

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

EFFECTO DEL PROBIÓTICO *Lactobacillus reuteri* EN ESTADO ACTIVO E INACTIVO
Y SUS SOBRENADANTES LIBRES DE CÉLULAS SOBRE LA EXPRESIÓN DE
CITOCINAS EN MONOCITOS DE HUMANO

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CON OPCIÓN EN:

BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

SONIA CAROLINA ROSAS FORNES

HERMOSILLO, SONORA

JUNIO DEL 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



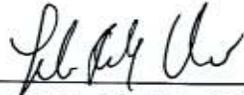
**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de Sonia Carolina Rosas Fornes, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en Biotecnología.



M.C. Leticia Félix Valenzuela

Director de Tesis



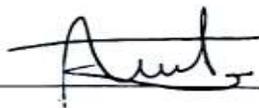
Dr. Marco Antonio López Torres

Sinodal Secretario



Dra. Marina Arenas Padilla

Sinodal



Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta

Suplente

DEDICATORIA

A Dios, por escucharme y darme serenidad en todos los momentos difíciles.

A mi mamá, porque siempre me alentó en esos momentos que yo no podía hacerlo. Por creer en mí cuando yo no lo hacía. Por quererme. Por vivir mis victorias o derrotas como suyas. Por ser mi mejor amiga. Esto es para ti.

A mi papá, por ser la definición de esfuerzo y determinación en mi vida. Por siempre apoyarme y sólo pedir un café a cambio. Te debo mucho. Esto es para ti.

A mis hermanos, Beto y David, por ser mis mejores amigos. Por todas esas veces que tuvieron que llevarme a diferentes lugares, debió ser molesto y aun así lo hicieron, muchas gracias; sé que no hay cosa que no harían por mí, al igual que yo por ustedes.

A mi nana María, que desde el cielo me cuida, escucha y ayuda siempre.

Y finalmente, a mí, no de una forma egocéntrica, sino de una forma amigable y de amor. Por todo lo sufrido y disfrutado.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora y al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, por mi formación como Bióloga.

Al Centro de Investigación en Desarrollo y Alimentación (CIAD, A.C.), por brindarme diversos tipos de apoyo, entre ellos sus instalaciones y equipos para la realización de mi tesis, así como por la beca otorgada en el “Programa de iniciación a la investigación para la formación de capital humano de alto nivel”.

A la Dra. Verónica Mata, por haberme aceptado en su laboratorio a pesar de no saber quién era y por brindarme recomendaciones y apoyo. Por su alegría y sentido del humor.

A mi directora de tesis, la M.C. Leticia Félix, por siempre estar ahí para ayudarme, por ser tan paciente conmigo. Por todas esas risas, dulces, y días de experimento donde nunca me dejó sola. Por enseñarme tantas cosas. Muchísimas gracias por todo lo que vivimos, Lety. Fue una gran directora de tesis.

A la Dra. Marina Arenas, por su gran ayuda no solo en el escrito de mi tesis, también en los análisis de datos y recomendaciones en los diversos seminarios. Muchas gracias, Marina.

Al Dr. Marco Antonio López, por su apoyo y sus críticas constructivas para la mejora de éste trabajo de tesis.

A la Dra. Guadalupe Burboa, por siempre ser tan amable, por asistir a las reuniones y ayudarme con diferentes cuestiones; así como por sus palabras de aliento.

A la Dra. Anna González, por sus recomendaciones en las presentaciones de seminarios en CIAD.

A la Sra. Alma, por acompañarme ese día al laboratorio de la Dra. Mata.

A mis compañeros de laboratorio, las pirañas, por nuestros convivios con o sin motivo aparente. Aprendo cada día de ustedes.

A mis compañeros y amigos de la Licenciatura, por las experiencias vividas.

A mis amigos y a todos aquellos que fueron inspiración y motivación de forma directa e indirecta.

CONTENIDO

| | |
|--|------|
| FORMATO DE APROBACIÓN | ii |
| DEDICATORIA | iii |
| AGRADECIMIENTOS | iv |
| LISTA DE TABLAS | vii |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| RESUMEN | 1 |
| I. INTRODUCCIÓN | 2 |
| II. ANTECEDENTES | 5 |
| II.1. Sistema Inmunológico | 5 |
| II.1.1. Citocinas | 6 |
| II.1.2. Cuantificación de citocinas | 8 |
| II.2. Modulación del Sistema Inmunológico | 11 |
| II.2.1. Probióticos | 12 |
| II.2.2. Paraprobióticos | 14 |
| II.2.3. Postbióticos | 16 |
| II.3. Líneas Celulares..... | 17 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 18 |
| IV. HIPÓTESIS CIENTÍFICA | 20 |
| V. OBJETIVOS | 21 |
| V.1. Objetivo General..... | 21 |
| V.2. Objetivos Específicos | 21 |
| VI. METODOLOGÍA | 22 |
| VI.1. Diseño Experimental | 22 |
| VI.2. Preparación de Tratamientos para Estimulación de Monocitos | 23 |
| VI.3. Cultivo de Monocitos | 24 |
| VI.4. Estimulación de Monocitos | 24 |
| VI.5. Extracción de ARN y Preparación de ADNc | 25 |

| | |
|---|-----------|
| VI.6. Determinación de Citocinas por qPCR | 26 |
| VI.7. Cálculo de la Expresión Relativa de Genes de Citocinas (DDCT) | 27 |
| VI.8. Análisis Estadístico de Expresión Relativa | 27 |
| VII. RESULTADOS | 28 |
| VII.1. Curva de Correlación (DO ₆₀₀ y UFC/ml)..... | 28 |
| VII.2. Determinación de Citocinas por qPCR | 29 |
| VII.2.1. Curvas de amplificación..... | 29 |
| VII.2.2. Curvas de fusión | 31 |
| VII.3. Cálculo de la Expresión Relativa de Genes de Citocinas (DDCT)..... | 33 |
| VII.4. Análisis Estadístico de Expresión Relativa..... | 35 |
| VIII. DISCUSIÓN | 40 |
| IX. CONCLUSIONES | 44 |
| X. RECOMENDACIONES | 45 |
| XI. LITERATURA CITADA | 46 |

LISTA DE TABLAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabla I | Secuencias de iniciadores utilizados en el qPCR. | 26 |
| Tabla II | Expresión relativa de TNF- α , de experimentos 1 y 2 a las 6 y 24 horas de estimulación, obtenida mediante el método DDCT ($2^{-\Delta\Delta CT}$). | 33 |
| Tabla III | Expresión relativa de IL-10, de experimentos 1 y 2 a las 6 y 24 horas de estimulación, obtenida mediante el método DDCT ($2^{-\Delta\Delta CT}$). | 34 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Mecanismo de acción presentado por las citocinas. | 7 |
| Figura 2 | Mecanismos de interacción de las citocinas con sus receptores. | 8 |
| Figura 3 | Representación de una curva de amplificación obtenida en una qPCR. | 10 |
| Figura 4 | Representación de una curva de temperatura obtenida en una qPCR. | 10 |
| Figura 5 | Métodos de inactivación de paraprobóticos y sus efectos. UV: Rayos Ultravioleta, S: Sonicación, TT: Tratamiento Termal, pH: potencial de hidrógeno. | 15 |
| Figura 6 | Diagrama general experimental donde se señala de forma resumida aquellos procedimientos realizados en la metodología. | 22 |
| Figura 7 | Condiciones y tratamientos utilizados en la estimulación de las células THP-1. | 25 |
| Figura 8 | Curva de correlación lineal de densidad óptica y concentración bacteriana de <i>Lactobacillus reuteri</i> NRRL B -14171 utilizada para la determinación de la concentración de inóculo a utilizar en los diferentes tratamientos experimentales. | 28 |
| Figura 9 | Curva de amplificación representativa de IL-10. | 29 |
| Figura 10 | Curva de amplificación representativa de TNF- α . | 30 |
| Figura 11 | Curva de amplificación representativa de GADPH. | 30 |
| Figura 12 | Curva representativa de la temperatura de fusión para TNF- α . | 31 |
| Figura 13 | Curva representativa de la temperatura de fusión para IL-10. | 32 |
| Figura 14 | Curva representativa de la temperatura de fusión para GADPH. | 32 |
| Figura 15 | Expresión relativa de TNF- α de células THP-1 estimuladas por los diferentes tratamientos durante 6 | 35 |

horas. Las barras en la parte superior representan el error estándar (SEM, por sus siglas en inglés) mientras que letras distintas representan diferencias entre tratamientos (ANOVA, *post hoc* prueba de Tukey) $p < 0.05$.

- | | | |
|-----------|---|----|
| Figura 16 | Expresión relativa de TNF- α de células THP-1 estimuladas por los diferentes tratamientos durante 24 horas. Las barras en la parte superior representan el error estándar (SEM, por sus siglas en inglés) mientras que letras distintas representan diferencias entre tratamientos (ANOVA, <i>post hoc</i> prueba de Tukey) $p < 0.05$. | 36 |
| Figura 17 | Expresión relativa de IL-10 de células THP-1 estimuladas por los diferentes tratamientos durante 6 horas. Las barras en la parte superior representan el error estándar (SEM, por sus siglas en inglés) mientras que letras distintas representan diferencias entre tratamientos (ANOVA, <i>post hoc</i> prueba de Tukey) $p < 0.05$. | 37 |
| Figura 18 | Expresión relativa de IL-10 de células THP-1 estimuladas por los diferentes tratamientos durante 24 horas. Las barras en la parte superior representan el error estándar (SEM, por sus siglas en inglés) mientras que letras distintas representan diferencias entre tratamientos (ANOVA, <i>post hoc</i> prueba de Tukey) $p < 0.05$. | 38 |

RESUMEN

Una de las características de gran importancia dentro de la modulación del sistema inmunológico por parte de probióticos, es la expresión de citocinas. La relevancia de su estudio radica en comprender acerca de la compleja interacción entre los probióticos y las respuestas brindadas por el hospedero. Hasta hace algún tiempo se consideraba la viabilidad de las bacterias como un factor clave para la producción de respuestas; sin embargo, líneas de investigación dentro de probióticos, como son paraprobióticos y postbióticos han surgido recientemente, presentando de igual forma efectos moduladores. Por tanto, en el presente trabajo se utilizó el probiótico *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 en su estado vivo e inactivo, así como sus sobrenadantes libres de células, para determinar su efecto sobre la expresión de citocinas en monocitos de la línea celular humana THP-1. Para lo anterior, se utilizaron los siguientes tratamientos de estimulación: Bacteria Viva (BV), Sobrenadante de la Bacteria Viva (SBV), Bacteria Inactiva (BI) y Sobrenadante de la Bacteria Inactiva (SBI) por periodo de 6 y 24 horas; además se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa en Tiempo Real (RT-qPCR) para cuantificar la expresión relativa de IL-10 y TNF- α utilizando el método DDCT ($2^{-\Delta\Delta CT}$). De acuerdo con los resultados obtenidos, el tratamiento SBV fue el mayor inductor de la expresión de ambas citocinas, en los tiempos de estimulación estudiados. *L. reuteri* produce metabolitos como reuterina, histamina y tiramina, que podrían explicar el aumento de TNF- α e IL-10, así como su equilibrio a las 24 horas. Sin embargo, son necesarias más investigaciones para establecer efectos proporcionados por paraprobióticos y postbióticos, ya que representan una alternativa de utilización con un futuro prometedor.

I. INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico es un conjunto de células, tejidos y productos solubles con capacidad de reconocer, atacar y destruir todo aquello que podría resultar como una amenaza a la salud de los individuos (Mak et al., 2014). Generalmente se clasifica al sistema inmunológico en dos categorías: innato y adaptativo. El primero representa una respuesta rápida pero no específica ante un estímulo, mientras el segundo se caracteriza por ser específico ante los organismos que amenazan al individuo (De Melo et al., 2010).

El tracto gastrointestinal humano posee un rol central en la homeostasis del sistema inmunológico. Es la ruta principal de contacto entre el medio exterior y el individuo, estando en contacto con estímulos externos la mayor parte del tiempo (Vighi et al., 2008). Su composición comprende una compleja y dinámica población de microorganismos, conocidos como la microbiota gastrointestinal (Thursby y Juge, 2017); su relevancia radica en ser partícipes del desarrollo y mantenimiento de una correcta función del sistema inmunológico (Jensen et al., 2015). Una de las estrategias más eficaces en la actualidad para mantener un equilibrio saludable de la microbiota intestinal, es la administración de probióticos como suplementos o su consumo en alimentos (De Almada et al., 2016).

Etimológicamente el término probiótico es derivado del latín “pro” y del griego “bios” y significa “por la vida” (Salazara y Montoya, 2003). La definición brindada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), enuncia que probióticos son “cepas vivas de microorganismos seleccionados estrictamente, los cuales administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del hospedero” (FAO/WHO, 2002). Debido a que una diversidad de estudios clínicos han probado la efectividad de los probióticos, la utilización de los mismos va en aumento; cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las más utilizadas comercialmente (Plaza-Díaz y Ruiz-Ojeda, 2017). Se han empleado como tratamiento para

enfermedades como obesidad, síndrome de resistencia a la insulina, diabetes tipo II e hígado graso no relacionado al alcohol. Además, los efectos positivos de los probióticos en la salud humana han sido demostrados al incrementar la inmunidad del cuerpo, conocida como inmunomodulación (Markowiak y Slizewska, 2017).

Hasta hace algunos años se creía que la viabilidad era un requisito para la funcionalidad de los probióticos, ya que potencia mecanismos como adherencia, reducción de la permeabilidad intestinal e inmunomodulación. Sin embargo, se ha demostrado que la viabilidad en los probióticos no es estrictamente necesaria, ya que los efectos no están relacionados totalmente con la misma (Kechagia et al., 2013). Las células de probióticos en estado activo perderán inevitablemente su viabilidad y el contenido real de los productos que los contienen, comprenderá una variedad de poblaciones de células muertas. Estas poblaciones podrían ser incluso más grandes que aquellas poblaciones de células vivas, pero esto generalmente se desconoce (Adams, 2010).

Se ha designado el nombre de paraprobióticos para aquellas cepas probióticas bacterianas que se han sometido a un tratamiento de inactivación, causando cambios en sus componentes. A pesar de esto, se ha comprobado que los paraprobióticos podrían ejercer una actividad biológica en el hospedero, ya que conservan importantes estructuras bacterianas (Patel y Denning, 2013) como componentes de la pared celular o ADN (Kechagia et al., 2013). Además, diversos estudios han demostrado que algunas cepas del género *Lactobacillus* inactivadas por calor mejoran la inmunidad en el consumidor (Saito et al., 2018).

Además de los paraprobióticos, el surgimiento de los postbióticos acontece también en tiempo similar, poniendo en cuestionamiento la viabilidad del microorganismo como fundamental en la modulación de respuestas. Los postbióticos son productos secretados por las bacterias en estado vivo o después de una lisis celular, siendo un ejemplo de esto, los sobrenadantes libres de células resultantes de un cultivo bacteriano. Dentro de sus funciones se encuentran: antimicrobianas, antioxidantes e inmunomodulatorias (Aguilar-Toalá et al., 2018).

Tanto los paraprobióticos como los postbióticos tienen la capacidad de modular respuestas en el sistema inmunológico, representando una alternativa de utilización con

posibles beneficios en el sector salud, como son las mitigaciones de padecimientos y en el sector económico, como la reducción de costos de mantenimiento y transporte.

Por todo lo anterior, debido a que las bacterias ácido lácticas (LAB, por sus siglas en inglés) no solo en su estado activo pueden modular el sistema inmunológico (Kataria et al., 2009), en el presente trabajo se utilizó la cepa de *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 en su estado vivo (probiótico) e inactivo (paraprobiótico), así como sus sobrenadantes libres de células (postbiótico), con el fin de investigar sus efectos de inmunomodulación, específicamente mediante la expresión de citocinas.

II. ANTECEDENTES

II.1. Sistema Inmunológico

Vivimos en un mundo poblado de una gran cantidad de organismos con los cuales interactuamos diariamente. Estas interacciones nos hacen estar expuestos a diversos factores que en ocasiones representan una amenaza a nuestra homeostasis. Por ende, no es de extrañar que el sistema inmunológico sea una red compleja compuesta de mecanismos y células que brindan protección (Chaplin, 2010). Para su funcionamiento, el sistema inmunológico está dividido en dos categorías: innato y adaptativo.

El sistema inmunológico innato provee la primera línea de defensa contra los patógenos invasores. Las células involucradas son neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas, siendo estas últimas un puente con el sistema inmunológico adaptativo (Simon et al., 2015). Las células del sistema inmune innato, no son específicas en cuanto al reconocimiento de sus objetivos, a diferencia del sistema inmune adaptativo. Sin embargo, esta primera línea de defensa depende en gran medida del número de células fagocíticas y proteínas, las cuales después activan la respuesta inmune adaptativa (Kalam et al., 2018).

El sistema inmunológico adaptativo a diferencia del innato, manifiesta mecanismos específicos contra antígenos. Las respuestas se basan en los receptores de antígeno específicos expresados en la superficie de los linfocitos T y B. Frecuentemente la inmunidad innata y adaptativa son descritas como mecanismos contrastantes y separados; sin embargo, usualmente trabajan juntos, siendo la inmunidad innata la respuesta inmediata y la adaptativa predomina con el paso de los días (Chaplin, 2010).

Los monocitos y los macrófagos son células de importancia para la respuesta innata y adaptativa; dentro de sus funciones principales se encuentra la defensa inmune, inflamación y

renovación de tejido (Kratofil et al., 2017). Estas células están involucradas en procesos inflamatorios, tienen la capacidad de sintetizar y secretar proteínas conocidas como citocinas, con funciones pro y anti-inflamatorias (Chanput et al., 2010), las cuales se detallarán en el siguiente apartado.

II.1.1. Citocinas

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular, producidas por una gran cantidad de células incluidas las del sistema inmunológico, como monocitos y macrófagos, que son fundamentales en el intercambio de información entre dicho sistema y las células del huésped (McInnes, 2017). Las citocinas regulan diversas funciones biológicas del sistema inmunológico innato y adaptativo (Fan-Chung, 2009), como respuestas no específicas a infecciones, respuestas específicas a un antígeno determinado, comunicación celular y otras más (Dinarello, 2011).

Dentro del grupo de las citocinas se incluyen las interleucinas (IL) los factores de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés), los interferones (IFN), los factores de estimulación de colonias (CSF, por sus siglas en inglés) y las quimiocinas (Filella et al., 2002). Es relevante señalar la importancia de IL-10 y TNF- α para el mantenimiento de la homeostasis y regulación del sistema inmunológico. La primera, es una citocina de tipo anti-inflamatoria con un rol central en equilibrar respuestas anti y pro-inflamatorias; la segunda se caracteriza por ser pro-inflamatoria y está relacionada con procesos infecciosos, activación de células del sistema inmune y por ende, la liberación de citocinas.

La actividad biológica de las citocinas se produce a través de esa interacción con receptores de membrana específicos que desencadenan una cascada de reacciones bioquímicas en el interior de la célula diana que determina su acción biológica (Filella et al., 2002). En la Figura 1 se muestra el mecanismo de acción de las citocinas.

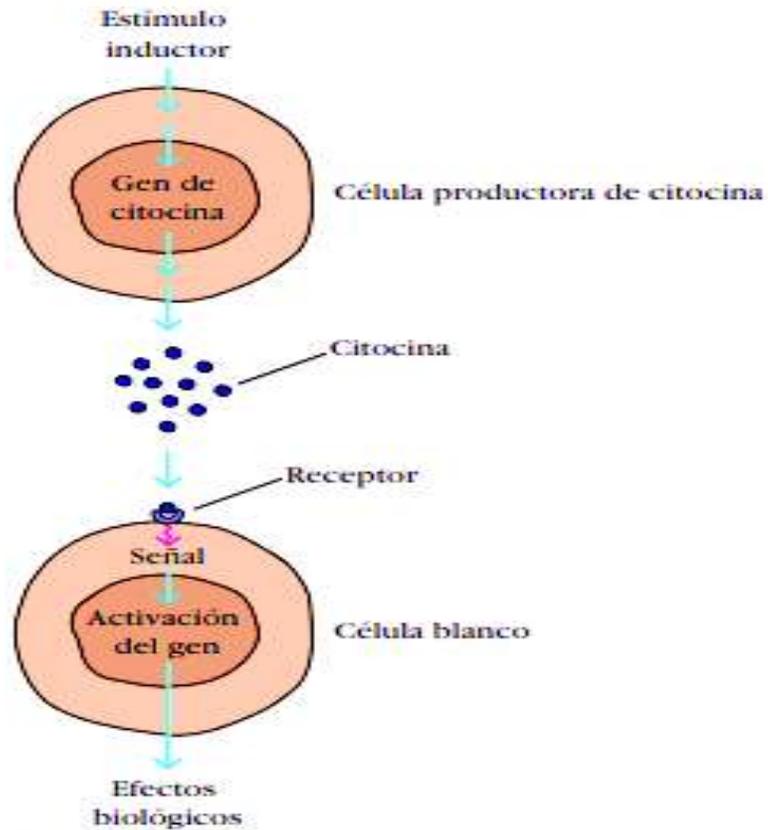


Figura 1. Mecanismo de acción presentado por las citocinas. Fuente: Kindt et al., 2007.

Los mecanismos de interacción de las citocinas son diversos; pueden actuar directamente en las células que los secretan (acción autócrina), o en células cercanas a ellas (acción parácrina), o en algunas ocasiones en células distantes a ellas (acción endócrina). Lo explicado anteriormente se resume en la Figura 2 (Zhang y An, 2007).

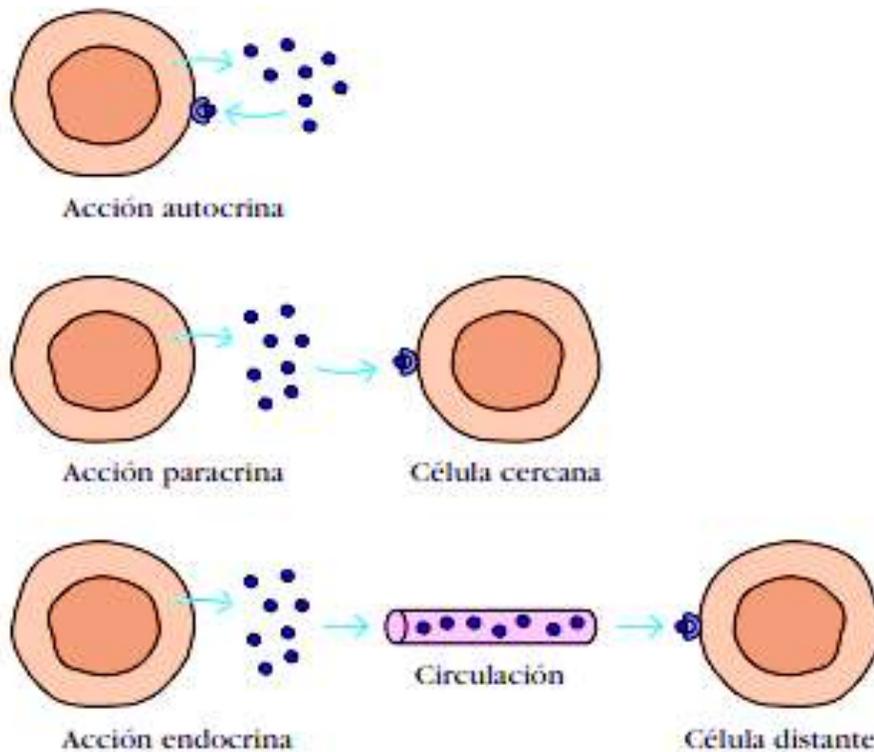


Figura 2. Mecanismos de interacción de las citocinas con sus receptores. Fuente: Kindt et al., 2007.

Es importante destacar que muchos investigadores utilizan la expresión de ARNm de genes de citocinas como herramienta para medir respuestas inmunitarias (Kim y Austin, 2006), tal como se explica en el siguiente apartado.

II.1.2. Cuantificación de citocinas

La expresión génica es el proceso por el cual la información codificada en los genes se traduce a proteínas (Arasappan et al., 2010). La complejidad de este proceso radica en que se ven involucrados distintos eventos en coordinación, que son regulados en múltiples niveles como son: transcripción, post-transcripción, traducción y post-traducción (Preziosi, 2007).

En los trabajos de investigación relacionados con el sistema inmune, es común y fundamental el determinar las variaciones de ciertos genes, o los cambios en su expresión. Los cambios en la expresión génica son cuantificables, para lo cual debe elegirse el tipo de cuantificación a realizar, misma que puede ser de dos tipos: absoluta y relativa. La

cuantificación absoluta determina la cantidad de copias de los genes estudiados utilizando una curva de calibración. En cambio, la cuantificación relativa determina la diferencia en la expresión de ARNm de los genes deseados sometidos a diferentes condiciones experimentales con respecto a una expresión basal. Para lo anterior, es necesario seleccionar genes de referencia, es decir, genes en los cuales la expresión no cambia a pesar de los tratamientos (Pfaffl, 2006).

Dentro de los métodos moleculares más utilizados para cuantificar la expresión génica se encuentran: *northern blot*, micro y macroarreglos, análisis en serie de la expresión génica (SAGE, por sus siglas en inglés) y el método de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real (RT-qPCR); siendo esta última, una de las técnicas más utilizadas en la actualidad.

La RT-qPCR es un método altamente sensible que detecta escasas cantidades de ácidos nucleicos, siendo capaz de proporcionar resultados con alta eficiencia (Ramos-Payan et al., 2002). Esta técnica combina la amplificación y la detección de ácidos nucleicos en un mismo paso (Aguilera et al., 2014), se realizan en equipos conocidos como termocicladores y utilizan sondas específicas o fluorocromos no específicos que se unen a las ácidos nucleicos (Costa, 2004). Su fundamento se basa en que la señal de fluorescencia emitida, producto de la amplificación del gen diana, se registra en forma de valores numéricos conocidos como valores Ct (threshold cycle, por sus siglas en inglés) o valores umbral de ciclo. Los datos quedan registrados en el software específico del termociclador, formando una curva de fluorescencia, donde se fija un punto por encima de la línea base que se denomina umbral de ciclo. Los valores umbral de ciclo se determinan identificando el ciclo en el cual la emisión fluorescente atraviesa el punto umbral, por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción, y son los valores que se utilizarán para calcular la expresión génica relativa, como se presenta en la Figura 3 (Castanera, 2011).

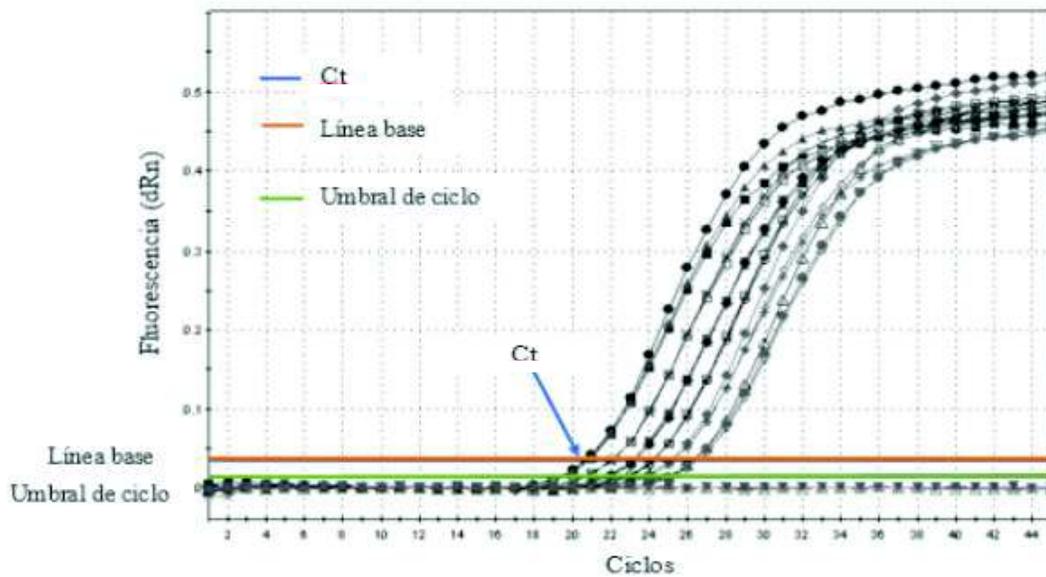


Figura 3. Representación de una curva de amplificación obtenida en una qPCR. Fuente: Bustin y Nolan, 2006.

Por otra parte, al representar gráficamente la fluorescencia detectada en función de la temperatura, se obtienen las curvas de fusión, las cuales confirmarán la aparición de nuestro producto esperado (Castanera, 2011), como se presenta en la Figura 4.

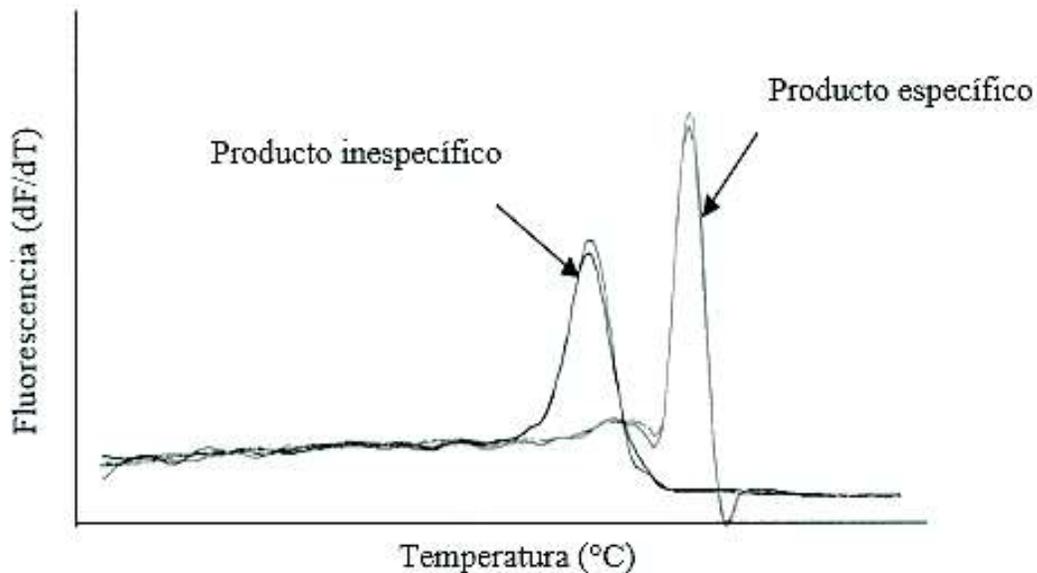


Figura 4. Representación de una curva de fusión obtenida en una qPCR. Fuente: Keer, 2008.

Además de seleccionar una técnica para cuantificar la expresión génica, es indispensable seleccionar un método para el análisis de los datos. Para el cálculo de la expresión relativa, existe un modelo matemático llamado método comparativo DDCT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) el cual se basa en la comparación de los valores Ct obtenidos en cada condición experimental, normalizados con los controles internos, como la expresión de genes de referencia. Con ayuda de éste modelo matemático se obtienen los cambios relativos en la expresión de genes problema (Livak y Schmitgen, 2001).

II.2. Modulación del Sistema Inmunológico

La salud de los organismos está relacionada con un balance eficiente de las funciones inmunológicas. Estas funciones, pueden ser mediadas por muchos factores, como la modulación inmunológica (Chanput et al., 2014), también conocida como inmunoestimulación, inmunoregulación o inmunomodulación (Jindal, 2004). Este proceso, tiene como principal objetivo el proporcionar al huésped homeostasis inmunológica, así como proveer protección contra ataques de microorganismos u otros agentes causantes de infecciones (Dhama et al., 2015).

Nuevas evidencias sugieren que la microbiota y el sistema inmunológico interactúan para mantener la homeostasis de los individuos. Algunos padecimientos en el ser humano se han asociado con la perturbación de la microbiota, mientras que la restauración de la misma ha demostrado la prevención o la mejora de determinadas enfermedades (Qinghui et al., 2018).

Gran variedad de organismos son conocidos como estimulantes de las funciones del sistema inmunológico (Werner y Jollés, 1996), tales como los probióticos, que son capaces de otorgar protección al huésped a través de la regulación, estimulación y modulación de respuestas del sistema inmune (Azad et al., 2018); de igual forma, paraprobióticos y postbióticos han presentado esta cualidad como podrá ser visto en los apartados siguientes.

II.2.1. Probióticos

Los probióticos son organismos vivos que al ser administrados en las dosis adecuadas confieren un beneficio a la salud del huésped (Hou et al., 2015). Dentro de sus efectos benéficos se encuentran: mejora de la salud del tracto gastrointestinal, al prevenir y mejorar padecimientos como diarreas; protección contra alergias, así como la reducción de padecimientos cardiacos, al disminuir el porcentaje de colesterol (Kechagia et al., 2013). En el sistema inmunológico, dentro de los efectos destacados es la inmunomodulación (Fang y Polk, 2014), siendo la capacidad de inducir la producción de citocinas en las células, uno de los mecanismos más estudiados (Ashraf y Shah, 2011). Los efectos inmunomodulatorios de los probióticos se deben en parte a esta habilidad, las citocinas son determinantes en la regulación de respuestas del sistema inmune innato y adaptativo (Brisbin et al., 2010).

Diversos estudios han concluido que la inducción de citocinas es cepa-específica (Ashraf y Shah, 2011). Esto nos indica que las cepas de un determinado género podrían inducir resultados diferentes. Las citocinas inducidas por especies del género *Lactobacillus* tienen un rol importante en la inmunoregulación. Algunas cepas de *Lactobacillus* pueden inducir citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e IFN- γ así como citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y el factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β , por sus siglas en inglés) (Shida et al., 2006).

Dentro de los probióticos frecuentemente utilizados se encuentran el grupo de las Bacterias Ácido Lácticas (LAB). Éstas son un grupo de bacterias Gram-positivas que comparten la característica de convertir rápidamente los carbohidratos a lactatos, acidificando su ambiente (Burgé et al., 2015). Las LAB se encuentran distribuidas ampliamente en hábitats naturales, como tractos gastrointestinales de humanos y mamíferos, así como también en alimentos fermentados (Gilliland, 1990).

Al encontrarse en una convivencia constante con su entorno, las células del sistema inmune interactúan con diversos estímulos del medio. Estos estímulos son reconocidos por medio de receptores celulares, llamados Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR, por

sus siglas en inglés). Dentro de estos receptores se incluyen la familia muy bien caracterizada de los Receptores Tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés). Éstos son imprescindibles para el inicio de una respuesta inmunitaria innata y se activan al detectar estructuras como los componentes de la pared celular de las bacterias. La activación de TLRs genera diferentes cascadas de señalización intracelular que culminan en la producción de citocinas (Samsonetti, 2004; Arribas, 2009). En el caso de los lactobacilos, los ácidos teicoicos presentes en bacterias Gram-positivas son considerados uno de los componentes principales en la inmunoestimulación mediante TLR2 (Vissers et al., 2010).

En los estudios de inmunomodulación se han utilizado bacterias vivas, bacterias inactivadas (calor, radiación, etc.), componentes de la pared bacteriana, ácido desoxirribonucleico genómico (ADN), o sobrenadantes de cultivos bacterianos libres de células. Sin embargo, la cantidad de estudios que investigan estas tres condiciones en las LAB, se encuentran muy limitados (Jensen et al., 2015).

II.2.1.1. *Lactobacillus reuteri*

El género *Lactobacillus* es uno de los más utilizados como probióticos, comprendiendo un amplio grupo heterogéneo de bacterias Gram-positivas, anaerobias facultativas, encontrándose en una gran cantidad de ambientes, siendo utilizados en la industria en la fabricación de productos fermentados y en mejoras a la salud de humanos y animales (Hou et al., 2015).

Lactobacillus reuteri, ha sido caracterizada como una bacteria heterofermentativa, teniendo así, la capacidad de crecer en ambientes donde la cantidad de oxígeno es limitada. Este organismo puede tolerar una gran variedad de ambientes con diferentes pH, utiliza diferentes mecanismos que le permiten inhibir microorganismos patógenos, como la capacidad de secretar componentes antimicrobiales (Qinghui et al., 2018), como ácido láctico, peróxido de hidrógeno, reuterociclina, reuterina, histamina, entre otras (Jones y Versalovic, 2009). Por otra parte, el hecho de que normalmente colonice los tractos gastrointestinales podría ser la razón por la cual confiere grandes beneficios al ser utilizada como probiótico (Qinghui et al.,

2018); su gran capacidad de adherencia al tracto digestivo le permite competir contra patógenos por espacio y nutrientes.

Estudios tanto en humanos como animales han demostrado los efectos benéficos de *L. reuteri*. Dentro de estos beneficios se encuentran la reducción de la incidencia y severidad de diarreas y dolor visceral; prevención de cólico y mantenimiento de la funcionalidad de la barrera intestinal. En animales ha sido utilizada en cerdos para modular la microbiota gastrointestinal, teniendo como objetivo la prevención de diarrea post-destete y estimular el crecimiento en lechones. También esta bacteria presenta un futuro prometedor como terapia para aminorar el cólico infantil, alivio contra eczema y supresión de la infección por la bacteria *Helicobacter pylori* (Jones y Versalovic, 2009). En cuanto a los efectos provistos en el sistema inmunológico, *L. reuteri* tiene la capacidad de estimular o suprimir respuestas del sistema inmune innato al afectar la producción de citocinas en monocitos, macrófagos y células dendríticas (Hou et al., 2015).

II.2.2. Paraprobióticos

Los paraprobióticos, también conocidos como “probióticos inactivados”, “probióticos no viables” o “probióticos fantasma”, hacen referencia a células de microorganismos inactivados (no viables), los cuales al ser administrados en suficientes cantidades, confieren un beneficio al consumidor (Traverniti y Guglielmetti, 2011). La inactivación de las células se logra a través de métodos físicos o químicos, los cuales pueden alterar las estructuras de las células bacterianas al igual que sus funciones, como se muestra en la Figura 5 (De Almada et al., 2016).

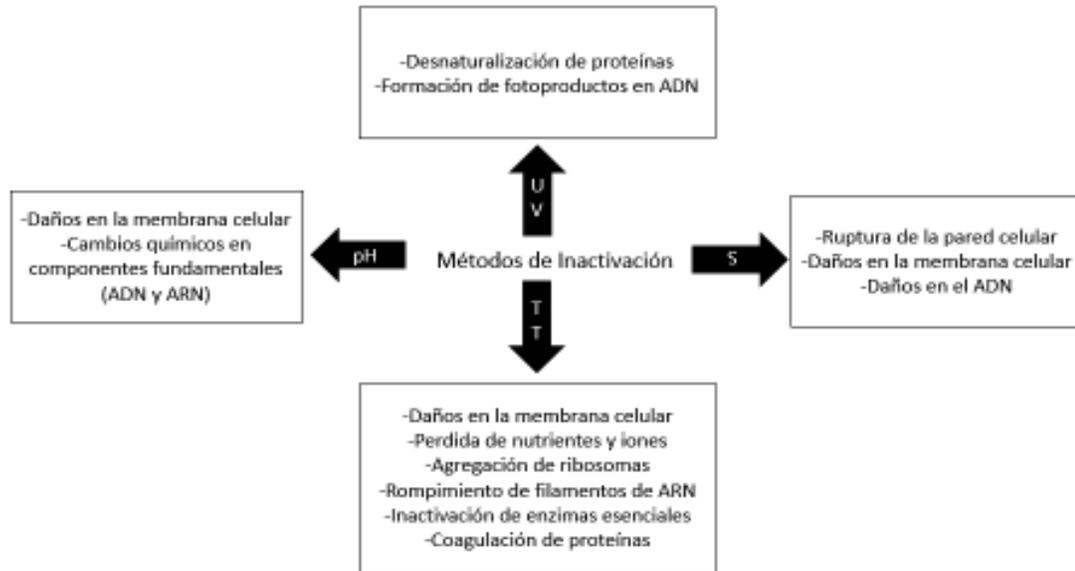


Figura 5. Métodos de inactivación de paraprobióticos y sus efectos. UV: Rayos Ultravioleta, S: Sonicación, TT: Tratamiento Termal, pH: potencial de hidrógeno. Fuente: De Almada et al., 2016.

Los tratamientos termales comprenden los procedimientos más comunes para inactivar microorganismos, los cuales consisten en la aplicación de calor por un periodo determinado (De Almada et al., 2016). Ou et al. (2011) utilizó cepas de bacterias ácido lácticas inactivadas por calor, a diferentes condiciones de temperaturas y tiempos, para determinar su capacidad inmunomoduladora, concluyendo que las propiedades que estos microorganismos confieren eran cepa-dependientes.

Los paraprobióticos al igual que los probióticos tienen la habilidad de estimular las defensas del huésped cuando se presenta una infección. El paraprobiótico de *Lactobacillus plantarum* b240, inactivado por calor y resuspendido en solución fisiológica salina, demostró que puede proteger al huésped en contra de una infección sistémica causada por *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (De Almada et al., 2016).

En un estudio realizado con tres cepas del género *Lactobacillus*, inactivadas por calor, se demostró que éstas fueron capaces de modular la respuesta inmunológica al estimular la proliferación de esplenocitos murinos. También otro estudio en ratones, mostró que 6 cepas del género *Lactobacillus* inactivadas por calor, activan la respuesta pro-inflamatoria induciendo la secreción de TNF- α en células esplénicas mononucleares (Adams, 2010).

II.2.3. Postbióticos

Los postbióticos, también conocidos como metabiómicos, biogénicos, sobrenadantes libres de células (CFS, por sus siglas en inglés) o simplemente como metabolitos bacterianos, hacen referencia a factores solubles, los cuales pueden ser bioproductos o productos metabólicos, secretados por la bacteria en estado vivo o liberados después de una lisis bacteriana (Aguilar-Toalá et al., 2018).

Entre los postbióticos se encuentran ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, por sus siglas en inglés), enzimas, péptidos, ácidos teicoicos, muropéptidos derivados de peptidoglicano, endo y exo-polisacáridos, receptores de superficie celular, vitaminas, plasmalógenos y ácidos orgánicos (Tsilingiri y Recsigno, 2013). Dentro de sus propiedades funcionales se encuentran las de tipo antimicrobianas, antioxidantes e inmunomodulatorias (Aguilar-Toalá et al., 2018). Los componentes de la pared celular bacteriana, como lipopolisacáridos, peptidoglicanos y ácidos lipoteicoicos, están involucrados en la inducción de citocinas (Ashraf y Shah, 2011).

Dentro de los trabajos realizados con postbióticos se encuentra el de Jones-Versalovic (2009), donde utilizaron sobrenadantes provenientes de cultivos planctónicos de *Lactobacillus reuteri*, y observaron una disminución en la producción de TNF- α y la supresión de esta citocina fue un factor importante para el alivio de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, por sus siglas en inglés), en un modelo murino. Un estudio *in vitro* demostró también las propiedades inmunomodulatorias de sobrenadantes libres de células de cepas de *L. reuteri*, provenientes de una fase de cultivo estacionaria (biofilm) y en su estado libre (planctónico), estimularon células monocíticas THP-1 en presencia o ausencia de lipopolisacárido (LPS). El resultado que obtuvieron fue que este probiótico posee la capacidad de regular la producción de TNF- α de forma cepa- específica, y la inhibición de esta citocina se mantuvo independiente del tipo de cultivo de la cepa probiótica (tanto planctónica como biofilm) (Jones y Versalovic, 2009).

II.3. Líneas Celulares

Una línea celular es un cultivo de células establecido, que ha sido adaptado para crecer de forma continua en el laboratorio, al proporcionarle el espacio y medio necesario, y son utilizadas en investigación. Las líneas celulares difieren de cultivos primarios en que las primeras se convierten en células inmortalizadas (Ulrich y Pour, 2001). Frecuentemente son utilizadas en lugar de los cultivos celulares primarios, para estudiar procesos biológicos, al ofrecer diversas ventajas como su bajo costo, facilidad de uso, son una fuente ilimitada de material y elimina los problemas éticos que conllevan la utilización de animales o tejidos humanos (Gurvinder y Dufour, 2012).

Dentro de los modelos ampliamente utilizados para estudiar la respuesta inmunológica a estímulos, se encuentra la línea celular monocítica THP-1. Éstas fueron aisladas por Tsuchiya et al., en la época de 1980, de un paciente pediátrico con leucemia mieloide aguda (Auwerx, 1991).

Las células THP-1 asemejan a los cultivos primarios de monocitos humanos de acuerdo a diversos criterios como morfología, productos secretados, y expresión de antígenos de membrana (Auwerx, 1991). Presentan similitudes en cuanto a su respuesta, comparadas con la fracción monocítica de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) (Chanput et al., 2010); además proveen una población de células con un trasfondo genético homogéneo, lo cual es determinante para tener resultados reproducibles (Gurvinder y Dufour, 2012).

Dentro de los estudios realizados con esta línea celular se encuentra el de Schildberger et al. (2013), donde estimuló monocitos, PBMCs, y células THP-1 con lipopolisacárido (LPS), obteniendo como resultado que la cantidad de TNF- α producido era similar en los tres tipos de células, concluyendo que las células de la línea THP-1 son una opción viable para estudios en monocitos. También el cultivo de células THP-1 se ha utilizado ampliamente en la búsqueda de microorganismos con funciones inmunomodulatorias (Joon et al., 2016).

III. JUSTIFICACIÓN

Los efectos de los probióticos han sido determinados por una gran cantidad de estudios científicos, encontrando que algunas cepas son seguras para su administración, así como los beneficios producidos contra determinadas enfermedades inmunológicas, gastrointestinales, reumatológicas entre otras. A pesar de las investigaciones y ensayos clínicos realizados con probióticos, aún existen incógnitas relacionadas con el consumo de los mismos; hasta hace algunos años se creía que los efectos de los probióticos estaban íntimamente relacionados con su viabilidad, sin embargo, se ha descubierto que ésta no está ligada totalmente con el efecto proporcionado.

El surgimiento de los paraprobióticos y postbióticos nace como una alternativa de conservar el efecto benéfico de las cepas probióticas en el hospedero, con la ventaja que conlleva el consumir una cepa inactivada o metabolitos secretados por una cepa probiótica. Es importante destacar que el efecto de los paraprobióticos y postbióticos, actualmente es tema de estudio debido a su reciente surgimiento, y se ha reportado que al igual que una cepa en estado viable, tiene efecto sobre el sistema inmunológico.

Personas con un sistema inmunológico comprometido, o adultos mayores, podrían verse beneficiados con estas nuevas alternativas, así como problemas relacionados en el sector salud podrían ser enfrentados con estas nuevas estrategias, que se podrían utilizar como tratamientos alternativos para mitigar efectos de enfermedades. Sin embargo, debido a que el efecto de los paraprobióticos y postbióticos, al igual que en los probióticos, es cepa-específico, es necesario realizar más investigaciones para conocer cuales cepas tienen potencial para ser utilizadas en un futuro; es aquí donde radica la importancia del presente trabajo, el cual se enfoca en conocer el efecto de la estimulación de monocitos humanos con el probiótico,

paraprobiótico y postbiótico *de Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171, analizado en términos de expresión relativa de citocinas.

IV. HIPÓTESIS CIENTÍFICA

El probiótico *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 en estado activo e inactivo, así como sus sobrenadantes libres de células, modulan la expresión de citocinas en monocitos de la línea celular THP-1.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo General

Determinar el efecto de *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 en estado activo (probiótico) e inactivo (paraprobiótico), así como de sus sobrenadantes libres de células (postbiótico), sobre la expresión de citocinas en monocitos de la línea celular THP-1.

V.2. Objetivos Especificos

1. Establecer una curva de correlación lineal de densidad óptica y concentración bacteriana, para determinar el inóculo de *L. reuteri* NRRL B-14171 a utilizar en los tratamientos
2. Determinar la expresión relativa de IL-10 y TNF- α , mediante qPCR en células THP-1 estimuladas con *L. reuteri* NRRL B-14171 activo e inactivo, así como con sus sobrenadantes libres de células
3. Comparar la expresión relativa de IL-10 y TNF- α entre los diferentes tratamientos de monocitos THP-1

VI. METODOLOGÍA

VI.1. Diseño Experimental

Se utilizaron células monocíticas pertenecientes a la línea celular THP-1 con los siguientes tratamientos de estimulación: bacteria viva (BV), sobrenadante de la bacteria viva (SBV), bacteria inactiva (BI), sobrenadante de la bacteria inactiva (SBI) y células sin estímulo (SE) como control negativo. La Figura 6 presenta un diagrama general de las actividades realizadas durante esta etapa del trabajo.

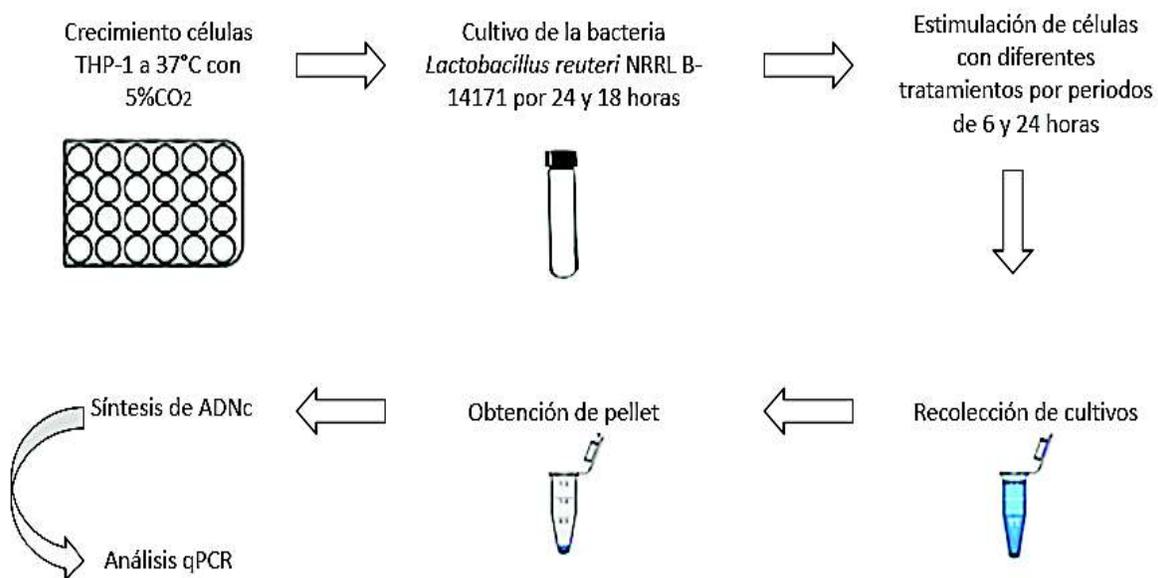


Figura 6. Diagrama general experimental donde se señala de forma resumida aquellos procedimientos realizados en la metodología.

VI.2. Preparación de Tratamientos para Estimulación de Monocitos

La cepa de *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171, que se empleó en este trabajo, fue donada por el Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, Hermosillo, México).

El cultivo de *L. reuteri* NRRL B-14171 se realizó en el caldo Man Ragosa Sharpe (MRS; BD Difco, EUA) suplementado con 0.05% de cisteína (Sigma-Aldrich, EUA), incubado a 37°C, 5% CO₂ por 24 horas, posteriormente se resembró y se incubó por 18 horas bajo las mismas condiciones. A partir de este cultivo se prepararon los tratamientos ya mencionados en el apartado anterior.

La concentración de bacterias a utilizar en los experimentos se determinó mediante la medición de la densidad óptica a 600nm (DO₆₀₀) utilizando un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para lo anterior se realizaron diluciones seriadas de la bacteria en buffer de fosfatos a concentración de 1X (PBS, por sus siglas en inglés), se determinó su DO₆₀₀ y simultáneamente se realizó una cuenta en placas con medio MRS. La curva de correlación se obtuvo graficando la densidad óptica contra las UFC/ml de *L. reuteri*; a partir de ésta se determinó el inóculo de bacterias a utilizar en cada tratamiento.

Para el tratamiento de la bacteria viva o activa (BV), se centrifugaron los cultivos de bacterias a 3,000 rpm por 5 minutos a 25°C y se lavó el pellet bacteriano con PBS 1X con las condiciones mencionadas anteriormente (Sorvall ST 16R, Thermo Fisher Scientific, EUA). El sobrenadante resultante de dicha centrifugación corresponde al tratamiento de sobrenadante de bacteria viva (SBV).

Para el tratamiento de bacteria inactiva (BI), se utilizaron bacterias lavadas y resuspendidas en PBS 1X y se colocaron en un baño de agua por 25 minutos a 80°C, posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante obtenido corresponde al tratamiento de sobrenadante bacteria inactiva (SBI).

Tanto el SBV como el SBI fueron ajustados a un pH de 7.3, y se filtraron a través de una membrana de 0.22 µm.

VI.3. Cultivo de Monocitos

El cultivo de las células monocíticas de la línea THP-1 se realizó en placas de 6 pozos con medio de cultivo celular RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA), adicionado con los antibióticos penicilina-estreptomicina 5,000 UI/ml y gentamicina 50 µg/ml (Gibco, EUA) además se suplementó con suero fetal bovino al 10% (SFB; Gibco, EUA).

El cambio de medio de las células se realizó cada dos días, en los cuales se retiraba el medio y se lavaban con PBS 1X. Un pase de multiplicación corresponde a transferir las células a pozos nuevos para su multiplicación sucesiva, agregando medio fresco. Para los experimentos se utilizaron células en el cuarto pase de multiplicación.

VI.4. Estimulación de Monocitos

Para la estimulación con los diferentes tratamientos, se colocaron 200,000 células THP-1 por pozo, en placas de 24 pozos; éstas se resuspendieron en 900 µl de medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA), con 10% de SFB y sin adición de antibióticos.

Las células fueron estimuladas durante 6 y 24 horas con los distintos tratamientos: (BV, SBV, BI, SBI y SE). Los tratamientos de BV y BI se agregaron, respectivamente, en una relación 1:100 (célula-bacteria) y los tratamientos SBV y SBI se añadieron a una concentración del 10% con respecto al volumen final del medio RPMI 1640 de cultivo de los monocitos. El tratamiento SE consistió en 200,000 células THP-1 en el pozo. Se realizaron dos experimentos y cada tratamiento se hizo por duplicado, como se representa en la Figura 7.

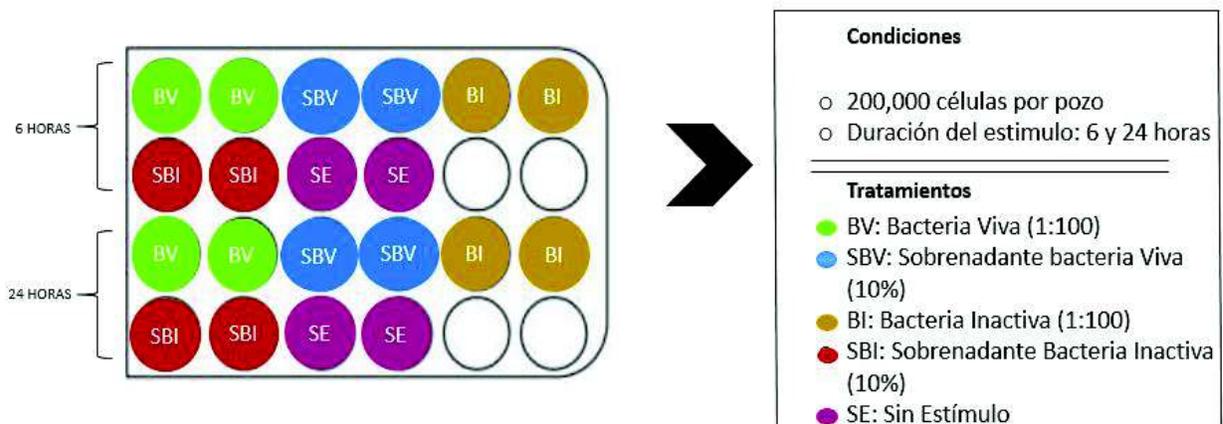


Figura 7. Condiciones y tratamientos utilizados en la estimulación de las células THP-1.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos se recolectaron y resuspendieron en buffer de lisis RLT (Qiagen, EUA) y se almacenaron para su posterior uso a -70°C en un ultracongelador (Thermo Fisher Scientific, EUA).

VI.5. Extracción de ARN y Preparación de ADNc

Se descongelaron las muestras almacenadas en buffer de lisis y se agitaron vigorosamente utilizando un vórtex.

Para la extracción de ARN de los lisados celulares, se utilizó el kit de extracción RNeasy Mini kit (Qiagen, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de ARN para cada tratamiento fueron determinadas en un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, EUA). El ARN fue tratado con la enzima TURBO DNasa (Ambion, EUA) para la eliminación de ADN genómico contaminante.

Para la síntesis de ADNc se utilizó el kit qSCRIPT (Quantabio, EUA) siguiendo las instrucciones del proveedor. El volumen total fue de $20\ \mu\text{l}$ con una concentración total de $800\ \text{ng}$ de ARN por reacción. La retrotranscripción se realizó en un termociclador MJ mini (Bio-Rad, EUA) con el siguiente protocolo de reacción: 22°C por 5 minutos, 42°C por 30 minutos y 85°C por 5 minutos. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

VI.6. Determinación de Citocinas por qPCR

La determinación de citocinas se realizó mediante qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real), utilizando un termociclador QuantStudio 6 flex (Applied Biosystems, EUA). Para la amplificación se utilizó la enzima 5x Hot Firepol Evagreen (Solis Biodyne, UE) y los iniciadores que muestra la Tabla I a una concentración final de 100 nM.

Tabla I. Secuencias de iniciadores utilizados en el qPCR de los genes de citocinas humanas TNF- α , IL-10 y GADPH.

| Gen | Secuencias sentido (5'-3') | Secuencia anti-sentido (5'-3') |
|---------------|----------------------------|--------------------------------|
| TNF- α | CCGTCTCCTACCAGACCAAGG | CTGGAAGACCCCTCCCAGATAG |
| IL-10 | GTGATGCCCCAAGCTGAGA | CACGGCCTTGCTCTTGTTTT |
| GADPH | TCAACAGCGACACCCACTCC | TGAGGTCCACCACCCTGTTG |

La mezcla de reacción consistió en 2 μ l de buffer, 1 μ l de iniciador sentido (1 μ M), 1 μ l de iniciador antisentido (1 μ M), 2 μ l de templado (10 ng totales de ADNc) y 4 μ l de agua ultra pura (Invitrogen, EUA), para hacer un volumen de reacción de 10 μ l. El protocolo de reacción fue el siguiente: activación de la enzima a 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Como control positivo se utilizó ADNc de PBMC estimuladas con LPS y como control negativo agua ultra pura.

VI.7. Cálculo de la Expresión Relativa de Genes de Citocinas (DDCT)

En la cuantificación relativa DDCT ($2^{-\Delta\Delta CT}$), se utilizan fórmulas aritméticas para determinar el cambio de expresión de un gen de interés en una muestra, en relación con el mismo gen en una muestra de referencia (control). El método consiste en determinar primeramente los cambios en los niveles de ARNm del gen de interés, con respecto al ARNm de un gen constitutivo de la célula. En este caso se utilizó el gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), cuya expresión no se altera o modifica por los tratamientos. Se calcula la diferencia de Ct entre ambos genes (ΔCT). Posteriormente se calcula la diferencia de CT entre los valores obtenidos anteriormente, y los obtenidos para la muestra control, o sea aquellas que no han sido sometidas a ningún tratamiento (SE), obteniendo de esta manera el $\Delta\Delta CT$.

VI.8. Análisis Estadístico de Expresión Relativa

Los resultados de DDCT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) se analizaron mediante una prueba ANOVA de una vía y comparación múltiple de medias de Tukey, en el Software GraphPad Prism 5 (California, EUA).

VII. RESULTADOS

VII.1. Curva de Correlación (DO₆₀₀ y UFC/ml)

Para la determinación de la concentración del inóculo a utilizar en los tratamientos experimentales, se obtuvo la curva de correlación de densidad óptica (DO₆₀₀) y concentración bacteriana (UFC/ml), con una ecuación de la recta y r^2 de 0.99, como se presenta en la Figura 8.

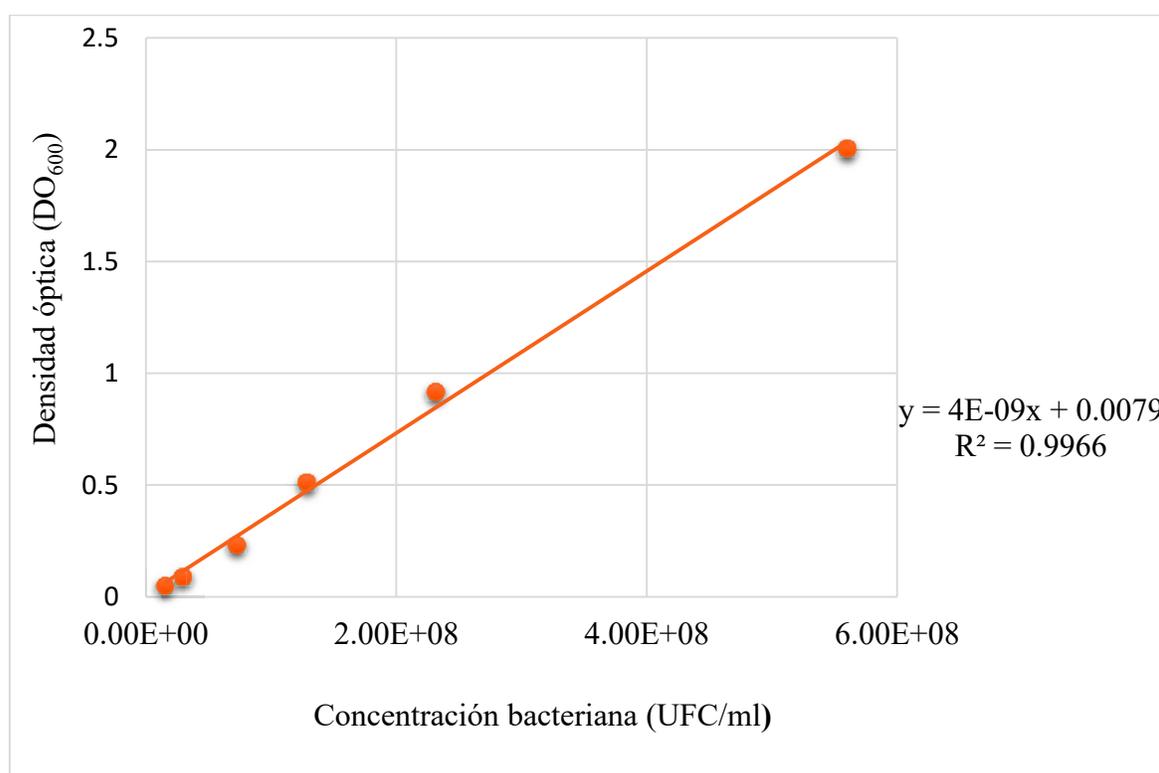


Figura 8. Curva de correlación lineal de densidad óptica y concentración bacteriana de *Lactobacillus reuteri* NRRL B -14171 utilizada para la determinación de la concentración de inóculo a utilizar en los diferentes tratamientos experimentales.

VII.2. Determinación de Citocinas por qPCR

VII.2.1. Curvas de amplificación

Las curvas de amplificación son una representación gráfica de la señal emitida por el fluorocromo (sybergreen) al intercalarse en las moléculas de ADN, esta señal es registrada por el equipo de detección del termociclador en forma de valores numéricos conocidos como Ct, los cuales se utilizaron posteriormente para el cálculo de la expresión relativa. Para establecer las condiciones de reacción se utilizaron PBMC estimuladas con LPS durante 6 horas. A continuación se muestran curvas de amplificación representativas de TNF- α , IL-10 y el gen constitutivo GAPDH, para los distintos tratamientos (BV, SBV, BI, SBI y SE), cuyos Ct variaron entre 30-32, 32 y 19 respectivamente, tal como se muestra en las Figuras 9-11.

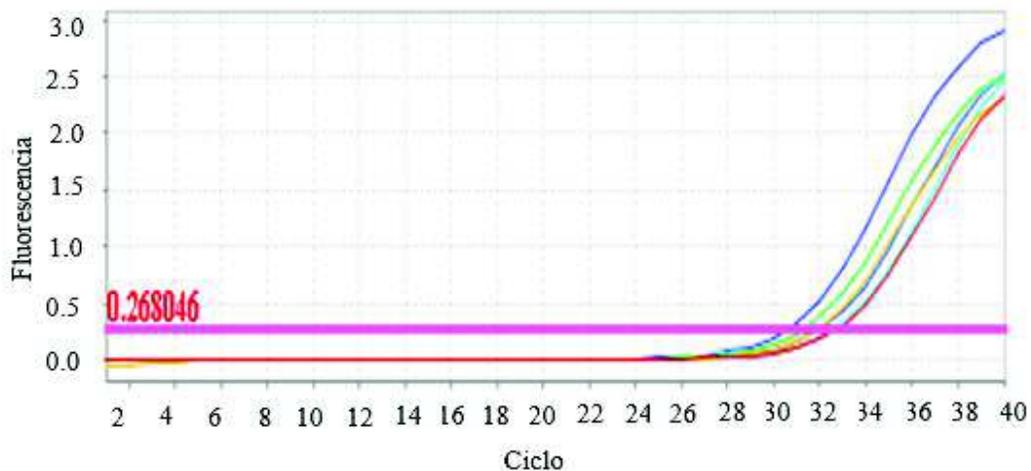


Figura 9. Curva de amplificación representativa de TNF- α .

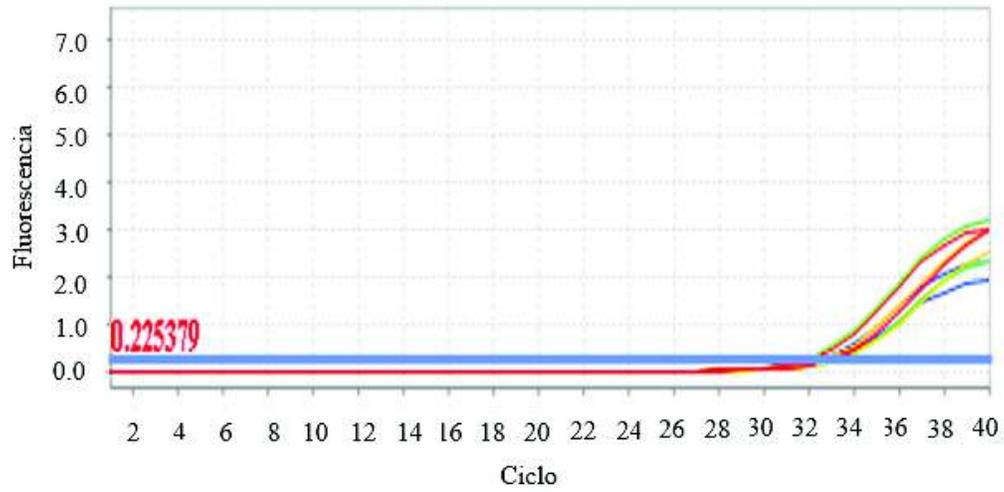


Figura 10. Curva de amplificación representativa de IL-10.

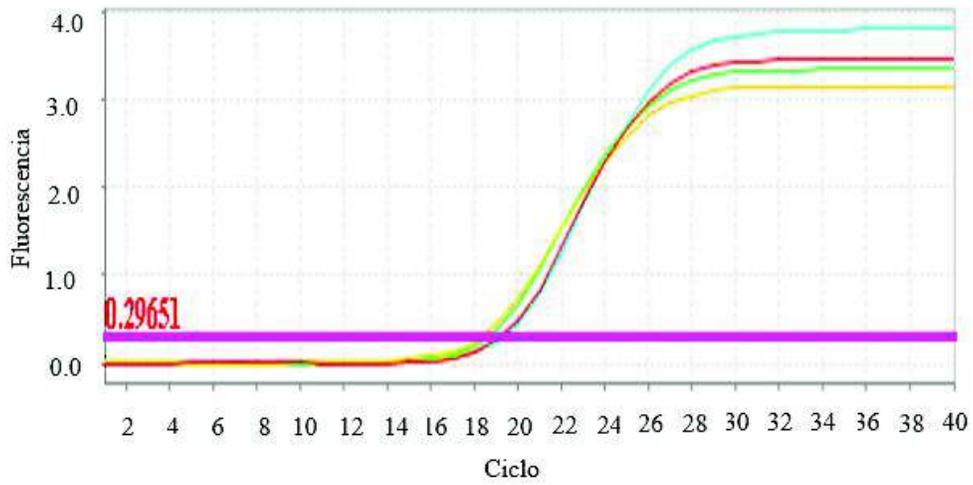


Figura 11. Curva de amplificación representativa de GADPH.

VII.2.2. Curvas de fusión

Las curvas de temperatura de fusión (T_m , por sus siglas en inglés), son la representación gráfica de la fluorescencia detectada en función de la temperatura. Se utilizaron PBMC estimuladas con LPS durante 6 horas como control positivo, con el fin de confirmar las T_m del producto de amplificación, para los genes de las citocinas analizadas. Para $TNF-\alpha$ fue de 88.15°C , para IL-10 de 87.39°C , y para GADPH de 86.5°C , como se presenta en las Figuras 12-14.

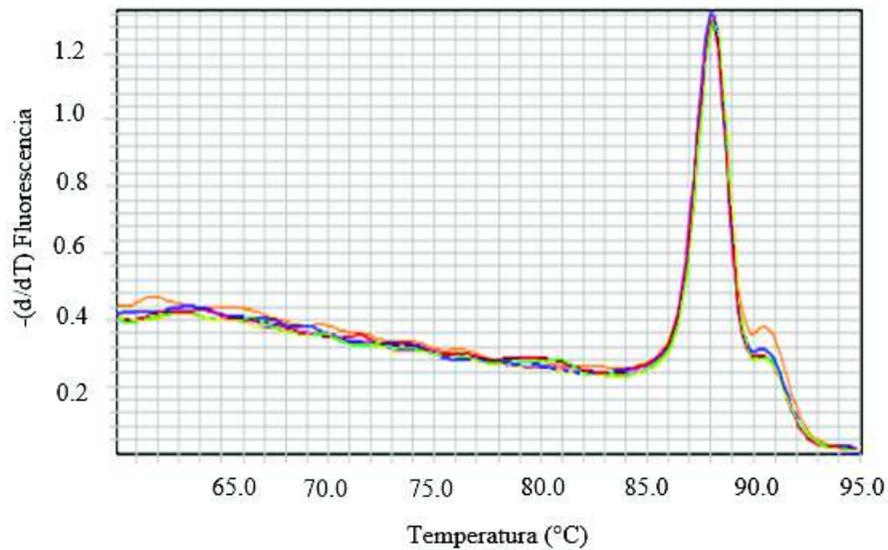


Figura 12. Curva representativa de la temperatura de fusión para $TNF-\alpha$.

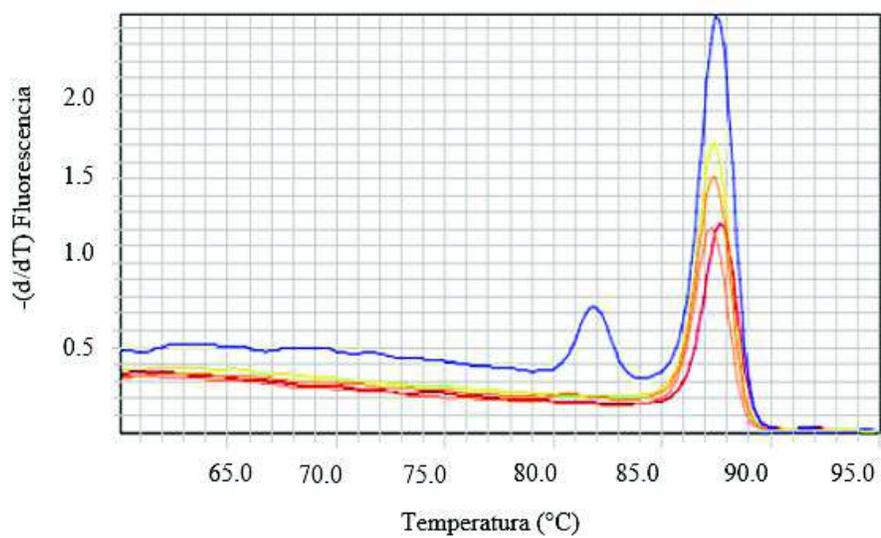


Figura 13. Curva representativa de la temperatura de fusión para IL-10.

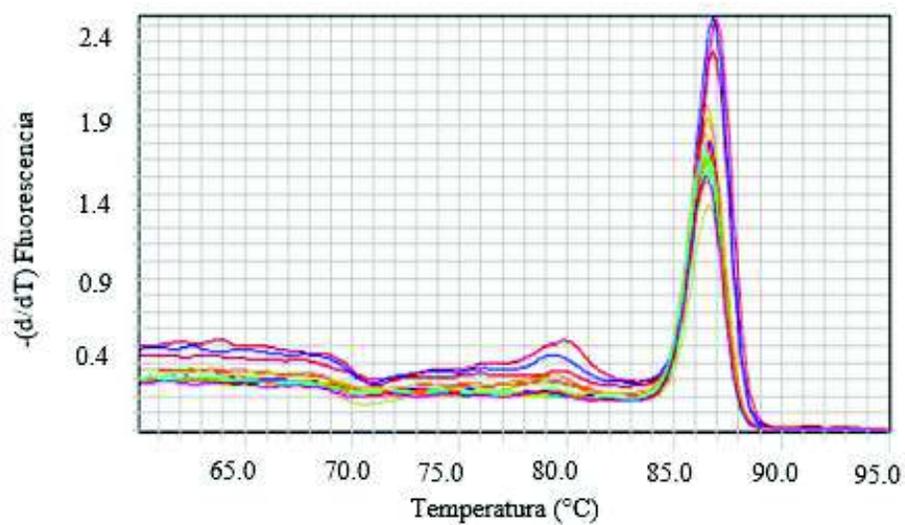


Figura 14. Curva representativa de la temperatura de fusión para GADPH.

VII.3. Cálculo de la Expresión Relativa de Genes de Citocinas (DDCT)

Utilizando el método DDCT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) se determinaron los valores de la expresión relativa para TNF- α e IL-10, con el gen constitutivo GAPDH como normalizador y el tratamiento sin estímulo (SE) como valor de referencia o control para cada uno de los tratamientos. En las Tablas II y III se presentan los valores obtenidos.

Tabla II. Expresión relativa de TNF- α de experimentos 1 y 2 a las 6 y 24 horas de estimulación, obtenida mediante el método DDCT ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

| | 6 horas | | | | 24 horas | | | |
|-----|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|
| | Experimento 1 | | Experimento 2 | | Experimento 1 | | Experimento 2 | |
| | Pozo 1 | Pozo 2 |
| BV | 1.33 | 1.56 | 2.34 | 1.99 | 1.33 | 1.56 | 2.34 | 1.99 |
| SBV | 2.04 | 2.10 | 1.96 | 2.13 | 2.04 | 2.10 | 1.96 | 2.13 |
| BI | 1.79 | 1.36 | 1.38 | 1.59 | 1.79 | 1.36 | 1.38 | 1.59 |
| SBI | 1.49 | 1.44 | 0.72 | 1.56 | 1.49 | 1.44 | 0.72 | 1.56 |
| SE | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Tabla III. Expresión relativa de IL-10, de experimentos 1 y 2 a las 6 y 24 horas de estimulación, obtenida mediante el método DDCT ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

| | 6 horas | | | | 24 horas | | | |
|-----|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|
| | Experimento 1 | | Experimento 2 | | Experimento 1 | | Experimento 2 | |
| | Pozo 1 | Pozo 2 |
| BV | 0.56 | 0.62 | 0.66 | 0.53 | 0.38 | 0.41 | 0.46 | 0.55 |
| SBV | 0.67 | 0.46 | 0.68 | 0.62 | 3.23 | 3.40 | 3.75 | 4.07 |
| BI | 0.97 | 1.03 | 1.19 | 0.94 | 0.50 | 0.44 | 0.64 | 0.66 |
| SBI | 0.20 | 0.54 | 0.71 | 0.56 | 0.81 | 1.38 | 1.43 | 1.36 |
| SE | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

VII.4. Análisis Estadístico de Expresión Relativa

El análisis de los datos se realizó en el software GraphPad Prism 5 (California, EUA), utilizando una prueba ANOVA de una vía y una prueba de Tukey, de comparación múltiple de medias. Las diferencias significativas se consideraron con una $p < 0.05$. A continuación se describen los resultados obtenidos para TNF- α e IL-10.

Todos los tratamientos utilizados presentaron un ligero aumento en la expresión del transcrito de TNF- α , a las 6 horas de estimulación. Sin embargo, solo el tratamiento SBV fue estadísticamente significativo, ya que duplicó la expresión del transcrito con respecto al tratamiento SE, como se aprecia en la Figura 15.

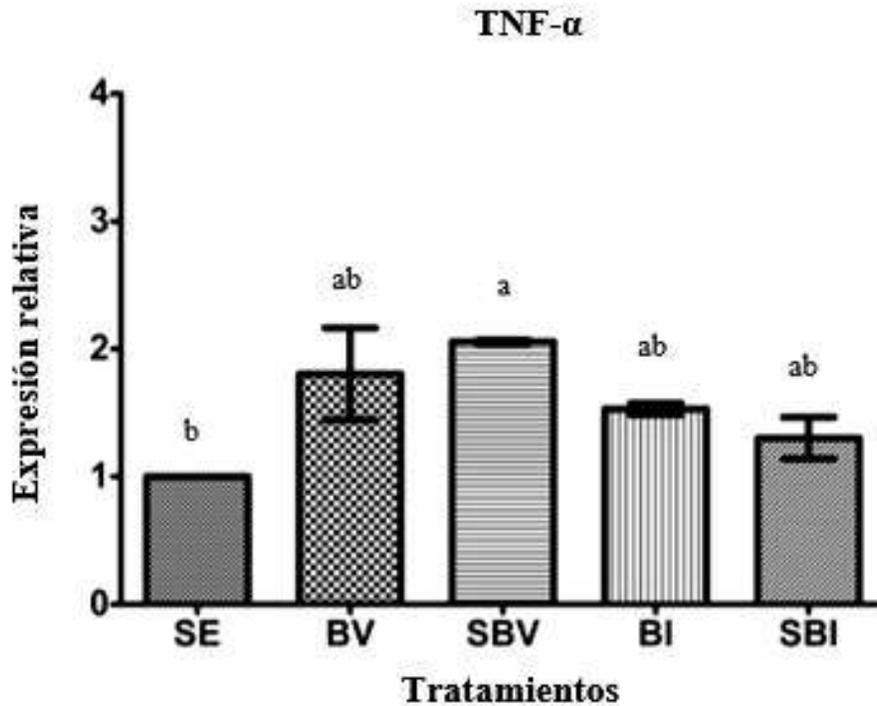


Figura 15. Expresión relativa de TNF- α de células THP-1 estimuladas por los diferentes tratamientos durante 6 horas. Las barras en la parte superior representan el error estándar (SEM, por sus siglas en inglés) mientras que letras distintas representan diferencias entre tratamientos (ANOVA, *post hoc* prueba de Tukey) $p < 0.05$.

Igualmente, para la expresión del transcrito de TNF- α a las 24 horas de estimulación, solamente el tratamiento SBV mostró un aumento importante, triplicando el valor obtenido para el tratamiento SE, como se muestra en la Figura 16.

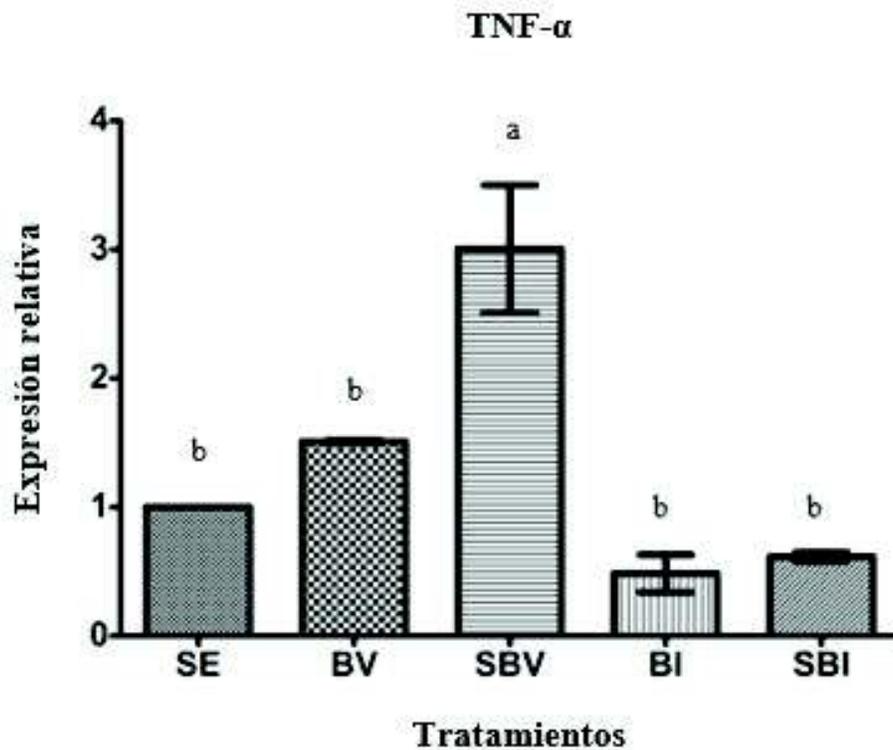


Figura 16. Expresión relativa de TNF- α de células THP-1 estimuladas por los diferentes tratamientos durante 24 horas. Las barras en la parte superior representan el error estándar (SEM, por sus siglas en inglés) mientras que letras distintas representan diferencias entre tratamientos (ANOVA, *post hoc* prueba de Tukey) $p < 0.05$.

Para la expresión de IL-10 a las 6 horas de estimulación, los tratamientos utilizados no incrementaron la expresión del transcrito, tal como se presenta en la Figura 17. Los tratamientos SE y BI mostraron un comportamiento similar, mientras que los tratamientos BV, SBV y SBI produjeron una ligera disminución en la expresión de la citocina, comparándola con el tratamiento SE.

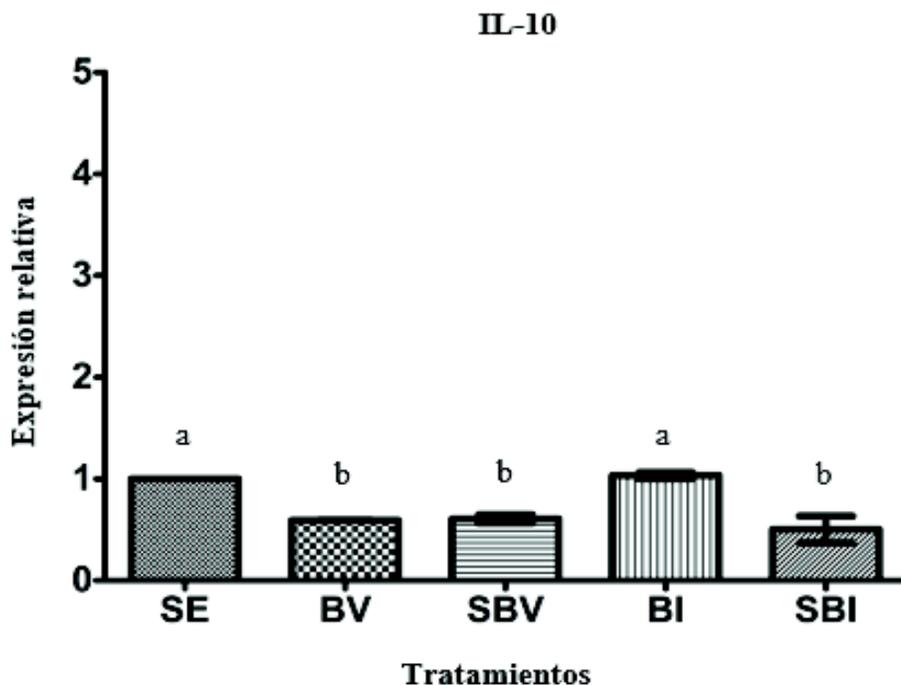


Figura 17. Expresión relativa de IL-10 de células THP-1 estimuladas por los diferentes tratamientos durante 6 horas. Las barras en la parte superior representan el error estándar (SEM, por sus siglas en inglés) mientras que letras distintas representan diferencias entre tratamientos (ANOVA, *post hoc* prueba de Tukey) $p < 0.05$.

De igual forma, al estimular las células por 24 horas, la mayoría de los tratamientos no resultaron en un cambio de la expresión del transcrito de IL-10 con respecto al tratamiento control. Solamente el tratamiento SBV presentó un incremento de hasta 3.5 veces en la expresión de la citocina, como se muestra en la Figura 18.

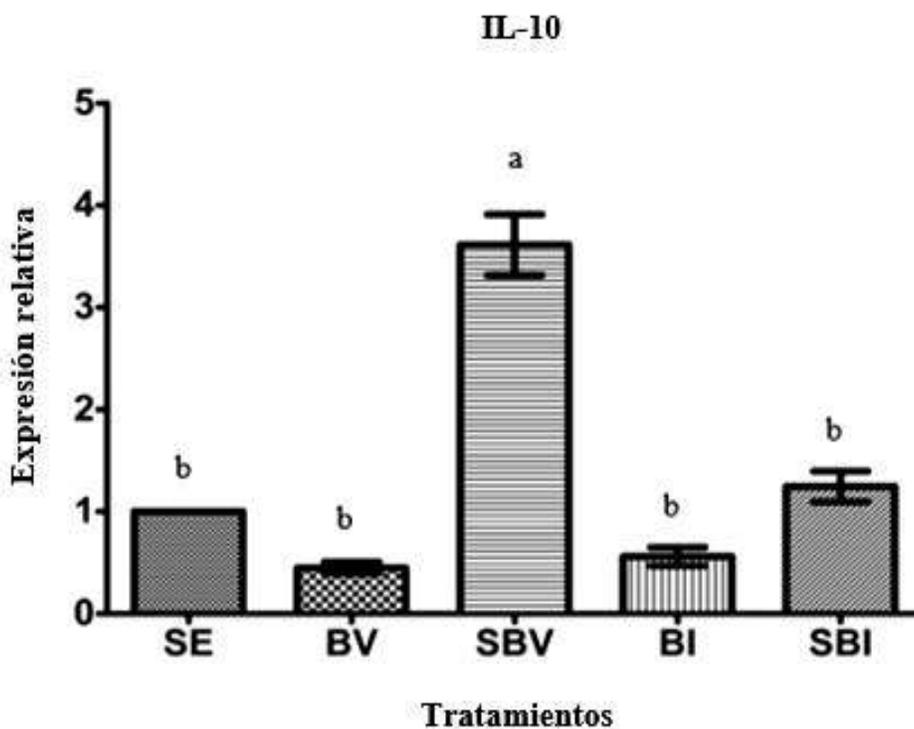


Figura 18. Expresión relativa de IL-10 de células THP-1 estimuladas por los diferentes tratamientos durante 24 horas. Las barras en la parte superior representan el error estándar (SEM, por sus siglas en inglés) mientras que letras distintas representan diferencias entre tratamientos (ANOVA, *post hoc* prueba de Tukey) $p < 0.05$.

En resumen, los efectos de estimulación de los tratamientos BV (probiótico activo) y BI (probiótico inactivo) sobre las células THP-1 fueron muy semejantes en la expresión de ambas citocinas, no mostrando cambios importantes con respecto al tratamiento control. El tratamiento SBI (postbiótico de bacteria inactiva) tampoco produjo cambios relevantes en el patrón de expresión de ambas citocinas con respecto al control. Solamente el tratamiento SBV (postbiótico de bacteria viva) fue el mayor inductor de la expresión del transcrito de ambas citocinas, particularmente a las 24 horas de estimulación.

VIII. DISCUSIÓN

Diversos estudios han descrito las propiedades modulatorias de bacterias probióticas, tanto *in vitro*, como en estudios animales y en pruebas clínicas. A pesar de esto, la cantidad de información sobre los mecanismos por los cuales los probióticos proveen sus beneficios aún no han sido completamente elucidados. Ésto está relacionado con la característica de ser cepa-específicos en cuanto a los efectos que confieren. La cantidad de estudios que utilizan probióticos en su forma viva, inactiva o sus sobrenadantes libres de células es limitada; sin embargo, la comparación de estas formas nos llevaría a entender sus mecanismos de acción.

En el trabajo presentado, se estimularon monocitos de la línea celular humana THP-1 con el probiótico *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 en estado vivo e inactivo, así como con sus sobrenadantes libres de células, con la finalidad de determinar sus efectos sobre la expresión de IL-10 y TNF- α . La importancia de estas dos citocinas radica en que, por un lado, TNF- α es una citocina clave en la respuesta pro-inflamatoria y tiene un papel fundamental en el control y eliminación de infecciones (Parameswaran y Patial, 2011). Mientras que IL-10 es una citocina con propiedades anti-inflamatorias, con un rol central en limitar la respuesta del huésped ante patógenos, previniendo así daños al tejido resultado de una inflamación excesiva, y contribuyendo en la homeostasis del organismo (Iyer y Cheng., 2012). En este sentido, algunos estudios se han enfocado en determinar los efectos de bacterias probióticas en la expresión de dichas citocinas en distintos sistemas celulares. Por ejemplo, Jones-Versalovic (2009) utilizaron cepas de *L. reuteri* sobre la línea celular THP-1, previamente estimulada con LPS para la producción de TNF- α , y encontraron que algunas cepas secretaron factores que inhibieron la producción de TNF- α , mientras que otras estimularon la producción de esta citocina, concluyendo que la cepa utilizada puede poseer una dualidad en sus funciones, estimulando o suprimiendo el sistema inmunológico innato.

En el caso del presente estudio, a las 6 horas de estimulación se observó una ligera respuesta inflamatoria para todos los tratamientos, en términos de expresión de TNF- α , aunque solamente en las células estimuladas con el tratamiento SBV fue significativo (Figura 15). Al cabo de 24 horas de estimulación, se observa que el proceso inflamatorio ocasionado por dicho tratamiento, aumenta en orden de una unidad con respecto al presentado a las 6 horas (Figura 16). Lo anterior concuerda con el trabajo realizado por Jensen et al. (2015), en el cual utilizaron las células THP-1 y estimularon durante 6 horas con *L. reuteri* DSM20016 en estado activo e inactivo (por radiación ultravioleta). Los autores reportaron un aumento en la producción de TNF- α e IL-8, las cuales fueron determinadas por el método de Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Además, encontraron que *L. reuteri* es un potente inductor del factor de transcripción de citocinas (NF- κ B), concluyendo que la suma de las proteínas de la membrana celular y metabolitos secretados fueron los causantes de la activación de NF- κ B y el posterior aumento de la producción de citocinas pro-inflamatorias. Estos resultados indican que la bacteria en su forma viva e inactiva es capaz de activar a las células del sistema inmune, lo que podría favorecer al organismo ante una infección.

En contraparte, a las 6 horas de estimulación no se alcanza a producir una respuesta anti-inflamatoria en términos de expresión de IL-10, no se observa un aumento de esta citocina por efecto de los tratamientos, sino más bien, un ligero decremento en alguno de ellos (Figura 17). En el caso de 24 horas de estimulación, solamente en el tratamiento SBV se produjo un incremento significativo en la expresión de esta citocina ($p < 0.05$), lo que sugiere que únicamente el sobrenadante libre de células fue capaz de activar la respuesta anti-inflamatoria hasta las 24 horas, mientras los demás tratamientos permanecen sin cambios (Figura 18).

Algunos estudios realizados en animales han reportado que los efectos inmunomoduladores de cepas del género *Lactobacillus* (principalmente *L. rhamnosus* GG y *L. reuteri*) son muy similares entre cepas vivas y cepas inactivas (Nan et al., 2009; Collins et al., 2016). Hay muy pocos estudios donde se investiguen los efectos de la bacteria viva e inactiva, bajo condiciones similares a las utilizadas en el presente trabajo, y además utilizando la línea celular THP-1 como modelo. En el caso de esta investigación, el tratamiento BI

(paraprobiótico) no presentó un aumento significativo en la expresión de las citocinas, ni a las 6, ni a las 24 horas de estimulación, igual sucedió también para el tratamiento BV (Figuras 15, 16 y 18). Por lo tanto, se sugiere que el tratamiento térmico utilizado para inactivar la bacteria, no modificó las estructuras bacterianas de tal forma que se lograra una estimulación distinta o mayor a la ocasionada por las bacterias vivas sobre los monocitos. Cabe mencionar que los tratamientos termales son influenciados por diversos factores, como son el tipo de microorganismo, temperatura, tiempo, estado de crecimiento de la bacteria, exposición previa a estrés, valor de pH, entre otros. Además, los mecanismos de acción de los paraprobióticos no están completamente elucidados (De Almada et al., 2016).

Por otra parte, en los últimos años ha surgido mucho interés en el ámbito científico, hacia la identificación de las moléculas bioactivas que ejercen efectos probióticos en los seres humanos. Los metabolitos extracelulares producidos por los probióticos a menudo son responsables de los efectos beneficiosos, o están involucrados en el mecanismo de acción. Los metabolitos más explorados son las proteínas y péptidos extracelulares, pero también se ha encontrado que los exopolisacáridos, las bacteriocinas y los ácidos lipoteicoicos interactúan con los epitelios intestinales (Sánchez, et al., 2010). En el caso de *L. reuteri*, estas cepas se caracterizan por la producción de metabolitos como reuterina, un potente compuesto capaz de inhibir un amplio espectro de microorganismos como bacterias, hongos y bacterias Gram-negativas (Jones y Versalovic, 2009). Asimismo, algunas cepas pueden producir tiramina e histamina, conocidos por ser capaces de modular respuestas en el sistema inmunológico de los organismos (Greifová et al, 2017). La histamina es capaz de modular el sistema inmunológico de dos formas: como estimulador o como inhibidor de respuestas inmunes (Greifová et al, 2017). La producción de compuestos antimicrobianos e inmunoestimuladores dependen estrictamente de la cepa del lactobacilo y de su estado de crecimiento. En el caso de la cepa utilizada en el presente trabajo, ésta es productora de reuterina, pero se desconoce si es productora de tiramina e histamina.

Se ha reportado también que en los sobrenadantes de cepas de *Lactobacillus* en su forma viva, están presentes proteínas y polisacáridos que tienen actividad sobre la producción de citocinas. Chon-Choi (2010) obtuvieron distintas fracciones de sobrenadante libre de bacterias, de *Lactobacillus plantarum*; y encontraron que a las 24 horas, algunas de estas

fracciones inducen la producción de TNF- α , y otras tienen el potencial de inducir IL-10. Concluyeron que algunos péptidos específicos probablemente contribuyan a la estimulación de una respuesta anti-inflamatoria, mientras que las fracciones con grandes cantidades de polisacáridos contribuyen a la producción de TNF- α .

TNF- α e IL-10 son citocinas que poseen efectos opuestos, pero de gran importancia, ya que para el equilibrio de la homeostasis de los organismos, es necesaria una proporción IL-10/TNF- α (Shmarina et al., 2001). Por ejemplo, en el estudio realizado por Othoro et al. (1999), determinó la concentración de citocinas en sobrenadantes de plasma provenientes de niños con manifestaciones de malaria, encontrando que niños con síntomas leves de la enfermedad tenían una proporción IL-10/TNF- α significativamente diferente (elevado), al presentado por niños con una condición severa de la enfermedad, concluyendo que el balance entre citocinas Th1 como TNF- α e IFN- γ y citocinas Th2 como IL-10 e IL-4, podría ser crítico para el desarrollo de esa enfermedad. En el presente trabajo, en el resultado obtenido en el tratamiento SBV a las 24 horas, se observa un incremento tanto en TNF- α como en IL-10. La alta producción de citocinas pro-inflamatorias induce a su vez a los factores de respuesta anti-inflamatorias. IL-10 tiene la capacidad de bloquear la síntesis de diversas citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 en monocitos humanos. Las vías de señalización intracelular que se inducen tanto para la respuesta pro-inflamatoria como anti-inflamatoria están constantemente siendo reguladas. La expresión de IL-10 que se muestra a las 24 horas podría deberse a la participación de los receptores de citocinas presentes en membrana celular; el receptor de TNF- α al detectar el incremento de TNF- α , activa la señalización para la producción de transcritos de IL-10, esto con la finalidad mantener la homeostasis inmunológica en las células.

IX. CONCLUSIONES

En el presente estudio, solamente uno de los tratamientos (SBV), mostró un efecto modulador sobre las células THP-1, en la expresión de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Por tanto, el postbiótico de la cepa de *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 tiene la capacidad de modular la respuesta inmune en monocitos humanos, en términos de expresión de citocinas TNF- α e IL-10.

La evaluación de una cepa probiótica en estado vivo e inactivo, así como sus sobrenadantes libres de células, es de gran importancia para determinar los efectos en la respuesta inmune, ya que dichos efectos son cepa-específicos, y, además, pueden verse afectados por las condiciones experimentales utilizadas. Sin embargo, se requiere realizar más estudios para profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción y potenciales beneficios en la salud del consumidor.

X. RECOMENDACIONES

- Se aconseja probar diferentes condiciones de inactivación para el probiótico *Lactobacillus reuteri* cepa NRRL B-14171, ya que este factor podría ser determinante en el efecto sobre el sistema inmunológico.
- Se sugiere la caracterización de los principales metabolitos presentes en el tratamiento SBV, para correlacionarlos con los resultados obtenidos en la expresión de citocinas de las células estimuladas con dicho tratamiento.
- Se recomienda analizar la producción de proteínas (TNF- α e IL-10) por ELISA, para confirmar el efecto del tratamiento SBV sobre la expresión de los ARNm encontrados, para relacionarlo con la producción de dichas proteínas.

XI. LITERATURA CITADA

- Adams, C.A. 2010. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutrition Research Reviews* 23: 37-46.
- Aguilar-Toalá, J.E., R. García-Varela, H.S. García, V. Mata-Haro, A.F. González-Córdova, B. Vallejo-Cordoba y A. Hernández-Mendoza. 2018. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology* 75: 105-114.
- Aguilera, P., M. Ruiz, M. Rocha, B. Pineda y M. Chánez. 2014. 175-201p. En: Cornejo, A., A. Serrato, B. Rendón, M. Rocha (Eds), *Herramientas moleculares aplicadas en Ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). México.
- Arasappan, D., H. Fang y W.Tong. 2010. Interpretation of toxicogenomics data. 663-683 p. En: McQueen C. (Ed), *Comprehensive Toxicology*. Elsevier Science. Ámsterdam, Holanda.
- Arribas, M.B. 2009. Probióticos: una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Departamento de Farmacología. Granada, España.
- Ashraf, R. y N.P. Shah. 2011. Immune System stimulation by probiotic microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. doi: 10.1080/10408398.2011.619671.
- Auwerx, J. 1991. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 47(1): 22-31.
- Azad, M., M. Sarker y D. Wan. 2018. Immunomodulatory effects of probiotics on cytokine profiles. *Biomed Research International*. doi:10.1155/2018/8063647.

- Brisbin, J.T., J. Gong, P. Parvizi y S. Sharif. 2010. Effects of *Lactobacilli* on cytokine expression by chicken spleen and cecal tonsil cells. *Clinical and Vaccine Immunology*. doi: 10.1128/CVI.00143-10.
- Burgé, G., C.S.Berión, M. Moussa, F. Allais, V. Ather y H.E. Spinnler. 2015. Relationships between the use of Embden Meyerhof pathway (EMP) or Phosphoketolase pathway (PKP) and lactate production capabilities of diverse *Lactobacillus reuteri* strains. *Journal of Microbiology*. doi: 10.1007/s12275-015-5056-x.
- Bustin, S. y T. Nolan. 2006. Analysis of mRNA expression by real-time PCR. *Nature Protocols* 1:1559-1582.
- Castanera, R. 2011. Estudio de la variación en los niveles de transcripción de genes de enzimas degradadoras de lignina en cultivos sólidos y sumergidos de *Pleurotus ostreatus*. España. Tesis de Maestría. Universidad Pública de Navarra. Departamento de Genética y Microbiología (GEMIC).
- Chanput, W., J. Mes, R.A. Vreeburg, H.F. Savelkoul y H. Wichers. 2010. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food derived compounds. *The Royal Society of Chemistry*. doi:10.1039/c0fo00113a.
- Chanput, W., J. J. Mes y H. Wichers. 2014. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*. doi: 10.1016/j.intimp.2014.08.002.
- Chaplin, D., 2010. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980.
- Chon, H., y B. Choi. 2010. The effects of a vegetable-derived probiotic lactic acid bacterium on the immune response. *Microbiology and Immunology*. doi.org/10.1111/j.1348-0421.2009.00202.

- Collins, F., R.A. Britton, L.R. McCabe y N. Parameswaran. 2016. Modulation of CD4+T cell differentiation by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. The FASEB Journal 30(1):1530-6860.
- Costa, J. 2004. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo real. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 22(5):299-305.
- De Almada, C.N., C.N, Almada, R. Martínez y A.S. Sant'Ana. 2016. Paraprobiotics: evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. Trends in Food Science & Technology. doi:10.1016/j.tifs.2016.09.011.
- De Melo, W., D. Mesquita, J. Pereira, T. Tiekko, A. Wagner, N. Pereira y L. Coehlo. 2010. Fundamentals of innate immune system. Brazilian Journal of Rheumatology 50(4):434-461.
- Dhama, K., M. Saminathan, S.S, Jacob, M. Singh, K. Kartnik, R. Tiwari, L. T. Sunkara, Y.S. Malik y R.J. Singh. 2015. Effect of immunomodulation and immunomodulatory agents on health with some bioactive principles, modes of action and potent biomedical applications. International Journal of Pharmacology 11(4):253-290.
- Dinarello, C.A .2011. Historical insights of cytokines. European Journal of Immunology 37:34-45.
- Fan-Chung, K. 2009. Cytokines. En Asthma and COPD. Pp 327-341. Academic Press. Estados Unidos de América.
- Fang, Y. y D.B. Polk. 2014. Probiotics and immune health. Current Opinión in Gastroenterology 27(6): 496-501.
- Filella, X., R. Molina y A.M. Ballesta. 2002. Estructura y función de las citocinas. Medicina Integral 39(2):63-71.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Ontario, Canadá. Recuperado de: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.

- Gilliland, S.E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 7(1-2): 175-188.
- Greifová, G., H. Májejková, G. Greif, P. Body, M. Greifová y M. Dubnicková. 2017. Analysis of antimicrobial and immunomodulatory substances produced by heterofermentative *Lactobacillus reuteri*. *Folia Microbiologica* 62:515-524.
- Gurvinder, K. y J.M. Dufour. 2012. Cell lines, valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* 2(1): 1-5.
- Hou, C., X. Zeng, F. Yang, H. Liu y S. Qiao. 2015. Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 6: 3-8.
- Iyer, S.S. y G. Cheng. 2012. Role of Interleukin 10 transcriptional regulation inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology* 32(1):23-63.
- Jensen, H., S.M. Dromtorp, L. Axelsson y S. Grimmer. 2015. Immunomodulation of monocytes by probiotic acid lactic bacteria. *Probiotics and antimicrobial proteins*. doi: 10.1007/s12602-014-9174-2.
- Jindal, S.K. 2004. Immunostimulation, does it work in COPD? *Chest Journal*. doi: 10.1378/chest.126.5.1406.
- Jones E., S. y J. Versalovic. 2009. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiology* 9: 1-9.
- Joon, L.W. Yang, A. Hostetler, N. Schultz, M.A. Suckow, K.L. Stewart, D.D. Kim y H.S. Kim. 2016. Characterization of the anti-inflammatory *Lactobacillus reuteri* BM36301 and its probiotic benefits on aged mice. *BMC Microbiology*. doi: 10.1186/s12866-016-0686-7.
- Kalam-Azad, A., M. Sarker y D. Wan. 2018. Immunomodulatory effects of probiotics on cytokine profiles. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2018/8063647.

- Kataria, J., N. Li, J.L. Wynn y J. Neu. 2009. Probiotic microbes: do they need to be alive to be beneficial? *Nutrition Reviews* 67 (9): 546-560.
- Kechagia, M., D. Basoulis, S. Konstantopoulou, D. Dimitriadi, K. Gyftopoulou, N. Skarmoutsou y E.M. Fakiri. 2013. Health benefits of probiotics: a review. *International Scholarly Research Notices: Nutrition*. doi: 10.5402/2013/481651.
- Keer, J. 2008. Quantitative Real-time PCR Analysis. 132-166p. En: Keer, J. y L. Birch (Eds), *Essentials of Nucleic Acid Analysis: A Robust Approach*. Royal Society of Chemistry Publishing. Cambridge, Reino Unido.
- Kim, D.H. y B. Austin. 2006. Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. doi: /10.1016/j.vetimm.2006.08.015.
- Kindt, T.J., R.A. Goldsby y B.A. Osborne. 2007. *Inmunología de Kuby*. McGraw Hill. México.
- Kratofil, R.M., P. Kubes y J.F. Deniset. 2017. Monocyte conversion during inflammation and injury. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308198.
- Livak, K.J. y T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Journal METHODS* 25:402-408.
- Mak, T., M. Saunders y B. Jett. 2014. Introduction to the immune response. En: *Primer to the Immune Response*. Academic Cell. Massachusetts, Estados Unidos de América.
- Markowiak, P. y K. Slizewska. 2017. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients Journal*. doi: 10.3390/nu9091021.
- McInnes, Iain. 2017. Cytokines. 396-407p. En: *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology*. Elsevier. Philadelphia. Estados Unidos de América.
- Nan, L., W.M. Russell, M. Douglas-Escobar, N. Hauser, M. López y J. Neu. 2009. Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG: effects on pro-inflammatory and anti-

- inflammatory cytokines/chemokines in gastrostomy-fed infant rats. *Pediatric Research* 66:203-207.
- Othoro, C., A. Lal, B. Nahlen, D. Koech, A. Orago, V. Udhayakumar. 1999. A low Interleukin-10 Tumor Necrosis Factor- α ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in Western Kenya. *The Journal of Infectious Diseases* 179(1): 279-282.
- Ou, C.C., S.K. Lin, J.J. Tsai y M.Y. Lin. 2011. Heat-killed lactic acid bacteria enhance immunomodulatory potential by skewing the immune response toward Th1 polarization. *Journal of Food Science*. 10.1111/j.1750-3841.2011.02161.x.
- Parameswaran y S. Patial. 2011. Tumor Necrosis Factor- α signaling in macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 20(2):87-103.
- Patel, R. y P. Denning. 2013. Therapeutic use of prebiotics, probiotics and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: what is the current evidence? *Clinics in Perinatology* 40(1): 11-25.
- Pfaffl, M. 2006. Relative quantification. 63-82p. En: Dorak, T. (Ed), *Real Time PCR*. International University Line. California, Estados Unidos de América.
- Plaza- Diaz, J. y F. Ruiz- Ojeda. 2017. Evidence of the Anti-Inflammatory effects of probiotics and synbiotics in intestinal chronic diseases. *Nutrients*. doi: 10.3390/nu9060555.
- Preziosi, P. 2007. Drug development. 173-202 p. En: Taylor, J. y D. Triggle (Eds), *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Elsevier Science. Ámsterdam, Holanda.
- Qinghui, M., V. Tavella y X. Luo. 2018. Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Frontiers in Microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2018.00757.
- Ramos-Payán, R., M. Aguilar-Medina, S. Estrada-Parra, J.A. González, L. Favila-Castillo, A. Monroy-Ostria y I. Estrada-García. 2002. Quantification of cytokine gene expression using an economical Real-Time Polymerase Chain Reaction method based on SYBER Green I. *Scandinavian Journal of Immunology* 57:439-445.

- Saito, Y., T. Mihara, M. Oki y T. Kumagai. 2018. Effects of heat-killed *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 intake on defecation in healthy volunteers: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 37 (3): 59-65.
- Salazara, B. y O. Montoya. 2003. Importancia de los probióticos y prebióticos en la salud humana. *VITAE*. 10(2):20-26.
- Sánchez., M. Urdaci y A. Margolles. 2010. Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions. *Microbiology Society*. doi: 10.1099/mic.0.044057-0.
- Samsonetti, P.J. 2004. War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews: Immunology*. 4:953-964.
- Schildberger, A., E. Rossmannith, T. Eichhorn, K. Strassl y V. Weber. 2013. Monocytes, Peripheral Blood Mononuclear Cells and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with Lipopolysaccharide. *Mediators of Immunology*. doi: 10.1155/2013/697972.
- Shida, K., T. Suzuki, J. Kiyoshima-Shibata, S. Shimada y M. Nanno. 2006. Essential roles of monocytes in stimulating human peripheral blood mononuclear cells with *Lactobacillus casei* to produce cytokines and augment natural killer cell activity. *Clinical and Vaccine Immunology*. doi: 10.1128/CVI.00076-06.
- Shmarina, G., A.L. Pukhalsky, S.N. Kokarovtseva, D.A. Pukhalskaya, L.A. Shabalova, N.I. Kapranov y N.J. Kashirskaja. 2001. Tumor Necrosis factor- α /interleukin-10 balance in normal and cystic fibrosis children. *Journal Mediators of Inflammation* 10(4):191-197.
- Simon, A.K., G.A. Hollander y A. McMichael. 2015. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Royal Society Publishing*. doi:10.1098/rspb.2014.3085.
- Thursby, E. y N. Juge. 2017. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal* 474(11):1823-1836.

- Traverniti, V. y S. Guglielmetti. 2011. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes & Nutrition*. doi: 10.1007/s12263-011-0218-x.
- Tsilingiri, K. y M. Rescigno. 2013. Postbiotics: What else? *Journal Beneficial Microbes* 4(1): 101-107.
- Ulrich, A.B. y P.M. Pour. 2001. Cell lines. En: *Encyclopedia of Genetics*. Elsevier. California, Estados Unidos de América.
- Vighi, G., F. Marucci, L. Sensi, G. Di Cara y F. Frati. 2008. Allergy and the gastrointestinal system. *Clinical and Experimental Immunology* 153 (Suppl. 1):3-6.
- Vissers, Y.M., J. Sneel, P.F. Zuurendonk, B.A. Smit, H.J. Wichers y H.F. Savelkoul. 2010. Differential effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* strains on cytokine induction in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology & Medical Microbiology* 59:60-70.
- Werner, G.H. y P. Jollés. 1996. Immunostimulating agents: what next? *European Journal of Biochemistry*. doi: 10.1007/978-3-642-60659-5_13.
- Zhang, J.M. y J. An. 2007. Cytokines, Inflammation and pain. *International Anesthesiology Clinics* 45(2): 27-37.