



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“La contribución del probiótico de *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) en la función inmunitaria de leucocitos polimorfonucleares humanos”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**P R E S E N T A:**

**Jessica Flores García**

Asesora: Dra. Luz María Rocha Ramírez

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Infectología-Laboratorio de Investigación en Infectología, en colaboración con el Departamento de Inmunología y Biología Celular del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”

Este trabajo fue financiado por el apoyo a proyectos de Investigación (**Fondos Federales**) de la Secretaría de Salud con números de registro **HIM/2011/007** y **HIM/2014/013**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



DEPARTAMENTO DE  
EXÁMENES PROFESIONALES

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

**La contribución del probiótico de Lactobacillus rhamnosus (LGG) en la función inmunitaria de leucocitos polimorfonucleares humanos.**

Que presenta la pasante: **Jessica Flores Garcia**

Con número de cuenta: **307067076** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Septiembre de 2016.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Marco Antonio Vega López	
<b>VOCAL</b>	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Luz Maria Rocha Ramirez	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Ladislao Palomar Morales	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional [art. 127].

A Dios y a mis abuelitos, quienes desde el cielo guían mi camino.  
A mis padres, pilares fundamentales en mi vida, con mucho amor y cariño,  
les dedico todo mi esfuerzo, en reconocimiento a todo el sacrificio  
puesto para que yo pueda ser una profesionalista.  
A mis hermanas por su apoyo incondicional.

A todos ustedes, con amor

# Agradecimientos

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por haberme dado salud para lograr mis objetivos y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía en este camino.

A mis padres Mauricio y Silvia, por su apoyo en todo momento, sus consejos, sus valores, su motivación constante y su ejemplo de perseverancia y constancia para salir adelante y ser una persona de bien, pero sobre todo por su infinito amor.

A mis hermanas Erika y Xiomara, por compartir alegrías y tropiezos por su confianza por hacer más amenas esas noches de estudio, porque más que hermanas son mis amigas las quiero mucho gordas.

A mis abuelos, Mario†, Rafaela†, Benito†, Virginia por ser parte esencial de mi formación, mi educación y por todos esos consejos y sabiduría transmitidos para hacer de mí una persona con valores.

A mi familia en general a todos mis tíos y primos que me han apoyado a lo largo de esta trayectoria.

A mis amigos Citlali, Ana, Sergio que hicieron más ameno este recorrido ya que sin su amistad, consejos y compañía no hubiera sido tan fácil llegar al final.

A mi asesora Dra. Luz María Rocha por hacer posible esta tesis, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y compartir conmigo algo tan valioso como su tiempo, paciencia y conocimiento.

Al Hospital Infantil de México Federico Gómez por darme la oportunidad de seguir formándome académicamente dentro de sus instalaciones en especial al Dr. Eslava, Araceli, Arturo, Selene, y a todo el personal que me ayudo en la realización de mi trabajo.

A mi amada UNAM, mi casa de estudios, por brindarme gran parte de mis conocimientos teóricos y prácticos, por darme la oportunidad de acudir a sus instalaciones y hacer realidad uno de mis sueños.

# Indice General

<b>I.</b>	<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>I</b>
<b>II.</b>	<b>INDICE DE TABLAS .....</b>	<b>II</b>
<b>III.</b>	<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>III</b>
<b>1.</b>	<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
	2.1 Características generales del probiótico de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG .....	3
	2.2 El Sistema inmune innato y los probióticos .....	4
	2.3 El papel de las células PMN en la inflamación intestinal .....	14
<b>3.</b>	<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>18</b>
<b>4.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>20</b>
<b>5.</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>21</b>
<b>6.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
	6.1 OBJETIVO GENERAL.....	22
	6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>7.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
	7.1 Cepa probiótica de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LGG).....	23
	7.2 Cultivo del probiótico LGG en medio de cultivo MRS.....	24
	7.3 Cuantificación de las UFC (unidades formadoras de colonias) en LGG.....	25
	7.3 Inactivación por calor de probiótico LGG .....	26
	7.5 Obtención de células polimorfonucleares (PMN) de sangre periférica humana .....	27
	7.6 Determinación de la viabilidad de células PMN.....	28
	7.7 Cuantificación de células PMN .....	30
	7.8 Evaluación del estallido respiratorio (función oxidativa) de leucocitos PMN por el método de quimioluminiscencia .....	31
	7.9 Estimulación de PMN con LGG.....	33
	7.10 Evaluación de la síntesis de citocinas pro inflamatorias (IL8, IL1 $\beta$ y TNF $\alpha$ ) en células PMN por el método de ELISA.....	33
	7.11 Análisis de actividad microbicida de polimorfonucleares retados con <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> .....	37
	7.12. Análisis estadístico .....	38
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
	8.1 Actividad oxidativa de células polimorfonucleares (quimioluminiscencia) en respuesta a la bacteria <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG viable y no viable .....	39
	8.2 Producción de IL-8, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ inducidas por LGG viable y no viable en células PMN .....	42
	8.3 Efecto in vitro de la bacteria LGG viable y no viable en la actividad bactericida de células PMN al reto de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .....	45

9.	DISCUSIÓN.....	48
10.	CONCLUSIONES .....	53
11.	PERSPECTIVAS .....	54
12.	REFERENCIAS.....	55
13.	ANEXO.....	66

# I. Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> La interacción molecular de los componentes de superficie de lactobacillus y los receptores del sistema inmune innato. ....	6
<b>Figura 2.</b> Importancia de los probióticos en la salud del intestino humano. ....	9
<b>Figura 3.</b> Impacto de los probióticos en la superficie de la inmunidad de mucosa. ....	10
<b>Figura 4.</b> Leucocitos polimorfonucleares con su contenido de moléculas antimicrobianas. ....	13
<b>Figura 5.</b> La contribución de las funciones de los neutrófilos. ....	17
<b>Figura 6.</b> El origen de la cepa probiótica. ....	23
<b>Figura 7.</b> Características generales de la cepa probiótica LGG. ....	24
<b>Figura 8.</b> Inactivación por calor de cepa probiótica LGG*. ....	26
<b>Figura 9.</b> Crecimiento en placa de LGG viable y LGG inactivado por calor. ....	26
<b>Figura 10.</b> Obtención y purificación de células PMN de sangre periférica humana. ....	27
<b>Figura 11.</b> Determinación de viabilidad de células PMN. ....	28
<b>Figura 12.</b> Viabilidad de células PMN. ....	29
<b>Figura 13.</b> Análisis morfológico de las células PMN. ....	30
<b>Figura 14.</b> Neutrófilos purificados de sangre periférica humana. ....	31
<b>Figura 15.</b> La interacción de luminol con las especies reactivas de oxígeno. ....	32
<b>Figura 16.</b> Placa de ELISA con curvas (IL8, TNF $\alpha$ e IL1 $\beta$ ) y las muestras de las citocinas analizadas. ....	35
<b>Figura 17.</b> Curva estándar de IL-8. ....	36
<b>Figura 18.</b> Curva estándar de TNF- $\alpha$ . ....	36
<b>Figura 19.</b> Curva estándar de IL-1 $\beta$ . ....	37
<b>Figura 20.</b> Síntesis de estallido respiratorio (quimioluminiscencia) por células PMN estimulados con LGG viable e inactivado. ....	40
<b>Figura 21.</b> Análisis de la cinética de producción oxidativa de células PMN inducida por <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> viable. ....	41
<b>Figura 22.</b> Análisis de la cinética de producción oxidativa de células PMN inducida por <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> inactivado. ....	42
<b>Figura 23.</b> Síntesis de IL-8 en PMN estimulados in vitro con probiótico LGG viable y no viable. ....	43
<b>Figura 24.</b> Síntesis de TNF- $\alpha$ en PMN estimulados in vitro con probiótico LGG viable y no viable. .	44
<b>Figura 25.</b> Síntesis de IL-1 $\beta$ en PMN estimulados in vitro con LGG viable e inactivado. ....	45
<b>Figura 26.</b> Actividad bactericida de células PMN retadas con <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213. 46	
<b>Figura 27.</b> Actividad bactericida de células PMN retadas con <i>Escherichia coli</i> ATCC 35128. ....	47

## II. Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Cálculos de número de UFC de Lactobacillus LGG. ....	25
<b>Tabla 2.</b> Preparación de tubos de reacción para medición de ROS. ....	32
<b>Tabla 3.</b> Programa de luminómetro. ....	32
<b>Tabla 4.</b> Parámetros del programa de lavador de ELISA (Das). ....	34
<b>Tabla 5.</b> Especificaciones de los insertos. ....	35

# III. Abreviaturas

AFM	Microscopia de fuerza atómica
BAL	Bacterias ácido lácticas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a una Enzima
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HBSS	Solución Salina Balanceada de Hank's
IL-8	Interleucina 8
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IEC	Células intestinales epiteliales
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>
LTA	Ácidos lipoteicoicos
LPG	Peptidoglicana
MAMP's	Patrones moleculares asociados a microorganismos
MRS	Rogosa y Sharpe
$\mu$ L	Microlitro
mL	Mililitro
mV	Milivolts
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NET'S	Trampas extraclulares de neutrófilos
NO	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
PAMP's	Patrones moleculares asociados a patogenos
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PMN	Polimorfonucleares
PRR's	Receptores de reconocimiento a patrones
PSH	Pool de Suero Humano
QL	Quimioluminiscencia
Rh	Recombinante humano
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
S.au	<i>Staphylococcus aureus</i>
SFB	Suero Fetal Bovino
SSF	Solución Salina Fisiológica
TLR'S	Receptores tipo Toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TMB	Sustrato 3,3,5,5-tetrametilbencidina
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
Zy	Zymosán

# 1. Resumen

Las células polimorfonucleares (PMN) son componentes esenciales de la inmunidad innata y pioneras de la respuesta inflamatoria a través de la secreción de diversas moléculas como citocinas, defensinas y la producción del estallido respiratorio ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ). El conocimiento de la interacción molecular, entre bacterias comensales del intestino, como *Lactobacillus* y los PMN es controversial. En el presente trabajo, utilizando un modelo *in vitro*, se analizó el efecto biológico de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) sobre células PMN purificadas de concentrados leucocitarios de donadores de Banco de Sangre. Las células PMN se purificaron por tratamiento con solución lítica y su viabilidad se determinó por el método de exclusión de azul de tripano. Las células PMN se retaron con diferentes concentraciones de LGG viable e inactivado y se evaluaron las siguientes funciones inmunes: 1) La producción de estallido respiratorio mediante el método de quimioluminiscencia (QL), ampliada por luminol, a la par de testigos negativo y positivo (PMN no estimulados y estimulados con Zymosán). 2) La síntesis de citocinas IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por el método de ELISA después de 24 horas al reto de LGG, y 3) La capacidad microbicida contra los patógenos bacterianos *Staphylococcus aureus* (ATCC 2529), y *Escherichia coli* (ATCC 35128) mediante el método de dilución en placa y conteo de las UFC después de 60 minutos. Los resultados mostraron que el LGG induce el estallido respiratorio en los PMN, en picos de quimioluminiscencia de  $202.35 \pm 16.56$  mv/mL con el LGG inactivado por calor, a diferencia del LGG viable que produjo  $138.11 \pm 12.58$  mv/mL. Estos picos de quimioluminiscencia fueron dependientes a la concentración del lactobacilo. Así mismo, la cinética de activación mostró una extensión bajo la curva de quimioluminiscencia muy similar a la observada con el estímulo de Zymosán (testigo positivo), la cual se alcanzó entre los 15 y 20 minutos. Sin embargo, los picos observados en la respuesta a LGG fueron dos veces menores al observado en la respuesta al Zymosán ( $202.35 \pm 16.56$  vs  $341.15 \pm 2.77$  mV). Así también, la respuesta oxidativa fue mayor con el LGG inactivado comparado con el bacilo viable. El análisis de la síntesis de citocinas mostró

efectos diferenciales en las concentraciones de IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . La producción de estas citocinas fue de 192.29 $\pm$ 36.35, 113 $\pm$ 15.5 y 152.5 $\pm$ 14.84 pg/mL respectivamente. La condición de LGG viable produjo mayor concentración de citocinas en comparación al inactivado (108.5 $\pm$ 23.3, 22.5 $\pm$ 7.7, y 36.5 $\pm$ 2.12 pg/ML para IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  respectivamente). Además, la preincubación de los PMN con LGG inactivado por 60 minutos en relación 1:10 (célula/bacteria) indujo un aumento del 28 % en la capacidad bactericida de los PMN contra *E. coli* y *S. aureus*, comparado al tratamiento con LGG no viable. Estos resultados demuestran propiedades inmunoestimuladoras de LGG en la función inmunitaria innata de las células PMN humanas en un sistema *in vitro* siendo estos efectos dependientes a la concentración y viabilidad de LGG.

## 2. Introducción

*“La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda”*

Francois Marie Arovet Voltaire

### 2.1 Características generales del probiótico de *Lactobacillus rhamnosus GG*

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos Gram positivos, no patógenos, no toxigénicas, fermentadoras, caracterizadas por producir ácido láctico a partir de carbohidratos. Esta particularidad las hace útiles como cultivos iniciadores para los procesos de fermentación de alimentos. Sin embargo, varias de las BAL también comparten otros rasgos comunes como ser aerotolerantes, no forman esporas, no reducen el nitrato y no producen pigmentos (Douillard, *et al.*, 2014; Klaenhammer, *et al.*, 2008).

El grupo se subdivide en bacterias homo y heterofermentativas en función de los productos de su metabolismo. Las homofermentativas se caracterizan porque el único producto de fermentación de los carbohidratos es el ácido láctico, mientras que las segundas pueden originar además dióxido de carbono, etanol o ácido acético. Así mismo, BAL forma parte de los comensales del tracto intestinal y genital humano (Klein *et al.*, 1998 Papadimitriou, *et al.*, 2016).

Existen reportados 13 géneros distintos de BAL entre ellos, *Lactobacillus* representa el grupo mayoritario; utilizado en la obtención de alimentos y bebidas fermentadas. Además, *Lactobacillus* ocupa un lugar importante dentro de las bacterias definidas como probióticas (Monteagudo, *et al.*, 2011).

Este concepto de las bacterias probióticas, fue señalado desde los trabajos de Metchnikoff en 1908 cuando sugirió la teoría de que la larga vida de los agricultores de Bulgaria era debido al consumo de productos de leche fermentada (Delcenserie, *et*

*al.*, 2008, Mackowiak, *et al.*, 2013). En la actualidad, las bacterias probióticas están definidas por la organización mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO/WHO) como: “Microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedero”.

*Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)* es una de las bacterias probióticas de las BAL más estudiadas (Vandenplas, *et al.*, 2015; Yan, *et al.*, 2012). Además, LGG forma parte de la microbiota intestinal en los seres humanos, este bacilo fue aislado de muestras de heces de adulto humano por Sherwood Gorbach y Barry Goldwin, de allí las siglas GG, integradas al nombre genérico de la bacteria láctica. Esta cepa presenta características asociadas a las bacterias probióticas, entre ellas, la capacidad de resistencia al ácido y a la bilis, sus características de crecimiento y su potencial de adhesión al epitelio intestinal (Ardita, *et al.*, 2014; J Palva, *et al.*, 2012).

En la mayoría de los reportes científicos, el impacto de las bacterias probióticas se ha analizado de acuerdo a su capacidad de activación sobre diferentes sistemas del hospedero como el nutricional, el metabólico y el inmunológico (Singh, *et al.*, 2013; Kubiszewska, *et al.*, 2014; Lin, *et al.*, 2014)

## 2.2 El Sistema inmune innato y los probióticos

La inmunidad innata representa la primera línea de defensa en contra de los microorganismos patógenos. Estas vías innatas son independientes a las características *per se* del patógeno involucrado y son alertados en el momento inmediato de la entrada del microorganismo debido a que la gran mayoría de sus componentes son constitutivos (Riera, *et al.*, 2016; Chaplin, *et al.*, 2010).

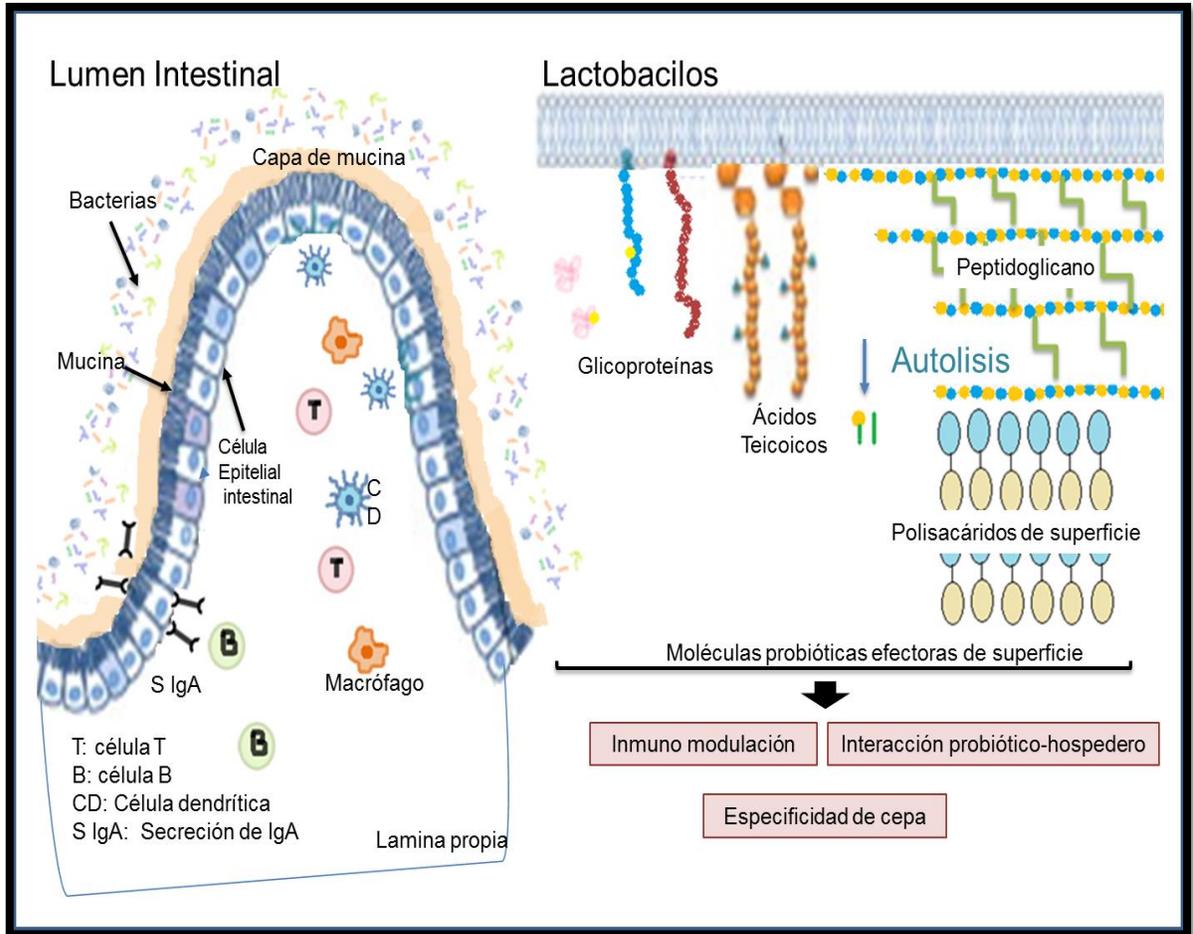
El sistema inmune innato, se caracteriza por utilizar proteínas codificadas en línea germinal para identificar, mediante un número restringido de receptores, sustancias

extrañas y moléculas invariantes presentes en los patógenos. Estas moléculas receptoras pueden estar en la superficie de las células inmunes, en los compartimientos del citoplasma o en forma soluble y reciben el nombre de las siglas de PRRs (receptores de reconocimiento de patrones), entre ellos el grupo de los TLR (receptores tipo Toll) que son de los más importantes (Kawai, *et al.*, 2010).

Los PRRs reconocen estructuras invariantes o altamente conservadas denominadas PAMP's (patrones moleculares asociados a patógenos) que son compartidas por un grupo importante de microorganismos (Kumagai, *et al.*, 2010). Estos PAMP's son expresados en diferentes patógenos, por ejemplo, LPS, peptidoglicana (LPG) y ácidos lipoteicoicos de bacterias gram positivas, ácidos micólicos (Micobacterias) y flagelinas, entre otras (Bianchi, *et al.*, 2007).

Los probióticos de *Lactobacillus*, al igual que otras bacterias gram positivas, poseen moléculas conservadas denominadas MAMP's (patrones moleculares asociados a microorganismos), expresados su pared celular. En los últimos años a estas MAMPs se les atribuye un papel importante en el reconocimiento por el sistema inmune innato del hospedero (Figura 1). Entre las moléculas de MAMPs se citan a la LPG, los ácidos lipoteicoicos (LTA), los ex polisacáridos y las distintas glicoproteínas secretadas por estas bacterias (Newman, *et al.*, 2013)

En las interacciones de MAMP-PRR en las bacterias comensales se ha documentado a la pared celular como un factor prioritario en el contacto. Sin embargo, en estudios por Lebeer y col, (2010), sugieren que el resultado final de la respuesta en las células del hospedero depende de la combinación de los distintos MAMP's que interactúan con varios PRRs y asociados a correceptores pueden afinar la señalización en función de la concentración de estos MAMP's (Abreu, *et al.*, 2010; Bron, *et al.*, 2013).



**Figura 1.** La interacción molecular de los componentes de superficie de lactobacillus y los receptores del sistema inmune innato. Los polisacáridos de la superficie del lactobacillus pueden también contribuir también en las moléculas MAMPs de estas bacterias.

(Bron , 2013)

Estudios previos han identificado los MAMP's de los probióticos y éstos, como ya se citó, se encuentran distribuidos sobre la pared celular de estas bacterias (Kleerebezem, *et al.*, 2010). También, parte de los efectos benéficos de los probióticos se han asociado al contacto directo entre la célula del hospedero con la bacteria probiótica viable (Adams, *et al.*, 2010; Ohashi, *et al.*, 2009). Por el contrario, en otros reportes se menciona que algunos factores solubles, derivados de los probióticos, tienen también la propiedad de modular directamente la producción de citocinas y de regular respuestas inmunes innatas en el hospedero (Mokrozub, *et al.*, 2015).

Trabajos previos han demostrado que ciertos probióticos pueden modular respuestas inflamatorias mediado por los PRRs en el intestino con impacto directo en las funciones de las células intraepiteliales y células presentadoras de antígeno (Roselli, *et al.*, 2007; Zhang, *et al.*, 2010).

En estudios recientes, se han propuesto varios mecanismos de los factores solubles de los probióticos para la modulación del intestino. Peña y colaboradores (2003) reportan la inhibición de TNF- $\alpha$  y la relación de TNF- $\alpha$ /IL-10 por LGG en el modelo de macrófagos de ratones, con un efecto anti inflamatorio, independiente del contacto de las células probióticas. Así mismo, utilizando la cepa de *L. rhamnosus GG*, para indagar el mecanismo molecular por el cual los probióticos regulan células intraepiteliales, Yan F y colaboradores (2013) reportan la purificación de dos proteínas derivadas de esta bacteria (p75 y p40) con papel potencial en la respuesta inmune.

Estas proteínas solubles activan proteínas de señalización del grupo Akt, inhiben la apoptosis de células epiteliales por citocinas, promueven el crecimiento celular en células epiteliales de colon humano y también en explantes de colon de ratón, observando reducción del daño de colon inducido por el TNF- $\alpha$  (Yan, *et al.*, 2012).

En otros estudios de cultivo celular de líneas epiteliales humanas, se demostró que el LGG era igualmente efectivo, tanto viable como inactivado (por UV), para la disminución de IL-8 en epitelio intestinal (López, *et al.*, 2008).

En otros trabajos se ha demostrado que las bacterias probióticas inactivadas, viables o sus productos liberados, tienen efectos similares en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, que los hacen candidatos para la regulación de citocinas proinflamatorias inducidas por moléculas tipo PAMP's, (por ejemplo, LPS de las bacterias gram negativas).

También se han demostrado, los efectos beneficios con ciertos grupos de probióticos, en el hospedero tanto en condiciones de salud como de enfermedad. Así mismo se ha analizado la interacción de estos microorganismos con las células del epitelio y como intraccionan con el sistema inmune. (Frei, *et al.*, 2015).

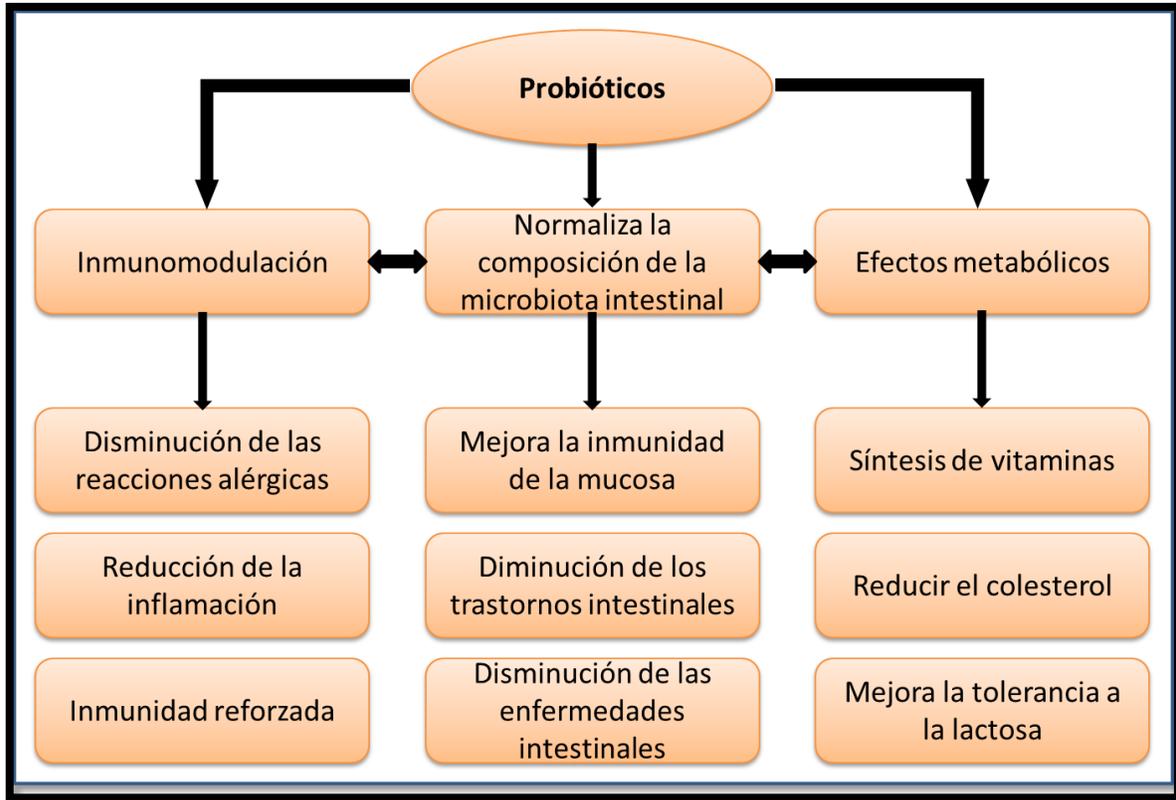
Está documentado también que los probióticos contribuyen a regímenes alimentarios saludables y, en los últimos años, se le atribuyen papeles importantes relacionados a la gestión de la enfermedad e inmunidad del hospedero esto debido a que los probióticos bloquean el efecto de bacterias atógenas por la síntesis de sustancias bactericidas y compiten con el microorganismo patógeno por la adherencia al epitelio gastrointestinal. (Kemgang, *et al.*, 2014)

Parte de estas funciones benéficas se han estratificado en diferentes acciones reguladoras de la respuesta del hospedero, entre ellas la vía metabólica (síntesis de otros componentes), y función homeostática (mantenimiento de la composición de la microbiota intestinal) por un aumento en la resistencia de las células epiteliales que proveen una barrera funcional y estimulan la respuesta protectora mediando las respuestas del epitelio gastrointestinal vía NF- $\kappa$ B (Ashraf, *et al.*, 2014).

Además, las bacterias probióticas (por ejemplo, *Lactobacillus*) son constituyentes de la microbiota natural del intestino y han sido propuestos con efectos potenciales para revertir la disbiosis (desequilibrio de la microbiota) y restaurar la tolerancia hacia la microbiota (Sartor, *et al.*, 2008; Gareau, *et al.*, 2010).

Otra investigación importante de estas acciones también es en el campo inmunológico, al tener un efecto positivo sobre el aumento de la respuesta inmunitaria por su participación en la protección local de la mucosa al competir o antagonizar contra microorganismos patógenos y contrarrestar la disbiosis, así como en la inmunomodulación (Forsythe, *et al.*, 2010; Singh, *et al.*, 2013).

En la inmunomodulación del intestino, la interacción de los probióticos con células presentadoras de antígeno, por ejemplo, dendríticas y macrófagos induce a que secreten citocinas, que regulan la función de células T reguladoras llevando a la inmunomodulación (Figura 2).



**Figura 2.** Importancia de los probióticos en la salud del intestino humano. Los probióticos desarrollan un papel importante en el mantenimiento de la microbiota intestinal, composición, metabolismo e inmunidad. Además, los probióticos disminuyen el riesgo de infecciones y refuerzan la mucosa intestinal

(Singh, *et al.*, 2013)

Las acciones de los probióticos contra la adhesión del patógeno involucran distintas vías, como la competencia de sitios de adhesión en las células epiteliales intestinales. Esta interacción puede activar o no mecanismos de respuesta inflamatoria, a través de la activación de las células inmunitarias como macrófagos y dendríticas. Otros mecanismos incluyen la liberación de bacteriocinas, cambios del pH y la neutralización de toxinas (Kemgang, *et al.*, 2014) (Figura 3).

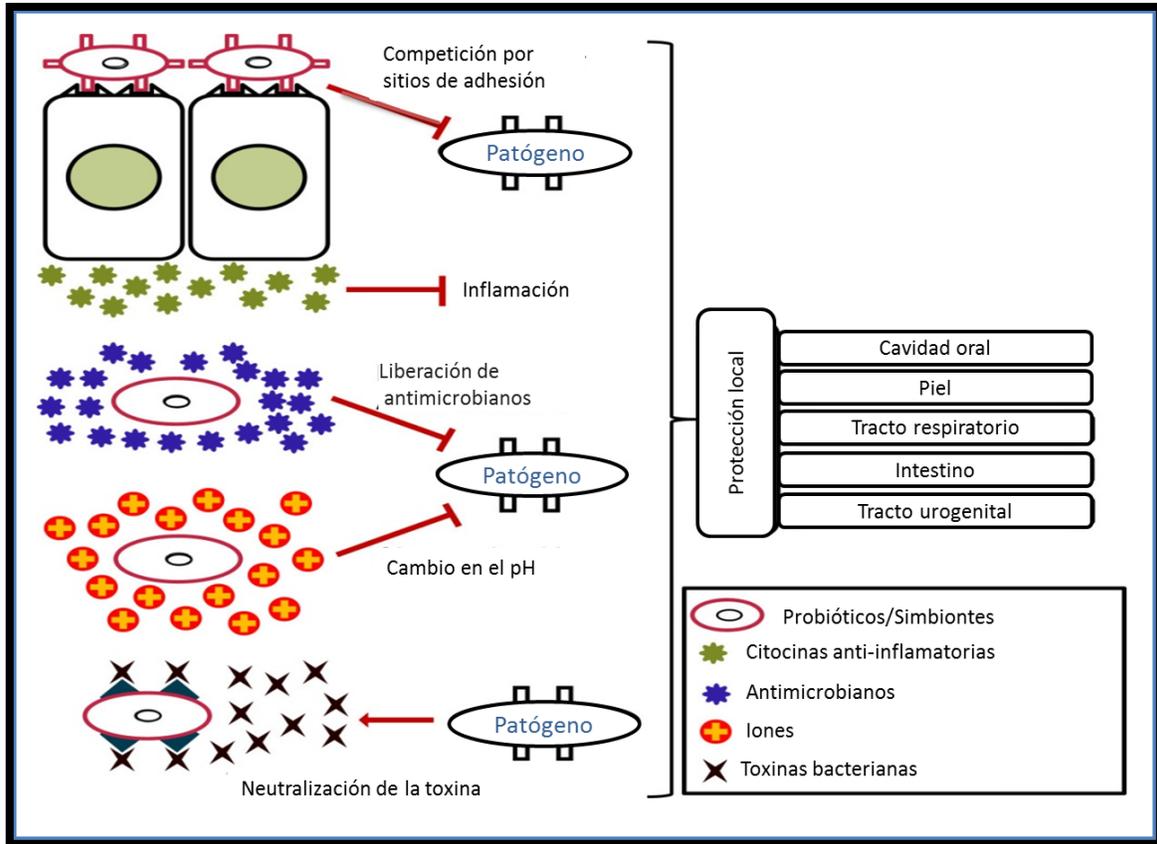


Figura 3. Impacto de los probióticos en la inmunidad de la superficie de la mucosa.

(Singh, *et al.*, 2013)

El potencial inmunomodulador de las bacterias probióticas tiene interés como opción profiláctica y terapéutica en diversos trastornos, que van desde la diarrea a la alergia. Sin embargo, los estudios clínicos y de intervención con probióticos no son universalmente eficaces. La mayoría de la protección por los probióticos se ha asociado a vías respiratorias y gastrointestinales. Por ejemplo, el probiótico conocido como LGG muestra resultados prometedores en la prevención de la enfermedad atópica (Foolad, *et al.*, 2014), el alivio de la diarrea (Guandalini, *et al.*, 2011) y la prevención de infecciones del tracto respiratorio en niños (Hojsak, *et al.*, 2010), mientras los resultados en la enfermedad de Crohn son menos prometedoras (Jiang, *et al.*, 2011; Bonaccorsi, *et al.*, 2016). Claramente, el momento de la aplicación y la

gravedad de las condiciones del hospedero *per se* son factores importantes en la determinación de la eficacia de los probióticos.

Varias de las moléculas inmunomoduladoras de las bacterias probióticas son MAMP's, mismas que pueden interactuar con moléculas como los receptores tipo Toll (TLR's), expresados en células epiteliales (IEC) y células dendríticas (DC) en el tracto gastrointestinal, las cuales parecen ser especialmente importantes en la comunicación entre los probióticos y el hospedero (De Nardo, *et al.*, 2015).

La interacción entre una MAMP y los receptores de PRR en células del hospedero da como resultado la inducción de las cascadas de señalización. Esta respuesta puede incluir la producción de citocinas pro y antiinflamatorias, quimiocinas, moléculas antimicrobianas y factores citoprotectores (Medzhitov, *et al.*, 2007).

Un aspecto relevante de esas interacciones, se encuentra en la pared bacteriana de estas bacterias probióticas, la cual representa una entidad dinámica, integrada de varios componentes como peptidoglicano, polisacárido capsular (CPS), lipoproteínas, y ácidos teicoicos los cuales desarrollan un papel esencial en la modulación de la respuesta inmune (Remus, *et al.*, 2011).

Estudios previos, han analizado el efecto de la elasticidad de la pared bacteriana utilizando microscopía de fuerza atómica (AFM) en las BAL y cepas de bifidobacterias en su papel al sistema fagocítico de células mononucleares (macrófagos). Los autores de este estudio (Mokrozub, *et al.*, 2015) demostraron que existen diferentes grados de elasticidad y rigidez en la pared celular de bacterias lácticas, siendo un factor importante para la síntesis de mediadores inflamatorios como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la síntesis del óxido nítrico (NO) por que los lactobacillus con pared celular más elástica tienen mayor capacidad para acumular metabolitos reactivos de oxígeno que los que tienen una pared celular más rígida.

Por ejemplo, *L. delbrueckii*, sub especie *bulgaris* IMV B 7281, presenta una pared celular más elástica, en comparación a *L. casei* IMV B7280. Estos datos sugieren que las propiedades de inmunoestimulación dependen de la hidrofobicidad y lo por tanto,

es una importante variable a considerar en el efecto biológico esperado de las cepas probióticas (Mokrozub, *et al.*, 2015; Schaer-Zammaretti, *et al.*, 2003).

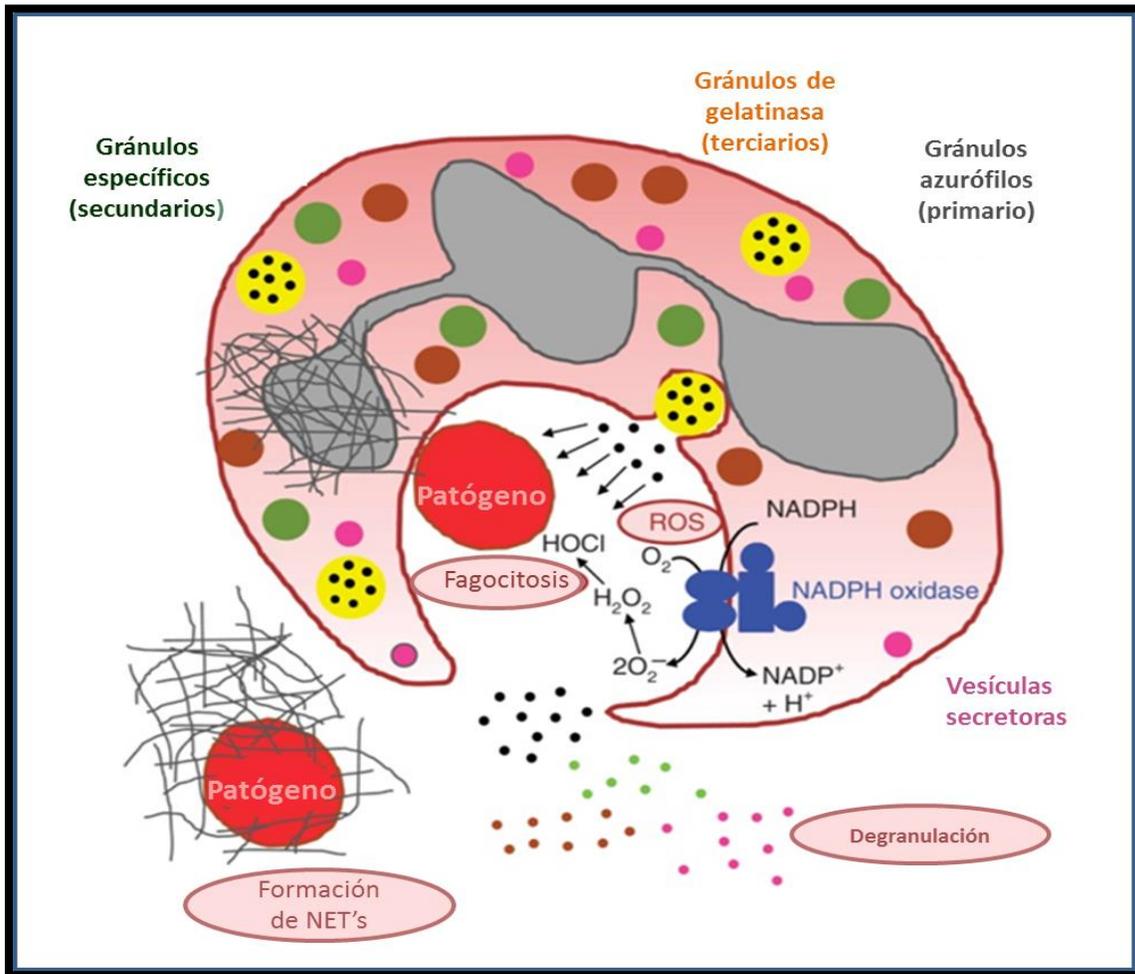
Por otra parte, la interacción del sistema inmune innato y los probióticos también se ha sustentado en la activación y regulación de citocinas pro y antiinflamatorias en distintas células inmunes de ese sistema, principalmente macrófagos, células dendríticas y células NK, con efectos diferenciales a la cepa probiótica empleada. Sin embargo, el impacto de cepas probióticas en otras células de la inmunidad innata como son los neutrófilos es poco conocido.

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN), también comúnmente llamados neutrófilos son de las más abundantes poblaciones de leucocitos de la sangre, integran el 50 a 60 % de los leucocitos circulantes ( $25 \times 10^9$  células). Estas células PMN son componentes críticos de la inmunidad innata que son esenciales en la protección del hospedero contra diferentes microorganismos patógenos y también intervienen en minimizar los efectos nocivos mediados por el daño celular. Las células PMN desarrollan una variedad de funciones antimicrobianas, tal es el caso de la degranulación y la fagocitosis (Sadik, *et al.*, 2011)

Es conocido que los neutrófilos producen en forma masiva grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno y otras moléculas que destruyen efectivamente a los microorganismos patógenos (Fournier, *et al.*, 2012). En el contacto de las células PMN y los microorganismos patógenos, las especies oxidativas son generadas por un estallido respiratorio iniciado por la activación de la NADPH oxidasa; esta enzima está constituida de un complejo multienzimático de proteínas denominadas proteínas phox ensamblado sobre la membrana celular del fagocito (Figura 4).

La activación de la enzima de NADPH oxidasa en el fagocito incluye la generación de varios productos oxidantes (Maghzal, *et al.*, 2012). Los eventos bioquímicos asociados al estallido respiratorio se agrupan en la síntesis inicial de anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los productos intermedios del singlete de oxígeno  $O^2$  y radical hidroxilo (OH), además del sistema de mieloperoxidasa, cuyo sustrato es el peróxido de hidrogeno para la generación del ión hipoclorito. Estas diferentes

reacciones se clasifican como mecanismos microbicidas dependientes de oxígeno, así como dependientes de mieloperoxidasa (ión hipoclorito). Esta última molécula con propiedades altamente oxidantes (Wang, *et al.*, 2015).



**Figura 4.** Leucocitos polimorfonucleares con su contenido de moléculas antimicrobianas. La NADPH oxidasa induce la producción de estallido respiratorio, entre otros mecanismos que se activan como la degranulación y fagocitosis.

( Fournier, *et al.*, 2012)

Otros componentes, antimicrobianos de estas células incluyen diferentes enzimas contenidas en sus gránulos intracelulares, además varias de ellas están definidas como péptidos antimicrobianos (defensinas y catelicidinas), mieloperoxidasa, enzimas

hidrolíticas (lisozima, sialididasas y colagenasas), proteasas (captosina G, aurocidin y elastasa), fosfolipasas catiónicas y quelantes de hierro (lactoferrina), que son liberadas bajo el contacto con microorganismos. Las células polimorfonucleares son capaces también de formar redes extracelulares con función antimicrobiana denominadas NET (trampas extracelulares de neutrofilos).

En los últimos años, las trampas extracelulares (NET's) han sido extensamente investigadas y es notoria su participación en la función microbicida de estas células (Papayannoulou, et al., 2009). Así también, las células PMN son un componente principal del sistema inmune innato y comprenden la primera respuesta en los sitios de inflamación (Sadik, *et al.*, 2011; Amulic, *et al.*, 2012).

Así mismo, la función primaria del sistema innato involucra el reclutamiento de células inmunes a los sitios de infección y su participación en la inflamación. Esta función es modulada por la síntesis de mediadores inflamatorios como las citocinas (moléculas de bajo peso molecular involucradas en la comunicación célula a célula). Las células PMN's, tienen un papel dual, es decir tanto benéfico como nocivo, dependiente de las condiciones intrínsecas del hospedero. Estos papeles, también están presentes durante la inflamación intestinal (Wallace, *et al.*, 2014).

### 2.3 El papel de las células PMN en la inflamación intestinal

La regulación homeostática del intestino es compleja e involucra un fino balance al limitar la respuesta inflamatoria ante un número masivo de bacterias comensales presentes en el lumen. Tres principales componentes contribuyen a la homeostasis intestinal, el epitelio, los microorganismos intestinales y las células inmunes. Las células epiteliales intestinales (IEC) forman una barrera física protectora en contra de la microflora comensal presente en el lumen intestinal, es decir, constituyen la inmunidad constitutiva del sitio.

Existen varios tipos de macrófagos locales, algunos de ellos encargados de la fagocitosis de antígenos y otros que además de las funciones fagocíticas participan en la amplificación de la respuesta.

Durante la inflamación intestinal, los monocitos residentes contribuyen al reclutamiento de neutrófilos a través de síntesis de quimiocinas derivadas de macrófagos. Los neutrófilos presentes en la sangre censan estos gradientes y atraviesan el endotelio vascular y llegan a la lámina propia; este evento se considera parte fisiológica de la respuesta inflamatoria del intestino. Los neutrófilos son reclutados a los sitios de infección en minutos y la respuesta inmune puede alcanzar su máximo entre 24 y 48 horas en situaciones agudas. (Ajuebor, *et al.*, 1999).

Bajo ciertas condiciones fisiológicas o patológicas estas células atraviesan el epitelio dentro del lumen intestinal y liberan moléculas quimioatrayentes, como CAP18, captosina G y azurocidina. Así mismo, el arribo de estas células conlleva al reclutamiento de macrófagos circulantes, como células de la segunda fase de la respuesta inflamatoria. En desórdenes intestinales de etiología compleja, como colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn, los daños al epitelio son notorios, con invasión de bacterias comensales dentro del espacio subepitelial y el reclutamiento masivo de neutrófilos. (Mantovani, *et al.*, 2011).

Sin embargo, la contribución de estas células es controversial; algunos reportes señalan un papel benéfico y otros en deterioro de la enfermedad (Wallace, *et al.*, 2014). Por ejemplo, en modelos de colitis ulcerativa en ratones y de rata la eliminación de neutrófilos aumenta la inflamación sugiriendo a las células PMN con papel benéfico en la colitis.

En contraste, la eliminación de los neutrófilos en ratas, usando anticuerpos contra neutrófilos, no tiene efectos importantes sobre la severidad de inflamación. Por lo tanto, las células PMN'S se han considerado con un pael dicotómico durante la inflamación intestinal (Fournier, *et al.*, 2012).

La función primaria de los neutrófilos en el intestino es la eliminación de patógenos que translocan y atraviesan el epitelio e invaden la mucosa. Estas células contribuyen directamente al reclutamiento de células inmunes por la síntesis de citocinas y mediadores muy potentes involucrados en la respuesta inflamatoria. (Figura 4).

La citocina IL-8 es un potente quimioatrayente secretado a la superficie basolateral de las células intraepiteliales, y por las células PMN activadas de la lámina propia del intestino (Kucharzik, *et al.*, 2005).

Esta citocina también ejerce funciones importantes sobre otros fagocitos, entre ellos monocitos y macrófagos, induciendo la síntesis de otras citocinas proinflamatorias como IL-1 y TNF- $\alpha$ , que pueden regular la activación de la inmunidad innata e inducir señales para la activación de células T cooperadoras (Newton, *et al.*, 2012). La síntesis de citocinas es un importante factor de comunicación intracelular y una vía también en la regulación de los signos clásicos de la inflamación (Akris, *et al.*, 2011; Perobelli, *et al.*, 2015).

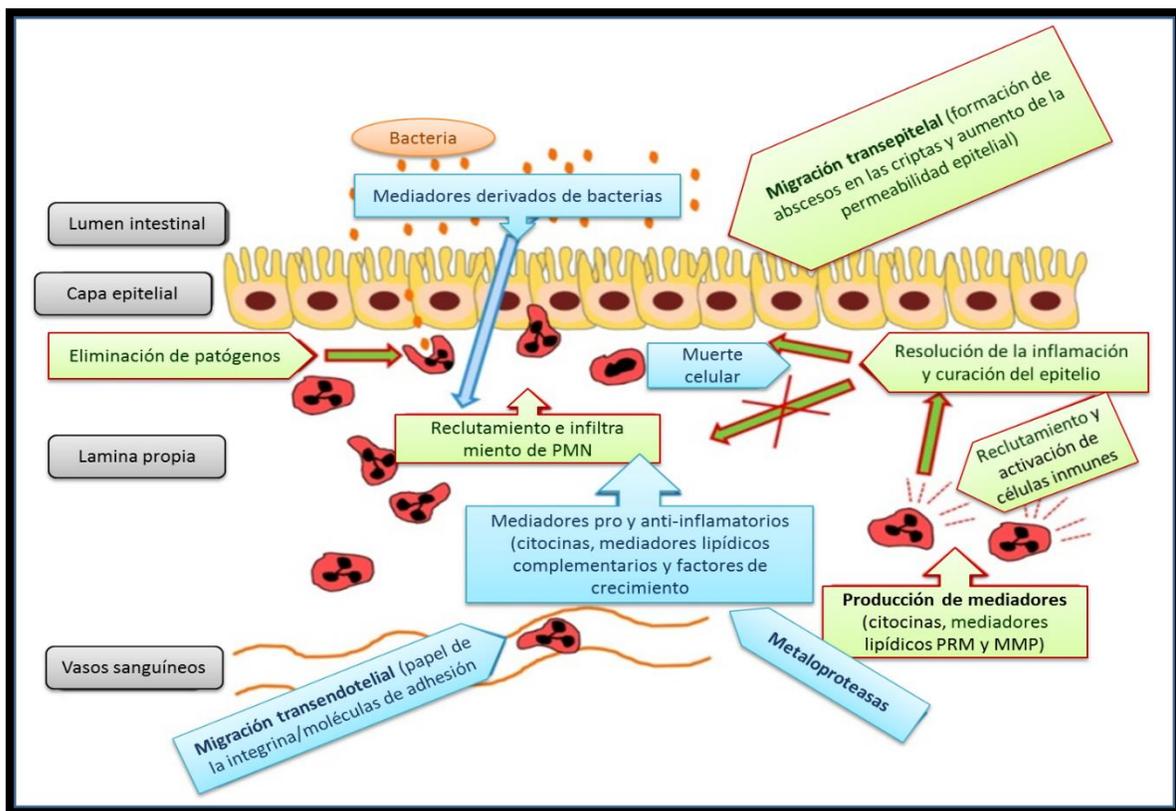
Así mismo, la resolución de la inflamación requiere también de la participación de los fagocitos para remover los detritus del tejido inflamado y restaurar la homeostasis (Serhan, *et al.*, 2008).

Diferentes reportes han documentado la contribución de las células PMN en la biosíntesis de factores de crecimiento, tal es caso del factor del endotelio vascular y mediadores para la resolución de la respuesta inflamatoria, como lipoxinas, resolvinas y protectinas, que facilitan la reparación y cicatrización tisular (Sylvia, *et al.*, 2003).

Las células fagocíticas participan también en la regulación del proceso inflamatorio, llevan a cabo la síntesis de moléculas como leucotrienos, prostaglandinas y la lipoxina A<sub>4</sub> que posee una potente actividad antiinflamatoria inhibidora del reclutamiento de PMN al sitio de inflamación. (Levy, *et al.*, 2001).

Los neutrófilos también son responsables de participar en la biosíntesis de la resolvina E<sub>1</sub> otro mediador anti-inflamatorio, este es un derivado del ácido eicosapentaenoico producido por la vía de la 5- lipoxigenasa (Serhan, *et al.*, 2000). La

resolvina E1, en asociación a otros mediadores como el leucotrieno B4 (LTB4) y el receptor de BLT1 presentes en neutrófilos resultan en una desregulación negativa de la actividad de LTB4 (Arita, *et al.*, 2007). Aunque es claro, la contribución benéfica de los neutrófilos durante la activación de la inflamación respuesta inmune temprana ; también el exceso del reclutamiento y la acumulación de los neutrófilos en el intestino bajo ciertas condiciones patológicas del hospedero como las enfermedades inflamatorias del intestino, pueden tener un papel nocivo a la mucosa intestinal. Sin embargo, el fino balance de la respuesta pro y anti-inflamatoria en los neutrófilos en cooperación con otras células representan una estrategia de regulación y homeostasis del sistema inmune del hospedero (Colgan, *et al.*, 2013).



**Figura 5.** La contribución de las funciones de los neutrófilos. La trans migración de las células polimorfonucleares al epitelio intestinal con lleva a funciones de respuesta inflamatoria temprana, por ejemplo, la producción de citocinas, desarrollando una comunicación estrecha con el epitelio intestinal, sin embargo, también es importante mencionar que la excesiva migración de estas células puede conducir a inflamación intestinal patológica.

(Fournier *et al.*, 2012)

# 3. Antecedentes

*“La ciencia se compone de errores que a su vez son los pasos hacia la verdad”*

Julio Verne

Diferentes estudios han demostrado los efectos biológicos de la modulación de la barrera intestinal y la respuesta inmune por prebióticos y probióticos. Parte de estos efectos incluyen funciones de homeostasis sobre la mucosa intestinal y efectos de activación y regulación de la respuesta inmune en el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT). Además, de otras funciones, entre ellas el aumentar la expresión de mucina y la secreción de moco para estimular la síntesis de péptidos anti microbianos. (Bodera, *et al.*, 2008)

Así también, la transferencia de antígenos por las células M, y la activación de respuestas inmunes relacionadas con inmunidad adquirida como la activación de los linfocitos T citotóxicos, células NK y de células presentadoras de antígeno con producción de citocinas, IL-12 e IL-15 y mantenimiento de la tolerancia por TGF- $\alpha$  e IL- 10 (Hardy, *et al.*, 2013).

En otros estudios, la administración del *Lactobacillus rhamnosus GG* induce aumento de las células productoras de IgA en la mucosa intestinal, liberación local de interferones, y también facilita el transporte y la captura de los antígenos por las células linfoides en las placas de Peyer (Reid, *et al.*, 2003).

Algunas de las cepas bacterianas consideradas como probióticas también pueden influir en los mecanismos inmunitarios innatos, por ejemplo, la fagocitosis. Estudios por Perdigón y colaboradores en 1988, demostraron que *L. acidophilus* y *L. casei* aumentan la capacidad de fagocitosis de macrófagos peritoneales.

Además, se demostró que tienen efecto biológico al aumentar la adherencia de los leucocitos al epitelio (Perdigon, *et al.*, 1988). Otras cepas como *B. lactis* HNO19 también aumentan la fagocitosis de células mononucleares de sangre periférica (Arunachalam, *et al.*, 2000).

*L rhamnosus GG* también tiene efecto en la regulación positiva de la expresión de los receptores de la fagocitosis como CR1, CR3 Fcγ RIII y FcαR en los neutrófilos (Pelto, *et al.*, 1998).

*Lactobacillus casei* Shirota (probiótico de bacterias Gram positivas) induce la producción de citocinas pro-inflamatorias en la línea celular de macrófagos J744 A1 (Cross, *et al.*, 2004).

En otros estudios, LGG posee efectos antitumorales en modelo animal de cáncer de vejiga (Lim, *et al.*, 2002) y la instilación intra-vesical de LGG en el modelo animal de cáncer de vejiga inducen una afluencia significativa de neutrófilos y células dendríticas; y los autores sugieren acciones importantes en la migración de estas células al sitio de infección y posibles mecanismos de activación de estas células que reducen el riesgo a este tipo de cáncer (Seow, *et al.*, 2010).

La respuesta anti tumoral de LGG en este modelo de cáncer de vejiga favorece la expresión de moléculas de MHC clase I y la activación de neutrófilos en una primera fase, aunado a la maduración de células dendríticas en sistemas de cocultivo para generar linfocitos T citotóxicos en contra de las células cancerosas. (Kandasamy, *et al.*, 2011).

Así mismo, LGG favorece la secreción de los antígenos del tumor que activan no solo a los neutrófilos, sino también respuestas inmunes específicas (Kandasamy, *et al.*, 2011).

Estudios recientes sugieren además al LGG con propiedades inmunoregulatoras en la actividad funcional de neutrófilos al ejercer un efecto inhibitorio en la formación de las trampas extracelulares de estas células NET (Vong, *et al.*, 2014). Este mecanismo de acción anti microbicida de estas células, comúnmente conocido como Netosis.

Estos datos proporcionan evidencias de la acción de probióticos, entre ellos LGG en diferentes mecanismos a la inmunidad innata del hospedero. Sin embargo; la contribución de LGG principalmente neutrófilos, es aún controvertido.

## 4. Justificación

*No está en la naturaleza de las cosas que el hombre realice un descubrimiento súbito e inesperado; la ciencia avanza paso a paso y cada hombre depende del trabajo de sus predecesores”*

Sir Ernest Rutherford

Desde 1907, en trabajos reportados por Metchnikoff, se observó que los microorganismos de diferentes géneros y especies habían sido reconocidos como probióticos en humanos y animales con un papel protector multifacético. *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) es uno de los probióticos más estudiados, su efecto positivo se ha demostrado en la prevención de diarrea asociada con antibióticos en niños, así como en la resistencia a la infección de patógenos del tracto gastrointestinal. Sin embargo, los mecanismos inmunes que están involucrados en los efectos biológicos son controversiales. Entender la interacción de esta bacteria probiótica y las células polimorfonucleares y las modificaciones que ocurran en la respuesta inmune derivado de ello, generará información de importancia para su uso como un inmunoestimulante y/o regulador de la respuesta inmune innata principalmente.

# 5. Hipótesis

*“La formulación de un problema, es más importante que su solución”*

Albert Einstein

Si LGG induce la síntesis temprana *in vitro* de IL-8, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  dependiente de la concentración y condición (viable e inactivado) del probiótico entonces también aumenta la actividad bactericida de los PMN al reto *de Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

# 6. OBJETIVOS

*“...las vendas cayeron de mis ojos, las dudas se desvanecieron y una sensación de tranquila certidumbre ocupó su lugar”*

Lothar Meyer

## 6.1 Objetivo general

Analizar el efecto *in vitro* del probiótico comercial liofilizado *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) sobre los mecanismos efectores de células polimorfonucleares (PMN) humanas.

## 6.2 Objetivos específicos

**6.2.1** Evaluar el efecto *in vitro* de LGG en la función oxidativa de leucocitos polimorfonucleares (PMN) mediante un ensayo de quimioluminiscencia.

**6.2.2** Analizar la síntesis de las citocinas proinflamatorias, IL-8, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en leucocitos PMN, estimulados con LGG, por el método de ELISA.

**6.2.3** Establecer el efecto del LGG sobre la actividad bactericida de células PMN retadas con *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

**6.2.4** Conocer la contribución de LGG viable e inactivado (por calor) en las funciones oxidativa, síntesis de citocinas y actividad bactericida de PMN humanos.

# 7. Material y métodos

*“La inteligencia consiste no solo en el conocimiento, sino también en la destreza de aplicar los conocimientos en la práctica “.*

Aristóteles

## 7.1 Cepa probiótica de *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG)

En este trabajo se utilizó una cepa probiótica de *Lactobacillus rhamnosus GG* aislada de un producto comercial (Cápsulas Culturelle®). El aislamiento de la bacteria probiótica fue realizado por el Dr. Mariano García y sus colaboradores del Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, y fue donada para la elaboración de la presente tesis. El producto comercial de Capsulas Culturelle® contiene 5 mil millones de UFC (unidades formadoras de colonias) del probiótico *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG) viable en la presentación liofilizada como se señala en la Figura 6.



Figura 6. El origen de la cepa probiótica utilizada en este estudio (LGG) fue aislada de producto comercial.

## 7.2 Cultivo del probiótico LGG en medio de cultivo MRS

La bacteria probiótica, donada por el grupo del Laboratorio de Biotecnología (Dr. Mariano García Garibay), fue crecida en medio MRS (agar y caldo) a condiciones de pH 5.2 y se incubaron por 18 horas a 37 °C. El paquete bacteriano se cosechó en tubos Eppendorf por centrifugación a 5000 rpm/5 min (Micro centrifuga Eppendorf Centrifuge) y las bacterias se lavaron tres veces con solución salina fisiológica (SSF) bajo las mismas condiciones de centrifugación y el paquete bacteriano obtenido se resuspendió en un volumen de 1 mL de SSF.

Durante la cosecha de esta bacteria probiótica se realizaron tinciones de gram para verificar la morfología de las bacterias y las características de las colonias en crecimiento sobre placas de agar MRS. La tinción de gram se desarrolló de la siguiente manera: se preparó un frotis de la cepa probiótica recién cosechada, dejando secar al aire, posteriormente se adicionó una gota de cristal violeta (al 10 % en etanol/95 %, Merck) durante 1 minuto; después se lavó con agua corriente y se agregó una gota de lugol, dejándola otro minuto y posteriormente se retiró la solución con agua nuevamente. El frotis se decoloró con 2 gotas de alcohol/acetona (50 % v/v) y se enjuagó inmediatamente con agua de la llave para finalmente adicionar safranina por 1 min. Después, se dejó secar y se observó la morfología al microscopio óptico en objetivo de 100X con aceite de inmersión. Las características morfológicas de crecimiento de estas bacterias se muestran en la Figura 7.



**Figura 7.** Características generales de la cepa probiótica LGG (crecimiento en caldo, en placa y tinción de Gram).

### 7.3 Cuantificación de las UFC (unidades formadoras de colonias) en LGG

Las bacterias se crecieron en 4 mL del medio MRS caldo y se incubaron a 37 °C durante 18 horas. El número de bacterias presentes en esta suspensión se analizó por método de dilución en placa, brevemente; las bacterias fueron cosechadas por centrifugación (5000 rpm/5 min), una suspensión ajustada a 1mL fue diluida 1/2 con SSF (500 µL de suspensión bacteriana + 500 µL de SSF). La absorbancia se midió en espectrofotómetro (Gene Quant) a una longitud de onda de 600 nm.

En la cuenta de UFC se realizaron diluciones seriadas en un volumen de 10 mL de SSF, la primera dilución de 1/1000 (10 µL de bacteria + 9 990 µL de SSF), la segunda 1/100 (100 µL de bacteria + 9900 µL de SSF) y la tercera 1/10 (1000 µL de bacteria + 9 000 µL de SSF). De la última dilución se inocularon 100 µL por duplicado en una placa de agar MRS y se dejaron incubar a 37 °C durante 72 h. Después del tiempo de incubación se contaron las colonias crecidas en cada placa y se calcularon las UFC aplicando la fórmula:

$$\frac{(\text{número de colonias})(FD)}{\text{alícuota inoculada}} = \text{UFC/mL}$$

FD=Factor de dilución (inverso a la dilución)

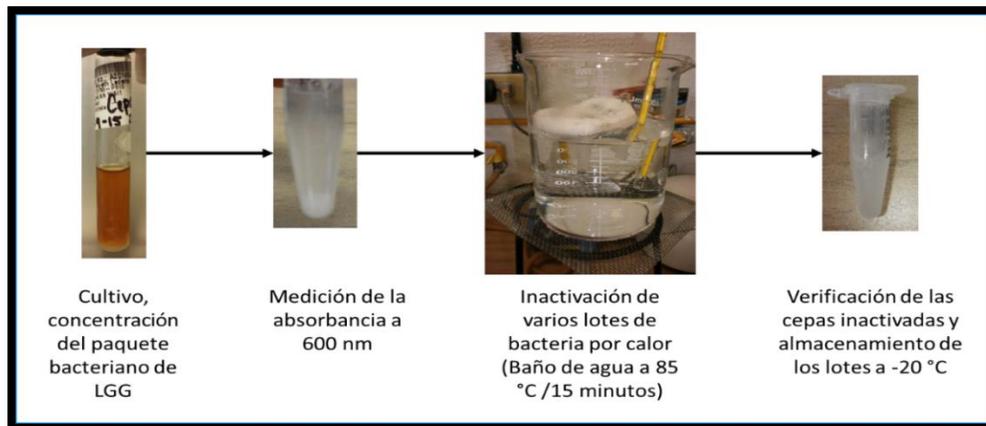
Por ejemplo: En la Tabla 1 se muestran los datos de los cálculos. Obteniendo así una relación de abs/UFC a 1.373 de absorbancia hay 1.625x10<sup>9</sup> UFC del bacilo LGG

<b>Tabla 1. Cálculos de número de UFC de Lactobacillus LGG.</b>			
<b>Absorbancia</b>	<b>Colonias</b>	<b>Promedio</b>	<b>UFC/mL</b>
1.497	88 108	98	9.8x10 <sup>8</sup>
1.373	164 161	162.5	1.625x10 <sup>9</sup>



### 7.3 Inactivación por calor de probiótico LGG

Se realizó un lote previo de probiótico no viable a partir de una resiembra de la cepa de LGG crecida en caldo MRS. La inactivación de la bacteria probiótica se realizó por tratamiento de calor, en un baño de agua a 85 °C durante 15 min (Figura 8).



**Figura 8.** Inactivación por calor de cepa probiótica LGG\* Se prepararon lotes de bacterias probióticas inactivadas en un solo paso para todos los ensayos de estimulación de las células polimorfonucleares. Estos lotes fueron almacenados en alícuotas suficientes de acuerdo al diseño experimental programado.

Así mismo, la verificación de la bacteria inactivada se realizó a través de resiembras en placas de medio MRS por duplicado, las cuales se incubaron a 37 °C por 48 h.



**Figura 9.** Crecimiento en placa de LGG viable y LGG inactivado por calor

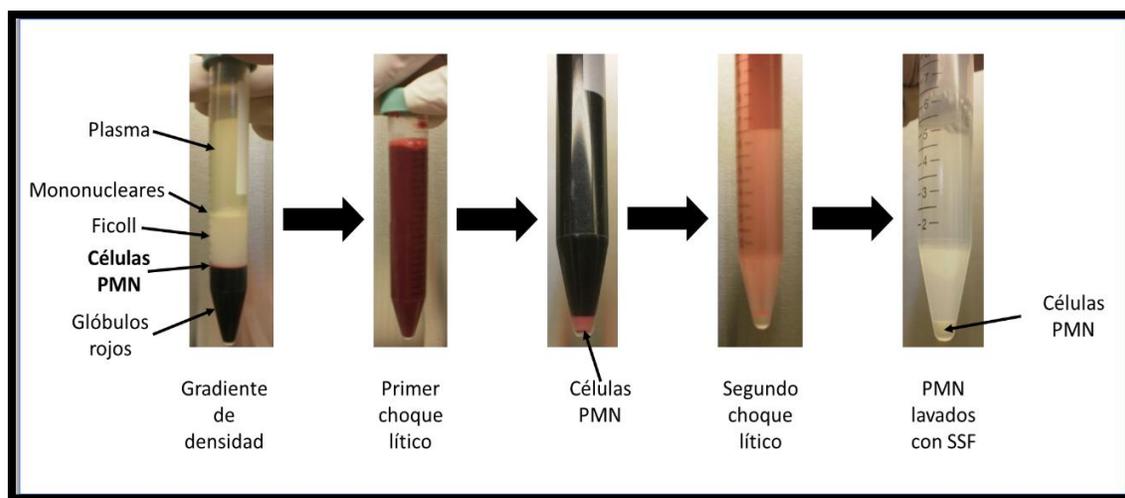
En los diferentes ensayos realizados con la cepa de LGG no viable se prepararon alícuotas en volúmenes de 1 mL, las cuales se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta su uso.

## 7.5 Obtención de células polimorfonucleares (PMN) de sangre periférica humana

Se obtuvieron concentrados leucocitarios del Banco de Sangre del Hospital Infantil de México, Federico Gómez, de donadores clínicamente sanos. La sangre se diluyó 1/2 con SSF (25 mL de sangre + 25 mL de SSF), homogenizando lentamente en un tubo de 50 mL.

Posteriormente, 10 mL de la sangre diluida se adicionaron lentamente sobre un tubo de 15 mL cónico estéril, conteniendo 3 mL del gradiente Lymphoprep, con ayuda de una pipeta Pasteur. Esta preparación fue centrifugada a 2500 rpm durante 25 min (Centrifuga Universal 32R. hettich Zentrifgen) a 22 °C. En condiciones de arranque y freno mínimos para mantener las condiciones óptimas del gradiente. Después de la centrifugación se retiraron con ayuda de una pipeta las fases formadas del gradiente (Figura 10).

Estas corresponden al plasma, plaquetas, células mononucleares (interfase) y el gradiente de Lymphoprep junto a la banda de células polimorfonucleares y el paquete de glóbulos rojos.



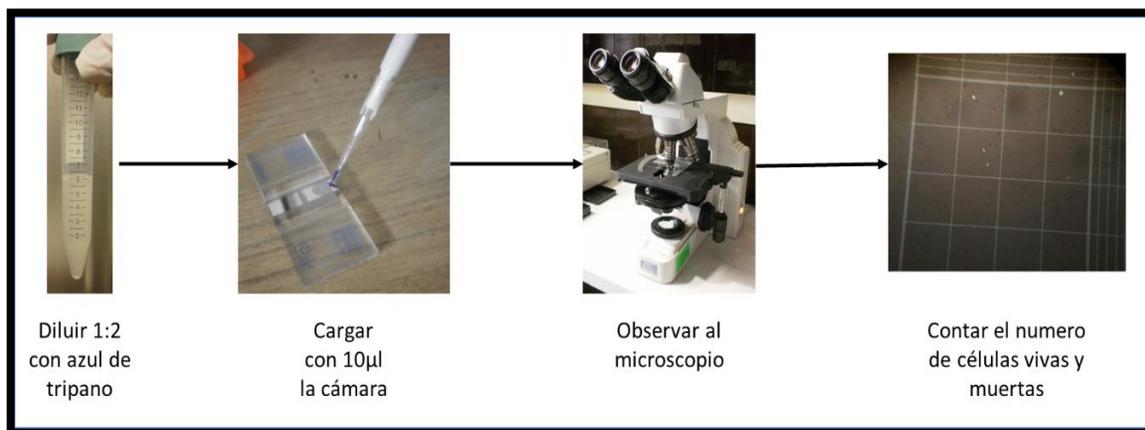
**Figura 10.** Obtención y purificación de células PMN de sangre periférica humana.

La purificación de las células polimorfonucleares (neutrófilos) se llevó a cabo por la eliminación de eritrocitos mediante tratamientos con 10 mL de solución lítica (ver anexo) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las células obtenidas fueron centrifugadas a 1500 rpm/10 min a temperatura ambiente.

El sobrenadante se retiró y el paquete celular fue tratado con un segundo choque lítico, bajo las condiciones ya descritas. El paquete celular obtenido (PMN) fue lavado con 6 mL de SSF, homogenizando lentamente con una pipeta Pasteur y nuevamente centrifugado a 1500 rpm/5 min (con condiciones máximas de arranque y de frenado). Finalmente, el paquete celular de PMN se resuspendió en 4 mL de SSF (concentrado de células PMN).

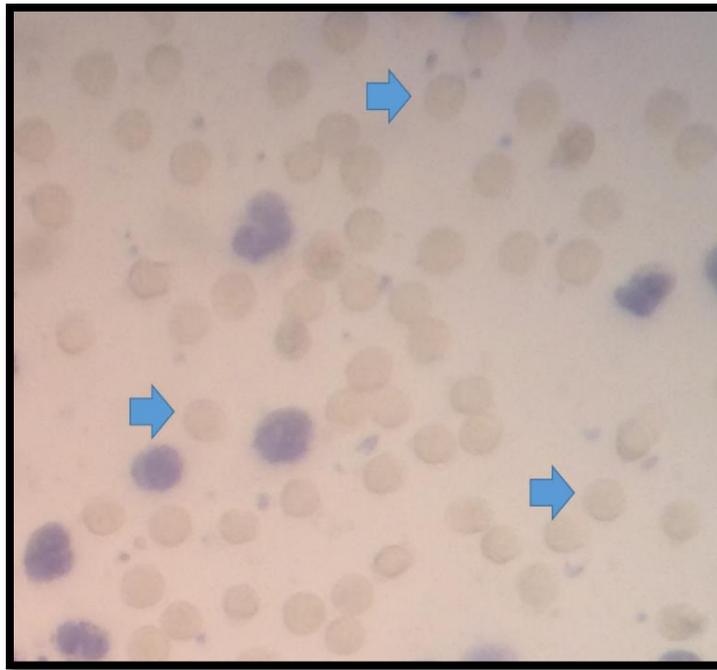
## 7.6 Determinación de la viabilidad de células PMN

Después de la obtención de los PMN se evaluó la viabilidad de estas células en la cámara de Neubauer a partir del concentrado de células PMN (Figura 11).



**Figura 11.** Determinación de viabilidad de células PMN a través de la exclusión del colorante de azul de tripano. Las células se contaron en el cuadrante de células blancas en la cámara de Neubauer.

Esta determinación se realizó en una dilución de las células 1/2 (10 µL del stock de células PMN + 10 µL de azul de tripano) con azul de tripano al 4 % (GIBCO). 10 µL de la suspensión, se colocaron para llenar la cámara. El conteo se realizó en uno de los cuadrantes, visualizando (figura 12) el total de células vivas (refringentes) y el total de células muertas (azules).



**Figura 12.** Viabilidad de células PMN. Análisis de las células en microscopio simple en objetivo de 100 x con aceite de inmersión, la flecha indica las células viables que excluyen el colorante de azul de tripano, en donde hay ausencia de la coloración azul, característica de las células muertas.

La viabilidad se expresó en %, determinado por la siguiente fórmula:

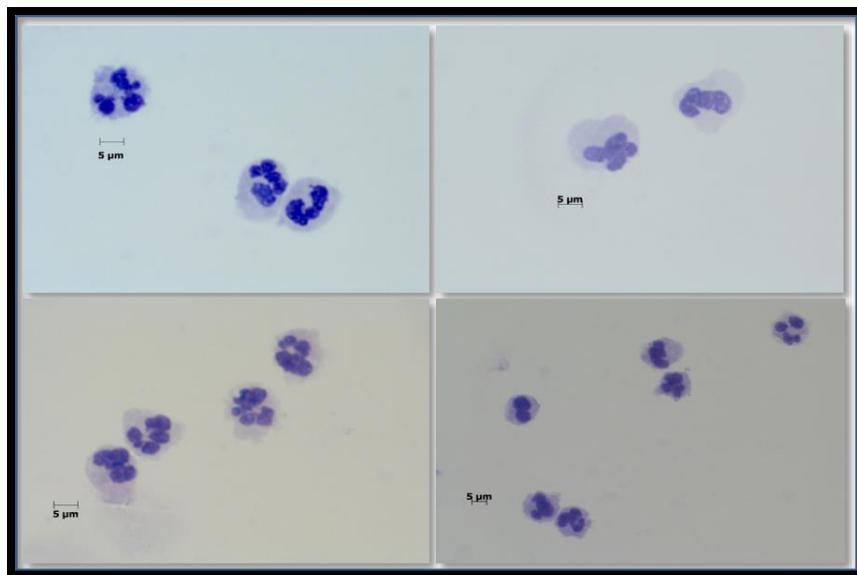
$$\left( \frac{\text{células vivas}}{\text{células vivas} + \text{células muertas}} \right) (100) = \% \text{ de viabilidad}$$

## 7.7 Cuantificación de células PMN

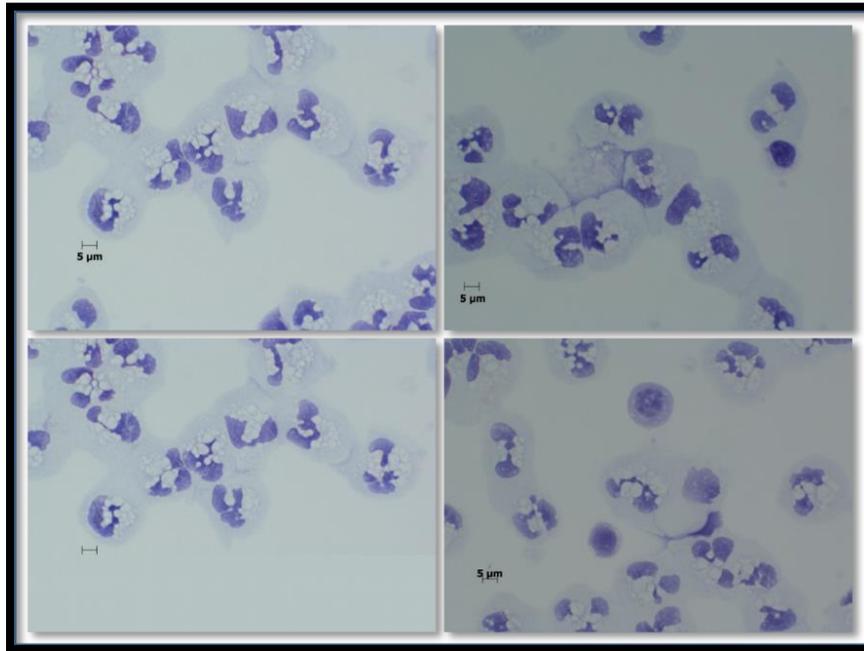
Al mismo tiempo, también se realizó un conteo del total de PMN obtenidos utilizando el otro compartimento de la cámara de Neubauer. Los PMN se diluyeron 1/5 con líquido de Turk (10  $\mu$ L del concentrado de PMN + 40  $\mu$ L de líquido de Turk) y de esta dilución se tomaron 10  $\mu$ L para llenar la cámara, la cual fue observada en microscopio óptico (Ver anexo). El número total de células se determinó por la siguiente fórmula:

$$\left( \frac{\text{número de células}}{\text{número de cuadrantes}} \right) (\text{volumen de suspensión}) (\text{factor de dilución}) (\text{factor de la cámara}) = \text{número de células/mL}$$

Durante el proceso de purificación de las células polimorfonucleares se realizaron tinciones de Wright (Figuras 13 y 14) para visualizar la morfología típica de estas células, por preparación de diferentes frotis en portaobjetos, así mismo se realizaron centrifugaciones en cytopspin de las células para varios de los experimentos realizados en esta tesis. La mayoría de las células por morfología corresponden a más del 95 % de neutrófilos.



**Figura 13.** Análisis morfológico de las células PMN teñidas con Diff-Quik (Wright modificado).



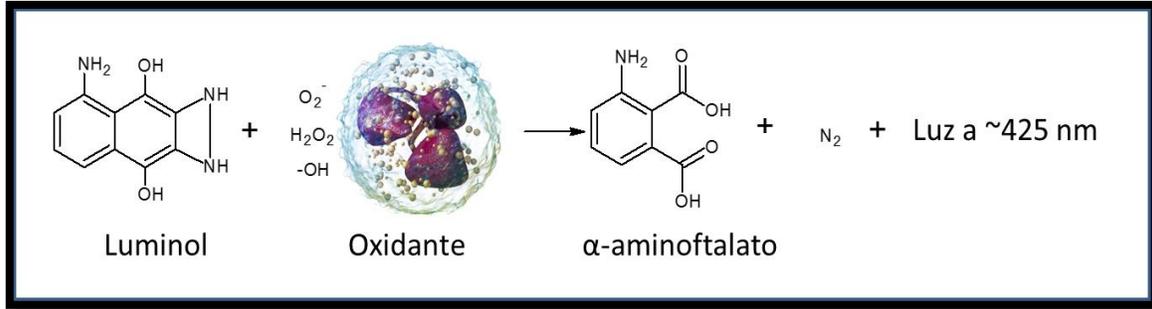
**Figura 14.** Neutrófilos purificados de sangre periférica humana. La morfología también se visualizó por frotis preparados en centrifuga de cytopsin, las laminillas fueron teñidas por colorante de Diff-Quik (Wright modificado). En estas microfotografías se puede observar las características del núcleo multilobulado de los neutrófilos en una forma de célula aplanada

### 7.8 Evaluación del estallido respiratorio (función oxidativa) de leucocitos PMN por el método de quimioluminiscencia

La evaluación de la actividad oxidativa se realizó a través de la medición de la síntesis de ROS, en las células PMN mediante el método de quimioluminiscencia amplificada con luminol (Sigma).

La solución amplificadora se preparó en forma fresca a un stock de una concentración de  $0.8 \times 10^{-4}$  M en HBSS (ver anexo).

La respuesta quimioluminiscente amplificada con luminol queda establecida en la siguiente reacción:



**Figura 15.** La interacción de luminol con las especies reactivas de oxígeno durante el estallido respiratorio

En el protocolo del ensayo de quimioluminiscencia las células PMN fueron ajustadas a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL en la mezcla de reacción (luminol, Hank's) con diferentes relaciones de LGG viable e inactivado por calor ( $2 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  y  $2.5 \times 10^8$  UFC). Al mismo tiempo se preparó el control positivo (zymosán opsonizado) y negativo (PMN/HBSS) como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Preparación de tubos de reacción para medición de ROS.**

	Control negativo	Control positivo	Muestra LGG viable	Muestra LGG no viable
<b>HBSS</b>	800 µL	700 µL	700 µL	700 µL
<b><math>2 \times 10^6</math> cel/mL</b>	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
<b>Luminol</b>	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
<b>Zymosán</b>	-----	100 µL	-----	-----
<b>LGG viable</b>	-----	-----	100 µL	-----
<b>LGG no viable</b>	-----	-----	-----	100 µL
<b>Volumen total</b>	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL

Los tubos preparados se colocaron inmediatamente en un equipo de luminómetro (LKB-1251) el cual fue programado como se indica en la tabla 3.

**Tabla 3. Programa de luminómetro.**

<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

Este equipo contiene un sistema fotomultiplicador que convierte los fotones liberados en unidades de corriente eléctrica, de tal forma que la quimioluminiscencia es expresada en mini volts (MV) por número de células.

## 7.9 Estimulación de PMN con LGG

Posteriormente se realizó una interacción de las células con *Lactobacillus*, por un ensayo de estimulación *in vitro*, que se llevó a cabo en placas de 24 pozos a concentración de  $2 \times 10^6$  PMN/500  $\mu$ L por pozo en medio RPMI-1640/5 % SFB.

Después se adicionaron 50  $\mu$ L de *Lactobacillus* inactivados por calor y viables en concentraciones de  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^7$  UFC, se dejaron incubar a 37 °C en atmosfera de CO<sub>2</sub> durante 24 horas; transcurrido el tiempo de incubación se recogió el medio de los pozos y se colocó en tubos Eppendorf e inmediatamente se centrifugó 5000 rpm/5 min. El sobrenadante se guardó a -20 °C hasta su uso para la determinación de la síntesis de citocinas.

## 7.10 Evaluación de la síntesis de citocinas pro inflamatorias (IL8, IL1 $\beta$ y TNF $\alpha$ ) en células PMN por el método de ELISA

La síntesis de citocinas proinflamatorias se evaluó por el método de ELISA de las siglas en inglés (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) utilizando un kit comercial OPTEIA PHARMINGEN, San Diego CA, USA. El protocolo fue de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

La técnica de ELISA se realizó sensibilizando una placa de 96 pozos (poliestireno de alta adherencia) de fondo plano. A cada pozo se adicionaron 100  $\mu$ L del anticuerpo de

captura de la citocina a cuantificar. Este anticuerpo fue diluido en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.2 en una dilución de 1/250 y se dejó incubar toda la noche a 4° C. Al día siguiente y antes de cada adición del anticuerpo de captura, detección y conjugado, se realizaron lavados mediante la utilización de un lavador de ELISA (Plate Washer modelo A1) de acuerdo al protocolo indicado en la tabla 4:

**Tabla 4. Parámetros del programa de lavador de ELISA (Das).**

<b>SELECT DEL PROGRAM</b>	<b>MEMORY</b>	<b>MENÚ</b>
<b>Starting strip</b>		01-12
<b>Number of strip to washing</b>		01-12*
<b>Liquid volumen</b>		300 µL
<b>Plate managenent</b>		Wash
<b>Strip washing cycles</b>		01-12*
<b>Strip empty</b>		Yes-no
<b>Strip washing delay</b>		30 s
<b>Number of cycles</b>		01
<b>Plate starting</b>		0-1 min
<b>Plate incubation</b>		0-1 min
<b>Sabe parameter</b>		Yes-no
<b>Insert plate</b>		Yes
<b>Run</b>		Yes

\*El número de lavados se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones del inserto para cada una de las citocinas

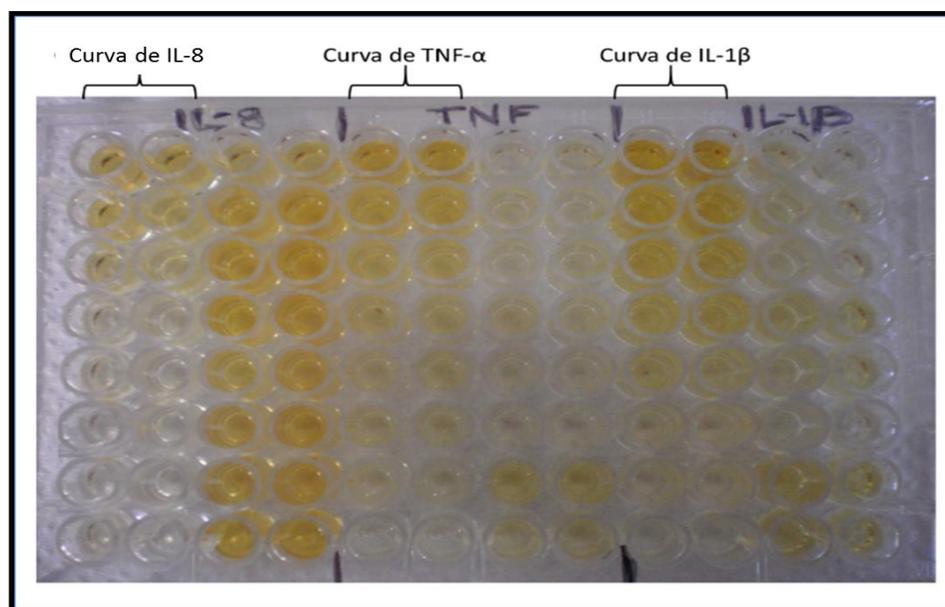
Brevemente, después del tratamiento de la placa tratada con el anticuerpo de captura se lavó tres veces con solución de PBS/Tween 20 al 0.05 %. Después se agregaron 200 µL de la solución diluyente (PBS/SFB 10 %, pH 7.0) dejando incubar 1 hora a temperatura ambiente y después se realizaron tres lavados. Se agregaron 100 µL del Rh (recombinante humano) de la citocina (IL-8, IL-1β y TNF-α) o 100 µL de la muestra colocados por duplicado y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente, los pozos fueron lavados 5 veces y se les adicionó el anticuerpo de detección en la dilución indicada (Tabla 5) para cada citocina, por 1 hora a temperatura ambiente.

Tabla 5. Especificaciones de los insertos.					
Citocina	Concentración del Rh	Concentración inicial de la curva	Dilución del anticuerpo de captura	Dilución del anticuerpo de detección	Dilución del conjugado
<b>IL-8</b>	110 ng/mL	200 pg/mL	1/250	1/250	1/250
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	74 ng/mL	500 pg/mL	1/250	1/500	1/250
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	34 ng/mL	250 pg/mL	1/250	1/500	1/250

Finalmente se adicionaron 100  $\mu$ L del sustrato revelador TMB (BD/Pharmingen, San Diego, CA, USA) por 30 min, protegidas de la luz a temperatura ambiente, la reacción fue detenida por la adición de 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (Figura 16).

Las absorbancias de reacción fueron leídas en un lector de ELISA (Thermo Scientific Multiskan FC microplatephotometer, Multiskan F C3.0) a una longitud de 450 nm. Determinando la concentración de las citocinas a través de la interpolación de las lecturas en la curva patrón (Figuras 17, 18 y 19).



**Figura 16.** Placa de Elisa con curvas (IL-8, TNF- e IL-1 $\beta$ ) y las muestras de las citocinas analizadas. El revelado de la placa se realizó con una solución de sustrato TMB. El esquema representa uno de los cuatro ensayos experimentales realizados.

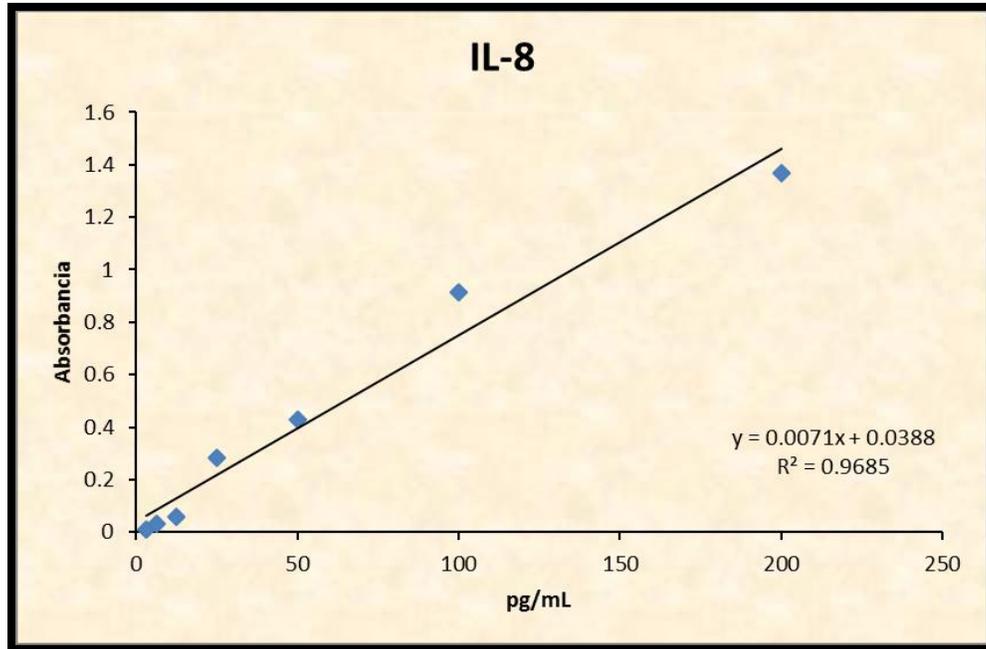


Figura 17. Curva estándar de IL-8.

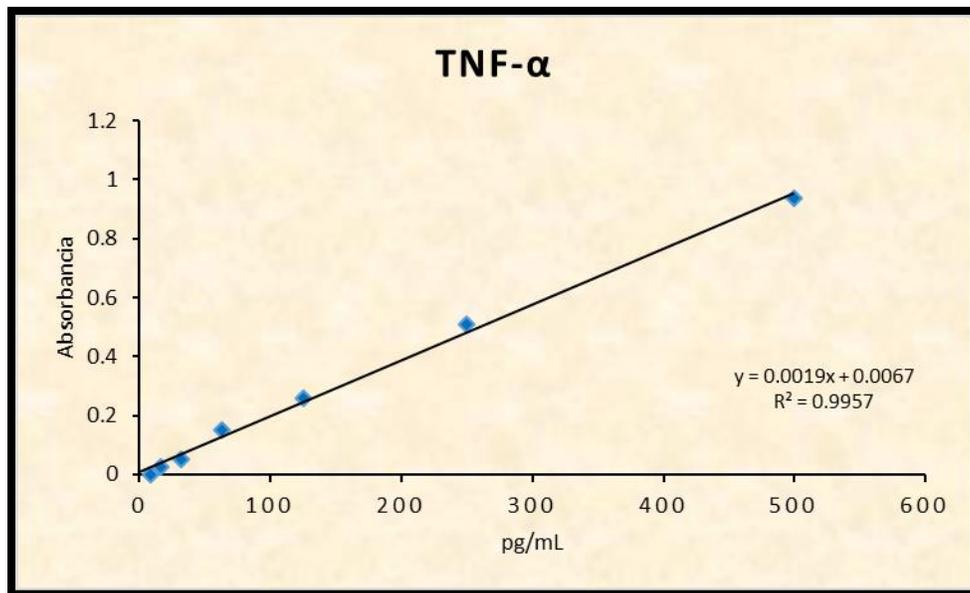


Figura 18. Curva estándar de TNF-α.

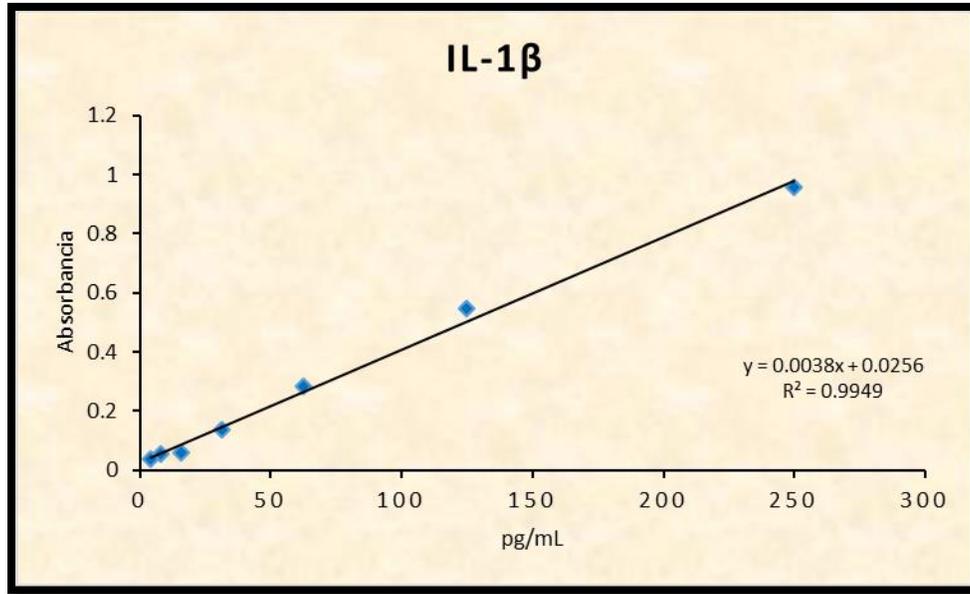


Figura 19. Curva estándar de IL-1 $\beta$ .

### 7.11 Análisis de actividad microbicida de polimorfonucleares retados con *S. aureus* y *E. coli*

Se analizó la actividad microbicida de los polimorfonucleares retados con *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 35128. Previamente las bacterias patógenas se resembraron en 4 mL de caldo soya tripticaseína por 18 horas (para el caso de *S. aureus*) y 4 horas (*E. coli*) y se incubaron a 37 °C. Después, cada bacteria fue lavada 3 veces por centrifugación a 5000 rpm/5 min. Las bacterias fueron cuantificadas en un espectrofotómetro (Quant-gene) a una longitud de 550 nm. Posteriormente, se realizó una opsonización del concentrado de bacterias a  $1 \times 10^8$  UFC/ mL de cada bacteria con pool de suero humano por 30 min a 37 °C.

Por otra parte, las células PMN ajustadas a  $1 \times 10^6$  fueron incubadas con LGG en una relación de 1:10 (célula: bacteria), tanto con la bacteria láctica viable e inactivada por calor, durante una hora en baño maría con agitación constante a 37 °C. Posteriormente se adicionaron las bacterias opsonizadas en relación 1:10 de cada

bacteria patógena (*S. aureus* y *E. coli*) durante 60 minutos, en las condiciones arriba señaladas. Se prepararon alícuotas de la interacción en los tiempos de 0 y 60 minutos. Así mismo, la actividad microbicida fue determinada por la cuenta de unidades formadoras de colonias por el método de dilución y conteo en placa para cada una de las bacterias ensayadas. A la par, se prepararon testigos negativos sin previa incubación con bacteria probiótica. Los experimentos se realizaron en muestras por duplicado en un total de tres experimentos.

#### 7.12. Análisis estadístico

Para establecer las diferencias de las células tratadas con los diferentes estímulos y las no estimuladas, se aplicó la prueba no paramétrica de Wilcoxon en los ensayos de la producción de ROS (picos de quimioluminiscencia), producción de citocinas y actividad microbicida. Las diferencias se consideraron significativas a una  $p < 0.05$ .

# 8. RESULTADOS

*“Lo importante en la ciencia no es tanto obtener nuevos datos, sino descubrir nuevas formas de pensar sobre ellos.”*

William Lawrence Bragg

## 8.1 Actividad oxidativa de células polimorfonucleares (quimioluminiscencia) en respuesta a la bacteria *Lactobacillus rhamnosus GG* viable y no viable

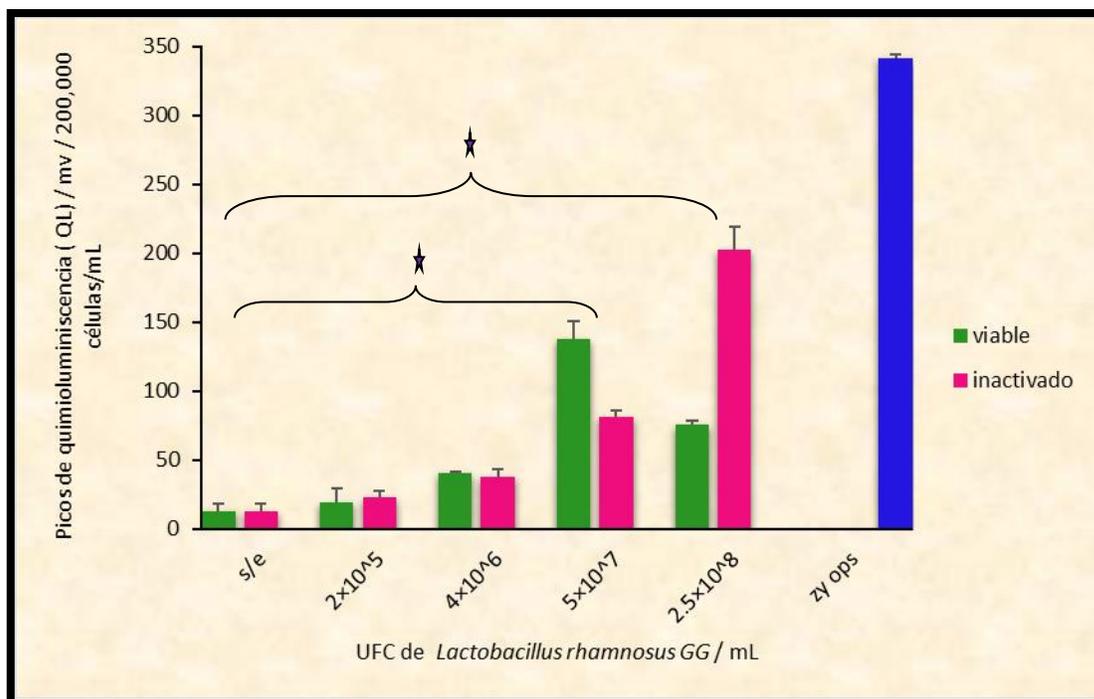
La producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) por las células PMN fue evaluada en un modelo *in vitro*, usando la emisión de luz amplificada con luminol (quimioluminiscencia). Esta emisión es producida como resultado de la liberación de las especies oxidativas principalmente ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) producto de la activación de las células PMN en respuesta a un estímulo específico. El análisis de la capacidad del bacilo de LGG de inducir la síntesis de los ROS se muestra en la Figura 20.

Las células PMN estimuladas con LGG viable indujeron una señal por arriba de los niveles de las células sin estímulo ( $138.11 \pm 12.58$  vs  $12.58 \pm 5.73$  mV/mL). Así mismo después de la adición de LGG no viable ( $202.35 \pm 16.56$  mV). En ambas condiciones del bacilo viable y no viable, los niveles de los picos de quimioluminiscencia obtenidos fueron dependientes a la concentración del bacilo.

El efecto estimulante máximo a la respuesta oxidativa al bacilo viable fue alcanzado con  $5 \times 10^7$  UFC bajo estas condiciones experimentales de estudio, a diferencia de un logaritmo de concentración en el caso de LGG no viable (Figura 20).

En contraste, concentraciones menores de  $2 \times 10^5$  UFC tanto de LGG viable y no viable indujeron picos menores de respuesta oxidativa con valores de ( $18.81 \pm 10.65$  y  $22.53 \pm 5.1$  mV/ $2 \times 10^5$  células/mL) respectivamente. La respuesta oxidativa con LGG no viable fue mayor comparada al LGG viable ( $202.35 \pm 16.56$  mV/mL vs  $138.11 \pm 12.58$  mV/mL).

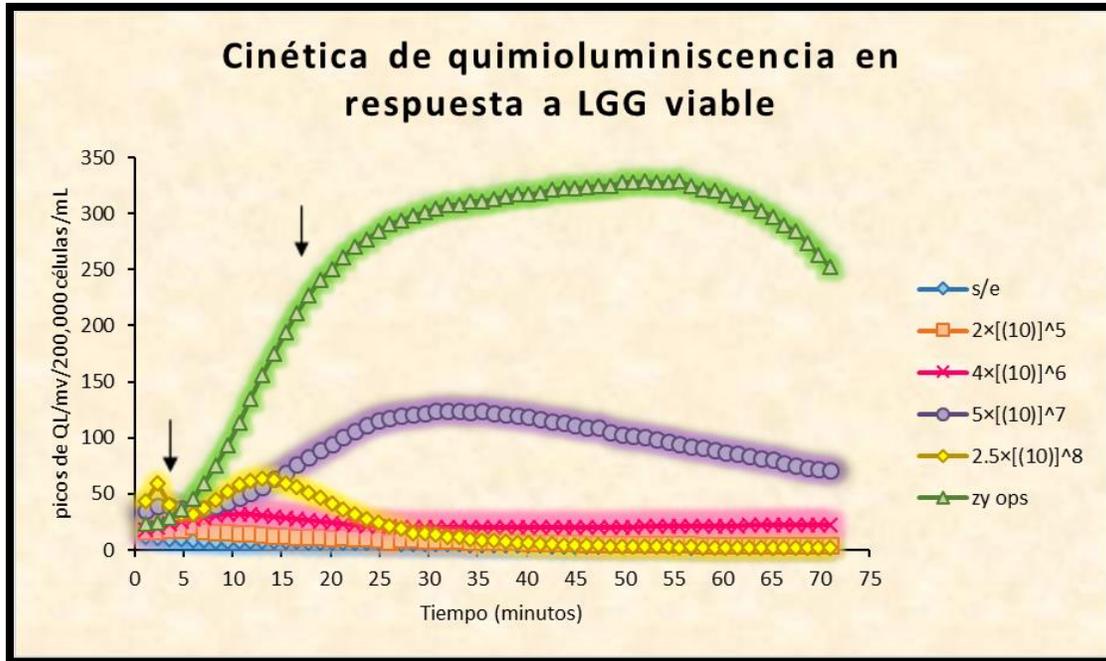
Por otro lado, los niveles de respuesta oxidativa fueron comparados a los picos de quimioluminiscencia inducidos por Zymosán (un testigo positivo, y molécula ligando al receptor de TLR2). Dicho estímulo, produjo una señal de quimioluminiscencia 2.4 veces mayor ( $341.15 \pm 2.77$  mV) al obtenido con LGG viable ( $138.11 \pm 12.58$  mV) y 1.6 veces ( $202.35 \pm 16.56$  mV/mL) mayor a LGG no viable (Figura 20).



**Figura 20.** Síntesis de estallido respiratorio (quimioluminiscencia) por células PMN estimulados con LGG viable e inactivado. PMN en HBSS-luminol fueron puestos en contacto directo con LGG viable e inactivado e inmediatamente colocadas para su corrida en un luminómetro LKB-1251. Los valores representan cuatro experimentos realizados en muestras por duplicado.

\*( $p < 0.05$ ) células PMN tratadas con LGG viable y no viable vs células PMN sin tratamiento

Además, de los picos de quimioluminiscencia, también se analizó el tiempo de aparición de las respuestas oxidativas al estímulo de LGG a través de las curvas de quimioluminiscencia obtenidas bajo el protocolo descrito en material y métodos. Las extensiones del área bajo la curva nos muestran que la máxima respuesta oxidativa se alcanzó en tiempos cortos de estimulación (respuesta temprana) entre 12 y 30 minutos de adicionado el estímulo (Figura 21).



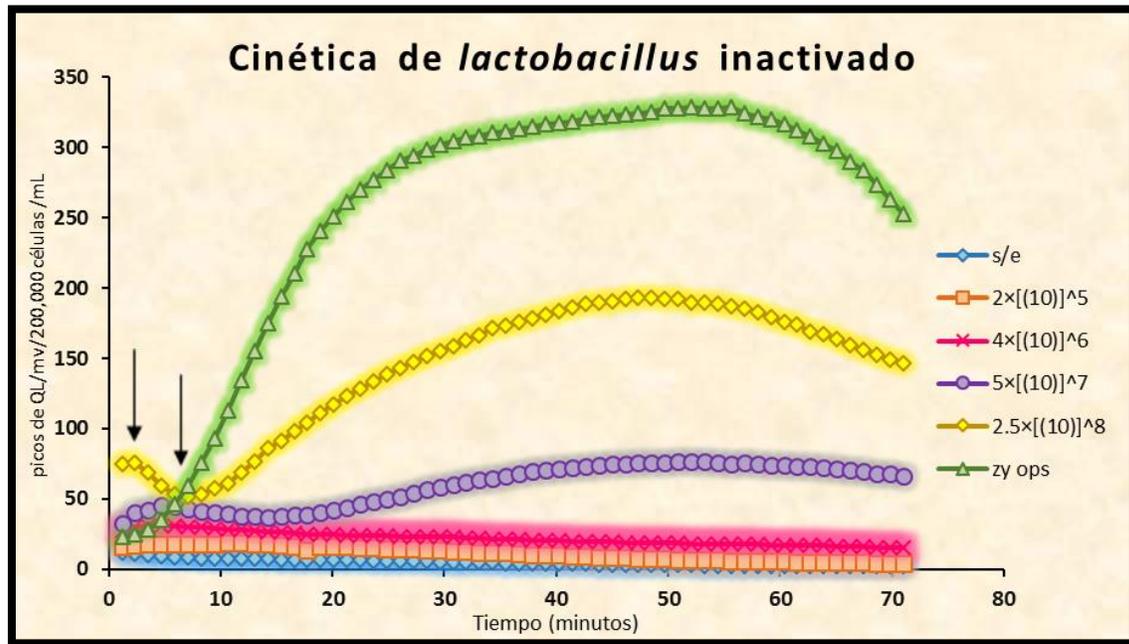
**Figura 21.** Análisis de la cinética de producción oxidativa de células PMN inducida por *Lactobacillus rhamnosus* GG viable. Los PMN ( $2 \times 10^5$  células/mL) fueron colocados en celdas de polipropileno en solución de HBSS-luminol en diferentes concentraciones de bacteria e inmediatamente introducidas al luminómetro LKB-1251. La flecha indica el inicio de la síntesis de ROS. Los valores representan cuatro experimentos realizados en muestras por duplicado.

Así mismo, las células tratadas con LGG viable a la concentración de  $2 \times 10^8$  UFC/mL comienzan la producción de ROS desde los primeros minutos (un promedio de 5 min) las extensiones de las curvas se producen en máximo de 60 minutos de adicionado el estímulo (Figura 21).

La cinética de quimioluminiscencia del bacilo viable comparado a las concentraciones bajas ( $2.5 \times 10^8$  UFC/mL) es muy corta y rápida entre 5 y 25 minutos a diferencia de concentraciones de ( $5 \times 10^7$   $4 \times 10^6$  y  $2 \times 10^5$  UFC/mL) con tiempos más tardíos de 10 min.

En contraste la cinética de la respuesta oxidativa a Zymosán (un testigo positivo) se observó en forma tardía entre los 40 y 50 minutos de adicionado el estímulo, la extensión de la respuesta es lenta, se sostiene por mucho mayor tiempo; y tarda más en retornar al estado basal. (Figura 21).

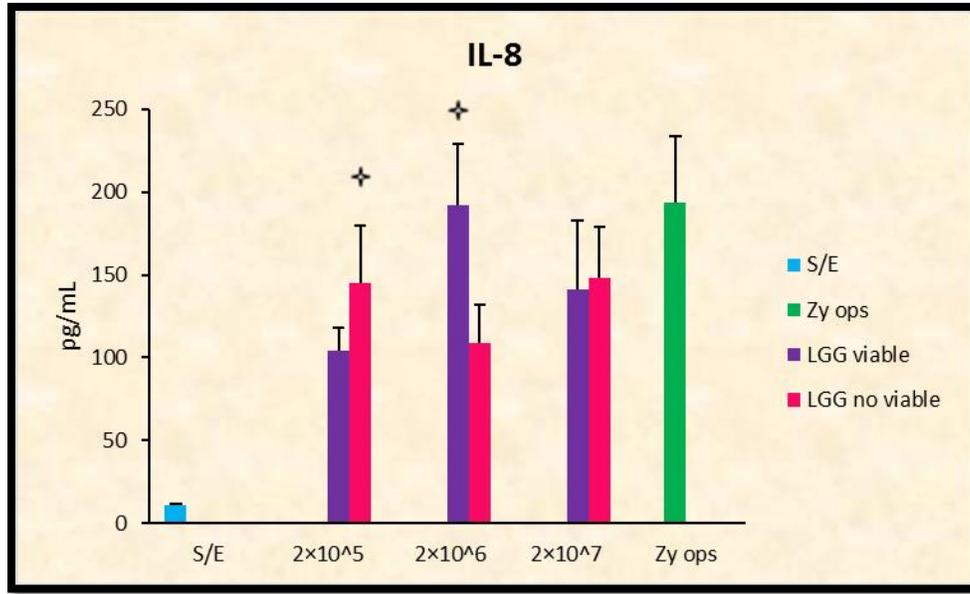
Por otra parte, la cinética de quimioluminiscencia a la respuesta de LGG no viable resulta muy similar al estímulo de bacilo viable, iniciándose la respuesta oxidativa también en los primeros minutos con extensiones de la curva entre 10 y 70 minutos (Figura 22).



**Figura 22.** Análisis de la cinética de producción oxidativa de células PMN inducida por *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivado. Células PMN  $2 \times 10^5$ /mL fueron colocadas en celdas de polipropileno en solución de HBSS-luminol con diferentes concentraciones de LGG inactivado por calor (15min a  $85^\circ\text{C}$ ) e inmediatamente introducidas en el luminómetro LKB-1252. Los valores representan cuatro experimentos realizados en muestras por duplicado.

## 8.2 Producción de IL-8, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ inducidas por LGG viable y no viable en células PMN

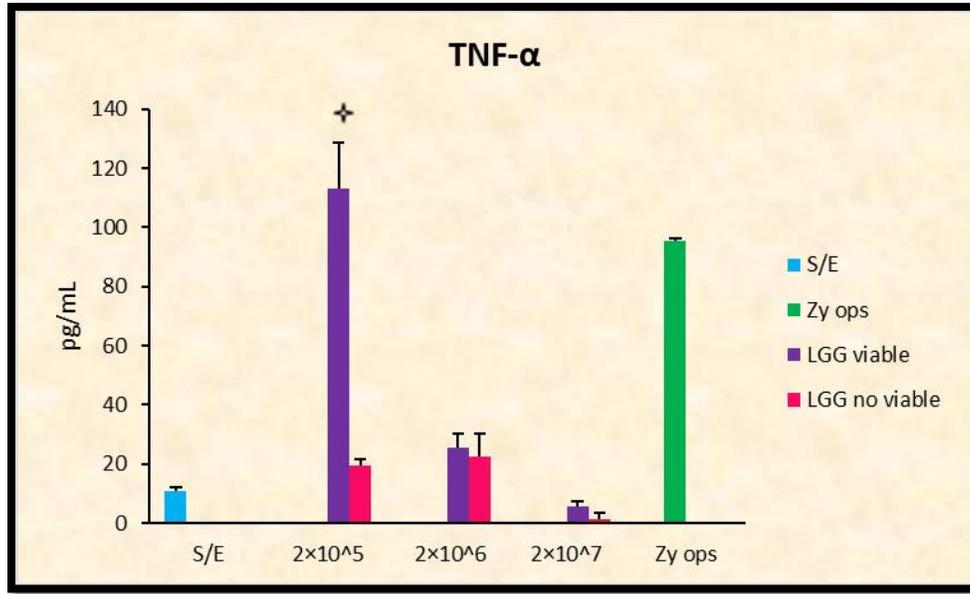
Como parte del análisis de la respuesta inmune innata se evaluó la síntesis de citocinas proinflamatorias, principalmente de IL-8 después de 24 horas. (Figura 23). La capacidad de estimulación de LGG viable a la síntesis de IL-8, fue dependiente a la concentración del bacilo, siendo la máxima síntesis de IL-8 ( $192.29 \pm 36.35$  pg/mL) observada a una concentración de  $2 \times 10^6$  UFC/mL. LGG no viable indujo niveles menores de esta citocina ( $108.5 \pm 23.34$  vs  $192.29 \pm 36.35$  pg/mL).



**Figura 23.** Síntesis de IL-8 en PMN estimulados in vitro con probiótico LGG viable y no viable. Los PMN fueron estimulados con la cepa probiótica de LGG a diferentes concentraciones ( $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  UFC) de bacteria viable e inactivada por calor. Los sobrenadantes de las células fueron recolectados después de 24 horas de estimulación. La medición de las citocinas se realizó por método de ELISA. Las concentraciones son resultado de muestras por duplicado  $\pm$  desviación estándar en un total de tres experimentos realizados.

\* $p < 0.05$  células PMN estimuladas con LGG viable y no viable vs células sin estimular

Otra de las citocinas proinflamatorias evaluadas fue TNF- $\alpha$ , la síntesis de esta citocina fue inversamente proporcional a la concentración de LGG viable. La producción máxima de esta citocina se observó a una concentración de  $2 \times 10^5$  UFC, en cambio, a concentraciones mayores ( $2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^7$  UFC) se indujeron niveles menores de TNF- $\alpha$  ( $25.5 \pm 4.94$  y  $5.5 \pm 2.12$  pg/mL). La comparación al estímulo de LGG no viable, sobre la producción de esta citocina indujo valores 5.7 menores de TNF- $\alpha$  ( $113 \pm 15.55$  vs  $19.5 \pm 2.12$  pg/mL) (Figura 24).

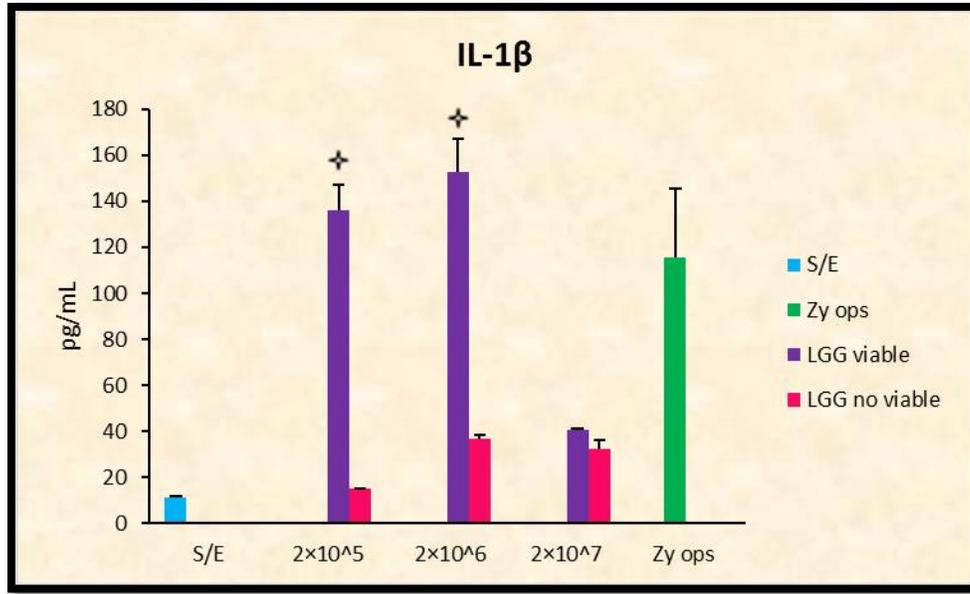


**Figura 24.** Síntesis de TNF- $\alpha$  en PMN estimulados in vitro con probiótico LGG viable y no viable. Los PMN fueron estimulados con la cepa probiótica a diferentes concentraciones ( $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^7$  UFC) de bacteria viable e inactivada y los sobrenadantes de las células fueron recolectados a las 24 horas. La medición de las citocinas se realizó por método de ELISA. Las concentraciones son resultado de tres experimentos realizados por duplicado.

\* $p < 0.05$  células PMN estimuladas con LGG viable y no viable vs células sin estimular

Así mismo, se evaluó la producción de IL-1 $\beta$  que fue significativamente mayor en las células estimuladas con LGG viable ( $152.5 \pm 14.84$  pg/mL), en comparación a las células sin estímulo (Figura 25). Sin embargo, a concentraciones de  $2 \times 10^6$  UFC se indujeron niveles menores ( $40.5 \pm 0.7$  vs  $152.5 \pm 14.84$  pg/mL). LGG no viable indujo 4.2 veces niveles menores de IL-1 $\beta$  ( $36.5 \pm 2.12$  vs  $152.5 \pm 14.84$  pg/mL), sugiriendo que LGG viable induce mayor síntesis de IL-1 $\beta$  en comparación a LGG no viable.

En conjunto LGG viable y no viable indujeron citocinas de respuesta inflamatoria (IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) dependientes de la condición del estímulo viable y no viable (Figuras 23, 24 y 25).



**Figura 25.** Síntesis de IL-1 $\beta$  en PMN estimulados *in vitro* con *Lactobacillus* LGG viable e inactivado. Los PMN fueron estimulados con la cepa probiótica a diferentes concentraciones ( $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^7$  UFC) de bacteria viable e inactivada y los sobrenadantes de las células fueron recolectados a las 24 horas. La medición de las citocinas se realizó por método de ELISA. Las concentraciones son expresadas en pg/mL  $\pm$  desviación estándar y son el resultado de tres experimentos realizados por duplicado.

\* $p < 0.05$  células PMN estimuladas con LGG viable y no viable vs células sin estimular

### 8.3 Efecto *in vitro* de la bacteria LGG viable y no viable en la actividad bactericida de células PMN al reto de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

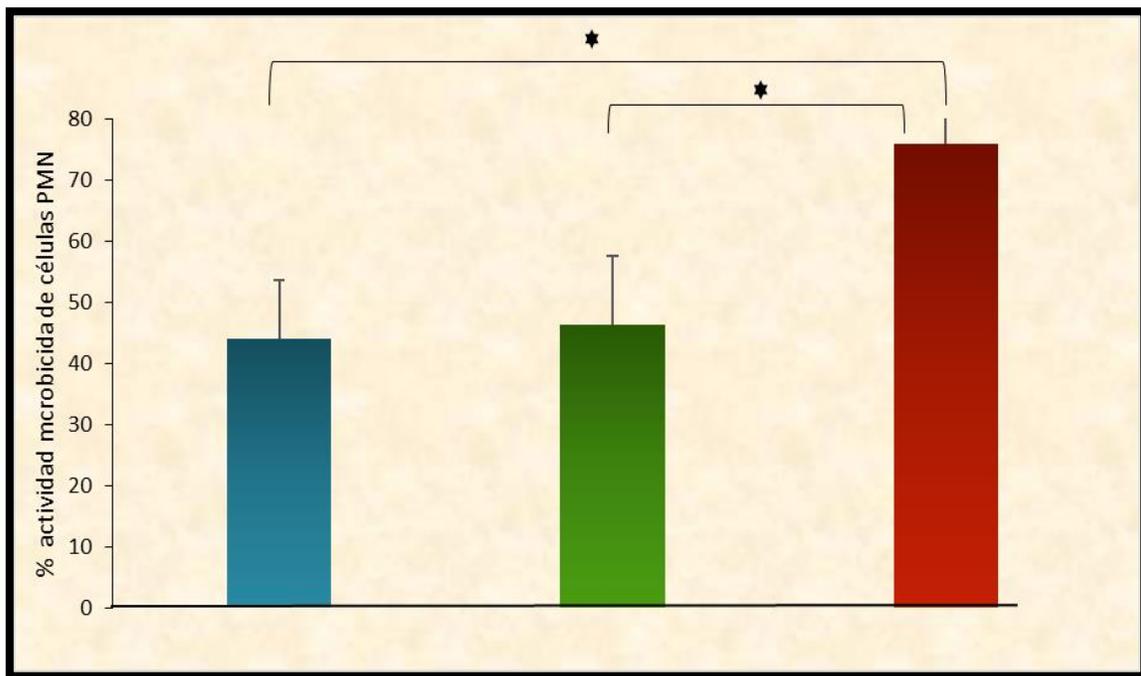
Otra de las funciones inmunitarias analizadas en esta tesis fue la capacidad bactericida de las células PMN al reto con una bacteria gram positiva *S. aureus* cepa ATCC 29213. El efecto de LGG sobre esta función se evaluó en células PMN en una relación 1:10 célula:bacteria a los 60 minutos.

En condiciones basales, sin tratamiento, se observó que las células PMN *per se* tienen la capacidad de eliminar hasta  $48.66 \pm 3.21$  % del *S. aureus* evaluado en tiempos cortos de interacción célula: bacteria (60 minutos).

El tratamiento *in vitro* de una hora con LGG viable no tuvo efectos significativos en la capacidad de eliminación de *S. aureus* ( $48.66 \pm 3.21$  vs  $49 \pm 12.28$  %) después de 60 minutos de interacción.

Sin embargo, el tratamiento con LGG no viable indujo un aumento significativo del 26 % en la eliminación de esta bacteria con valores de ( $48.66 \pm 3.21$  vs  $75.66 \pm 5.85$  %), comparado a células PMN no tratadas (Figura 26).

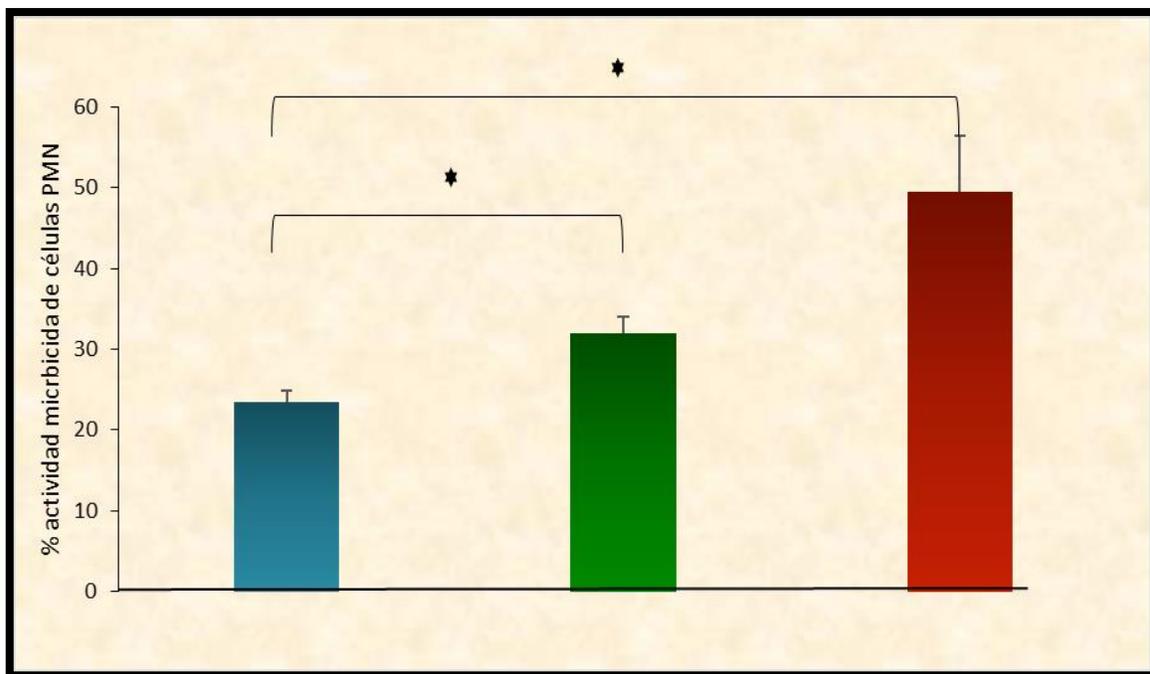
Así también, al establecer la comparación de la capacidad microbicida en condiciones de tratamiento previo de LGG viable y no viable, los datos de porcentaje indican un incremento ( $75.66 \pm 5.85$  vs  $49 \pm 12.28$  %) cuando las células PMN son previamente tratadas con LGG no viable.



<b>PMN</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>LGG viable</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>LGG no viable</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>

**Figura 26.** Actividad bactericida de células PMN retadas con *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Las células PMN ajustadas a  $2 \times 10^5$  células fueron incubadas previamente con  $1 \times 10^6$  de bacteria probiótica de LGG (1:10, célula/bacteria) a 37 °C por 1 hora en agitación constante. Posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ L de *Staphylococcus aureus* 29213, en concentración de  $1 \times 10^6$  UFC y se mantuvieron 1 hora a 37 °C. Los resultados están representados en porcentaje y son representativos de un promedio de cuatro experimentos realizados por duplicado.

Así mismo analizamos el mismo sistema con una bacteria gram (*E. coli* cepa ATCC 35128). Los resultados mostraron un efecto similar, siendo el LGG no viable el que indujo mayor aumento en la capacidad bactericida de estas células comparada a las células sin tratamiento ( $23.33 \pm 1.52$  vs  $49.33 \pm 7.09$  %) (Figura 27).



<b>PMN</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>LGG viable</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>LGG no viable</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>

**Figura 27.** Actividad bactericida de células PMN retadas con *Escherichia coli* ATCC 35128. Las células PMN ajustadas a  $2 \times 10^5$  células fueron incubadas previamente con  $1 \times 10^6$  de bacteria probiótica LGG (1:10, célula/bacteria) a 37 °C por 1 hora en agitación constante. Posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ L de *Escherichia coli* ( $1 \times 10^7$  UFC/mL) y se mantuvieron 1 hora a 37 °C. Los resultados están presentados en porcentaje y son representativos de un promedio de cuatro experimentos realizados por duplicado.

# 9. Discusión

*“Ciencia es todo aquello sobre lo cual cabe discusión”*

José Ortega y Gasset

El mantenimiento de la homeostasis gastrointestinal se considera un punto crítico para la prevención del desarrollo de las enfermedades autoinmunes y metabólicas (Hotamisligil, 2008). La influencia positiva de los probióticos en la homeostasis intestinal se ha sustentado principalmente en su antagonismo bacteriano y en la inmunomodulación, que ayudan al hospedero sano a mantener y controlar ciertas reacciones infecciosas, inflamatorias e inmunológicas (Galdeano, *et al.*, 2007).

Sin embargo, una de las recientes preocupaciones sobre el tratamiento con probióticos, es el alcance de sus efectos locales y sistémicos; además de las vías moleculares responsable de su interacción con las células del hospedero (Vogel, *et al.*, 2008).

En esta tesis, apoyados por un sistema *in vitro* con neutrófilos humanos de sangre periférica, se demostró la actividad inmunoestimulante del probiótico de LGG, derivado de un producto comercial. Los resultados obtenidos demostraron que LGG, en su condición de bacteria viable y no viable ejercen efectos biológicos diferenciales sobre las funciones inmunitarias de las células polimorfonucleares.

La cepa probiótica de LGG indujo la síntesis de mediadores proinflamatorios, entre ellos la producción de ROS, principalmente de las especies oxidativas: anión superóxido y peróxido de hidrógeno, detectables por quimioluminiscencia.

La síntesis de ROS por las células polimorfonucleares en reto a la estimulación de LGG en este estudio fue dependiente a la concentración de la bacteria láctica adicionada. Las características de estas cinéticas de quimioluminiscencia nos sugieren que el evento de estallido respiratorio activado por la estimulación de LGG viable y no viable es un evento corto y rápido con un comportamiento muy similar a la respuesta de

Zymosán, únicamente con respuestas diferenciales en los picos de quimioluminiscencia entre los estímulos estudiados y dependientes a la concentración y viabilidad del bacilo.

Ambas preparaciones del LGG viable y el inactivado por calor tienen la habilidad de inducir la síntesis de ROS. Sin embargo, la mayor actividad se obtuvo con bacteria viable.

Está reconocido en la literatura que las acciones estimulante e inhibidora de una bacteria probiótica también se pueden atribuir a las condiciones de los microorganismos, es decir viables, muertas, o en su caso componentes solubles obtenidos de los sobrenadantes libres de células bacterianas probióticas. Dichos efectos también se sugieren dependen de la cepa probiótica y de la especie analizada (Chapot-Chartier, *et al.*, 2014).

Además, la pared celular de bacterias lácticas se sugiere como un factor importante de los efectos observados en la activación de las células inmunes (Vinderola, *et al.*, 2004). En esta tesis, también se observa esta situación ya que los polimorfonucleares se activaron con ambas bacterias probiótica viable y no viable.

El papel inmunitario de los ROS, como moléculas de acción microbicida se destaca por los efectos observados en los individuos con defectos en la maquinaria bioquímica necesaria a la síntesis de estas moléculas oxidativas (Kumar, *et al.*, 2010; Meissner, *et al.*, 2010). Así también, los ROS son componentes extremadamente tóxicos, para los microorganismos patógenos, entre ellos bacterias y parásitos. Los fagocitos profesionales (neutrófilos y macrófagos) son las principales células productoras de estos mecanismos dependientes de oxígeno (Koch, *et al.*, 2012). Estos resultados en la síntesis de ROS fueron consistentes con los datos obtenidos de otros reportes que demuestran la producción de estallido respiratorio y la síntesis de citocinas por bacterias probióticas en fagocitos profesionales de ratón (Kapila, *et al.*, 2013).

En contraste, estudios por Sun y colaboradores demuestran efectos inhibitorios sobre la producción del estallido respiratorio, principalmente de los radicales hidroxilos,

por extractos libres del bacilo de LGG y *L. paracasei*, siendo estas propiedades atribuibles a la presencia de la enzima de superóxido dismutasa (SOD) detectable en los extractos libres de LGG y *L. paracasei* Fn 003 (Sun, *et al.*, 2010).

Estas divergencias en los efectos biológicos de las bacterias probióticas, como en el caso del LGG pueden atribuirse a la complejidad de los componentes de la pared celular distintos entre ellas y también en su capacidad de liberar varios grupos de moléculas o productos de secreción (por ejemplo, bacteriocinas, ácido láctico, ácidos grasos de cadena corta y enzimas entre ellas la actividad de SOD).

La contribución inmunomoduladora de las bacterias lácticas, en su efecto local se ha demostrado en varias estirpes celulares de la mucosa intestinal (epitelio, células epiteliales) y también células inmunes de la mucosa (por ejemplo, linfocitos T, células dendríticas y monocito-macrófagos).

Sin embargo, su función en la modulación de la actividad funcional de los neutrófilos es contradictoria y escasamente investigada. Los neutrófilos soportan el ataque de los microorganismos infecciosos como la primera línea de defensa del hospedero del sistema inmune innato, y son de las primeras células reclutadas en el sitio de infección (Jaillon, *et al.*, 2013; Rosales, *et al.*, 2016).

Basados en este principio, el fino balance de mediadores inflamatorios (citocinas pro- y antiinflamatorias) en los neutrófilos es un evento importante para la regulación y homeostasis de la inflamación (Soehnlein, *et al.*, 2010).

Los resultados de esta tesis sustentan a LGG como inductor de la síntesis de citocinas proinflamatorias, entre ellas la IL-8. Esta quimiocina es muy importante para el reclutamiento y migración de neutrófilos y de otras células de la respuesta inflamatoria, como macrófagos y células dendríticas (Harada, *et al.*, 1994).

La quimiocina IL-8 en los neutrófilos fue detectable a las 24 horas de estimulación con LGG. Los niveles alcanzados de esta citocina fueron muy similares al inducido por una molécula del tipo PAMPs (por ejemplo, Zymosán).

La producción de la IL-8 en los neutrófilos fue dependiente de la concentración del estímulo adicionado, y los datos sugieren que ambas preparaciones de LGG viable y no viable inducen esta quimiocina en niveles significativos en comparación a la respuesta de las células no estimuladas.

Esta reconocido también que los neutrófilos son fuente de citocinas proinflamatoria y reguladoras, incluyendo el interferón- $\gamma$  e IL-17 A (Taylor, *et al.*, 2014). Aunque, los neutrófilos son generalmente considerados como células de vida corta en la circulación, otros informes indican que estas células pueden sobrevivir por períodos más largos de tiempo en condiciones inflamatorias, donde son estimuladas por citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento (Koch, *et al.*, 2012).

En similitud a nuestros resultados, otros autores han demostrado la expresión de RNAm de IL-8 y actividad quimiotáctica en los sobrenadantes de LGG hacia células TH1 (Veckman, *et al.*, 2003).

En esta tesis, también se demostró la síntesis de otra citocina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$ , esta molécula, como la IL-8, son proteínas que tienen efectos biológicos importantes en la activación de neutrófilos (Palomino, *et al.*, 2015).

TNF- $\alpha$  es un componente esencial en la defensa innata del hospedero, demostrado por las complicaciones en las infecciones por defectos en la síntesis de esta citocina (Barbar, *et al.*, 1996). Está demostrado que ante el reconocimiento de un microorganismo, citocinas como TNF- $\alpha$ . IL-8 e IL1- $\beta$  son secretadas por neutrófilos activados (Mantovani, *et al.*, 2011).

De acuerdo a las condiciones experimentales del estudio se sugiere una dependencia de la concentración del bacilo con la producción de TNF- $\alpha$ .

La activación de neutrófilos por LGG también indujo la síntesis de IL-1 $\alpha$ , esta citocina tiene una participación esencial en la activación del complejo de inflamósoma, el cual es muy importante en el control de ciertas infecciones bacterianas y virales. *In vivo* la IL-1 $\beta$  es la responsable de la respuesta de fase aguda como fiebre, la síntesis de proteínas de fase aguda, anorexia y somnolencia (Kolaczowska, *et al.*, 2013).

La activación del inflamasoma y procesamiento de la IL-1 $\beta$  se han estudiado ampliamente en los monocitos, macrófagos y células dendríticas (Latz, *et al.*, 2013; Gross, *et al.*, 2011). Sin embargo, aunque los neutrófilos son las células más prominentes que infiltran los sitios de infección e inflamación, la contribución de los neutrófilos en el inflamasoma y la producción de activación y IL-1 $\beta$  son menos conocidos.

En esta tesis, LGG viable indujo mayor producción de esta citocina en comparación a la bacteria inactivada; estos datos sugieren que la estimulación de LGG podría tener un papel importante en la activación del inflamasoma.

Otro aspecto, de la contribución del LGG en la función de los neutrófilos fue su efecto en la actividad bactericida durante tiempos cortos, 1 hora de interacción. Los resultados llaman la atención porque la bacteria láctica inactivada indujo mayor porcentaje de muerte, en comparación a la bacteria láctica viable. Este aumento de capacidad bactericida de los neutrófilos por LGG se observó para ambos patógenos evaluados (*Staphylococcus aureus* y *E. coli*).

Los resultados bajo estas condiciones de estudio sugieren a LGG no viable con un efecto potencial mayor a la capacidad microbicida de estas células contra *S aureus* cepa ATCC 29213.

Estos resultados también sugieren que las cepas inactivadas pueden ser utilizadas como adyuvantes en la depuración de bacterias patógenas. Además, esta respuesta fue muy similar a los datos obtenidos por otros estudios, que señalan que bacterias probióticas del grupo de las bacterias ácido láctica, aumentan la función microbicida de los fagocitos profesionales tanto en modelos *in vitro* e *in vivo* (Giorgetti , *et al.*, 2015).

Finalmente, los resultados de la presente tesis sustentan la modulación de los mecanismos potenciales de respuesta inmunitaria temprana por LGG y nos orientan a sugerir a este probiótico como un candidato potencial a reforzar las actividades inmunitarias de las células polimorfonucleares.

# 10. Conclusiones

*“En la vida no hay cosas que temer solo cosas que comprender”*

Marie Curie

El probiótico de LGG derivado de producto comercial Culturelle activa *in vitro* a leucocitos polimorfonucleares humanos.

Los leucocitos polimorfonucleares activados por el bacilo de LGG inducen mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno (estallido respiratorio).

Los efectos inmunitarios inducidos por LGG, como la producción de ROS fueron dependientes de la concentración del bacilo y de la preparación de la bacteria viable y no viable.

La estimulación de las células polimorfonucleares por LGG activa la síntesis de citocinas pro inflamatorias (IL-8, TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$ ) de forma diferencial a la bacteria viable e inactivada.

El tratamiento *in vitro* de las células PMN con LGG no viable aumentó la capacidad microbicida frente al reto de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* patógena.

La contribución del LGG en sus preparaciones de bacterias viables y no viables induce efectos inmune diferenciales en las células PMN con perfil de citocinas pro inflamatorias, que podrían coadyuvar a fortalecer la función inmunitaria de estas células fagocíticas.

# 11. Perspectivas

*“Lo importante es no dejar de hacerse preguntas”*

Albert Einstein

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

- ❖ Analizar el efecto del LGG en células PMN en condiciones de preactivación de las células (inflamación activa) en modelos animales o estudios *in vivo*.
- ❖ Estudiar el efecto del LGG en otras funciones del PMN como es su función quimiotáctica y fagocitosis a otros patógenos.
- ❖ Evaluar el papel del LGG en hospederos con enfermedades inflamatorias crónicas como desórdenes inflamatorios del intestino, además de diabetes, obesidad y cáncer.
- ❖ Determinar los mecanismos de señalización involucrados en los efectos de LGG sobre estas células de la inmunidad innata.

# 12. Referencias

*“Después de todo, ¿qué es un científico entonces? Es un Hombre curioso que mira a través del ojo de una cerradura, la cerradura de la naturaleza, tratando de saber qué es lo que sucede.”*

Jacques Yves Cousteau

- Adams, C.A. (2010) ‘The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers’, *Nutrition Research Reviews*, 23(1), 37–46. DOI: 10.1017/S0954422410000090
- Abreu MT. (2010), Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol.* 10(2), 131- 44.
- Ajuebor MN, Das AM, Virág L, Flower RJ, Szabó C, Perretti M. (1999), Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. *J Immunol.* 162(3), 1685-91.
- Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O, Rhyner C, Ouaked N, Schaffartzik A, Van De Veen W, Zeller S, Zimmermann M, Akdis CA. (2011), Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*;127(3):701-21. doi: 10.1016/j.jaci.2010.11.050.
- Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. (2012), Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol.* 30, 459-89 DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-074942
- Ardita CS, Mercante JW, Kwon YM, Luo L, Crawford ME, Powell DN, Jones RM, Neish AS., (2014), Epithelial adhesion mediated by pilin SpaC is required for *Lactobacillus rhamnosus* GG-induced cellular responses. *Appl Environ Microbiol.* 80(16):5068-77.

- Arita M, Ohira T, Sun YP, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN. (2007), Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J Immunol.* 15;178(6):3912-7.
- Arunachalam K, Gill HS, Chandra RK. (2000), Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur J Clin Nutr.* 54(3):263-7.
- Ashraf R, Shah NP. (2014), Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit Rev Food Sci Nutr.*,54(7):938-56.
- Barbara JA, Van ostade X, Lopez (1996), A. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective. *Immunol Cell Biol.* ,74(5):434-43.
- Bianchi ME. (2007), DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc Biol.*,81(1):1-5
- Boder P. (2008), Influence of prebiotics on the human immune system (GALT). *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.*, 2(2):149-53.
- Bonaccorsi I, Buda C, Campana S, De Pasquale C, Oliveri D, Cascio A, Ferlazzo G. (2016), Th17 skewing in the GALT of a Crohn disease patient upon *Lactobacillus rhamnosus* GG consumption. *Immunol Lett.*, 170:95-7. doi: 10.1016/j.imlet.2015.11.008
- Bron PA, Tomita S, Mercenier A, Kleerebezem M. (2013), Cell surface-associated compounds of probiotic lactobacilli sustain the strain-specificity dogma. *Curr Opin Microbiol.*,16(3):262-9. doi: 10.1016/j.mib.2013.06.001
- Chaplin DD. (2010), Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.*, 125(2 Suppl 2): S3-23. doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.980.
- Chapot-Chartier MP, Kulakauskas S. (2014), Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb Cell Fact.*,29;13 Suppl 1: S9. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S9.
- Colgan SP, Ehrentraut SF, Glover LE, Kominsky DJ, Campbell EL. (2013), Contributions of neutrophils to resolution of mucosal inflammation. *Immunol Res.* 55(1-3):75-82. doi: 10.1007/s12026-012-8350-2.

- Cross ML, Ganner A, Teilab D, Fray LM. (2004), Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol.*1;42(2):173-80.
- De Nardo D. (2015), Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine.*74(2):181-9. doi: 10.1016/j.cyto.2015.02.025
- Delcenserie V, Martel D, Lamoureux M, Amiot J, Boutin Y, Roy D. (2008), Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr Issues Mol Biol*, (1-2):37-54.
- Douillard FP, de Vos WM. (2014), Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microb Cell Fact.*, 13 Suppl 1: S8. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S8.
- Foolad N, Armstrong AW. (2014), Prebiotics and probiotics: the prevention and reduction in severity of atopic dermatitis in children. *Benef Microbes.* 1;5(2):151-60. doi: 10.3920/BM2013.0034.
- Forsythe P, Bienenstock J. (2010), Immunomodulation by commensal and probiotic bacteria. *Immunol Invest.*39(4-5):429-48. doi: 10.3109/08820131003667978.
- Fournier BM, Parkos CA. (2012), The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.*, ;5(4):354-66. doi: 10.1038/mi.2012.24.
- Frei R, Akdis M, O'Mahony L. (2015), Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence. *Curr Opin Gastroenterol*, 31(2):153-8. doi: 10.1097/MOG.0000000000000151.
- Galdeano CM, de Moreno de LeBlanc A, Vinderola G, Bonet ME, Perdígón G. (2007), Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin Vaccine Immuno*;14(5):485-92.
- Gareau MG, Sherman PM, Walker WA. (2010), Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 7(9):503-14. doi: 10.1038/nrgastro.2010.117.

- Giorgetti G, Brandimarte G, Fabiocchi F, Ricci S, Flamini P, Sandri G, Trotta MC, Elisei W, Penna A, Lecca PG, Picchio M, Tursi A. (2015), Interactions between Innate Immunity, Microbiota, and Probiotics. *J Immunol Res.*501361. doi:10.1155/2015/501361.
- Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. (2011), The inflammasome: an integrated view. *Immunol Rev*; 243(1):136-51. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01046. x.
- Guandalini S. (2011), Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. *J Clin Gastroenterol*;45 Suppl: S149-53. doi: 10.1097/MCG.0b013e3182257e98
- Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol.* 1994 Nov;56(5):559-64.
- Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. (1994), Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol*; 56(5):559-64.
- Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. (2013), Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: omeostasis and immunopathology *29*;5(6):1869-912
- Hojsak I, Snovak N, Abdović S, Szajewska H, Misak Z, Kolacek S. (2010), Lactobacillus GG in the prevention of gastrointestinal and respiratory tract infections in children who attend day care centers: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Nutr*;29(3):312-6. doi: 10.1016/j.clnu.2009.09.008.
- Hotamisligil GS, Erbay E. (2008), Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol*;8(12):923-34.
- Jaillon S, Gaudier MR, Del Prete D, Cassatella MA, Garlanda C, Mantovani A. (2013), Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol.*;35(4):377-94.
- Jiang H, Przybyszewski J, Mitra D, Becker C, Brehm-Stecher B, Tentinger A, MacDonald RS. (2011), Soy protein diet, but not Lactobacillus rhamnosus GG,

decreases mucin-1, trefoil factor-3, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in colon of dextran sodiumsulfate-treated C57BL/6 mice. *J Nutr*, 141(7):1239-46

- J, Palva A, Vos WM, Keersmaecker SC, Vanderleyden J. (2012), Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol.*, 78(1):185-93
- Kandasamy M, Selvakumari Jayasurya A, Moochhala S, Huat Bay B, Kun Lee Y, Mahendran R. (2011), *Lactobacillus rhamnosus* GG secreting an antigen and Interleukin-2 translocates across the gastrointestinal tract and induces an antigen specific immune response. *Microbiol Immunol*;55(10):704-14.
- Kapila R, Sebastian R, Varma D VP, Sharma R, Kapasiya M, Salingati V, Kapila S, Dang AK. (2013), Comparison of innate immune activation after prolonged feeding of milk fermented with three species of *Lactobacilli*. *Microbiol Immunol.*, 57(11):778-84.
- Kawai T, Akira S. (2010), The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*;11(5):373-84.
- Kemgang TS, Kapila S, Shanmugam VP, Kapila R. (2014), Cross-talk between probiotic *Lactobacilli* and host immune system. *J Appl Microbiol*;117(2):303-19.
- Klaenhammer TR, Altermann E, Pfeiler E, Buck BL, Goh YJ, O'Flaherty S, Barrangou R, Duong T. (2008), Functional genomics of probiotic *Lactobacilli*. *J Clin Gastroenterol*; 42 Suppl 3 Pt 2: S160-2
- Kleerebezem M, Hols P, Bernard E, Rolain T, Zhou M, Siezen RJ, Bron PA. (2010), The extracellular biology of the *Lactobacilli*. *FEMS Microbiol Rev*;34(2):199-230.
- Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G. (1998), Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*;41(2):103-25.
- Kolaczowska E, Kubes P. (2013), Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*; 13:159–175.
- Koch S, Nusrat A. (2012), The life and death of epithelia during inflammation: lessons learned from the gut. *Annu Rev Pathol*; 7:35-60.

- Kubiszewska I, Januszewska M, Rybka J, Gackowska L. (2014), Lactic acid bacteria and health: are probiotics safe for human? *Postepy Hig Med Dosw (Online)*; 68:1325-34.
- Kucharzik T, Hudson JT 3rd, Lügering A, Abbas JA, Bettini M, Lake JG, Evans ME, Ziegler TR, Merlin D, Madara JL, Williams IR. (2005), Acute induction of human IL-8 production by intestinal epithelium triggers neutrophil infiltration without mucosal injury. *Gut*;54(11):1565-72.
- Kumagai Y, Akira S. (2010), Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol*;125(5):985-92.
- Kumar V, Sharma A. (2010), Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol*;10(11):1325-34.
- Latz E, Xiao TS, Stutz A. (2013), Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*; 13:397–411
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. (2010), Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev. Microbiol*; 8(3):171-84.
- Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. (2001), Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol*; 2(7):612-9.
- Lim BK, Mahendran R, Lee YK, Bay BH. (2002), Chemopreventive effect of *Lactobacillus rhamnosus* on growth of a subcutaneously implanted bladder cancer cell line in the mouse. *Jpn J Cancer Res*; 93(1):36-41.
- Lin CS, Chang CJ, Lu CC, Martel J, Ojcius DM, Ko YF, Young JD, Lai HC. (2014), Impact of the gut microbiota, prebiotics, and probiotics on human health and disease. *Biomed J*;37(5):259-68
- Lopez M, Li N, Kataria J, Russell M, Neu J. (2008), Live and ultraviolet-inactivated *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease flagellin-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J Nutr*;138(11):2264-8

- Mackowiak, P. A. (2013). Recycling Metchnikoff: Probiotics, the Intestinal Microbiome and the Quest for Long Life. *Frontiers in Public Health*, 1, 52. <http://doi.org/10.3389/fpubh.2013.00052>
- Maghzal GJ, Krause KH, Stocker R, Jaquet V. (2012), Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med*;53(10):1903-18. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.002
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. (2011), Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*; 11:519–531 doi: 10.1038/nri3024
- Medzhitov R. (2007), Recognition of microorganism and activation of immune response. *Nature* 449: 819-826
- Meissner F, Seger RA, Moshous D, Fischer A, Reichenbach J, Zychlinsky A. (2010), Inflammasome activation in NADPH oxidase defective mononuclear phagocytes from patients with chronic granulomatous disease. *Blood*; 116:1570–1573. doi: 10.1182/blood-2010-01-264218.
- Mokrozub VV, Lazarenko LM, Sichel LM, Babenko LP, Lytvyn PM, Demchenko OM, Melnichenko YO, Boyko NV, Biavati B, DiGioia D, Bubnov RV, Spivak MY. (2015), The role of beneficial bacteria wall elasticity in regulating innate immune response. *EPMA J*;6(1):13 doi: 10.1186/s13167-015-0035-1.
- Montegudo-Mera A, Caro I, Rodríguez-Aparicio LB, Rúa J, Ferrero MA, García-Armesto MR. (2011), Characterization of certain bacterial strains for potential use as starter or probiotic cultures in dairy products. *J Food Prot*;74(8):1379-86. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-10-392
- Newman MA, Sundelin T, Nielsen JT, Erbs G. (2013), MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front Plant Sci*; 4:139
- Newton K, Dixit VM. (2012), Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*;4(3) doi:10.1101/cshperspect.a006049.
- Ohashi Y, Ushida K. (2009), Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Anim Sci J*;80(4):361-71. doi: 10.1111/j.1740-0929.2009.00645.x.

- Palomino DC, Marti LC. (2015), Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)*;13(3):469-73. doi: 10.1590/S1679-45082015RB3438.
- Papadimitriou K, Alegría Á, Bron PA, de Angelis M, Gobetti M, Kleerebezem M, Lemos JA, Linares DM, Ross P, Stanton C, Turrone F, van Sinderen D, Varmanen P, Ventura M, Zúñiga M, Tsakalidou E, Kok J. (2016), Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*;80(3):837-90.
- Papayannopoulos V, Zychlinsky A. (2009), NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*;30(11):513-21 doi: 10.1016/j.it.2009.07.011
- Pelto L, Isolauri E, Lilius EM, Nuutila J, Salminen S. (1998), Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin Exp Allergy*;28(12):1474-9
- Peña JA, Versalovic J. (2003), *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF- $\alpha$  production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell Microbiol*;5(4):277-85
- Perdígón G, de Macias ME, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AP. (1988), Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology*;63(1):17-23.
- Perobelli SM, Galvani RG, Gonçalves-Silva T, Xavier CR, Nóbrega A, Bonomo A. (2015), Plasticity of neutrophils reveals modulatory capacity. *Braz J Med Biol Res*; 48(8):665-75. doi: 10.1590/1414-431X20154524.
- Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. (2003), Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev*;16(4):658-72.
- Remus DM, Kleerebezem M, Bron PA. (2011), An intimate tête-à-tête -how probiotic lactobacilli communicate with the host. *Eur J Pharmacol*;668 Suppl 1: S33-42.
- Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. (2016), Immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*;148(2):125-39. doi:10.1111/imm.12597.

- Rosales C, Demaurex N, Lowell CA, Uribe-Querol E. (2016), Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity. *J Immunol Res.* doi:10.1155/2016/1469780
- Roselli M, Finamore A, Britti MS, Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM, Mengheri E. (2007), The novel porcine *Lactobacillus sobrius* strain protects intestinal cells from enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection and prevents membrane barrier damage. *J Nutr*;137(12):2709-16.
- Sadik CD, Kim ND, Luster AD. (2011), Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol*;32(10):452-60.
- Sartor RB. (2008), Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*;134(2):577-94
- Schaer-Zammaretti P, Ubbink J. (2003), Imaging of lactic acid bacteria with AFM-elasticity and adhesion maps and their relationship to biological and structural data. *Ultramicroscopy*; 97(1-4):199-208
- Seow SW, Cai S, Rahmat JN, Bay BH, Lee YK, Chan YH, Mahendran R. (2010), *Lactobacillus rhamnosus* GG induces tumor regression in mice bearing orthotopic bladder tumors. *Cancer Sci*;101(3):751-8. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01426.x.
- Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. (2008), Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*;8(5):349-61
- Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. (2000), Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med*;192(8):1197-204
- Singh VP, Sharma J, Babu S, Rizwanulla, Singla A. (2013), Role of probiotics in health and disease: a review. *J Pak Med Assoc*;63(2):253-7.
- Singh Y, Ahmad J, Musarrat J, Ehtesham NZ, Hasnain SE. (2013), Emerging importance of holobionts in evolution and in probiotics. *Gut Pathog*;5(1):12.

- Soehnlein O, Lindbom L. (2010), Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*;10(6):427-39.
- Sun J, Hu XL, Le GW, Shi YH. (2010), Lactobacilli prevent hydroxy radical production and inhibit *Escherichia coli* and *Enterococcus* growth in system mimicking colon fermentation. *Lett Appl Microbiol*;50(3):264-9.
- Sylvia CJ. (2003), The role of neutrophil apoptosis in influencing tissue repair. *J Wound Care*;12(1):13-6
- Taylor PR, Roy S, Leal SM, Jr, Sun Y, Howell SJ, Cobb BA, Li X, Pearlman E. (2014), Activation of neutrophils by autocrine IL-17A-IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, ROR $\gamma$  and dectin-2. *Nat Immunol*; 15:143–151. doi: 10.1038/ni.2797
- Vandenplas Y, Huys G, Daube G. (2015), Probiotics: an update. *J Pediatr (Rio J)*;91(1):6-21. doi: 10.1016/j.jpmed.2014.08.005.
- Veckman V, Miettinen M, Matikainen S, Lande R, Giacomini E, Coccia EM, Julkunen I. (2003), Lactobacilli and streptococci induce inflammatory chemokine production in human macrophages that stimulates Th1 cell chemotaxis. *J Leukoc Biol*;74(3):395-402
- Vinderola CG, Medici M, Perdigón G. (2004), Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *J Appl Microbiol*;96(2):230-43
- Vogel G. Clinical trials. (2008), Deaths prompt a review of experimental probiotic therapy. *Science*;319(5863):557. doi: 10.1126/science.319.5863.557a.
- Vong L, Lorentz RJ, Assa A, Glogauer M, Sherman PM. (2014), Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *J Immunol*; 192(4):1870-7. doi: 10.4049/jimmunol.1302286
- Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, Shih DQ. (2014), Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*;20(1):6-21 doi: 10.3748/wjg.v20.i1.6.

- Wang G, Nauseef WM. (2015), Salt, chloride, bleach, and innate host defense. *J Leukoc Biol*;98(2):163-72. doi: 10.1189/jlb.4RU0315-109R.
- Yan F, Liu L, Dempsey PJ, Tsai YH, Raines EW, Wilson CL, Cao H, Cao Z, Liu L, Polk DB. (2013), A *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived soluble protein, p40, stimulates ligand release from intestinal epithelial cells to transactivate epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*;288(42):30742-51. doi: 10.1074/jbc.M113.492397
- Yan F, Polk DB. (2012), Characterization of a probiotic-derived soluble protein which reveals a mechanism of preventive and treatment effects of probiotics on intestinal inflammatory diseases. *Gut Microbes*;3(1):25-8. doi: 10.4161/gmic.19245
- Yan, F., & Polk, D. B. (2012). *Lactobacillus rhamnosus* GG: An Updated Strategy to Use Microbial Products to Promote Health. *Functional Food Reviews (Print)*, 4(2), 77–84.
- Zhang L, Xu YQ, Liu HY, Lai T, Ma JL, Wang JF, Zhu YH. (2010), Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG using an *Escherichia coli* K88 model of piglet diarrhoea: Effects on diarrhoea incidence, faecal microflora and immune responses. *Vet Microbiol*;141(1-2):142-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.003.

# 13. Anexo

*“En el fondo los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida”*

Lee Smolin

## ❖ Medios de cultivo para bacterias

### ➤ Medio de cultivo MRS caldo

Difco™ Lactobacilli MRS caldo (1 L)

<b>Proteasa peptona N.3</b>	10.0 g
<b>Extracto de carne</b>	10.0 g
<b>Extracto de levadura</b>	5.0 g
<b>Dextrosa</b>	20.0 g
<b>Polisorbato 80</b>	1.0 g
<b>Citrato de amonio</b>	2.0 g
<b>Acetato de sodio</b>	5.0 g
<b>Sulfato de magnesio</b>	0.1 g
<b>Sulfato de manganeso</b>	0.05 g
<b>Fosfato dipotásico</b>	2.0 g

Suspender 70 g del polvo en 1 L de agua destilada y disolver completamente. Ajustar el pH a 5.2 posteriormente esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

### ➤ Medio de cultivo MRS agar

Difco™ Lactobacilli MRS agar (1 L)

<b>Proteasa peptona N.3</b>	10.0 g
<b>Extracto de carne</b>	10.0 g
<b>Extracto de levadura</b>	5.0 g
<b>Dextrosa</b>	20.0 g
<b>Polisorbato 80</b>	1.0 g
<b>Citrato de amonio</b>	2.0 g
<b>Acetato de sodio</b>	5.0 g
<b>Sulfato de magnesio</b>	0.1 g
<b>Sulfato de manganeso</b>	0.05 g
<b>Fosfato dipotásico</b>	2.0 g
<b>Agar</b>	15.0 g

Suspender 70 g del polvo en 1 L de agua destilada y disolver completamente. Ajustar el pH a 5.2 posteriormente esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

➤ **Caldo soya tripticaseina (1 L)**

<b>Cloruro de sodio</b>	10.0 g
<b>Dextrosa</b>	10.0 g
<b>Fosfato dipotásico</b>	5.0 g
<b>Peptona de casina</b>	20.0 g
<b>Peptona de soya</b>	1.0 g

Rehidratar 30 g del medio en 1 L de agua destilada y disolverlo por completo. Agregar 20 g de agar bacteriológico disolver perfectamente y esterilizar por autoclave 121 °C durante 15 minutos.

❖ **Medio para células**

➤ **Medio RPMI-1640/5 % SFB (50 mL)**

<b>MPMI-1640 Gibco®</b>	47.5 mL
<b>SFB Gibco®</b>	2.5 mL

Colocar en un tubo cónico de 50 mL estéril en la campana de flujo laminar.

❖ **Soluciones**

➤ **Pool de suero Humano (PSH)**

Recolectar suero humano de 10 individuos, mezclar y guardar a -20 °C.

➤ **Solución Salina Fisiológica (SSF) (1 L)**

<b>NaCl</b>	9.0 g
-------------	-------

Pesar 9 g de NaCl y disolver en 1 L de agua destilada, posteriormente ajustar a pH 7.2 y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

➤ **Solución de cloruro de amonio NH<sub>4</sub>Cl (1L)**

<b>Cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl)</b>	16.58 g
<b>Agua destilada (H<sub>2</sub>O)</b>	1000 mL

Pesar 16.58 g de NH<sub>4</sub>Cl disolver en 500 mL de agua destilada y aforar a 1000 mL. Esterilizar por autoclave a 121°C durante 15 minutos. Almacenar a 4 °C.

➤ **Solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (1L)**

<b>EDTA</b>	0.146 g
<b>Agua destilada (H<sub>2</sub>O)</b>	1000 mL

Pesar 0.146 g de sal sódica de EDTA mezclar en 500 mL de agua destilada y aforar a 1000 ml. Posteriormente esterilizar por autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Almacenar a 4 °C.

➤ **Solución de bicarbonato de sodio NaHCO<sub>3</sub> (1 L)**

<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	8.4 g
<b>Agua destilada (H<sub>2</sub>O)</b>	1000 mL

Pesar 8.4 g de NaHCO<sub>3</sub> mezclar en 500 mL de agua destilada y aforar a 1000 mL. Esterilizar por autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Almacenar a 4 °C.

➤ **Solución de lisis (50 mL)**

<b>Solución de cloruro de amonio</b>	25 mL
<b>Solución de EDTA</b>	10 mL
<b>Solución de bicarbonato de sodio</b>	5 mL
<b>Agua destilada</b>	10 mL

Se mezclan todas las soluciones en un tubo de 50 mL al momento de su uso ya que con el tiempo se pierde la capacidad de lisis.

➤ **Líquido de Turk**

<b>Cristal violeta en solución al 2 %</b>	3 gotas
<b>Ácido acético glacial al 95 %</b>	10 mL

➤ **Solución Salina Balanceada de Hank's (HBSS) libre de rojo de fenol (1 L)**

<b>Agua destilada</b>	1000 mL
<b>Dextrosa o glucosa</b>	10.00 g
<b>Cloruro de sodio</b>	8.00 g
<b>Cloruro de potasio</b>	0.40 g
<b>Cloruro de calcio</b>	0.14 g
<b>cloruro de magnesio</b>	0.10 g
<b>Sulfato de magnesio</b>	0.10 g
<b>Bicarbonato de sodio</b>	0.35 g
<b>Fosfato de potasio monobásico</b>	0.06 g
<b>Fosfato de sodio dibásico</b>	0.06 g

Pesar cada una de las sales en orden de aparición, disolver y aforar a 1 000 mL con agua destilada y ajustar a pH 7. Esterilizar por filtración usando una membrana e 0.22 µm. conservar a 4 °C.

➤ **Zymosán A de *Saccharomyces cerevisiae* 1mg/mL (Sigma Z4250)**

<b>Zymosán A</b>	200 mg
<b>SSI</b>	20 mL

Colocar 200 mg de Zymosán A en 200 de SSF, calentar en baño maría durante 30 minutos, posteriormente centrifugar a 5 000 rpm/10 min. Realizar lavados con SSF y enseguida hacer alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf, conservar a -20 °C.

➤ **Opsonización de Zymosán A**

<b>Zymosán A</b>	1 mL
<b>Suero AB</b>	200 µL
<b>HBSS</b>	800 µL

Se prepara al momento de su uso, descongelar el Zymosán a temperatura ambiente y posteriormente centrifugar a 5 000 rpm/5 min, quitar el sobrenadante y realizar un lavado con SSF, retirar nuevamente el sobrenadante, resuspender con HBSS (800 µL) y suero AB (200 µL); homogenizar y dejar incubar a 37 °C durante 30 minutos en estufa con atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Transcurrido el tiempo retirar de la incubación y centrifugar a 5 000 rpm/5 min, quitar el sobrenadante. Realizar dos lavados con HBSS y resuspender en 1 000 µL de HBSS y conservar a temperatura ambiente mientras se usa.

➤ **Luminol 0.8x10<sup>-4</sup> M Sigma**

<b>Luminol</b>	0.0141 g
<b>DMSO</b>	282 µL
<b>HBSS</b>	

Pesar 0.0141 g de luminol y disolver en 282 µL de DMSO, posteriormente aforar a 100 mL con HBSS y esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm en la campana de flujo laminar.

➤ **Buffer de carbonatos 0.1 M pH 9.5 (1 L)**

<b>Bicarbonato de sodio (Na HCO<sub>3</sub>)</b>	7.43 g
<b>Carbonato de sodio (Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>)</b>	1.59 g
<b>Agua destilada (H<sub>2</sub>O)</b>	1000 mL

Disolver las sales en 1 L de agua destilada, ajustar el pH a 9.5 y guardar a 4 °C.

➤ **Buffer de fosfatos (PBS) pH 7 (1 L)**

<b>Cloruro de sodio (NaCl)</b>	8.0 g
<b>Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</b>	11.6 g
<b>Fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	2.0 g
<b>Cloruro de potasio (KCl)</b>	2.0 g
<b>Agua destilada (H<sub>2</sub>O)</b>	1000 mL

Pesar las sales y disolver en 1 L de agua destilada ajustar a pH de 7 y esterilizar en autoclave 121 °C durante 15 minutos.

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

<b>PBS</b>	500 mL
<b>Tween-20</b>	250 µL

Se prepara al momento de usar y se puede guardar 5 días a 4 °C.

➤ **Solución diluyente (PBS/10%SFB) pH 7 (50 mL)**

<b>PBS</b>	45 mL
<b>SFB</b>	5 mL

Mezclar en un tubo de 50 mL el PBS con el SFB.

➤ **Ácido sulfúrico 2 N (100 mL)**

<b>Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)</b>	10.66 mL
<b>Agua destilada (H<sub>2</sub>O)</b>	100 mL

Colocar 10.66 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en un matraz y aforar a 100 mL con agua destilada.