



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD**  
**ANIMAL**

**"EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DEL PROBIÓTICO *BACILLUS***  
***SUBTILIS* EN GATOS JÓVENES ADULTOS"**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS  
P R E S E N T A

**MARÍA DE LOS ÁNGELES TORRES JUÁREZ**

TUTORA: DRA. YAZMÍN ALCALÁ CANTO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTORAL: DR. CARLOS GUTIÉRREZ OLVERA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DRA. MARÍA ESTHER ORTEGA CERRILLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL

MÉXICO, D.F

NOVIEMBRE 2014



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.

# DEDICATORIA



*Para ti que se que sigues conmigo a pesar de tu  
ausencia y te pido sostengas mi mano en este camino*

*hasta el día en que nos volvamos a encontrar*

*Gloria Méndez González*

*20/02/1933 - 24/03/2014*

# AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue posible gracias a:

La Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El financiamiento otorgado a través del proyecto UNAM-DGAPA-PAPIME PE212102.

La beca otorgada por el Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología (CONACYT).

El apoyo otorgado por la Universidad Nacional Autónoma de México a través del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Dra Yazmín Alcalá Cánto, muchas gracias por su apoyo y por no abandonarme a pesar de todos los problemas y conflictos.

A los miembros de mi jurado: Dr. José Antonio Montaraz Crespo, Dra. Edda Lidia Sciutto Conde, Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello y Dra. Karen Elizabeth Nava Castro, gracias por enriquecer con su conocimiento esta tesis.

Al Dr. Espiridión Ramos Martínez por el apoyo y las asesorías brindadas.

MVZ Erika Valdivieso Meza por otorgarme un espacio en su clínica veterinaria para la realización de este proyecto, así como por ayudarme en todos los muestreos.

A mi amiga Claudia Gaspar López y a la Señora Mirna Martínez por ayudarme a la realización de este proyecto al prestarme a sus gatitos para la experimentación.

A mi mamá Ángeles Juárez Silva por ayudarme a transportar la comida y la arena felina sana y salva hasta su destino.

A la familia Cedillo Valdivieso, gracias infinitamente por ayudarme a cuidar a los niños y a lograr en la medida de lo posible su bienestar durante su estancia.

Mi familia: Erika, Claudia, Elizabeth, Susana y Gilberto. Gracias no solo por ayudarme a quienes les corresponda con este proyecto, sino también por su apoyo durante estos dos años y especialmente en uno de los momentos más difíciles de mi vida, eso no se los podre pagar de ningún modo, bien dicen que los amigos son la familia que uno elige y yo elegí los mejores. Los amo.

A mis compañeritas Sara, Brenda, Alejandra, Rosalía, Janette e Itzel por tener en muchas ocasiones palabras de aliento, abrazos y la intención de hacerme reír a pesar de todo. 만난 기간동안 부터도와줘서 너무 고마워요. 많이 사랑해!!!

Por último pero no menos importantes, mis pequeños felinos: Loky, Vader, Sirious, Quique, Goya, Puma, Mimisa, Shaky, Thabatha, Nariz, Noar, Lluvia, Tohui y Chispa, así como a los felinos prestados : Tutsi, Marian, Lucrecia, Rodríguez, Momo, Homero, Jovita, Pachoncita, Pillo y Pilla. Muchísimas gracias por ser parte de mi vida. Siempre los pensare y tengo fe en que se encuentran bien.

# RESUMEN

## EVALUACION DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DEL PROBIÓTICO

### *Bacillus subtilis* EN GATOS JÓVENES ADULTOS

El presente estudio se realizó para determinar la eficacia inmunomoduladora de un probiótico adicionado a la dieta de gatos adultos jóvenes sanos e infectados naturalmente con coccidias del género *Cystoisospora spp.* Para ello se utilizaron 14 gatos clínicamente sanos en el primer grupo y 10 gatos infectados naturalmente con *Cystoisospora spp.* en el segundo grupo. Todos con una edad promedio de 6-8 meses y un peso promedio de 3.500 kg. Cada sujeto experimental fue alimentado con alimento comercial y se le administro una dosis equivalente a 250 millones de UFC del probiótico *Bacillus subtilis* en presentación de tableta de forma diaria durante 60 días en el primer grupo y durante 30 días en el segundo grupo. En el grupo de gatos sanos se realizaron muestreos sanguíneos a los días 0, 30, 45 y 60 de tratamiento. Se obtuvo plasma sanguíneo para la obtención y aislamiento de células mononucleares sanguíneas periféricas en las cuales se cuantificó la concentración de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) mediante la técnica 2,7-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (H2DCFDA) sin obtener diferencias estadísticamente significativas ( $P>0.05$ ). En el grupo de gatos infectados se realizaron muestreos sanguíneos para la obtención de plasma y suero a los días 0, 15 y 30 de tratamiento, así como la recolección de heces cada semana durante la duración del tratamiento. En el plasma sanguíneo se obtuvieron y aislaron las células mononucleares sanguíneas periféricas para la cuantificación de la concentración de ROS obteniendo una disminución estadísticamente significativa entre los tres muestreos ( $P<0.05$ ). En el suero se determinaron las concentraciones de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), Interleucina 10 (IL-10) e Interleucina 4 (IL-4) por medio de la técnica de ELISA. Se obtuvo un aumento estadísticamente significativo para las concentraciones de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ( $P<0.05$ ) y una disminución estadísticamente significativa para la IL-4 ( $P<0.05$ ) mientras que para las concentraciones de IL-10 no se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $P>0.05$ ). En el caso del número de ooquistes/gr de heces se obtuvo una disminución estadísticamente significativa a partir de la tercera semana de tratamiento ( $P<0.05$ ).

Los resultados obtenidos permiten concluir que con la complementación con el probiótico *Bacillus subtilis* en gatos sanos no se observaron cambios significativos en la generación de ROS, mientras que en los gatos infectados la complementación con dicho probiótico proporciona un efecto al disminuir la cantidad de ooquistes/gr de heces, las concentraciones séricas de ROS e IL-4 y al incrementar la concentración de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , así mismo no hubo un efecto en la concentración sérica de IL-10.

**Palabras clave:** Gatos jóvenes adultos, *Bacillus subtilis*, probiótico, *Cystoisospora spp*, Especies Reactivas de Oxígeno, citocinas.

# ABSTRACT

## EVALUATION OF THE IMMUNOMODULATORY EFFECT OF PROBIOTIC *Bacillus subtilis* IN YOUNG ADULT CATS

The aim of the present study was to determine if addition of a probiotic to young adult cats diet improves their health. Fourteen healthy cats were assigned to group 1 and 10 *Cystoisospora* spp.-naturally-infected cats were included in group 2. All animals averaged 6-8 months and a mean weight of 3.5 kg. Each experimental subject of group 1 was fed with a commercial diet and administered a dose of 250 million CFU of the probiotic *Bacillus subtilis* in a tablet presentation daily during 60 days in group 1 and during 30 days in group 2. Blood sampling was carried out in the control group during 0, 30, 45 and 60 days of treatment. Plasma was obtained and reactive oxygen species (ROS) were quantified using the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) method and no statistical difference ( $P>0.05$ ) was observed. In the infected group of cats, blood samples were collected to obtain plasma and sera at 0, 15 and 30 days during treatment, and fecal samples were as well collected every week throughout the whole treatment period. In plasma, ROS concentrations were quantified. A significant decrease was observed in the three sampling periods ( $P<0.05$ ). Concentrations of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), interleukin-10 (IL-10) and interleukin 4 (IL-4) were determined using the ELISA test. A significant ( $P<0.05$ ) increase was observed for TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and a decrease was determined for IL-4 levels; whereas IL-10 levels remained unchanged (IL-10). Regarding coprology, a significant ( $P<0.05$ ) decrease in oocysts/gram was observed from week 3 until the end of the study. These data suggest that complementing a diet with the probiotic *Bacillus subtilis* in healthy cats does not cause a significant effect in health under the conditions of the present study; whereas in infected cats the addition of such probiotic to the diet provides an effect through the decrease of oocysts in feces and concentrations of ROS and IL-4; while increasing TNF- $\alpha$  and INF- $\gamma$ ; though concentrations of IL-10 remained unchanged.

**Keywords:** Young adult cats, *Bacillus subtilis*, probiotic, *Cystoisospora spp.*, reactive oxygen species, cytokines.

# CONTENIDO

<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	X
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XII
<b>CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPITULO 2: ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 MICROBIOTA INTESTINAL.....	3
2.1.1. <i>Funciones principales de la microbiota</i> .....	3
2.1.1.1 <i>Funciones metabólicas</i> .....	3
2.1.1.2 <i>Funciones tróficas: crecimiento celular epitelial</i> <i>y diferenciación</i> .....	4
2.1.1.3 <i>Funciones protectoras: el efecto de barrera</i> .....	5
2.2 CÉLULAS QUE CONTRIBUYEN A LA FUNCIÓN PROTECTORA DE LA MUCOSA INTESTINAL.....	6
2.3 INTERACCIÓN DE LA MICROBIOTA CON EL SISTEMA INMUNE DEL HUESPED.....	8
2.3.1 <i>Componentes de las bacterias comensales con efectos en la</i> <i>inmunidad innata y/o adaptativa</i> .....	9
2.4 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LEUCOCITOS FAGOCÍTICOS.....	12
2.5 LA MICROFLORA INTESTINAL EN PERROS Y GATOS.....	13
2.6 CITOCINAS.....	16
2.6.1 <i>Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-<math>\alpha</math>)</i> .....	16
2.6.2 <i>Interferón gamma (IFN-<math>\gamma</math>)</i> .....	17

2.6.3 Interleucina 10 (IL-10).....	18
2.6.4 Interleucina 4 (IL-4).....	18
2.7 COCCIDIOSIS EN PERROS Y GATOS.....	19
2.7.1 Biología.....	19
2.7.2 Descripción de la enfermedad.....	19
2.7.3 Morfología.....	20
2.7.4 Ciclo biológico.....	20
2.7.5 Ciclo biológico: huésped paraténico.....	22
2.7.6 Patogenia de la enfermedad y signos clínicos.....	23
2.7.7 Diagnóstico.....	23
2.7.8 Tratamiento.....	23
2.7.9 Control.....	24
2.8 ALIMENTOS FUNCIONALES.....	24
2.9 PROBIÓTICOS.....	26
2.9.1 Características.....	26
2.9.2 Beneficio de los probióticos.....	27
2.9.3 Mecanismos de acción.....	27
2.10 EL USO DE LAS BACTERIAS FORMADORAS DE ESPORAS COMO PROBIÓTICOS.....	29
2.10.1 Esporas bacterianas.....	29
2.10.2 El uso de los <i>Bacillus</i> como probióticos.....	29
2.10.3 Características del probiótico <i>Bacillus subtilis</i> .....	30

<b>CAPITULO 3: OBJETIVOS</b> .....	32
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3.3 HIPÓTESIS.....	32
<b>CAPITULO 4: MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	33
4.1 MODELO ANIMAL.....	33
4.2 CONSIDERACIONES DE ALOJAMIENTO.....	33
4.3 ALIMENTACIÓN Y COMPLEMENTACIÓN.....	34
4.4 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	37
4.5 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	37
4.6 MÉTODO ESTADÍSTICO.....	38
<b>CAPITULO 5: RESULTADOS</b> .....	39
5.1 RESULTADOS DEL GRUPO DE GATOS JÓVENES ADULTOS SANOS.....	39
5.2 RESULTADOS DEL GRUPO DE GATOS JÓVENES ADULTOS INFECTADOS CON <i>Cystoisospora</i> spp.....	41
<b>CAPITULO 6: DISCUSIÓN</b> .....	48
<b>CAPITULO 7: CONCLUSIONES</b> .....	55
<b>CAPITULO 8: REFERENCIAS</b> .....	58
<b>ANEXOS</b> .....	68
ANEXO 1.....	68
ANEXO 2.....	69
ANEXO 3.....	70
ANEXO 4.....	71

ANEXO 5.....	72
ANEXO 6.....	73
ANEXO 7.....	74
ANEXO 8.....	75
ANEXO 9.....	76

# Lista de cuadros

## CAPÍTULO 2

Cuadro 2.1: Principales grupos bacterianos identificados en el tracto gastrointestinal felino usando métodos moleculares.....	15
---	----

## CAPÍTULO 4

Cuadro 4.1: Análisis garantizado del alimento proporcionado durante la experimentación.....	34
Cuadro 4.2: Estimación del contenido de energía metabolizable del alimento proporcionado durante la experimentación.....	35

## CAPÍTULO 5

Cuadro 5.1: Promedio de la concentración de especies reactivas de oxígeno (URF) en gatos jóvenes adultos sanos complementados con el probiótico <i>Bacillus subtilis</i> .....	39
Cuadro 5.2: Promedio de la concentración de especies reactivas de oxígeno (URF) en gatos jóvenes adultos infectados con <i>Cystoisospora spp</i> complementados con el probiótico <i>Bacillus subtilis</i> .....	41
Cuadro 5.3: Promedio de la concentración sérica de Factor de Necrosis Tumoral alfa (pg/mL) en gatos jóvenes adultos infectados con <i>Cystoisospora spp</i> complementados con el probiótico <i>Bacillus subtilis</i> .....	42
Cuadro 5.4: Promedio de la concentración sérica de Interferón gamma (pg/mL) en gatos jóvenes adultos infectados con <i>Cystoisospora spp</i> complementados con el probiótico <i>Bacillus subtilis</i> .....	43

Cuadro 5.5: Promedio de la concentración sérica de Interleucina 10 (pg/mL) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp* complementados con el probiótico *Bacillus subtilis*.....44

Cuadro 5.6: Promedio de la concentración sérica de Interleucina 4 (pg/mL) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp* complementados con el probiótico *Bacillus subtilis*.....45

Cuadro 5.7: Promedio de la carga parasitaria (Ooquistes Por Gramo de Heces) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp* complementados con el probiótico *Bacillus subtilis*.....46

# Lista de figuras

## CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Ciclo biológico de <i>Cystoisospora</i> spp.....	21
Figura 2.2. Ciclo biológico de <i>Cystoisospora</i> spp incluyendo al huésped paraténico.....	22
Figura 2.3. Espora de <i>Bacillus subtilis</i> C-3102.....	31

## CAPÍTULO 4

Figura 4.1. Administración del probiótico <i>Bacillus subtilis</i> mezclado con alimento húmedo.....	36
--	----

## CAPITULO 5

Figura 5.1. Efecto de la complementación de la dieta con el probiótico <i>Bacillus subtilis</i> en la concentración de especies reactivas de oxígeno (URF) en gatos jóvenes adultos sanos.....	40
Figura 5.2. Efecto de la complementación de la dieta con el probiótico <i>Bacillus subtilis</i> en la concentración de especies reactivas de oxígeno (URF) en gatos jóvenes adultos infectados con <i>Cystoisospora</i> spp.....	41
Figura 5.3. Efecto de la complementación de la dieta con el probiótico <i>Bacillus subtilis</i> en la concentración sérica de Factor de Necrosis Tumoral alfa (pg/mL) en gatos jóvenes adultos infectados con <i>Cystoisospora</i> spp.....	42

Figura 5.4. Efecto de la complementación de la dieta con el probiótico *Bacillus subtilis* en la concentración sérica de Interferón gamma (pg/mL) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp*.....43

Figura 5.5. Efecto de la complementación de la dieta con el probiótico *Bacillus subtilis* en la concentración sérica de Interleucina 10 (pg/mL) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp*.....44

Figura 5.4. Efecto de la complementación de la dieta con el probiótico *Bacillus subtilis* en la concentración sérica de Interleucina 4 (pg/mL) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp*.....45

Figura 5.4. Efecto de la complementación de la dieta con el probiótico *Bacillus subtilis* en la carga parasitaria (Log<sub>10</sub> Ooquistes Por Gramo de Heces) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp*.....47

# CAPITULO 1

## INTRODUCCIÓN

La alimentación de los animales de compañía tiene objetivos propios que la diferencian de la alimentación de los animales de abasto, en los cuales se busca optimizar la producción. Los animales de compañía son en muchas ocasiones considerados como miembros de la familia y se les trata como tales. Ello implica que su alimentación, además de suministrar una cantidad de nutrientes correcta, equilibrada y disponible, debe permitirles optimizar su salud, actividad y longevidad.

Perros y gatos son las especies más extendidas como animales de compañía y entre ellos existen marcadas diferencias que pueden ayudar a comprender mejor sus particularidades nutricionales (Boixeda, 2000).

Desde hace muchos años se sabe que existe una estrecha relación entre la microflora intestinal y la salud de los individuos, ya que se ha demostrado que estos microorganismos tienen una función importante de protección de la integridad del epitelio intestinal frente a las infecciones (Quera y Quingley, 2005).

Hoy en día se sabe que es posible manipular la microbiota intestinal por medio de la alimentación para obtener beneficios sobre la salud de los animales. De esta forma surgen los probióticos, los cuales se definen como organismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico en la salud del huésped. Estos productos han sido utilizados en especies productivas con grandes beneficios (aumento en la masa corporal, conversión alimenticia y disminución en la frecuencia de diarreas), pero su uso en animales de compañía ha sido poco estudiado y solamente se han utilizado en la práctica de forma empírica (Vázquez, 2009).

El uso de los probióticos en la salud humana ha traído grandes beneficios ayudando al tratamiento de enfermedades gastrointestinales causadas tanto por agentes infecciosos así como por enfermedades de origen idiopático o causadas por estrés. Tanto los

propietarios de pequeñas especies como médicos veterinarios han utilizado los probióticos de forma empírica, por lo tanto la finalidad de este estudio es proporcionar información científica que permita determinar si el uso del probiótico *Bacillus subtilis* en gatos puede tener un efecto benéfico en su salud.

# CAPITULO 2

## ANTECEDENTES

### **2.1 Microbiota intestinal**

El término “microbiota” se refiere a la comunidad diversa de microorganismos que colonizan un nicho particular en el huésped (piel y membranas mucosas del tracto respiratorio, gastrointestinal y urogenital) y aunque hay variaciones entre y dentro de los individuos, esta microbiota posee una “estabilidad funcional” que le permite mantener su capacidad de llevar a cabo numerosas funciones biológicas (Hooper *et al*, 2002).

Estas poblaciones bacterianas residentes realizan un gran número de contribuciones a la salud del huésped, incluyendo el mejoramiento de la eficiencia digestiva, promoviendo el desarrollo del sistema inmune y limitando la colonización de bacterias patógenas. A cambio, los microorganismos residentes obtienen como beneficio un ambiente protegido rico en nutrientes. Así, esta asociación entre el huésped y su microbiota constituye una simbiosis benéfica mutua (Duerkop *et al*, 2009).

#### **2.1.1 Funciones principales de la microbiota**

El uso de animales criados bajo condiciones libres de patógenos ha proporcionado información importante acerca del efecto fisiológico y patológico de la comunidad microbiana en el huésped. La evidencia obtenida a través de estos estudios sugiere que la microbiota intestinal tiene importantes funciones metabólicas, tróficas y de protección (Falk *et al*, 1998).

##### **2.1.1.1 Funciones metabólicas**

Una de las principales funciones metabólicas de la microbiota colónica es la fermentación de residuos alimenticios no digeribles y de moco endógeno producido por el epitelio. La diversidad genética de la comunidad microbiana provee diversas enzimas y vías bioquímicas que difieren de las fuentes constitutivas del propio huésped. El resultado general de esta actividad metabólica compleja es la recuperación de energía metabólica y

de sustratos absorbibles para el huésped. Los carbohidratos no digeribles incluyen polisacáridos (celulosa, hemicelulosa, pectinas y gomas), algunos oligosacáridos que escapan a la digestión, azúcares no absorbidos y alcoholes. El objetivo final de esta actividad metabólica es la generación de ácidos grasos de cadena corta (Cummings *et al*, 1996).

El metabolismo anaeróbico microbiano de péptidos y proteínas también produce ácidos grasos de cadena corta, pero al mismo tiempo genera una serie de sustancias potencialmente tóxicas que incluyen amoníaco, aminas, fenoles, tioles e indoles. Las proteínas disponibles incluyen la elastina y colágeno de origen alimenticio, enzimas pancreáticas, células epiteliales y algunas bacterias lisadas.

Los microorganismos colónicos también juegan un papel importante en la síntesis de vitaminas y en la absorción de calcio, magnesio y hierro. La absorción de iones en el ciego se incrementa gracias a la fermentación de carbohidratos y a la producción de ácidos grasos de cadena corta, especialmente el acetato, butirato y propionato. Estos tres ácidos grasos tienen importantes funciones en la fisiología del huésped. El butirato es consumido casi en su totalidad por el epitelio colónico y es la mayor fuente de energía de los colonocitos. El acetato y el propionato que se encuentran en la sangre porta son eventualmente metabolizados por el hígado (propionato) o en tejidos periféricos, particularmente el músculo (acetato)(Cummings *et al*, 1996).

#### **2.1.1.2 Funciones tróficas: crecimiento celular epitelial y diferenciación**

Posiblemente el papel más importante de los ácidos grasos de cadena corta en la fisiología colónica es su efecto trófico sobre el epitelio intestinal. La diferenciación de las células epiteliales es afectada considerablemente debido a la interacción con microorganismos residentes. Los tres ácidos grasos de cadena corta más importantes estimulan la proliferación celular epitelial y la diferenciación tanto en el intestino delgado como en el intestino grueso.

### **2.1.1.3 Funciones protectoras: el efecto de barrera**

Las superficies epiteliales han desarrollado mecanismos protectores para resistir a la invasión de microorganismos exógenos y endógenos. La microbiota forma parte integral de los mecanismos de defensa de las membranas mucosas y de la piel protegiendo al organismo de microorganismos potencialmente patógenos (Turner, 2009). Cuando la microbiota posee una composición óptima, ésta previene la unión y multiplicación de microorganismos patógenos o virulentos en las superficies mucosas y la invasión de éstos en las células epiteliales llegando a la circulación (Tlaskalová-Hogenová *et al*, 2011). El equilibrio entre especies de bacterias residentes provee una estabilidad en la población microbiana dentro del mismo individuo en condiciones normales. Sin embargo el uso de antibióticos puede afectar este balance y permitir el crecimiento excesivo de especies con potencial patogénico.

Las bacterias no patogénicas compiten por la disponibilidad de nutrientes y mantienen su hábitat colectivo al administrar y consumir todos los recursos disponibles. Esta relación simbiótica previene una sobreproducción indeseada de algún nutriente, lo cual puede favorecer la aparición de competidores microbianos con un potencial patogénico para el huésped. El huésped provee activamente los nutrientes que las bacterias necesitan así como un ambiente protegido en el cual pueden multiplicarse (Hooper *et al*, 2002). Finalmente las bacterias pueden inhibir el crecimiento de sus competidores al producir sustancias antimicrobianas llamadas bacteriocinas. La habilidad para sintetizar bacteriocinas está ampliamente distribuida entre poblaciones microbianas del tubo digestivo gastrointestinal. El huésped puede controlar la producción de dichas sustancias ya que la mayoría de éstas son compuestos proteínicos degradables por proteasas digestivas. De esta manera el papel de las bacteriocinas está restringido a ciertas porciones del tubo digestivo gastrointestinal (Guarner y Malagelada, 2003).

## **2.2 Células que contribuyen a la función protectora de la mucosa intestinal**

Lejos de ser una población celular homogénea, el epitelio intestinal está compuesto por diversos tipos celulares (enterocitos, células de Paneth, células caliciformes) que contribuyen a limitar la penetración bacteriana a través de la barrera epitelial y de esa forma mantener la ignorancia inmunológica hacia los simbioses intestinales.

Las células más abundantes en la superficie intestinal son los enterocitos. Las membranas de los enterocitos junto con las uniones estrechas que forman con las células adyacentes son esenciales para prevenir la penetración bacteriana mientras permiten el flujo de nutrientes hacia los tejidos. Además de proveer una importante barrera física, los enterocitos juegan un papel importante promoviendo la compartimentación de las bacterias simbióticas al secretar una variedad de péptidos antimicrobianos. Estos antibióticos naturales son miembros de diversas familias peptídicas tales como las defensinas y catelicidinas que promueven la muerte bacteriana al modificar la integridad de la pared celular bacteriana. Los péptidos antimicrobianos son producidos constitutivamente o pueden ser inducidos por bacterias (Hooper *et al*, 2003).

La superficie intestinal alberga otros tipos de células menos abundantes que también ayudan a limitar la penetración bacteriana a los tejidos. Las células caliciformes tanto en el intestino delgado como en el intestino grueso secretan una gran cantidad de mucina, la cual está compuesta por proteínas altamente glicosiladas que forman una capa protectora de moco sobre la superficie epitelial. La capa de moco está conformada por dos estratos. El externo está colonizado por bacterias mientras que el interno es resistente a la penetración bacteriana formando una zona protegida adyacente a la superficie epitelial. El bajo número de bacterias en el estrato mucoso interno también es resultado de los factores antibacterianos secretados por las células epiteliales y que son retenidos por la capa de moco para prevenir su diseminación al interior del lumen.

Otras células epiteliales intestinales que juegan un papel importante en la limitación de la penetración bacteriana hacia los tejidos son las células de Paneth. Las células de Paneth secretan la gran mayoría de proteínas antimicrobianas producidas por el intestino. Estas células epiteliales especializadas están situadas en la base de las criptas del intestino delgado y albergan gránulos secretores que contienen proteínas microbicidas que

incluyen defensinas y lisozimas. Cuando las células de Paneth perciben señales bacterianas reaccionan descargando sus gránulos microbicidas al interior del lumen intestinal. Las células de Paneth son esenciales para controlar la penetración hacia la mucosa tanto de bacterias simbióticas como de bacterias patógenas.

Además de las diversas líneas celulares epiteliales que protegen a la superficie mucosa de una invasión bacteriana, las células inmunes adaptativas subepiteliales localizadas en agregados linfoides conocidos como Placas de Peyer ayudan al aislamiento de bacterias entéricas en el intestino. Estos agregados linfoides están cubiertos por un epitelio especializado que contiene células M dedicadas al muestreo antigénico constante. Los linfocitos subyacentes están ordenados en folículos prominentes que contienen células T y B. Las células B productoras de IgA son las más abundantes y mejor caracterizadas dentro de las poblaciones de células inmunes adaptativas en la mucosa intestinal. Estas células residen en la lámina propia y secretan IgA específica bacteriana la cual atraviesa el epitelio por medio de transcitosis y es depositada en la superficie apical de las células epiteliales. La IgA es esencial en el mantenimiento de la compartimentación luminal de bacterias intestinales (Duerkop *et al*, 2009). El mecanismo exacto por el cual la IgA confina a las bacterias simbióticas al lumen intestinal no está claro pero puede envolver actividades como la captura de bacterias en la capa de moco y el fomento en la fagocitosis de las bacterias que han invadido el tejido mucoso (Fagarasany Honjo, 2003).

Finalmente, un factor crítico en el mantenimiento de la ignorancia inmunológica sistémica a la microbiota intestinal es la rápida eliminación de los simbioses que penetran a través de la barrera epitelial. Estas bacterias son rápidamente fagocitadas y destruidas por macrófagos en la lámina propia a diferencia de las bacterias patógenas que activamente interfieren con los mecanismos microbicidas de los macrófagos, permitiendo así su supervivencia y replicación en los tejidos. La susceptibilidad de las bacterias simbióticas a los mecanismos microbicidas de los macrófagos representa una coadaptación evolutiva con su huésped, debido a que la supresión o evasión de la fagocitosis podría comprometer la salud del huésped e incluso destruir a los microorganismos del propio ambiente intestinal (Macpherson y Uhr, 2005).

### **2.3 Interacción de la microbiota con el sistema inmune del huésped**

El tejido linfoide asociado al intestino (GALT) es la parte más amplia y compleja del sistema inmune, no solo debido a que en este órgano se encuentran una gran cantidad de antígenos en comparación con otros órganos, sino también porque debe diferenciar claramente entre organismos invasivos y antígenos inofensivos, tales como las proteínas y las bacterias comensales (Mowat, 2003).

La mucosa intestinal es uno de los principales medios de interacción entre el sistema inmune y el ambiente externo, por lo tanto el sistema linfoide asociado a intestino posee la mayor cantidad de células inmunocompetentes. La comunicación entre el huésped y las bacterias en la superficie mucosa parecer tener un papel importante en el desarrollo del sistema inmune competente. Los animales criados en un ambiente libre de patógenos poseen una menor densidad de células linfoides en la mucosa intestinal, las estructuras foliculares especializadas son más pequeñas y las concentraciones sanguíneas circulantes de inmunoglobulinas son bajas (Tannock, 2001).

La colonización microbiana del tubo digestivo intestinal afecta la composición del tejido linfoide asociado a intestino. Inmediatamente después de la exposición a microorganismos lumbinales, el número de linfocitos intraepiteliales aumenta considerablemente, los centros germinales con células productoras de inmunoglobulinas se convierten rápidamente en folículos y las concentraciones de inmunoglobulinas séricas se incrementan sustancialmente.

La respuesta inmune a los microorganismos depende de los componentes innatos y adaptativos, tales como la secreción de inmunoglobulinas. La respuesta innata es mediada no sólo por leucocitos tales como los neutrófilos o macrófagos que pueden fagocitar y matar patógenos, sino también por las células epiteliales intestinales que coordinan las respuestas del huésped al sintetizar una amplia gama de mediadores inflamatorios y transmiten señales hacia las células subyacentes en la mucosa. El sistema inmune innato tiene que discriminar patógenos potenciales de bacterias comensales a través del uso de un número restringido de receptores preformados. Las células mamíferas expresan una serie de receptores que reconocen patrones bacterianos que no se encuentran en eucariotes superiores. Este sistema permite el reconocimiento

bacteriano inmediato, así como una respuesta rápida ante un cambio eventual (Guarner y Malagelada, 2003).

### **2.3.1 Componentes de las bacterias comensales con efectos en la inmunidad innata y/o adaptativa**

No sólo las bacterias vivas sino también los componentes que expresan, secretan o son liberados debido a la muerte microbiana son responsables de diversos efectos inmunomoduladores. Entre esos componentes se encuentran los siguientes:

- Lipopolisacáridos (endotoxinas): las endotoxinas son fragmentos de lipopolisacáridos solubles de la membrana externa de las bacterias gram negativas . La porción polisacárida de la endotoxina contiene un epítipo antigénico específico para el organismo, mientras que la porción lipídica es requerida para la unión de las células y la activación de procesos que proveen resistencia a la infección de una manera no específica, por ejemplo, promoviendo la inmunidad innata (Arora *et al*, 2011). Las proteínas de unión a lipopolisacáridos (LBP) presentes en esta monocapa interactúan con las moléculas CD14 expresadas por monocitos y macrófagos. Posterior al reconocimiento de los lipopolisacáridos una variedad de tipos celulares que expresan sus Receptores Reconocedores de Patrones (PRR), en este caso TLR4, se inician acciones defensivas que regulan la protección hacia los microorganismos, incluyendo la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y la secreción de citocinas inflamatorias. Las citocinas inician una cascada de señales a las células de la respuesta inmune adaptativa y las prepara para el desarrollo de una respuesta inmune específica contra el antígeno. La exposición a endotoxinas también resulta en la producción de defensinas, las cuales comprenden diversas familias de péptidos antibacterianos, antifungales y antivirales (Tlaskalová-Hogenová *et al*, 2004).
- Peptidoglicanos (PGN): Los peptidoglicanos son componentes de la pared celular en todas las bacterias, pero es especialmente abundante en la pared celular de las bacterias Gram positivas, donde otros polisacáridos y proteínas se unen a ellos de modo covalente. En las bacterias Gram negativas los PGN están localizados bajo

los lipopolisacáridos presentes en la membrana externa. Estos envuelven la membrana citoplasmática en la bacteria y mantienen su forma. Los peptidoglicanos están formados por moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidas por un enlace beta 1-4, y son reconocidos por el sistema inmune innato eucariótico por medio de diversas moléculas de reconocimiento que incluyen al TLR2, , las proteínas citoplasmáticas Nod1 y Nod2, la familia de las proteínas reconocedoras de peptidoglicanos (PGRPs) y a las enzimas peptidoglicanolíticas (lisozimas y amidasas), las cuales tienen efectos directos antimicrobianos. Las proteínas reconocedoras de peptidoglicanos se expresan en leucocitos polimorfonucleares, piel, glándulas salivales, cavidad oral, tracto gastrointestinal, ojos e hígado. Estas tienen como función controlar la adquisición y mantenimiento de la microbiota intestinal normal, la cual protege al huésped de una inflamación exacerbada y daño tisular (Dziarsky, 2003).

- Moléculas CpG contenidas en el ADN bacteriano: Las moléculas CpG no metiladas se encuentran contenidas en las bacterias más no así en el ADN de los vertebrados. La estructura fundamental está compuesta por Oligodeoxiribonucleótidos conformados por un núcleo de citosina-guanina no metilado (CpG). La carencia de actividad estimuladora del ADN mamífero resulta de diferencias estructurales con el ADN bacteriano debido a que el ADN mamífero contiene pocas moléculas CpG no metiladas. El reconocimiento de las moléculas CpG requiere de receptores tipo Toll los cuáles acarrear alteraciones celulares en el balance de óxido-reducción y la inducción de vías celulares de señalización que incluyen a las proteincinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y al factor nuclear kappa-beta. Este tipo de receptores se encuentran principalmente en células del sistema inmune innato, particularmente células dendríticas y macrófagos (Hacker *et al*, 2002). Estas moléculas desencadenan una inmunidad humoral al inducir la proliferación de células B y células dendríticas plasmocitoides, así como la secreción de una variedad de citocinas, quimiocinas e IgM. Las moléculas CpG DNA activan a los monocitos y macrófagos para secretar citocinas, especialmente IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha\beta$ . También pueden estimular a los macrófagos a producir citocinas que actúan sobre células NK para inducir la actividad lítica y la secreción

de IFN- $\gamma$ . El IFN- $\gamma$  secretado promueve la activación de células B y la secreción de IgG (Cai *et al*, 2014).

- Proteínas de choque térmico (Hsps): Son moléculas abundantes que son expresadas constitutivamente en todas las especies eucarióticas y procarióticas constituyendo del 5-10% del total proteico en los diferentes tipos celulares. Sus concentraciones intracelulares pueden ser incrementadas de dos a tres veces por daños o lesiones que induzcan la liberación de proteínas. Las proteínas de choque térmico han sido ampliamente definidas como proteínas de estrés celular, ya que el incremento en la temperatura, la exposición al estrés oxidativo, las deficiencias nutricionales, la radiación ultravioleta, químicos, etanol, infecciones virales y la reperfusión posterior a la isquemia pueden inducir la expresión de estas proteínas (Strbo *et al*, 2013). Aunque las Hsps han sido relacionadas con la autoinmunidad debido a que son moléculas sobre reguladas que activan a la inmunidad adaptativa durante el estrés inflamatorio, recientemente se han considerado como factores desencadenantes para la inmunidad innata vía la activación de receptores tipo Toll (Wilson *et al*, 2002).
- Superantígenos (SAG): Son proteínas extracelulares cuyas propiedades incluyen la pirogenicidad, la activación mitogénica por subtipos específicos de células T y la habilidad para incrementar la susceptibilidad del huésped a un choque endotóxico así como la supresión en la producción de inmunoglobulinas. Estos superantígenos evitan el proceso convencional de presentación del antígeno, activando un gran número de células T sin la restricción del MHC II. Esto conlleva a una activación inmune extensa con una gran liberación de citocinas proinflamatorias tales como TNF- $\alpha$ , IL-2 e IFN- $\gamma$ , lo cual puede resultar en choque y daño orgánico generalizado (Commons *et al*, 2014). Las células T reconocen a estos mitógenos a través de algunos tipos de receptores en sus cadenas variables beta y pueden estimular la inducción de la activación policlonal de las células B por medio de una respuesta timodependiente (Tlaskalová-Hogenová *et al*, 2004).

## 2.4 Especies Reactivas de Oxígeno en leucocitos fagocíticos

Las especies reactivas de oxígeno generalmente son moléculas de oxígeno o algunos compuestos del oxígeno, nitrógeno e hidrógeno que presentan una reactividad más alta que el oxígeno molecular. Estos incluyen a algunas moléculas como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), algunos iones como el ion hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ) y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y algunos radicales como el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y el radical superóxido ( $\text{O}_2^- \cdot$ ). Un radical (también llamado “radical libre”) se refiere a moléculas que poseen al menos un electrón no pareado en su capa más externa de electrones. Debido a la presencia de un electrón no pareado, los radicales libres son altamente reactivos a oxidar diversas biomoléculas como las proteínas, ADN y lípidos causando así una variedad de enfermedades (Lu *et al*, 2006).

La generación de especies reactivas de oxígeno juega un papel importante en el sistema inmune. Los fagocitos incluyendo a los macrófagos y neutrófilos son capaces de generar una gran cantidad de estos radicales libres que son importantes para las respuestas inmunes fagocíticas antitumorales y antimicrobianas (Curtin *et al*, 2002).

Los leucocitos fagocíticos cuando son apropiadamente estimulados consumen oxígeno y producen superóxido en un proceso denominado estallido respiratorio. El estallido respiratorio es mediado por el complejo NADPH-oxidasa que es un sistema multicompuesto que es rápidamente ensamblado posterior a la activación de los fagocitos, lo cual conlleva a la producción de radical superóxido y peróxido de hidrógeno. Tanto el peróxido de hidrógeno como el radical superóxido son componentes del sistema antimicrobiano oxígeno-dependiente de los leucocitos fagocíticos. Los efectos citotóxicos de estas moléculas se relacionan con su habilidad de reaccionar con productos de otros sistemas microbicidas en la célula para generar especies reactivas de oxígeno adicionales como el radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ), el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) y el ozono ( $\text{O}_3$ ). El superóxido puede reaccionar con el ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) y con el óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) para producir radical hidroxilo. El ácido hipocloroso y el óxido nítrico son producidos en las células fagocíticas por la mieloperoxidasa y la sintetasa de óxido nítrico respectivamente, lo cual da como resultado la formación de hipoclorito y peróxido de nitrito que provocan la destrucción microbiana. El oxígeno singlete puede ser formado por una dismutación no enzimática del superóxido.

Entre los estímulos fisiológicos capaces de activar a la NADPH-oxidasa están las partículas fagocitables como las bacterias o las levaduras, algunas moléculas que inducen quimiotaxis, ciertos lípidos bioactivos y anticuerpos. Otros agentes “no fisiológicos” también pueden activar a la oxidasa, tales como los ésteres de forbol, ácidos grasos, retinoides y fluoruro de sodio (Robinson, 2008).

## **2.5 La microflora gastrointestinal en perros y gatos**

Debido a las diferencias anatómicas y fisiológicas cada compartimento gastrointestinal alberga un ecosistema microbiano único, por lo tanto cada perro y gato alberga un perfil microbiano único e individual (Suchodolski *et al*, 2005). Las diferencias individuales principales radican en las especies bacterianas presentes y las cepas que las componen.

La cavidad oral felina y canina contiene aproximadamente  $10^7$  UFC/mL de fluido salival y alberga una población diversa de bacterias tanto aerobias como anaerobias. El continuo comportamiento de acicalamiento, el alto contenido de humedad y la exposición al ambiente contribuyen de manera activa al incremento en el número de bacterias orales presentes.

El estómago de los perros y gatos contiene un número menor de microorganismos ( $10^1$  a  $10^5$  UFC/g de contenido) en comparación con la cavidad oral debido a las condiciones ácidas del estómago, las cuales son desfavorables para la mayoría de los microorganismos. El número de bacterias aeróbicas es similar al de bacterias anaeróbicas y hay una predominancia de bacterias Gram positivas.

En el intestino delgado de perros y gatos el número total de bacterias se incrementa gradualmente desde el duodeno y el yeyuno ( $10^5$  a  $10^6$  UFC/g de contenido) hasta el final del íleon ( $10^7$  UFC/g de contenido). Los géneros *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son las bacterias aeróbicas y anaeróbicas más comunes presentes en perros y gatos, aunque se ha reportado que los gatos pueden tener una población de bacterias anaeróbicas mayor su intestino delgado comparado con los perros (Johnston *et al*, 1993).

El intestino grueso (ciego y colon) en perros y gatos alberga el mayor número de microorganismos, con poblaciones de entre  $10^9$  y  $10^{10}$  UFC/ gr de contenido. Las bacterias

aeróbicas gram negativas y las bacterias anaeróbicas formadoras y no formadoras de esporas parecen predominar. Aunque la mayoría de los microorganismos presentes en el intestino delgado también son detectados en el intestino grueso, la prevalencia entre esos grupos bacterianos principales difiere entre estas dos regiones (Kil y Swanson, 2011).

Muchos estudios han descrito los productos metabólicos generados por la microbiota canina y felina, incluyendo a los ácidos grasos de cadena corta, lactato, amoniaco y otros productos finales. La habilidad de la microbiota para fermentar productos dietarios en ácidos grasos de cadena corta es de vital importancia para la salud intestinal. De estos, el acetato, propionato y butirato son los más abundantes y constituyen aproximadamente el 60, 25 y 10 % de los ácidos grasos volátiles presentes en muestras fecales caninas y felinas (Sunvold *et al*, 1995).

Aunque se han observado marcadas diferencias en la composición filogenética de la microbiota intestinal entre animales de la misma especie, los productos metabólicos son similares entre individuos, lo cual sugiere que los individuos comparten un amplio rango de genes microbianos entre los miembros de la comunidad bacteriana que son capaces de realizar funciones similares y esto implica que si un grupo microbiano es desplazado debido a distintos trastornos otros miembros de la comunidad microbiana son capaces de mantener una función estable en el ecosistema (Suchodolski *et al*, 2005).

**Cuadro 2.1. Principales grupos bacterianos identificados en el tracto gastrointestinal felino usando métodos moleculares**

<b>Phylum</b>	<b>Orden</b>	<b>Familia</b>	<b>Género</b>
<b>Actinobacteria</b>	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium
	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae	Atopobium, Collinsella
<b>Bacteroidetes</b>	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
		Prevotellaceae	Paraprevotella
<b>Fusobacteria</b>	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
<b>Proteobacteria</b>	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrio
	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia, Salmonella
	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Pasteurella
<b>Firmicutes</b>	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus
	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus
		Lactobacillaceae	Lactobacillus
		Streptococcaceae	Streptococcus
	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
		Lachnospiraceae	Blautia, Roseburia, Clostridium XIVa
		Peptostreptococcaceae	Clostridium XI
		Ruminococcaceae	Faecalibacterium, Rumicoccus, Clostridium IV
Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Allobaculum, Catenibacterium, Clostridium XVIII, Turicibacter, Coprobacillus	

Editado de Minamoto *et al* 2012

## **2.6 Citocinas**

Las citocinas son polipéptidos o glicoproteínas reguladoras producidas por el sistema inmune y secretadas en respuesta a una estimulación externa. Estas moléculas señalizadoras interactúan con receptores específicos en células blanco causando una modificación en la función o el comportamiento de éstas células. Frecuentemente los efectos de las citocinas son confinados al ambiente local en el cuál son generadas. Sin embargo algunas citocinas alcanzan concentraciones altas en suero después de ciertos tipos de daño. Las citocinas son instrumentos moderadores de cada etapa de la respuesta inflamatoria, desde el reclutamiento inicial de células inflamatorias hasta la resolución del daño causado.

Las células del infiltrado inflamatorio incluyendo a los neutrófilos polimorfonucleares, monocitos y linfocitos son las mayores fuentes de citocinas durante una reacción inflamatoria debido a su gran número y su persistencia prolongada en el sitio afectado. Sin embargo los macrófagos tisulares, las células parenquimales y las células del estroma (fibroblastos y células endoteliales) también contribuyen de forma importante a la generación de citocinas inflamatorias. Estas células residentes podrían ser de mayor importancia inmediatamente después del daño al tejido y después, durante la resolución de la respuesta inflamatoria al participar en procesos reparadores del tejido afectado (Brandes y Wahl, 1994).

### **2.6.1 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

La familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) incluye al TNF-alfa (TNF- $\alpha$ ), TNF-beta (TNF- $\beta$ ), CD40 ligando (CD40L), Fas Ligando (FasL) y el ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL). Estas son algunas de las citocinas más importantes envueltas en procesos fisiológicos, inflamación sistémica, lisis tumoral, apoptosis y la iniciación de una fase aguda.

El TNF es una proteína de 157 aminoácidos de alrededor de 17.3 kD cuya forma activa la constituyen tres subunidades idénticas que se asocian para formar un trímero en forma de cono (Sánchez-Pobre, 1997) y es producida principalmente por macrófagos y monocitos activados. Otras células como los linfocitos B, mastocitos, células Natural Killer, queratinocitos y algunas células tumorales también pueden expresar TNF- $\alpha$  en bajas

concentraciones. El TNF- $\alpha$  ejerce muchas acciones fisiológicas y patológicas importantes. TNF causa la necrosis de células tumorales y la apoptosis. Además algunos estudios han revelado que el TNF juega un papel importante en la regulación del desarrollo embrional, en el ciclo circadiano, en la formación de centros germinales así como en la defensa del huésped contra infecciones bacterianas y virales. Se ha demostrado que el TNF puede ser un pirógeno endógeno causante de fiebre y que la exposición crónica a bajas dosis puede causar caquexia y depresión. Adicionalmente el TNF es un mediador clave en las reacciones inflamatorias sistémicas agudas y crónicas, ya que esta citocina no solo induce su propia secreción sino también la producción de otras citocinas y quimiocinas inflamatorias (Chu, 2013).

### **2.6.2 Interferón gamma (IFN- $\gamma$ )**

Las funciones biológicas del interferón gamma están primariamente relacionadas con la defensa del huésped y la regulación inmune, incluyendo la defensa antiviral y antibacteriana, el ciclo celular, la apoptosis, la inflamación y la inmunidad innata y adquirida. Una de las funciones más importantes del IFN- $\gamma$  es la sobrerregulación del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I y II en las células presentadoras de antígenos. El IFN- $\gamma$  también regula la diferenciación y función de muchos tipos de células inmunes. Está íntimamente involucrado en todos los aspectos de las respuestas inmunes mediadas por una respuesta  $T_h1$  tales como la regulación, diferenciación, activación y homeostasis de las células T, inhibe el desarrollo de células  $T_h2$  pero a su vez promueve el desarrollo de células T reguladoras. El IFN- $\gamma$  también activa a los macrófagos e induce la producción de citocinas, las cuales llaman a células efectoras específicas al sitio de la infección (Zaidi y Merlino, 2011).

Tanto las células del sistema inmune innato (células NK, macrófagos, células mielomonocíticas) como adaptativo (células  $T_h1$ , linfocitos T citotóxicos y células B) son capaces de producir IFN- $\gamma$ . Su producción es controlada por citocinas secretadas por las Células Presentadoras de Antígeno (APC) principalmente Interleucina 12 (IL-12) e Interleucina 18 (IL-18). IL-12 promueve la secreción de IFN- $\gamma$  en células NK, y la combinación de IL-12 e IL-18 posteriormente incrementa la producción de IFN- $\gamma$  en macrófagos, células NK y células T. La Interleucina 4 (IL-4) inductora de una respuesta

T<sub>h</sub>2, la Interleucina 10 (IL-10) el Factor de Crecimiento Transformante (TGF-β) y los glucocorticoides regulan negativamente la producción de IFN-γ (Akdis, 2011).

### **2.6.3 Interleucina 10 (IL-10)**

La IL-10 es secretada como un homodímero que consiste en 2 subunidades, cada una de 178 aminoácidos con un peso molecular de 18 kD (Akdis, 2011) y es producida principalmente por células mieloides o linfocitos, aunque también puede ser secretada por células no inmunes tales como las células epiteliales, queratinocitos y fibroblastos. En contraste con los fuertes efectos proinflamatorios del IFN-γ, la IL-10 es probablemente la citocina antiinflamatoria más importante usada en la regulación de reacciones inmunes intensas que conllevan al daño tisular. Fagocitos mononucleares y linfocitos (no solo T<sub>h</sub>2 y células T reguladoras, sino también T<sub>h</sub>1, T<sub>h</sub>17, T<sub>h</sub>22 y células B) representan la fuente principal de IL-10, aunque limitadas concentraciones de esta citocina pueden ser producidas por granulocitos, células NK y queratinocitos. La IL-10 inhibe la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas y reduce la capacidad de presentar antígenos por parte de las células presentadoras de antígenos al reducir las moléculas de MCH II y las moléculas coestimuladoras en la superficie de los macrófagos y monocitos. Por otro lado la IL-10 también puede poseer una función proinflamatoria en inmunopatologías mediadas por anticuerpos al contribuir con la activación de células B y la producción de IgG (Striz *et al*, 2014).

### **2.6.4 Interleucina 4 (IL-4)**

La IL-4 es un monómero de 129 aminoácidos con un peso aproximado de 15 kD (Akdis, 2011) que funciona como un potente regulador de la inmunidad y es secretada principalmente por células cebadas, células T<sub>h</sub>2, eosinófilos y basófilos. Se ha demostrado que la IL-4 juega un papel importante en la regulación de condiciones alérgicas y la respuesta inmune protectora contra helmintos y parásitos extracelulares, así como en la supervivencia leucocitaria bajo condiciones fisiológicas y patológicas tales como la inmunidad mediada por células T<sub>h</sub>2, el cambio de isotipo de célula B a IgE y la reparación de tejidos y homeostasis a través de la activación "alternativa" de macrófagos, es decir, una vía de activación de macrófagos que difiere de la clásica vía proinflamatoria (Gadani *et al*, 2012)

producido por las células  $T_H2$ , basófilos, mastocitos y eosinófilos. Es una citocina pleiotrópica que regula condiciones alérgicas y la respuesta inmune protectora contra helmintos y otros parásitos extracelulares. IL-4 es el mayor estímulo para el desarrollo de células  $T_H2$ , también suprime el desarrollo de células  $T_H1$  e induce el cambio de isotipo en las células B a Inmunoglobulina E (IgE). IL-4 incrementa la expresión de moléculas del MHC II en células B, sobrerregula los receptores de las células B, incrementa la expresión de CD23, prolonga la vida de células B y T en cultivos celulares y es mediadora de la adhesión tisular y la inflamación (Adkis, 2011).

## **2.7 Coccidiosis en perros y gatos**

### **2.7.1 Biología**

Las coccidias son protozoarios intracelulares obligados, pertenecen al Phylum Apicomplexa, el cual agrupa a varios parásitos de importancia médica y veterinaria como *Toxoplasma gondii*, *Babesia*, *Plasmodium*, *Cryptosporidium*, *Neospora caninum* y el género *Eimeria* que afecta a aves de corral y otros animales. En el caso de los perros y gatos el agente causal de la coccidiosis pertenece al género *Cystoisospora*, anteriormente conocido como *Isospora*, las especies principales son: *C. canis* y *C. ohioensis* en perros, y *C. felis* y *C. rivolta* en gatos.

Los huéspedes definitivos son los perros y gatos, el ciclo es de tipo directo (sin huésped intermediario) sin embargo, se ha demostrado que las ratas y ratones pueden ser huéspedes paraténicos, que son animales en los que el parásito está presente en forma latente pero sin desarrollo y sin afectarlo, cuando el huésped definitivo ingiere a este huésped paraténico el ciclo puede completarse.

### **2.7.2 Descripción de la enfermedad**

Estos parásitos se reproducen en el intestino delgado ocasionando una enteritis hemorrágica sobretodo en animales jóvenes, en hacinamiento o inmunodeprimidos; en los animales sanos o adultos la mayoría de las ocasiones la infección cursa de manera asintomática. Cabe señalar que debido a las características de su ciclo biológico, puede

ser una enfermedad de tipo autolimitante, siempre y cuando no haya más animales infectados en convivencia o exista alguna enfermedad inmunodepresora como parvovirus, distemper o leucemia viral felina.

### **2.7.3 Morfología**

Las coccidias presentan una forma esférica o sub-esférica (dependiendo la especie), de doble membrana y con una estructura en su interior llamada esporonte, el cuál es un conjunto de células sin diferenciar, a toda la estructura en conjunto se le llama ooquiste no esporulado; esta fase no es infectiva, ya que necesita madurar o “esporular”, diferenciando el esporonte a dos estructuras llamadas esporoblastos que en su interior contienen cuatro esporozoitos, cuando esto sucede entonces al ooquiste se le conoce como “esporulado”. Los esporozoitos tienen la típica forma de los Apicomplexas, de media luna o curvados y con la presencia de un complejo apical en el extremo anterior, este complejo es una maquinaria especializada en invasión celular y es característica del Phylum, estos invadirán los enterocitos una vez que sean liberados en el intestino delgado.

### **2.7.4 Ciclo biológico**

El ciclo biológico como es de tipo directo, es decir de transmisión horizontal entre animales infectados (figura 2.1). En general el ciclo de vida de las coccidias tiene tres fases principales:

1. Esporogonia: fase en la cual el ooquiste no esporulado se vuelve infectante (esporulado), ocurre en el medio ambiente en un lapso de hasta 48 horas, dependiendo de las condiciones de humedad y temperatura.
2. Esquizogonia: Fase de reproducción asexual rápida dentro de los enterocitos, esta fase es la más patógena y es la que puede ocasionar el cuadro clínico.
3. Gametogonia: Fase de reproducción sexual, al igual que la esquizogonia ocurre en el interior del animal, el objetivo de esta es formar los ooquistes no esporulados mediante la fusión los gametos femeninos y masculinos, producto de la última reproducción asexual en la esquizogonia.

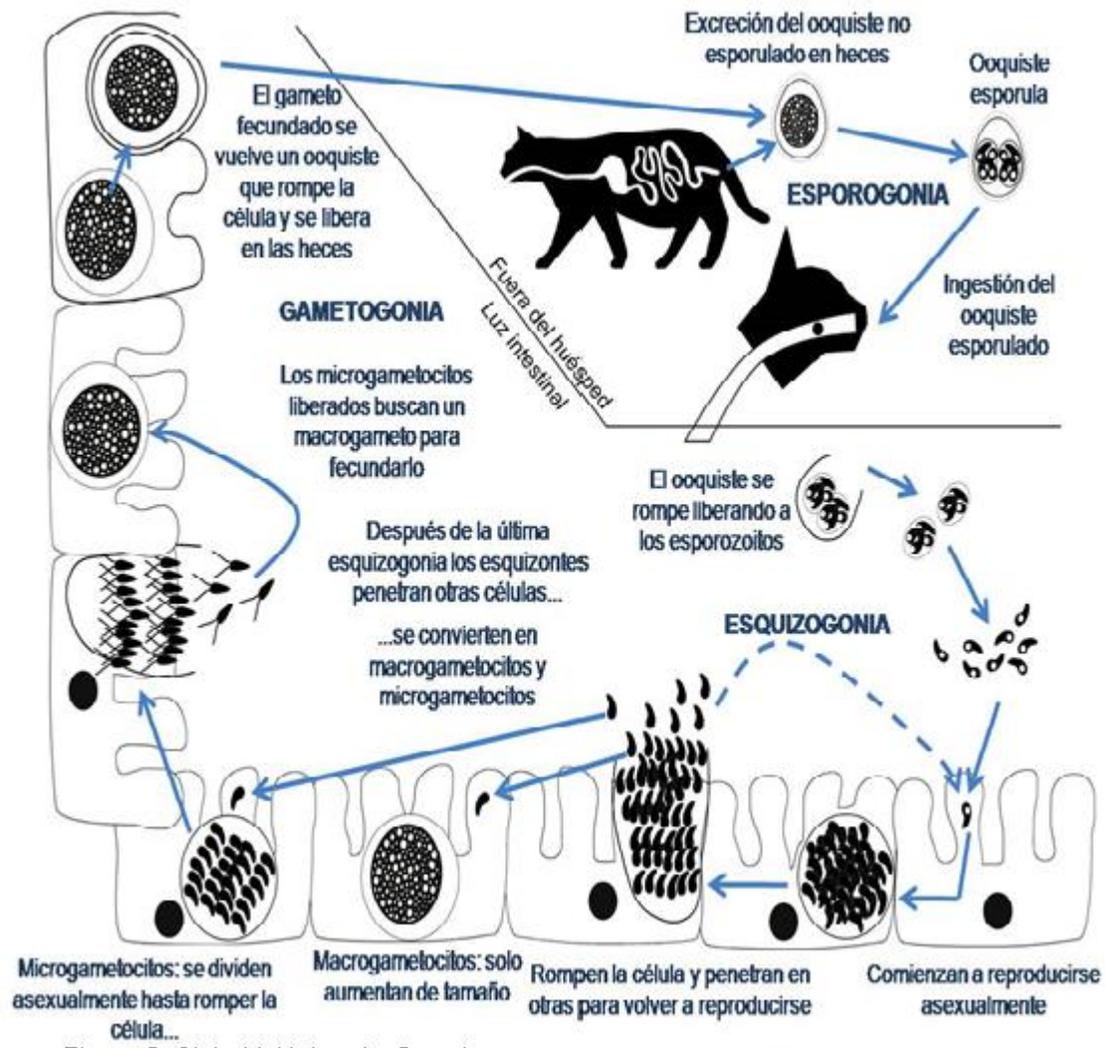


Figura 2.1. Ciclo biológico de *Cystoisospora* spp. Editado de Besne, 2014

Los perros o gatos eliminan en las heces el ooquiste no esporulado, este se volverá infectante (esporulado) después de hasta 48 horas, dependiendo de la temperatura y la humedad, el ooquiste ingerido llegará al intestino delgado y se liberarán los esporozoitos los cuales invadirán a los enterocitos, ya dentro de estas células, se reproducen de manera asexual hasta romper la célula para invadir otras, esta fase (esquizogonia) se puede repetir hasta por 5 ocasiones, después de la última reproducción asexual los esquizoitos cambian de forma microgametocitos y macrogametocitos, los microgametocitos se reproducen asexualmente hasta romper las células y salen en busca de los macrogametocitos para fusionarse, una vez realizada la fusión forman una estructura llamada cigoto que luego se volverá el ooquiste no esporulado y que será

liberado al medio ambiente a través de las heces, si otro animal o el mismo ingiere el ooquiste esporulado el ciclo se completa.

Al respecto del ciclo hay que hacer notar dos partes importantes: 1) después de la última esquizogonia, en teoría no hay forma de que se formen más ooquistes, por lo que si un perro o gato infectado elimina ooquistes y los vuelve a ingerir puede auto-infectarse, por el contrario si se evita que los ingiera, manteniendo higiene constante, la auto-infección es poco probable, por esta razón se puede considerar a la infección como autolimitante y no es necesario administrar tratamiento la mayoría de las veces; 2) esta re-infección es frecuente cuando en el lugar hay más de un perro o gato, en este caso es necesario dar tratamiento ya que la infección estará de manera prevalente en ese lugar.

### 2.7.5 Ciclo biológico: huésped paraténico

Como se mencionó anteriormente, *Cystoisospora* es una coccidia de ciclo directo, sin embargo las ratas, ratones y hamsters pueden mantener los esporozoitos enquistados sin que les causen daño y al ser estos animales presas de los huéspedes definitivos, el ciclo puede completarse (Figura 2.2).

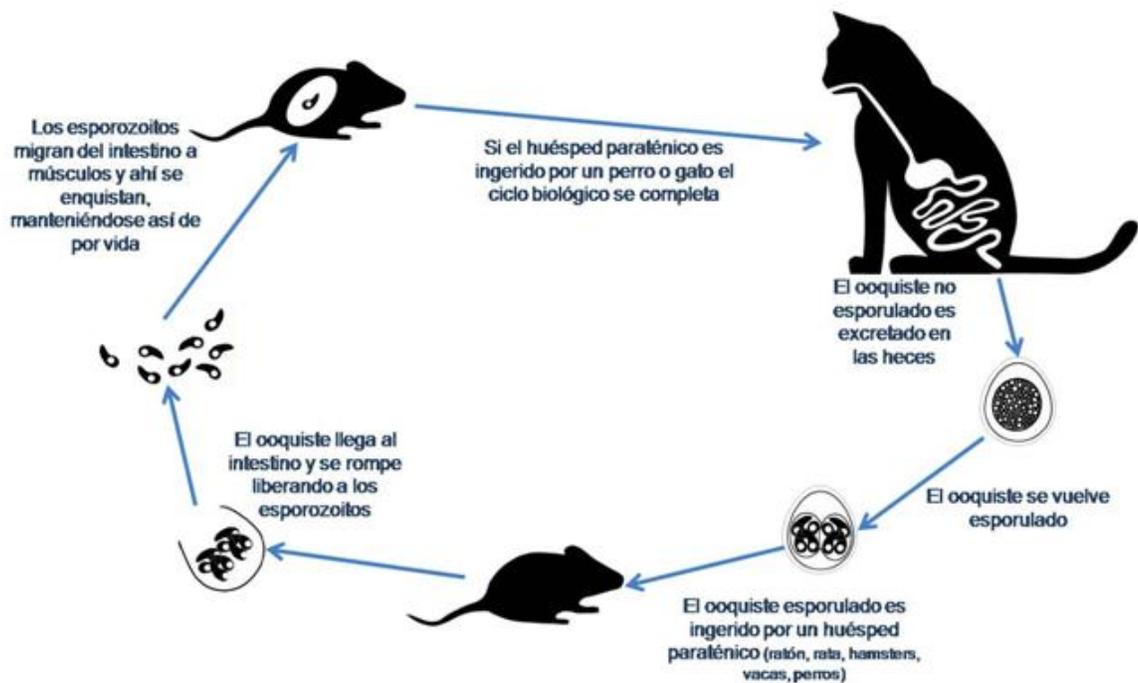


Figura 2.2. Ciclo biológico de *Cystoisospora* spp, incluyendo el huésped paraténico. Editado de Besné ,2014

### **2.7.6 Patogenia de la enfermedad y signos clínicos**

En general los signos clínicos se presentan en animales muy jóvenes, inmunodeprimidos o que cursan alguna enfermedad primaria viral o bacteriana, en los demás casos los animales parasitados cursan la infección de manera sub-clínica.

Los signos clínicos de la coccidiosis son poco frecuentes, hay casos en los que los animales infectados están eliminando miles de ooquistes, sin embargo no presentaron diarrea previa o alguna otra signología indicativa de la enfermedad.

El signo clínico predominante es la diarrea con sangre, esta es producto de la fase de reproducción asexual rápida (esquizogonia) en el intestino delgado, por la destrucción excesiva de enterocitos, produciendo una diarrea de tipo mecánico y con sangre al dejar expuestos pequeños vasos sanguíneos, esto puede complicarse si hay además, la presencia de virus o bacterias en el intestino u otro parásito.

### **2.7.7 Diagnóstico**

El diagnóstico de la enfermedad está basado en encontrar al parásito en las heces, la técnica más comúnmente usada es la de flotación fecal con alguna solución más densa que el agua, como el sulfato de zinc o saturada con cloruro de sodio.

Esta técnica únicamente nos indica la presencia o ausencia del parásito, como los perros y gatos pueden estar parasitados por más de una especie de *Cystoisospora* la vez, si se requiere conocer la especie que está causando la infección, entonces se recomienda la medición de los ooquistes encontrados mediante escalas micrométricas, y entonces poder asegurar que especie está presente, esta técnica también es útil cuando se quiere diferenciar a los otros ooquistes de otras coccidias (*Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Hamondia* o *Besnoitia*), ya que las infecciones concomitante pueden existir.

### **2.7.8 Tratamiento**

En general, dado que la enfermedad es asintomática en la mayoría de los casos, no se recomienda administrar ningún fármaco mientras se mantenga una higiene apropiada con las heces (para evitar una re-infección) y no haya más animales en el lugar, si esto no es posible o se presentan signos clínicos, los desparasitantes de elección son:

- Sulfadimetoxina 50 a 60 mg/kg PO, cada 24 horas por 5 a 20 días, el intervalo de días varía de acuerdo a la gravedad de la infección y signos clínicos, generalmente con 8 días de tratamiento es suficiente, además se requiere hacer la técnica de flotación fecal cada 8 días durante el tratamiento para monitorear el desarrollo de la infección.
- Sulfonamida-Trimetoprim 15 a 30 mg/kg PO o SC, cada 12 o 24 horas por 5 a 20 días, mismas indicaciones de monitoreo que la sulfadimetoxina.

Se pueden usar también coccidiostatos como el amprolio a 100 mg totales PO, cada 24 horas durante 7 días.

### **2.7.9 Control**

El control de la coccidiosis es relativamente simple; dado que los ooquistes necesitan mínimo 24 horas para esporular y volverse infectantes, si se mantiene el ambiente libre de heces se elimina la posibilidad de una re-infección por parte de sus mismos parásitos, sin embargo esto se complica cuando hay más de un animal en el lugar, para esto se recomienda desinfectar con una solución de amoníaco al 10% para eliminar los ooquistes que queden en el suelo, sobretodo en criaderos o pensiones.

También debe evitarse en lo posible la caza e ingestión de la presa paraténica, esto aplica a los adultos ya que si bien ellos no manifiestan la enfermedad, pueden actuar como portadores y diseminar la infección en otros animales (Besné, 2014).

### **2.8 Alimentos funcionales**

La función primaria de los alimentos es proveer nutrientes y energía. Estos nutrientes pueden incluir macronutrientes (proteínas, grasas y carbohidratos) y micronutrientes (minerales, vitaminas y diversos elementos en cantidades traza). Los alimentos también poseen la función secundaria de brindar satisfacción sensorial en su sabor, color y textura. Recientemente se ha identificado una tercera función: la capacidad del alimento de modular sistemas fisiológicos (inmunes, endócrinos, nerviosos, circulatorios y digestivos) más allá de sus efectos nutricionales. Los componentes alimenticios que cumplen con estas funciones son llamados “alimentos funcionales” (Garsen *et al*, 2003).

Un alimento funcional se define como aquel que “está suficientemente demostrado que actúa benéficamente sobre una o más funciones del cuerpo, más allá de su efecto nutricional, mejorando la salud y el bienestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedad”.

Puede ser un alimento natural, un alimento al que se ha añadido, eliminado o modificado un componente por medios biotecnológicos, un alimento en el que se ha modificado la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes o una combinación de cualquiera de estas posibilidades (Terrer y Dalmau, 2001).

Los alimentos funcionales pueden ejercer diferentes funciones en el cuerpo, entre las más estudiadas se encuentran las siguientes:

- **Funciones gastrointestinales:** Estas funciones incluyen aquellas que están asociadas con una microflora colónica balanceada, la biodisponibilidad de nutrientes, el control del tiempo de tránsito intestinal, de la motilidad intestinal y de la modulación en la proliferación celular epitelial.
- **Funciones en el sistema antioxidante y de óxido-reducción:** Este sistema requiere una ingesta balanceada de vitaminas antioxidantes, así como de componentes alimenticios no vitamínicos tales como los polifenoles y otros antioxidantes naturales de origen vegetal. Las actividades protectoras antioxidantes y de óxido-reducción son importantes para todas las células y tejidos, y su desequilibrio está asociado con diversas patologías.
- **Funciones en el metabolismo de macronutrientes:** Estas funciones corresponden al metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos y en particular a la modulación hormonal de su metabolismo por medio del balance de insulina y glucagón, y por medio de la producción de péptidos gastrointestinales.

En relación a su efecto los alimentos funcionales pueden clasificarse en antioxidantes, esteroides vegetales, ácidos grasos poliinsaturados, algunos minerales, prebióticos, probióticos y simbióticos (Garsen *et al*, 2003).

## **2.9 Probióticos**

Los probióticos han sido definidos por la Organización Mundial de la Salud como “organismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico en la salud del huésped” (Travers *et al*, 2011) y son también conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprolifácticos (De las Cagigas y Blanco, 2002)

En 1908 el poseedor del premio Nobel Ellie Metschnikoff propuso la teoría de que los productos lácteos fermentados contienen bacterias que contribuyen al proceso de descomposición en el intestino, contrarrestan la formación de aterosclerosis y extienden la vida. Posteriormente se pensó que estos efectos positivos se debían a la presencia de *Bacillus bulgaricus* aunque poco después se comprobó que estos productos fermentados contenían predominantemente *Lactobacillus acidophilus*.

Durante los últimos veinte años se ha intentado transpolar el concepto de probiótico a la alimentación animal, ya que estos son discutidos frecuentemente como una alternativa ante la inminente prohibición del uso de antibióticos como aditivos alimenticios (Simon, 2005).

En la alimentación animal los probióticos son definidos "como formas vivas de microorganismos que son aplicados como aditivo alimenticio y que a razón de fomentar el equilibrio de la flora intestinal, tienen efectos favorables para el animal " (Fuller, 1989).

Mientras que en los seres humanos se busca principalmente la estabilización de la salud y los efectos a largo plazo, las metas en la utilización de probióticos en la alimentación animal están orientadas hacia efectos a corto plazo. Algunos parámetros productivos como el incremento de la masa corporal, la conversión alimenticia y la disminución en la frecuencia de diarreas son utilizados como “efectos favorables” del uso de probióticos.

### **2.9.1 Características**

Para que un microorganismo pueda ser incorporado como aditivo alimenticio tiene que cumplir con los postulados de Huchetson: ser habitante normal del intestino, tener un tiempo corto de reproducción, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos, deben ser apatógenos y no producir alguna toxina, no deben ser invasivos ni producir contaminación del producto, no deben promover resistencia hacia los antibióticos, y

finalmente deben ser estables durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que pueda llegar vivo al intestino. Es importante que estos microorganismos puedan ser capaces de atravesar la barrera gástrica para poder multiplicarse y colonizar el intestino (Simon, 2005).

### **2.9.2 Beneficio de los probióticos**

Los probióticos son usados cada vez más en la terapéutica para el tratamiento de enfermedades o afecciones intestinales, incluyendo tanto a la diarrea idiopática y asociada al estrés, así como también a las infecciones bacterianas y virales. Las especies bacterianas más frecuentemente usadas como probióticos promotores de la salud son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium spp*, aunque algunas levaduras y especies de *Enterococcus* también son usadas como promotores de ganancia de peso en animales de producción (Marshall-Jones *et al*, 2006).

### **2.9.3 Mecanismos de acción**

Los efectos positivos de estas bacterias pueden llevarse a cabo por medio de tres mecanismos principales:

- **Modulación del ambiente intestinal:** Los probióticos tienen la capacidad de controlar la proliferación de organismos circundantes al competir por el espacio y por el acceso a nutrientes. Por ejemplo el hierro es un nutriente limitante esencial para la mayoría de las bacterias y los probióticos pueden competir por su disponibilidad. Bacterias como *Lactobacillus* pueden hacer el hierro indisponible para microorganismos patógenos al unir hidróxido férrico en su superficie o al secretar sideróforos que quelan y transportan al hierro. Algunos probióticos son capaces de influir en la composición y el equilibrio de la microbiota intestinal residente al incrementar el número total de bacterias intestinales y al restaurar su diversidad. Finalmente los probióticos también pueden controlar su ambiente a través de la regulación de la motilidad intestinal y de la secreción de moco.
- **Secreción de moléculas activas:** Algunas moléculas como las bacteriocinas, antibióticos, ácidos grasos libres y el peróxido de hidrógeno pueden controlar el crecimiento o la supervivencia de algunos microorganismos circundantes. Las

bacteriocinas son péptidos o proteínas secretados que generalmente matan a las bacterias cercanas al permeabilizar su membrana o al interferir con la acción de enzimas esenciales. Algunos probióticos generalmente *Lactobacillus* son capaces de producir antibióticos de amplio espectro contra bacterias, levaduras, hongos, protozoarios y virus. Al disminuir el pH intestinal con ácido láctico los probióticos también pueden modificar el crecimiento de organismos sensibles a un ambiente ácido.

- Modulación de la inmunidad: Los probióticos pueden modular la inmunidad al estimular la respuesta inmune del huésped ante una variedad de patógenos. En el intestino, los probióticos interactúan con las células epiteliales, las células M localizadas en las placas de Peyer y con células inmunes. Estas interacciones resultan en un incremento en el número de células productoras de IgA y de IgA secretora, la cual es particularmente importante en la inmunidad mucosa al contribuir con la función de barrera contra organismos patógenos. Además los probióticos también pueden afectar a las células dendríticas, las cuales son responsables de la recolección de antígenos y su presentación a células T nativas que conlleva a su diferenciación en células T cooperadoras (Th1, Th2) o a linfocitos T reguladores. Los probióticos también pueden regular la secreción de citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12). Estas citocinas juegan un papel principal en el mantenimiento del balance entre los mecanismos de defensa necesarios y una respuesta inmune excesiva (Travers *et al*, 2011).

Otros mecanismos de acción incluyen la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que promueven la salud de la mucosa local mediante la estimulación del flujo de sangre epitelial gastrointestinal y la promoción de la integridad de la mucosa, y la disminución de la producción de enzimas como la glucuronidasa, la glucosidasa, la nitritoreductasa y la ureasa. Estas enzimas participan en la activación metabólica de los mutágenos y carcinógenos (Torres, 1999).

## **2.10 El uso de las bacterias formadoras de esporas como probióticos**

### **2.10.1 Esporas bacterianas**

Las esporas bacterianas son producidas en la naturaleza como una forma de sobrevivir a las condiciones ambientales extremas permitiendo una supervivencia más prolongada en condiciones que de otro modo destruirían a la célula vegetativa.

La decisión de esporular depende mucho de la disminución de nutrientes en la proximidad inmediata a la célula vegetativa. Al detectar esta disminución de nutrientes la bacteria entra en un proceso irreversible que tiene como resultado la producción de una spora, 8 horas después. La estructura de la endospora bacteriana es importante para la supervivencia, esta endospora contiene en su núcleo un cromosoma condensado e inactivo. Capas adicionales rodean a la endospora, incluyendo una corteza rica en peptidoglicanos y una o más capas de material proteínico denominado como la cobertura de la spora. Estas capas protegen a la endospora de la radiación UV, del calor extremo, de la exposición a solventes, del peróxido de hidrógeno y de enzimas tales como lisozimas.

La spora se encuentra deshidratada y si es expuesta a los nutrientes adecuados puede germinar. La germinación es un proceso que toma poco tiempo y permite la entrada de agua a la spora, la ruptura y remoción de las capas que protegen a la spora y finalmente la reanudación y el crecimiento de la célula vegetativa.

Las bacterias formadoras de esporas comúnmente comprenden dos géneros principales, *Bacillus spp* y las bacterias estrictamente anaeróbicas *Clostridium spp* (Cutting, 2011).

### **2.10.2 El uso de los *Bacillus* como probióticos**

Entre las especies que han sido ampliamente estudiadas se encuentran *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* y *Bacillus licheniformis*.

Las esporas son estables al calor y por lo tanto proveen ciertas ventajas frente a otras especies bacterianas que no forman esporas (*Lactobacillus spp*), tales como que el producto puede ser almacenado a temperatura ambiente en una forma desecada sin ningún efecto que deteriore la viabilidad. Una segunda ventaja es que la spora es capaz

de sobrevivir al pH gástrico bajo, así que en principio una dosis específica de esporas puede ser almacenada indefinidamente sin refrigeración y la dosis total de bacterias ingeridas alcanzaran intactas el intestino delgado.

Las especies de *Bacillus* han sido utilizadas como probióticos en productos usados como suplementos medicinales en humanos, principalmente debido a desordenes gastrointestinales que son resultado directo de tratamientos con antibióticos. Los probióticos que contienen bacterias formadoras de esporas han sido usados ampliamente en humanos y en animales como promotores de crecimiento y como agentes de exclusión competitiva (Cutting, 2011).

### **2.10.3 Características del probiótico *Bacillus subtilis***

*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva, no patogénica, que produce endosporas las cuales resisten a factores físicos perjudiciales como la temperatura, la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos (Figura 2.3). Estos microorganismos viven dentro de los límites de temperatura de 55-70°C y pueden soportar un pH de 2 a 3, lo cual les permite pasar a través de la barrera gástrica donde las esporas germinan en el intestino delgado y son capaces de poblar, aunque brevemente, el tracto intestinal.

Otras características importantes son que el género *Bacillus* produce enzimas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuente de energía, además de que crece bien en medios sintéticos que contienen azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes. Por lo tanto *Bacillus subtilis* es una de las 40 especies reconocidas de *Bacillus* que tiene la capacidad de moverse, mostrar velocidades de crecimiento altas, su reconocimiento es sencillo ya que es catalasa y Voges-Proskauer positivo, su crecimiento en agar anaerobio (agar nutritivo) es negativo y la hidrólisis del almidón es positiva.

*Bacillus subtilis* realiza una fermentación característica en la que los productos principales son 2,3-butanadiol, glicerol y CO<sub>2</sub> acompañados de pequeñas cantidades de lactato y etanol. Este microorganismo no puede crecer anaeróticamente a expensas de glucosa, probablemente porque no puede reducir la triosa fosfato a glicerol.

Esta bacteria puede encontrarse de forma saprófita en el suelo, agua, polvo y aire y no es potencialmente patógena, no produce endotoxinas y secreta proteínas al medio, algunas de ellas con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas (González, 2012). Algunos efectos clínicos de *Bacillus subtilis* han sido documentados como agente inmunoestimulador en una variedad de enfermedades, como estimulante in vivo e in vitro de la Inmunoglobulina A secretora y como agente mitogénico in vivo (Green *et al*, 1999).



Figura 2.3 Espora de *Bacillus subtilis* C-3102. Editado de <http://www.calsporin.com/english02/calsporin/index.html>

# CAPITULO 3

## OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto inmunomodulador del probiótico *Bacillus subtilis* en gatos jóvenes adultos sanos e infectados de forma natural con *Cystoisospora spp.*

### 3.2 Objetivos específicos

- Evaluar la concentración de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en células mononucleáres sanguíneas periféricas de 14 gatos jóvenes sanos a los días 0, 30, 45 y 60 de complementación con el probiótico *Bacillus subtilis*.
- Evaluar la concentración de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en células mononucleáres sanguíneas periféricas de 10 gatos jóvenes adultos infectados naturalmente con *Cystoisospora spp* a los días 0, 15 y 30 de complementación con el probiótico *Bacillus subtilis*.
- Evaluar la concentración sérica de Factor de Necrosis Tumoral alfa, Interferón gamma, Interleucina 10 e Interleucina 4 en 10 gatos jóvenes adultos infectados naturalmente con *Cystoisospora spp* a los días 0, 15 y 30 de complementación con el probiótico *Bacillus subtilis*.
- Determinación de la carga parasitaria en heces de los 10 gatos jóvenes adultos infectados naturalmente con *Cystoisospora spp* cada semana durante la complementación con el probiótico *Bacillus subtilis*.

### 3.3 Hipótesis

La complementación con el probiótico *Bacillus subtilis* modulará la respuesta inmune mediante la disminución de la generación de ROS en los gatos sanos y el incremento tanto de ROS como de citocinas en los gatos infectados con *Cystoisospora spp* para favorecer la eliminación del parásito del huésped.

# CAPITULO 4

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **4.1 Modelo animal**

Grupo de gatos sanos: Para el grupo de gatos jóvenes sanos se emplearon 14 gatos de raza europeo doméstico, entre 6 y 7 meses de edad, 10 hembras (6 esterilizadas y 4 enteras) y 4 machos (esterilizados), con un peso promedio de 3.5 kg, clínicamente sanos, vacunados, desparasitados y con un grado aceptable de socialización.

Grupo de gatos infectados: Para el grupo de gatos jóvenes moderadamente infectados con *Cystoisospora spp* (Rodríguez-Vivas y Cob, 2005) se emplearon 10 gatos de raza europeo doméstico, entre 7 y 8 meses de edad, 7(4 esterilizadas y 3 enteras) hembras y 3 machos (2 esterilizados y 1 entero), con un peso promedio de 3.5 kg, clínicamente sanos, sin vacunas, sin desparasitaciones y con un grado aceptable de socialización

### **4.2 Consideraciones de alojamiento**

Todos los animales fueron alojados en distintas fechas en una clínica veterinaria y su permanencia fue de 75 días para el primer grupo y de 45 días para el segundo grupo aproximadamente.

La habitación para el alojamiento contó con un área de 14 mts<sup>2</sup> resultando en un espacio vital de 1.0 mts<sup>2</sup> aproximadamente por animal más un espacio en niveles superiores de por lo menos 2 metros de altura según las especificaciones del Departamento de Medicina Clínica Veterinaria de la Universidad de Cambridge (Rochlitz, 2000). La habitación fue provista de 3 baterías de 3 jaulas metálicas dispuestas en forma vertical (45x45x80 cm) y colocadas en diferentes ubicaciones en la habitación de manera que pudieran brincar de una a otra permitiendo con esto el desarrollo de la conducta natural de exploración y que de la misma forma funcionaron como zonas de descanso y resguardo.

Dentro de la habitación se contó con lo necesario para el bienestar de los gatos como 6 platos metálicos limpios y secos para el agua y el alimento con capacidad de 24 onzas cada uno, cojines y camas, tres areneros (50x42x38 cm) con arena limpia y seca, así como juguetes adecuados para ellos, tales como pelotas, cuerdas y bolsas de papel.

### 4.3 Alimentación y complementación

Todos los gatos de los dos grupos de estudio fueron alimentados tres veces al día con alimento seco comercial clasificado como Premium de acuerdo a la calidad de sus ingredientes. El análisis garantizado de dicho alimento es el siguiente:

**Cuadro 4.1. Análisis garantizado del alimento proporcionado durante la experimentación**

Nutriente	% de inclusión
Proteína cruda (PC)	33%
Grasa cruda (GC)	13%
Humedad	12%
Cenizas	7.5%
Fibra cruda (FC)	5%
Calcio	1.1-1.4%
Fósforo	1.0-1.4%

Mediante esta información se determinó la cantidad de energía metabolizable del alimento mediante el empleo de factores Atwater modificados para su uso en gatos:

**Cuadro 4.2. Estimación del contenido de energía metabolizable del alimento proporcionado durante la experimentación**

Nutriente	Factor de ajuste (Atwater)	Kcal/gramo
Proteína Cruda: 36%	3.9	140.4
Grasa cruda: 13%	7.7	100.1
Carbohidratos: 26.5%	3.0	79.5
<b>TOTAL</b>		<b>320 kcal/100 gr</b>

Posteriormente se obtuvo la ración para cada gato de acuerdo a su requerimiento energético en mantenimiento por peso al día mediante la siguiente fórmula:

$$K \times PV_{kg}$$

Donde K es el nivel de actividad y corresponde a:

50: inactivo

60: activo

70: muy activo

PV es el peso vivo en kilogramos.

Una vez determinada la cantidad de energía que provee el alimento y la necesidad energética de los animales se realizó el cálculo de la ración consumida para cada gato. El total de la ración fue de:

Necesidad energética por gato:  $60 \times 3.500 \text{ kg} = 210 \text{ Kcal EM/día}$

Cantidad de energía metabolizable del alimento: 320 Kcal/100 gr

Total de la ración por gato: 65.62 gr de alimento diario

Con la finalidad de que todos los animales se acostumbraran al nuevo alimento se les dio un periodo de adaptación de 15 días para evitar trastornos gastrointestinales.

Cabe mencionar que los animales contaron con agua limpia y fresca *ad libitum*.

El probiótico a base de *Bacillus subtilis* (CALSPORIN®, tabletas a base de esporas viables de *B. subtilis* C-3102 con capacidad de germinación) se administró en la primera comida del día molido y mezclado con una pequeña porción de alimento húmedo de marca comercial a una dosis diaria de 250 millones de UFC/tableta/animal. Esta porción de alimento húmedo solo fue utilizada para facilitar la ingesta del probiótico y no se consideró dentro de la cantidad de alimento consumido (Figura 4.1).

La suplementación tuvo una duración de 60 días en el grupo de gatos sanos y de 30 días en el grupo de gatos infectados tomando en cuenta la duración del periodo prepatente del parásito (10-15 días aproximadamente)(Lindsay, 1997).



Figura 4.1. Administración del probiótico *Bacillus subtilis* mezclado con alimento húmedo

#### **4.4 Recolección de muestras**

Todos los animales fueron ayunados 8 horas previo a la toma de muestras.

Para el grupo de gatos sanos se tomaron muestras de sangre de aproximadamente 1 ml por medio de veno-punción vía yugular con catéter núm. 23 a los días 0, 30, 45 y 60 de tratamiento. La sangre fue colocada individualmente en tubos vacutainer con anticoagulante EDTA previamente etiquetados para la determinación de las Especies Reactivas de Oxígeno.

Para el grupo de gatos infectados se tomaron muestras de sangre de aproximadamente 2 ml por medio de veno-punción vía yugular con catéter número 23 a los días 0, 15 y 30 de tratamiento. La sangre fue distribuida en tubos vacutainer con y sin anticoagulante EDTA previamente etiquetados para la determinación de Especies Reactivas de Oxígeno y la determinación de las concentraciones de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), Interleucina 10 (IL-10) e Interleucina 4 (IL-4) respectivamente. Los gatos fueron separados en jaulas individuales para la recolección de muestras de heces para la determinación de la carga parasitaria. Éstas muestras fueron recolectadas directamente del recto de cada gato cada semana utilizando una varilla de muestreo y fueron colocadas en bolsas individuales previamente etiquetadas.

#### **4.5 Procesamiento de las muestras**

En las muestras sanguíneas para la determinación de Especies Reactivas de Oxígeno fueron aisladas las células mononucleares de sangre periférica (PMBC)(Anexo 8) y posteriormente fueron procesadas mediante la técnica de la 2,7 Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA)(Anexo 9). Las concentraciones de citocinas fueron determinadas por la técnica de ELISA de captura (Anexo 10). Ambas fueron procesadas por un técnico académico en la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

La cuantificación de los ooquistes de *Cystoisospora spp* se realizó mediante la técnica de McMaster (Colville 1991) en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM.

#### **4.6 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó una prueba no paramétrica U de Mann-Whitney usando el paquete SPSS versión 17.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Para todas las pruebas el nivel de significancia fue ajustado a  $P < 0.05$ .

# CAPITULO 5

## RESULTADOS

### 5.1 RESULTADOS DEL GRUPO DE GATOS JÓVENES ADULTOS SANOS

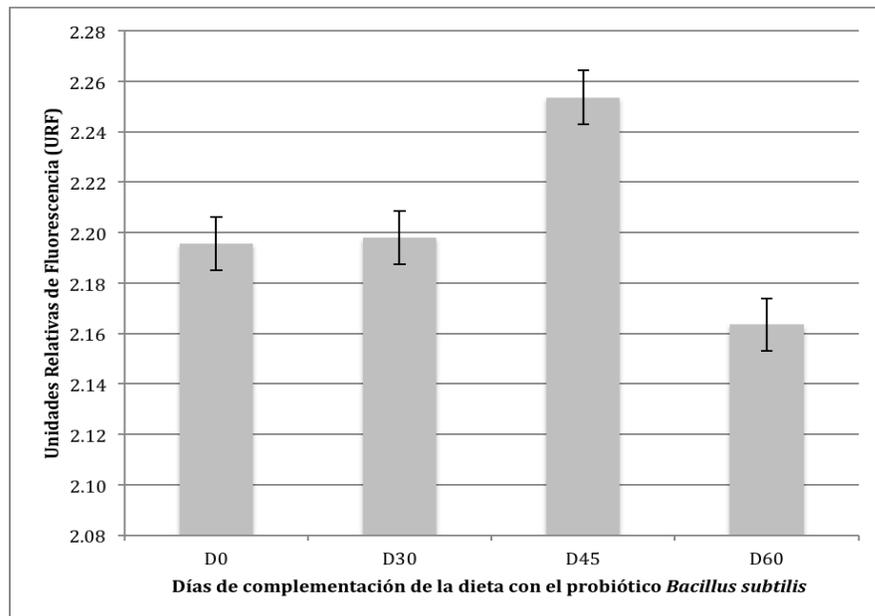
Para las especies reactivas de oxígeno en el grupo de gatos sanos se pudo observar que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los cuatro muestreos realizados ( $P>0.05$ ).

**Cuadro 5.1. Promedio de la concentración de especies reactivas de oxígeno (URF) en gatos jóvenes adultos sanos complementados con el probiótico *Bacillus subtilis***

Día	Media (URF)	Desviación estándar
0	2.20 <sup>a</sup>	0.48
30	2.20 <sup>a</sup>	0.49
45	2.25 <sup>a</sup>	0.44
60	2.16 <sup>a</sup>	0.61

Literales diferentes indican diferencias ( $P<0.05$ )

**Figura 5.1. Efecto de la complementación de la dieta con el probiótico *Bacillus subtilis* en la concentración de especies reactivas de oxígeno (URF) en gatos jóvenes adultos sanos**



## 5.2 RESULTADOS DEL GRUPO DE GATOS JÓVENES ADULTOS INFECTADOS CON *Cystoisospora spp.*

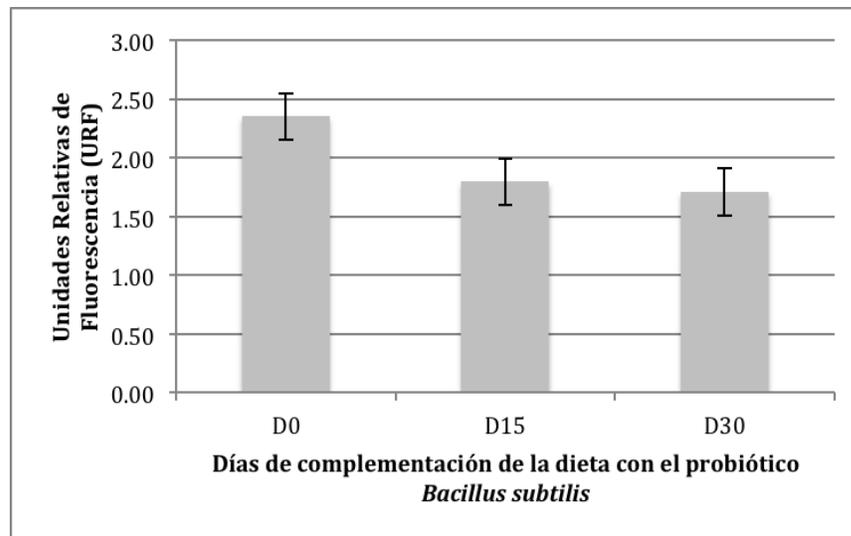
Para las especies reactivas de oxígeno en el grupo de gatos infectados se pudo observar que hubo una disminución estadísticamente significativa entre los tres muestreos realizados ( $P < 0.05$ ).

**Cuadro 5.2. Promedio de la concentración de especies reactivas de oxígeno (URF) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp.* complementados con el probiótico *Bacillus subtilis***

Día	Media (URF)	Desviación estándar
0	2.35 <sup>a</sup>	0.29
15	1.79 <sup>b</sup>	0.06
30	1.71 <sup>c</sup>	0.07

Literales diferentes indican diferencias ( $P < 0.05$ )

**Figura 5.2. Efecto de la complementación de la dieta con el probiótico *Bacillus subtilis* en la concentración de especies reactivas de oxígeno (URF) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp.***



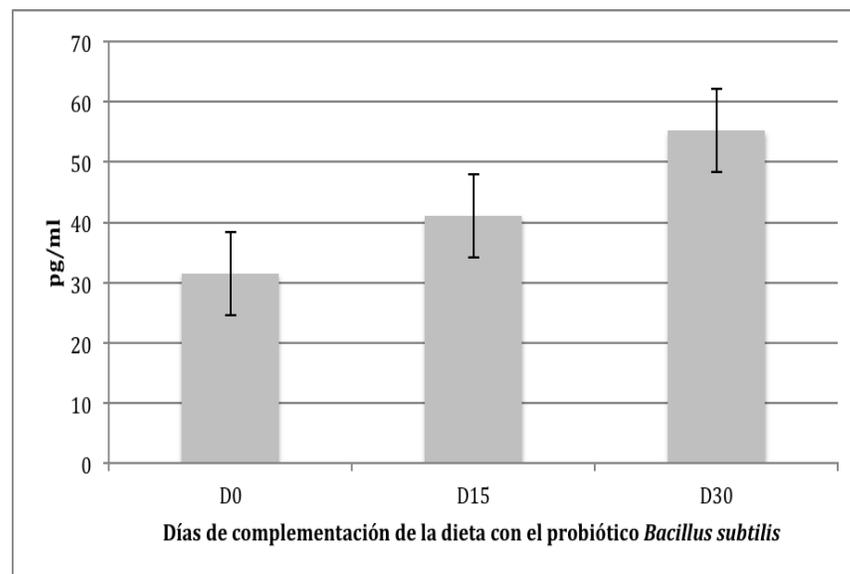
Para la concentración sérica del Factor de Necrosis Tumoral alfa en el grupo de gatos infectados se pudo observar que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los muestreos de los días 0 y 15, así como entre los muestreos de los días 15 y 30; no siendo así entre los muestreos de los días 0 y 30 donde se observó un aumento estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ).

**Cuadro 5.3. Promedio de la concentración sérica de Factor de Necrosis Tumoral alfa (pg/mL) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp* complementados con el probiótico *Bacillus subtilis***

Día	Media (pg/mL)	Desviación estándar
0	31.52 <sup>a</sup>	10.89
15	41.15 <sup>ab</sup>	17.75
30	55.25 <sup>b</sup>	17.37

Literales diferentes indican diferencias ( $P < 0.05$ )

**Figura 5.3. Efecto de la complementación de la dieta con el probiótico *Bacillus subtilis* en la concentración sérica de Factor de Necrosis Tumoral alfa (pg/mL) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp***



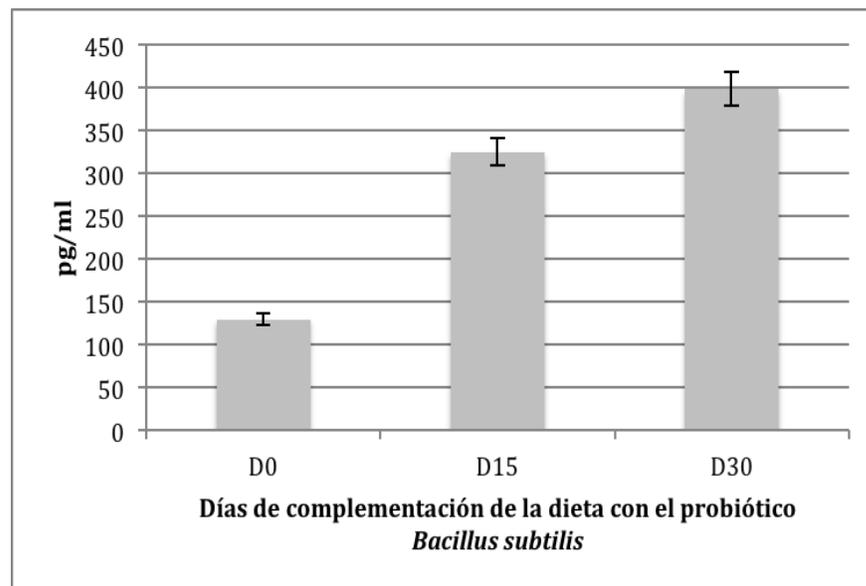
Para la concentración sérica de Interferón gamma en el grupo de gatos infectados se pudo observar que hubo un aumento estadísticamente significativo entre los tres muestreos realizados ( $P < 0.05$ ).

**Cuadro 5.4. Promedio de la concentración sérica de Interferón gamma (pg/mL) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp* complementados con el probiótico *Bacillus subtilis***

Día	Media (pg/mL)	Desviación estándar
0	129.75 <sup>a</sup>	66.68
15	324.34 <sup>b</sup>	44.04
30	397.84 <sup>c</sup>	14.93

Literales diferentes indican diferencias ( $P < 0.05$ )

**Figura 5.4. Efecto de la complementación de la dieta con el probiótico *Bacillus subtilis* en la concentración sérica de Interferón gamma (pg/mL) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp***



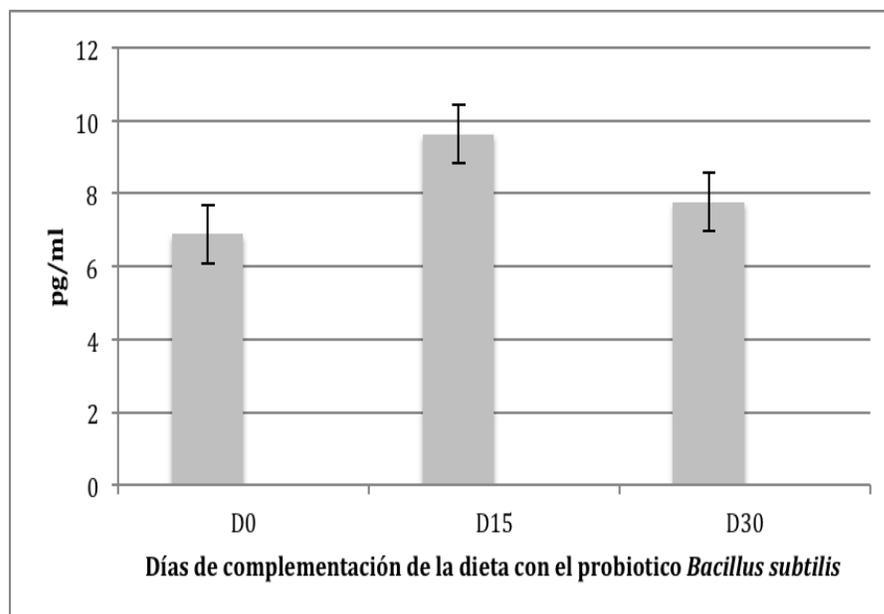
Para la concentración sérica de Interleucina 10 en el grupo de gatos infectados se pudo observar que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los tres muestreos realizados ( $P > 0.05$ ).

**Cuadro 5.5. Promedio de la concentración sérica de Interleucina 10 (pg/mL) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp* complementados con el probiótico *Bacillus subtilis***

Día	Media (pg/mL)	Desviación estándar
0	6.89 <sup>a</sup>	5.38
15	9.63 <sup>a</sup>	4.99
30	7.77 <sup>a</sup>	3.46

Literales diferentes indican diferencias ( $P < 0.05$ )

**Figura 5.5. Efecto de la complementación de la dieta con el probiótico *Bacillus subtilis* en la concentración sérica de Interleucina 10 (pg/mL) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp***



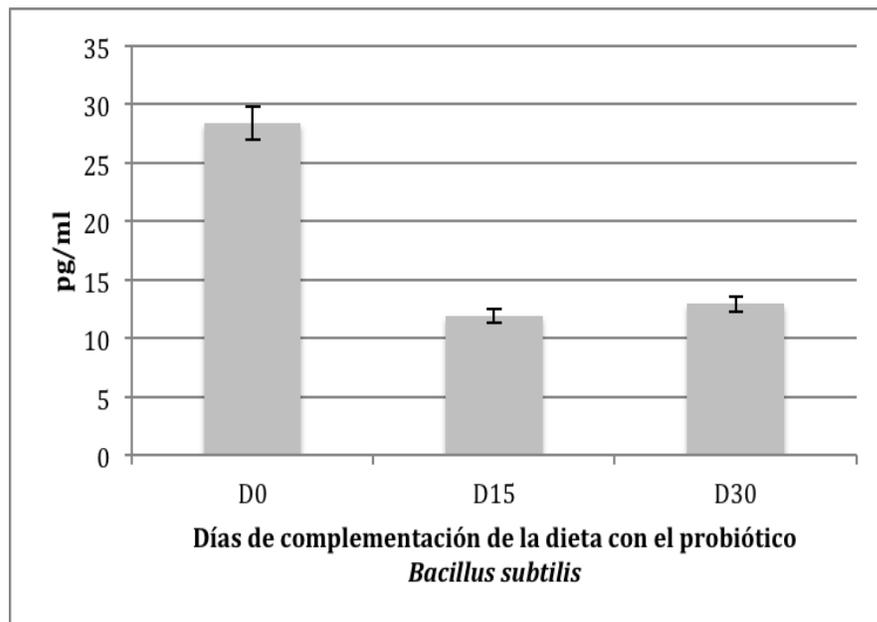
Para la concentración sérica de Interleucina 4 en el grupo de gatos infectados se pudo observar que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los muestreos de los días 15 y 30, no siendo así para los muestreos de los días 0 y 15 y los muestreos de los días 0 y 30 donde se observó una disminución estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).

**Cuadro 5.6. Promedio de la concentración sérica de Interleucina 4 (pg/mL) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp* complementados con el probiótico *Bacillus subtilis***

Día	Media (pg/mL)	Desviación estándar
0	28.43 <sup>a</sup>	12.56
15	11.93 <sup>b</sup>	6.74
30	12.94 <sup>b</sup>	7.42

Literales diferentes indican diferencias ( $P < 0.05$ )

**Figura 5.6. Efecto de la complementación de la dieta con el probiótico *Bacillus subtilis* en la concentración sérica de Interleucina 4 (pg/mL) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp***



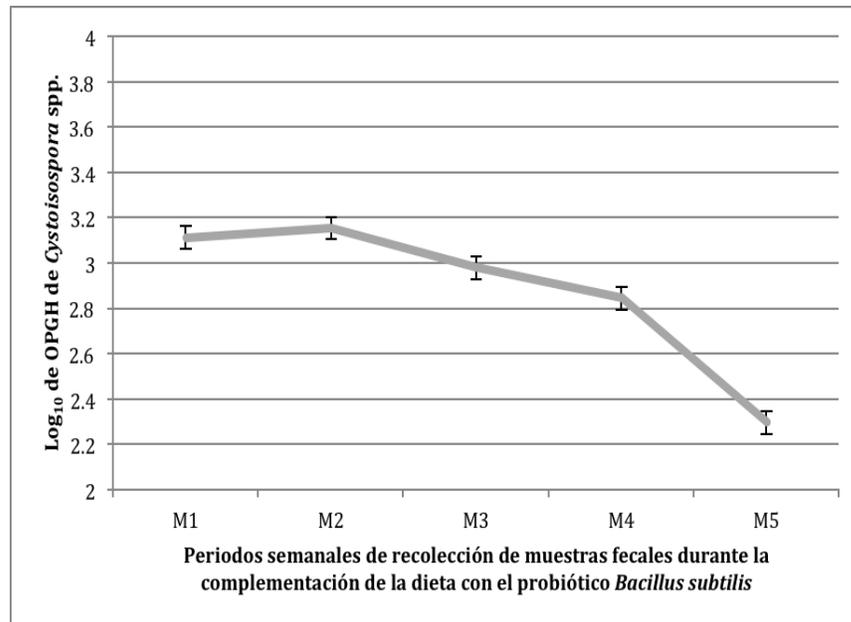
Para la determinación de la carga parasitaria en el grupo de gatos infectados se pudo observar que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los muestreos del día cero y la primera semana, del día cero y la segunda semana, así como entre la tercera y la cuarta semana de tratamiento ( $P>0.05$ ), mientras que se observó una disminución estadísticamente significativa entre los muestreos del día cero y la tercera semana, del día cero y la cuarta semana, entre la primera y la segunda semana, entre la primera y la tercera semana, entre la primera y la cuarta semana y entre la segunda y la cuarta semana de tratamiento ( $P<0.05$ ).

**Cuadro 5.7. Carga parasitaria ( $\text{Log}_{10}$  Ooquistes Por Gramo de Heces) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp* complementados con el probiótico *Bacillus subtilis***

Muestreo	$\text{Log}_{10}$ (OPGH)	Desviación estándar
1	3.11 <sup>a</sup>	0.16
2	3.15 <sup>a</sup>	0.15
3	2.98 <sup>b</sup>	0.17
4	2.85 <sup>b</sup>	0.21
5	2.30 <sup>c</sup>	0.31

Literales diferentes indican diferencias ( $P<0.05$ )

**Figura 5.7. Efecto de la complementación de la dieta con el probiótico *Bacillus subtilis* en la carga parasitaria ( $\text{Log}_{10}$  Ooquistes Por Gramo de Heces) en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp***



# CAPITULO 6

## DISCUSIÓN

El parásito *Cystoisospora felis* es un protozooario que afecta el epitelio intestinal de los gatos. Se denomina coccidiosis a la enfermedad resultante de la infección con este parásito, la cual se caracteriza por causar enteritis. Los parásitos patógenos generan mecanismos de defensa en los huéspedes que eventualmente interfieren con la fisiología del huésped (Schmid-Hempel P, 2011). A pesar de que pareciera ser obvio asumir que siempre es mejor defenderse de los parásitos de manera rápida y eficiente, la respuesta inmune varía entre los individuos y los huéspedes permanecen susceptibles la mayoría de las ocasiones debido a que la enfermedad se presenta como el resultado de factores propios del individuo, el patógeno y el ambiente. Una explicación ecológica de este aparente paradoja consiste en afirmar que las respuestas inmunes generan un costo provocado por el daño tisular inmunopatológico (Dowling *et al*, 2009). El sistema inmune innato de los vertebrados protege al organismo mediante la producción de moléculas inflamatorias y de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales eliminan a los patógenos al provocarles daño en las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (ADN). Las especies reactivas no son específicas de patógeno y también pueden dañar los tejidos del huésped si no hay suficientes antioxidantes protectores presentes. El estrés oxidativo es una situación en la que el equilibrio de radicales oxidantes y antioxidantes se sesga hacia los agentes oxidantes, lo que provoca daño oxidativo a los tejidos propios del organismo (Sies, 1997). Las coccidias son protozoarios intracelulares que habitan el intestino e inhiben directamente la absorción de componentes esenciales de la dieta, incluyendo antioxidantes solubles en lípidos tales como la vitamina E y los carotenoides (Allen *et al*, 2002) generando en consecuencia, daño oxidativo en el huésped. Actualmente se utilizan tratamientos farmacológicos para controlar extensivamente esta enfermedad, pero la presión de selección de resistencia de las cepas parasitarias de otras coccidias ha sustentado el interés en desarrollar métodos alternativos de control. La eliminación del parásito es deseable en todo programa de prevención y control de coccidiosis; no obstante, la modulación de las consecuencias inmunopatológicas también debe ser estudiada para evitar daños tisulares provocados por una respuesta defensiva

desproporcionada del huésped. Por consiguiente, uno de los objetivos de este estudio fue probar si el daño oxidativo medido en términos de la concentración de ROS en una infección natural con coccidias intestinales del género *Cystoisospora* en gatos puede ser contrarrestado con el uso de un producto experimental.

La importancia de la microflora intestinal en la salud y enfermedad está siendo resaltada, particularmente, el papel de la misma en la protección del huésped contra la colonización intestinal de patógenos (McCracken VJ *et al*, 2001). Este papel protector parece ser debido a efectos de barrera no específicos tales como la competencia por sitios de superficie, producción de productos anti-patógeno y aumento de la respuesta inmune; o bien, una combinación de estos factores. Entre las especies de microflora se encuentran las de *Lactobacillus*, las cuales exhiben propiedades que incluyen su capacidad para adherirse a las células, excluir o reducir la adherencia patogénica, persistir y multiplicarse y producir ácidos, peróxido de hidrógeno y péptidos antimicrobianos (Reid G, 1999). Con el avance en el conocimiento sobre la etiología y mecanismos de las diferentes condiciones fisiopatológicas, particularmente de la inflamación, se ha visto que las ROS contribuyen y potencian dicha condición (Kim *et al*, 2004; Faria *et al*, 2005) y aunque los mecanismos endógenos de defensa, han evolucionado para ofrecer protección, se ha visto que algunos agentes de origen natural, aumentan las reservas de antioxidantes del organismo para disminuir el estrés oxidativo.

Durante la fagocitosis, los polimorfonucleares pueden producir un estallido respiratorio seguido de la liberación de radicales oxidantes con el objetivo de atacar a microorganismos invasores (Johnston *et al*, 2008). Sin embargo, una liberación no controlada de estos radicales oxidantes puede dañar al organismo, así un balance en la liberación de radicales oxidantes es esencial para mantener la homeostasis tanto intestinal como sistémica (Li, 2012).

Chiu *et al* (2010) documentaron que la actividad del estallido respiratorio en leucocitos renales del Mero de puntos naranjas fue significativamente más alta en el grupo complementado con el probiótico *Saccharomyces cerevisiae* P13 que en el grupo control. En otro estudio Balcazar *et al* (2009) reportaron que la producción del radical oxidante anión superóxido se incrementó significativamente en fagocitos renales de trucha arcoíris

complementadas con el probiótico *Lactobacillus sakei*. Kumar *et al* (2007) también reportaron el incremento significativo de la actividad del estallido respiratorio en leucocitos de carpa *Labeo rohita* posterior a la complementación del probiótico *Bacillus subtilis* en comparación con el grupo control. Estos estudios concuerdan con lo reportado por Zhou *et al* (2010) en donde se complementó a un grupo de tilapias con los probióticos *Bacillus subtilis* B-10, *Bacillus coagulans* B-16 y *Rhodopseudomonas palustris* G06 y se encontró un incremento significativo en la actividad del estallido respiratorio de los tres probióticos probados en comparación con el grupo control.

A diferencia de lo reportado por estos autores, Vesterlund *et al* (2007) reportaron que el probiótico *Lactobacilli* induce un estallido respiratorio bajo en mononucleocitos sanguíneos periféricos. Estos resultados concuerdan con los hallazgos encontrados durante este estudio, donde se demostró que la complementación con el probiótico *Bacillus subtilis* puede inducir una reducción en la concentración de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en células mononucleares sanguíneas periféricas, especialmente en el grupo de gatos jóvenes adultos infectados naturalmente con *Cystoisospora spp* complementados durante 30 días. Los resultados de este estudio indican que *Bacillus subtilis* podría poseer la habilidad de evitar una estimulación inmune excesiva del estallido respiratorio en células fagocíticas activadas.

De acuerdo con Kelkka (2013) las ROS tanto metabólicas como provenientes de células inflamatorias son consideradas mediadores proinflamatorios, lo cual podría indicar una función antiinflamatoria de *B. subtilis* al disminuir la concentración de las mismas.

En relación al grupo de gatos jóvenes adultos sanos no se encontró una diferencia significativa entre los muestreos durante los 60 días de tratamiento. Debido a que la liberación de radicales oxidantes como resultado del estallido respiratorio en las células fagocíticas ocurre durante una infección (Hillern, 2008), los hallazgos encontrados en nuestro estudio nos indican la ausencia de un estrés oxidativo característico de animales sanos.

## **Citocinas**

Con el propósito de ayudar a controlar una infección cascadas de señalización proinflamatorias son activadas, lo cual resulta en una respuesta inflamatoria que tiene una

función importante desencadenando y estableciendo la respuesta inmune adaptativa a través de la sobrerregulación de citocinas y moléculas coestimuladoras (Lakshmanan, 2007). Las citocinas son moléculas críticas en la generación y resolución de la inflamación y por consiguiente son generalmente agrupadas en dos categorías: proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, e IL-12) y antiinflamatorias (IL-4, IL-10 e IL-13)(Stoycheva, 2005).

En el presente estudio las esporas de *B. subtilis* inducen significativamente ( $P < 0.05$ ) la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), por lo que se puede especular que el probiótico *B. subtilis* podría mejorar la función inmune del macrófago al promover respuestas inflamatorias. Estos resultados son concordantes con los hallazgos de Duc *et al* (2004) y Huang *et al* (2008) quienes demostraron que las cepas de *Bacillus* pueden estimular la secreción de citocinas inflamatorias en macrófagos. En otro estudio realizado, Xu *et al* (2012) demostraron que las esporas de *Bacillus subtilis natto B4* inducen la secreción de citocinas proinflamatorias, especialmente TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en macrófagos de ratón. Zoumpopoulou *et al* (2008) reportaron que probióticos como *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus macedonicus* inducen efectivamente la secreción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en células mononucleares sanguíneas periféricas humanas.

De acuerdo con Adkis (2011) la IL-4 es una citocina que regula la respuesta inmune contra helmintos y otros parásitos extracelulares, por lo tanto se sugiere que la reducción significativa en la producción de IL-4 por las células mononucleares sanguíneas periféricas en los gatos infectados con coccidias reportada en este estudio podría estar relacionada con el aumento de IFN- $\gamma$  y por lo tanto con la disminución significativa ser causada por la disminución significativa ( $P < 0.05$ ) de ooquistes por gramo de heces con la subsecuente reducción del daño oxidativo.

En lo que respecta a las concentraciones de IL-10 este estudio demostró que el probiótico *B. subtilis* no afecta significativamente la producción de IL-10 ( $P > 0.05$ ), lo cual difiere con los resultados de Huang *et al* (2013) donde la complementación con el probiótico *Bacillus subtilis B10* reduce marcadamente la producción de IL-10 por macrófagos de ratón. Otro estudio realizado por Rajput *et al* (2012) reportó que la administración del probiótico *Bacillus subtilis* en patos Shaoxing disminuye la concentración sérica de IL-10 comparado con el grupo control.

De acuerdo a los descrito por Fiorentino *et al* (1991) la IL-10 es una citocina que reduce la síntesis de mediadores inflamatorios. Estos resultados implican que las esporas del probiótico *B. subtilis* podrían funcionar como promotoras de respuestas inflamatorias a través de la modulación de la producción de citocinas por los macrófagos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo no están en concordancia con la inducción de citocinas descrita por otros autores con respecto a los niveles de IL-10 que se generan durante una infección por protozoarios intracelulares (Jankovic et al. 2010; O'Garra y Vieira 2007), ya que estos estudios afirman que los niveles de IL-10 aumentan en presencia de una elevación de las concentraciones de IFN- $\gamma$  a fin de lograr una homeostasis que evite un daño inmunopatológico al tejido. Los resultados del presente estudio, en contraste, no demostraron un aumento de IL-10 a pesar de que los niveles de IFN- $\gamma$  habían incrementado. La posible explicación de este hallazgo se fundamenta en estudios que han sustentado la causa de este tipo de discrepancias. Libraty *et al* (1997) reportaron que el IFN- $\gamma$  puede modular la liberación de IL-12 e IL-10 al incrementar concomitantemente la liberación de IL-12 y al disminuir la liberación de IL-10. Estos datos indican que la presencia o ausencia relativa de IFN- $\gamma$  en el microambiente local es un factor determinante en la respuesta de los monocitos y la liberación subsecuente de citocinas, por lo tanto de eso dependerá el nivel de la respuesta del hospedero a la infección. En el presente estudio, la carga parasitaria era elevada y por lo tanto, se especula que por ello aumentaron los niveles de IFN- $\gamma$  y los de IL-10 se mantuvieron en concentraciones basales, a fin de favorecer la respuesta celular que abatiera la infección parasitaria antes de lograr un equilibrio homeostático, pues la cantidad de parásitos intestinales comprometía la vida del animal.

## **Coccidiosis**

La coccidiosis es controlada principalmente con el uso de fármacos antiprotozoarios que pueden alterar el balance intestinal. Además debido al desarrollo de resistencia a los antibióticos en los microorganismos patógenos hay una necesidad urgente de soluciones naturales y biodegradables que no alteren dicha microbiota.

Los productos que contienen probióticos y que son usados en perros y gatos debido principalmente a su uso en diarreas causadas por el cambio de dieta, estrés o cuando hay desordenes gastrointestinales causados por la antibioterapia generalmente son de uso

humano por lo tanto se requieren más estudios que respalden la utilización de probióticos de uso animal en animales de compañía ya que la mayoría de los estudios son realizados en animales de producción tales como cerdos, aves y bovinos (Musa, 2009). Por lo tanto el presente estudio se realizó con el propósito de determinar el efecto de la suplementación de un probiótico en la modulación de la coccidiosis en gatos.

Simpson *et al* (2009) determinaron que el consumo del probiótico *Enterococcus faecium* durante seis semanas en perros con giardiasis subclínica crónica naturalmente adquirida no afecta significativamente el número de ooquistes por gramo de heces. Estos resultados no concuerdan con aquellos reportados por Benyacoub *et al* (2005) donde se demostró una disminución en el número de trofozoitos de *Giardia* en intestino al día 14 de tratamiento en un grupo de ratones donde se probó el mismo probiótico y dio como resultado final una detección nula de trofozoitos al día 28 de tratamiento. En otros estudios se puede observar el efecto positivo de los probióticos, tal como lo demostraron Dalloul *et al* (2003) donde encontraron que una dieta complementada con un probiótico del género *Lactobacillus* dio resultados positivos en un estudio realizado en aves contra *Eimeria acervulina*. Estos autores demostraron un efecto inmunoregulador en el sistema inmune local de los pollos de engorda y una disminución en la liberación de ooquistes en heces. En un estudio similar Lee *et al* (2007) concluyeron que el probiótico *Pediococcus acidilactici* incrementa la resistencia de las aves y las protege parcialmente contra la coccidiosis, mientras que Giannenas *et al* (2012) demostraron que el número de ooquistes de *Eimeria tenella* por gramo de heces en aves fue menor en grupos de aves con una dieta complementada con diferentes probióticos incluyendo *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus reuteri* y *Bacillus subtilis*.

Estos resultados concuerdan con lo demostrado durante este estudio, donde la complementación con el probiótico *Bacillus subtilis* tuvo un efecto en términos de la disminución significativa ( $P < 0.05$ ) del número de ooquistes en heces en el grupo de gatos jóvenes adultos infectados naturalmente con *Cystoisospora spp* a partir de la tercera semana de tratamiento.

El mecanismo preciso por el cual el probiótico *B. subtilis* antagoniza la infección con *Cystoisospora spp* no es conocido y requiere investigaciones posteriores, sin embargo el efecto protector del probiótico *B. subtilis* contra este patógeno intestinal podría deberse a

factores extracelulares bacterianos (Lievin, 2002), interferencia en las interacciones del patógeno con el enterocito (Bibiloni, 1999) y la modulación del sistema inmune (específico y no específico).

# CAPITULO 7

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, el presente estudio proporciona información inicial que permitirá sustentar la evaluación en experimentos futuros del uso del probiótico *Bacillus subtilis* en el control de la coccidiosis en gatos causada por *Cystoisospora spp.*

Los hallazgos en este estudio indican que la aplicación del probiótico *B. subtilis* disminuye significativamente la cantidad de ooquistes por gramo de heces, así como la concentración sérica de IL-4. Estos resultados sugieren que el probiótico *B. subtilis* puede usarse como una estrategia alternativa antiparasitaria, tanto para la aminoración de los signos en las infecciones parasíticas intestinales así como para la resolución de la enfermedad. Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que el efecto de la complementación del probiótico *B. subtilis* en gatos jóvenes adultos sanos no tiene efecto sobre las concentraciones de ROS.

Al encontrar una disminución significativa en la concentración de ROS en gatos jóvenes adultos infectados con *Cystoisospora spp* se puede concluir que el probiótico *B. subtilis* podría poseer la habilidad de evitar una estimulación inmune excesiva en células fagocíticas activadas evitando así un posible estrés oxidativo y daño celular.

En el presente estudio se encontró un aumento significativo en la concentración de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), lo cual puede indicar que el probiótico *B. subtilis* promueve las respuestas inmunes e inflamatorias al mejorar la función inmune de los macrófagos e incrementa el sistema de defensa previniendo así una subsecuente respuesta inflamatoria intensa. En lo que respecta a las concentraciones de IL-10 la suplementación con el probiótico no tuvo un efecto significativo. Al no modificar las concentraciones séricas de IL-10 el probiótico podría funcionar como promotor de respuestas inflamatorias al favorecer la inducción de una respuesta celular inflamatoria que permita eliminar al parásito. Sin embargo, en vista de que no

aumentaron los niveles de IL-10 se sugiere vigilar cuidadosamente el estado clínico de los animales.

Se reconoce que el presente estudio tuvo varias limitantes, por lo que los resultados no pueden considerarse concluyentes ni permiten sustentar la recomendación del uso del probiótico utilizado como una alternativa inmunomoduladora bajo las condiciones en las que se llevaron a cabo los experimentos; pues no se contó con un grupo testigo de gatos infectados con *Cystoisospora spp.* a los cuales no se les haya administrado el probiótico. Asimismo, lo ideal en un estudio relacionado con parámetros inmunológicos es contar con una población con la menor variabilidad genética posible, así como una homogeneidad con respecto al sexo y etapa del ciclo estral, madurez sexual y presencia de órganos sexuales o no a causa de procedimientos quirúrgicos. Lo anterior en vista de que las hormonas influyen en los mecanismos inmunológicos en diversas infecciones parasitarias (Roberts *et al*, 2001). A pesar de que las condiciones experimentales fueron limitadas, los resultados permitirán realizar estudios futuros en poblaciones homogéneas a fin de replicar, y en su caso, confirmar los datos obtenidos en el presente trabajo y determinar eficazmente el mecanismo de acción en el sistema inmune y ante un desafío parasitario. Asimismo, en los estudios sobre alternativas de control y prevención de las enfermedades parasitarias, lo ideal es trabajar con el huésped natural del parásito, ya que los aspectos coevolutivos influyen significativamente en la resistencia de las diferentes especies animales contra los protozoarios y helmintos parásitos.

## RECOMENDACIONES

Es necesario realizar estudios adicionales en diferentes especies animales para determinar la duración de los tratamientos con diferentes probióticos, las dosis a las cuales deben administrarse y conocer si estos factores pueden disminuir efectivamente la carga parasitaria y de algún modo prevenir o disminuir las reinfecciones.

Muchos estudios han demostrado que cada probiótico influye en el sistema inmune de un modo particular, por lo que se dice que las propiedades inmunomoduladoras son específicas de cada bacteria, por lo que se recomienda tomar estos resultados como propios del probiótico *Bacillus subtilis*.

Se requieren estudios adicionales para determinar los modos de acción precisos de este probiótico tanto en la inmunidad de las membranas mucosas como en la inmunidad sistémica en animales sanos y con diversas patologías.

# CAPITULO 8

## REFERENCIAS

1. Akdis *et al.* Interleukins from 1 to 37 and Interferon- $\gamma$ : Receptors, functions and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2011; 127; 701-721e70.
2. Allen PC, Fetterer RH. Interaction of dietary vitamin E with *Eimeria maxima* infections in chickens. *Poultry Science* 2002; 81; 41–48.
3. Arora M, Poe SL, Ray A, Ray P. LPS-induced CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>int</sup>F4/80<sup>+</sup> regulatory mieloid cells supress allergen-induced airway inflammation. *International Immunopharmacology* 2011; 11; 825-830.
4. Balcazar JL, De Blas I, Ruíz-Zarzuela I, Vendrell D, Girones O, Muzquiz JL. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout. *Immunology and Medical Microbiology* 2007; 51; 185-193.
5. Benyacoub J, Maulden GL, Cavadini C, Sauthier T, Anderson RE, Schiffrin EJ, Weid T. Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *Journal of Nutrition* 2003; 133; 1158 1162.
6. Benyacoub J, Pérez PF, Rochat F, Saudan KY, Reuteler G, Antille N, Humen M, De Antoni GL, Cavadini C, Blum S, Schiffrin EJ. *Enterococcus faecium* SF68 enhances the immune response to *Giardia intestinalis* in mice. *Nutritional Immunology* 2005; 135: 1171-1176.
7. Besné MA. 2014. “Coccidiosis en perros y gatos”. *Infectología de perros y gatos*. Diplomado en Linea. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

8. Bibiloni R, Pérez PF, De Antoni GL. Will a high adhering capacity in a probiotic strain guarantee exclusion of pathogens from intestinal epithelia? *Anaerobe* 1999; 5; 519-524.
9. Boixeda de Miquel Ignacio. Introducción a la alimentación canina y felina. Visión del mercado. Friskies España S.A. XVI Curso de Especialización FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal) 2012.
10. Brandes ME, Wahl SM. Inflammatory Cytokines: An overview. *Xenobiotics and Inflammation*. Academic Press Inc. 1994.
11. Cai H, Kuang Z, Huang K, Shi J, Zhao X, Chu P, Huang C, Ming F, Xia F, Yang J, Zhang L. CpG oligodeoxynucleotide protect neonatal piglets from challenge with the enterotoxigenic *E. coli*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2014; 161; 66-76.
12. Chiu CH, Cheng CH, Gua WR, Guu YK, Cheng W. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology* 2010; 29; 1053-1059.
13. Chu Wm. Tumor Necrosis Factor. *Cancer Letters* 2013; 328; 222-228.
14. Colville J. Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians. American veterinary Publications, Inc. USA. 1991.
15. Commons RJ, Smeesters PR, Proft T, Fraser JD, Robins-Browne R, Curtis N. Streptococcal superantigens: categorization and clinical associations. *Trends in Molecular Medicine* 2014; 20; 48-62.
16. Cummings JH, Beatty ER, Kingman SM, Bingham SA, Englyst HN. Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. *British Journal of Nutrition* 1996; 75: 733-747.
17. Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods* 2002; 265: 49-72.

18. Cutting SM. Bacillus probiotics. Food Microbiology 2011; 28; 214-220.
19. De las Cagigas RAL, Blanco AJ. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición 2002; 16; 63-68.
20. Dowling DK, Simmons LW. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. Proceedings of the Royal Society B; Biological Sciences 2009; 276; 1737–1745.
21. Duc LH, Hong HA, Uyen NQ, Cutting SM. Intracellular fate and immunogenicity of *Bacillus subtilis* spores. Vaccine 2004; 22; 1873-1885.
22. Duerkop BA, Vaishnava S, Hooper LV. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. Immunity Review 2009; 31; 368-375.
23. Dziarsky R. Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system. Cellular and Molecular Life Science 2003; 60; 1793-1804.
24. Fagarasan S, Honjo T. Intestinal IgA synthesis: Regulation of front-line body defences. Nature Reviews. Immunology 2003; 3; 63-72.
25. Falk PG, Hooper LV, Midtved T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62; 1157-1170.
26. Faria A, Oliveira J, Neves P, Gameiro P, Santos BC, De Freitas V, Mateus N. Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005; 53; 6896-6902.
27. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. Journal of Immunology 1991; 147; 3815-3822.
28. Fuller R. probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol 1989; 66; 365-378.
29. Gadani SP, Cronk JC, Norris GT, Kipnis J. Interleukin-4: A cytokine to remember. The Journal of Immunology 2012; 189;4213-4219.

30. Garssen J, Herreilers M, Van Loveren H. Immunomodulation by probiotics: a literature survey. RIVM 340320001/2003.
31. Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2005; 65; 45-80.
32. González Urías M.A; 2012 “*Bacillus subtilis* como promotora del rendimiento y calidad de la fresa”. Tesis de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral regional Unidad Michoacán. Instituto Politécnico Nacional.
33. Green HD, Wakeley PH, Page A, Barnes A, Baccigalupi L, Ricca E, Cutting SM. Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; 65; 4288-4291.
34. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *The Lancet* 2003; 360; 512-519.
35. Hacker G, Redecke V, Hacker H. Activation of the immune system by bacterial CpG-DNA. *Immunology* 2002; 105; 245-251.
36. Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI. Angiogenins: A new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nature Immunology* 2003; 4; 269-273.
37. Hooper LV, Tore M, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr* 2002; 22; 283-307.
38. Huang JM, La Ragione RM, Nunez A, Cutting SM. Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2008; 53;195-203.
39. Huang Q, Xu X, Mao Y, Huang Y, Rajput IR, Li W. Effects of *Bacillus subtilis* B10 spores on viability and biological functions of murine macrophages. *Animal Science Journal* 2013; 84; 247-252.

40. Jankovic D, Kluger DG, Sher A. IL-10 production by CD4<sup>+</sup> effector T cells: a mechanisms of selfregulation. *Mucosal Immunology* 20120; 3; 239-246.
41. Johnston KL, Lamport A, Batt RM. An unexpected bacterial flora in the proximal small intestine of normal cats. *Veterinary Record* 1993; 132; 362-363.
42. Johnston RB, Godzik CA, Cohn ZA. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* 1978; 148; 115-127.
43. Kelkka T; 2013. "Reactive Oxygen Species in inflammation". Doctoral Thesis. Department of Medical Microbiology and Immunology. University of Turku, Finland.
44. Kil, D.Y; Swanson, S; 2011: Companion Animals Symposium: Role of microbes in canine and feline health. *Journal Animal Science*. 90: 1498-1505.
45. Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences* 2004; 96; 229-245.
46. Kumar R, Mukherjee SC, Ranjan R, Nayak SK. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish and Shellfish Immunology* 2008; 24; 168-172.
47. Lakshmanan U, Porter AG. Caspase-4 interacts with TNF receptor-associated factor 6 and mediates lipopolisaccharide-induced NF-kappa $\beta$ -dependent production of IL-8 and CC chemokine ligand 4 (macrophage-inflammatory protein-1). *Journal of Immunology* 2007; 179; 8480-8490.
48. Li WF, Huang Q, Li Y, Rajput IR, Huang Y, Hu C. Induction of probiotic strain *Enterococcus faecium* EF1 on the production of cytokines, superoxide anion and prostaglandin E<sub>2</sub> in a macrophage cell line. *Pakistan Veterinary Journal* 2012; 32; 530-534.
49. Libraty DH, Airan LE, Uyemura K, Jullien D, Spellberg B, Rea TH, Modlin RL. Interferon- $\gamma$  differentially regulates Interleukin 12 and Interleukin 10 production in leprosy. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 99; 336-341.

50. Lievin-Le MV, Amsellem R, Servin AL, Coconnier MH. *Lactobacillus acidophilus* (strain LB) from the resident adult human gastrointestinal microflora exerts activity against brush border damage promoted by a diarrhoeagenic *Escherichia coli* in human enterocyte-like cells. *Gut* 2002; 50; 519-524.
51. Lindsay DS, Dubey JP, Blagburn BL. Biology of *Isospora spp.* from humans, nonhuman primates, and domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews* 1997; 10; 19-34).
52. Lu C, Song G, Lin JM. Reactive oxygen species and their chemiluminescence-detection methods. *Trends in Analytical Chemistry* 2006; 25: 985-995.
53. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004; 303; 1662-1665.
54. Marshall-Jones ZV, Baillon MLA, Croft JM, Butterwick RF. Effects of *Lactobacillus acidophilus* DSM13241 as a probiotic in healthy adult cats. *American Journal of Veterinary Research* 2006; 67; 1005-1012.
55. McCracken VJ, Lorenz RG. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiology* 2001; 3; 1-11.
56. Minamoto Y, Hooda S, Swason KS, Sucholdolski JS. Feline Gastrointestinal Microbiota. *Animal Health Research Reviews* 2012; 13; 64-77.
57. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews. Immunology* 2003; 3; 331-341.
58. Musa HH, Wu SL, Zhu CH, Seri HI, Zhu GQ. The potential benefits of probiotics in animal production and health. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2009; 2; 313-321.
59. O'Garra A, Vieira P. T<sub>H</sub>1 cells control themselves by producing interleukin 10. *Nature Reviews. Immunology* 2007; 7; 425-428.
60. Quera P Rodrigo, Quigley Eamonn. El rol de los prebióticos, probióticos y simbióticos en gastroenterología. *Gastro. Latinoam.* 2005; Vol. 16, No 3: 218-228.

61. Rajput IR, Wei FL, Ya LL, Lei J, Min QW. Application of probiotic (*Bacillus subtilis*) to enhance immunity, antioxidation, digestive enzymes activity and hematological profile of Shaoxing Duck. *Pakistan Veterinary Journal* 2012; 3; 69-72.
62. Reid G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus* Appl. Environ. Microbiology 1999; 65; 3763–3766.
63. Roberts CW, Walker W, Alexander J. Sex-Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14; 476-488.
64. Robinson JM. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochemistry and Cell Biology* 2008; 130:281-297.
65. Rochlitz I. Recommendations for the housing and care of domestic cats in laboratories. *Laboratory Animals* 2000; 34; 1-9.
66. Rodríguez-Vivas RI, Cob GL. Técnicas diagnósticas en parasitología veterinaria. Segunda edición. Universidad Autónoma de Yucatan. Mérida, Yucatan. México. 2005. pp. 38-45.
67. Sanchez-Pobre Berajano P. 1997. “Mecanismos de citotoxicidad del Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  en las líneas celulares L929 y HEPG2”. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.
68. Schmid-Hempel P. Evolutionary Parasitology. The Integrated Study of Infections, Immunology, Ecology, and Genetics New York: Oxford University Press.2011.
69. Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 1997; 82; 291–295.
70. Simon O. Mikroorganismen als Futterzusatzstoffe: Probiotika-Wirksamkeit und Wirkungsweise. 4. BOKU-Symposium Tierernährung ohne antibiotische Leitungsförderer 2005; 10-16.

71. Simpson KW, Risniw M, Bellosa M, Liotta J, Lucio A, Baumgart M, Czernecki-Maulden G, Benyacoub J, Bowman D. Influence of *Enterococcus faecium* SF68 probiotic in giardiasis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2009; 23; 1-6.
72. Stoycheva M, Murdjeva M. Dynamics of serum proinflammatory cytokines in patients with salmonella infection. *Trakia Journal of Science* 2005; 3; 56-60.
73. Strbo N, García-Soto A, Schreiber TH, Podack ER. Secreted heat shock protein gp 96-Ig: next generation vaccines for cancer and infectious diseases. *Immunology and Microbiology in Miami* 2013; 57; 311-325.
74. Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Sekerkova A. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clinical Science* 2014; 126; 593-612.
75. Suchodolski, J.S,C.G. Ruaux, J.M Steiner, K Fetz, and D.A. Williams. Assessment of the qualitative variation in bacterial microflora among compartments of the intestinal tract of dogs by use of a molecular fingerprinting technique. *American Journal of Veterinary Research* 2005; 66; 1556-1562.
76. Sunvold GD, Hussein HS, Fahey GC, Merchen NR, Reinhart GA. In vitro fermentation of cellulose, beet pulp, citrus pulp, and citrus pectin using fecal inoculum from cats, dogs, horses, humans, and pigs and ruminal fluid from cattle. *Journal of Animal Science* 1995; 73; 3639-3648.
77. Tannock GW. Molecular assessment of intestinal microflora. *American Journal of Clinical Nutrition* 2001; 73; 410-414. Vázquez V.S.A. Tesis: Uso de probióticos en gatos en crecimiento: su efecto en algunas variables alimenticias, inmunológicas y fisiológicas. 2009. Págs: 3-16.
78. Terrer LB, Dalmau SJ. Alimentos funcionales: probióticos. *Acta Pediátrica Española* 2001; 59; 150-155.
79. Tlaskalová-Hogenová H, Štěpánková R, Hudcovic T, Tučková L, Cukrowska B, Lodinová-Žádníková R, Kozáková H, Rossmann P, Bártová J, Sokol D, Funda DP, Borovská D, Řeháková Z, Šinkora J, Hofman J, Drastich P, Kokešová A.

Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters* 2004; 93; 97-108.

80. Tlaskalová-Hogenová H, Štěpánková R, Kozáková H, Hudcovic T, Vanucci L, Tučková L, Rossmann P, Hrnčíř T, Kverka M, Zákostelská Z, Klimešová K, Příbylová J, Bártová J, Sanchez D, Fundová P, Borovská D, Šrůtková D, Zídek Z, Schwarzer M, Drastich P, Funda DP. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cellular Molecular Immunology* 2011; 8; 110-120.
81. Travers MA, Florent I, Kohl L, Grellier P. Probiotics for the control of parasites: an overview. *Journal of Parasitology Research* 2011; 11; 1-11.
82. Torres R. Flora intestinal, probióticos y salud. Guadalajara. Edit Gráfica Nueva, Yakult, 1999.
83. Vesterlund S, Vankerckhoven V, Saxelin M, Goossens H, Salminen S, Ouwehand AC. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *International Journal of Food Microbiology* 2007; 116; 325-331.
84. Wilson M, McNab R, Henderson B editors. Bacterial disease mechanisms. Cambridge: Cambridge University Press; 2002.
85. Xu X, Huang Q, Mao Y, Cui Z, Li Y, Huang Y, Rajput IR, Yu D, Li W. Immunomodulatory effects of *Bacillus subtilis* (natto) B4 spores on murine macrophages. *Microbiology and Immunology* 2012; 56; 817-824.
86. Zaidi MR, Merlino G. The two faces of Interferon- $\gamma$  in Cancer. *Clinical Cancer Research* 2011; 17; 6118-6124.
87. Zhou X, Tian Z, Wung Y, Li W. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune responses. *Fish Physiology and Biochemistry* 2010; 36; 501-509.

88. Zoumpopoulou G, Foligne B, Christodoulou K, Grangette C, Pot B, Tsakalidou E. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonate acid (TNBS)-induced colitis and salmonella infection in murine models. International Journal of Food Microbiology 2008; 121; 18-26.

# ANEXOS

**ANEXO 1. Resultados de la determinación de Especies Reactivas de Oxígeno (Unidades Relativas de Fluorescencia) para el grupo de gatos jóvenes adultos sanos obtenidos mediante la técnica 2,7 Diclorodihidrofluoresceinadiacetato (DCFH-DA).**

Individuo	Día 0	Día 30	Día 45	Día 60
1	2.07	2.18	2.38	2.01
2	3.10	2.56	2.82	2.38
3	1.85	1.96	1.91	1.67
4	1.74	1.58	1.58	1.37
5	2.47	2.77	2.70	2.72
6	2.69	2.89	2.61	2.77
7	2.35	2.66	2.48	2.89
8	1.61	1.34	1.69	1.42
9	2.61	2.54	2.66	2.63
10	1.69	1.71	1.71	1.35
11	2.08	2.12	2.27	2.10
12	2.93	2.72	2.85	3.23
13	1.94	2.12	2.20	2.27
14	1.60	1.60	1.71	1.48
<b>Media</b>	2.20	2.20	2.25	2.16
<b>Desviación estándar</b>	0.48	0.49	0.44	0.61

**ANEXO 2. Resultados de la determinación de Especies Reactivas de Oxígeno (Unidades Relativas de Fluorescencia) para el grupo de gatos jóvenes infectados naturalmente con *Cystoisospora spp* obtenidos mediante la técnica 2,7 Diclorodihidrofluoresceinadiacetato (DCFH-DA).**

Individuo	Día 0	Día15	Día 30
1	2.37	1.77	1.77
2	1.96	1.71	1.60
3	2.68	1.80	1.65
4	2.31	1.70	1.70
5	2.73	1.78	1.68
6	2.27	1.85	1.84
7	2.41	1.86	1.69
8	2.51	1.81	1.78
9	1.79	1.82	1.64
10	2.46	1.84	1.73
<b>Media</b>	2.35	1.79	1.71
<b>Desviación estándar</b>	0.29	0.06	0.07

**ANEXO 3. Resultados de la determinación de Factor de Necrosis Tumoral alfa (pg/mL) para el grupo de gatos jóvenes infectados naturalmente con *Cystoisospora spp* obtenidos mediante la técnica de ELISA.**

Individuo	Día 0	Día 15	Día 30
1	19.83	71.56	27.07
2	19.67	38.66	71.32
3	45.22	46.27	51.28
4	30.08	68.68	47.19
5	48.68	21.68	66.62
6	17.91	34.91	52.37
7	27.52	21.01	59.28
8	41.67	28.97	74.57
9	31.75	31.34	28.74
10	32.92	48.44	74.06
<b>Media</b>	31.52	41.15	55.25
<b>Desviación estándar</b>	10.89	17.75	17.37

**ANEXO 4. Resultados de la determinación de Interferón gamma (pg/mL) para el grupo de gatos jóvenes infectados naturalmente con *Cystoisospora spp* obtenidos mediante la técnica de ELISA.**

Individuo	Día 0	Día 15	Día 30
1	200.67	373.06	413.86
2	87.3	304.04	411.75
3	35.31	347.04	384.85
4	118.13	250.67	392.64
5	79.16	330.11	378.43
6	190.41	335.65	390.10
7	166.15	314.72	412.70
8	46.71	399.83	386.53
9	226.54	272.30	387.92
10	147.15	315.94	419.64
<b>Media</b>	129.75	324.34	397.84
<b>Desviación estándar</b>	66.68	44.04	14.93

**ANEXO 5. Resultados de la determinación de Interleucina 10 (pg/mL) para el grupo de gatos jóvenes infectados naturalmente con *Cystoisospora spp* obtenidos mediante la técnica de ELISA.**

Individuo	Día 0	Día 15	Día 30
1	4.95	11.32	8.28
2	2.70	1.76	8.08
3	12.93	14.83	9.68
4	8.51	11.36	4.35
5	14.27	10.52	2.82
6	5.30	11.79	9.46
7	0.65	3.84	4.28
8	2.32	14.46	10.41
9	2.43	2.62	14.31
10	14.82	13.83	6.04
<b>Media</b>	6.89	9.63	7.77
<b>Desviación estándar</b>	5.38	4.99	3.46

**ANEXO 6. Resultados de la determinación de Interleucina 4 (pg/mL) para el grupo de gatos jóvenes infectados naturalmente con *Cystoisospora spp* obtenidos mediante la técnica de ELISA.**

Individuo	Día 0	Día 15	Día 30
1	31.75	13.41	4.35
2	33.58	3.31	14.31
3	16.00	22.47	9.53
4	43.00	2.73	4.13
5	21.88	17.97	23.85
6	1.26	10.97	22.63
7	42.56	17.98	4.39
8	29.23	9.85	11.25
9	32.28	15.46	17.33
10	32.77	5.19	17.61
<b>Media</b>	28.43	11.93	12.94
<b>Desviación estándar</b>	12.56	6.74	7.42

**ANEXO 7. Resultados de la cuantificación de ooquistes de protozooario (ooquistes/gr de heces) para el grupo de gatos jóvenes infectados naturalmente con *Cystoisospora spp* obtenidos mediante la técnica de McMaster.**

<b>Individuo</b>	<b>Muestreo 1</b>	<b>Muestreo 2</b>	<b>Muestreo 3</b>	<b>Muestreo 4</b>	<b>Muestreo 5</b>
<b>1</b>	950	1300	900	700	500
<b>2</b>	1100	1450	750	550	350
<b>3</b>	2400	2000	1800	1400	850
<b>4</b>	950	1100	1050	950	500
<b>5</b>	1300	1450	800	550	250
<b>6</b>	1900	2300	1050	900	450
<b>7</b>	1650	2400	1850	1350	750
<b>8</b>	1800	1200	600	300	150
<b>9</b>	850	800	700	550	100
<b>10</b>	900	1100	750	500	0
<b>Media</b>	1380	1510	1025	775	390
<b>Desviación estándar</b>	502.59	514.20	422.64	350.18	262.53

## **ANEXO 8. PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO**

### **Aislamiento de células mononucleadas de sangre periférica (PBMC)**

- 1) Diluir la sangre heparinizada con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (Sigma).
- 2) Pipetear cuidadosamente sobre el medio de separación Ficoll-Paque (Sigma). (Ejemplo: 1 ml de sangre diluida en 0.5 ml de Ficoll-Paque) Se debe evitar que la sangre y el medio de separación se mezclen.
- 3) Centrifugar a 800g x 30 min a temperatura ambiente.
- 4) Obtener la fracción mononuclear y diluir con PBS.
- 5) Centrifugar a 250g x 10 min a temperatura ambiente.
- 6) Decantar o aspirar el sobrenadante y repetir el paso anterior.
- 7) Resuspender el pellet celular en PBS.

### **Protocolo para la determinación de ROS**

La formación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) se midió a través del uso de la sonda fluorescente sensible a oxidación 2'7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFDA; D6665; Sigma). Esta medición se basa en la oxidación dependiente de ROS del DCFDA a 2'7'-diclorofluoresceína (DCF). Se utilizaron microplacas de 96 pozos a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/pozo en un volumen de 0.1 ml de medio, se lavaron 2 veces con PBS (Sigma) y se incubaron con una 200  $\mu$ l de una solución de DCFDA 10  $\mu$ M por 15 min a 37°C en la oscuridad. Posteriormente las células fueron estimuladas con LPS (1mg/mL). Las células se lavaron con PBS y la producción intracelular de ROS se midió utilizando un espectrofluorímetro (Perkin Elmer LS50B) a 585 nm de excitación y 530 nm de emisión. Como control positivo de estrés oxidativo se utilizaron las celdillas con Medio esencial mínimo (DMEM) (Sigma) DCFDA y xantina oxidasa grado IV (Sigma) y como control negativo se utilizaron celdillas con DMEM y DCFDA.

## **ANEXO 9. PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA PRUEBA DE ELISA DE CAPTURA**

### **CARACTERÍSTICAS DE LOS PAQUETES COMERCIALES DE ELISA UTILIZADOS:**

#### **Proveedor:**

RayBiotech, Inc. (Norcross, GA, EUA)

#### **Especie detectada:**

Felino

#### **Citocinas blanco por paquete comercial:**

IFN-gamma, IL-4, TNF-alfa, IL-10

#### **Reactivos suministrados:**

- Placa de 96 micropozos recubiertos con anticuerpos monoclonales anti-citocina felino
- 1 vial (100 µl) con **anticuerpo conjugado a biotina** (anticuerpos monoclonales anti- citocina felino)
- 1 vial (150 µl) con **estreptavidina-HRP**
- 2 viales con **estándar** citocina de felino liofilizada
- 1 vial (12 ml) de **diluyente de muestra**
- 1 vial (5 ml) de **concentrado de solución amortiguadora de ensayo 20x** (PBS con Tween 20 al 1% y BSA al 10%)
- 1 frasco (50 ml) de **concentrado de solución amortiguadora de lavado 20x** (PBS con Tween 20 al 0.05%)
- 1 vial (15 ml) de **solución de sustrato** (sal diamino del ácido 2-2-azino-di-(3 etil benzotiazolinsulfónico-6)-ABTS)
- 1 vial (15 ml) de **solución de parada** (ácido fosfórico 1 M)
- 1 vial (0.4 ml) **colorante azul**
- 1 vial (0.4 ml) **colorante verde**
- 1 vial (0.4 ml) **colorante rojo**

- **Tapas para placas**

## **PROTOCOLO**

1. Preparar los reactivos, muestras, el anticuerpo de captura y estándares conforme a las instrucciones del fabricante
2. Añadir 100 µL de diluyente de muestra en duplicado a todos los **pozos estándar**
3. Agregar 100 µl de **estándar** preparado a cada pozo.
4. Incubar 2.5 h a temperatura ambiente
5. Añadir 100 µL del **conjugado a biotina** a cada pozo
6. Incubar 1 h a temperatura ambiente con tapa
7. Añadir 100 µl estreptavidina-HRP a todos los pozos
8. Incubar 45 min a temperatura ambiente
9. Añadir 100 µl del reactivo del sustrato ABTS a cada pozo
10. Incubar 30 min a temperatura ambiente
11. Añadir 50 µl de solución de parada a cada pozo
12. Leer a 450 nm en un lector automático de ELISA (Microplate Reader, Elx808, Bio Tek Instruments, EUA)