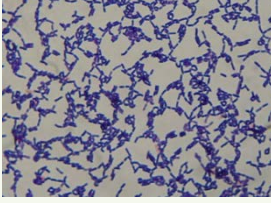
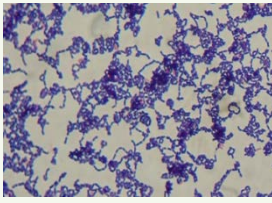
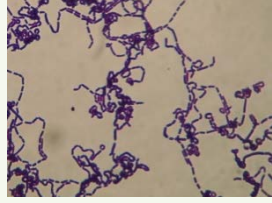




### 8.1 Cepas probióticas aisladas de productos comerciales.

En este trabajo se utilizaron 4 cepas probióticas de *Lactobacillus*, aisladas de productos de l eches fermentadas c omerciales ( **Figura 1 2**). El a islamiento d e las cepas probióticas fue d esarrollado por l os colaboradores del *Dr. Mariano García-Garibay* ( *Departamento d e B iotecnología, U niversidad A utónoma Metropolitana-Iztapalapa*) las mismas fueron donadas para la presente tesis. Las c aracterísticas d e l as ce pas aisladas de l os pr oductos c omerciales s e describen en l a ( **Figura 1 3**). Los pr obióticos de bacterias l ácticas (*LGG*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus*) se crecieron en 3ml de medio MRS caldo y *L. caseí* en 3ml de MRS/NaCl 4%. Se dejaron en incubación durante 24 horas a 37°C, posteriormente el paquete bacteriano se cosechó y fue almacenado en 1ml de medio MRS caldo s uplementado d e 20% de glicerol y al macenado a -70°C hasta su uso.



**Figura 12. Cepas probióticas de productos comerciales.**

Las especies de *Lactobacillus* utilizadas en el estudio fueron aisladas de cuatro productos comerciales: Producto comercial 1 ( Capsulas C ulturrelle), 2 ( Leche N AN – Nestle), 3 (Chamyto) y 4 (Bio – 4). La mayoría de los productos corresponden a leches fermentadas.

<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
Cápsulas Culturelle	Leche en polvo NAN (Nestlé)	Leche fermentada Chamyto (Nestlé)	Leche fermentada Bio 4 (Lala)
			
MRS-pH 5.2, 42°C	MRS-pH 5.2, 42 °C	MRS-pH 5.2, 42°C	MRS-NaCl, 37°C
Microaerófilos			
Gram positivos			
			
Bacilos largos, delgados y forma cadenas.	Bacilos cortos, de bordes redondos y empalizados.	Bacilos muy cortos y gruesos, forma cadenas separadas.	Bacilos en forma de bastón, forman filamentos y son más largos.
			
Forma colonias blancas, cremosas y opacas.	Colonias grandes, blanco brillante.	Las colonias son pequeñas de consistencia cremosa.	Colonias grandes con ligera elevación convexa de borde entero, ligeramente café.

**Figura 13. Características generales de probióticos de *Lactobacillus*.** El crecimiento bacteriano se llevó a cabo en medio de cultivo MRS para *LGG*, *L rhamnosus* y *L helveticus*, en el caso de *L. casei* se adicionó NaCl y los cuales se incubaron durante 24 horas. La tinción de Gram demostró ser treptobacilos con extremos redondos, Gram positivos. El crecimiento en MRS-agar, las colonias bacterianas tardan mayor tiempo en crecer, generalmente 48 horas.

#### \*IDENTIFICACIÓN DE CEPAS POR EXTRACCIÓN DE DNA Y PCR

La extracción de DNA genómico total se realizó mediante el empleo del *Kit Wizard™*, DNA Purification Kit (Promega, USA). La reacción para la amplificación (PCR) se llevó a cabo en un termociclador Corbett Research. Los productos de PCR se purificaron por medio de los sistemas comerciales *Wizard™ SV Gel and Clean-Up System* (Promega, USA). La secuenciación de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la UAM-I.

## 8.2 Crecimiento bacteriano y cuantificación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de probióticos de *Lactobacillus*.

De los lotes de bacterias congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  se tomó un vial de cada cepa probiótica; en condiciones de esterilidad se prepararon tres tubos con 3ml de medio MRS-caldo (Difco™ Lactobacilli MRS Broth) y se inocularon 100 $\mu\text{l}$  de cada una de las cepas respectivamente *LGG*, *L. rhamnosus* y *L. helveticus*) y en el caso de *L. casei* el medio MRS suplementado con 4% de NaCl. Se dejaron en incubación por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  sin agitación. Transcurrido este tiempo se cosechó el crecimiento bacteriano en tubos eppendorf y se concentró por centrifugación a 5000rpm/5min (microcentrifuga Eppendorf Centrifuge).

Posteriormente el paquete bacteriano obtenido se lavó tres veces con solución salina fisiológica (SSF) pH 7.2 bajo las mismas condiciones de centrifugación, finalmente se resuspendió en 1 000 $\mu\text{l}$  de SSF. Enseguida se homogenizó la suspensión bacteriana y se realizó una dilución 1:2 (500 $\mu\text{l}$  de cepa probiótica + 500 $\mu\text{l}$  de SSF), los 500  $\mu\text{l}$  restantes se conservaron en condiciones de esterilidad.

Se ajustó la bacteria a una absorbancia de 0.9 a 1 a una longitud de onda de 600nm en espectrofotómetro (GeneQuant pro). Una vez que se conoce la absorbancia en esta alícuota, en otros stock del mismo lote de bacteria se realiza el mismo procedimiento.

De esta suspensión bacteriana con absorbancia conocida se realizaron diluciones seriadas de cada cepa; la primera dilución 1:1000 (9990 $\mu\text{l}$  de SSF + 10 $\mu\text{l}$  cepa estéril), y una segunda dilución 1:100 a partir de la primera (factor de dilución  $1 \times 10^5$ ). Después se inocularon 100 $\mu\text{l}$  de esta última dilución para cada una de las cepas probióticas en placas de MRS agar, en muestras por duplicado de cuatro experimentos independientes y las placas se dejaron en crecimiento durante 48h a  $37^{\circ}\text{C}$  (**Figura 14**).

Después de la incubación se contaron las colonias desarrolladas en las placas de cada una de las cepas probióticas y se aplicó la siguiente fórmula matemática.

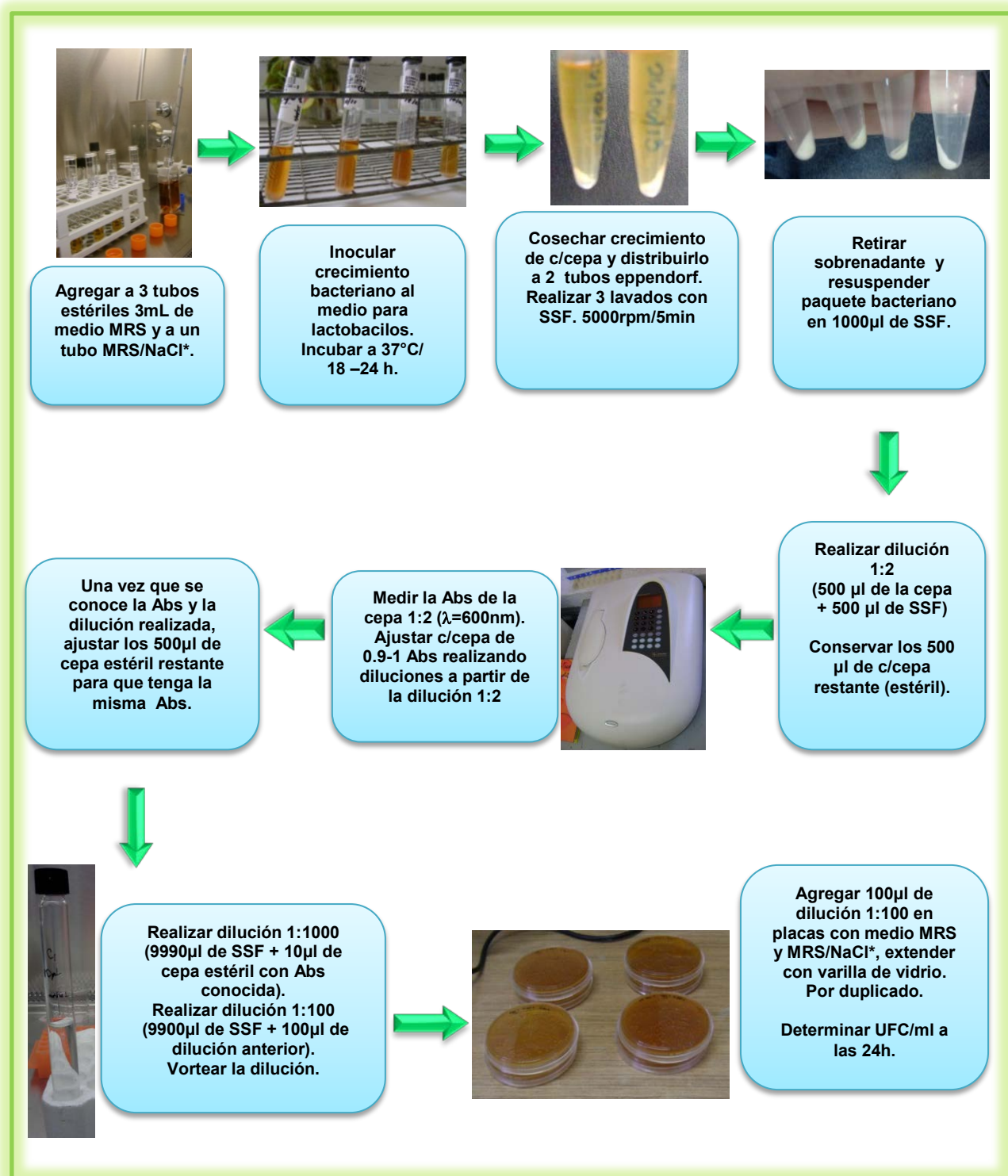
$$\frac{\text{Número de colonias} * FD}{\text{Alicuota sembrada (ml)}} = UFC/ml$$

FD= Factor de dilución (inverso de la dilución)

$$\frac{286 \text{ colonias } (10^5)}{0.1 \text{ ml}} = 2.86 \times 10^8 UFC/ml$$

En la **Tabla 2** se resumen el número de colonias cuantificadas.

Tabla 2. Unidades Formadoras de Colonias (UFC).	
Cepas	UFC/ml
<i>L. rhamnosus GG</i>	2.86 x 10 <sup>8</sup>
<i>L. rhamnosus</i>	2.35 x 10 <sup>8</sup>
<i>L. helveticus</i>	3.865 x 10 <sup>8</sup>
<i>L. caseí</i>	1.13 x 10 <sup>8</sup>



**Figura 14. Cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC) de probióticos de bacterias lácticas.** El procedimiento de las UFC se realizó por métodos de dilución en placa mediante la dilución de la bacteria en solución salina fisiológica. Cada uno de los ensayos de realización en muestras por duplicado en 4 experimentos independientes.

### 8.3 Cepas probióticas inactivadas por calor.

Se realizó una resiembra de las cuatro cepas probióticas en caldo MRS (*LGG*, *L. rhamnosus* y *L. helveticus*) y MRS/NaCl 4% (*L. casei*) como se indicó anteriormente, se dejaron en incubación por 24 horas a 37°C. De igual manera, el crecimiento bacteriano se lavó tres veces y se resuspendió en 1000 µl de SSF, posteriormente se midió la absorbancia siguiendo el procedimiento anterior.

Las bacterias probióticas de cada cepa con absorbancia conocida y en condiciones estériles se inactivaron por calor en baño de agua a 85°C durante 15 minutos. Después se sembraron en placas con medio de cultivo MRS-agar y se incubaron a 37°C por 48 horas para verificar que las bacterias no están viables. Posteriormente se hicieron alícuotas de 500 µl las cuales se rotularon con su respectivo nombre, fecha de resiembra y Abs. Fueron almacenadas a 4°C para su posterior uso (a las 24 horas de ser inactivadas o el mismo día de uso).

### 8.4 Obtención de células mononucleares (MN) de sangre periférica humana.

En una fase preliminar se separaron las células mononucleares (linfocitos y monocitos) de acuerdo al método de centrifugación en gradiente de Bøyum usando ficoll (Lymphoprep) de concentrados leucocitarios obtenidos del departamento de Medicina Transfusional del Hospital Infantil de México Federico Gómez. El procedimiento consistió en realizar una dilución del concentrado con SSF en volúmenes 1:1 (25 ml de sangre + 25 ml de SSF estéril), se homogenizó lentamente con una pipeta serológica.

En otro tubo de 50 ml de fondo cónico se colocó 15 ml de solución gradiente Lymphoprep (Nycomed, Oslo; de densidad  $1.077 \pm 0.001$  g/ml) y sobre la pared del tubo se añadió lentamente con una pipeta serológica 30 ml de sangre diluida para no alterar el gradiente. Se centrifugó a 2500 rpm durante 40 minutos a 25°C en condiciones mínimas de arranque y freno (0 y 1 respectivamente, de acuerdo al tipo de centrifuga) (Centrifuga Universal 32R. Hettich Zentrifugen) **(Figura 15)**.



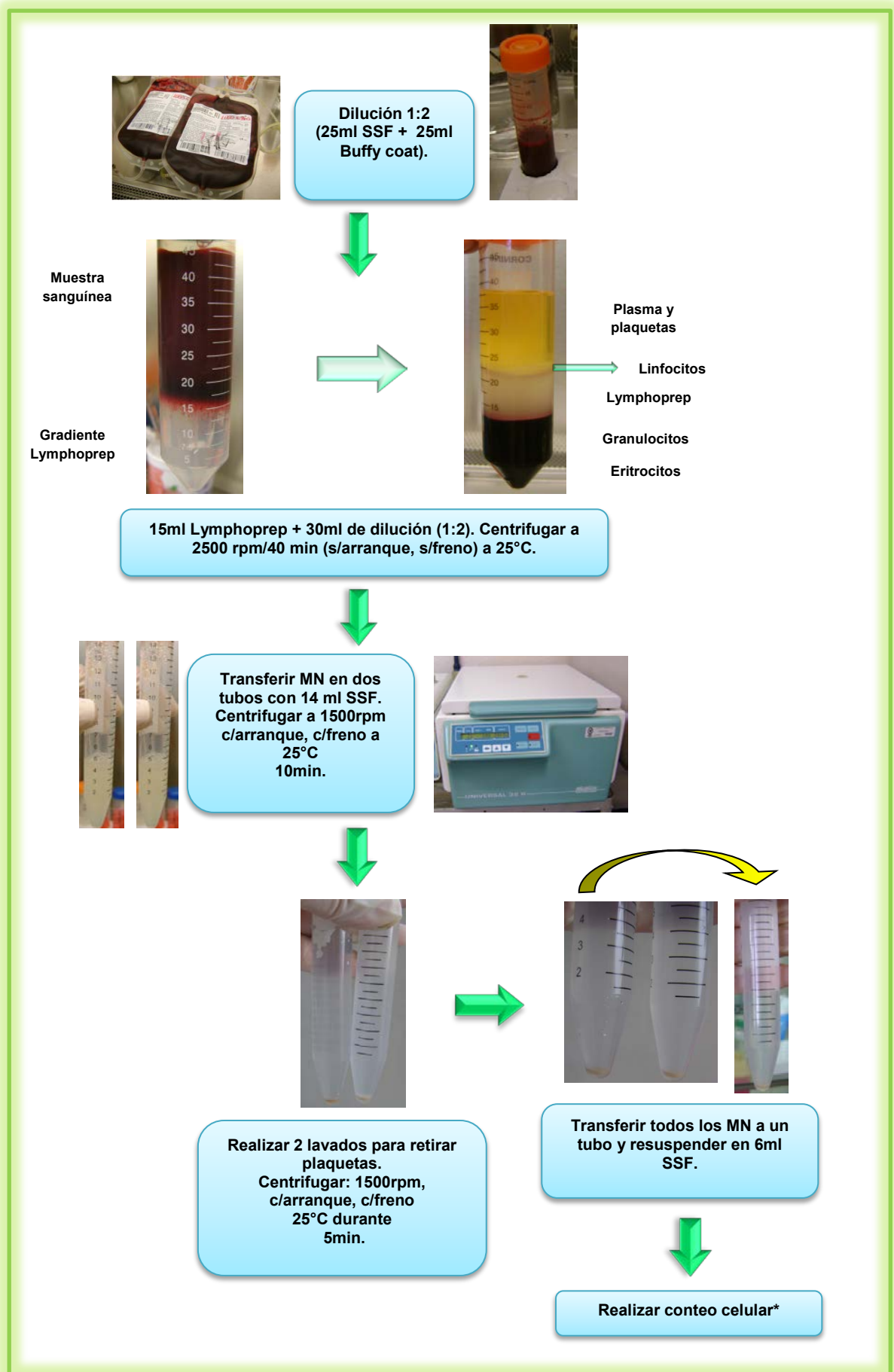


Figura 15. Obtención de células MN de sangre periférica humana.

Con una pipeta pasteur transferir la interface de c élulas mononucleares a dos tubos de 15ml y se lavaron tres veces con 14ml de SSF, se centrifugaron a 1500rpm/10 min a temperatura ambiente (eliminación de plaquetas), todos los MN obtenidos fueron transferidos a un solo tubo con 6ml de SSF.

Las c élulas mononucleares se contabilizaron en cámara de Neubauer (hematocitómetro) y la viabilidad se evaluó por el método de exclusión de azul de tripano (**Figura 16**). Por lo que se realizó una dilución 1:2 de la suspensión celular (20µl de azul de tripano 0.4% GIBCO® + 20µl de la suspensión celular de MN) y se transfirieron 10µl en la cámara de Neubauer. En el microscopio óptico NOVA con el objetivo de 40x se observaron las c élulas viables y se realizó el conteo de cuatro cuadrantes para obtener el número de c élulas totales aplicando la siguiente fórmula matemática.

$$\left( \frac{\text{Número de Células}}{\text{Número de cuadrantes}} \right) \left( \text{Factor de la cámara} \right) \left( \text{Factor de dilución} \right) \left( \text{Volumen en suspensión} \right) = \frac{\text{Núm. de céls}}{\text{ml}}$$

Ejemplo de cálculo:

$$(448)(10^4)(2)(6ml) = 53,760,000 \text{ MN/ml}$$

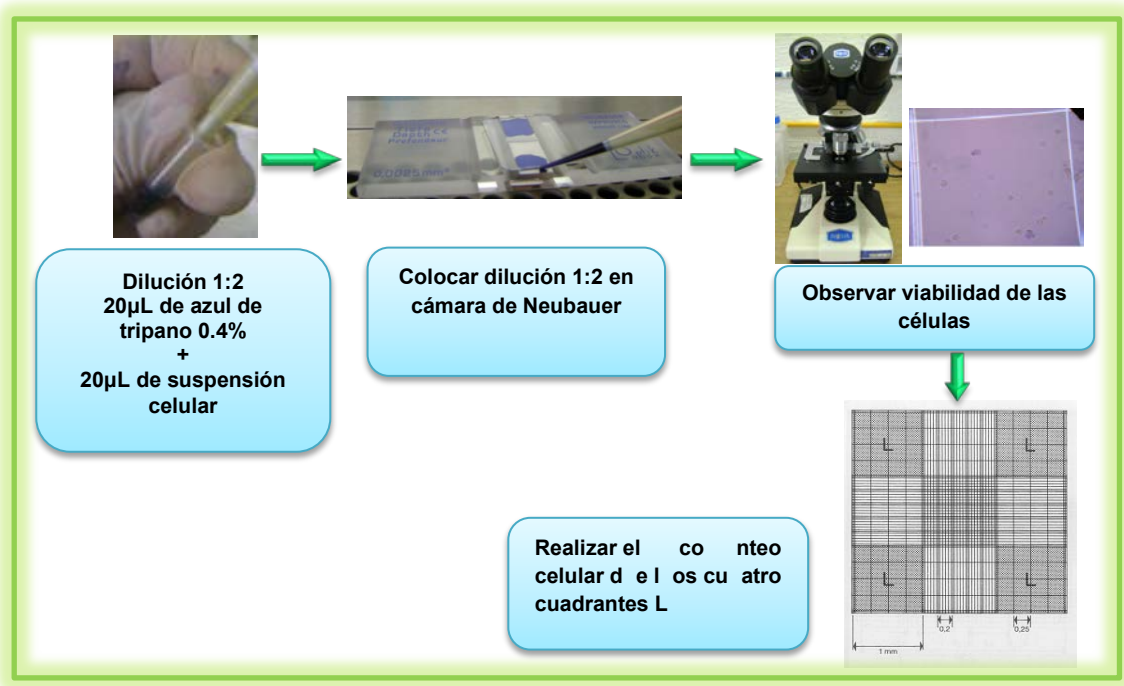


Figura 16. Conteo y determinación de la viabilidad celular por el método de exclusión (azul de tripano) en cámara de Neubauer (hematocitómetro).

### 8.5 Purificación de monocitos por adherencia a vidrio y cultivo *in vitro* para su diferenciación a macrófagos (MDM).

La suspensión de células obtenidas se ajustó a una concentración de  $16 \times 10^6$  células/ml en medio para monocitos (*anexo*), el cual consiste en medio RPMI-1640 GIBCO suplementado con 10% suero fetal bovino (GIBCO) y 25% de pool de suero humano.

Posteriormente, en una placa de cultivo de 24 pozos (CORNING cat. 3524) se colocaron cubreobjetos circulares de vidrio (CORNING) de 9mm de diámetro previamente tratados para cultivo de tejidos (*ver anexo*). Después se colocaron 60µl de la suspensión celular ajustada ( $16 \times 10^6$  células/ml) en el centro de cada cubreobjeto. Estas placas se incubaron durante 2 horas a 37°C con atmósfera CO<sub>2</sub> al 5% para su adhesión (Revco Habitat). Las células no adherentes se eliminaron con tres lavados de 500µl cada uno, con solución balanceada de Hank's pH 7.2 (*anexo*) (**Figura 17**).

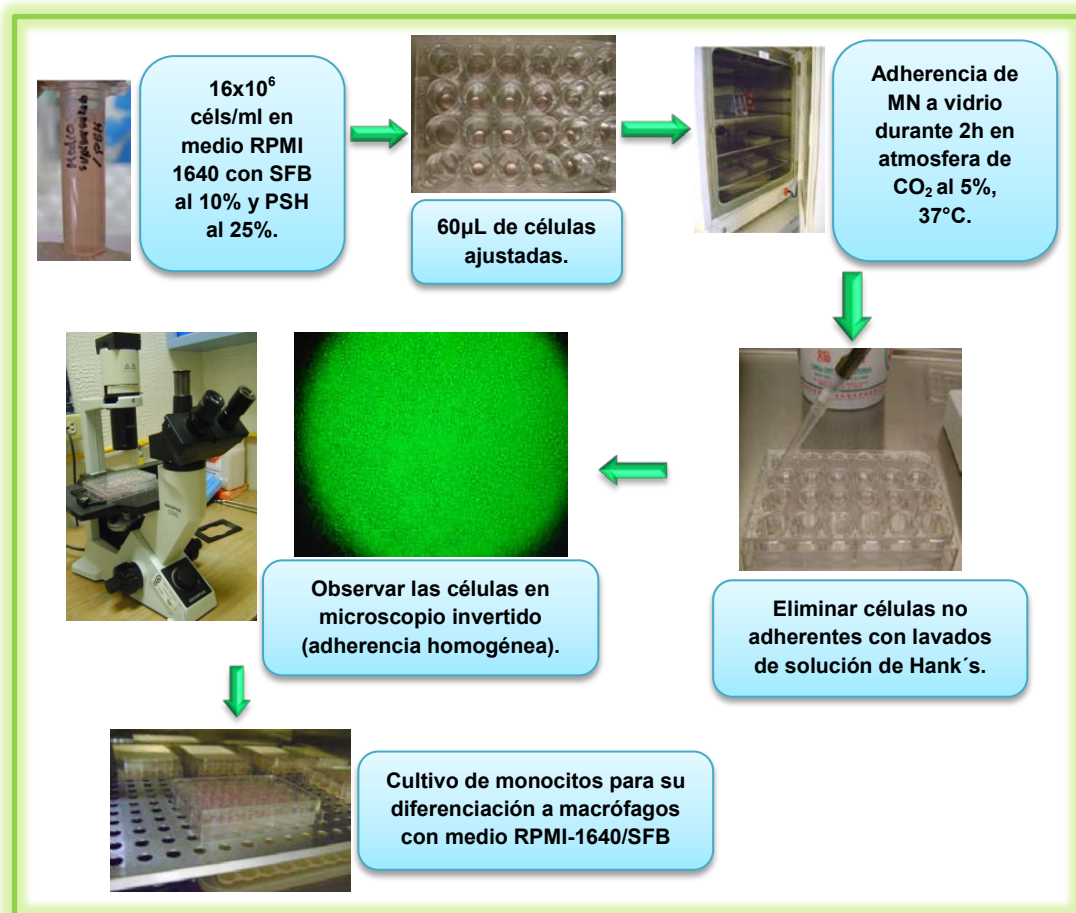
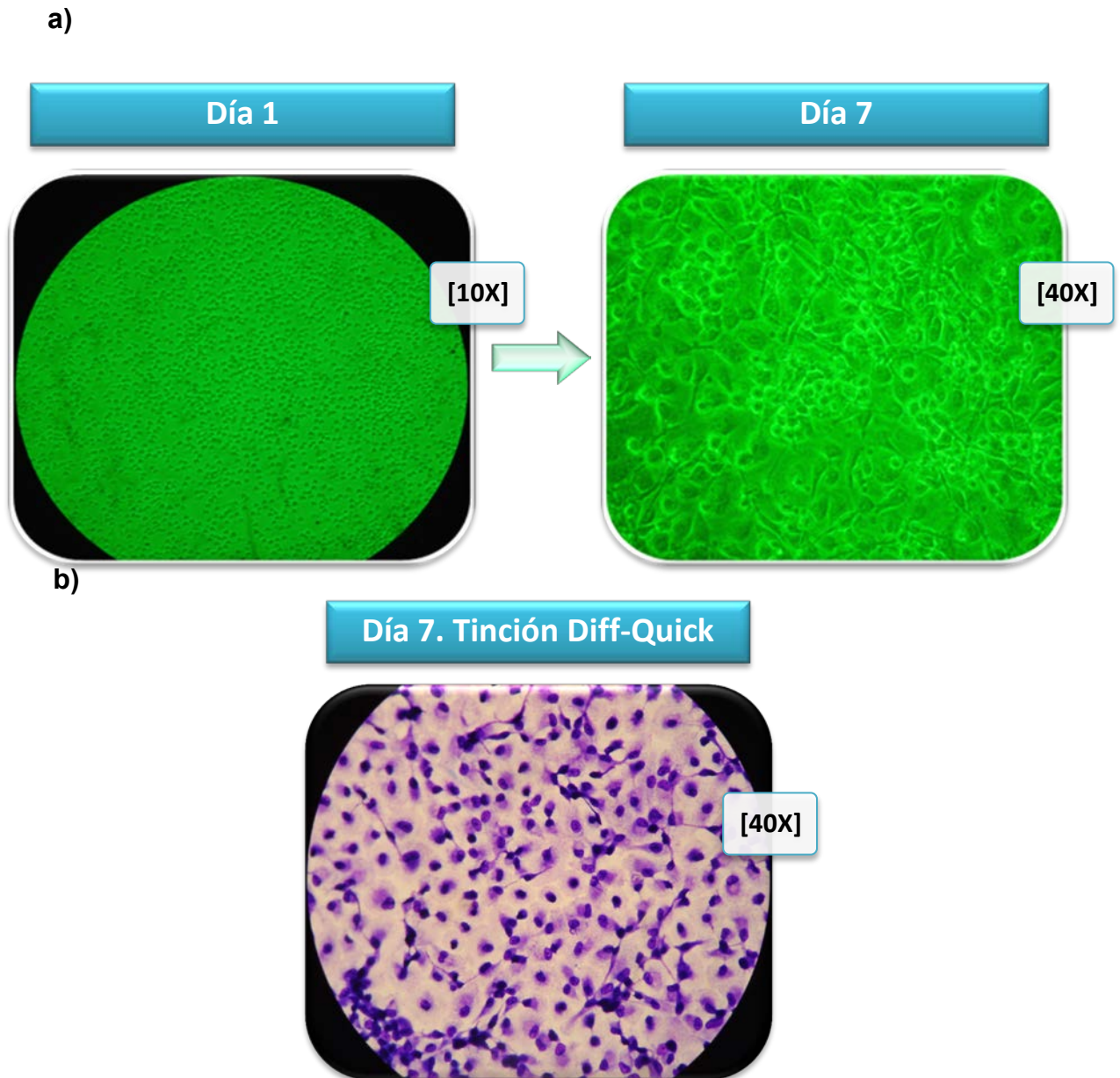


Figura 17. Purificación de monocitos por adherencia a discos de vidrio en placas de 24 pozos.

El Hank's del último lavado se sustituyó por 500 µl de medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB atemperado a 37°C. Los monocitos adheridos se mantuvieron en cultivo durante 7 días para su diferenciación a macrófagos a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Durante el proceso de cultivo se hicieron recambios de medio cada tercer día, antes de estimular a las células con las diferentes bacterias probióticas (**Figura 18**).



**Figura 18. Diferenciación celular de monocitos a macrófagos.** a) Las células *in vivo* presentan diferencias en morfología (mayor tamaño a los 7 días). b) En el día 7, por tinción de Diff-Quick se observa la forma fusiforme y espumosa del citoplasma de estas células.

### 8.6 Evaluación del estallido respiratorio de macrófagos derivados de monocito de sangre periférica humana (MDM).

El estallido respiratorio en los MDM estimulados y no estimulados se evaluó mediante quimioluminiscencia amplificada con luminol de acuerdo al protocolo reportado por Müller y colaboradores (Müller-Peddinghaus R. 1984; Rellstab P, et al. 1989).

Los MDM se arrestaron 24 h antes del ensayo de quimioluminiscencia por lo que se cambió el medio en el que se encuentran por RPMI 1640 suplementado con 2% de suero fetal bovino y se dejó en incubación a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

El día del ensayo se prepararon los estímulos con las bacterias probióticas de *Lactobacillus* inactivados por calor a diferentes relaciones *célula efectora vs bacteria* (1:10, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500 y 1:1000, ver anexo) por triplicado y como control positivo de estimulación se realizó la opsonización de Zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae* (SIGMA) con suero AB al 20% (ver anexo). Posteriormente se estimularon los MDM para evaluar el estallido respiratorio. Para ello se prepararon las celdas para luminómetro adicionando Hank's y luminol atemperados previamente a 37°C en las cantidades indicadas en la tabla 3.

Tabla 3. Estimulación de MDM con probióticos de <i>Lactobacillus</i> para evaluar el estallido respiratorio				
Controles				
	MDM*	Luminol	Hank's	Zymosán
Control negativo		100µl	900µl	--
Control positivo		100µl	800µl	100µl
Estímulos de bacterias probióticas				
	MDM*	Luminol	Hank's	1:10
LGG	cubreobjeto con MDM adheridos	100µl	800µl	100µl
<i>L. rhamnosus</i>		100µl	800µl	100µl
<i>L. helveticus</i>		100µl	800µl	100µl
<i>L. casei</i>		100µl	800µl	100µl
		Luminol	Hank's	1:50
LGG		100µl	800µl	100µl
<i>L. rhamnosus</i>		100µl	800µl	100µl
<i>L. helveticus</i>		100µl	800µl	100µl
<i>L. casei</i>	100µl	800µl	100µl	

En la tabla se muestran los estímulos de las cuatro bacterias probióticas en la relación macrófago vs *Lactobacillus* 1:10 y 1:50 (las relaciones restantes 1:100, 1:250, 1:500 y 1:1000 se prepararon de la misma manera)

\* En cada celda para luminómetro colocar 1 cubreobjeto con MDM adheridos.

Introducir cuidadosamente en el fondo del tubo de polipropileno con ayuda de unas pinzas de punta fina uno de los cubreobjetos circulares de vidrio con los MDM adheridos previamente, se colocó procurando que las células estén en contacto con la solución de Hank's y luminol para una lectura correcta de los picos de quimioluminiscencia. (Figura 19).

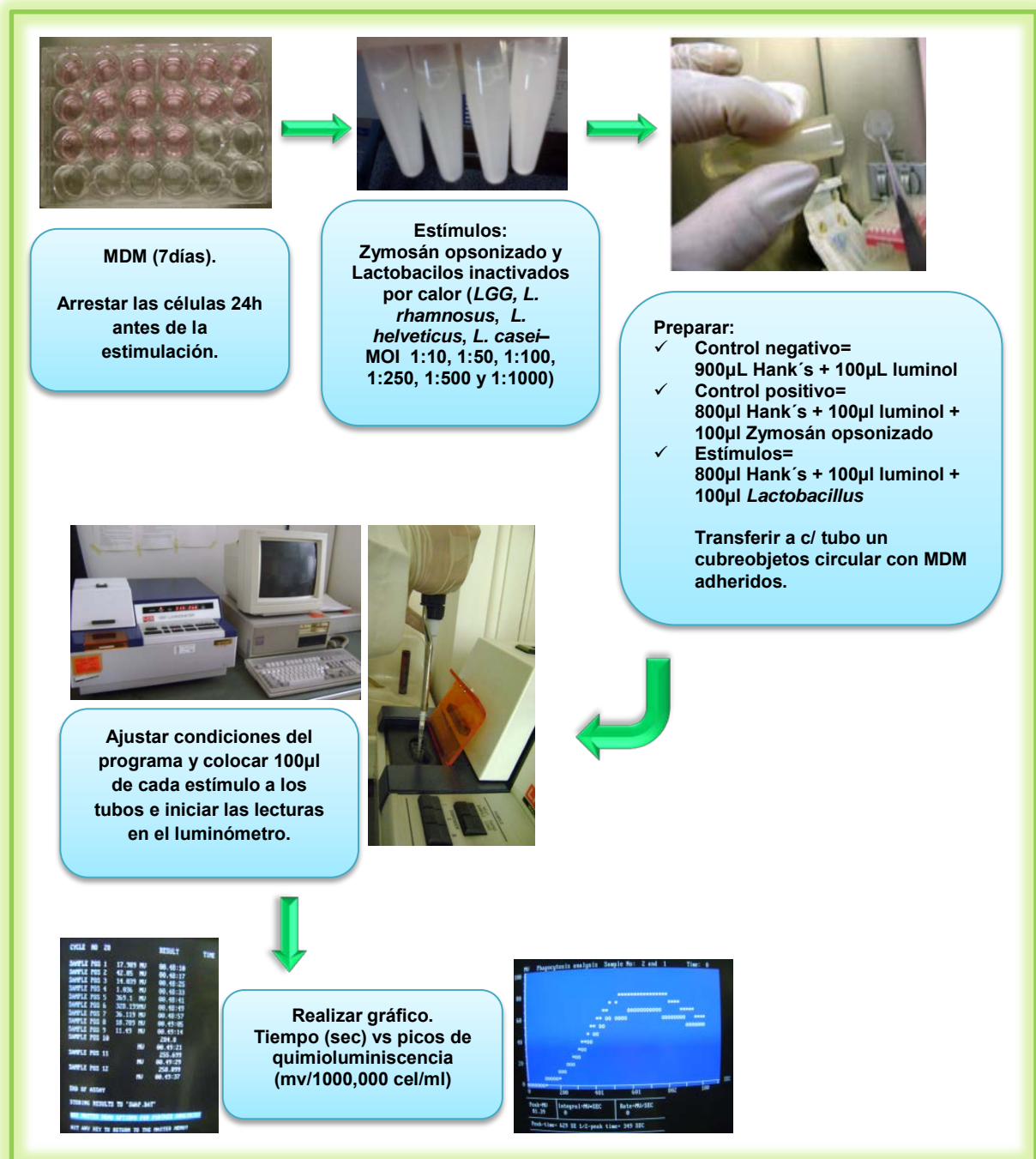


Figura 19. Evaluación del estallido respiratorio por método de quimioluminiscencia amplificada con luminol.

Se adicionaron 100µl de los estímulos al momento de realizar la lectura en el luminómetro (Luminómetro LKB-1251) el cual se programó a 37°C.

El procedimiento se realizó por triplicado para cada uno de los controles, así como para las cuatro cepas probióticas (1:10, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500 y 1:1000).

El equipo contiene un sistema de fotomultiplicador que convierte los fotones liberados en unidades de corriente eléctrica, de tal forma que la quimioluminiscencia es expresada en mili-Volts (mV) por número de células. Las evaluaciones se realizaron en muestras por triplicado, de acuerdo al programa (*PHAGOCYTOSIS*) en las condiciones programadas. **(Tabla 4).**

<b>Tabla 4. Programación del luminómetro (protocolo de quimioluminiscencia. (Parámetros del Menú).</b>	
<b>NO OF SAMPLES</b>	= 8
<b>NO OF CYCLES</b>	= 60
<b>DISPENSING</b>	= NO. 1
<b>UNIT OF X – AXIS</b>	= SEC
<b>TIME INTERVAL</b>	= 71 SEC
<b>UNIT OF Y – AXIS</b>	= MV

Cuando el equipo comienza a trabajar se muestra un menú que indica el número de ciclo, posición de la muestra y su respectivo valor en MV los cuales se fueron registrando.

Una vez que terminaron los 60 ciclos, en el menú se seleccionó la opción de análisis de resultados para observar los picos máximos de quimioluminiscencia.

Posteriormente con estos datos se realizó el gráfico de Tiempo (sec) en el eje X y en el eje Y los picos de quimioluminiscencia (mV/1000,000 cel/ml).

### **8.7 Producción de citocinas pro (IL-8, TNF- $\alpha$ ) y anti-inflamatorias (IL-10) en MDM estimulados con bacterias probióticas de *Lactobacillus*.**

Una vez que los monocitos se diferenciaron a macrófagos, antes de ser estimulados se arrestaron con 500 $\mu$ l de medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 2% en cada pozo de la placa. Se dejaron en incubación a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 24h.

Los MDM se estimularon con las bacterias lácticas (*LGG*, *rhamnosus*, *helveticus* y *casei*) en una relación 1:500 en tiempos de (6 y 24 horas de incubación). Cada pozo contiene las células, 500 $\mu$ l de medio RPMI 1640/SFB 2% y se adicionaron 100 $\mu$ l de bacteria probiótica.

Se preparó el control negativo (células MDM + medio RPMI 1640/SFB 2%); el control positivo de activación celular (células MDM + medio RPMI 1640/SFB 2% + 100 $\mu$ l de Zymosan). Los controles, así como la estimulación con las bacterias probióticas de *Lactobacillus* se prepararon por duplicado en un total de 4 experimentos.

Posteriormente los sobrenadantes de las condiciones señaladas anteriormente fueron recolectados (se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos para eliminar los restos bacterianos y celulares), después se hicieron alícuotas de 250  $\mu$ l y se almacenaron a -70°C hasta su corrimiento.

### **8.8 Evaluación de citocinas pro (IL-8, TNF- $\alpha$ ) y anti-inflamatorias (IL-10).**

La evaluación de citocinas pro y anti-inflamatorias se realizó mediante el ensayo de ELISA (“Enzyme-linked immunosorbent assay”). Para la determinación de cada citocina se empleó un kit comercial (B.D. OptEIA®, Pharmingen, San Diego, CA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante (*Human IL-10 ELISA Set*, *Human IL-8 ELISA Set*, *Human TNF*).



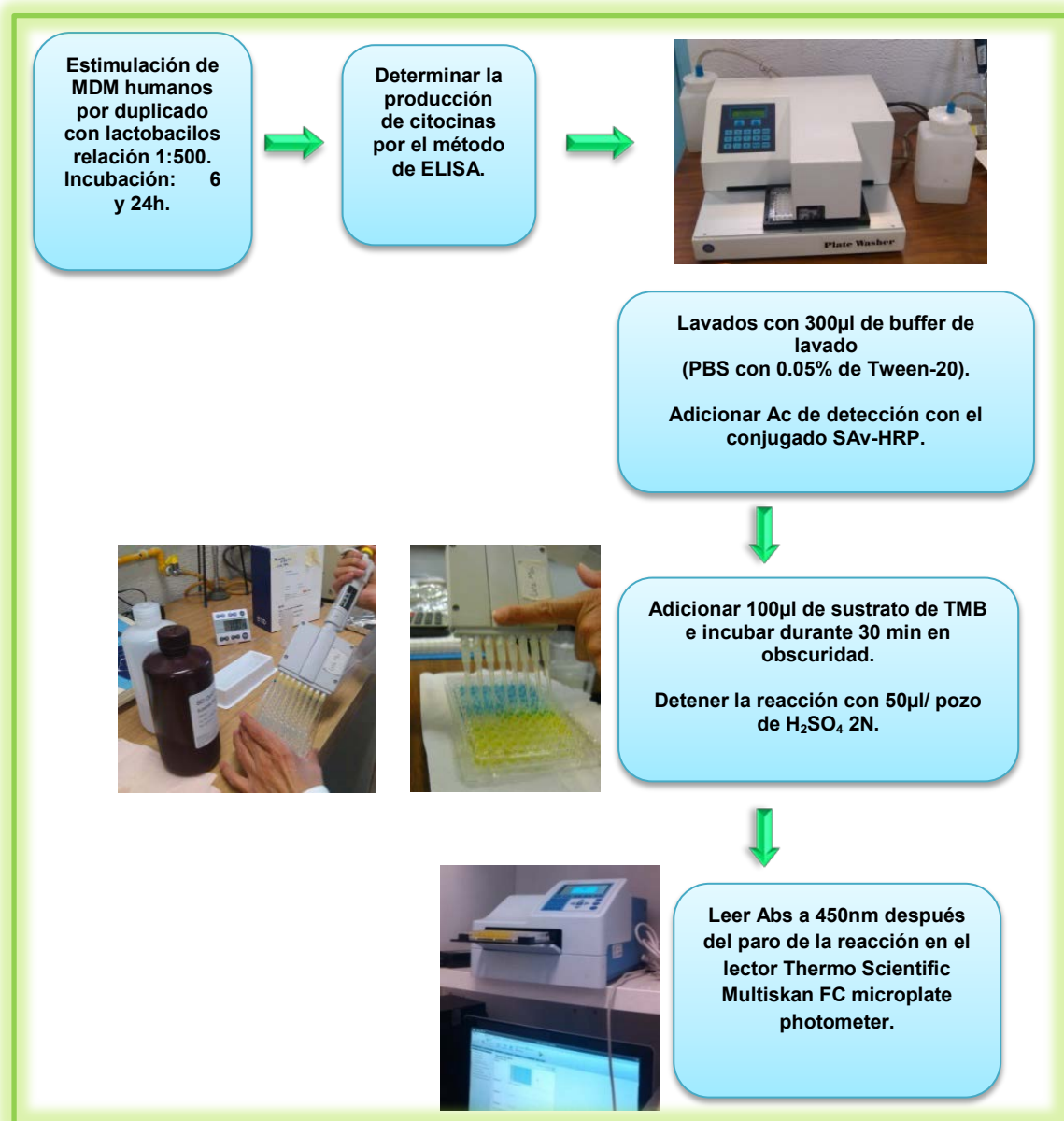
El proceso consistió en sensibilizar microplacas de ELISA de 96 pozos (poliestireno de alta adherencia COSTAR) adicionando a cada pozo 100 µl de anticuerpo de captura para cada citocina (anti-IL-8, TNF-α e IL-10) diluido 1:250 en solución amortiguadora (Buffer de carbonatos, *ver anexo*) pH 9.5. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente las placas se lavaron con 300µl de solución de lavado (PBS/Tween 20 al 0.05%) tres veces en el lavador de pozos programable de ELISA (Plate Washer, Das).

Posteriormente las placas se trataron con 200µl/pozo de solución de bloqueo (PBS/SFB 10%, pH 7.0) y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente, después se realizaron 3 lavados.

A cada uno de los pozos se les adicionó por duplicado 100µl de los sobrenadantes obtenidos después de la estimulación de los MDM y a la par se preparó una curva estándar de la proteína recombinante humana para cada citocina.

Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 2 horas y se lavaron 5 veces; se adicionaron 100µl del anticuerpo de detección diluido 1:250 (anticuerpo monoclonal Anti-TNF-α Humano biotinilado, anti-IL-8 y anti-IL-10) con el conjugado SA<sub>v</sub>-HRP (streptoavidina-peroxidasa de rábano - diluido 1:250) y las placas se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 7 lavados con 30 s de espera entre lavado y lavado. Después se adicionaron a los pozos 100µl de sustrato revelador TMB (Substrate Reagent Set BD/ Pharmingen, San Diego, CA, USA) y se incubaron protegidos de la luz por 30 minutos a temperatura ambiente. Al término de la incubación, la reacción se detuvo adicionando 50µl de solución de paro (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0N).

La absorbancia se leyó a 450nm dentro de los 30 minutos posteriores al paro de la reacción en el lector de ELISA (Thermo Scientific Multiskan FC microplate photometer, Multiskan FC3.0). La concentración de citocinas se determinó a partir de la interpolación de las lecturas con la curva patrón. (**Figura 20**).



**Figura 20. Determinación de citocinas por método de ELISA (Kit del sistema Pharmingen OptEIA®).** El desarrollo de color se analizó en un lector de ELISA (Thermo Sicienic, Multiskan PC) a una longitud de onda de 450nm. El análisis de las muestras de los sobrenadantes obtenidos fue por duplicado y la concentración de citocinas se expresó en pg/ml siendo los niveles de detección de estos kits para citocinas de (3.1 pg/ml IL-8; 7.8 pg/ml para TNF- $\alpha$  e IL-10).

### 8.9 Análisis de NF-κB (p65) por Inmunofluorescencia indirecta.

La localización y translocación de la proteína p65 a NF-κB se evaluó en MDM adheridos a cubreobjetos circulares de 9 mm de diámetro a través de un kit para la activación de NF-κB (Cellomics NF-κB Thermo Scientific). La utilización de este kit nos permite medir la translocación espacial de NF-κB del citoplasma al núcleo de las células. Este kit utiliza un anticuerpo primario anti-conejo contra la proteína de NF-κB y anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo de Alexa-488.

Los macrófagos adheridos a los discos circulares de 9 mm de diámetro fueron colocados en las placas de 24 pozos como se mencionó anteriormente en medio RPMI-1640/10% SFB. Al mismo tiempo, se estimularon las células con las diferentes bacterias probióticas de *Lactobacillus* y se preparó otra serie de MDM en disco con estímulos conocidos, por ejemplo LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 (SIGMA Chemical Co. St Louis, MO USA) a una concentración de 100 ng/ml. Las células se incubaron por 30 minutos a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

Posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en un mortiguador de Dulbecco PBS modificado (Cellomics NF-κB Thermo Scientific). Esta solución de fijación fue previamente precalentada y adicionada a las células por 10 minutos (este paso es crítico para mantener la integridad de las células).

Después las células fueron lavadas con 400µl de solución Dulbecco Modificada/PBS y permeabilizadas con Dulbecco/PBS/0.1% de Triton X-100, Cellomics) por 10 minutos. La solución de permeabilización se retiró y las células se lavaron dos veces con Dulbecco modificado/PBS y se incubaron por una hora a temperatura ambiente con anticuerpo primario (policlonal de conejo p65 de NF-κB) en Dulbecco/PBS.

Las células se lavaron nuevamente y se adicionó solución de tinción y anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo, preparado en cabra conjugado a Alexa-488) más el colorante de contraste nuclear Hoechst (Cellomics NF- $\kappa$ B Thermo Scientific) y se incubaron durante 1 hora protegidos de la luz.

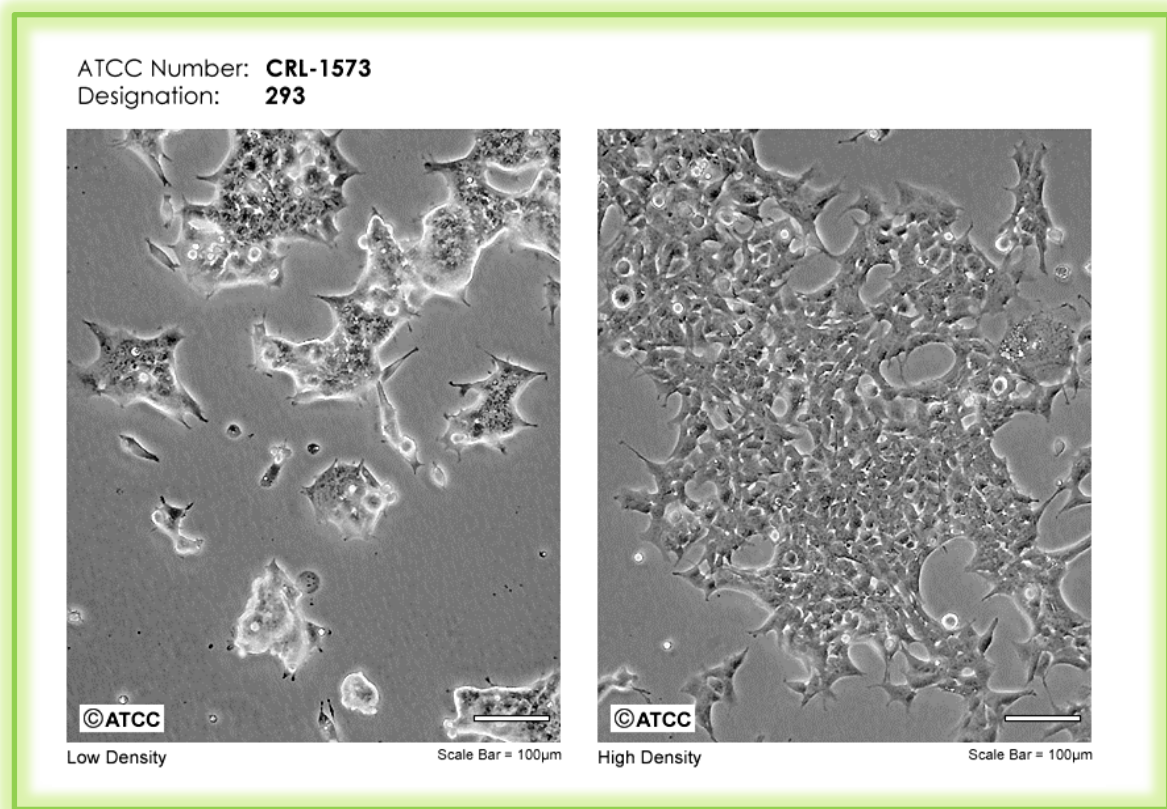
Posteriormente se lavaron dos veces con Dulbecco/PBS y las células se colocaron en líquido de montaje para conservación de la fluorescencia (Vecta Shield) y se sellaron con barniz (toda la circunferencia de los discos).

La lectura se llevó a cabo en microscopio (Axio Imager M.2, Carl Zeiss). La adquisición de imágenes se obtuvo de acuerdo al programa pre-establecido Axio Vision Rel 4.8. Así mismo se cuantificó el porcentaje de células positivas a p65 NF- $\kappa$ B por conteo en campo de 200 células a través de dos observadores, para cada una de las variables de estímulos utilizados en este estudio.

#### **8.10 Participación del receptor de TLR2 a la estimulación de bacterias probióticas por modelo de transfección estable a la molécula de TLR2 en línea celular HEK-293-hTLR2.**

Las células HEK 293 (*human embryonic kidney*) son una línea celular derivadas de preparaciones de riñón embrionario humano. Son adherentes y tienen morfología epitelial (**Figura 21**). Estas células son capaces de generar tumores en ratones nude.

En este estudio se utilizó la línea celular HEK-293-hTLR2, la cual es tá transfectada con la molécula de TLR2; la línea celular de control para estas células es HEK-null (no transfectada) (Invivogen, San Diego, CA) se cultivaron en DMEM (high-glucose 4.5 g/l, Gibco)/10% SFB con Blastidicin S 0.01mg/ml (antibiótico de selección a la expresión de TLR2).



**Figura 21. Línea celular HEK-293 (*human embryonic Kidney*)**

Las células de cultivos confluentes al 75%, se desprendieron suavemente con solución de PBS tibio y fueron centrifugadas a 1500rpm por 5 minutos. Después las células fueron lavadas dos veces bajo las mismas condiciones; el paquete celular fue ajustado a  $1.5 \times 10^4$  células/ml. Posteriormente se depositó 1 ml de la suspensión en cada pozo de placas de 24 pozos, las cuales se dejaron toda la noche a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Al día siguiente, se realizó cambio de medio tibio (DMEM, High-glucose 4.5g/l, Gibco/10%SFB/Blasticidin S 0.01 mg/ml) y las células fueron estimuladas con las bacterias probióticas de lactobacilos por 18 horas. Los sobrenadantes de las células se recolectaron y se centrifugaron a 5000 rpm/5 minutos y se almacenaron en alícuotas de 250 µl hasta su uso.

La participación de TLR2 se analizó por el método de transfección por células, evaluando la secreción de interleucina-8 (IL-8) por el método de ELISA de acuerdo a las indicaciones del fabricante de la casa comercial de estas líneas células (Invivogen, San Diego CA).

En los controles de la activación del TLR2 se emplearon algunos agonistas como LTA (Invivogen); Zymosán A de *Saccharomyces cerevisiae* (SIGMA) a 10µg/ml). Así mismo, se prepararon testigos negativos células no tratadas con los estímulos y los ensayos se realizaron a la par con las células de HEK (null; no transfectadas con TLR2). Los ensayos se realizaron por duplicado en un total de 4 experimentos.

### **8.11 Análisis Estadístico.**

Para establecer las diferencias de las células tratadas con diferentes estímulos y las no estimuladas se aplicó la prueba no paramétrica de Wilcoxon, en los ensayos de producción de citocinas y estallido respiratorio. Las diferencias se consideran significativas a una  $p < 0.05$ .

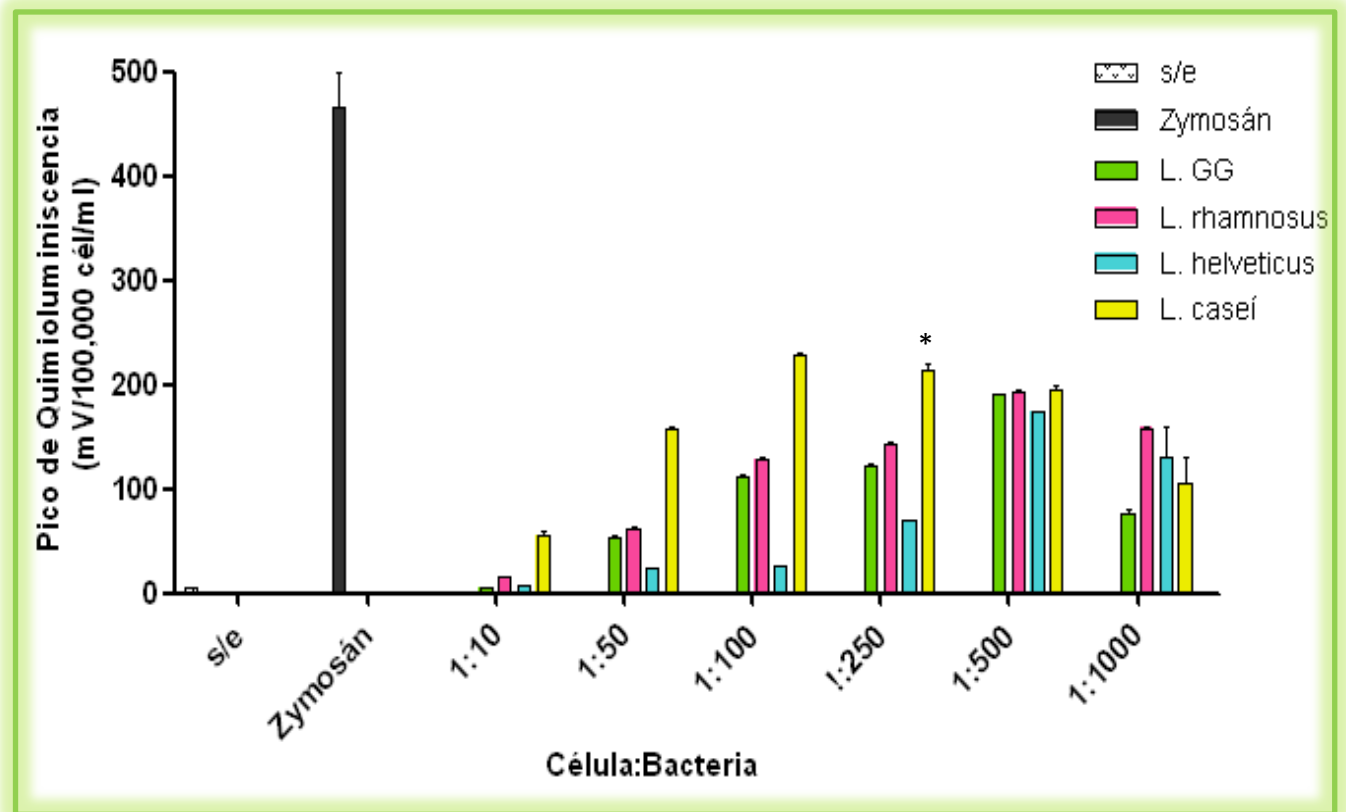
## 9. RESULTADOS

### 9.1 **Actividad oxidativa de los MDM (Quimioluminiscencia) en respuesta a bacterias probióticas de *Lactobacillus*.**

La producción de ROS por los macrófagos fue evaluada *in vitro* usando la quimioluminiscencia amplificada con luminol (LCL). La LCL observada durante el estallido respiratorio es principalmente producida por el anión superóxido y peróxido de hidrógeno. La capacidad de los *Lactobacillus* para inducir ROS se observa en la **Figura 22**.

Los MDM produjeron una señal por arriba de los niveles de las células sin estímulo (4.875 mV). Así mismo, esta respuesta oxidativa; fue dependiente de la concentración de bacilos adicionados a los MDM. La máxima actividad oxidativa fue observada cuando la relación de célula: lactobacilo fue 1:500 para *LGG*, *rhamnosus*, *helveticus* y *caseí* (190.1±15, 196.24±10, 175.86±12, y 200.12±14 vs 4.875mV) respectivamente (**Figura 22**).

La señal oxidativa inducida por la estimulación de las bacterias lácticas fue dos veces menor a la respuesta observada al ligando de TLR2 (467.5±40 vs 190.1±15, 196.24±10, 175.86±12, y 200.12±14 respectivamente). Así también se observaron diferencias de los picos de quimioluminiscencia en tre las diferentes especies de lactobacilos (**Figura 22**). La producción de ROS fue mayor para *L. caseí* (200.12±14 Mv) comparado con *LGG*, *rhamnosus* y *L. helveticus*. Sin embargo, es importante señalar que la actividad oxidativa fue dependiente de la concentración y especie de lactobacilo (**Figura 22**).



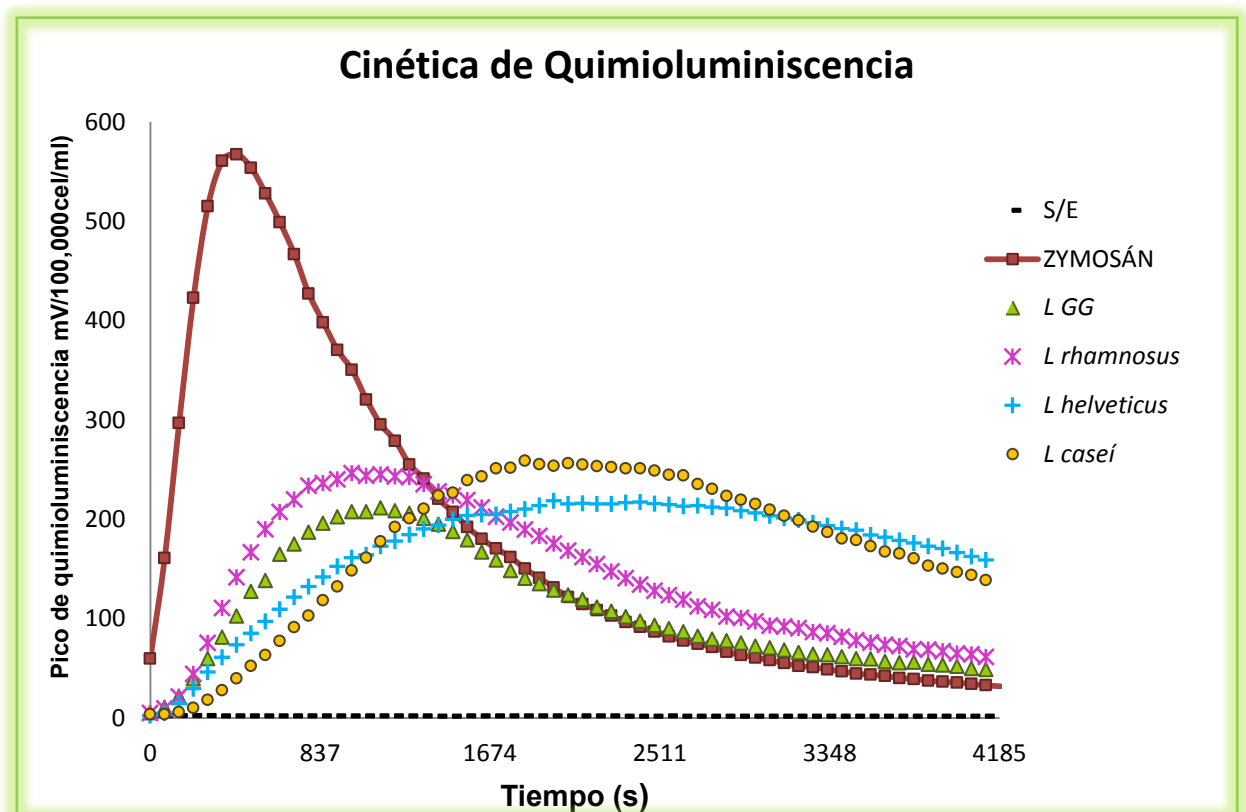
**Figura 2 2. Producción del estallido respiratorio (quimioluminiscencia) por MDM estimulados con probióticos de *Lactobacillus*.** MDM en Hank's-luminol fueron puestas en contacto directo con bacterias de cepas probióticas muertas por calor e inmediatamente colocadas para su corrida en un luminómetro LKB-1251. Los valores están representados por cuatro experimentos realizados en muestras por duplicado.

\*[( $p < 0.05$ ) Células MDM tratadas con *Lactobacillus* vs células sin tratamiento].



Así mismo, al determinar la cinética de activación de los ROS, a la estimulación con este PAM Ps ( Zymosán) se alcanzaron picos máximos en poco tiempo (cinética rápida) con valores de  $567.5 \pm 35$  mV. Las células estimuladas por Zymosán comienzan su síntesis desde los primeros segundos de adicionado el estímulo y alcanzan picos máximos a los 6.9 minutos de adicionado el estímulo es decir la extensión de la respuesta oxidativa es rápida y corta (**Figura 23**).

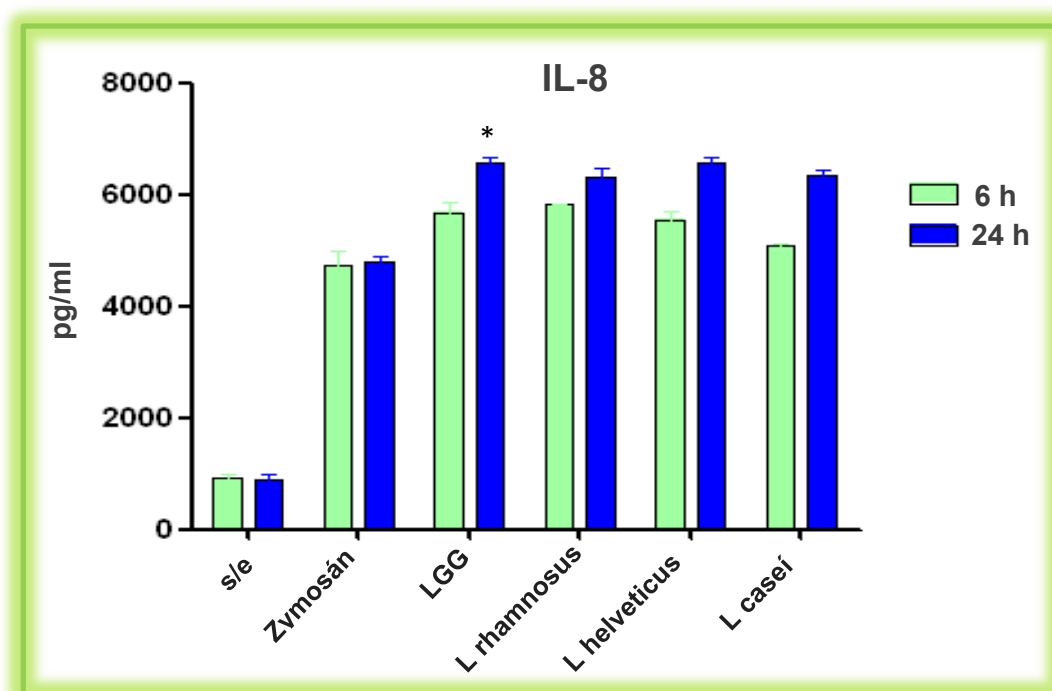
Por el contrario, la cinética de la respuesta oxidativa en los MDM estimulados con bacterias probióticas apareció en forma tardía (aproximadamente a los 30 minutos) 3 veces más a lo observado con Zymosán, la extensión de la respuesta es lenta y tarda en retornar al estado basal. De acuerdo, a los datos anteriores, los probióticos de *Lactobacillus* activan el estallido respiratorio en MDM de voluntarios sanos siendo *L. caseí*, la especie que induce mayor producción con respecto a las otras cepas de probióticos analizadas (**Figura 23**).



**Figura 23. Análisis de la cinética oxidativa de MDM inducida por probióticos de bacterias lácticas.** El tiempo máximo de producción de los ROS se monitoreo en intervalos de tiempo pre-establecidos de acuerdo a lo descrito en material y métodos. Los MDM ( $1 \times 10^5$ ) células/ml fueron colocadas en celdas de polipropileno en solución de Hanks-luminol en la relación de 500:1 (Bacterias: células) e inmediatamente introducidos en el luminómetro LKB-1251.

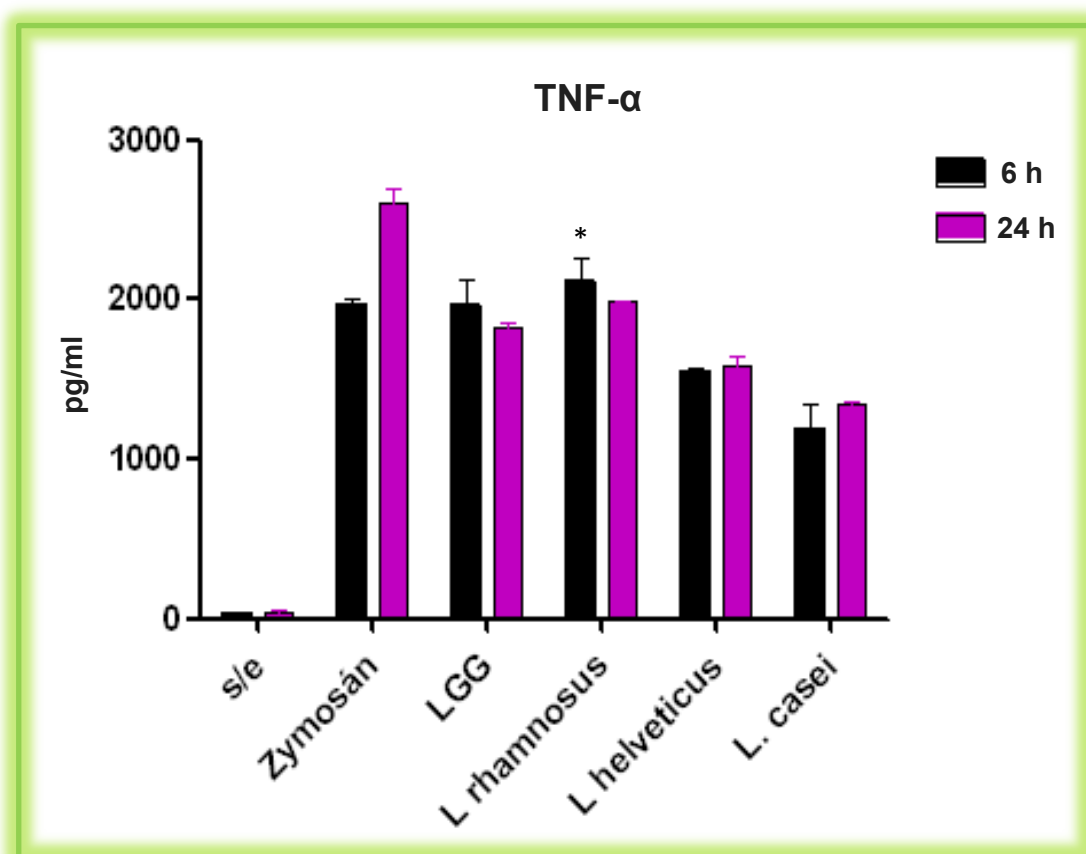
## 9.2 Producción de IL-8, TNF- $\alpha$ e IL-10 inducida por probióticos de bacterias lácticas en MDM.

Como parte del análisis de la respuesta inmunitaria innata a los probióticos se investigó su efecto sobre la síntesis de citocinas tanto pro-inflamatorias (la IL-8, TNF- $\alpha$ ) y anti-inflamatoria (IL-10) evaluadas a diferentes tiempos (6 y 24h). La capacidad de estimulación de bacterias lácticas a la síntesis de IL-8, fue significativa comparada con las células sin estímulo ( $5860.25 \pm 100$ ,  $5851 \pm 100$ ,  $5709 \pm 100$ ,  $5,114.75 \pm 100$  vs  $880 \pm 85$  pg/ml). Su producción fue observada de forma temprana desde las 6 horas de estimulación. Después de las 24 horas la producción de IL-8 aumento al rededor de 1000 pg/ml más ( $6690 \pm 50$ ;  $6,471.75 \pm 45$ ;  $6,669 \pm 38$ ;  $6,258.25 \pm 40$ ) respectivamente para LGG, *L. rhamnosus*, *L. helveticus* y *L. casei* (Figura 24). La capacidad de producción de IL-8 fue similar entre las bacterias analizadas. Como se puede observar en la (Figura 24). Todas las bacterias lácticas presentaron actividad inmunoestimuladora en los MDM a la síntesis de esta citocina.



**Figura 24. Producción de IL-8 en MDM estimulados con bacterias lácticas y otros estímulos (Zy mosán).** Los MDM fueron estimulados con células bacterianas en una relación de 500:1 (bacterias/ células) y los sobrenadantes de las células fueron recolectados a las 6 y 24 horas. La medición de las citocinas se realizó por método de ELISA. En este caso para la cuantificación de la producción de esta citocina fue necesario realizar una dilución 1:10 de los sobrenadantes de cultivo debido a que la concentración de la misma estuvo por arriba del límite máximo de detección. Las concentraciones son el resultado de muestras por duplicado  $\pm$  SEM. En un total de 4 experimentos realizados \* ( $p < 0.05$ ). (Células MDM estimuladas con cepas probióticas vs células sin estímulo).

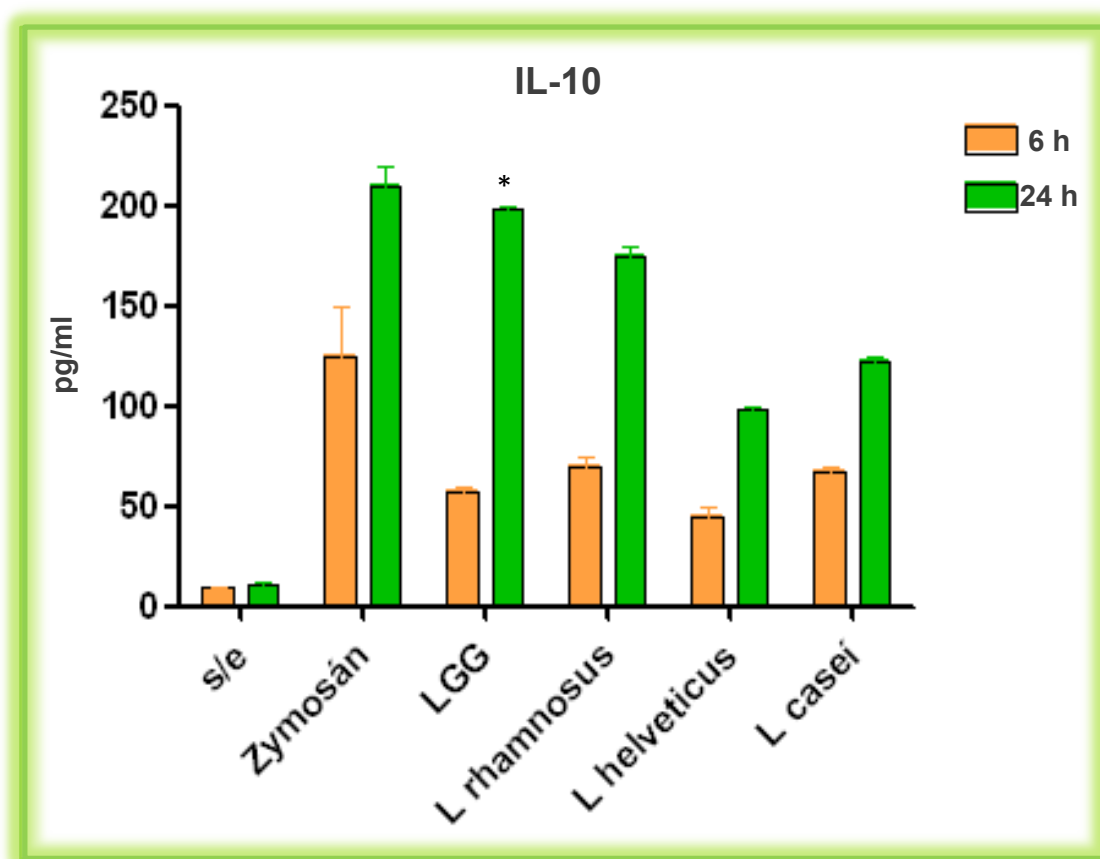
Otra de las citocinas pro-inflamatoria evaluada en la presente tesis fue TNF- $\alpha$ . La producción de esta citocina se observó desde las 6 horas de estimulación y alcanzó valores de  $2131.1 \pm 100$ ,  $2256.3 \pm 100$ ,  $1575.4 \text{ pg/ml}$  y  $1339.5 \pm 100 \text{ pg/ml}$  respectivamente (*LGG*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus* y *L. casei*) (**Figura 25**). Así mismo, la producción de TNF- $\alpha$  entre los diferentes tiempos ensayados (6 y 24 horas) no fue significativa aunque en apariencia *L. casei* produjo menor concentración de TNF- $\alpha$  (**Figura 25**). La síntesis de TNF- $\alpha$  en respuesta a ligando de TLR2, tal es el caso de Zymosán fue mayor en comparación a bacterias lácticas, su producción alcanzó valores de concentración más altos a las 24 horas ( $2600 \text{ pg/ml}$ ). Al igual que la producción de IL-8, las bacterias probióticas tienen capacidad estimulante a la síntesis de TNF- $\alpha$  de forma temprana.



**Figura 25. Síntesis de TNF- $\alpha$  en MDM estimulados con probióticos de bacterias lácticas.** Los MDM fueron estimulados con diferentes especies de bacterias lácticas en relación 1: 500 (células/bacterias). Los resultados representan el promedio y la desviación estándar en muestras por duplicado de cuatro experimentos

\* ( $p < 0.05$  células de MDM vs MDM sin estímulo).

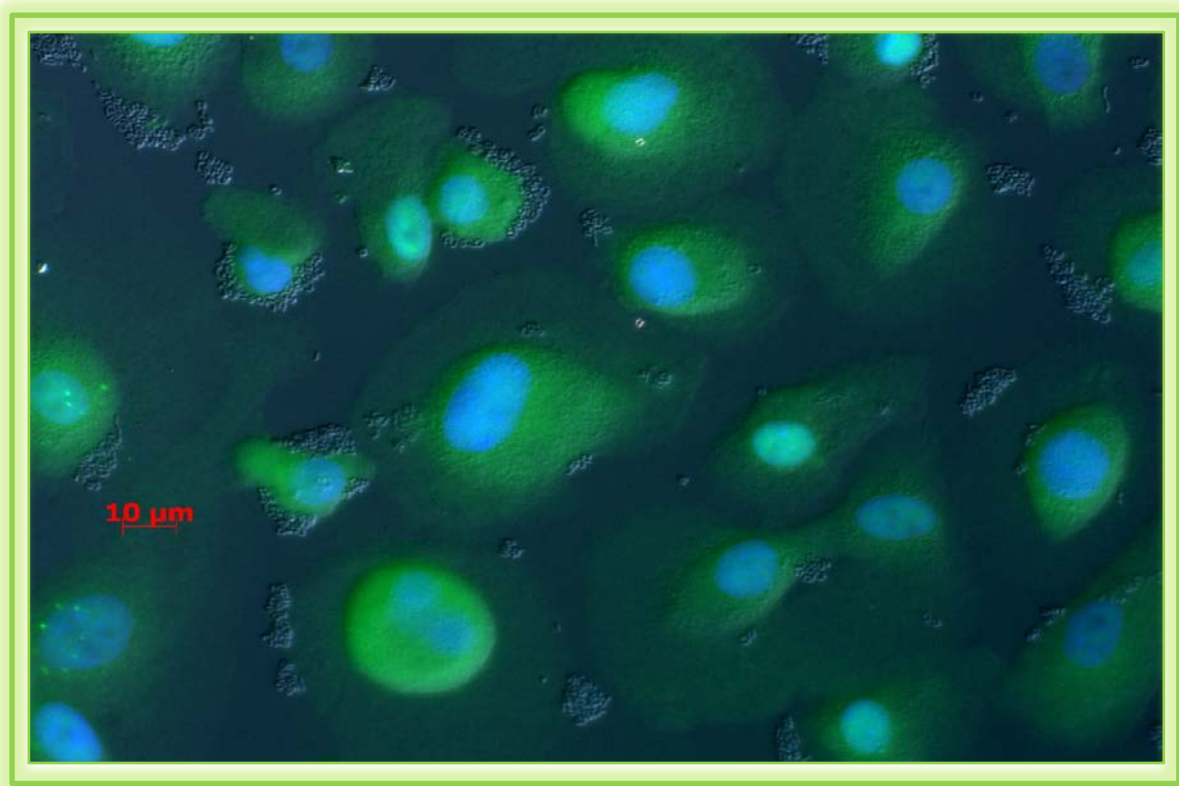
Por otro parte, también se analizaron las propiedades inmunoregulatoras de estas bacterias lácticas a través de la inducción de IL-10. Al contrario de la producción de citocinas IL-8 y TNF- $\alpha$ , la síntesis de IL-10 fue mucho menor y se presentó de manera tardía, es decir a las 24 horas de su estimulación con las bacterias lácticas comparada a las células sin estímulo ( $200\pm 40$ ,  $180\pm 40$ ,  $100\pm 12$ ,  $120\pm 10$  pg/ml) para LGG, *L. rhamnosus*, *L. helveticus* y *L. casei* respectivamente. La síntesis de IL-10 en MDM estimulados con LGG y *L. rhamnosus* fue similar comparado con zymosán ( $200\pm 40$ ,  $180\pm 40$  vs  $210$  pg/ml) (Figura 26). Estos resultados nos muestran que las bacterias lácticas inducen IL-10 tardíamente y sugieren un perfil de citocinas TH1 en forma temprana.



**Figura 26. Síntesis de IL-10 en MDM estimulados con probióticos de bacterias lácticas.** Las células de MDM fueron estimuladas con *Lactobacillus* de cepas probióticas en una relación de 1:500, después de 6 y 24 horas, los sobrenadantes se recolectaron y se cuantificó la concentración de IL-10. Un ligando de TLR2 (Zymosán,  $10\mu\text{g/ml}$ ) fue usado como control positivo de estimulación de los MDM. Los resultados representados en el gráfico son promedio de muestras por duplicado de un total de 4 experimentos realizados. \* ( $p < 0.05$ ) entre células estimuladas y sin estímulo.

### 9.3 Interacción *in vitro* de probióticos de *Lactobacillus* en MDM.

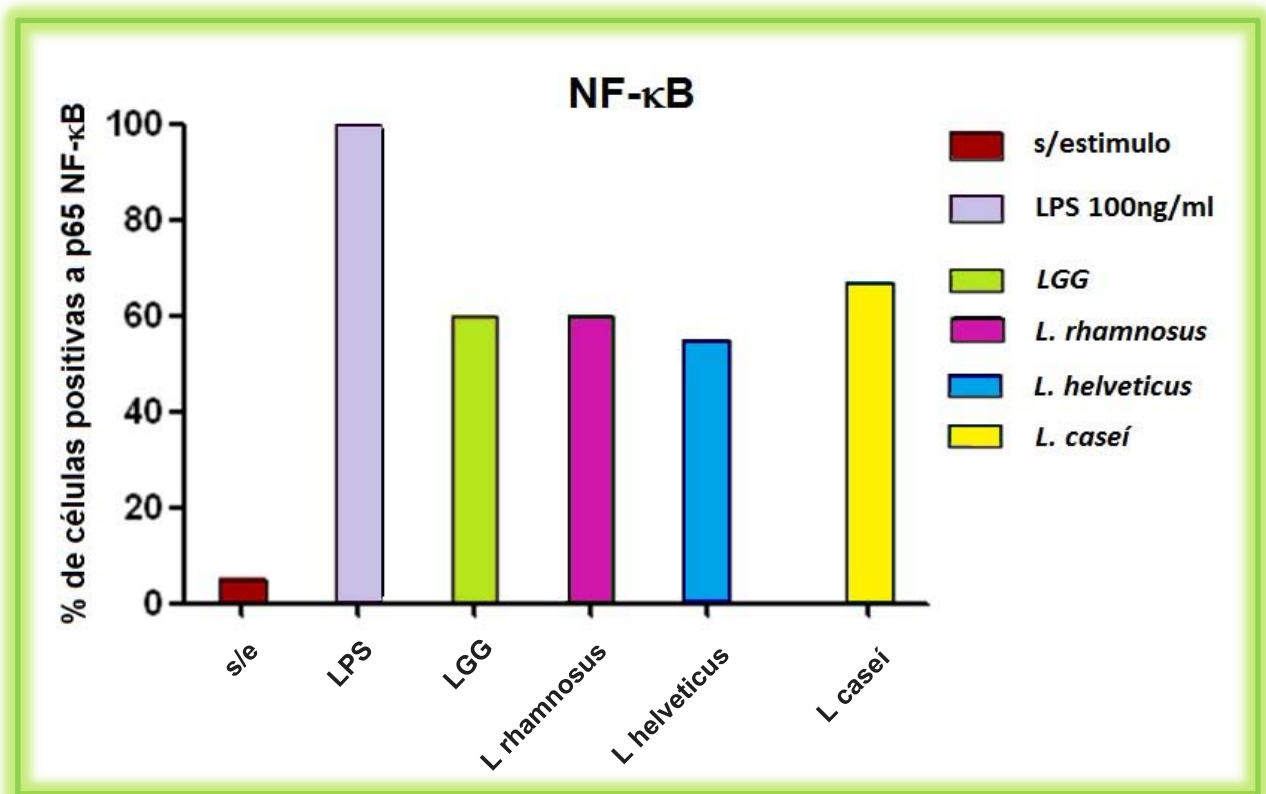
El efecto de las cepas probióticas, se analizó a través de Microscopía confocal, en tiempos cortos de interacción de 1 hora. Es importante señalar que en estos tiempos de interacción tan cortos no se observó fagocitosis de los lactobacilos por las macrófagos (**Figura 27**). En su mayoría los lactobacilos solamente mantienen contacto con las células.



**Figura 27.** Interacción *in vitro* de macrófagos y probióticos de *L. casei*. La imagen es representativa a las otras cepas de lactobacilos analizados.

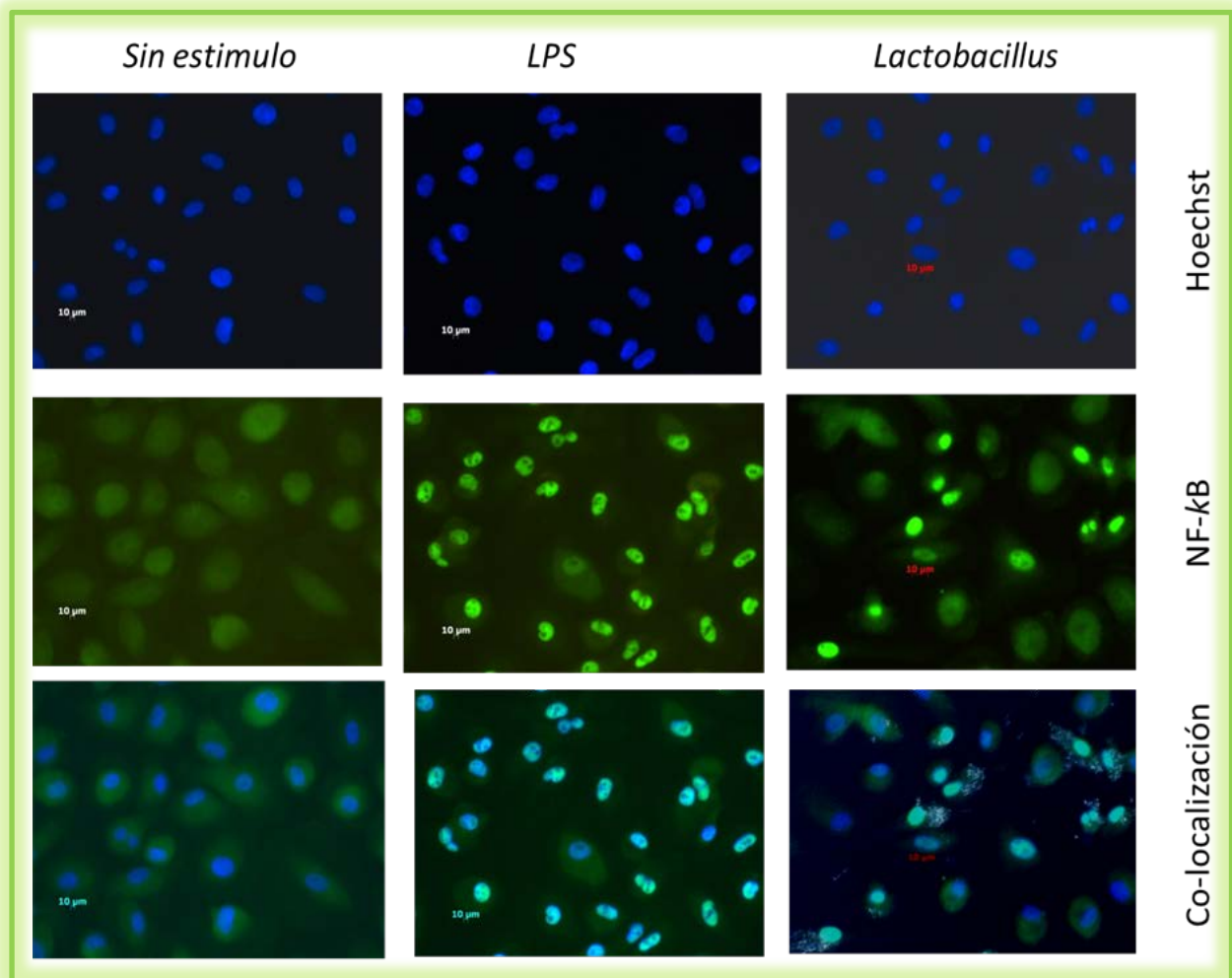
#### 9.4 Activación y translocación del factor nuclear NF- $\kappa$ B en MDM estimulados con probióticos de *Lactobacillus*.

En la respuesta inmune innata las diferentes vías de señalización involucran de manera importante al factor nuclear NF- $\kappa$ B. En este estudio se evaluó su papel al estimular a los macrófagos (MDM) con probióticos de bacterias lácticas, se analizó su capacidad de inducir la translocación de p65 NF- $\kappa$ B dentro del compartimento nuclear de los MDM, determinado por un ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Su translocación fue observada en todas las bacterias probióticas analizadas a los 30 minutos. Los porcentajes de células positivas a la proteína p65 NF- $\kappa$ B fueron alrededor del 5% en células no estimuladas, 67% para LGG, 60% *L. rhamnosus*, 60% *L. helveticus* y 55% *L. casei*. A la par de este análisis, se evaluó un control positivo (de LPS de *E. coli* 0111:B4) el cual indujo 100% de translocación a la proteína p65 (Figura 28).



**Figura 28. Activación del factor NF- $\kappa$ B por probióticos de *Lactobacillus*.** Los MDM fueron colocados en cubreobjetos a  $1 \times 10^4$  células/ml sobre placas de 24 pozos. Posteriormente fueron estimulados con diferentes especies de lactobacilos, y LPS de *E. coli* 0111:B4 (control positivo). La determinación de la actividad de NF- $\kappa$ B se realizó por un ensayo de inmunofluorescencia indirecta y se llevó a cabo un conteo de 200 células por campo. Los resultados son el promedio de 4 campos analizados.

Para confirmar la translocación de NF- $\kappa$ B en los MDM estimulados se llevó a cabo un análisis por microscopia confocal (**Figura 29**). Se observó la co-localización de NF- $\kappa$ B de los MDM estimulados con las bacterias probióticas (traslape del azul-verde). Estos resultados demuestran que los lactobacilos activan la vía NF- $\kappa$ B.

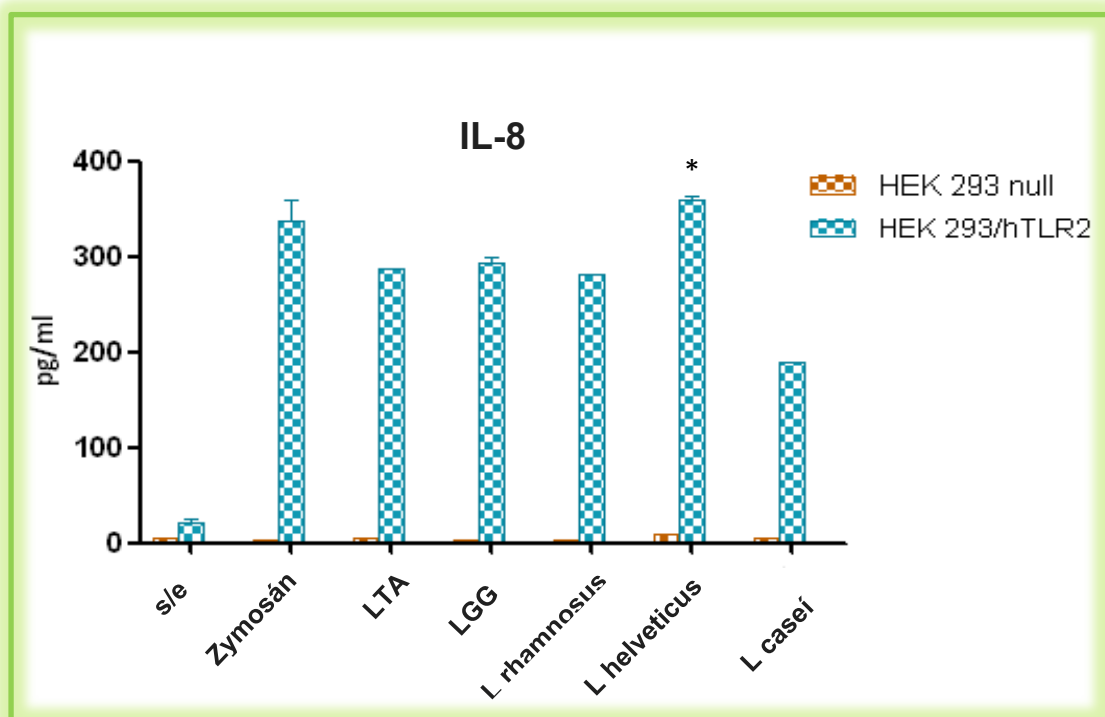


**Figura 29. Microscopia confocal a la translocación de NF- $\kappa$ B.**

MDM fueron estimulados con cepas de probióticos de bacterias lácticas en relación 1: 500 (células/bacteria) y control positivo (LPS 0.1  $\mu$ g/ml). La morfología nuclear identificada por la tinción con colorante de Hoechst (fluorescencia azul) y la positividad a p65 NF- $\kappa$ B (fluorescencia verde). Así mismo, la co-localización de la proteína en el núcleo. Las imágenes fueron analizadas en Microscopio AX10 Imager M.2 Marca Carl Zeiss y de acuerdo a programa preestablecido Axion Visión Rel 4.0 y es una imagen representativa de *Lactobacillus casei*.

### 9.5 Participación de TLR2 en la producción de IL-8 en la estimulación de MDM con probióticos de bacterias lácticas en el modelo de cultivo de células HEK-293-hTLR2 transfectadas.

La dependencia de vía de señalización TLR2 al efecto inmunoestimulador de probióticos de bacterias lácticas fue analizada por la síntesis de IL-8 en células HEK-293hTLR2 como se muestra en la **Figura 30**. La producción de IL-8 inducida por las diferentes bacterias lácticas de probióticos fue observada después de 24 horas en  $285 \pm 35$ ,  $281,363 \pm 35$  y  $187.48$  pg/ml (*LGG*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus* y *L. casei*). Por el contrario, estas mismas cepas fueron incapaces de producir IL-8 en las células HEK-null (control negativo). Estos resultados demuestran que la participación de TLR2 es importante en la señalización del efecto inmune de estas bacterias probióticas de acuerdo a las condiciones experimentales de este estudio, en el cual a la par las células se estimularon con PAMPs específicos de TLR2 (LTA y Zymosán) observando también la síntesis de IL-8.



**Figura 30. Participación de TLR2 en la activación de MDM por probióticos de bacterias lácticas.** El reconocimiento de los probióticos por TLR2 fue evaluado en modelo de células transfectadas con (A) plásmido (HEK null) y (B) células HEK-293hTLR2 (transfectadas-estables) a la molécula de TLR humana. Las células HEK de las diferentes líneas fueron estimuladas con diferentes especies de lactobacilos inactivados por calor, LTA ( $10\mu\text{g/ml}$ ) y Zymosán ( $10\mu\text{g/ml}$ ) durante 18 horas. Los sobrenadantes de los cultivos fueron recolectados y evaluados para la producción de IL-8 por ELISA.



## 10. DISCUSIÓN

La mucosa intestinal está en continua exposición a diversos antígenos. Sin embargo, es sorprendente la capacidad del sistema inmunitario de mucosas para discernir entre la “Paz y Guerra” en estas superficies (**Sansonetti, et al 2004**). Tal situación, nos hace reflexionar sobre el significado del tipo de respuesta inmunitaria más adecuada a la supervivencia del hospedero: la respuesta inmunitaria local y sistémica contra los patógenos, la tolerancia a antígenos de la dieta y la contribución homeostática de la biota comensal del intestino (**Sansonetti, et al 2011, Garret WS et al 2010**).

En la homeostasis intestinal, células epiteliales y macrófagos son importantes centinelas inmunológicas del tracto gastrointestinal (**Mac Donald, et al 2011, Platt AM, et al 2008**). La mayoría de estas células están infiltradas en la lámina propia siendo fuente principal a la síntesis de moléculas reguladoras y activadoras de las respuestas inmunitarias innatas. La infiltración de los macrófagos derivados de monocitos al intestino pueden iniciar respuesta inflamatoria a causa de infección; pero también la ruptura de homeostasis de estas células contribuye al daño inmune observado en ciertas enfermedades inflamatorias crónicas (**Van Li erop P P et al 2009, K aser et al ., 2010**). Al respecto, diferentes estudios han sugerido cierto grado de restauración de la homeostasis intestinal al administrar suplementos de productos lácteos fermentados adicionados de microorganismos benéficos (probióticos) tal es el caso de *Lactobacillus*. Sin embargo, los resultados de su contribución no son contundentes. (**Klaenhammer TR et al., 2012**).

En el presente trabajo, se observó el efecto inmunitario de cuatro bacterias probióticas de *Lactobacillus* (*LGG*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus*, y *L. casei*) al activar *in vitro* la síntesis de mediadores inflamatorios, entre ellos la producción de los ROS (principalmente de los agentes oxidantes de  $O^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$ ) en macrófagos humanos de hospederos sanos. La importancia inmune de los intermediarios del oxígeno molecular ( $O^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot -}$ ) como agentes microbicidas se ha puesto en evidencia en los individuos con defectos en la

maquinaria bioquímica requerida para la síntesis de estas moléculas oxidativas **(De Oliveira-Junior EB et al., 2010)**. Así mismo, los ROS son componentes extremadamente tóxicos, los cuales tienen efectos del etéreo en variedad de patógenos, hongos, parásitos y bacterias; siendo los fagocitos (neutrófilos y macrófagos) los principales productores de estos agentes microbicidas **(Fang FC et al., 2011)**. La síntesis de ROS por los macrófagos en reto a las bacterias lácticas de este estudio fue dependiente de la concentración de bacteria láctica y tipo de especie. Ambos probióticos *L casei* y *L helveticus* indujeron la mayor actividad de los ROS.

Estos resultados, fueron consistentes a reportes previos que demuestran la producción del es tallido respiratorio y la síntesis de diferentes citocinas por bacterias probióticas en modelo de macrófagos murinos retados con *Lactobacillus* **(MarcinKiewicz J et al., 2007)**. Así mismo, ciertas especies de lactobacilos, producen ROS y su síntesis se ha considerado importante a la producción de IL-12. Estos datos sustentados por la observación de reducción de esta citocina en la presencia de inhibidores de la enzima NADPH-oxidasa o moléculas de sequestración de los ROS **(Ichikawa S. et al., 2012)**. Así también, Ichikawa y colaboradores sugieren la dependencia de MyD88 y proponen a los ROS como nuevas moléculas asociadas a los mecanismos de síntesis de IL-12 inducida por *Lactobacillus* **(Ichikawa S. et al., 2012)**.

En contraste, en otro estudio imitando la fermentación en colon por microorganismos *E. coli*, *Enterococcus* y la adición del hierro se observa inhibición en la producción de radicales hidroxilo, siendo estas propiedades anti-oxidantes atribuibles a la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) detectable en los extractos libres de *LGG* y *L paracasei Fn003* **(Sun J et al., 2010)**. Estas divergencias en los efectos biológicos de las bacterias probióticas de *Lactobacillus* pueden atribuirse a la complejidad de los componentes de la pared celular distintos entre ellas y también a su capacidad de liberar distintos factores o productos de secreción (por ejemplo, bacteriocinas, ácido láctico, ácidos grasos de cadenas corta y enzimas como la actividad de SOD). Es contradictorio, pero bacterias lácticas tienen la habilidad de coexistir con

propiedades inhibidoras y es estimuladoras bajo las condiciones de células bacterianas viables, muertas o sobrenadantes libres de células bacterianas (Adams CA. et al., 2010; Meyer AL. et al., 2007).

Diferentes estudios han reportado la capacidad inmunomoduladora de probióticos de diferentes *Lactobacillus* en varias estirpes celulares de sistema inmunitario y de la mucosa incluidos células T, B, NK, dendríticas y epiteliales (Forsythe P et al., 2010; Singh Y et al., 2013).

Sin embargo su función en la modulación de los macrófagos ha sido escasamente investigada. Es reconocido que un fino balance de citocinas pro y anti-inflamatorias en los macrófagos es un evento importante a la regulación de la respuesta inmunitaria innata. Los datos de este estudio de muestran a probióticos de bacterias lácticas como inductores de la síntesis de citocinas pro-inflamatorias entre ellas, IL-8. Esta quimiocina muy importante al reclutamiento y migración de otras células de respuesta inflamatoria (Winkler M et al., 2003).

La quimiocina de IL-8 se produjo desde etapas tempranas de interacción de lactobacilos y macrófagos (6 horas de estimulación). Las concentraciones de la IL-8 inducida por las diferentes cepas probióticas de *Lactobacillus* (*LGG*, *rhamnosus*, *helveticus* y *casei*) fueron muy similares y se mantuvo a las 24 horas. La síntesis de IL-8 inducida por los microorganismos probióticos fue elevada (> a 2 000 pg/ml) comparada a la producción de la otra citocina pro-inflamatoria (TNF- $\alpha$ ).

En similitud a nuestros resultados, otros autores han demostrado la expresión del RNA md de la IL-8 y la actividad quimiotáctica de sobrenadantes de macrófagos estimulados por *LGG* hacia células TH1 (Veckman V et al., 2003). Además Veckman, y colaboradores señalan al bacilo *LGG* como promotor de síntesis de quimiocinas, con posibilidades de propiedades anti-alergia. Al respecto, en investigaciones recientes se ha observado una contribución benéfica de *LGG* en la disminución de alergia en niños (Savilahti E. et al.,

2011). En contraste, otros trabajos (**Ma D. et al., 2004; Lin YP. et al., 2008**) han reportado ausencia de producción de IL-8 a la estimulación de recta por ciertas cepas de *Lactobacillus* como *L reuteri* analizado en modelo de células epiteliales intestinales (Caco-2, T84, HT-29 polarizadas) así como del *L. acidophilus* en línea de monocitos humanos (THP-1) (**Jiang Y et al, 2012**). Así mismo, reportes de efectos inhibitorios de otras cepas de probióticos de *Lactobacillus* en células pre-estimuladas con PAMPs específicos como LPS, flagelina, LPGs derivadas de distintos patógenos (*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*) (**Donato KA et al., 2010; Hsu-Wei Fang et al 2010, Malago JJ, et 2010; Han Geun Kima et al 2011**).

Las discrepancias sobre la síntesis de la IL-8, las atribuimos a las diferencias entre los modelos de experimentación. El presente estudio, se encaminó más al efecto directo de probióticos (No-tratamiento previo con otros estímulos) inversamente en los otros modelos experimentales que fija a las células a pre-activación para valorar su participación en situaciones de respuesta inflamatoria activa. De acuerdo a las condiciones de nuestro estudio; la síntesis de IL-8 por los probióticos evaluados fue similar a la producida por la molécula tipo PAMPs al receptor de TLR2 (zymosán).

En este trabajo también se demuestra la síntesis de otra de las citocinas pro-inflamatoria (el TNF- $\alpha$ ) determinada después de 6 horas de estimulación y al igual a la IL-8 se mantienen en niveles significativos después de 24 horas. Tanto IL-8 y TNF- $\alpha$  son proteínas que tienen efectos biológicos muy importantes en la regulación de la respuesta inflamatoria y a la activación de macrófagos (**Winkler M. et al., 2003; Riches DW et al., 1996**). La combinación de estos resultados sugiere a los *Lactobacillus* de (*LGG, rhamnosus, helveticus* y *casei*) como estímulos pro-inflamatorios, en eventos tempranos de la interacción lactobacilos-macrófagos.

En contraste, los lactobacilos también indujeron la secreción de IL-10, pero en cinética distinta; esta citocina se detecta en mayor concentración a las 24 horas (>250pg/ml). La síntesis de IL-10 de este estudio aparece de forma tardía, estos datos compatibles a otros reportes que señalan la producción de IL-10 como un evento tardío de la respuesta inmunitaria del hospedero (**Bogdan C et al., 1991; Ren de Waal Malefyt et al 1991**).

Las explicaciones en la síntesis de citocinas por estos lactobacilos sugieren que este tipo de bacterias probióticas tienen la capacidad de ejercer efectos anti-inflamatorios, pero de forma tardía. Esta respuesta, considerada como parte de las propiedades de *Lactobacillus* para controlar respuestas inmunes pro-inflamatorias, siendo la producción de IL-10 una importante citocina a la regulación inmunitaria del hospedero (**Dong H et al., 2010**).

La función de IL-10 también se ha destacado en problemas gastrointestinales crónicos, su modulación por microorganismos probióticos se ha observado con varias cepas probióticas sustentado en los pacientes de colitis ulcerativa y enfermedad inflamatoria del intestino (**Mirpuri J et al., 2012**). No hay duda de la importancia de IL-10 sobre la regulación negativa de cascadas inflamatorias mediante la contra-regulación a las citocinas pro-inflamatorias (**Hutchins AP et al 2013; Couper KN, et al, 2008**).

Así también, la importancia de IL-10 en la prevención de la enfermedad inflamatoria del intestino de mostrado por la aparición de inflamación crónica observada en murinos deficientes de IL-10 (**R. Kuhn, J et al., 1993**). Adicionado del efecto positivo observado en la disminución del daño inflamatorio después de la administración oral con *Lactobacillus* en modelos de colitis murina inducida por dextran sulfato de amonio (**Pan T, et al, 2014**). La importancia de la producción de IL-10 se ha descrito a varias cepas de microorganismos probióticos (**de Moreno de Leblanc et al., 2011**).

Por otro lado, la síntesis de citocinas requiere de cascadas de señalización importantes, entre ellas, la participación del factor NF- $\kappa$ B (**Napetschnig J, 2013**). En este trabajo, la estimulación de los macrófagos con las cepas de probióticos activó a este importante factor de la transcripción. Apoyando a estos resultados, otros autores han demostrado el efecto de bacterias probióticas como *L. paracasei* K28 en la activación de NF- $\kappa$ B asociado a la expresión temprana de varios mediadores inflamatorios de macrófagos peritoneales, además de vías de señalización de la familia de las MAPKs cinasas p38 (**Kang H et al, 2011**).

Consistentes a los hallazgos de este trabajo, otros autores reportan vías de señalización asociadas a MAPK y NF- $\kappa$ B en la producción de (TNF- $\alpha$  e IL-12) de células de bazo de murino estimuladas por *L. casei* (**Kim YG et al., 2006**). Así también, *L. rhamnosus* GG puede iniciar cascadas de señalización que involucran NF- $\kappa$ B y vías de señalización STAT en macrófagos humanos (**Miettinen M et al., 2000**).

También una parte muy importante en la cascada de señalización, es la contribución del receptor y los macrófagos expresan receptores tipo Toll (TLRs) como TLR2, TLR4 y TLR6 (**O'Mahony DS et al 2011**). Estas moléculas de TLRs intervienen en la cascada de señalización de la respuesta inflamatoria (**Kay E et al, 2014**).

La señalización vía TLR2 en las formas de heterodímeros (tal es caso, de TLR2-TLR6 o TLR2/TLR1 con sus correceptores) se ha destacado a la estimulación de diferentes moléculas tipo PAMPs (**Oliveira-Nascimento et al., 2012**). La diversidad de estructuras de ligandos al TLR2 lleva a cuestionar acerca de la especificidad del receptor, sin embargo el principal ligando caracterizado son las lipoproteínas de las bacterias Gram positivas (**Zähringer U, et al., 2008**).

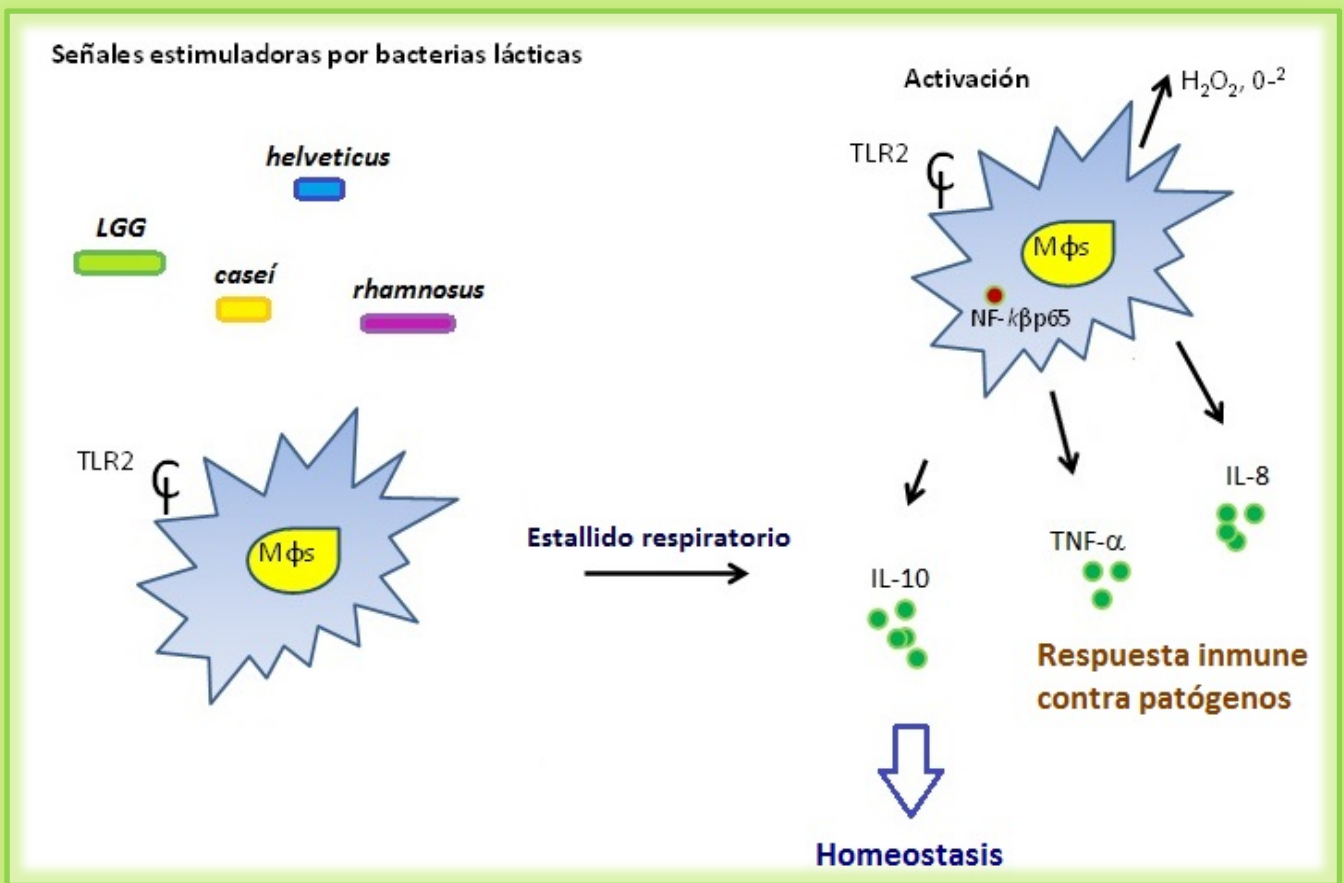
En el presente trabajo se demostró un papel importante de la molécula de TLR2 al activar la síntesis de IL-8 en el modelo de células HEK-293-hTLR2 en respuesta al estímulo de *Lactobacillus* (*LGG*, *rhamnosus*, *helveticus* y *casei*).

En contraste Shida K. y colaboradores reportan efectos inhibidores de las peptidoglicanas (PGN) derivadas de *L johnsonii* y *L plantarum* vía mecanismos dependientes e independientes de TLR2 (Shida K et al., 2009). En otros estudios, la estimulación por ácidos lipoteicoicos revierten el predominio de la producción de ciertas cepas de lactobacilos a la síntesis de IL-12 por predominio de IL-10 vía la activación de la familia de ERK dependiente de la activación de TLR2 en macrófagos murinos (Kaji R et al., 2010). Otros estudios utilizando células de bazo obtenidas de murino, demuestran efectos distintos de inmunomodulación de *Lactobacillus* viables y liofilizados parcialmente atribuibles a la participación del receptor de TLR2, a diferencia de TLR4 y TLR9 (Cai S et al., 2010).

En estudios recientes, LTA de *Lactobacillus rhamnosus GG* se considera el principal MAMPs de esta bacteria y las diferencias en la acetilación de estas moléculas modifican su capacidad de señal a la activación de NF- $\kappa$ B vía TLR2, TLR2/TLR6 (Claes IJ et al., 2012).

En resumen, los resultados de esta tesis sustentan la modulación de mecanismos potenciales de respuesta inmunitaria temprana por los probióticos como la producción de ROS, producción de citocinas y activación de NF- $\kappa$ B, vía dependiente del receptor del TLR2, los cuales se integran en la **figura 31**. En donde se muestran parte de las acciones biológicas de estas bacterias a la activación del macrófago basadas en los resultados de este estudio.

Finalmente los mecanismos en la activación de macrófagos por los lactobacilos son relevantes y nos orientan a sugerir a este grupo de bacterias lácticas con efectos potenciales de adyuvantes a la respuesta inmunitaria del hospedero.



**Figura 31. Efectos inmunes de probióticos de bacterias lácticas en macrófagos humanos.** Las bacterias lácticas como *LGG*, *rhamnosus*, *helveticus* y *casei* inducen señales de estimulación en macrófagos derivados de monocitos (MDM) a través del receptor TLR2 expresado que conducen a la producción de estallido respiratorio principalmente ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ) y citocinas pro-inflamatorias, importantes en la defensa del hospedero, así como IL-10 con papel en la homeostasis.



## 11. CONCLUSIONES

1. Probióticos de bacterias lácticas como *LGG*, *L rhamnosus*, *L helveticus* y *L. caseí* derivadas de productos comerciales activan a macrófagos humanos.
2. Los macrófagos activados por las bacterias lácticas inducen mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno, tal es el caso de estallido respiratorio.
3. Los efectos inmunitarios inducidos por las bacterias lácticas como la producción del estallido respiratorio fueron dependientes de la concentración y cepa probiótica analizada.
4. La estimulación de macrófagos por bacterias lácticas *LGG*, *L rhamnosus*, *L helveticus* y *L. caseí* inducen la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (IL-8 y TNF- $\alpha$ ) de forma temprana y también anti-inflamatorias (IL-10) pero tardíamente.
5. El análisis de los probióticos de bacterias lácticas en la activación de macrófagos, sugiere que estas bacterias son estímulos pro-inflamatorios que podrían ayudar a reforzar la respuesta inmunitaria del hospedero.
6. Las bacterias lácticas activan al factor de transcripción NF- $\kappa$ B p65.
7. La producción de la IL-8 inducida por las cepas probióticas sugiere la participación del receptor de TLR2.

## 12. PERSPECTIVAS

Con base en los datos obtenidos en la presente tesis, surgen nuevas oportunidades de investigación.

- Analizar el papel de estas bacterias probióticas de lactobacilos en la polarización de macrófagos (M1, M2).
  
- Evaluar la contribución de probióticos de bacterias lácticas en macrófagos obtenidos de hospederos con algún inmunocompromiso, por ejemplo la desnutrición.
  
- Estudiar el efecto del *Lactobacillus casei* en la respuesta inmune de macrófagos, en condiciones de pre-activación (inflamación activa) en modelos animales (murinos) o estudios *in vitro*.
  
- Evaluar la posible propiedad adyuvante de *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. rhamnosus*, *L. helveticus* y *L. casei* a otros antígenos

**13. BIBLIOGRAFÍA**

- **A S cott**, K Khan, J Cook, and V Duronio. What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus? *Br J Sports Med.* Jun 2004; 38(3): 248–249.
- **Adams C A.** The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr Res Rev.* 2010 Jun;23(1):37-46.
- **Akdis M**, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O, Rhyner C, Ouedek N, Schaffartzik A, Van De Veen W, Zeller S, Zimmermann M, Akdis CA. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$  receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Mar;127(3):701-21.e1-70.
- **Akira S**, Uematsu S, Takeda O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):783-801.
- **Akira S.** Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2009;85(4):143-56.
- **Alzoghaibi MA.** Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2013 Oct 21;19(39):6540-7.
- **Arunachalam K**, Gill HS, Chandra RK. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur J Clin Nutr.* 2000 Mar;54(3):263-7.
- **Aureli P**, Capurso L, Castellazzi AM, Clerici M, Giovannini M, Morelli L, Poli A, Pregliasco F, Salvini F, Zuccotti GV. Probiotics and health: an evidence-based review. *Pharmacol Res.* 2011 May;63(5):366-76.

- **Barbalat R**, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:185-214.
- **Barton GM**. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest.* 2008 Feb;118(2):413-20.
- **Bogdan C**, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med.* 1991 Dec 1;174(6):1549-55.
- **Bonilla FA**, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S33-40.
- **Borchers AT**, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, Gershwin ME. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol.* 2009;44(1):26-46.
- **Borish LC**, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Feb;111(2 Suppl):S460-75.
- **Borkowski AW**, Gallo RL. The coordinated response of the physical and antimicrobial peptide barriers of the skin. *J Invest Dermatol.* 2011 Feb;131(2):285-7.
- **Bouma G**, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jul;3(7):521-33.
- **Broz P**, Monack DM. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2013 Aug;13(8):551-65.

- **Cai S**, Bay B H, Lee Y K, Lu J, Mahendran R. Live and lyophilized *Lactobacillus* species elicit differential immunomodulatory effects on immune cells. *FEMS Microbiol Lett.* 2010 Jan;302(2):189-96.
- **Capuron L**, Miller A H. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol Ther.* 2011 May;130(2):226-38.
- **Cario E**, Podolsky D K. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun.* 2000 Dec;68(12):7010-7.
- **Chaplin DD**. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S3-23.
- **Chung Y W**, Choi J H, Oh T Y, Eun C S, Han D S. *Lactobacillus casei* prevents the development of dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 mutant mice. *Clin Exp Immunol.* 2008 Jan;151(1):182-9.
- **Claes I J**, Segers M E, Verhoeven TL, Dusselier M, Sels B F, De Keersmaecker S C, Vanderleyden J, Lebeer S. Lipoteichoic acid is an important microbe-associated molecular pattern of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Microb Cell Fact.* 2012 Dec 15;11:161
- **Commins S P**, Borish L, Steinke J W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S53-72.
- **Couper KN**, Blount DG, Riley E M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 2008 May 1; 180(9):5771-7.

- **Cross ML**, Ganner A, Teilab D, Fray LM. Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004 Oct 1;42(2):173-80.
- **De Moreno de Le Blanc A**, Matar C, Perdigón G. The application of probiotics in cancer. *Br J Nutr.* 2007 Oct;98 Suppl 1:S105-10.
- **de Moreno de Leblanc A**, Del Carmen S, Zurita-Turk M, Santos Rocha C, van de Guchte M, Azevedo V, Miyoshi A, Leblanc JG. Importance of IL-10 modulation by probiotic microorganisms in gastrointestinal inflammatory diseases. *ISRN Gastroenterol.* 2011;2011:892971.
- **De Oliveira-Junior EB**, Bustamante J, Newburger PE, Condino-Neto A. The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scand J Immunol.* 2011 May;73(5):420-7.
- **Delcenserie V**, Martel D, Lamoureaux M, Amiot J, Boutin Y, Roy D. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr Issues Mol Biol.* 2008;10(1-2):37-54.
- **Donato K A**, Gareaux M G, Wang Y J, Sherman PM. *Lactobacillus rhamnosus* GG attenuates interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha-induced barrier dysfunction and pro-inflammatory signalling. *Microbiology.* 2010 Nov;156(Pt 11):3288-97.
- **Dong H**, Rowland I, Tuohy KM, Thomas LV, Yaqoob P. Selective effects of *Lactobacillus casei* Shirota on T cell activation, natural killer cell activity and cytokine production. *Clin Exp Immunol.* 2010 Aug;161(2):378-88.

- **Dostert C**, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*. 2008 May 2;320(5876):674-7.
- **Esther M. Sternberg**. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol*. Apr 2006; 6(4): 318–328.
- **Fang FC**. Antimicrobial actions of reactive oxygen species. *MBio*. 2011 Sep 6;2(5). pii: e00141-11.
- **Forsythe P**, Bienenstock J. Immunomodulation by commensal and probiotic bacteria. *Immunol Invest*. 2010;39(4-5):429-48.
- **Furrie E**, Macfarlane S, Thomson G, Macfarlane GT; Microbiology & Gut Biology Group; Tayside Tissue & Tumour Bank. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology*. 2005 Aug;115(4):565-74.
- **Galdeano CM**, Perdígón G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin Vaccine Immunol*. 2006 Feb;13(2):219-26.
- **Garrett WS**, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):859-70.
- **Gillor O**, Etzion A, Riley MA. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008 Dec;81(4):591-606. Epub 2008 Oct 14.
- **Gupta V**, Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol*. 2009 Jul-Sep;27(3):202-9.

- **Han Geun Kima**, , Seung Yeon Leeb, , Na Ra Kima, Hea Young Leea, Mi Yeon Kob, Bong Jun Junga, Chul Min Kimc, Jung Min Leeb, Jong Hwan Parke, Seung Hyun Hand, Daekyun Chunga, Lactobacillus plantarum lipoteichoic acid down-regulated Shigella flexneri peptidoglycan-induced inflammation Molecular Immunology Volume 48, Issue 4, January 2011, Pages 382–391.
- **Hardy H**, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defenses: homeostasis and immunopathology. *Nutrients*. 2013 May 29;5(6):1869-912.
- **Hayashi T**, Nakamura T, Takaoka A. [Pattern recognition receptors]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2011;34(5):329-45. [Article in Japanese].
- **Hsu-Wei Fang**, Shih-Bin Fang, Jen-Shiu Chiang, Chun-Yan Yeung, Wai-Tao Chan, Huen-Bin Jiang, Mei-Lien Cheng and Hung-Chang Lee Inhibitory effects of Lactobacillus casei subsp. rhamnosus on Salmonella lipopolysaccharide-induced inflammation and epithelial barrier dysfunction in a co-culture model using Caco-2/peripheral blood mononuclear cells *J Med Microbiol* May 2010 vol. 59 no. 5 573-579.
- **Hutchins AP**, Diez D, Miranda-Saavedra D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Brief Funct Genomics*. 2013 Nov;12(6):489-98.
- **Ichikawa S**, Miyake M, Fujii R, Konishi Y. MyD88 associated ROS generation is crucial for Lactobacillus induced IL-12 production in macrophage. *PLoS One*. 2012;7(4):e35880.
- **Jacobs SR**, Damania B. NLRs, inflammasomes, and viral infection. *J Leukoc Biol*. 2012 Sep;92(3):469-77.



- **Jarczak J** , Kościuczuk EM, Lisowski P, Strzałkowska N, Józwik A, Horbańczuk J, Krzyżewski J, Zwierzchowski L, Bagnicka E. Defensins: natural component of human innate immunity. *Hum Immunol*. 2013 Sep;74(9):1069-79.
- **Jiang Y** , Lü X , Man C, Han L, Shan Y, Qu X, Liu Y, Yang S, Xue Y, Zhang Y . Lactobacillus acidophilus induces cytokine and chemokine production via NF- $\kappa$ B and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in intestinal epithelial cells. *Clin Vaccine Immunol*. 2012 Apr;19(4):603-8.
- **Kaji R** , Kiyoshima-Shibata J, Nagaoka M, Nanno M, Shida K. Bacterial teichoic acids reverse predominant IL-12 production induced by certain lactobacillus strains into predominant IL-10 production via TLR2-dependent ERK activation in macrophages. *J Immunol*. 2010 Apr 1;184(7):3505-13.
- **Kang H** Choi H S Kim J E, Han N S. Exopolysaccharide-overproducing Lactobacillus paracasei K B28 induces cytokines in mouse peritoneal macrophages via modulation of NF- $\kappa$ B and MAPKs. *J Microbiol Biotechnol*. 2011 Nov;21(11):1174-8.
- **Kaser A** , Zeissig S , Blumberg RS . Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:573-621.
- **Kawai T** , Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010 May;11(5):373-84. doi: 10.1038/ni.1863. Epub 2010 Apr 20.
- **Kay E** , Scotland R S, Whiteford J R. Toll-like receptors: Role in inflammation and therapeutic potential. *Biofactors*. 2013 Dec 21.

- **Kay E** , Scotland R S, Whiteford J R T Toll-like receptors: Role in inflammation and therapeutic potential. *Biofactors*. 2014 May-Jun;40(3):284-94.
- **Kim YG**, Ohta T, Takahashi T, Kushiro A, Nomoto K, Yokokura T, Okada N, Danbara H. Probiotic *Lactobacillus casei* activates innate immunity via NF-kappaB and p38 MAP kinase signaling pathways. *Microbes Infect*. 2006 Apr;8(4):994-1005.
- **Klaenhammer TR**, Kleerebezem M, Kopp MV, Rescigno M. The impact of probiotics and prebiotics on the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012 Oct;12(10):728-34.
- **Kumar S** , Ingle H , Prasad D V, Kumar H. Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Crit Rev Microbiol*. 2013 Aug;39(3):229-46.
- **Lin Y P**, Thibodeaux C H, Peña J A, Ferry GD, Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* suppress proinflammatory cytokines via c-Jun. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Aug;14(8):1068-83.
- **Lippolis J D**. Immunological signaling networks: integrating the body's immune response. *J Anim Sci*. 2008 Apr;86(14 Suppl):E53-63. Epub 2007 Dec 21.
- **Ma D** , Forsythe P , Bienenstock J. Live *Lactobacillus rhamnosus* [corrected] is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infect Immun*. 2004 Sep;72(9):5308-14.
- **MacDonald TT**, Monteleone I, Fantini MC, Monteleone G. Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1768-75.

- **Maghzal G J**, Krause K H, Stocker R, Jaquet V. Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med.* 2012 Nov 15;53(10):1903-18.
- **Malago J J**, Tooten PC, Koninkx J F A. Anti-inflammatory properties of probiotic bacteria on Salmonella-induced IL-8 synthesis in enterocyte-like Caco-2 cells. *Benef Microbes.* 2010 Jun;1(2):121-30.
- **Marcinkiewicz J**, Ciszek M, Bobek M, Strus M, Heczko PB, Kurnyta M, Biedroń R, Chmielarczyk A. Differential inflammatory mediator response in vitro from murine macrophages to lactobacilli and pathogenic intestinal bacteria. *Int J Exp Pathol.* 2007 Jun;88(3):155-64.
- **Martinon F**, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:229-65.
- **Medzhitov R**. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):428-35.
- **Medzhitov R**. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):771-6.
- **Meyer A L**, Elmadafi I, Herbage I, Micksche M. Probiotic, as well as conventional yogurt, can enhance the stimulated production of proinflammatory cytokines. *J Hum Nutr Diet.* 2007 Dec;20(6):590-8.
- **Miettinen M**, Lehtonen A, Julkunen I, Matikainen S. Lactobacilli and Streptococci activate NF- $\kappa$ B and STAT signaling pathways in human macrophages. *J Immunol.* 2000 Apr 1;164(7):3733-40.

- **Mirpuri J**, Sotnikov I, Myers L, Denning TL, Yarovinsky F, Parkos CA, Denning PW, Louis NA. Lactobacillus rhamnosus (LGG) regulates IL-10 signaling in the developing murine colon through upregulation of the IL-10R2 receptor subunit. *PLoS One*. 2012;7(12):e51955.
- **Monie TP**, Bryant CE, Gay NJ. Activating immunity: lessons from the TLRs and NLRs. *Trends Biochem Sci*. 2009 Nov;34(11):553-61.
- **Montero Vega MT**, de Andrés Martín A. Toll-like receptors: a family of innate sensors of danger that alert and drive immunity. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2008 Nov-Dec;36(6):347-57.
- **Montero Vega MT**. A new era for innate immunity. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2008 May-Jun;36(3):164-75.
- **Morais MB**, Jacob CM. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. *J Pediatr (Rio J)*. 2006 Nov;82(5 Suppl):S189-97.
- **Müller-Peddinghaus R**. In vitro determination of phagocyte activity by luminol- and lucigenin-amplified chemiluminescence. *Int J Immunopharmacol*. 1984;6(5):455-66.
- **Napetschnig J**, Wu H. Molecular basis of NF- $\kappa$ B signaling. *Annu Rev Biophys*. 2013;42:443-68.
- **Nathan C**. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):846-52.
- **Nauseef WM**. Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Feb;1840(2):757-67.
- **Newton K**, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Mar 1;4(3).

- **Oliveira-Nascimento L**, Massari P, Wetzler LM. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front Immunol*. 2012 Apr 18;3:79.
- **O'Mahony D S**, Pham U, Iyer R, Hawn TR, Liles WC. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int J Med Sci*. 2008 Jan 4;5(1):1-8.
- **Pan T**, Guo HY, Zhang H, Liu AP, Wang XX, Ren FZ. Oral administration of *Lactobacillus paracasei* alleviates clinical symptoms of colitis induced by dextran sulphate sodium salt in BALB/c mice. *Benef Microbes*. 2014 Sep;5(3):315-22.
- **Pelto L**, Isolauri E, Lilius EM, Nuutila J, Salminen S. Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin Exp Allergy*. 1998 Dec;28(12):1474-9.
- **Perdigón G**, de Macias ME, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AP. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology*. 1988 Jan;63(1):17-23.
- **Platt A M**, Mowat A M. Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. *Immunol Lett*. 2008 Aug 15; 119(1-2):22-31.
- **R. Kuhn, J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Muller**. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. 1993. *Cell* 75 (2). 263–274.
- **Reid G**, Jass J, Sebuly MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Oct;16(4):658-72.

- **Rellstab P**, Schaffner A. Endotoxins suppresses the generation of O<sub>2</sub>- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by "resting" and lymphokine-activated human blood-derived macrophages. *J Immunol.* 1989 Apr 15;142(8):2813-20.
- **Ren de Waal Malefyt**, John Abrams Bruce Bennett Carl G. Figdor and Jan E. de Vries Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes *J Exp Med.* Nov 1, 1991; 174(5): 1209–1220.
- **Ricciotti E**, FitzGerald G A. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 May;31(5):986-1000.
- **Riches DW**, Chan ED, Winston BW. TNF-alpha-induced regulation and signalling in macrophages. *Immunobiology.* 1996 Oct;195(4-5):477-90. Review.
- **Riedel CU**, Foata F, Philippe D, Adolfsson O, Eikmanns BJ, Blum S. Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF-kappaB activation. *World J Gastroenterol.* 2006 Jun 21;12(23):3729-35.
- **Roberfroid M**, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, Guarner F, Respondek F, Whelan K, Coxam V, Davicco MJ, Léotoing L, Wittrant Y, Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM, Mheust A. Probiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr.* 2010 Aug;104 Suppl 2:S1-63.
- **Rocha e Silva M**. A brief survey of the history of inflammation. 1978. *Agents Actions.* 1994 Dec;43(3-4):86-90.
- **Saïd-Sadier N**, Ojcius DM. Alarmins, inflammasomes and immunity. *Biomed J.* 2012 Nov-Dec;35(6):437-49.

- **Sansonetti P J**. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol*. 2004 Dec;4(12):953-64.
- **Sansonetti P J**. To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question. *Mucosal Immunol*. 2011 Jan;4(1):8-14.
- **Sasai M**, Yamamoto M. Pathogen recognition receptors: ligands and signaling pathways by Toll-like receptors. *Int Rev Immunol*. 2013 Apr;32(2):116-33.
- **Savilahti E**. Probiotics in the treatment and prevention of allergies in children. *Biosci Microflora*. 2011;30(4):119-28.
- **Shida K**, Kiyoshima-Shibata J, Kaji R, Nagaoka M, Nanno M. Peptidoglycan from *Lactobacilli* inhibits interleukin-12 production by macrophages induced by *Lactobacillus casei* through Toll-like receptor 2-dependent and independent mechanisms. *Immunology*. 2009 Sep;128(1 Suppl):e858-69.
- **Singh Y**, Ahmad J, Musarrat J, Htешam N Z, Hasnain S E. Emerging importance of holobionts in evolution and in probiotics. *Gut Pathog*. 2013 May 22;5(1):12.
- **Sirisinha S**. Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2011 Mar;29(1):1-14.
- **Sun J**, Hu X L, Le GW, Shi Y H. *Lactobacilli* prevent hydroxy radical production and inhibit *Escherichia coli* and *Enterococcus* growth in system mimicking colon fermentation. *Lett Appl Microbiol*. 2010 Mar;50(3):264-9.

- **Suresh R**, Mosser DM. Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. *Adv Physiol Educ.* 2013 Dec;37(4):284-91.
- **Suzuki N**, Mittler R. Reactive oxygen species-dependent wound responses in animals and plants. *Free Radical Biol Med.* 2012 Dec 15;53(12):2269-76.
- **Szajewska H**, Kotowska M, Mrukowicz JZ, Armańska M, Mikołajczyk W. Efficacy of *Lactobacillus GG* in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J Pediatr.* 2001 Mar;138(3):361-5.
- **Tian J**, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA, Coyle AJ. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol.* 2007 May;8(5):487-96. Epub 2007 Apr 8.
- **Tien MT**, Girardin SE, Regnault B, Le Bourhis L, Dillies MA, Coppée JY, Bourdet-Sicard R, Sansonetti PJ, Pédrón T. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 2006 Jan 15;176(2):1228-37.
- **Torres MA**, Jones JD, Dangl JL. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 2006 Jun;141(2):373-8.
- **Triantafilou K**, Triantafilou M, Drick RL. A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat Immunol.* 2001 Apr;2(4):338-45.
- **Turvey SE**, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S24-32.



- **Van Lierop PP**, Samsom JN, Escher JC, Nieuwenhuis EE Role of the innate immune system in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009 Feb;48(2):142-51.
- **Vanderpool C**, Yan F, Polk D B. Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2008 Nov;14(11):1585-96.
- **Veckman V**, Miettinen M, Matikainen S, Lande R, Giacomini E, Coccia EM, Julkunen I. Lactobacilli and streptococci induce inflammatory chemokine production in human macrophages that stimulates Th1 cell chemotaxis. *J Leukoc Biol.* 2003 Sep;74(3):395-402.
- **Warrington R**, Watson W, Kim HL, Antonetti FR. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2011 Nov 10;7 Suppl 1:S1.
- **Winkler M.** Role of cytokines and other inflammatory mediators. *BJOG.* 2003 Apr;110 Suppl 20:118-23.
- **Wollowski I**, Reichemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr.* 2001 Feb;73(2 Suppl):451S-455S.
- **Yanai H**, Ban T, Wang Z, Choi MK, Kawamura T, Negishi H, Nakasato M, Lu Y, Hangai S, Koshiba R, Savitsky D, Ronfani L, Akira S, Bianchi ME, Honda K, Tamura T, Kodama T, Taniguchi T. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature.* 2009 Nov 5;462(7269):99-103.
- **Zähringer U**, Lindner B, Iinuma S, Heine H, Alexander C. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology.* 2008; 213(3-4):205-24.

## 14. ANEXO

### ◆ **Tratamiento de cubreobjetos circulares de vidrio (9mm) para cultivo de tejidos.**

Cortar los cubreobjetos con ayuda de un lápiz de punta diamante y una platilla para obtener discos de 9mm de diámetro. Colocar de 20 a 24 discos en una caja Petri y cubrirlos con EtOH al 70% durante 5 días. Transcurrido ese tiempo se realizan 7 lavados de 15 minutos cada uno con agua de stillada y en agitación constante. Posteriormente se cubren los discos con HCl 1 M durante 30 minutos con agitación, enjuagar con agua destilada o bidestilada y retirarlos de la caja Petri para su secado en condiciones ambientales.

Una vez secos, colocar en cajas Petri papel filtro y se esterilizan en autoclave en seco.

### ◆ **Ajuste de Células mononucleares $16 \times 10^6$ células/ml.**

Realizar el conteo de células mononucleares por el método de *exclusión de azul de tripano*, se recomienda que las células mononucleares se encuentren resuspendidas en 6mL de SSF al 0.9%

$$\left( \frac{\text{Número de Células}}{\text{Número de cuadrantes}} \right) (\text{Factor de la cámara}) (\text{Factor de dilución}) (\text{Volumen en suspensión}) = \frac{\text{Núm. de céls}}{\text{ml}}$$

#### Ejemplo de ajuste celular:

$$(448 \text{ células}) \times (10^4) \times (2) \times (6 \text{ ml}) = 53,760,000 \text{ células/ml}$$

$$53,760,000 \text{ células} \text{-----} 6 \text{ mL}$$

$$16 \times 10^6 \text{ células} \text{-----} x$$

$$X = 1.8 \text{ mL}$$

En un volumen de 1.8mL se tienen  $16 \times 10^6$  células mononucleares.

◆ **Ejemplo representativo de los estímulos: relación célula efectora vs bacteria (1:500)**

Las cuatro bacterias probióticas se resembraron y se dejaron en incubación durante 24h a 37°C, posteriormente se cosecharon y se realizaron los lavados correspondientes para cuantificar las UFC como se indicó en el apartado 8.2 *Crecimiento bacteriano y cuantificación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de probióticos de Lactobacillus.*

Se determinaron las UFC/ml de *L. rhamnosus GG* (Absorbancia 0.906)

$$\frac{286 \text{ colonias } (10^5)}{0.1 \text{ ml}} = 2.86 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

$$A_{\text{ref}} 0.906 \equiv 2.86 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

Una vez que se determinaron las UFC/ml, fue el resultado que se tomó de referencia para los posteriores cálculos.

Para preparar los estímulos se hizo una resiembra de cada bacteria probiótica 24h antes del ensayo, de igual manera se lavaron y se midió la Abs. Posteriormente se realizó una relación entre esta absorbancia (1.409) y la absorbancia de referencia ( $A_{\text{ref}}$  0.906).

$$\begin{aligned} 0.906 \text{ Abs} &\rightarrow 2.86 \times 10^8 \text{ UFC/ml} \\ 1.409 \text{ Abs} &\rightarrow X = 0.4 \times 10^9 \text{ UFC/ml} \end{aligned}$$

En 1000  $\mu\text{l}$  se tienen  $0.4 \times 10^9 \text{ UFC/ml}$ , se quiere saber cuántas UFC hay en 100  $\mu\text{l}$  de muestra requerido para el ensayo de quimioluminiscencia.

$$\begin{aligned} 0.4 \times 10^9 \text{ UFC/ml} &\rightarrow 1000 \mu\text{l} \\ 4.4 \times 10^7 = X &\rightarrow 100 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Considerando que en cada cubreobjetos se adhieren  $1 \times 10^5$  monocitos, se hace la relación *célula efectora vs bacteria*.

$$\frac{4.4 \times 10^7}{1 \times 10^5} = 445$$

Por lo que es una relación 1:445

A partir de este lote de absorbancia 1.409, se calcularon 1:10, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500 y 1:1000

Ejemplos

- **1:50**

$$A_{\text{ref}} \quad 0.906 \equiv 2.86 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

$$A_{\text{LGG}} \quad 1.409$$

$1 \times 10^5 * 50 = 5 \times 10^6$  bacterias en 100µl requeridos para el ensayo.

$$\begin{aligned} 0.4 \times 10^9 \text{ UFC} &\rightarrow 1000 \mu\text{l} \\ 5 \times 10^6 \text{ bact} &\rightarrow X = 12.5 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Se requirieron 12.5µl del lote de LGG Abs 0.906 y se agregó 87.5µl de Hank's (se preparó por triplicado).

- **1:500**

$$A_{\text{ref}} \quad 0.906 \equiv 2.86 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

$$A_{\text{LGG}} \quad 1.409$$

$1 \times 10^5 * 500 = 50 \times 10^6$  bacterias en 100µl requeridos para el ensayo.

$$\begin{aligned} 0.4 \times 10^9 \text{ UFC} &\rightarrow 1000 \mu\text{l} \\ 50 \times 10^6 \text{ bact} &\rightarrow X = 125 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Se requirieron 125µl del lote de LGG Abs 0.906, posteriormente este volumen se centrifugó a 5000rpm/5min, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1000µl de Hank's (se preparó por triplicado).

Estos procedimientos se realizaron para las cuatro cepas probióticas de *Lactobacillus* y cada una de las relaciones célula efectora vs bacteria.

◆ **MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANOS**

◆ **Difco™ Lactobacilli MRS agar y caldo (1L).**

Proteosa peptona N ° 3	10,0 g
Extracto de Carne	10,0 g
Extracto de Levadura	5,0 g
Dextrosa	20,0 g
Polisorbato 80	1,0 g
Citrato de amonio	2,0 g
Acetato de Sodio	5,0 g
Sulfato de magnesio	0,1 g
Sulfato de Manganeso	0,05 g
Fosfato dipotásico	2,0 g
Agar	15,0 g

Suspender 70g del polvo en 1 L de agua desionizada y hervir hasta disolución completa. Ajustar el pH a 5.2.

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos

Difco™ lactobacilos MRS caldo consta de los mismos ingredientes sin el agar.

◆ **Difco™ lactobacilos MRS/NaCl 4%, agar y caldo**

Proteosa peptona N ° 3	10,0 g
Extracto de Carne	10,0 g
Extracto de Levadura	5,0 g
Dextrosa	20,0 g
Polisorbato 80	1,0 g
Citrato de amonio	2,0 g
Acetato de Sodio	5,0 g
Sulfato de magnesio	0,1 g
Sulfato de Manganeso	0,05 g
Fosfato dipotásico	2,0 g
NaCl	4,0g
Agar	15,0 g

Suspender 70g del polvo y 40g de NaCl en 1L de agua desionizada, hervir hasta disolución completa. Ajustar el pH a 5.2.

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Difco™ lactobacilos MRS caldo consta de los mismos ingredientes sin el agar.

◆ MEDIOS DE CULTIVO CELULAR

- ◆ **Medio para monocitos. RPMI–1640 Gibco®/ SFB 10% / PSH 25% (1 ml).**

RPMI–1640 Gibco®	650 µl
SFB Gibco®	250 µl
PSH	100 µl

Preparar en condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar, colocar en tubo eppendorf y resuspender perfectamente.

- ◆ **Medio para monocitos. RPMI–1640 GIBCO®/ SFB 10% (50 ml).**

RPMI–1640 Gibco®	45 ml
SFB Gibco®	5 ml

Colocar en un tubo para centrifuga Corning es téril ( 50 ml) en la campana de flujo laminar.

- ◆ **Medio de cultivo para células HEK (HEK-hTLR2 y HEK-null)/10% SFB con Blastidicin S 0.01 mg/ml**

DMEM high glucose 4.5 g/L Gibco®
SFB Gibco®
Blasticidin S

◆ SOLUCIONES

◆ **Pool de Suero Humano (PSH).**

Recolectar suero humano de 10 a 20 individuos y congelar a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

◆ **Solución Salina Fisiológica SSF 0.9% pH=7.2 (1L).**

NaCl	9.0 g
------	-------

Pesar 9g de NaCl y disolver en 1L de agua destilada, posteriormente ajustar pH= 7.2 con NaOH 1M. Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos.

◆ **Solución salina Balanceada de Hank's (HBSS) libre de rojo de fenol pH=7**

Agua destilada	1000mL
Dextrosa o glucosa	1.0 g
Cloruro de sodio	8.0 g
Cloruro de potasio	0.4 g
Cloruro de calcio	0.14 g
Sulfato de magnesio	0.10 g
Cloruro de magnesio	0.10 g
Bicarbonato de sodio	0.35 g
Fosfato de sodio monobásico	0.06 g
Fosfato de sodio dibásico	0.06 g

Pesar cada uno de los reactivos, disolver en 500ml de agua destilada en el orden de aparición, una vez disueltos aforar a 1000ml y ajustar a pH=7

Los ajustes de pH se realizan con NaOH 1M =1N o HCl 1M =1N. Esterilizar por el método de filtración usando una membrana de  $0.22\mu\text{m}$ . Conservar en refrigeración.

◆ **ZYMOSAN A de *Saccharomyces cerevisiae* 1mg/ml (Sigma Z4250).**

Zymosán A	200 mg
SSI	20 ml

Colocar 200 mg de Zymosán A en 20ml de SSF, calentar en baño maría durante 30 minutos, posteriormente centrifugar a 5000 rpm/10 minutos. Realizar dos lavados con SSF y enseguida hacer alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf. Conservar en refrigeración a -20°C.

◆ **Opsonización de Zymosán**

Zymosán A	1 ml
Suero AB	200 µl
Hank's	800 µl

Preparar en el momento de ser utilizado. Descongelar el zymosán a temperatura ambiente y posteriormente centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos, quitar el sobrenadante y realizar un lavado con SSF. Retirar nuevamente el sobrenadante, resuspender el zymosán con 800µl de solución de Hank's y añadir 200µl de suero AB; homogenizar perfectamente. Incubar a 37°C durante 30 min en estufa con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% o en baño de agitación a la misma temperatura. Transcurrido ese tiempo, retirar de incubación y centrifugar a 5000 rpm/5 min, quitar el sobrenadante y conservarlo. Realizar dos lavados al zymosán opsonizado y resuspender en 1000 µl de solución de Hank's. Conservar a temperatura ambiente mientras se usa. **Figura 32.**

◆ **Zymosán activado por suero (ZAS)**

El sobrenadante que se obtuvo de la opsonización del zymosán se coloca en baño maría a 56°C durante 30 minutos para inactivarlo. Retirar del baño y en condiciones asépticas realizar alícuotas de 20-50µl en tubos eppendorf de 0.6 mL. Congelar de -20°C a -80°C para evitar su degradación.



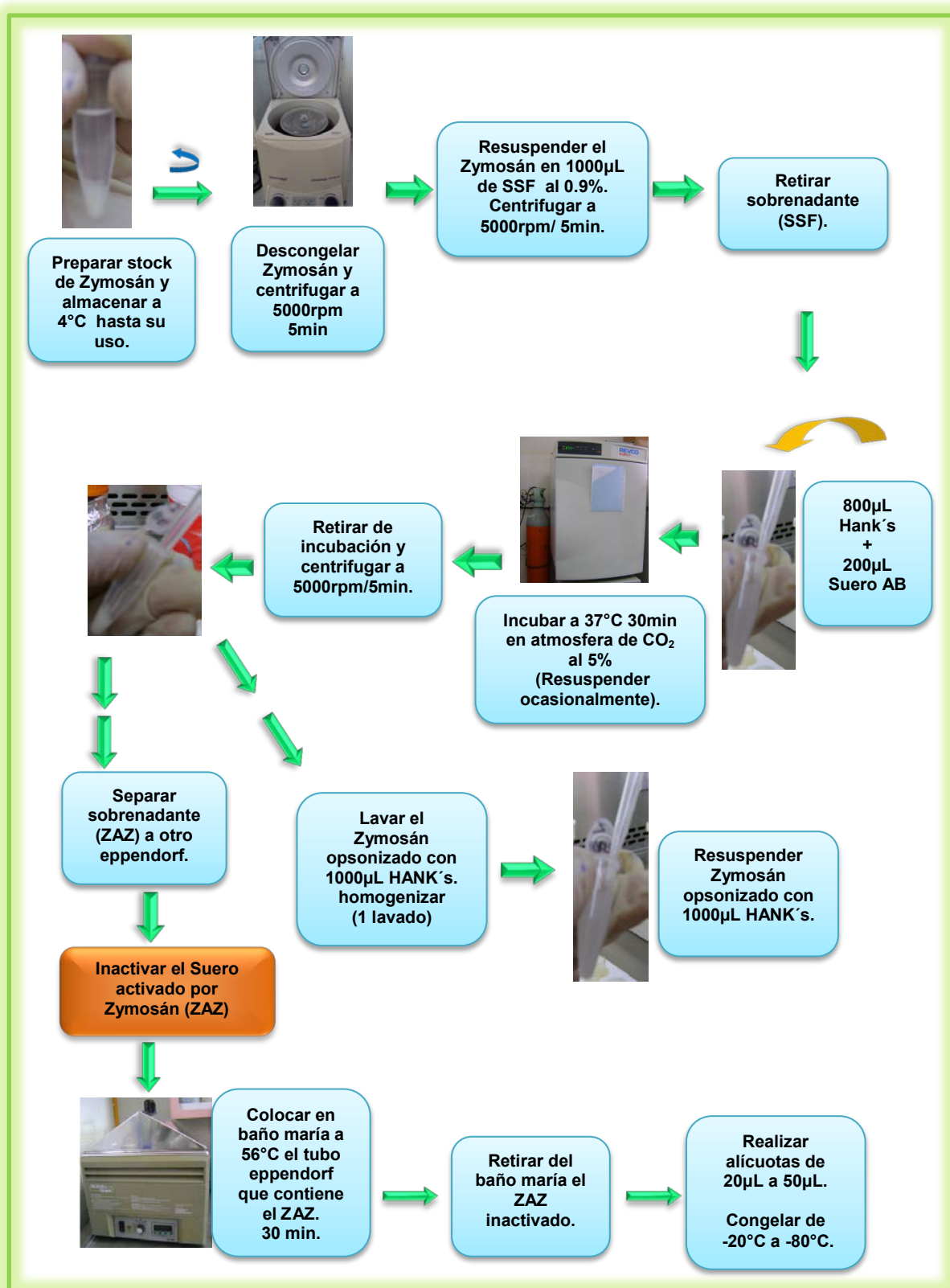


Figura 3 2. O psonización d e Z ymosán e Inactivación d e s uero activado p or zymosán.

◆ **Luminol  $0.8 \times 10^{-4} \text{M}$  (Sigma)**

luminol	0.0141 g
DMSO	282 $\mu\text{l}$
Hank's	

Pesar 0.0141 g de luminol y disolver en 282  $\mu\text{l}$  de DMSO. Posteriormente aforar a 100 ml con Hank's. Esterilizar por filtración.

◆ **Solución de EtOH 70% (100ml).**

Etanol absoluto	70 ml
Agua destilada	30 ml

Mezclar ambos reactivos en un tubo. Conservar en refrigeración.

◆ **Buffer de carbonatos 0.1 M pH=9.5 (1.0 L)**

Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )	7.13 g
Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ )	1.59 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los reactivos en 1 L de agua destilada. Ajustar el pH a 9.5 con NaOH 1.0 N. Usar recién preparado o dentro de los 7 días de preparación. Almacenar a 2-8°C.

◆ **Solución Buffer de Fosfatos-PBS pH=7.0 (1.0 L)**

Cloruro de sodio (NaCl)	8.0 g
Fosfato de sodio dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1.16 g
Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.2 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
Agua destilada	1000ml

◆ **Solución de lavado (PBS/ 0.05% Tween-20)**

PBS	500 ml
Tween-20	250 $\mu\text{l}$

Usar recién preparado o dentro de los 3 días de preparación. Almacenar a 2-8°C.

◆ **Solución de bloqueo (PBS/SFB 10%) pH=7.0 (50 ml)**

PBS	50 ml
SFB	5 ml

◆ **Solución de paro. Ácido sulfúrico 2 N (100 ml)**

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10.66 ml
Agua destilada	100 ml

◆ **Buffer de lavado 1X (200 ml)**

Buffer de lavado 10X	20 ml
Agua Ultrapura	180 ml

Almacenar el buffer a 4°C durante 7 días, máximo.

◆ **Buffer de permeabilización 1X (20 ml)**

Buffer de permeabilización 10X	2 ml
Agua Ultrapura	18 ml

Almacenar el buffer a 4°C durante 7 días, máximo.

◆ **Buffer de lavado II 1X (200 ml)**

Buffer de lavado II	20 ml
Agua Ultrapura	180 ml

Almacenar el buffer a 4°C durante 7 días, máximo.

◆ **Solución de fijación.**

Paraformaldehído 16%	3.0 ml
Buffer de lavado 1X	9.0 ml

Calentar a 37° C antes de us ar. Preparar una solución nueva para cada ensayo.

◆ **Solución Anticuerpo Primario.**

Anticuerpo primario NF-κB	24 μl
Buffer de lavado 1X	6.0 ml

◆ **Solución de tinción Anticuerpo Secundario.**

Colorante de Hoechst	3.0 μl
DyLight 488 de cabra Anti-conejo	12.0 μl
Buffer de lavado 1X	6.0 ml

Preparar la solución justo antes del ensayo.