

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

Trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor de
la Facultad de Ciencias Exactas

TESIS N° 1359

*Modulación de la Respuesta
Inmune Innata Epitelial por
Microorganismos Potencialmente
Probióticos Aislados de Kefir*

2013

Lic. David Emmanuel Romanin

Dirección: Dr. Martín Rumbo

Codirección: Dra. Graciela L. Garrote

Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune – LISIN

Cátedra de Microbiología

Facultad de Ciencias Exactas

Universidad Nacional de La Plata

(043.2)
TESIS
01359

Sala de Lectura



Universidad Nacional de La Plata
Fac. de Ciencias Exactas. Bib. Central

50 y 115 1° subsuelo.
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-6977/79 int. 129
Fax



DEX-59752

Dedico este trabajo a mi familia, fuente de toda alegría y digna de todo sacrificio.

Agradezco a mi familia inmediata, Deliana, Sofía (y los que estén por venir) por la paciencia, el amor y las alegrías que compartimos juntos.

A mi familia que conozco desde que nací, Ana, David y abuelos (y desde que nació ella Silvina), que gracias a su sacrificio durante generaciones pude lograr muchas cosas, incluyendo mi educación.

A mi familia política, suegros, cuñados y tíos heredados, pilar de seguridad ante las inclemencias de la vida.

A mi familia científica, Grace y Martín, padres en mi formación (ya por segunda vez), la paciencia, la dedicación y la buena onda que han tenido conmigo son difíciles de encontrar en el ámbito académico.

A mi familia con la que comparto todos los días una buena parte de mi tiempo, integrantes de Micro y el LISIN, a los que no voy a enumerar por miedo a olvidarme de alguno. Les agradezco por TODO.

David

Dedico este trabajo a mi familia, fuente de toda alegría y digna de todo sacrificio.

Agradezco a mi familia inmediata, Deliana, Sofía (y los que estén por venir) por la paciencia, el amor y las alegrías que compartimos juntos.

A mi familia que conozco desde que nací, Ana, David y abuelos (y desde que nació ella Silvina), que gracias a su sacrificio durante generaciones pude lograr muchas cosas, incluyendo mi educación.

A mi familia política, suegros, cuñados y tíos heredados, pilar de seguridad ante las inclemencias de la vida.

A mi familia científica, Grace y Martín, padres en mi formación (ya por segunda vez), la paciencia, la dedicación y la buena onda que han tenido conmigo son difíciles de encontrar en el ámbito académico.

A mi familia con la que comparto todos los días una buena parte de mi tiempo, integrantes de Micro y el LISIN, a los que no voy a enumerar por miedo a olvidarme de alguno. Les agradezco por TODO.

David

Introducción
Efecto
resistencia
potencialmente
gusanos
Super
modulación
capacidad
imágenes
Est

índices

Índice general

Introducción general	1
Capítulo 1: Selección de microorganismos potencialmente probióticos: análisis de la capacidad moduladora de la respuesta inmune innata epitelial	
Introducción	13
Resultados	18
Selección de microorganismos potencialmente probióticos utilizando un sistema reportero Caco ccl20:luc	18
Efecto del tiempo de preincubación en la modulación	21
Efecto de la viabilidad del microorganismo en la modulación	22
Efecto de la dosis de microorganismo en la modulación	23
Discusión	25
Resumen de resultados y conclusiones	29
Bibliografía	30
Capítulo 2: Estudio de los mecanismos de señalización implicados en la modulación de la respuesta proinflamatoria	
Introducción	35
Resultados	40
Estudio de la presencia de factores solubles de modulación	40
Modulación de la respuesta proinflamatoria de diversos genes provocada por diferentes agonistas	42
Estudio de las vías intracelulares de señalización implicadas en el efecto modulador de la respuesta innata	45
Estudio de la localización celular de NF-kB (p65) mediante inmunofluorescencia	46
Estudio de la interrelación entre las vías de NF-kB, MAPK y STAT3	47
Estabilidad de plkB en fracción citoplasmática de lisados de Caco2	48
Modulación de la Respuesta innata epitelial mediante la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS)	49
Discusión	57
Resumen de resultados y conclusiones	62
Bibliografía	64
Capítulo 3: Estudio de la capacidad moduladora de la respuesta innata de microorganismos seleccionados empleando modelos <i>in vivo</i>	
Introducción	67
Resultados	73
Modelo murino de inflamación en asa intestinal ligada	73
Factibilidad de la administración de la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CIDCA 8154 en el agua de bebida	75
Evaluación de la supervivencia de las levaduras seleccionadas al pasaje por el tracto gastrointestinal murino	76
Estudio de la distribución de las levaduras en el tracto gastrointestinal murino	78
Modelo murino de infección con <i>Salmonella typhimurium</i>	79
Modelo de colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS)	82

Discusión	90
Resumen de resultados y conclusiones	94
Bibliografía	95
Discusión general, conclusiones y perspectivas	99
Bibliografía	104
Materiales y métodos	105
Apéndice: Desarrollo de una <i>macro</i> para <i>ImageJ</i> destinada al análisis automatizado de imágenes de microscopía de fluorescencia	
Introducción	131
Bibliografía y enlaces de interés	141
Licencia	141

Índice de figuras

Fig.		Pag.
	Introducción general	
	Gránulos de kefir	6
	Capítulo 1: Selección de microorganismos potencialmente probióticos: análisis de la capacidad moduladora de la respuesta inmune innata epitelial	
1.1	Vías de señalización TLR y estructura de Flagelina	15
1.2	Esquema del sistema reportero Caco Ccl20:luc	16
1.3	<i>Screening</i> de la capacidad moduladora de la respuesta inmune <i>in vitro</i> de bacterias	19
1.4	<i>Screening</i> de la capacidad moduladora de la respuesta inmune <i>in vitro</i> de bacterias	20
1.5	Efecto del tiempo de preincubación sobre la modulación	21
1.6	Efecto de la viabilidad del microorganismo sobre la modulación	23
1.7	Efecto de la dosis de microorganismo sobre la modulación	24
1.8	Efecto de la adherencia del microorganismo sobre la modulación	25
1.9	Comparación de tendencias de búsqueda de los términos “bacterias probióticas” vs “levaduras probióticas” en internet	26
	Capítulo 2: Estudio de los mecanismos de señalización implicados en la modulación de la respuesta proinflamatoria	
2.1	Señalización a través de la vía de NF-kB	36
2.2	Modelo propuesto para la modulación de la respuesta innata epitelial mediante la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS)	38
2.3	Esquema de los dispositivos <i>transwells</i>	40
2.4	Estudio de la presencia de factores solubles de modulación	41
2.5	Efecto de <i>K marxianus</i> CIDCA 8154 sobre la expresión de genes proinflamatorios	43
2.6	Efecto de <i>K marxianus</i> CIDCA 8154 sobre la expresión de genes no relacionados con la respuesta inflamatoria epitelial	44
2.7	Expresión de CCL20 en diferentes líneas celulares de epitelio intestinal	45
2.8	Sistema reportero 3kB:luc	46
2.9	Estudio de la traslocación de NF-kB al núcleo mediante inmunofluorescencia	47
2.10	Efecto de inhibidores farmacológicos de diferentes vías de señalización intracelulares en la modulación	48
2.11	<i>Western Blot</i> para la detección de plkB en extractos citoplasmáticos	49
2.12	Sistema de detección de ROS mediante microscopía de fluorescencia	50
2.13	Inducción de ROS en células Caco2	51
2.14	Resumen de la capacidad inductora de ROS de los microorganismos utilizados	52
2.15	Capacidad inductora de ROS y capacidad moduladora de la respuesta inflamatoria de diferentes microorganismos	53
2.16	Efecto de N-acetilcisteína sobre la inducción de ROS y la modulación	54
2.17	Correlación entre la capacidad inmunomoduladora y la de inducción de ROS	55

Fig.	Capítulo 3: Estudio de la capacidad moduladora de la respuesta innata de microorganismos seleccionados empleando modelos <i>in vivo</i>	Pag.
3.1	Transmisión de salmonelosis	68
3.2	Salmonelosis en Argentina	70
3.3	Ensayo de ligación de asa intestinal	73
3.4	Expresión de CCL20 en ensayos de asa ligada	74
3.5	Supervivencia de <i>K. marxianus</i> CIDCA 8154 en agua de bebida	76
3.6	Supervivencia de <i>K. marxianus</i> CIDCA 8154 al pasaje por el tracto gastrointestinal de ratones Balb-c	77
3.7	Distribución de levaduras en el tracto gastrointestinal	78
3.8	Supervivencia de <i>K. marxianus</i> CIDCA 8154 al pasaje por el tracto gastrointestinal de ratones C57BL/6	80
3.9	Recuentos de <i>Salmonella</i>	81
3.10	Histopatología de la infección por <i>Salmonella</i>	82
3.11	Efecto de la dosis de TNBS intrarrectal	84
3.12	Cinética del daño histopatológico debido a la administración de TNBS	85
3.13	Efecto de la administración de <i>K. marxianus</i> CIDCA 8145 en el modelo de colitis inducida por TNBS	87
3.14	Expresión de CXCL1, CXCL2 el IL-6 en el colo de animales tratados con TNBS	88
3.15	Efecto de la administración de <i>K. marxianus</i> CIDCA 8154 en la expresión de genes proinflamatorios en el colon de animales tratados con TNBS	89
3.16	Comparación de estudios sobre tratamientos basados en probióticos para afecciones inflamatorias	92
	Apéndice: Desarrollo de una <i>macro</i> para <i>ImageJ</i> destinada al análisis automatizado de imágenes de microscopía de fluorescencia	
A.1	Detección de ROS por inmunofluorescencia	132
A.2	Composición de la imagen RGB	133
A.3	Interfaz gráfica de <i>ImageJ</i>	134
A.4	Análisis de imágenes con <i>Trained Monkey</i>	139
A.5	Comparación entre métodos de análisis de imágenes	140

Introducción

microorganismos

Introducción general

El tracto gastrointestinal de los mamíferos se encuentra colonizado por miríadas de especies bacterianas diferentes que constituyen la microbiota. La misma tiene representantes de los tres dominios de la vida (*Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya* y sus virus) y juega un rol central en el mantenimiento de la homeostasis intestinal¹. La importancia de los microorganismos comensales en el correcto mantenimiento de las funciones metabólicas, absortivas e incluso en el desarrollo de las estructuras del epitelio intestinal ha conducido a que muchos autores consideren a la microbiota como un órgano más del individuo².

La presencia de microorganismos comensales complementa las funciones metabólicas del huésped. Son ejemplo de esto la digestión de fibras de la dieta, la modificación de xenobióticos³ y la generación de vitaminas como la K, que es sintetizada por bacterias anaeróbicas del colon. Esta vitamina es indispensable en procesos de coagulación, modificación postraduccional de proteínas y otras vías metabólicas de mamíferos y se ha descrito una patología conocida como hipoprotrombinemia asociada a antibióticos⁴⁻⁶, debido a la baja de niveles de vitamina K que produce la disminución de microorganismos comensales por el tratamiento antimicrobiano. Otro ejemplo es la producción de ácidos grasos de cadena corta, como el butirato, que constituye la principal fuente energética de los colonocitos y es producido en su mayoría por microorganismos anaerobios del lumen intestinal⁷.

Con respecto a otras interacciones descritas entre los microorganismos y el huésped en el entorno intestinal, se ha demostrado que la modificación de la microbiota en ratas genera diferencias histológicas en el intestino, en cuanto a la cantidad de criptas, longitud de vellosidades e incluso la composición de la capa de mucus⁸. La interacción entre microbiota y huésped es sumamente estrecha, teniendo los microorganismos influencia incluso en el sistema nervioso. Algunos ejemplos incluyen la modificación del comportamiento de apareamiento de *Drosophila melanogaster* por *Lactobacillus plantarum*⁹, diferencias en la atracción de mosquitos debidas a variabilidad en la composición de la microbiota de la piel entre individuos¹⁰ y la influencia de los microorganismos en las hormonas, quimoquinas y neuropéptidos responsables de la señalización a través del eje cerebro-intestino^{11,12}, que modifican el comportamiento en ratones.

La composición de la microbiota varía en un individuo a lo largo de su desarrollo. Así, en la etapa del nacimiento/lactancia las primeras especies que colonizan el intestino son pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* con presencia variable de anaerobios obligados como *Clostridium* y *Bacteroides*, que aumentan con el tiempo para convertirse en predominantes. La sucesión de especies depende de factores como la dieta, variabilidad genética, sexo y eventos inflamatorios entre otros, generando diversidad en la microbiota de diferentes individuos^{13,14}.

Gracias a los últimos adelantos en tecnología de secuenciación de ADN ha sido posible estudiar la influencia de estos factores en la composición de la microbiota¹⁵⁻¹⁷. Los estudios basados en la pirosecuenciación del ARN 16s permiten conocer la distribución de los principales géneros de microorganismos comensales que colonizan el tracto gastrointestinal independientemente de la capacidad de cultivar esos microorganismos. El uso de este tipo de herramientas han llevado a la conclusión de que la dieta es un factor determinante en la composición de la microbiota, la cual parece estar vinculada a la incidencia de ciertos tipos de enfermedades¹⁸. Así por ejemplo, la dieta occidental, rica en carbohidratos, proteínas y grasa animal y baja en vegetales, está asociada con enfermedades tales como síndrome metabólico, cáncer de colon y enfermedades inflamatorias intestinales¹⁹⁻²².

Las causas del desbalance en la composición de la microbiota pueden ser de diversos orígenes e incluir a patógenos, antibióticos o incluso una respuesta inmune del huésped frente a los mismos microorganismos.

Un desbalance de la microbiota debido a un tratamiento con antibióticos puede generar una diarrea asociada a antibióticos, la cual se ha descrito en aproximadamente entre un 5 a 39% de pacientes que reciben un tratamiento antimicrobiano²³. La incidencia de esta patología varía de acuerdo al antibiótico utilizado y a la susceptibilidad de cada paciente. Los mecanismos por los que se produce la patología han sido descritos en diversos trabajos, entre ellos se pueden encontrar la pérdida de microbiota que protege contra la colonización de patógenos como *Clostridium difficile* el cual puede causar enfermedad severa con riesgo de muerte²⁴, especialmente si la infección es por cepas altamente virulentas que han emergido en los últimos tiempos en América del Norte y Europa²⁴.

En un escenario donde la microbiota se encuentra intacta, la colonización del tracto gastrointestinal por el patógeno se dificulta, ya que existe gran competencia por el espacio, los nutrientes y las condiciones óptimas de crecimiento para el patógeno.

El hecho de que los microorganismos comensales puedan ser considerados como tales, evidencia un largo trayecto de evolución de las poblaciones en la interacción de los microorganismos y los sistemas de defensa del huésped²⁵.

Las bacterias comensales son reconocidas por los receptores de la inmunidad innata, sin embargo el sistema inmune no genera una respuesta efectora clásica hacia los mismos. Este comportamiento puede ser explicado por una gran variedad de factores que actúan en coordinación, incluyendo cambios en la expresión de receptores tipo *Toll* (TLRs) del epitelio intestinal e interferencia entre vías de señalización de los receptores tipo *Toll* y receptores tipo *NOD* (NLRs) y la expresión de citoquinas reguladoras en el epitelio como $TGF\beta 1$ ²⁶. En la mucosa existen varios factores que actúan como barrera minimizando el contacto entre la microbiota y las células epiteliales, algunos ejemplos son los péptidos antimicrobianos y la presencia de IgA en la mucosa. En los últimos años se está prestando especial interés a la influencia de metabolitos y otros productos microbianos como señales inmunomoduladoras para el epitelio^{27,28}. Se ha descrito la presencia de receptores en los enterocitos capaces de reconocer los productos metabólicos de microorganismos, como los receptores de ácidos grasos de cadena corta (SCFAR por sus siglas en inglés) o receptores de péptidos formilados, responsables en parte del mantenimiento de la homeostasis intestinal¹.

Las epiteliales no son el único tipo celular responsable de la inmunidad del intestino; las células dendríticas están constantemente actuando como centinelas de la composición microbiana en los compartimentos mucosos mediante el muestreo directo de antígenos, este muestreo se realiza mediante extensión de las dendritas a través de la capa epitelial²⁹ y mediante la captación de antígenos que atraviesan el epitelio a través de las células M en las placas de Peyer³⁰. En conjunto con las células epiteliales, las células dendríticas secretan quimoquinas que reclutan y regulan una diversidad de macrófagos y linfocitos que eventualmente participan en una respuesta inflamatoria³¹⁻³³.

El hecho de que los microorganismos presentes en la luz intestinal puedan influenciar en la generación de respuesta o tolerancia del sistema inmune permite especular con la manipulación de la respuesta inmune a través de la dieta¹⁸.

En los últimos tiempos se ha incrementado el uso de los llamados *alimentos funcionales*, los que pueden definirse como aquellos que, gracias a agregados, poseen una función adicional más allá de la meramente nutritiva. Por lo general, estas funciones están asociadas con beneficios para la salud de los consumidores. Entre los alimentos funcionales, el rubro de los alimentos lácteos es uno de los más desarrollados por la industria, siendo destacable el uso de microorganismos probióticos. Estos son, según la organización mundial para la salud, aquellos microorganismos vivos, que al ser ingeridos en dosis adecuadas, confieren un beneficio a la salud del consumidor³⁴.

Algunas de las aplicaciones descritas para microorganismos probióticos incluyen el uso de ciertas especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* para disminuir los niveles de colesterol, propiedad de relevancia en la prevención de enfermedades cardiovasculares^{35,36}.

En el tratamiento de la diarrea asociada a antibióticos, se han aplicado exitosamente terapias a base de bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*^{37,38} y levaduras como *Saccharomyces boulardii*³⁹.

En cuanto a las infecciones por patógenos, se ha descrito el uso de probióticos para el complemento de tratamientos con antibióticos en infecciones de *Helicobacter pylori*. En estos estudios, el uso de ciertas especies de lactobacilos ayuda a evitar los efectos colaterales de la terapia antimicrobiana más que a erradicar al patógeno de manera directa⁴⁰⁻⁴².

En infecciones intestinales, *Salmonella* es uno de los agentes etiológicos más ampliamente distribuidos en el mundo y uno de los principales patógenos responsable de infecciones alimentarias. Se ha descrito que el uso de ciertas especies de lactobacilos modifica el comportamiento de la respuesta innata frente al patógeno, disminuyendo el entorno proinflamatorio que *Salmonella* necesita para colonizar el tracto intestinal^{43,44}.

Entre otras potenciales aplicaciones descritas para microorganismos probióticos se incluyen el tratamiento de caries, infecciones virales, cáncer de colon y constipación⁴⁵⁻⁴⁷.

La aplicación de microorganismos con capacidad probiótica se ha realizado históricamente de manera empírica, sin conocerse los mecanismos por los cuales estos ejercen sus efectos. Los estudios clínicos en personas, son escasos, complejos de llevar a cabo y por lo general no resultan

concluyentes en cuanto a los beneficios directos sobre la salud de los individuos derivados del consumo de probióticos ya que la variabilidad en el comportamiento, dieta, actividad, etc. entre individuos es un obstáculo difícil de sortear en el diseño experimental.

Existen trabajos que estudian los mecanismos de acción de probióticos comúnmente utilizados, desde el reconocimiento del microorganismo por el huésped, la caracterización de vías de señalización intracelular implicadas y los efectos que la administración de probióticos tiene sobre la microbiota^{48,49}.

En el presente trabajo de tesis, nos centraremos en aquellas aplicaciones en donde los probióticos son utilizados como moduladores de la respuesta innata. El interés clínico y científico por encontrar microorganismos con capacidad moduladora de la respuesta inmune intestinal se ha incrementado últimamente debido a la acumulación de evidencia sobre el papel central que juega la microbiota intestinal en el inicio y la perpetuación de las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD por *Inflammatory Bowel Diseases*)⁵⁰. A pesar de que se han atribuido efectos benéficos al consumo de diferentes microorganismos, los mecanismos por los cuales estos ejercen su efecto no son comprendidos aún en su totalidad⁵¹. Existe evidencia de la capacidad de ciertas especies bacterianas (mayoritariamente de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) de modular la producción de citoquinas pro- o antiinflamatorias en células dendríticas⁵², macrófagos⁵³ y células epiteliales intestinales⁵⁴.

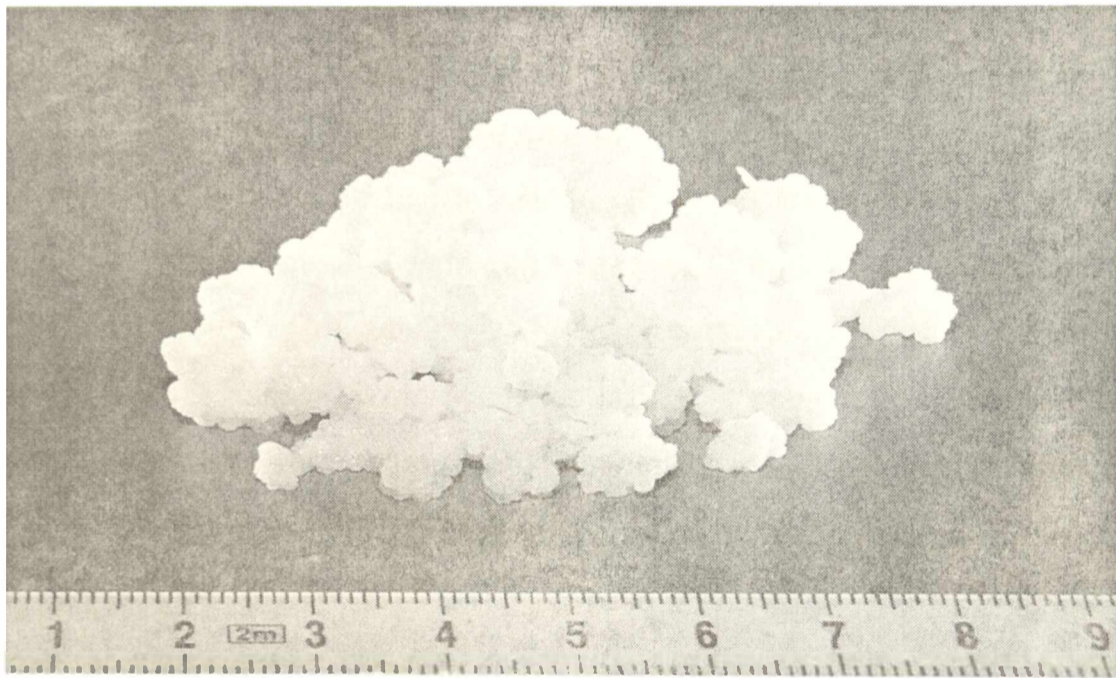
Puede observarse que en la mayoría de las aplicaciones de microorganismos probióticos en alimentos funcionales se utilizan bacterias ácido-lácticas. Esto tiene origen en que, tradicionalmente, la mayoría de los productos fermentados se generan mediante el uso de estas bacterias por las características organolépticas que confieren al alimento. Los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son los más comúnmente empleados en el desarrollo de estos alimentos y coinciden con el hecho de ser los principales representantes de la microbiota de los lactantes.

A pesar de que las levaduras han sido utilizadas tradicionalmente en la manufactura de alimentos tales como pan y bebidas fermentadas como vino y cerveza desde tiempos remotos, la asociación del consumo de estos microorganismos con beneficios en la salud es relativamente reciente y más reciente aún es el estudio científico de estos efectos⁵⁵⁻⁵⁸. Estos estudios se centran principalmente

en el uso de la levadura *Saccharomyces boulardii* y en menor medida de *Kluyveromyces marxianus* como probióticos.

Nuestro grupo de trabajo cuenta con una amplia trayectoria en microbiología alimentaria, particularmente con la microbiología de productos lácteos, entre ellos el Kefir.

El kefir se obtiene mediante la fermentación de leche con “gránulos de kefir”, que consisten en una comunidad de microorganismos diversos confinados en una matriz de polisacáridos y proteínas. Entre los microorganismos presentes se han descrito bacterias ácido-lácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*, bacterias ácido-acéticas y levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Issatchenkia*^{59,60}.



Gránulos de kefir - Fotografía de A. Kniesel utilizado bajo licencia *Creative Commons*

El consumo de kefir se ha asociado a propiedades promotoras de la salud como efectos antimicrobianos, antitumorales e hipocolesterolémicos entre otros y es utilizado de manera empírica en el Este europeo para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales⁶¹⁻⁶³.

Nuestro grupo de trabajo ha aislado y caracterizado más de 120 bacterias y levaduras a partir de gránulos de kefir hasta la fecha y de muchas de ellas se han estudiado las propiedades de resistencia a sales biliares, bajo pH, capacidad de adhesión a células epiteliales *in vitro* y caracterización de sus componentes de superficie^{63,64}.

En el presente trabajo de tesis y proponiendo al kefir como fuente de microorganismos potencialmente probióticos, se presentarán tres capítulos. En el primero se muestra la

caracterización de dichos microorganismos en cuanto a su capacidad moduladora de la respuesta inmune innata epitelial en un sistema reportero de inflamación *in vitro*; en el segundo capítulo se expondrá un estudio comparativo de los mecanismos de señalización implicados en la modulación, de manera comparativa entre bacterias y levaduras. Por último, en el tercer capítulo se analizará la posibilidad de aplicar microorganismos moduladores de la respuesta innata epitelial *in vitro* en modelos murinos de inflamación intestinal.

De este modo, se puede resumir la organización racional del trabajo en la selección de microorganismos con propiedad inmunomoduladora, el estudio mecanístico del efecto de inmunomodulación y la aplicación de estos microorganismos a un modelo de inflamación intestinal *in vivo*.

Bibliografia

1. Garrett, W. S., Gordon, J. I. & Glimcher, L. H. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell* **140**, 859–870 (2010).
2. O'Hara, A. M. & Shanahan, F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports* **7**, 688–93 (2006).
3. Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M. & Finlay, B. B. Gut Microbiota in Health and Disease. 859–904 (2010). doi:10.1152/physrev.00045.2009.
4. Shevchuk, Y. M. & Conly, J. M. Antibiotic-associated hypoprothrombinemia: a review of prospective studies, 1966-1988. *Reviews of infectious diseases* **12**, 1109–26
5. Conly, J. & Stein, K. Reduction of vitamin K2 concentrations in human liver associated with the use of broad spectrum antimicrobials. *Clinical and investigative medicine. Médecine clinique et expérimentale* **17**, 531–9 (1994).
6. Kirgizov, I. V., Sukhorukov, A. M., Dudarev, V. A. & Istomin, A. A. Hemostasis in children with dysbacteriosis in chronic constipation. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis: official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* **7**, 335–8 (2001).
7. Topping, D. L. & Clifton, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews* **81**, 1031–64 (2001).
8. Sharma, R., Schumacher, U., Ronaasen, V. & Coates, M. Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. *Gut* **36**, 209–14 (1995).
9. Roy, S. *et al.* Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 20051–20056 (2013).
10. Verhulst, N. O. *et al.* Composition of human skin microbiota affects attractiveness to malaria mosquitoes. *PloS one* **6**, e28991 (2011).
11. Bercik, P., Collins, S. M. & Verdu, E. F. Microbes and the gut-brain axis. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* **24**, 405–13 (2012).
12. Bercik, P. *et al.* The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* **141**, 599–609, 609.e1–3 (2011).
13. Heavey, P. M. & Rowland, I. R. The Gut Microflora of the Developing Infant: Microbiology and Metabolism. *Microbial Ecology in Health and Disease* **11**, 75–83 (1999).
14. Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P. & Vigi, V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta paediatrica (Oslo, Norway; 1992). Supplement* **91**, 48–55 (2003).
15. Andersson, A. F. *et al.* Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PloS one* **3**, e2836 (2008).
16. Li, M. *et al.* Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 2117–22 (2008).
17. Zhang, H. *et al.* Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 2365–70 (2009).
18. Maslowski, K. M. & Mackay, C. R. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nature immunology* **12**, 5–9 (2011).
19. Hou, J. K., Abraham, B. & El-Serag, H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *The American journal of gastroenterology* **106**, 563–73 (2011).

20. Chan, S. S. M. *et al.* Body Mass Index and the Risk for Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: Data From a European Prospective Cohort Study (The IBD in EPIC Study). *The American journal of gastroenterology* (2013).doi:10.1038/ajg.2012.453
21. *Crohn's Disease and Ulcerative Colitis.* (Springer US: Boston, MA, 2012).doi:10.1007/978-1-4614-0998-4
22. *Nutrition, Diet and Cancer.* (Springer Netherlands: Dordrecht, 2012).doi:10.1007/978-94-007-2923-0
23. Allen, S. J. *et al.* A multicentre randomised controlled trial evaluating lactobacilli and bifidobacteria in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in older people admitted to hospital: the PLACIDE study protocol. *BMC Infectious Diseases* **12**, 1 (2012).
24. Viswanathan, V. K., Mallozzi, M. J. & Vedantam, G. An overview of the disease and its pathogenesis , epidemiology and interventions Clostridium difficile infection. **1**, 234–242 (2010).
25. Schluter, J. & Foster, K. R. The Evolution of Mutualism in Gut Microbiota Via Host Epithelial Selection. *PLoS Biology* **10**, e1001424 (2012).
26. Ruiz, P. A., Shkoda, A., Kim, S. C., Sartor, R. B. & Haller, D. IL-10 gene-deficient mice lack TGF-beta/Smad-mediated TLR2 degradation and fail to inhibit proinflammatory gene expression in intestinal epithelial cells under conditions of chronic inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1072**, 389–94 (2006).
27. Cario, E. & Podolsky, D. K. Intestinal epithelial TOLLerance versus inTOLLerance of commensals. *Molecular immunology* **42**, 887–93 (2005).
28. Lee, W.-J. Bacterial-modulated signaling pathways in gut homeostasis. *Science signaling* **1**, pe24 (2008).
29. Rescigno, M., Urbano, M. & Valzasina, B. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology* **2**, 361–367 (2001).
30. Salazar-Gonzalez, R. M. *et al.* CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. *Immunity* **24**, 623–32 (2006).
31. Tsuji, M. *et al.* Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* **29**, 261–71 (2008).
32. Deshane, J. & Chaplin, D. D. Follicular dendritic cell makes environmental sense. *Immunity* **33**, 2–4 (2010).
33. Suzuki, K. *et al.* The Sensing of Environmental Stimuli by Follicular Dendritic Cells Promotes Immunoglobulin A Generation in the Gut. *Immunity* **33**, 71–83 (2010).
34. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization* 1–34 (2001).at <http://www.who.int/entity/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf>
35. Xie, N. *et al.* Effects of two Lactobacillus strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet. *BMC complementary and alternative medicine* **11**, 53 (2011).
36. Kumar, M. *et al.* Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Experimental diabetes research* **2012**, 902917 (2012).
37. Song, H. J. *et al.* Effect of probiotic Lactobacillus (Lacidofil® cap) for the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a prospective, randomized, double-blind, multicenter study. *Journal of Korean medical science* **25**, 1784–91 (2010).

38. Hickson, M. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* infection. *Therapeutic advances in gastroenterology* **4**, 185–97 (2011).
39. Pozzoni, P. *et al.* *Saccharomyces boulardii* for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in adult hospitalized patients: a single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The American journal of gastroenterology* **107**, 922–31 (2012).
40. Fujimura, S., Watanabe, a., Kimura, K. & Kaji, M. Probiotic Mechanism of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 Strain against *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology* **50**, 1134–1136 (2011).
41. Ahmad, K., Fatemeh, F., Mehri, N. & Maryam, S. Probiotics for the treatment of pediatric *Helicobacter pylori* infection: a randomized double blind clinical trial. *Iranian journal of pediatrics* **23**, 79–84 (2013).
42. Tolone, S., Pellino, V., Vitaliti, G., Lanzafame, A. & Tolone, C. Evaluation of *Helicobacter Pylori* eradication in pediatric patients by triple therapy plus lactoferrin and probiotics compared to triple therapy alone. *Italian journal of pediatrics* **38**, 63 (2012).
43. Zihler, A., Gagnon, M., Chassard, C. & Lacroix, C. Protective effect of probiotics on *Salmonella* infectivity assessed with combined in vitro gut fermentation-cellular models. *BMC microbiology* **11**, 264 (2011).
44. Bermudez-Brito, M. *et al.* Human intestinal dendritic cells decrease cytokine release against *Salmonella* infection in the presence of *Lactobacillus paracasei* upon TLR activation. *PLoS one* **7**, e43197 (2012).
45. De Roos, N. M., Katan, M. B. & Articles, R. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *The American journal of clinical nutrition* **71**, 405–11 (2000).
46. Meurman, J. H. & Stamatova, I. Probiotics: contributions to oral health. *Oral diseases* **13**, 443–51 (2007).
47. Uccello, M. *et al.* Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. *BMC Surgery* **12**, S35 (2012).
48. Damaskos, D. & Kolios, G. Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: microflora “on the scope”. *British journal of clinical pharmacology* **65**, 453–467 (2008).
49. Lyra, A. *et al.* Effect of a multispecies probiotic supplement on quantity of irritable bowel syndrome-related intestinal microbial phylotypes. *BMC gastroenterology* **10**, 110 (2010).
50. Strober, W., Fuss, I. & Mannon, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *The Journal of clinical investigation* **117**, 514–21 (2007).
51. Strober, W., Fuss, I., Boirivant, M. & Kitani, A. Insights into the mechanism of oral tolerance derived from the study of models of mucosal inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1029**, 115–31 (2004).
52. Foligne, B. *et al.* A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS one* **2**, e313 (2007).
53. Marcinkiewicz, J. *et al.* Differential inflammatory mediator response in vitro from murine macrophages to *Lactobacilli* and pathogenic intestinal bacteria. *International journal of experimental pathology* **88**, 155–64 (2007).
54. O’Hara, A. M. *et al.* Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology* **118**, 202–15 (2006).
55. Romanin, D. *et al.* Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *International journal of food microbiology* **140**, 102–108 (2010).

-
56. Buts, J.-P. & De Keyser, N. Transduction pathways regulating the trophic effects of *Saccharomyces boulardii* in rat intestinal mucosa. *Scandinavian journal of gastroenterology* **45**, 175–85 (2010).
57. Szajewska, H., Skórka, a. & Dylag, M. Meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* for treating acute diarrhoea in children. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **25**, 257–64 (2007).
58. Zanello, G., Meurens, F., Berri, M. & Salmon, H. *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases. *Current issues in molecular biology* **11**, 47–58 (2009).
59. Angulo, L., Lopez, E. & Lema, C. Microflora present in kefir grains of the Galician region (north-west of Spain. *The Journal of dairy research* **60**, 263–7 (1993).
60. Garrote, G. L., Abraham, A. G. & De Antoni, G. L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *The Journal of dairy research* **68**, 639–52 (2001).
61. Taverniti, V. & Guglielmetti, S. Health-promoting properties of *Lactobacillus helveticus*. *Frontiers in Microbiology* **3**, 1–13 (2012).
62. De Moreno de Leblanc, a, Matar, C., Farnworth, E. & Perdígón, G. Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer model. *Journal of dairy science* **90**, 1920–8 (2007).
63. Carasi, P., Trejo, F. M., Pérez, P. F., De Antoni, G. L. & Serradell, M. de los A. Surface proteins from *Lactobacillus kefir* antagonize in vitro cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxins. *Anaerobe* **18**, 135–42 (2012).
64. Golowczyc, M., Mobili, P. & Garrote, G. Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins. *Journal of Dairy* **76**, 111–116 (2009).

microorganismos

Capítulo 1

Capítulo 1 - Selección de microorganismos potencialmente probióticos: análisis de la capacidad moduladora de la respuesta inmune innata epitelial

Introducción

El epitelio intestinal integra una gran cantidad de señales moleculares tanto externas como internas, que funcionan de manera coordinada para mantener la homeostasis de las diferentes funciones en las que se ve involucrado. Entre las funciones de este epitelio se puede destacar como principal función a la absorción de nutrientes¹ (aminoácidos, glúcidos, ácidos grasos, hierro, etc). La función secretoria también es importante ya que se liberan al lumen intestinal componentes del mucus, IgA y péptidos antimicrobianos, que mantienen separada físicamente a la microbiota del epitelio. Otra función clave es la evaluación constante del entorno microbiano como primera línea de defensa ante la aparición de microorganismos patógenos. En los últimos tiempos la acumulación de evidencia a favor de la interacción entre las diversas funciones del epitelio ha aumentado exponencialmente²⁻⁵.

El epitelio intestinal interactúa asimismo con las células del sistema inmune. Ante un estímulo proinflamatorio, las células epiteliales responden con señales diversas y de diferente intensidad, que contribuyen al direccionamiento del tipo de respuesta efectora necesaria para tratar la amenaza particular⁶⁻⁸. Las quimoquinas son pequeñas moléculas peptídicas cuya función es reclutar células efectoras que juegan un papel central en esta interacción^{6,9-11}.

El reconocimiento de los microorganismos comensales en el intestino y en los epitelios en general se lleva cabo a través de la interacción de diversos receptores y ligandos. No se conocen receptores específicos para microorganismos particulares, aunque sí se han descrito los llamados receptores de reconocimiento de patrones moleculares¹² (PRRs por sus siglas en inglés), entre los que se encuentran los receptores tipo *Toll* (TLRs por sus siglas en inglés). Desde su descubrimiento los TLRs revolucionaron la forma de entender la interacción entre el sistema inmune y el entorno microbiológico. El primero descrito fue el TLR4, al cual se le adjudicó la capacidad de reconocer lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas (LPS). Ratones con mutaciones puntuales en este gen no respondían a un desafío con LPS pero eran susceptibles a infección por microorganismos Gram-

negativas. Los autores de ese trabajo hipotetizaron que TLR4 no sólo era responsable del reconocimiento del LPS sino que tal vez tenía alguna función para la transducción de señales a través de la membrana para montar la respuesta necesaria al estímulo¹³. Hoy, más de 14 años después se conocen 13 TLRs diferentes en mamíferos. Los TLR1 a TLR10 son compartidos entre humanos y ratones, aunque existe una diferencia estructural entre los homólogos de TLR10. TLR11, 12 y 13 se han descrito sólo en ratones. Entre las moléculas que pueden ser reconocidas se encuentran ácidos nucleicos, lípidos, oligosacáridos y proteínas. En los microorganismos patógenos, las moléculas ampliamente conservadas reconocidas por este tipo de receptores se denominan Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés). El término PAMP fue progresivamente siendo dejado de lado por la adopción de término MAMP (patrones moleculares asociados a microorganismos) al reconocerse que los distintos ligandos no tienen una distribución restringida a patógenos sino que se encuentran también en especies microbianas no patógenas. Actualmente el concepto de MAMP como ligando de los PRRs fue ampliado mediante la adopción del concepto de Patrones Moleculares Asociados a Daños (DAMPs por sus siglas en inglés), ya que ha sido descrito, que algunos receptores de la inmunidad innata son capaces de reconocer también moléculas endógenas, presentes sólo en situaciones de daño celular¹⁴. Pueden mencionarse a modo de ejemplo las proteínas de shock térmico o el reconocimiento β -defensina y miosina cardíaca entre otros por TLR2, 4 u 8 dependiendo del tipo celular^{15,16}.

Entre las distintas moléculas reconocidas por los TLRs, la flagelina, reconocida por TLR5, es de especial interés para el desarrollo del presente trabajo. Esta proteína es el principal componente de los flagelos bacterianos. En la figura 1.1 se muestra un modelo estructural de una molécula de flagelina en donde se diferencian cuatro dominios¹⁷. Los primeros dominios D0 y D1, se encuentran ampliamente conservados en las flagelinas de distintos microorganismos. D2 y D3 son dominios hipervariables en tamaño y secuencia, lo que genera una gran diversidad de flagelinas entre especies e incluso entre cepas dentro de la misma especie. Los flagelos bacterianos están conformados por filamentos compuestos de monómeros de flagelina unidos por los dominios D0 y D1, que exponen a la superficie los dominios variables. Todo el filamento de flagelina se encuentra anclado a la pared bacteriana por una estructura proteica conocida como "gancho" (*hook*).

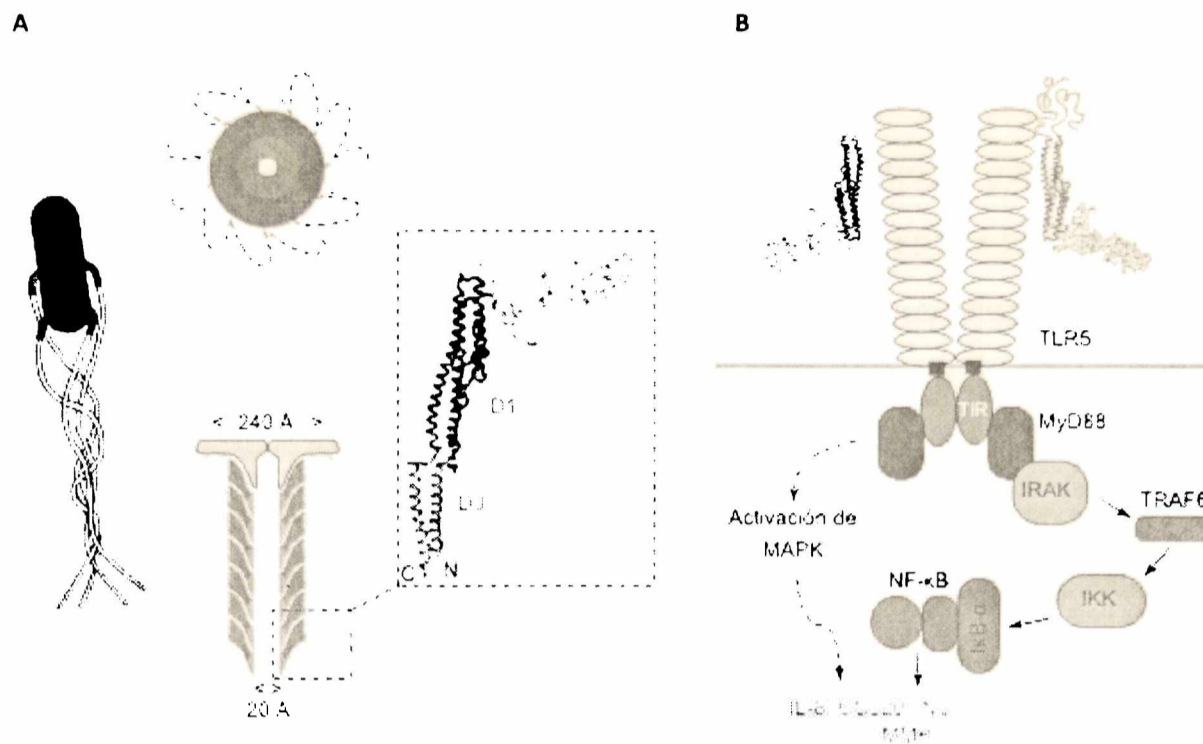


Figura 1.1 - Vías de señalización a través de los receptores tipo toll y estructura y distintos dominios de la flagelina. A estructura del flagelo y de la flagelina (recuadro). B Vía de señalización clásica de TLR5. Esquema adaptado de Ramos et al. doi:10.1016/j.tim.2004.09.002

En el lumen del tracto digestivo hay grandes cantidades de flagelina, debido a que esta molécula está presente en una amplia cantidad de organismos, no necesariamente patógenos. La expresión de TLR5 en el epitelio gastrointestinal está localizada tanto en el lado apical como basolateral de las células epiteliales. Durante un proceso inflamatorio disminuyen los niveles de expresión y la distribución se torna netamente basolateral, disminuyendo la probabilidad de responder frente a flagelina de microorganismos comensales^{18,19}. La señalización a través de TLR5 comienza cuando la flagelina, el ligando, se une a la región extracelular del receptor. Este cuenta con un dominio tirosina quinasa en la región intracelular, similar al del receptor de IL-1, que dispara una cascada de fosforilaciones a través de la proteína adaptadora *MyD88* (por *Myeloid differentiation primary response gene 88*) e *IRAK* (*interleukin – 1 receptor associated kinase*). La vía de señalización prosigue con la fosforilación de *IKK-γ/NEMO* (*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit gamma/NF-kappa-B essential modulator*) que fosforila al inhibidor del factor de transcripción *NF-κB* (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) el inhibidor es degradado en el proteasoma luego de su ubiquitinación y el factor de transcripción trasloca al núcleo y promueve la

expresión de genes de la respuesta proinflamatoria, entre ellos el de la quimoquina Ccl20. En nuestro laboratorio contamos con un sistema reportero basado en la línea Caco 2, una línea ampliamente aceptada como modelo de epitelio intestinal humano²⁰. El sistema reportero, obtenido por transfección en estable, se compone del gen reportero luciferasa (luc) de luciérnaga (*Lampyris noctiluca*) bajo el dominio del promotor de la quimoquina Ccl20²¹. Este sistema permite evaluar de manera sencilla la respuesta proinflamatoria en diversas condiciones, por lo que lo hemos utilizado ampliamente como sistema de *screening*. En respuesta al estímulo con flagelina, las células en cultivo responden con alta sensibilidad mediante la producción de la quimoquina Ccl20, haciendo de este gen un buen marcador a medir para evaluar la respuesta proinflamatoria²² (figura 1.2). La actividad luciferasa del sistema es proporcional a la expresión del gen de Ccl20. La medida de dicha actividad se lleva a cabo mediante una reacción bioluminiscente, que es cuantificada utilizando un luminómetro. En la figura 1.2 C y D se muestra un esquema del ensayo de *screening* y la forma en que los datos son normalizados para su comparación respectivamente.

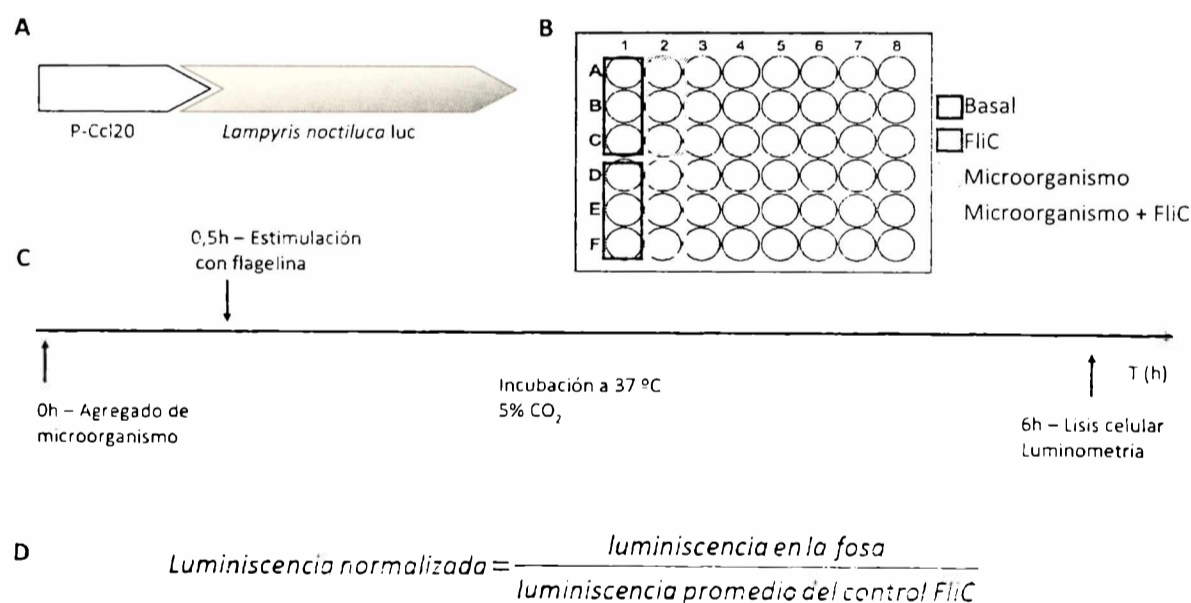


Figura 1.2 - Esquema del sistema reportero Caco-ccl20:luc y del formato del ensayo de *screening*. A Esquema de la construcción del sistema reportero. B Ejemplo de distribución de una placa de cultivo en un ensayo. C Línea de tiempo del desarrollo de los ensayos. D Definición de la luminiscencia normalizada utilizada para la comparación de resultados de normalización entre ensayos.

El gran interés que las industrias alimentaria y farmacéutica han mostrado por los microorganismos probióticos ha fomentado los estudios en busca de los mismos. Una de las estrategias es buscar microorganismos de diversos orígenes con propiedades específicas para una potencial aplicación en la mejora de algún aspecto de la salud del consumidor. Se han publicado diversos trabajos en

donde se prueba una determinada capacidad para una serie de microorganismos. Algunos ejemplos son la selección de lactobacilos aislados de leche, tomate y productos fermentados con capacidad antibacteriana utilizando un sistema *in vitro* de inhibición del crecimiento de patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*²³. Otras propiedades utilizadas para la búsqueda de microorganismos probióticos son la resistencia a sales biliares, bajo pH, adherencia a células epiteliales, asimilación de colesterol, y resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal, ya sea en modelos simulados o *in vivo*²³⁻³². Los orígenes de los microorganismos utilizados como probióticos son tan variados como las propiedades descritas. La mayoría de ellos son aislados de alimentos lácteos, heces, frutas, etc. La gran variedad de microorganismos presentes en el kefir y el hecho de que esta leche fermentada se haya consumido durante miles de años, atribuyéndosele a su consumo propiedades beneficiosas para la salud, lo convierte en una atractiva fuente de microorganismos para el desarrollo de alimentos funcionales.

Tal como se ha mencionado en la introducción general, existen numerosos reportes donde se describe el uso de microorganismos para el tratamiento de diferentes afecciones de base inmunológica como las alergias³³, enfermedades inflamatorias intestinales^{34,35}, enfermedad celíaca³⁶, etc. En estas patologías podría llegar a ser de utilidad la presencia de microorganismos que sean capaces de disminuir la respuesta proinflamatoria generada en intestino.

La hipótesis del presente capítulo es que el kefir es fuente de microorganismos potencialmente probióticos, con capacidad de modular la respuesta inmune. Para probar dicha hipótesis nos propusimos realizar un *screening* de la capacidad moduladora de la respuesta innata epitelial mediante el uso del sistema reportero Caco-ccl20:luc.

Objetivo específico: Seleccionar entre los microorganismos pertenecientes a la colección CIDCA, aquellos con capacidad moduladora de la respuesta innata en un sistema *in vitro*.

Resultados

Selección de microorganismos potencialmente probióticos utilizando un sistema reportero Caco ccl20:luc

Utilizando el sistema reportero Caco ccl20:luc en el formato de ensayo y análisis de resultados mostrados en la figura 1.2, se analizó la capacidad moduladora de la respuesta proinflamatoria disparada por flagelina. En las figura 1.3 y 1.4 se muestran los porcentajes de estimulación de la producción de la citoquina por 33 lactobacilos (23 aislados de kefir y 10 de otras colecciones) y 38 levaduras (27 aisladas de kefir y 11 de otras colecciones). Los orígenes de dichos microorganismos se detallan en la sección de materiales y métodos. Se puede apreciar que entre los lactobacilos ensayados, la mayor capacidad moduladora se encontró en los aislados *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8324, CIDCA 8346, CIDCA 8337, DSMZ 20174 y el aislado de un probiótico comercial, Lp299v. Las cepas de *L. kefir* CIDCA 8348 y ATCC 8007 también poseen capacidad moduladora así como la cepa de *L. brevis* JCM 1059. Sin embargo, la capacidad de ninguno de estos microorganismos resultó superior a la de los aislados de levadura analizados. En las de levaduras puede observarse una elevada capacidad moduladora, en comparación con la de las bacterias ensayadas. Se destaca además que no se aprecian diferencias significativas entre la capacidad moduladora de *Saccharomyces boulardii*, aislada de un probiótico comercial y las levaduras aisladas de kefir.

El estudio de la capacidad moduladora incluyó levaduras de otras procedencias diferentes al kefir ampliando la variedad de géneros ensayados, determinándose que todas las levaduras comparten dicha característica (figura 1.4 C). Entre los aislados incluidos se encuentran 4 de *Saccharomyces* spp. aislados de mosto de uva (CIDCA 1011, 1013, 1014 y 1015), las cepas *Candida krusei* LPSC 719, *Candida tropicalis* LPSC 610 y *Picchia anomala* LPSC 601 que fueron adquiridas del Cepario de levaduras y hongos filamentosos del Instituto de Botánica Carlos Spegazzini y un aislado ambiental de *Rhodotorula* sp. cortesía del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI).

En futuros ensayos la inclusión de una mayor cantidad de cepas, con una amplia representación de géneros, incluyendo levaduras patógenas sería de utilidad para evaluar cuán conservada es la capacidad moduladora en estos microorganismos.

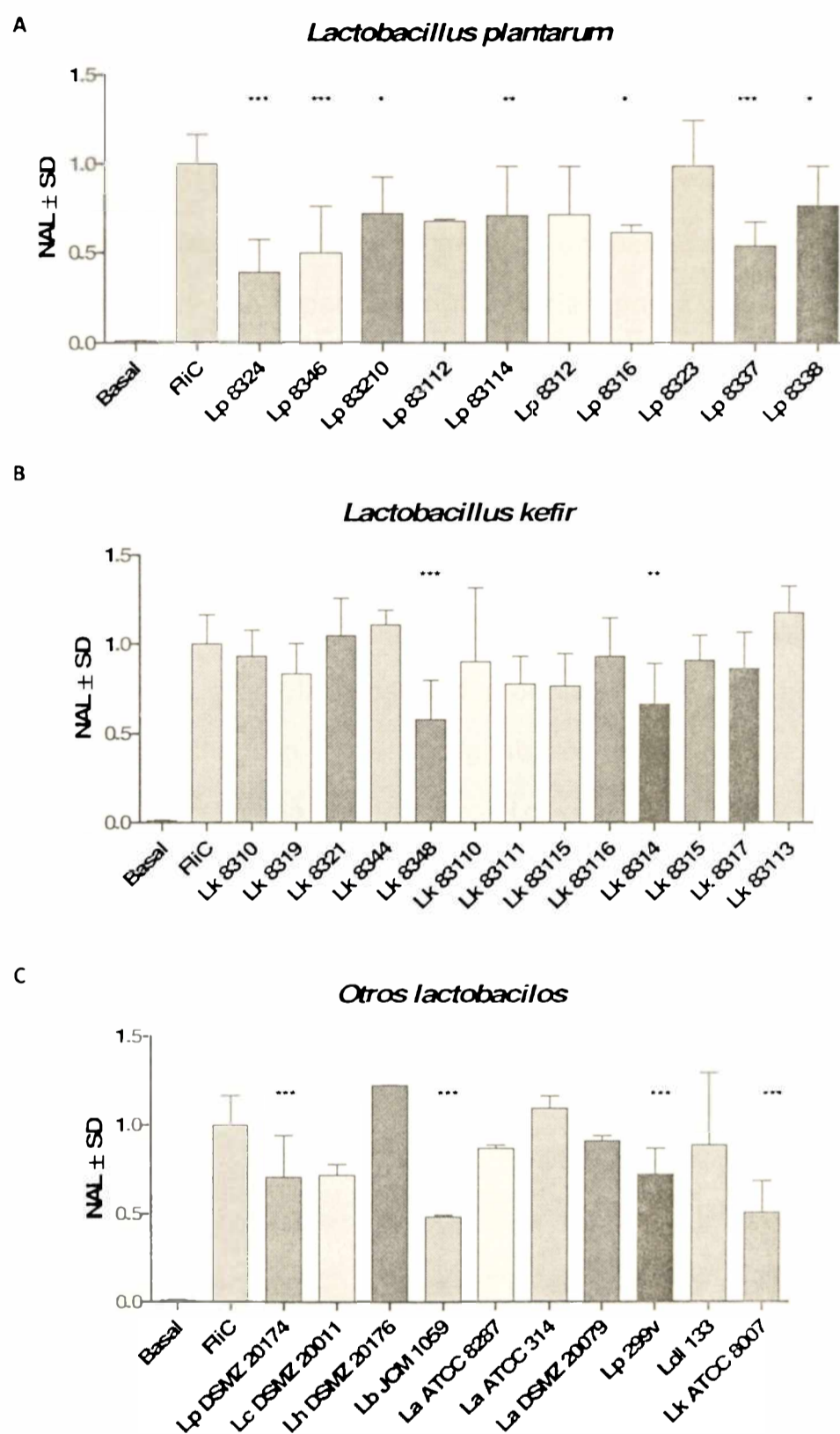


Figura 1.3 - Screening de la capacidad moduladora de la respuesta innata de bacterias lácticas A y B aislados de kefir. C cepas de otras colecciones. Lk *L. kefir* - Lp *L. plantarum* - La *L. acidophilus* - Lb *L. brevis* - Lc *L. casei* - Lh *L. hilgardii* - Ldl *L. delbrueckii lactis*. Se muestran los promedios y el desvío estándar de al menos 3 ensayos independientes con triplicados para cada microorganismo. Diferencias significativas * p<0,1; ** p<0,05 y *** p<0,01 ANOVA + Test de Dunnet vs control FliC.

La diferencia observada entre los diferentes grupos de microorganismos podría indicar que el mecanismo de acción de levaduras y bacterias para la modulación de la respuesta epitelial disparada por flagelina no es el mismo.

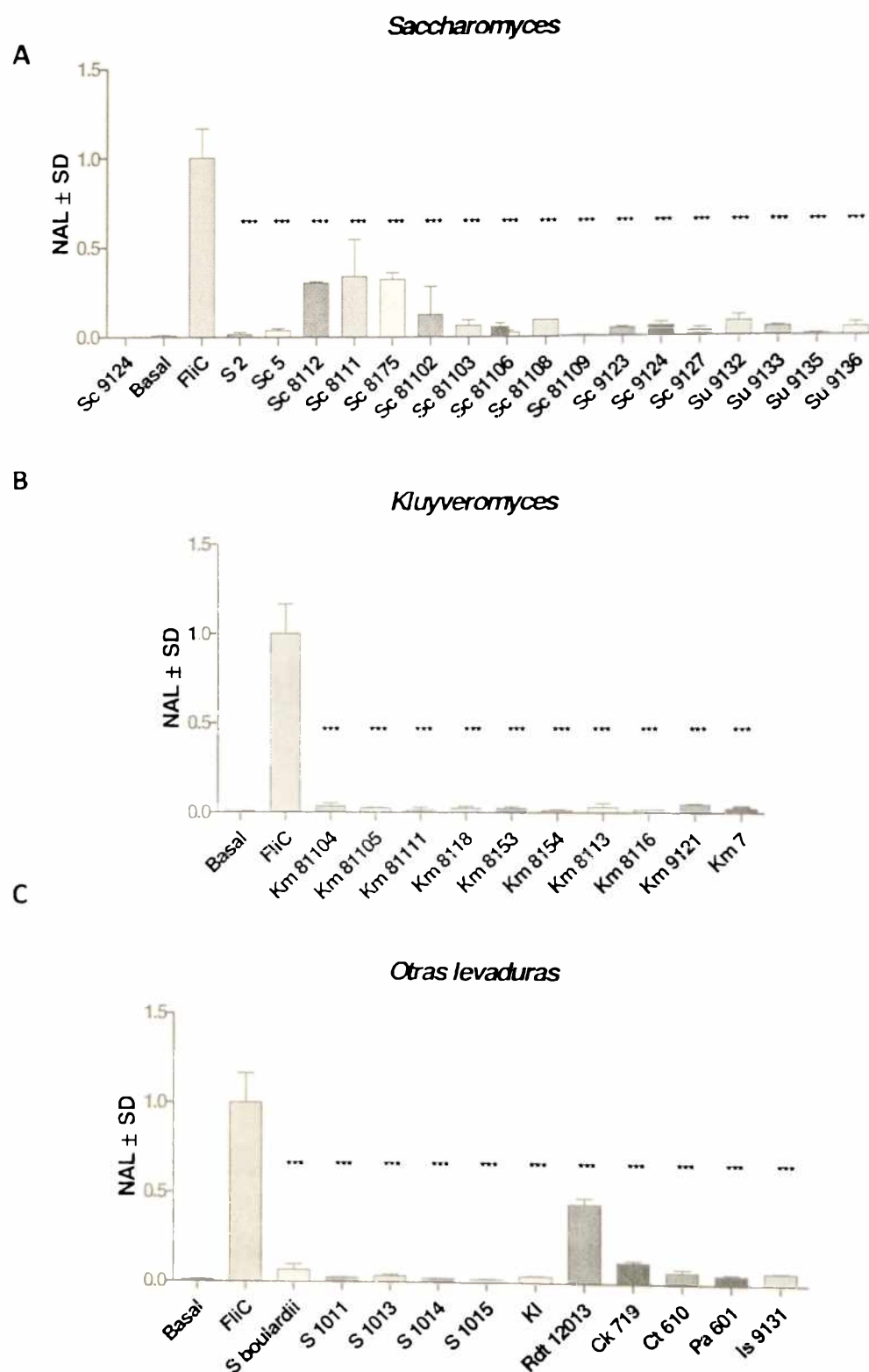


Figura 1.4 - Screening de la capacidad moduladora de la respuesta innata de levaduras. A y B aislados de kefir, C cepas de otras colecciones. S *Saccharomyces* sp. Sc *Saccharomyces cerevisiae* Su *S. unisporus* - Km *Kluyveromyces marxianus* - Is *Issatchenkia* sp. - Ck *Candida krusei* - Pa *Picchia anomala* - Rdt *Rhodotorula* sp. - Ct *Candida tropicalis*. Se muestran los promedios y el desvío estándar de al menos 3 ensayos independientes con triplicados para cada microorganismo. Diferencias significativas * p<0,1; ** p<0,05 y *** p<0,01 ANOVA + Test de Dunnet vs control FliC.

La capacidad moduladora de un microorganismo podría depender de variables como el tiempo de preincubación, la cantidad de microorganismos presentes en relación a la cantidad de células epiteliales, la equivalencia metabólica de los diferentes tipos de microorganismos, el estado metabólico del microorganismo, etc.

Para evaluar el posible efecto de estas variables, se realizaron los ensayos que se presentan en las siguientes secciones. Se seleccionó para los mismos un panel reducido de microorganismos teniendo en cuenta por un lado su capacidad moduladora y por otro las características descriptas previamente por nuestro grupo de trabajo, tales como la resistencia a bilis y al pH bajo, la supervivencia y permanencia de sus capacidades luego de diferentes procesos de conservación³⁷.

Efecto del tiempo de pre-incubación en la modulación

Se evaluó el efecto del tiempo de interacción del microorganismo con la célula epitelial previo a la estimulación con la flagelina sobre la capacidad moduladora de los mismos. Se preincubaron células reporteras Caco-ccl20:luc con los microorganismos durante diferentes tiempos, luego de los cuales se estimularon con flagelina (tiempo cero). Los resultados se muestran en la figura 1.5.

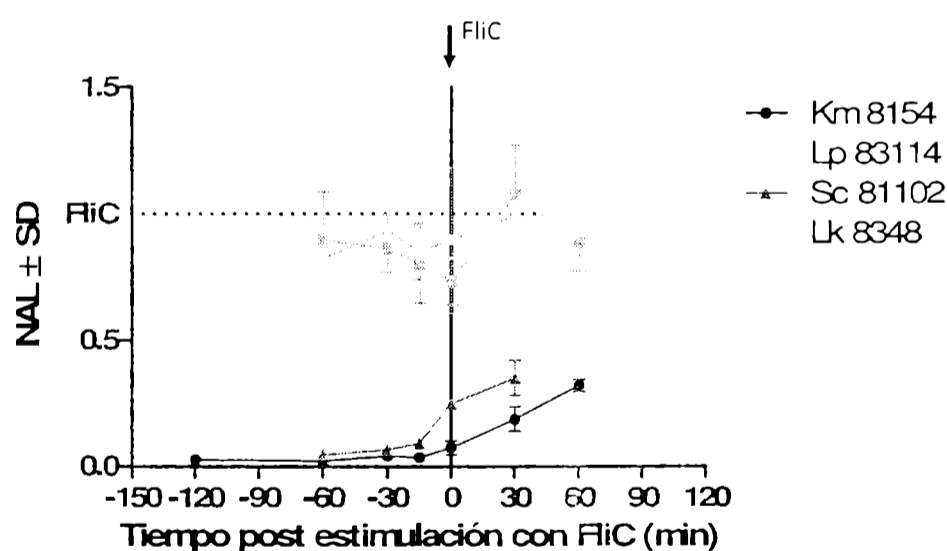


Figura 1.5 – Efecto del tiempo de preincubación con el microorganismo previo a la estimulación con flagelina (FliC) sobre el sistema reportero caco ccl20:luc. Km *Kluyveromyces marxianus* - Lp *Lactobacillus plantarum* – Sc *Saccharomyces cerevisiae* – Lk *Lactobacillus kefir*. Se muestran los resultados de al menos 2 ensayos independientes.

Se observa que las levaduras (*Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 y *Saccharomyces cerevisiae* CIDCA 81102) muestran efecto modulador incluso si se enfrentan a las células epiteliales hasta

una hora después de la estimulación con flagelina. Sin embargo el mecanismo modulador es más efectivo si el contacto entre las células epiteliales y el microorganismo se realiza previamente a la presencia del agonista proinflamatorio. La capacidad moduladora de las bacterias (*Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 y *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348) es inferior a la que demuestran las levaduras y nula cuando son agregadas luego de la flagelina.

La mejor capacidad moduladora se observa cuando las levaduras establecen un contacto previo con las células epiteliales. Esto podría indicar que, al interactuar con la levadura, la célula epitelial disminuye su respuesta a flagelina.

Efecto de la viabilidad del microorganismo en la modulación

Para evaluar el efecto de la viabilidad de los microorganismos sobre su capacidad moduladora, estos se trataron previamente con calor o radiación ultravioleta (UV). La pérdida de viabilidad de los mismos fue confirmada mediante recuento en agar YGC para las levaduras y agar MRS para las bacterias. En la figura 1.6 se observa que las levaduras tanto muertas mediante calor o radiación UV son incapaces de ejercer el efecto modulador de la respuesta disparada por flagelina en el sistema reportero. Esto indica que el mecanismo de acción requiere la viabilidad de las levaduras.

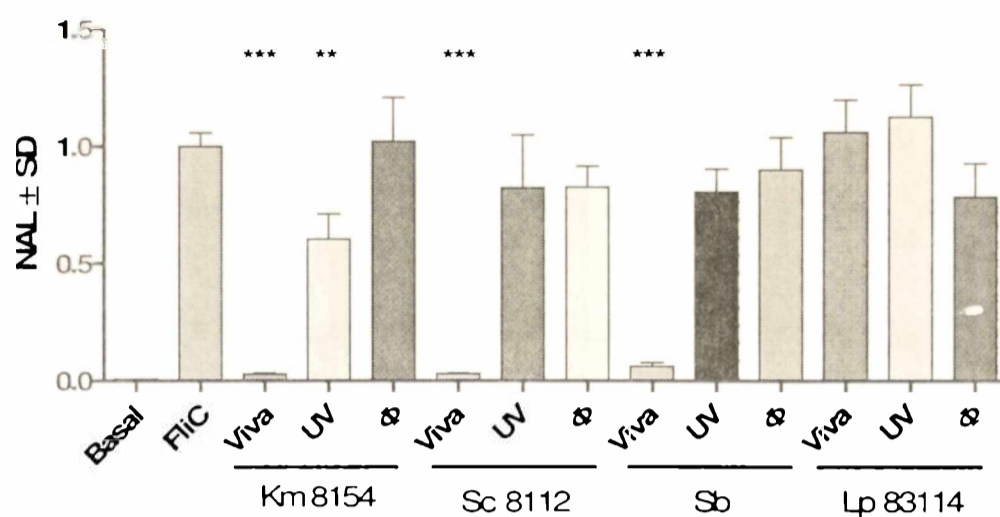


Figura 1.6 - Efecto de la viabilidad de diferentes microorganismos sobre la capacidad moduladora. Diferencias significativas ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ usando ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Km *Kluyveromyces marxianus* - Lp *Lactobacillus plantarum* - Sc *Saccharomyces cerevisiae* - Sb *Saccharomyces boulardii*. Viva: microorganismo sin tratar. UV: tratamiento de pérdida de viabilidad mediante radiación UV. Ø: tratamiento de pérdida de viabilidad mediante calor. Se muestran los datos de 3 ensayos independientes.

Efecto de la dosis de microorganismo en la modulación

Para evaluar si el efecto modulador es dependiente de la relación microorganismo-célula, se preincubaron las células Caco-ccl20:luc con concentraciones crecientes de microorganismos durante 30 minutos y luego se estimularon con flagelina. Los resultados se muestran en la figura 1.7.

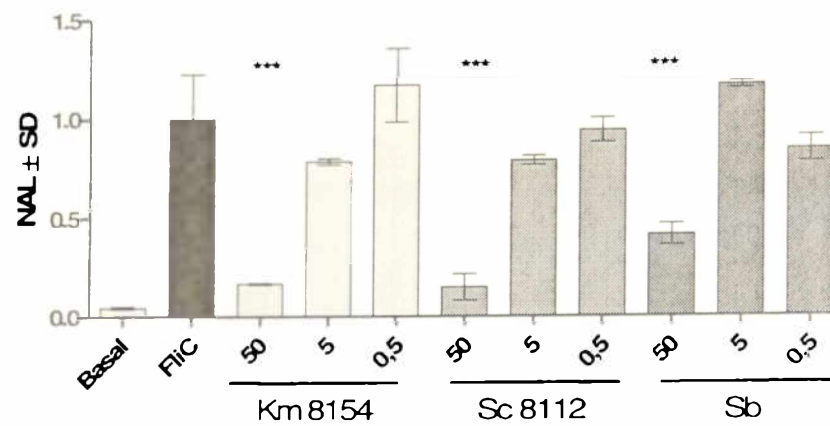


Figura 1.7 - Efecto de la dosis de diferentes levaduras sobre la capacidad moduladora. Diferencias significativas *** $p < 0,001$ usando ANOVA seguido del test de Dunnet comparando contra el control FliC. Se muestran las relaciones de multiplicidad de incubación en unidades de Levaduras/células epiteliales, 90, 5 y 0,5. Km *K. marxianus* – Sc *S. cerevisiae* – Sb *S. boulardii*. Se muestran los resultados de al menos 3 ensayos independientes.

Se observa que la relación entre levadura y célula epitelial es un factor influyente en la modulación, a menor relación levadura-célula epitelial, menor es el efecto modulador.

Para evaluar si la adherencia de los microorganismos juega un rol importante en la modulación, se realizaron ensayos donde luego de la preincubación célula epitelial-levadura, se procedió al lavado con PBS estéril previo a la estimulación con flagelina para eliminar los microorganismos no adheridos. Los resultados se muestran en la figura 1.8.

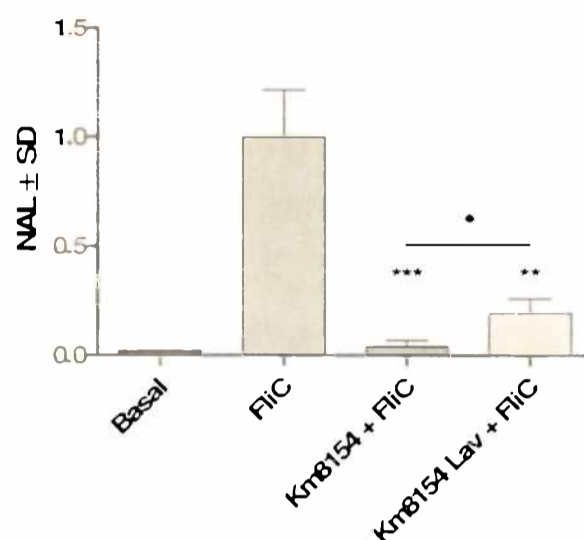


Figura 1.8 – Las levaduras adheridas son capaces de modular la respuesta disparada por flagelina. Diferencias significativas ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ con respecto al control de FliC. $p < 0,05$ prueba t de Student.

En las medidas realizadas para las células lavadas se observa una disminución significativa de la modulación (·) con respecto al control sin lavar, aunque este tratamiento no es suficiente para revertir completamente la modulación que permanece con una diferencia significativa ($P < 0,0159$ para la prueba t de Student) versus el control FliC, indicando que las levaduras que permanecen adheridas a las células epiteliales serían las principales responsables de la capacidad moduladora. La importancia de la proximidad y el contacto entre las levaduras y las células epiteliales para la modulación se ampliará y discutirá en detalle en el capítulo 2.

Discusión

Considerando como hipótesis la posible presencia de microorganismos con capacidad inmunomoduladora en el kefir, se ensayaron en un sistema reportero de inflamación intestinal basado en células epiteliales en cultivo más de 50 aislados incluyendo bacterias y levaduras. Así, como para otros lactobacilos se ha estudiado la capacidad de resistir condiciones de cultivo similares al pasaje por el tracto gastrointestinal como concentraciones altas de sales biliares o bajo pH^{24,25}, estas propiedades fueron también previamente estudiadas por nuestro grupo de trabajo para la mayoría de los microorganismos aislados de kefir utilizados^{37,38}. Mediante la estrategia

seleccionada para encontrar microorganismos con capacidad moduladora de la respuesta proinflamatoria, presentamos un enfoque original en cuanto a propiedades probióticas se refiere. De todos los microorganismos probados, es destacable la mayor capacidad moduladora que poseen las levaduras. Esta observación es interesante ya que la mayoría de los productos comerciales con agregados probióticos se basan en el uso de bacterias, por lo general ácido-lácticas.

Un análisis de las búsquedas en *Google Trends* (figura 1.9) muestra que en los últimos años, el volumen de búsquedas (en inglés) en Internet sobre levaduras probióticas está alcanzando al de bacterias. Considerando los resultados desde 2007, cuando el presente trabajo se inició, el concepto de “levaduras probióticas”, al menos como tema de búsqueda en Internet, era casi nulo, al día de hoy se está alcanzando un punto de inflexión en el estudio de este tipo de microorganismos para su potencial uso como probióticos. Sin embargo, su aplicación concreta se ve restringida a *Saccharomyces boulardii*. A pesar de que existen trabajos recientes sobre *Kluyveromyces*^{39,40} aún no ha sido descrita alguna aplicación práctica como microorganismos probióticos de levaduras de este género.

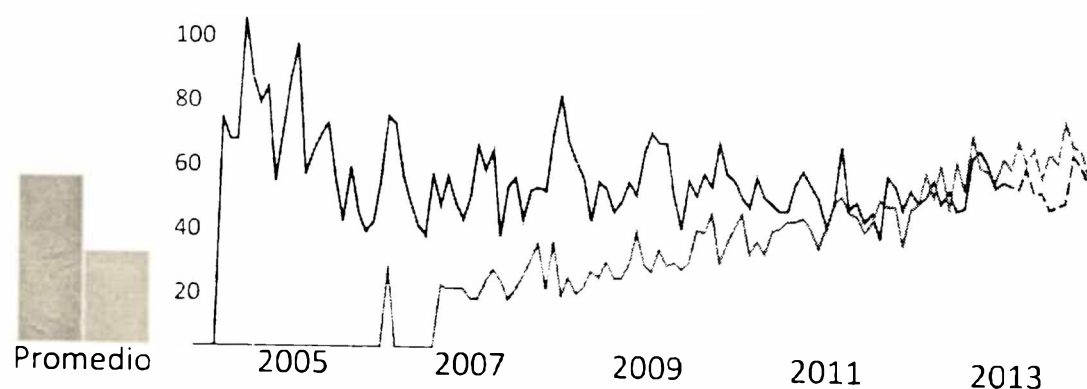


Figura 1.9 - Comparación de la tendencia de búsqueda en Google para los términos “bacterias probióticas” y “levaduras probióticas”. Se muestra el volumen de búsquedas a nivel global para el término “bacterias probióticas” (azul) y “levaduras probióticas” (rojo). El idioma de la búsqueda fue el inglés. Las líneas discontinuas indican las proyecciones a futuro. Fuente trends.google.com.

Entre los efectos descritos en bibliografía asociados al consumo de probióticos relacionados con

el sistema inmune se encuentran la inducción de producción de las citoquinas proinflamatorias IL-12, IFN- γ , IL-8. En sistemas *in vivo* se ha demostrado el aumento de la secreción de IgA en epitelio intestinal y el aumento en la expresión de TLRs⁴¹⁻⁴⁴. Estos trabajos en donde los microorganismos probióticos poseen capacidad inmunoestimuladora se contraponen parcialmente con los que describen capacidades inmunomoduladoras. Las diferencias pueden radicar en el tipo de microorganismo que se utilizó en el sistema de estudio (tipo celular, si es *in vivo* o *in vitro*, etc.), sugiriendo que se deberían diseñar tratamientos con cepas de microorganismos probióticos acordes a los mecanismos de las patologías a tratar⁴⁵.

Se ha demostrado que Ccl20 juega un rol clave en el inicio de la respuesta inflamatoria innata epitelial⁴⁶. El efecto modulador en la expresión de esta quimoquina descrito en el presente capítulo, puede tener aplicaciones en circunstancias en que la respuesta inflamatoria innata se encuentre exacerbada. Existen reportes del uso de microorganismos probióticos como estrategia para el tratamiento de alergias⁴⁷, infecciones⁴⁸⁻⁵⁰ y enfermedades inflamatorias intestinales⁵¹⁻⁵³ (IBDs por sus siglas en inglés) tales como la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. En este tipo de patologías se podría aplicar una estrategia diseñada en base a la administración de microorganismos que moderen la respuesta inflamatoria. Estos podrían actuar de manera directa sobre el epitelio intestinal o de manera indirecta mediante el reestablecimiento de la microbiota.

Si bien recientemente se ha acuñado el concepto de “paraprobiótico” o “probiótico fantasma”⁵⁴ para referirse a microorganismos inactivados, e incluso para componentes subcelulares de los mismos, con actividad beneficiosa para la salud, la definición de microorganismo probiótico implica que debe estar vivo cuando es consumido. El presente trabajo muestra concordantemente, que la viabilidad es un factor esencial para la modulación de la respuesta proinflamatoria.

Este efecto sigue un comportamiento dosis dependiente por lo que es adjudicable a la presencia del microorganismo. En este tipo de ensayos se torna más notoria la mayor capacidad moduladora observada para las levaduras, comparativamente en las dosis utilizadas, las bacterias a una densidad óptica (a 590 nm) de 1 equivalen a aproximadamente $1 \cdot 10^9$ UFC/ml mientras que las levaduras, la misma densidad óptica equivale a aproximadamente $1 \cdot 10^8$ UFC/ml.

El tiempo de preincubación necesario para una modulación eficiente, sugiere que el uso de estas levaduras para modular la respuesta inflamatoria sería más efectivo si se administrara como un

tratamiento preventivo, aunque podría actuar también una vez activada la señalización proinflamatoria.

Se ha reportado que distintas capacidades probióticas, como la adherencia a células epiteliales⁵⁵, los perfiles de citoquinas inducidos en intestino⁵⁶ entre otras^{45,57-59}, son dependientes de la cepa utilizada. En nuestro sistema de *screening* se observa una variabilidad en la capacidad moduladora entre aislados de la misma especie bacteriana, por ejemplo dos aislados de *Lactobacillus plantarum* de la colección CIDCA Lp 8324 y Lp 8323 (figura 1.3 B). Las diferencias entre cepas de una misma especie pueden deberse a cambios en los niveles de expresión de proteínas o diferencias metabólicas.

En cambio, dentro de las levaduras, a pesar de pertenecer a géneros diferentes, la variabilidad observada es menor; todas poseen una gran capacidad moduladora con algunas variaciones que no son estadísticamente significativas en los aislados de *S. cerevisiae* CIDCA 8111 y 8175. Ensayos suplementarios con levaduras de diversos orígenes (figura 1.4 C) muestran capacidades moduladoras similares sugiriendo que este fenómeno es ampliamente conservado en este tipo de microorganismos, también con una ligera diferencia en el aislado de *Rhodotorula* sp. 12013. Dada la variabilidad en las características probióticas de diferentes cepas de la misma especie, los estudios de *screening* como el que se presenta en este capítulo son de gran utilidad para la búsqueda de nuevos microorganismos de interés para la industria alimentaria.

El origen de la diferencia observada entre los microorganismos se tratará de dilucidar en el siguiente capítulo, donde se muestra el estudio de los mecanismos involucrados en la actividad moduladora de manera comparativa entre bacterias y levaduras.

Resumen de resultados y conclusiones

- Se ensayó la capacidad moduladora de 33 cepas de bacterias y 38 cepas de levaduras aisladas de kefir y de colecciones de microorganismos, utilizando un sistema reportero Ccl20- luciferasa.
- Las levaduras modulan la respuesta proinflamatoria disparada por flagelina a niveles basales, no así las bacterias, quienes tienen como máximo un 50% de modulación.
- La viabilidad es un factor esencial para el efecto modulador observado.
- La capacidad moduladora depende de la cantidad de microorganismos en relación a las células epiteliales, a mayor cantidad de microorganismos, más marcado es el efecto modulador.

Bibliografía

1. WILSON, T. H. *Intestinal absorption*. (W. B. Saunders Co., Philadelphia: London: 1962).at <<http://www.cabdirect.org/abstracts/19631403839.html;jsessionid=02120C1771C62CA17D785D631B90AF59?gitCommit=4.13.20-5-ga6ad01a>>
2. Turner, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature reviews. Immunology* **9**, 799–809 (2009).
3. Duggan, C., Gannon, J. & Walker, W. A. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *The American journal of clinical nutrition* **75**, 789–808 (2002).
4. Hardin, J., Kroeker, K., Chung, B. & Gall, D. G. Effect of proinflammatory interleukins on jejunal nutrient transport. *Gut* **47**, 184–91 (2000).
5. Wapnir, R. Regulation mechanisms of intestinal secretion: implications in nutrient absorption. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **13**, 190–199 (2002).
6. Zlotnik, A. & Yoshie, O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity* **36**, 705–16 (2012).
7. Aujla, S. J. & Kolls, J. K. IL-22: a critical mediator in mucosal host defense. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **87**, 451–4 (2009).
8. Cromer, W. E., Mathis, J. M., Granger, D. N., Chaitanya, G. V & Alexander, J. S. Role of the endothelium in inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology*: WJG **17**, 578–93 (2011).
9. Schutyser, E., Struyf, S. & Van Damme, J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **14**, 409–426 (2003).
10. Rumbo, M., Sierro, F., Debard, N., Kraehenbuhl, J.-P. & Finke, D. Lymphotoxin β receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium. *Gastroenterology* **127**, 213–223 (2004).
11. Iliev, I. D., Matteoli, G. & Rescigno, M. The yin and yang of intestinal epithelial cells in controlling dendritic cell function. *The Journal of experimental medicine* **204**, 2253–7 (2007).
12. Wael, E., Reham, A., Shanshan, L. & Yu, W. Pattern Recognition Receptors mini review. *Global Animal Science Journal* **1**, 1118–1127 (2013).
13. Poltorak, A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science (New York, N.Y.)* **282**, 2085–8 (1998).
14. Garg, A. D. *et al.* Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochimica et biophysica acta* **1805**, 53–71 (2010).
15. Erridge, C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *Journal of leukocyte biology* **87**, 989–99 (2010).
16. Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* **81**, 1–5 (2007).
17. Ramos, H. C., Rumbo, M. & Sirard, J.-C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends in Microbiology* **12**, 509–517 (2004).
18. Schmausser, B. *et al.* Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clinical and experimental immunology* **136**, 521–6 (2004).
19. Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology* **17**, 1–14 (2005).
20. Hidalgo, I. J., Raub, T. J. & Borchardt, R. T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **96**, 736–49 (1989).
21. Nempont, C. *et al.* Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)*: **1950** **181**, 2036–43 (2008).

22. Anderle, P. *et al.* Novel Markers of the Human Follicle—Associated Epithelium Identified by Genomic Profiling and Microdissection. *Gastroenterology* **129**, 321–327 (2005).
23. In-vitro Screening of antibacterial activity of lactic acid bacteria against common enteric pathogens Astha Nigam, Madhusudan HV, and Neelam Bhola Department of Microbiology, CloneGen Biotechnology(P) Ltd. *Journal of Biomedical Sciences* **1**, (2012).
24. Agaliya, P. J. & Jeevaratnam, K. Screening of Lactobacillus plantarum isolated from fermented idli batter for probiotic properties. *African Journal of Biotechnology* **11**, 12856–12864 (2012).
25. Reddy, K. B. P. K., Raghavendra, P., Kumar, B. G., Misra, M. C. & Prapulla, S. G. Screening of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Kanjika, an ayurvedic lactic acid fermented product: an in-vitro evaluation. *The Journal of general and applied microbiology* **53**, 207–13 (2007).
26. Sathyabama, S., Vijayabharathi, R., Bruntha Devi, P., Ranjith Kumar, M. & Priyadarisini, V. B. Screening for probiotic properties of strains isolated from feces of various human groups. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* **50**, 603–12 (2012).
27. Kechaou, N. *et al.* Identification of One Novel Candidate Probiotic Lactobacillus plantarum Strain Active against Influenza Virus Infection in Mice by a Large-Scale Screening. *Applied and environmental microbiology* **79**, 1491–9 (2013).
28. Huang, I.-N. *et al.* New screening methods for probiotics with adhesion properties to sialic acid and sulphate residues in human colonic mucin using the Biacore assay. *Journal of applied microbiology* **114**, 854–60 (2013).
29. Van der Aa Kühle, A., Skovgaard, K. & Jespersen, L. In vitro screening of probiotic properties of Saccharomyces cerevisiae var. boulardii and food-borne Saccharomyces cerevisiae strains. *International journal of food microbiology* **101**, 29–39 (2005).
30. Jacobsen, C. N. *et al.* Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of Lactobacillus spp . by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of Lactobacillus. *Applied and environmental microbiology* **65**, 4949–4956 (1999).
31. Zhang, Y.-C. *et al.* Screening of probiotic lactobacilli for inhibition of Shigella sonnei and the macromolecules involved in inhibition. *Anaerobe* **18**, 498–503 (2012).
32. Bao, Y. *et al.* Screening of potential probiotic properties of Lactobacillus fermentum isolated from traditional dairy products. *Food Control* **21**, 695–701 (2010).
33. Kirjavainen, P. V, Arvola, T., Salminen, S. J. & Isolauri, E. Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? *Gut* **51**, 51–5 (2002).
34. Lee, B. J. & Bak, Y.-T. Irritable bowel syndrome, gut microbiota and probiotics. *Journal of neurogastroenterology and motility* **17**, 252–66 (2011).
35. Lyra, A. *et al.* Effect of a multispecies probiotic supplement on quantity of irritable bowel syndrome-related intestinal microbial phylotypes. *BMC gastroenterology* **10**, 110 (2010).
36. D’Arienzo, R., Maurano, F., Lavermicocca, P., Ricca, E. & Rossi, M. Modulation of the immune response by probiotic strains in a mouse model of gluten sensitivity. *Cytokine* **48**, 254–9 (2009).
37. Diosma, G. Estudio y selección de levaduras con propiedades probióticas - Tesis de Maestría. 92 (2010).
38. Golowczyc, M. A. *et al.* Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic. *The Journal of Dairy Research* **75**, 211–217 (2008).
39. Romanin, D. *et al.* Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *International journal of food microbiology* **140**, 102–108 (2010).
40. Maccaferri, S., Klinder, A., Brigidi, P., Cavina, P. & Costabile, A. Potential probiotic

- Kluyveromyces marxianus B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. *Applied and environmental microbiology* **78**, 956–64 (2012).
41. Castillo, N. a, Perdigon, G. & De Moreno de Leblanc, A. Oral administration of a probiotic Lactobacillus modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in mice. *BMC microbiology* **11**, 177 (2011).
42. Kekkonen, R.-A. *et al.* Probiotic Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris and Streptococcus thermophilus induce IL-12 and IFN-gamma production. *World journal of gastroenterology*: *WJG* **14**, 1192–203 (2008).
43. Rautava, S., Arvilommi, H. & Isolauri, E. Specific probiotics in enhancing maturation of IgA responses in formula-fed infants. *Pediatric research* **60**, 221–224 (2006).
44. Hafez, M., Hayes, K., Goldrick, M., Grecis, R. K. & Roberts, I. S. The K5 capsule of Escherichia coli strain Nissle 1917 is important in stimulating expression of Toll-like receptor 5, CD14, MyD88, and TRIF together with the induction of interleukin-8 expression via the mitogen-activated protein kinase pathway in epithel. *Infection and immunity* **78**, 2153–62 (2010).
45. Mileti, E., Matteoli, G., Iliev, I. D. & Rescigno, M. Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of Lactobacilli using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy. *PloS one* **4**, e7056 (2009).
46. Sierro, F. *et al.* Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 13722–13727 (2001).
47. Niers, L. E. M. *et al.* Selection of probiotic bacteria for prevention of allergic diseases: immunomodulation of neonatal dendritic cells. *Clinical and experimental immunology* **149**, 344–52 (2007).
48. Silva, a M. *et al.* Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with Salmonella enteritidis subsp. typhimurium in conventional and gnotobiotic mice. *Journal of applied microbiology* **86**, 331–336 (1999).
49. Martins, F. S. *et al.* Interaction of Saccharomyces boulardii with Salmonella enterica serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. *PloS one* **5**, e8925 (2010).
50. Myllyluoma, E., Ahonen, a-M., Korpela, R., Vapaatalo, H. & Kankuri, E. Effects of multispecies probiotic combination on helicobacter pylori infection in vitro. *Clinical and vaccine immunology*: *CVI* **15**, 1472–82 (2008).
51. Foligné, B. Probiotic yeasts: Anti-inflammatory potential of various non-pathogenic strains in experimental colitis in mice. *World Journal of Gastroenterology* **16**, 2134 (2010).
52. Damaskos, D. & Kolios, G. Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: microflora “on the scope”. *British journal of clinical pharmacology* **65**, 453–467 (2008).
53. Lee, S. K., Kim, H. J. & Chi, S. G. Saccharomyces boulardii Reduced Intestinal Inflammation in Mice Model of 2,4,6-trinitrobenzene Sulfonic Acid Induced Colitis: Based on Microarray. *The Korean Journal of Gastroenterology* **55**, 33 (2010).
54. Taverniti, V. & Guglielmetti, S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes & nutrition* **6**, 261–74 (2011).
55. Tallon, R., Arias, S., Bressollier, P. & Urdaci, M. C. Strain- and matrix-dependent adhesion of Lactobacillus plantarum is mediated by proteinaceous bacterial compounds. *Journal of applied microbiology* **102**, 442–51 (2007).
56. Maassen, C. B. *et al.* Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered Lactobacillus strains. *Vaccine* **18**, 2613–23 (2000).
57. Sanders, M. E. Symposium: Probiotic Bacteria: Implications for Human Health

- Considerations for Use of Probiotic Bacteria to Modulate Human Health 1. 384–390 (2000).
58. Dong, H., Rowland, I. & Yaqoob, P. Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro. *British Journal of Nutrition* **108**, 459–470 (2011).
59. McFarland, L. V Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of Clostridium difficile disease. *The American journal of gastroenterology* **101**, 812–22 (2006).

Capítulo 2

Km

Est

de eulas

FIC ROS

Capítulo 2- Estudio de los mecanismos de señalización implicados en la modulación de la respuesta proinflamatoria

Introducción

Como se ha mencionado anteriormente, el epitelio intestinal coexiste con una variada gama de microorganismos que habitan en interacción directa e indirecta con el mismo, la microbiota. La interacción entre los microorganismos y las células epiteliales se manifiesta a distintos niveles, desde la señalización a través de receptores de superficie y la detección de metabolitos microbianos hasta la regulación de la expresión génica, tanto en el huésped como en el microorganismo¹⁻⁵.

Entre los receptores descritos en este tipo de interacción se encuentran los agrupados en la familia de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR), que incluye a los receptores tipo *Toll* (TLRs) y a los receptores tipo NOD (NLRs por las siglas en inglés de Dominio de Oligomerización de Nucleótidos) que reconocen componentes de la pared de microorganismos como N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico.

La señalización a través de los TLRs y NLRs converge en factores de transcripción comunes a ambas vías, uno de los más importantes es el NF- κ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)⁶⁻¹⁰. En el capítulo 1 se describió la señalización mediante esta vía para el receptor de flagelina, TLR5, sin embargo la familia de factores de transcripción NF- κ B participa en distintos eventos de señalización celular mediante un gran red de genes regulados por los mismos¹¹⁻¹³. En la figura 2.1 se muestra un esquema de esta vía. Entre los procesos celulares más destacables en que estos factores de transcripción se involucran, se encuentran el de la supervivencia celular y la inmunidad, tanto innata como adquirida¹⁴⁻¹⁶.

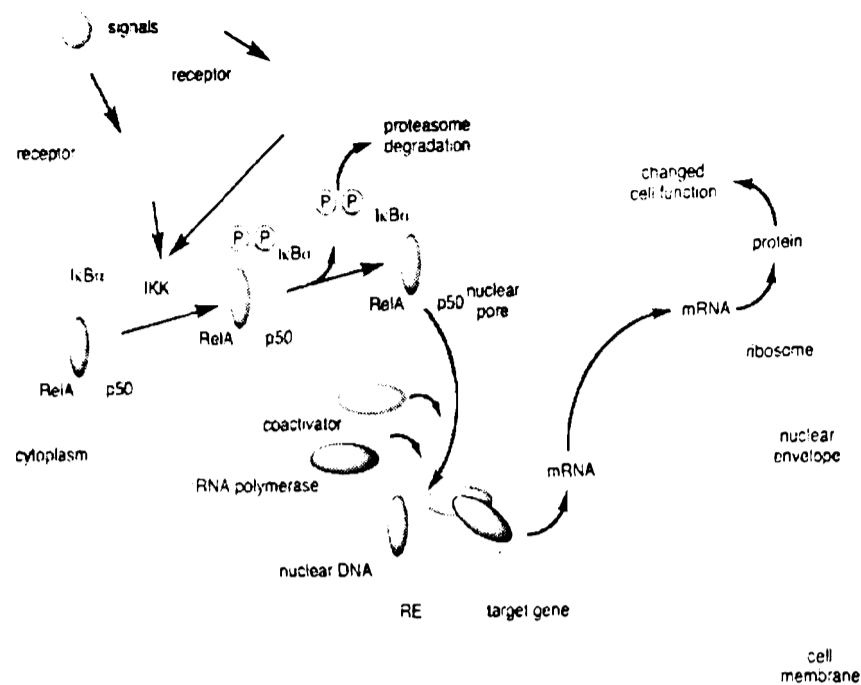


Figura 2.1 - Señalización a través de la vía de NF-κB – La familia de factores de transcripción NF-κB actúa como vínculo entre diversos tipos de receptores en la membrana plasmática. Tienen en común una cascada de fosforilaciones que llevan a la fosforilación y ubiquitinación del inhibidor IκB. Una vez degradado el inhibidor, se produce la traslocación al núcleo del factor de transcripción conformado por dímeros y la consiguiente expresión de genes como respuesta al estímulo. Los factores de transcripción de la familia de NF-κB están conformados por dímeros, en este caso se muestra el heterodímero RelA-p50, las combinaciones de monómeros dependen del tipo celular y las vías de señalización activadas y tienen diferencias de afinidad por distintos promotores, variando la respuesta de expresión génica con los estímulos. Imagen de dominio público creada por Boghog2.

La variedad de respuestas que se pueden generar se debe en parte a la conformación de los promotores de los diferentes genes de respuesta y su afinidad por los diferentes factores de transcripción, la posibilidad que tienen los factores de la familia NF-κB de formar distintas combinaciones de heterodímeros y la señalización coordinada con otras vías como las de MAPKinasas^{12,17,18}.

Las fallas en la regulación de estas vías de señalización han sido asociadas con el desarrollo tumoral^{19,20}, enfermedades asociadas a la longevidad^{14,21} y, de mayor interés para el presente trabajo, enfermedades inflamatorias como las alergias²², psoriasis²³ y enfermedades inflamatorias intestinales²⁴. Dado el papel clave que esta vía juega en la respuesta proinflamatoria han surgido estrategias basadas en el bloqueo de la misma para el tratamiento de patologías en las que el componente inflamatorio tiene un rol clave¹⁸.

Los microorganismos comensales que se encuentran en el lumen intestinal son reconocidos por el sistema inmune del huésped y podrían desencadenar respuestas efectoras inflamatorias, sin

embargo en condiciones normales existe un estado de homeostasis en donde no hay respuesta inmune contra los microorganismos. Este estado es generado a partir de la modulación de la expresión génica, tanto en la célula epitelial como en la bacteriana.

El sistema inmune no posee receptores específicos para comensales, las respuestas se articulan en base a la integración de múltiples señales. En los últimos años se han comenzado a describir distintos circuitos moleculares que participan en la interacción huésped-comensal. Una forma de interacción descrita recientemente es que ciertas bacterias, en especial del género *Lactobacillus*, son capaces de inducir en las células del epitelio intestinal la producción de especies reactivas de oxígeno tales como H_2O_2 o el radical superóxido²⁵. Las funciones de estas moléculas en la respuesta innata se hallan muy conservadas evolutivamente. La función más estudiada de las especies reactivas de oxígeno es la efectora, habiéndose descrito la producción de H_2O_2 como respuesta a agentes nocivos en organismos tan distantes como plantas y vertebrados superiores. Un ejemplo clásico de la producción de ROS como mecanismo efector es en macrófagos²⁶. Las ROS participan también en procesos de cicatrización de tejidos^{22,27} y principalmente en la señalización intracelular. En el epitelio intestinal, se ha descrito recientemente que las bacterias comensales o los productos de fermentación que las mismas generan, son capaces de bloquear las vías proinflamatorias dependientes de NF- κ B mediante la inhibición de la ubiquitinación del inhibidor I κ B, molécula que mantiene al factor de transcripción secuestrado en el citoplasma²⁸⁻³⁰. En el esquema de la figura 2.2 se muestra una posible vía de señalización descrita.

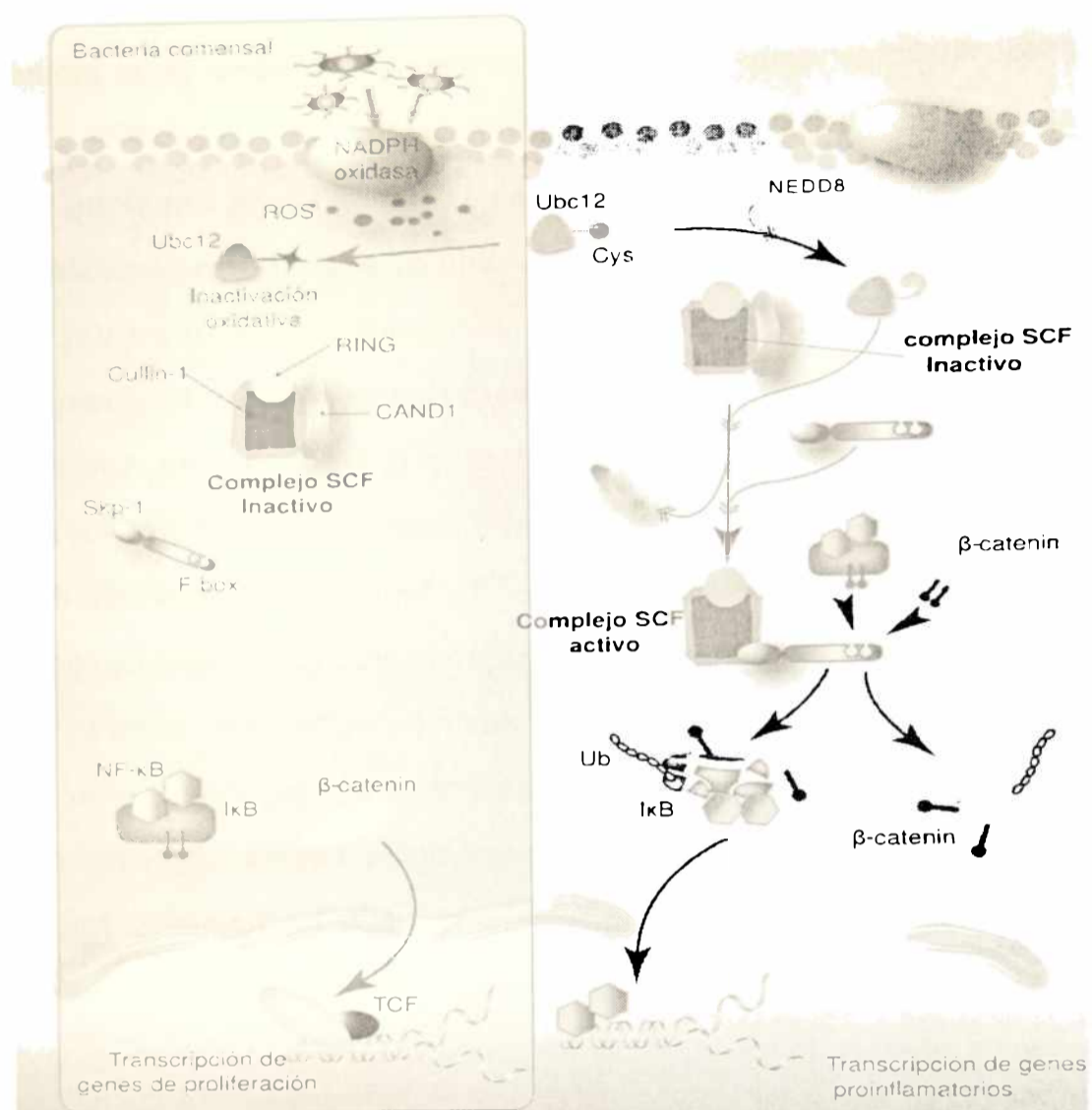


Figura 2.2 - Modelo propuesto para la modulación de la respuesta proinflamatoria mediada por especies reactivas de oxígeno. Adaptado de Lee 2008, *Bacterial-Modulated Signaling Pathways in Gut Homeostasis*, DOI: 10.1126/stke.121pe24.

La ubiquitinación de IκB es llevada a cabo por un complejo multienzimático llamado SCF-ligasa (de las siglas de sus componentes en inglés *E3 Skp1, Cullin1, F-box protein (SCF)-ligase complex*). El correcto ensamblado del complejo, depende de 3 componentes: E1 enzima de activación (responsable de la Neddylación de Ubc12, no mostrado en la figura), E2 enzima de conjugación (Ubc12 en la figura) y E3 ligasa (complejo SCF en la figura), lo que lleva a una cascada de tres pasos que terminan en la adición de ubiquitina a residuos laterales de lisina de la proteína sustrato. Además, la activación del complejo E3 SCF-ligasa depende de la modificación covalente, similar a la ubiquitinación, mediante la adición a la proteína Cul-1 (*Cullin-1*) de NEDD8 (*Neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated 8*) una proteína originalmente descrita como involucrada en el crecimiento, desarrollo y viabilidad celular³¹. La presencia de especies reactivas de oxígeno endógenas, inhiben la cascada de *neddilación* (adición de NEDD8) evitando la

formación del complejo, estabilizando a I κ B y por ende a NF- κ B en el citosol³².

Neish y colaboradores han descrito que la inducción de la producción de ROS en células de epitelio intestinal, no sólo son inducidas por bacterias comensales, lactobacilos²⁵ y productos de fermentación²⁸, sino que en trabajos posteriores han profundizado el estudio mecanístico del fenómeno, encontrando como una de las moléculas de reconocimiento de las bacterias comensales al receptor de péptidos formilados^{33,34}. Esta serie de trabajos es hasta la fecha, el estudio más detallado de los mecanismos de modulación de la señalización en la interacción entre las bacterias ácido-lácticas reconocidas comúnmente como probióticos y el epitelio intestinal, sin embargo, los estudios sobre los mecanismos en levaduras son más reducidos.

Se ha descrito que *Saccharomyces boulardii*, produce un factor hidrosoluble y termoestable de bajo peso molecular (< 1kDa) que disminuye la expresión de IL-8 a nivel transcripcional en células de epitelio intestinal HT29 estimuladas con IL-1 β ³⁵. Otros trabajos describen que los mananos derivados de la pared de *Saccharomyces* son capaces de modular la respuesta inflamatoria en modelos *in vivo* de infección^{36,37}.

Como se presentó en el capítulo anterior, la capacidad moduladora de la respuesta proinflamatoria de las levaduras es muy superior a la de las bacterias probadas.

El objetivo del presente capítulo es estudiar de manera comparativa entre bacterias y levaduras los mecanismos de interacción microorganismo-célula epitelial profundizando el estudio sobre las levaduras, particularmente *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154.

Resultados

Estudio de la presencia de factores solubles de modulación

Se ha descrito que diversos microorganismos probióticos, entre ellos *Saccharomyces boulardii* son capaces de liberar factores solubles como forma de interacción con el epitelio³⁵. Para estudiar si el efecto modulador que ejercen los microorganismos aislados de kefir es dependiente de este tipo de factores se plantearon dos aproximaciones. Por un lado estudiar la capacidad moduladora de sobrenadantes libres de microorganismos resultantes del cultivo de los microorganismos, o del co-cultivo de los microorganismos con células epiteliales y por otro lado el estudio de la modulación en un sistema de cultivo de células epiteliales polarizado (*transwells*), en donde se pueden separar los compartimientos apical y basolateral (Figura 2.3) de las células y evaluar la necesidad de contacto entre los microorganismos y las células epiteliales.

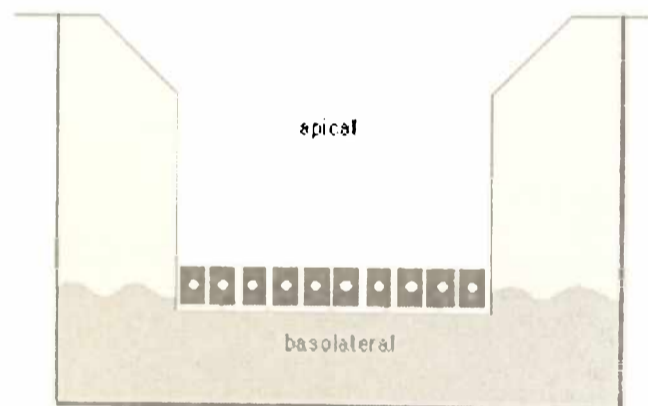


Figura 2.3 - Esquema del sistema "Transwell" para la separación de los compartimientos basolateral y apical. Adaptado de Lipschutz et al 2001 *Current Protocols*.

En la figura 2.4A se muestran los resultados correspondientes a la preincubación de células reporteras Caco-ccl20:luc con sobrenadantes de cultivo de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 en presencia (w/caco) o en ausencia (w/o caco) de células epiteliales. Se puede apreciar que no existe ningún componente presente en el medio de cultivo capaz de modular la respuesta pro-inflamatoria inducida por flagelina.

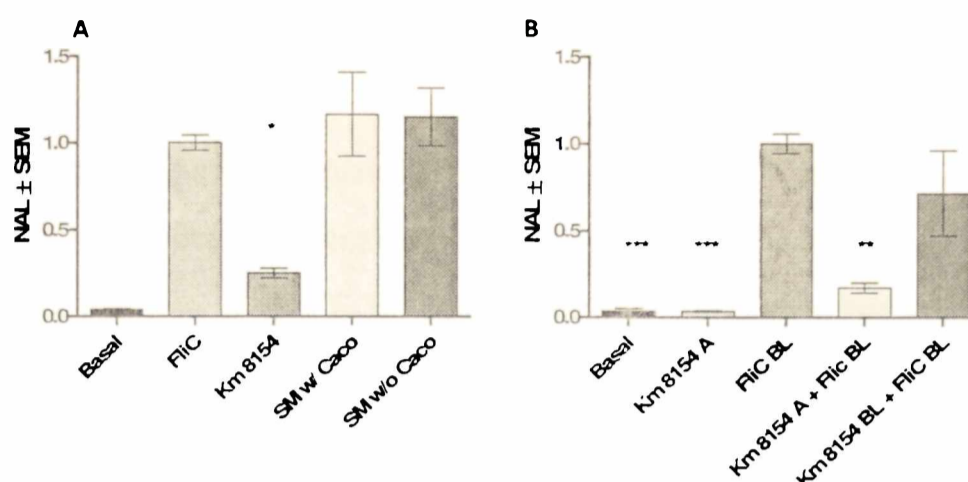


Figura 2.4- Estudio de la presencia de factores solubles de modulación. **A** efecto de la utilización de sobrenadantes de cultivo (SM) de Km 8154 generados en presencia (w/Caco) o en ausencia (w/o Caco) de células epiteliales. **B** Efecto de la incubación con Km 8154 en la cara apical (A) o en la basolateral (BL) previo a la estimulación con FliC en el compartimento basolateral. Diferencias significativas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$) ANOVA seguido de la prueba de Dunnett comparado contra el control FliC. Se muestran los resultados de al menos 3 ensayos independientes con triplicados cada uno.

En los epitelios, muchas de las interacciones microorganismo-huésped se realizan mediante interacción directa entre un ligando y un receptor, ambos expuestos en los dos organismos.

Para evaluar la necesidad de contacto entre el microorganismo y las células epiteliales, se preincubaron células reporteras caco-ccl20:luc con la levadura *K. marxianus* CIDCA 8154 en la región apical o en la basolateral durante 30 minutos y luego se estimularon las células con flagelina en la región basolateral. En la figura 2.4B se muestran los resultados de la actividad luciferasa 5 horas después de la estimulación. Cuando la levadura y las células epiteliales se hallan en contacto directo por la cara apical de estas últimas, el efecto modulador es marcado. En esta condición, es de resaltar la completa separación física entre los microorganismos y la flagelina, descartando una posible interacción entre los mismos como mecanismo de disminución de la respuesta proinflamatoria en el sistema. La incubación con la levadura en la cara basolateral, sin contacto directo con las células epiteliales, no es suficiente para generar un efecto modulador y, en concordancia con lo demostrado con los sobrenadantes de cultivo, permite descartar la presencia de un factor soluble producido por la levadura como responsable del efecto.

Modulación de la respuesta proinflamatoria de diversos genes provocada por diferentes agonistas

Para estudiar cuáles de los mecanismos de señalización están implicados en el efecto inmunomodulatorio de las levaduras se generaron diversas situaciones pro-inflamatorias en el entorno celular mediante el uso de diferentes agonistas de la respuesta inmune. En esas condiciones se evaluó la respuesta de las células mediante la medida de los niveles de ARNm en las células epiteliales. Los genes seleccionados para la caracterización de la respuesta fueron Ccl20, quimioattractante de linfocitos y células dendríticas a través del epitelio³⁸; Cxcl2, quimioattractante de neutrófilos y monocitos³⁹; Cxcl8 conocida también como IL-8, quimioattractante de neutrófilos^{40,41} y Cx3cl1, quimioattractante de linfocitos T y monocitos⁴²; todos estos genes son inducidos frente a estímulos proinflamatorios⁴³. En la figura 2.5 se observa que la expresión de los ARN mensajeros de las quimoquinas CCL20, CXCL2 y CXCL8 se ven aumentadas al menos 100 veces con respecto a la condición basal por la estimulación con flagelina y que esta respuesta se ve disminuida cuando las células epiteliales son previamente incubadas con la levadura *K marxianus* CIDCA 8154. La variabilidad experimental en la medida de los niveles de ARN mensajero de CX3CL1 no permite observar una diferencia significativa en la modulación ejercida por la levadura, sin embargo existe una tendencia de comportamiento similar al observado para las demás citoquinas. Se observa un efecto similar al estimular las células con otros inductores diferentes como lo son IL-1 β o TNF- α .

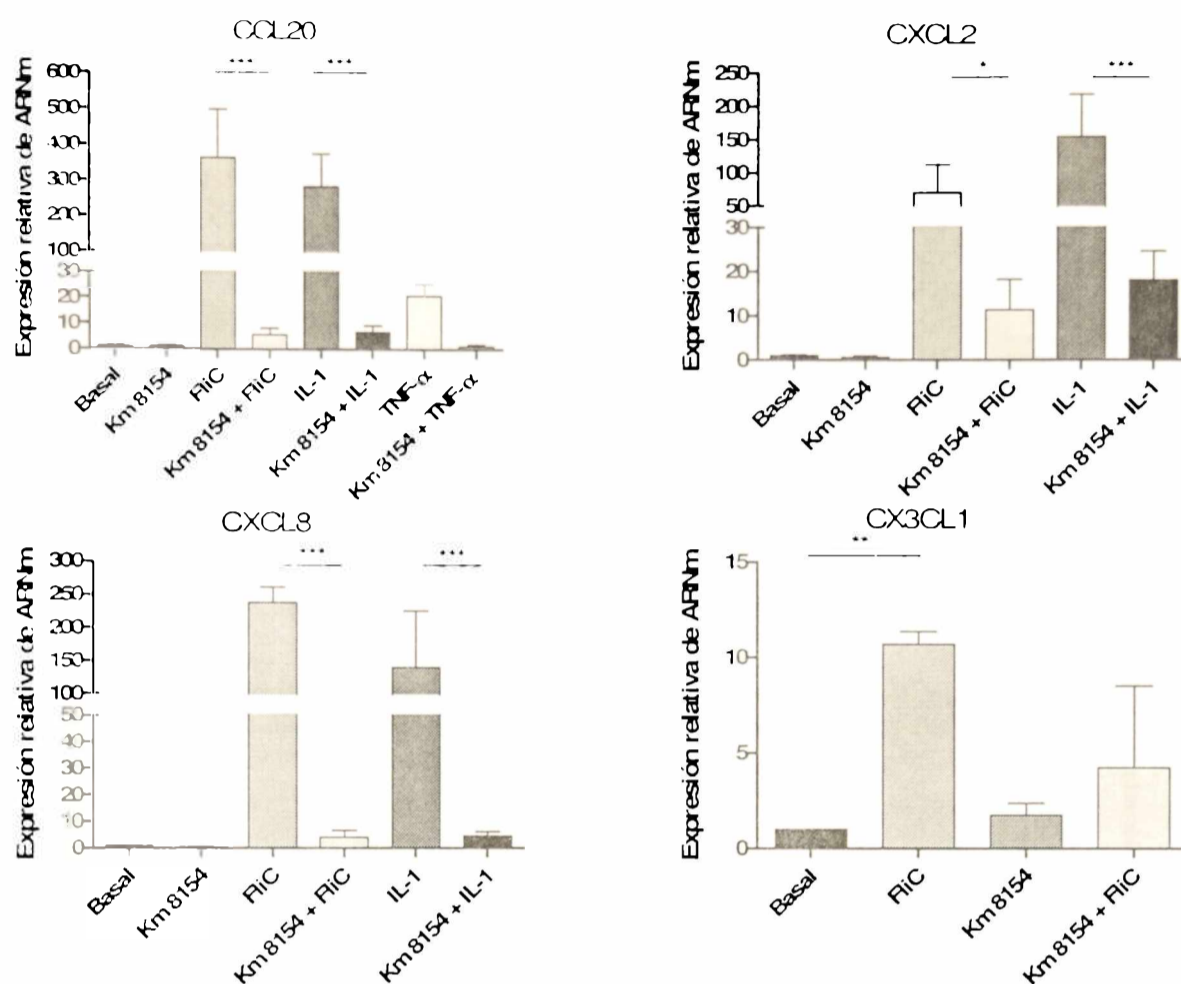


Figura 2.5 – Niveles transcripcionales de los genes proinflamatorios CCL20, CXCL2, CXCL8 y CX3CL1 en células de epitelio intestinal y el efecto de la preincubación de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 sobre los mismos. Diferencias significativas * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ANOVA + test de comparaciones múltiples de Bonferroni para las columnas indicadas. En todos los casos los valores son relativos a la condición basal, la que por definición toma el valor promedio de 1. Se muestran los valores promedio de expresión \pm error estándar de al menos 2 ensayos independientes por triplicado.

Para estudiar si el efecto de la levadura sobre las células epiteliales se debe a una regulación específica de genes responsables de la función inmunológica de los enterocitos, se evaluó el efecto de los microorganismos sobre la expresión de genes de otras funciones no inmunológicas, habitualmente expresadas en enterocitos, tales como CDX2, una proteína involucrada en el proceso de diferenciación celular; LPH (*Lactase Phlorizin Hydrolase*), un enzima involucrada en la función digestiva de los enterocitos; ITF (*Intestinal Trefoil Factor*), que participa en la reparación del epitelio intestinal y MIF, una quimocina constitutiva. La expresión de ninguno de estos genes se ve modificada de manera significativa ya sea por efecto de la preincubación de las células epiteliales con las levaduras, la estimulación con flagelina o la combinación de ambas (figura 2.6).

En ningún caso se observaron cambios en los niveles de expresión de β -actina, el gen utilizado como referencia.

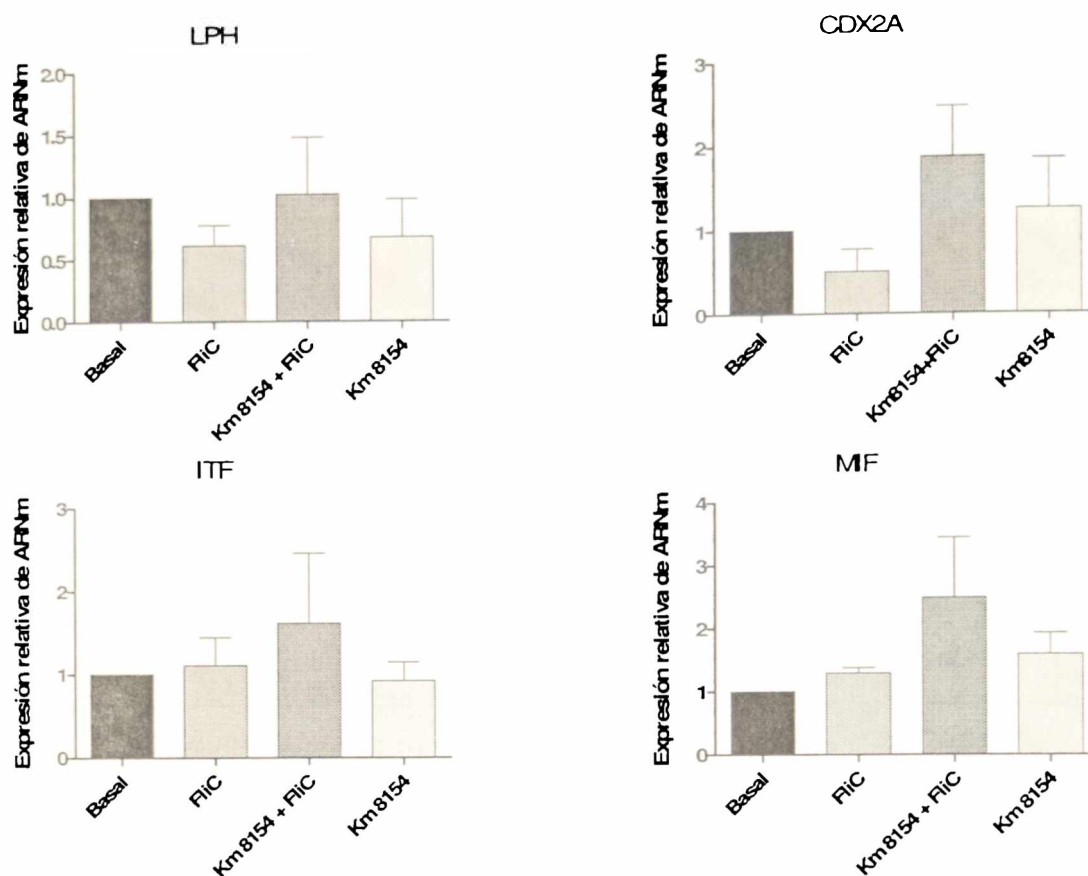


Figura 2.6 – Niveles de expresión relativa de ARN mensajero de funciones no relacionadas directamente con la respuesta inmune de enterocitos. Resultados representativos de 2 experimentos independientes. Se muestra el valor promedio \pm error estándar.

Estos resultados indican que el efecto modulador de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 es específico para la respuesta inmune innata.

Para elucidar si el efecto modulador observado es específico de la respuesta inducida por flagelina se estimularon las células con diferentes agonistas pro-inflamatorios, tales como IL-1, en cultivos celulares de la línea Caco-2 y para la línea celular HT29, también de epitelio intestinal, lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) y se midieron los niveles de ARNm de Ccl20 mediante qPCR. La pre-incubación con la levadura disminuyó significativamente en todos los casos la expresión de Ccl20 a nivel transcripcional (figura 2.7), indicando que el efecto observado se produce mediante un mecanismo de acción enfocado en algún punto compartido entre las vías de señalización de los agonistas utilizados.

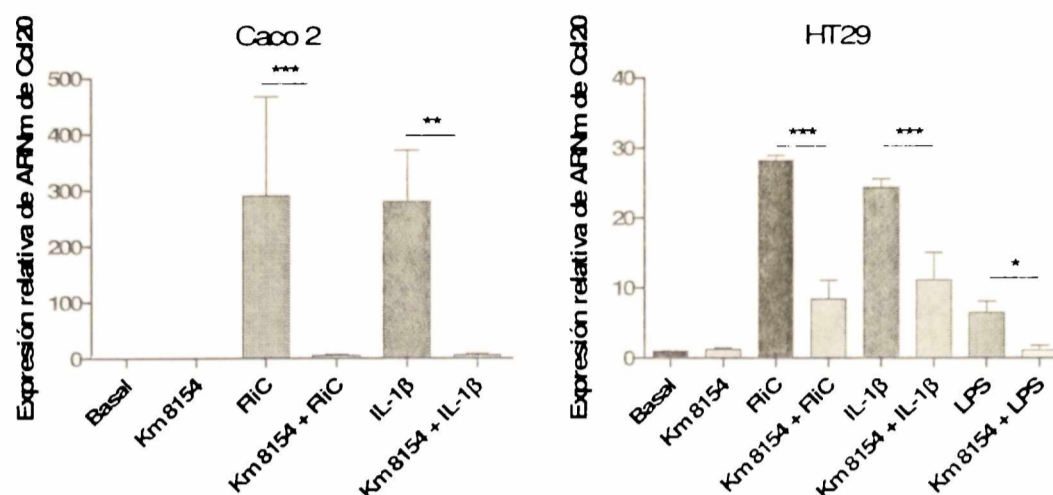


Figura 2.7 – Expresión de ARNm de Ccl20 en líneas celulares de epitelio intestinal Caco 2 y HT29 frente a distintos estímulos. Diferencia significativa * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ ANOVA + test de Bonferroni para las columnas seleccionadas. Se muestran los valores promedio \pm error estándar de 2 ensayos independientes por triplicado.

Los receptores TLR4 (receptor de LPS), TLR5 (flagelina) e IL-1 poseen un dominio tirosina kinasa y comparten gran parte de los efectores y segundos mensajeros en sus vías de transducción de señales. La mayoría de estas vías convergen hacia la cascada de fosforilaciones que incluyen a MyD88, IRAK e IKK, que conllevan a la fosforilación y ulterior ubiquitinación y degradación proteasómica de I κ B, que retiene en el citoplasma al factor de transcripción NF- κ B, perteneciente a la familia Rel-A de factores de transcripción. Los resultados obtenidos en los ensayos con diferentes estímulos indican que esta vía podría estar implicada en el efecto modulador.

Estudio de las vías intracelulares de señalización implicadas en el efecto modulador de la respuesta innata

Para evaluar si la vía de NF- κ B está involucrada en señalización se generaron células Caco 2 reporteras mediante transfección transiente con liposomas utilizando dos construcciones, la primera con el gen reportero luciferasa de luciérnaga bajo el dominio del promotor 3kB, un promotor artificial que posee tres sitios de unión a NF- κ B en tándem; la segunda construcción consiste en el gen reportero luciferasa de *Renilla* spp. bajo el dominio del promotor constitutivo Timidina quinasa de herpesvirus (HSV-Tk). Este sistema reportero generado, permite evaluar la

unión del factor de transcripción NF-kB y a su vez provee de una herramienta para normalizar las medidas de acuerdo al éxito de transfección en cada fosa de cultivo.

En la figura 2.7 se puede apreciar que la estimulación de las células por flagelina conlleva a un aumento significativo de la actividad relativa de luciferasa de luciérnaga (dependiente de NF-kB) y que la preincubación con *K marxianus* CIDCA 8154 conlleva a una modulación de esta respuesta tal y como se había observado en otros sistemas. Esto permite concluir que la vía de NF-kB es modulada por acción de la levadura.

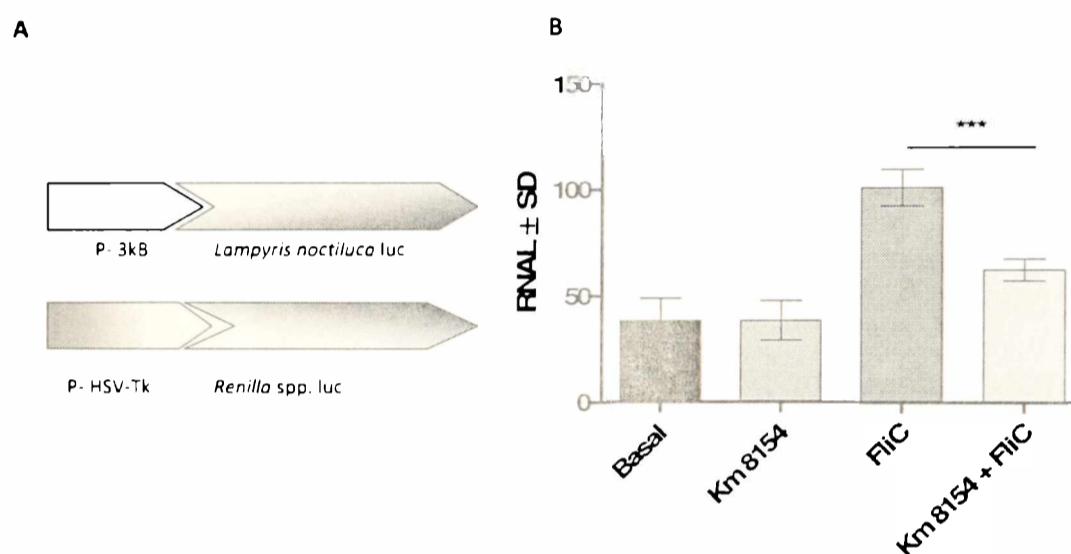


Figura 2.8 – Sistema reportero 3kB:luc. (A) Esquema de las construcciones utilizadas para la transfección de la línea celular de epitelio intestinal. (B) Valores de luciferasa relativos (Lnluc/Rluc) en células transfectadas. Diferencia significativa *** $p < 0.001$ utilizando la prueba t de Student. Se muestran los resultados de al menos 3 ensayos independientes por triplicado.

La disminución de la unión del factor de transcripción NF-kB a su promotor en el núcleo observada podría explicarse mediante diferentes procesos. Uno de ellos podría ser que se impida la fosforilación o la ubiquitinación del inhibidor I-kB, estabilizando a p65 en el citoplasma.

Para evaluar esta hipótesis se realizaron ensayos de localización nuclear de NF-kB por inmunofluorescencia.

Estudio de la localización celular de NF-kB (p65) mediante inmunofluorescencia

Se estudió la localización celular del factor de transcripción NF-kB mediante inmunofluorescencia empleando un anticuerpo específico contra p65 conjugado con el fluoróforo FITC. Como colorante

de núcleos se utilizó Ioduro de propidio (IP). Se puede apreciar la traslocación al núcleo de NF- κ B cuando las células son estimuladas con flagelina durante 45 minutos. En la figura 2.9 se observa que la preincubación con la levadura genera un patrón de localización de p65 similar al del estado basal, predominando la ubicación citoplasmática del factor de transcripción, aunque la cuantificación de este fenómeno no resultó estadísticamente significativa. El estudio de colocalización de fluorescencia podría completarse mediante la utilización de microscopía confocal, técnica que permite una mejor compartimentalización de las intensidades de fluorescencia que la microscopía de epifluorescencia.

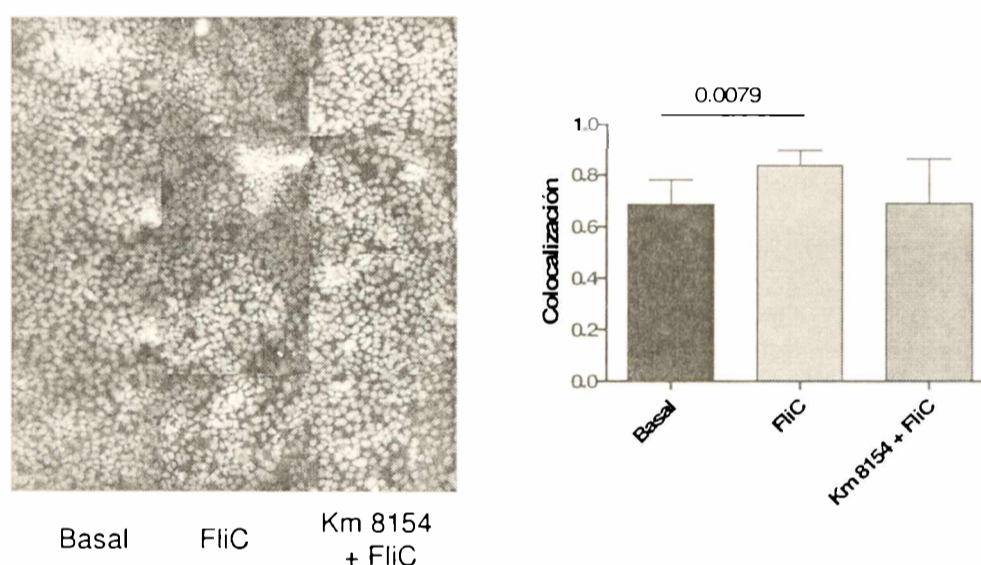


Figura 2.9 – Traslocación de NF- κ B al núcleo mediante inmunofluorescencia. En rojo se tiñeron los núcleos con Ioduro de propidio, en verde se utilizó un anticuerpo anti p65-FITC. A la derecha se muestra una semicuantificación de la colocalización nuclear de FITC-IP. Diferencia significativa test de Mann-Whitney. Las imágenes son representativas de 2 ensayos independientes con captura de 5 campos por condición en cada uno.

Estudio de la interrelación entre las vías de NF- κ B, MAPK y STAT3

Las vías de señalización de NF- κ B (del inglés *Nuclear Factor Kappa B*) y de MAPKs (del inglés *Mitogen Activated Protein Kinase*) se encuentran relacionadas de manera que se regulan mutuamente y son capaces de establecer un amplio rango de respuestas frente a diferentes estímulos. Las moléculas principales de estas vías interactúan de manera sinérgica frente a estímulos proinflamatorios⁴⁴. Para evaluar si la levadura *K. marxianus* CIDCA 8154 ejerce su efecto

modulador de manera dependiente de la interacción entre estas vías se realizaron ensayos utilizando inhibidores farmacológicos específicos de las diferentes moléculas de las cascadas, tales como Sulfasalazina para la vía de p65, SB203580 para p38 MAPK, S3I-201 para Stat3 y U0126 para erk1/2.

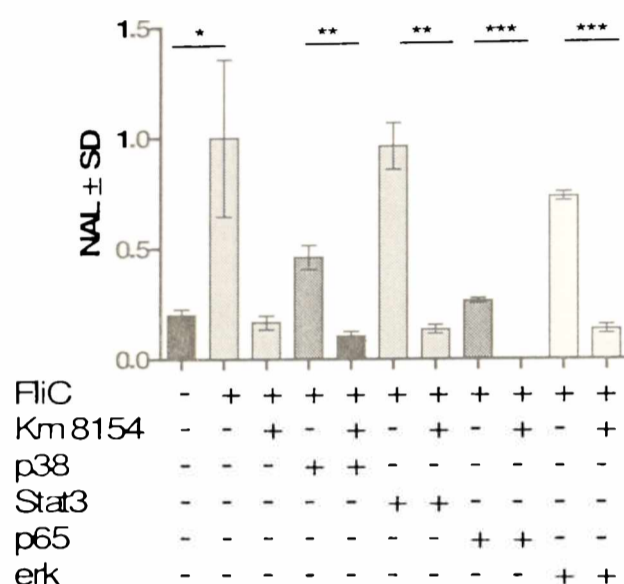


Figura 2.10 – Efecto de inhibidores farmacológicos de las vías de MAPKinasas y NF-kB sobre la modulación de la respuesta proinflamatoria disparada por flagelina. Diferencia significativa *p<0,05, ** p<0.01 y ***p<0,001, ANOVA + test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Inhibidores: p65 sulfasalazina, p38 sb203580, Stat3 (S3I-201), erk1/2 (U0126)

Se puede observar en las figura 2.10 que independientemente de la vía inhibida, *K. marxianus* CIDCA 8154 es capaz de modular la respuesta proinflamatoria. Se observa además un efecto sinérgico en la modulación cuando se utilizan inhibidores específicos para las vías de p38 y p65. Se ha descrito que la vía de MAPK está involucrada en la activación de la vía de NF-kB p65⁴⁵. Se puede inferir a partir de estos resultados que la inhibición de las vías de NF-kB mediada por la levadura es independiente de la activación de las otras cascadas.

Estabilidad de plkB en fracción citoplasmática de lisados de Caco2

Se ha descrito que ciertos lactobacilos utilizados como probióticos son capaces de estabilizar a NF-kB en el citoplasma mediante la inhibición de la ubiquitinación de del inhibidor IκB fosforilado.

Para evaluar la estabilidad de pIKB en células epiteliales, se realizaron ensayos de *western-blot*. Células Caco 2 fueron pre-incubadas con un lactobacilo de control (*Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114) y la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 y estimuladas con flagelina. Para el revelado se utilizaron anticuerpos específicos para pIKB y β -actina como normalizador.

En la figura 2.11 se puede observar que la preincubación con el *L. plantarum* CIDCA 83114 produce un aumento aparente en la estabilidad de pIKB en extractos citoplasmáticos, no así cuando se preincuba con la levadura. Este hecho podría sugerir diferentes mecanismos de señalización entre las especies, sin embargo, el elevado nivel basal de activación de la vía (las Caco 2, como la mayoría de las líneas celulares son tumorales) no permite realizar una afirmación concluyente al respecto.

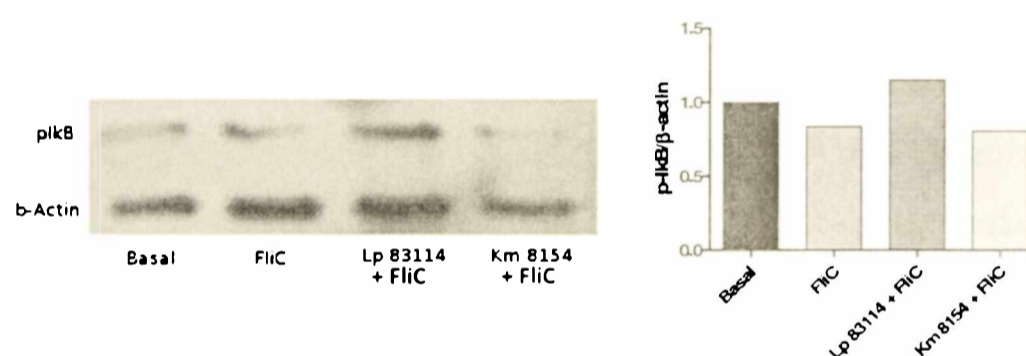


Figura 2.11 – Ensayo de *Western blot* para la detección de pIKB en extractos citoplasmáticos de células de epitelio intestinal Caco2. Como control de carga se utilizó β -Actina. A la derecha se muestra una cuantificación relativa de las intensidades de las bandas. La lisis celular se llevó a cabo luego de 30 minutos de estímulo con flagelina.

Modulación de la respuesta innata epitelial mediante la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Kumar y colaboradores^{27,30,46,47} han descrito que ciertas especies de bacterias ácido lácticas o sus productos metabólicos, en particular ácidos grasos de cadena corta como el butírico, inducen en las células epiteliales la generación de ROS, que son capaces de inhibir la ubiquitinación de I κ B,

estabilizando en el citosol a NF- κ B³². En la introducción del presente capítulo se mostró un esquema adaptado de uno de sus trabajos en donde se explica el mecanismo propuesto. El aumento de plkB en el citoplasma en las células preincubadas con el lactobacilo podría explicarse mediante la inhibición de la maquinaria de ubiquitinación/degradación de I κ B mediada por la inducción de la generación de especies reactivas de oxígeno endógenas en las células epiteliales.

Para evaluar la capacidad de producción de ROS de los distintos microorganismos se realizaron ensayos de fluorescencia con un colorante sensible a la presencia de ROS en las células epiteliales, el 5,6-diclorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato acetil ester (DCFDA).

Previamente se realizó una puesta a punto del sistema de detección de ROS, utilizando distintos controles positivos como H₂O₂ exógena o ácido butírico. Los resultados se muestran en la figura 2.12. La presencia de ácido butírico, un producto común del metabolismo de ciertas bacterias comensales induce la producción de ROS en las células epiteliales. La adición de peróxido de hidrógeno exógeno también induce la fluorescencia. La cuantificación de la intensidad de la fluorescencia puede hacerse mediante métodos informáticos de análisis de imágenes. En particular, para estos ensayos se desarrolló un método de cuantificación de fluorescencia, cuyo desarrollo y optimización se describen en el anexo de este trabajo.

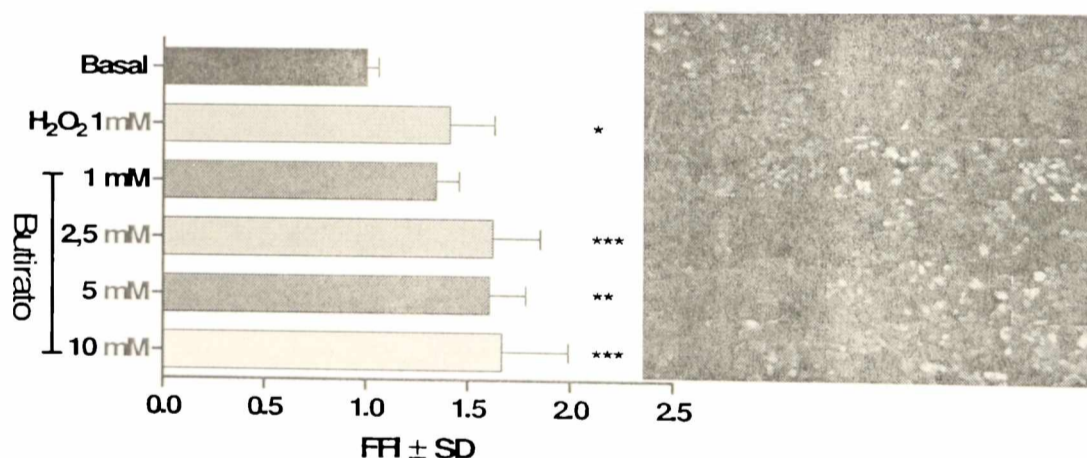


Figura 2.12 – Sistema de detección de especies reactivas de oxígeno mediante microscopía de fluorescencia. Como inductor de ROS se utilizó butirato en las concentraciones indicadas. Diferencias significativas * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ ANOVA + test de Dunnett comparando contra la columna control Basal. Se muestra la cuantificación de al menos 10 campos diferentes para cada condición. A la derecha se muestran 5 campos correspondientes a cada condición indicada en el gráfico.

Con el sistema puesto a punto, se estudió la capacidad de diferentes microorganismos para inducir ROS endógenas en células epiteliales. De 37 microorganismos utilizados para los ensayos se probaron 7 levaduras y 30 bacterias. Todas las levaduras fueron incapaces de inducir ROS endógenas en las células de epitelio intestinal Caco 2. De los 30 aislados bacterianos ensayados, sólo 5 (*L. brevis* JCM 1059, *L. plantarum* CIDCA 83114, *L. plantarum* DSMZ 20174, *L. delbrueckii* subesp *lactis* CIDCA 133 y *L. brevis* ATCC 8287) mostraron una capacidad de inducción de ROS significativa. En la figura 2.14 se presenta un resumen gráfico de estos resultados.

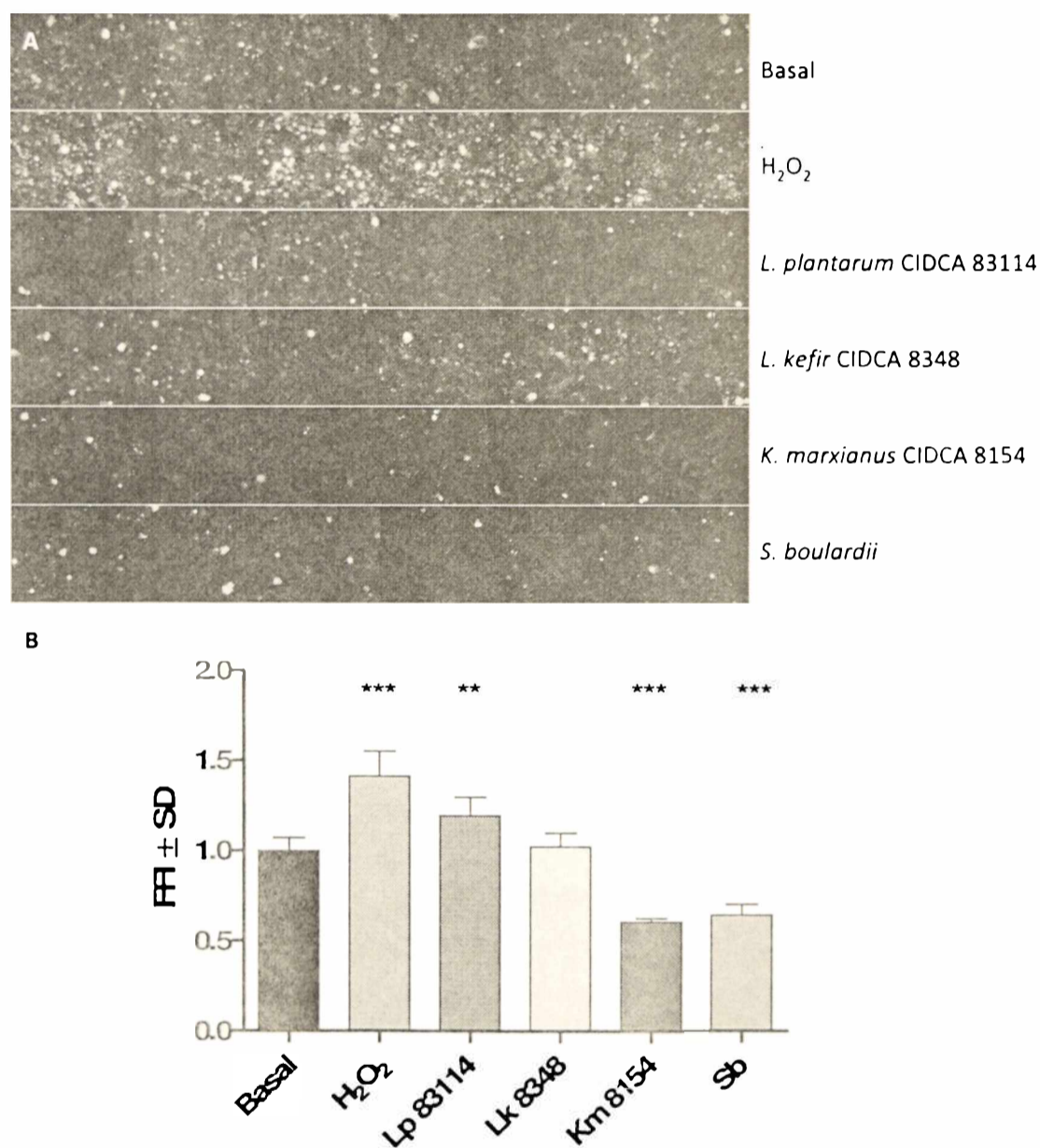


Figura 2.13 Inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células epiteliales Caco 2 en cultivo. A Las imágenes de al menos tres ensayos independientes con al menos 12 campos cada uno fueron procesadas según se describe en el anexo II para cuantificar la fluorescencia, los resultados de cuantificación se muestran en B. Aquí se muestran algunas imágenes de ejemplo. Los valores de fluorescencia se expresan referidos al valor basal, el cual por definición toma el valor de 1. Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio de epifluorescencia NIKON –Ti-Eclipse con un aumento de 20X. Diferencia significativa ** p<0,05 ***p<0,001 ANOVA + test de Dunnet contra el control Basal.

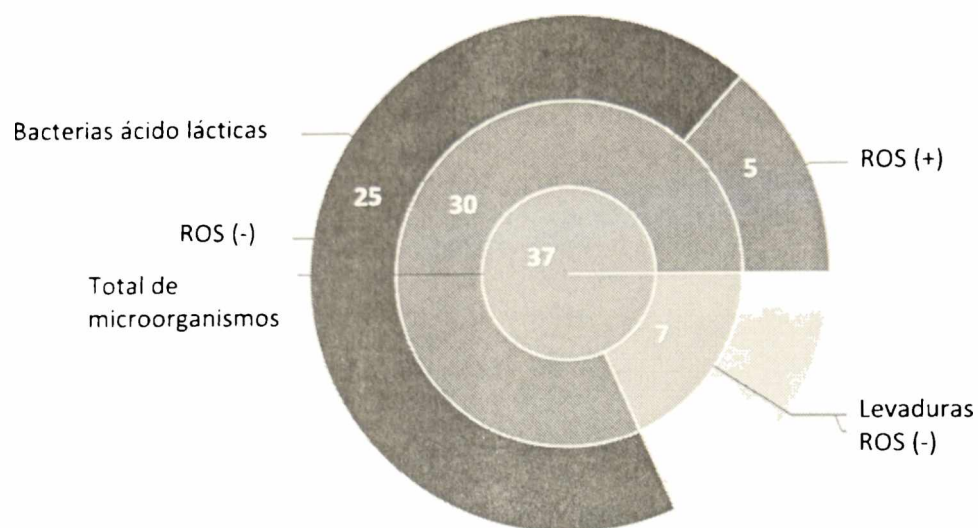


Figura 2.14 – Distribución de capacidad inductora de ROS endógenos de los distintos microorganismos ensayados. Se muestran los valores totales de los aislados ensayados.

En la figura 2.15 A se muestran los resultados de inducción de ROS para los microorganismos más representativos de las poblaciones antes mencionadas.

Luego de evaluar la capacidad inductora de ROS, se compararon con la capacidad moduladora de la respuesta pro-inflamatoria de los mismos microorganismos en el sistema reportero Caco Ccl20:luc. En la figura 2.15 B se presentan estos resultados.

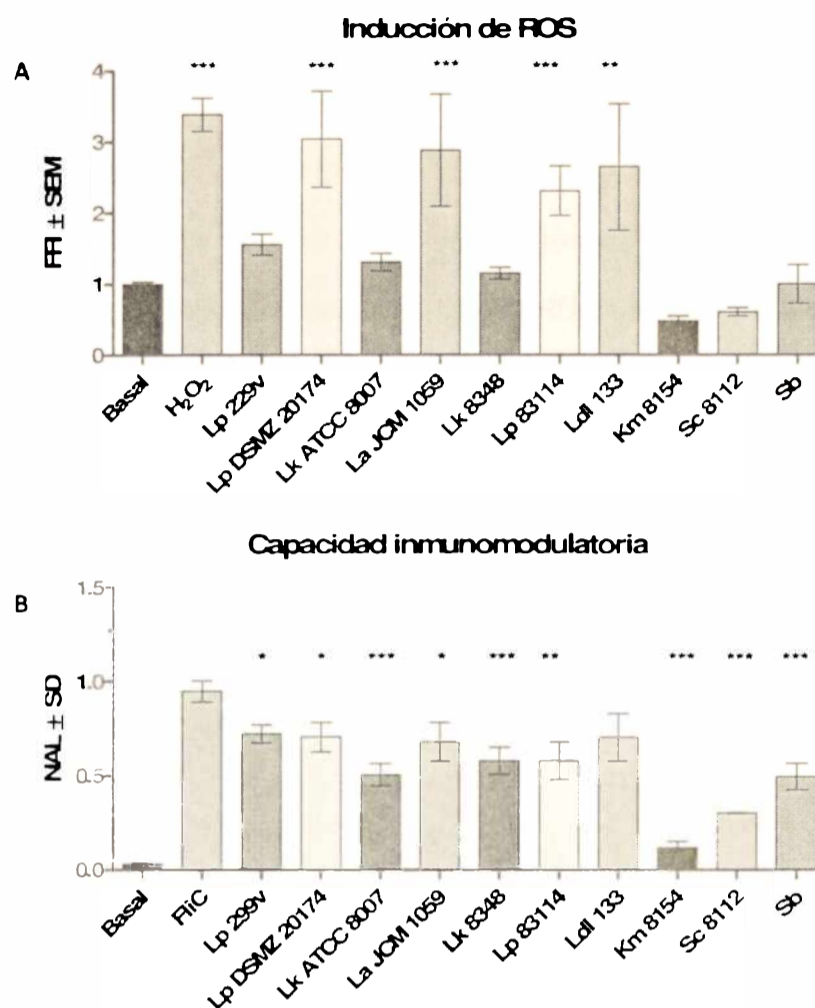


Figura 2.15 – A capacidad inductora de ROS en células epiteliales intestinales y B capacidad moduladora de la respuesta proinflamatoria disparada por flagelina de distintos microorganismos. Diferencias significativas con respecto al control. * p<0,05, ** p<0,01 y *** p<0,001 ANOVA + test de Dunet comprando contra las columnas control basal en A y con respecto al control FliC en B. Lp – *Lactobacillus plantarum*. Lk – *L. kefir* – Ldl *L. delbrueckii* subesp. *Lactis* – Sc *Saccharomyces cerevisiae* – Sb *S. boulardii* - Km *Kluyveromyces marxianus*.

Es destacable el hecho de que las levaduras (en este caso se muestran *K. marxianus* CIDCA 8154, *S. cerevisiae* CIDCA 8112 de la colección CIDCA y *Saccharomyces boulardii* aislado de un probiótico comercial) son las que poseen mayor capacidad moduladora de la respuesta proinflamatoria aunque, como ya se había adelantado, no muestran capacidad inductora de ROS. Entre las bacterias ensayadas se pueden encontrar aquellas que poseen tanto capacidad moduladora como de inducción de producción de ROS (como *L. plantarum* DSMZ 20174, *L. acidophilus* JCM 1059 y *L. plantarum* 83114); *L. delbrueckii* subesp. *lactis* CIDCA 133 que es capaz de inducir ROS pero no modular la respuesta disparada por flagelina y un grupo de moduladoras pero no inductoras de ROS (que incluye las levaduras y las cepas de *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 y ATCC 8007).

Neish y colaboradores, han publicado ampliamente sobre la modulación de la respuesta inmune por comensales^{27,29,30,48}, aunque sus trabajos no incluyen condiciones proinflamatorias como las tratadas en el presente trabajo al utilizar el estímulo con flagelina. Para evaluar si existe correlación entre la capacidad de inducción de ROS y la capacidad moduladora de la respuesta a flagelina se ensayó una estrategia para el secuestro de las ROS endógena en las células epiteliales mediante el uso de N-acetil-cisteína (NAC) y se evaluó el efecto de dicha estrategia tanto en la capacidad moduladora como en la capacidad de inducir ROS. En la figura 2.16 se muestra el efecto de la adición previa de NAC a las células sobre la inducción de ROS (A) y sobre la modulación de la respuesta inflamatoria a flagelina en el sistema reportero Caco ccl20:luc (B).

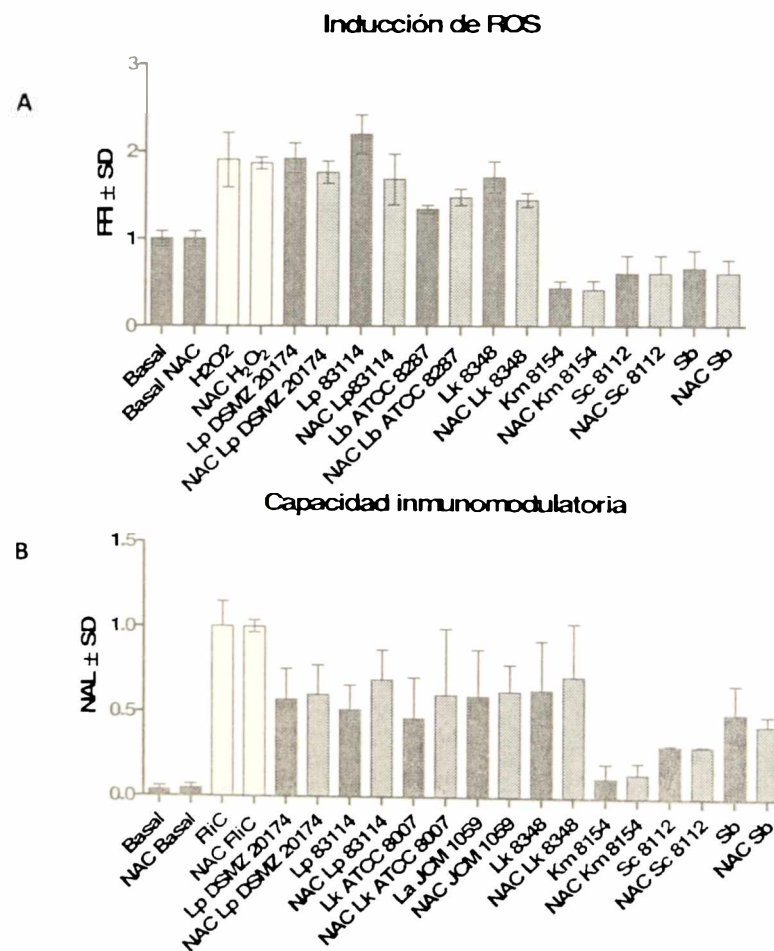


Figura 2.16 – Efecto de la preincubación con N-acetil-cisteína A sobre la generación de ROS evaluado mediante fluorescencia A y sobre el efecto modulador B en el sistema reportero Caco ccl20:luc. Se muestran los resultados para un panel reducido de microorganismos. Se muestran los resultados representativos de al menos dos ensayos independientes.

Los efectos de la NAC tanto sobre la capacidad inductora de ROS como sobre la de modulación de la respuesta innata, al menos en las condiciones de los ensayos observadas, no son absolutos, es decir que ni inhiben completamente la producción de ROS ni quitan toda capacidad moduladora a

los microorganismos. Esto, podría deberse a la presencia de varios mecanismos redundantes que difícilmente puedan ser bloqueados mediante una única estrategia. Una forma de analizar el efecto parcial de la incubación con NAC en la capacidad inductora de ROS y moduladora de la respuesta innata es mediante el estudio de la variación de los valores de los estadísticos de las pruebas de significancia en las distintas condiciones. En la figura 2.17 se puede apreciar que *Lactobacillus plantarum* DSMZ 20174, *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* CIDCA 83114 pierden significancia en su capacidad de inducir ROS (corrimiento hacia la derecha denotado en flechas azules) cuando se compara la inducción de ROS en ausencia (verde) o presencia (negro) de NAC. Lo mismo se observa para los primeros dos microorganismos mencionados con respecto a la capacidad moduladora (corrimiento hacia arriba).

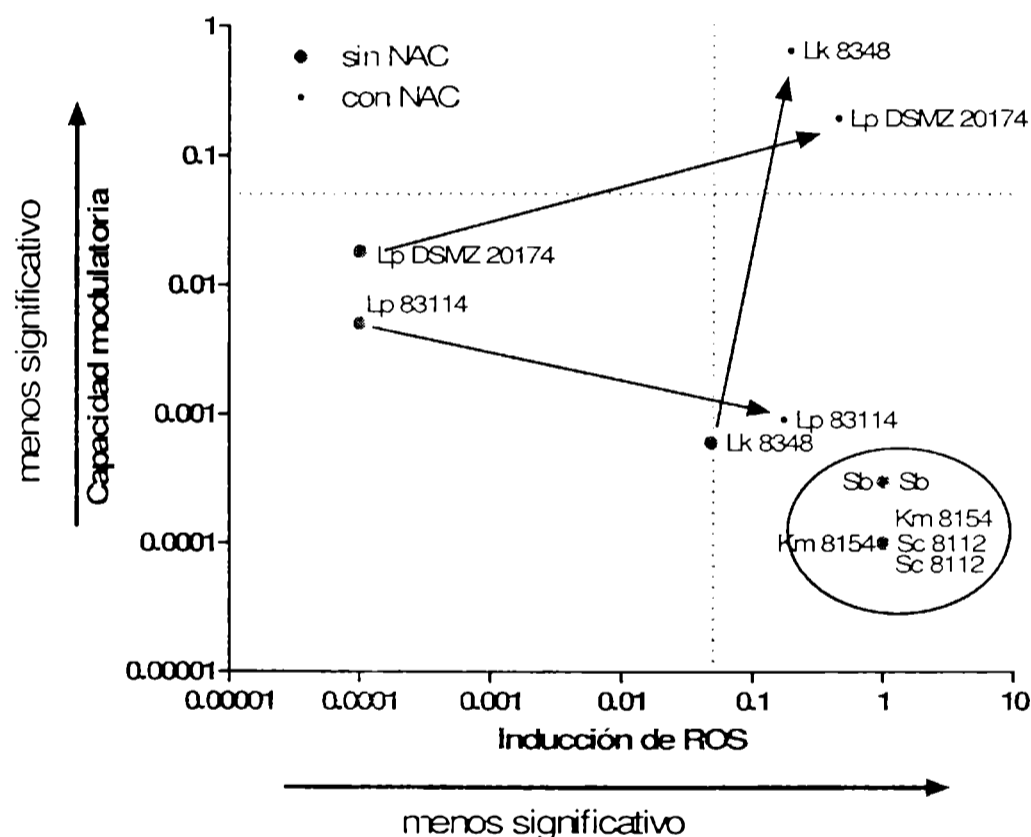


Figura 2.17 – Correlación entre la capacidad moduladora y la capacidad de inducir ROS de los diferentes microorganismos y el efecto de la presencia de N-acetil-cisteína (NAC). Se muestra una correlación para los p valores de las pruebas t de Student en donde se comparan contra el control basal en caso de ROS y contra el control FliC en el caso de la capacidad moduladora.

Es de destacar el comportamiento de las levaduras (resaltadas en una elipse azul) como ampliamente moduladoras de la respuesta proinflamatoria de manera independiente de la presencia de NAC y de la inducción de ROS.

Discusión

La diferencia en la capacidad moduladora de la respuesta innata epitelial descrita en el capítulo 1 para bacterias y levaduras se estudió con mayor detalle en el presente capítulo. El interés particular en las levaduras se origina tanto en la mayor capacidad moduladora observada como en su potencial probiótico.

Ha sido descrito que la levadura *Saccharomyces boulardii* es capaz de producir un factor soluble que disminuye la expresión a nivel transcripcional del gen de IL-8 en células epiteliales colónicas (HT-29) y monocitos (THP-1) cuando estas son estimuladas con IL-1 β , TNF- α o LPS³⁵. En el presente trabajo se descarta la producción de un factor similar por parte de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154, sugiriendo que a pesar de que todas las levaduras, incluida *Saccharomyces boulardii*, comparten la propiedad de modular la respuesta proinflamatoria, pueden diferir en sus mecanismos de acción. De esta comparación surge la necesidad de nuevos estudios para caracterizar de manera más profunda la capacidad moduladora de los diferentes aislados, ampliando la cantidad de microorganismos en los ensayos de medios condicionados por el crecimiento del probiótico, estimulación de células epiteliales crecidas en *transwells*, etc.

Por otra parte, los resultados obtenidos descartan la presencia de algún componente de las paredes de las levaduras como responsable del efecto de modulación. Los ensayos de viabilidad, demuestran que los componentes de la pared celular de *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 no son capaces de modular la respuesta proinflamatoria disparada por flagelina cuando la levadura es inactivada por radiación UV. Badia y colaboradores han descrito que β -galactomananos sintéticos y *Saccharomyces boulardii* modulan la expresión de los genes TNF- α , IL-1 α , IL-6, y GM-CSF (del inglés *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) y las quimoquinas CCL2, CCL20 y CXCL8 en células de epitelio intestinal porcino en sistemas *in vitro*³⁶. En este trabajo los autores sugieren que el β -galactomanano confiere a las células epiteliales mayor protección contra la adhesión de *Salmonella* y modula la expresión de los mencionados genes de manera más eficiente que *Saccharomyces boulardii* misma. Esto puede deberse a una diferencia en la composición de los polisacáridos sintéticos y los presentes en la pared de las levaduras o a que al utilizar el β -galactomanano purificado, la relación manano-célula epitelial puede ser mayor que al incubar con la levadura viable. Futuros estudios con las levaduras aisladas de kefir incluirán la purificación de

componentes de sus paredes celulares, así también como el estudio de la capacidad moduladoras de esferoplastos viables, es decir, levaduras a las cuales se les degrada la pared celular mediante un tratamiento enzimático con liticasa.

En cuanto a la diversidad de genes modulados por *K. marxianus* CIDCA 8154, se demostró que la levadura es efectiva tanto en la modulación de la respuesta proinflamatoria disparada por flagelina como por otros agonistas tales como IL-1 β , LPS o TNF α , sugiriendo que el mecanismo de acción es sobre algún componente común a estas vías. Los estudios de expresión génica demuestran que este efecto es específico de los genes de la respuesta proinflamatoria (CXCL8, CXCL2, CXCL10, CCL20 y CX3CL1) y no de los genes de funciones no relacionadas de los enterocitos, indicando que esta levadura es un potencial candidato para el desarrollo de una terapia antiinflamatoria basada en probióticos.

Los mecanismos de señalización intracelular en la célula epitelial fueron estudiados tomando como punto de partida las publicaciones existentes en cuanto a la interacción entre microorganismos probióticos y células epiteliales. Se ha descrito que la vía de NF-kB es el blanco de modulación utilizado por *Saccharomyces boulardii* y por un suplemento de bacterias probióticas comercial, VSL#3 compuesto por *Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*⁴⁹⁻⁵¹. Los resultados obtenidos en los ensayos con las dobles transfecciones muestran que la vía de NF-kB es blanco de modulación por la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154. Además, el sistema reportero utilizado para el *screening* utiliza el promotor de la quimoquina Ccl20 que tiene dominios de unión a NF-kB como principal factor de transcripción^{52,53}. Como se ha mencionado en la introducción, las vías de señalización de MAP-quinasas y NF-kB se encuentran estrechamente relacionadas. Al utilizar inhibidores farmacológicos para la vía de MAPK, no se pierde el efecto modulador de la levadura *K. marxianus* CIDCA 8154. Aparentemente la levadura ejercería su efecto de manera independiente de esta vía de MAPK, aunque se requieren estudios sobre la interacción con la vía de NF-kB, por ejemplo mediante *western-blot* o de la transcripción de genes específicos de esas vías que lo confirmen.

Se ha vinculado la estabilización del factor de transcripción en el citoplasma mediante la inhibición de la maquinaria de ubiquitinación y degradación proteasómica. Esta inhibición se lleva a cabo

mediante un aumento de especies reactivas de oxígeno en el citoplasma de las células epiteliales. Los primeros trabajos fueron realizados utilizando las bacterias comensales *Lactobacillus rhamnosus*, *Escherichia coli* y *Bacteroides thetaiotaomicron* en un sistema de detección de ROS por fluorescencia³⁰, si bien el número de microorganismos utilizado para los ensayos es bajo, los mismos pertenecen a géneros filogenéticamente distantes. Entre estas tres bacterias *L. rhamnosus*, comúnmente utilizada como microorganismo probiótico, tiene un efecto modulador mayor que las demás. Los mismos autores mencionan también que ciertos productos de fermentación de los microorganismos comensales, por ejemplo el butirato ejercen el mismo efecto de inducción de las ROS epiteliales²⁸. En el presente trabajo, aprovechando la reproducibilidad de utilizar butirato como control positivo, se optimizó y adaptó el sistema de detección de ROS mediante fluorescencia a nuestra capacidad operativa. Mediante este sistema se realizó un *screening* de la capacidad de inducción de ROS en células epiteliales y se demostró que este efecto es cepa dependiente, es decir, dos microorganismos de la misma especie pueden o no inducir la generación de ROS en el epitelio. Las bacterias *L. plantarum* DSMZ 20174 y *L. plantarum* CIDCA 83114 muestran que la capacidad de inducir ROS está vinculada al efecto modulador de la respuesta proinflamatoria disparada por flagelina, siguiendo los resultados esperados según lo descrito en bibliografía. Sin embargo en el presente trabajo se demuestra que existen comportamientos diversos en cuanto a la relación entre capacidad moduladora e inducción de ROS; por ejemplo *L. delbrueckii* subesp. *lactis* CIDCA 133 es capaz de inducir ROS pero no modular la respuesta disparada por flagelina y por otra parte *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 y ATCC 8007, presentan capacidad moduladora pero no inductora de ROS.

Asimismo, las levaduras utilizadas en este trabajo, de las cuales ya se ha mencionado la mayor capacidad moduladora de la respuesta proinflamatoria son completamente independientes de ROS para ejercer su efecto. Estos resultados una diferencia de mecanismos moduladores entre bacterias y levaduras. En ciertos lactobacilos la señalización a través de ROS parece ser un mecanismo esencial para ejercer su efecto modulador de la respuesta proinflamatoria. Los autores que describieron por primera vez la vía de interacción de los microorganismos comensales y las células epiteliales mediante este sistema, centraron su caracterización en el mecanismo puesto en juego en ausencia de activación proinflamatoria. En las condiciones utilizadas en el presente trabajo, es decir, con estímulo de la vía de TLR5 mediante flagelina, podrían existir otras

interacciones aún no estudiadas en profundidad, por lo que el efecto modulador propuesto hasta el momento podría ser importante para mantener la homeostasis inflamatoria frente a la microbiota, pero difícilmente pueda ser aplicable en un entorno proinflamatorio.

En trabajos más recientes, Neish y colaboradores estudiaron con mayor profundidad los mecanismos de la inducción de ROS por *L. rhamnosus*, vinculando la producción de ROS con el receptor para péptidos formilados FPR³⁴. Este puede ser un mecanismo que explique la inducción de ROS para ciertas bacterias, sin embargo, dista de ser específico para microorganismos probióticos ya que los péptidos formilados están presentes en todo procariota y las levaduras no podrían interactuar con las células epiteliales mediante este receptor.

Las tareas próximas a desarrollar en base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis referentes a la interacción entre probiótico y célula epitelial incluyen estudios sobre receptores de ácidos orgánicos de cadena corta y el rol de los receptores específicos para estas moléculas en la modulación de la respuesta proinflamatoria.

En cuanto a los mecanismos que median este comportamiento hemos realizado ensayos exploratorios en cuanto a la capacidad de las levaduras para interferir en la señalización vía TLR mediada por especies reactivas de oxígeno, encontrando que *K. marxianus* CIDCA 8154 es capaz de disminuir la cantidad de ROS presentes en las células epiteliales. Existen trabajos de más de una década, con poca continuidad, donde se describe que los TLRs tienen una vía alternativa de señalización dependiente de especies reactivas de oxígeno para su activación⁵⁴⁻⁵⁶. Futuras estrategias de estudio podrían incluir el uso de levaduras deficientes en catalasa, una enzima que podría ser responsable de la eliminación de las ROS epiteliales inducidas por flagelina, y que se encuentra ampliamente distribuida entre las levaduras. Una búsqueda en bases de datos sobre genes con actividad catalasa para *Saccharomyces* denota la presencia de al menos cuatro genes diferentes.

Como se ha mencionado previamente, el interés en microorganismos con capacidad moduladora de la respuesta proinflamatoria para su utilización como probióticos, recae en la potencialidad de aplicación en enfermedades inflamatorias intestinales, alergia o cualquier otra patología en donde el problema sea una respuesta inflamatoria exacerbada.

En el siguiente capítulo se estudiará la aplicación de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 a diferentes modelos murinos de inflamación intestinal *in vivo*.

Resumen de resultados y conclusiones

- El efecto modulador de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 no depende de ningún factor soluble que esta puede generar, al menos en las condiciones en los que los ensayos fueron realizados. La adhesión a las células epiteliales jugaría un papel importante en el mecanismo de modulación.
- La interacción de las levaduras con la cara apical de las células epiteliales es necesaria para la modulación.
- Esta levadura es capaz de modular de la expresión de los genes de las quimoquinas proinflamatorias CCL20, CX3CL1, CXCL2 y CXCL8 inducidos por flagelina, IL-1 o LPS sin alterar la expresión de genes de otras funciones no relacionadas con la respuesta inmune.
- El factor de transcripción NF- κ B juega un papel clave en la señalización y en el efecto modulador.
- Las vías de MAPK, ERK1/2 y STAT3 no parecen estar implicadas directamente en la modulación, aunque es necesario profundizar al respecto.
- Se requieren estudios en otros sistemas diferentes a las líneas celulares en cultivo para evaluar el efecto de los microorganismos sobre la estabilidad del inhibidor I κ B.
- De las 30 bacterias ensayadas, sólo *L. brevis* JCM 1059, *L. plantarum* CIDCA 83114, *L. plantarum* DSMZ 20174, *L. delbrueckii* subesp *lactis* CIDCA 133 y *L. brevis* ATCC 8287 son capaces de inducir la generación de especies reactivas de oxígeno en las células epiteliales, indicando que la inducción de ROS no es un mecanismo general en la interacción epitelio-microorganismo.
- Ninguna de las levaduras ensayadas muestra capacidad de inducir la generación de especies reactivas de oxígeno en las células epiteliales.
- La bacteria *L. plantarum* DSMZ 20174 pierde su capacidad moduladora y la capacidad de inducir la generación de ROS en las células epiteliales cuando se agrega el antioxidante N-acetil-cisteína al medio, lo que podría indicar que para este organismo, ambos fenómenos están vinculados. *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 tiene el mismo comportamiento a pesar de poseer una menor capacidad inductora de ROS.
- La bacteria *L. plantarum* CIDCA 83114 pierde su capacidad inductora de ROS en presencia

de NAC, pero su capacidad moduladora no se ve afectada, indicando que incluso para bacterias, el mecanismo de inducción de ROS no puede explicar completamente el fenómeno de modulación de la respuesta proinflamatoria disparada por flagelina.

Bibliografía

1. Artis, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature reviews. Immunology* **8**, 411–420 (2008).
2. Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M. & Finlay, B. B. Gut Microbiota in Health and Disease. 859–904 (2010).doi:10.1152/physrev.00045.2009.
3. Hold, G. L., Mukhopadhy, I. & Monie, T. P. Innate immune sensors and gastrointestinal bacterial infections. *Clinical & developmental immunology* **2011**, 579650 (2011).
4. Round, J. L. & Mazmanian, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews. Immunology* **9**, 313–23 (2009).
5. Chorny, A. & Cerutti, A. A gut triumvirate rules homeostasis. *Nature medicine* **17**, 1549–50 (2011).
6. Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology* **17**, 1–14 (2005).
7. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* **11**, 373–384 (2010).
8. Barreau, F. *et al.* Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches. *Gut* **59**, 207–17 (2010).
9. Van Beelen, A. J. *et al.* Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* **27**, 660–9 (2007).
10. Vijay-Kumar, M. *et al.* Toll-like receptor 5-deficient mice have dysregulated intestinal gene expression and nonspecific resistance to *Salmonella*-induced typhoid-like disease. *Infection and immunity* **76**, 1276–81 (2008).
11. Brasier, A. R. The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovascular toxicology* **6**, 111–30 (2006).
12. Gilmore, T. D. The Rel / NF-kB signal transduction pathway: introduction. 6842–6844 (1999).
13. Gilmore, T. D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680–4 (2006).
14. Salminen, A. *et al.* Activation of innate immunity system during aging: NF-kB signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing research reviews* **7**, 83–105 (2008).
15. Tnf, B., Tnf, A., Ikb, T. & Traf, T. Inhibition of apoptosis by NF-KB. **8924**, 107–111 (1998).
16. Gilmore, T. 20 years of NF-kB. **72**, 1051–1053 (2006).
17. Tian, B., Brasier, A. R. & Branch, M. Identification of a nuclear factor kappa B-dependent gene network. *Recent progress in hormone research* **58**, 95–130 (2003).
18. Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A. M. & Aggarwal, B. B. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **82**, 434–48 (2004).
19. Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R. & Li, Z.-W. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature reviews. Cancer* **2**, 301–10 (2002).
20. Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J. & Matias-Guiu, X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv: an international journal of pathology* **446**, 475–82 (2005).
21. Chung, H. Y. *et al.* Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing research reviews* **8**, 18–30 (2009).
22. Corsini, E., Galbiati, V., Nikitovic, D. & Tsatsakis, A. M. Role of oxidative stress in chemical allergens induced skin cells activation. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* (2013).doi:10.1016/j.fct.2013.02.038

23. Goldminz, a M., Au, S. C., Kim, N., Gottlieb, a B. & Lizzul, P. F. NF- κ B: An essential transcription factor in psoriasis. *Journal of dermatological science* **69**, 89–94 (2013).
24. Bouma, G. & Strober, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature reviews. Immunology* **3**, 521–33 (2003).
25. Lin, P. W. *et al.* Lactobacillus rhamnosus blocks inflammatory signaling in vivo via reactive oxygen species generation. *Free radical biology & medicine* **47**, 1205–1211 (2010).
26. Ruch, W., Cooper, P. H. & Baggiolini, M. Assay of H₂O₂ production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horseradish peroxidase. *Journal of Immunological Methods* **63**, 347–357 (1983).
27. Swanson, P. a *et al.* Enteric commensal bacteria potentiate epithelial restitution via reactive oxygen species-mediated inactivation of focal adhesion kinase phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 8803–8 (2011).
28. Kumar, A. & Wu, H. The bacterial fermentation product butyrate influences epithelial signaling via reactive oxygen species-mediated changes in cullin-1 neddylation. *The Journal o* **182**, 538–546 (2009).
29. Jones, R. M., Mercante, J. W. & Neish, a S. Reactive oxygen production induced by the gut microbiota: pharmacotherapeutic implications. *Current medicinal chemistry* **19**, 1519–29 (2012).
30. Kumar, A. *et al.* Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. *The EMBO journal* **26**, 4457–66 (2007).
31. Kawakami, T. *et al.* NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3 ligase. *The EMBO journal* **20**, 4003–12 (2001).
32. Neish, A. S. & Naumann, M. Microbial-induced immunomodulation by targeting the NF- κ B system. *Trends in microbiology* **19**, 596–605 (2011).
33. Wentworth, C. C., Jones, R. M., Kwon, Y. M., Nusrat, A. & Neish, A. S. Commensal-epithelial signaling mediated via formyl peptide receptors. *The American journal of pathology* **177**, 2782–90 (2010).
34. Wentworth, C. C., Alam, A., Jones, R. M., Nusrat, A. & Neish, A. S. Enteric commensal bacteria induce extracellular signal-regulated kinase pathway signaling via formyl peptide receptor-dependent redox modulation of dual specific phosphatase 3. *The Journal of biological chemistry* **286**, 38448–55 (2011).
35. Sougioultzis, S. *et al.* Saccharomyces boulardii produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression. *Biochemical and biophysical research communications* **343**, 69–76 (2006).
36. Badia, R. *et al.* β -Galactomannan and Saccharomyces cerevisiae var. boulardii modulate the immune response against Salmonella enterica serovar Typhimurium in porcine intestinal epithelial and dendritic cells. *Clinical and vaccine immunology*: CVI **19**, 368–76 (2012).
37. Pelizon, a C., Kaneno, R., Soares, a M. V. C., Meira, D. a & Sartori, a Immunomodulatory activities associated with beta-glucan derived from Saccharomyces cerevisiae. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **54**, 557–64 (2005).
38. Schutyser, E., Struyf, S. & Van Damme, J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **14**, 409–426 (2003).
39. Lee, J. *et al.* Chemokine binding and activities mediated by the mouse IL-8 receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md.:* 1950) **155**, 2158–64 (1995).
40. Waugh, D. J. J. & Wilson, C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical cancer research*: an official journal of the American Association for Cancer Research **14**, 6735–41 (2008).
41. Remick, D. G. Interleukin-8. *Critical care medicine* **33**, S466–7 (2005).
42. Zlotnik, A. & Yoshie, O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity* **36**, 705–16 (2012).

43. Anderle, P. *et al.* Novel Markers of the Human Follicle—Associated Epithelium Identified by Genomic Profiling and Microdissection. *Gastroenterology* **129**, 321–327 (2005).
44. Sturm, O. E. *et al.* The mammalian MAPK/ERK pathway exhibits properties of a negative feedback amplifier. *Science signaling* **3**, ra90 (2010).
45. Vanden Berghe, W. *et al.* p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *The Journal of biological chemistry* **273**, 3285–90 (1998).
46. Kumar, A. *et al.* The Bacterial Fermentation Product Butyrate Influences Epithelial Signaling via Reactive Oxygen Species-Mediated Changes in Cullin-1 Neddylation 1. *The Journal of Immunology* **1**, 538–546 (2009).
47. Lin, P. W. *et al.* Lactobacillus rhamnosus blocks inflammatory signaling in vivo via reactive oxygen species generation. *Free radical biology & medicine* **47**, 1205–11 (2009).
48. Kumar, A. *et al.* Changes in Cullin-1 Neddylation 1. *The Journal of Immunology* **1**, 538–546 (2009).
49. C. Pothoulakis Anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. Retrieved September 30, 826–833 (2007).
50. Buts, J.-P. & De Keyser, N. Transduction pathways regulating the trophic effects of *Saccharomyces boulardii* in rat intestinal mucosa. *Scandinavian journal of gastroenterology* **45**, 175–85 (2010).
51. Mencarelli, A. *et al.* Probiotics Modulate Intestinal Expression of Nuclear Receptor and Provide Counter-Regulatory Signals to Inflammation-Driven Adipose Tissue Activation. *PLoS ONE* **6**, e22978 (2011).
52. Varesio, L., Battaglia, F., Raggi, F., Ledda, B. & Bosco, M. C. Macrophage-inflammatory protein-3alpha/CCL-20 is transcriptionally induced by the iron chelator desferrioxamine in human mononuclear phagocytes through nuclear factor (NF)-kappaB. *Molecular immunology* **47**, 685–93 (2010).
53. Sirard, J.-C., Didierlaurent, A., Cayet, D., Sierro, F. & Rumbo, M. Toll-like receptor 5- and lymphotoxin beta receptor-dependent epithelial Ccl20 expression involves the same NF-kappaB binding site but distinct NF-kappaB pathways and dynamics. *Biochimica et biophysica acta* **1789**, 386–94 (2009).
54. Asehounne, K., Strassheim, D., Mitra, S., Kim, J. Y. & Abraham, E. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **172**, 2522–9 (2004).
55. Gloire, G., Legrand-Poels, S. & Piette, J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical pharmacology* **72**, 1493–505 (2006).
56. Schoonbroodt, S. & Piette, J. Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. *Biochemical pharmacology* **60**, 1075–83 (2000).

anmales

Capítulo 3

vadu

TNBS

Capítulo 3: Estudio de la capacidad moduladora de la respuesta innata de microorganismos seleccionados empleando modelos *in vivo*

Introducción

En los capítulos previos de este trabajo se seleccionaron microorganismos con capacidad moduladora de la respuesta inmune innata y se caracterizaron en parte los mecanismos por los cuales ejercerían su efecto. En el presente capítulo se muestran los resultados de la aplicación de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 a distintos modelos *in vivo* de inflamación intestinal.

El uso de microorganismos para el tratamiento de afecciones gastrointestinales es conocido desde hace tiempo y existe una gran cantidad de reportes en los que se describe su aplicación en el tratamiento de diarrea asociada a antibióticos¹⁻³, intolerancia a azúcares⁴, metabolismo de lípidos⁵, enfermedad celíaca⁶, gastritis⁷⁻⁹, diarreas asociadas a infecciones¹⁰⁻¹², etc.; sin embargo la utilización de la mayoría de estos tratamientos es de carácter empírico. En años recientes, los intereses clínicos y científicos en encontrar microorganismos con capacidad para regular la respuesta inmune intestinal se han incrementado debido a la acumulación de evidencia que indica que la flora luminal juega un rol crítico en el inicio y la perpetuación de enfermedades inflamatorias intestinales¹³.

De entre todas las posibles afecciones con un componente inflamatorio, son de particular interés para el estudio presentado en este capítulo la infección por *Salmonella* y las enfermedades inflamatorias intestinales.

El interés particular en las infecciones por *Salmonella* surge del hecho de que la salmonelosis es una de las principales zoonosis en humanos. Su principal forma de transmisión es mediante alimentos contaminados, aunque se puede producir la transmisión entre personas o por contaminaciones ambientales en situaciones de higiene precaria (Figura 3.1). La Red Global para Infecciones Alimentarias (GFN por *Global Foodborne Infections Network*) que asocia laboratorios a nivel mundial para el seguimiento y control de infecciones alimentarias, bajo la coordinación de la Organización Mundial de la Salud, tiene como una de sus principales actividades el estudio de la

salmonelosis y provee información y estadísticas sobre el tema. Según los reportes, las especies más comunes aisladas en los casos de contaminación alimentaria son *S. enteritidis* y *S. typhimurium* que alternan su incidencia en el tiempo¹⁴. En nuestra región, según datos de la Organización Pan-Americana de la Salud (PAHO por sus siglas en inglés) *S. enteritidis* fue en 2001 el serotipo más común. En nuestro país han existido brotes que afectaron gravemente a una gran cantidad de personas. Las 5 serovariedades prevalentes, en el período 2004-2005 fueron: *Salmonella enteritidis* (36.0%), *S. typhimurium* (20.5%), *S. infantis* (8.7%), *S. newport* (5.3%) y *S. agona* (4.9%)¹⁵. En la figura 3.2 se muestra el número de casos reportados en 2004 y 2005, ordenados según la serovariedad aislada y por provincia.

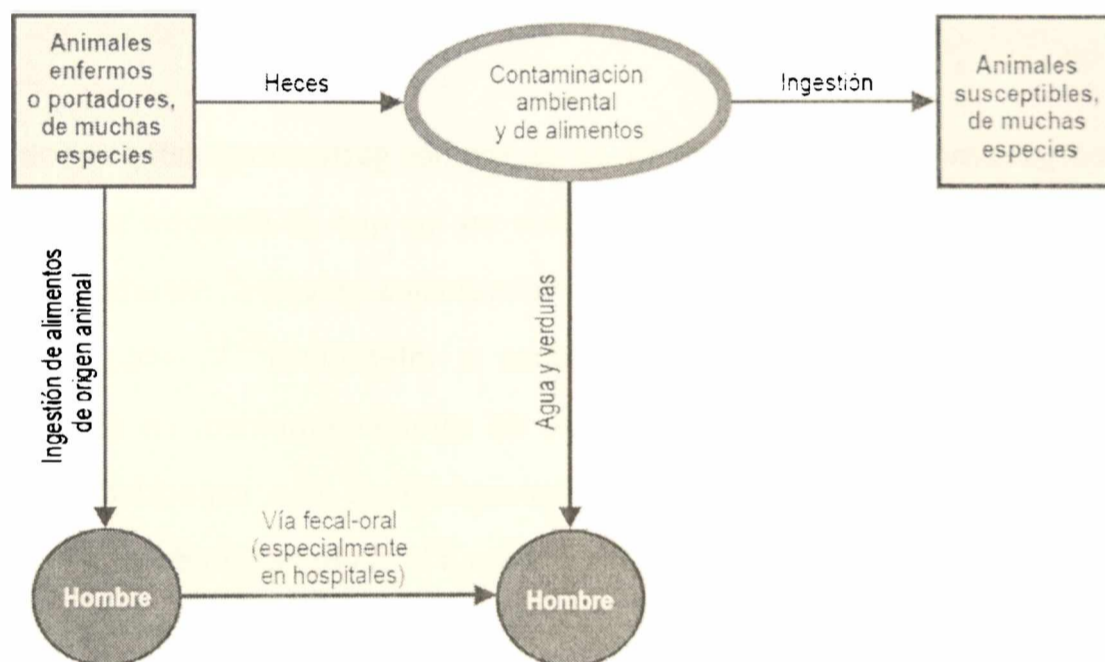


Figura 3.1 - Transmisión de la salmonelosis Adaptado de Bacteriosis, V. I., Acha, P. N. & Street, T. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales Tercera edición. (2001).

La incidencia de cepas de *Salmonella* aisladas con resistencia múltiple a antibióticos se ha ido incrementando con los años. Las causas principales de este fenómeno son el uso de antibióticos en la alimentación de animales (una práctica común en los países industrializados) y el uso indiscriminado de antibióticos (ya sea por parte de profesionales o de particulares).

La infección por *Salmonella* causa una enteritis originada por la infección intracelular de células epiteliales y células dendríticas, que en la mayoría de los casos se limita al intestino aunque puede

causar enfermedad diseminada. La bacteria expresa distintos factores de virulencia que participan en diferentes etapas de la infección. La enfermedad se manifiesta comúnmente por una diarrea aguda y la diseminación poblacional de la enfermedad se da por eliminación de bacterias viables en las deposiciones^{15,16}. Existen factores de patogenicidad en *Salmonella* que juegan un papel clave en el establecimiento de la infección. Uno de los principales es el sistema de secreción de tipo 3 (TTSS por sus siglas en inglés), que consta de una estructura proteica compleja en forma de aguja, que es capaz de “inyectar” proteínas que interfieren en los mecanismos fisiológicos de señalización en las células eucariotas¹⁷. Este sistema de secreción se encuentra en una gran cantidad de patógenos gram-negativos, al punto de que existe una base de datos internacional para la información generada en el estudio del sistema en distintas especies^{18,19}.

Los mecanismos moleculares de la infección por *Salmonella* implican la generación de un entorno inflamatorio en el intestino que elimina a los microorganismos comensales y disminuye la competencia por espacio y nutrientes que de otra manera no estarían disponibles para el patógeno¹⁶. La administración de un microorganismo probiótico con capacidad antiinflamatoria en tal escenario podría ser una estrategia útil para interferir con los mecanismos de patogénesis de *Salmonella*.

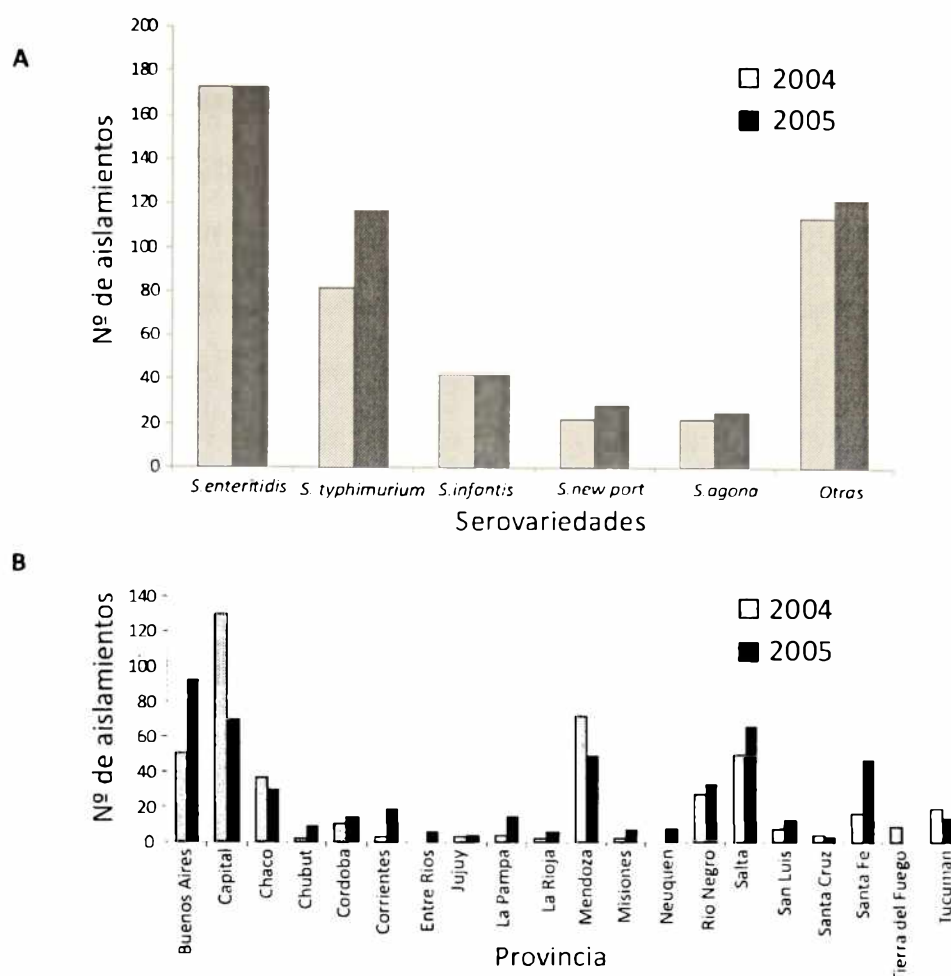


Figura 3.2 – Salmonelosis en Argentina. A Número de casos reportados según las serovariedades de *Salmonella* aislada. B Número de reportes ordenados por provincia. Adaptado del Boletín epidemiológico Periódico – Ministerio de Salud de la Nación. 2006¹⁵.

Para lograr los modelos murinos que permitan el estudio de la infección con *Salmonella*, se trata a los animales con estreptomycin, que elimina parcialmente la microbiota y genera un entorno favorable para el establecimiento del patógeno^{16,20}. En otros modelos se utilizan animales con microbiota de baja complejidad (LCF por *Low Complexity Microflora*). Estos animales poseen menor cantidad de especies representadas en su microbiota y sufren de alteraciones en el desarrollo de las estructuras linfoides, que los hace más susceptibles a las infecciones²¹. El uso de antibióticos o animales con microbiota reducida es necesario ya que los ratones desarrollan colitis al ser infectados por *Salmonella* por vía oral.

Las infecciones por microorganismos patógenos no son la única afección susceptible de ser tratada con microorganismos probióticos con capacidad antiinflamatoria. Existen otras patologías con un importante componente inflamatorio que no son disparadas por microorganismos patógenos. Tal es el caso de las llamadas enfermedades inflamatorias intestinales (IBDs por *Inflammatory Bowel*

Disease) cuyos principales exponentes son la enfermedad de Crohn (CD) y la colitis ulcerosa (UC). Las IBDs son enfermedades crónicas, progresivas que pueden llegar a tener un fuerte impacto en la calidad de vida del paciente. Su incidencia ha aumentado notablemente en las últimas décadas en los países occidentales²². La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa tienen síntomas similares y se diferencian entre sí por la distribución de los focos inflamatorios y por los perfiles de respuesta inmunológicos generados. Los pacientes con enfermedad de Crohn presentan un perfil tipo T_H1/T_H17 , con incrementos en la producción de IL-12, TNF e IFN- γ , mientras que los que sufren de colitis ulcerosa tiende a tener un perfil tipo T_H2 , con aumento de secreción de IL-4, IL-5 e IL-13²³⁻²⁶. La enfermedad de Crohn se caracteriza por una distribución de los focos inflamatorios a lo largo de todo el tracto gastrointestinal mientras que en la colitis ulcerosa se encuentran localizados principalmente en el colon.

El mecanismo más comúnmente aceptado como causa de estas patologías es una respuesta inmune exacerbada ante la microbiota²⁷. La predisposición a estas enfermedades depende de varios factores, entre los que se incluyen la constitución genética del paciente^{28,29}, la dieta, la edad y la composición de la microbiota^{27,30-34}.

Dada la complejidad y la multiplicidad de factores y mecanismos que contribuyen al desarrollo de estas patologías, los modelos animales para el estudio de las mismas suelen generar una mímica parcial de los síntomas de la enfermedad. La mayoría de los modelos se establecen por exacerbación de algún mecanismo determinado.

Una de las estrategias más comunes para la implementación de modelos animales de IBD es la modificación de la permeabilidad de la barrera epitelial. Existen distintos modelos de inducción de la inflamación con agentes químicos. La administración oral de dextrán sulfato de sodio (DSS) genera un fenotipo de respuesta epitelial similar al de las IBDs y es ampliamente utilizado para la prueba de concepto de intervenciones terapéuticas. Otro modelo de inducción de inflamación mediante un agente químico es la administración intrarrectal de ácido trinitrobencensulfónico (TNBS), que genera un daño epitelial en el colon de los animales, permitiendo la traslocación de la microbiota a través del epitelio y generando inflamación. Los modelos basados en TNBS tienen la ventaja de compartir gran parte de los mecanismos inflamatorios desarrollados durante una patología, además de permitir generar modelos de inflamación aguda o crónica, de acuerdo al ajuste de dosis y el número de administraciones^{25,35,36}. Existen otros modelos animales de IBDs

tanto químicos (como los anteriormente mencionados), inmunológicos, basados en la transferencia de células del sistema inmune, o modelos genéticos basados en animales *knock-out* para genes como IL-2³⁷, el receptor de células T³⁸ o IL-10³⁹ entre otros. Sin embargo, la aplicación de modelos basados en la inducción de la inflamación por agentes químicos tiene ventajas en cuanto a costo, infraestructura y simplicidad de implementación.

Diversos estudios describen la capacidad de especies bacterianas (principalmente de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) de modular la producción de citoquinas y mediadores pro- o anti-inflamatorios por células dendríticas⁴⁰, macrófagos⁴¹ y células de epitelio intestinal^{42,43}.

En cuanto a levaduras se refiere, *Saccharomyces boulardii* ha sido utilizada ampliamente en el tratamiento de afecciones gastrointestinales humanas⁴⁴⁻⁴⁶.

Como se mencionó en el capítulo 2, *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154, es capaz de modular la expresión transcripcional *in vitro* de citoquinas pro-inflamatorias, tales como Ccl20, Cxcl1, Cxcl8 y Cx3cl1 cuando las células epiteliales son estimuladas con agonistas proinflamatorios como LPS, Flagelina, IL-1 β o TNF- α ; este efecto es específico para los genes mencionados y no se ha visto afectada la expresión de genes con funciones no inmunológicas. Se ha descrito que la flagelina de las bacterias comensales juega un papel crítico en el establecimiento de la respuesta inflamatoria en la enfermedad de Crohn⁴⁷. La capacidad de las levaduras para disminuir la respuesta proinflamatoria disparada por este agonista en los modelos *in vitro* indica que podría ser de gran utilidad en un sistema *in vivo*.

Dada la importancia de la respuesta inflamatoria innata en las infección por *Salmonella* o en el inicio y establecimiento de las enfermedades inflamatorias intestinales, es de particular interés el estudio de la aplicación de microorganismos con capacidad inmunomoduladora para el tratamiento de tales afecciones.

En el presente capítulo se utilizaron estos modelos de inflamación intestinal para evaluar la capacidad inmunomoduladora *in vivo* de la respuesta epitelial de los microorganismos aislados de kefir, particularmente la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154.

Objetivo específico: Utilizando modelos *in vivo*, estudiar las propiedades antiinflamatorias descritas para los microorganismos previamente seleccionados.

Resultados

Modelo murino de inflamación en asa intestinal ligada

Como primer aproximación hacia un modelo *in vivo* de inflamación intestinal, se desarrolló un modelo de estimulación con flagelina en el compartimento luminal del intestino delgado de ratones Balb-c. La cirugía consiste en la anestesia del animal, apertura de la capa externa de piel y exposición del peritoneo, apertura del mismo por la línea *alba*, exposición de la segunda asa duodenal y ligación con hilo quirúrgico. Esto delimita una sección del intestino en donde se puede manipular su contenido y estudiar el efecto local, lo cual sería dificultoso si se mantiene el peristaltismo y tránsito intestinal normal. En el asa ligada se inyectó una suspensión de flagelina de manera de tener una dosis final de 22,5 μg o 450 μg . En los animales control se inyectó PBS. Luego de 2 horas los animales fueron sacrificados y se extrajo parte del tejido para estudiar la expresión de la citoquina proinflamatoria Ccl20. En la figura 3.3 se muestra el proceso de ligación del asa intestinal y el protocolo de trabajo.

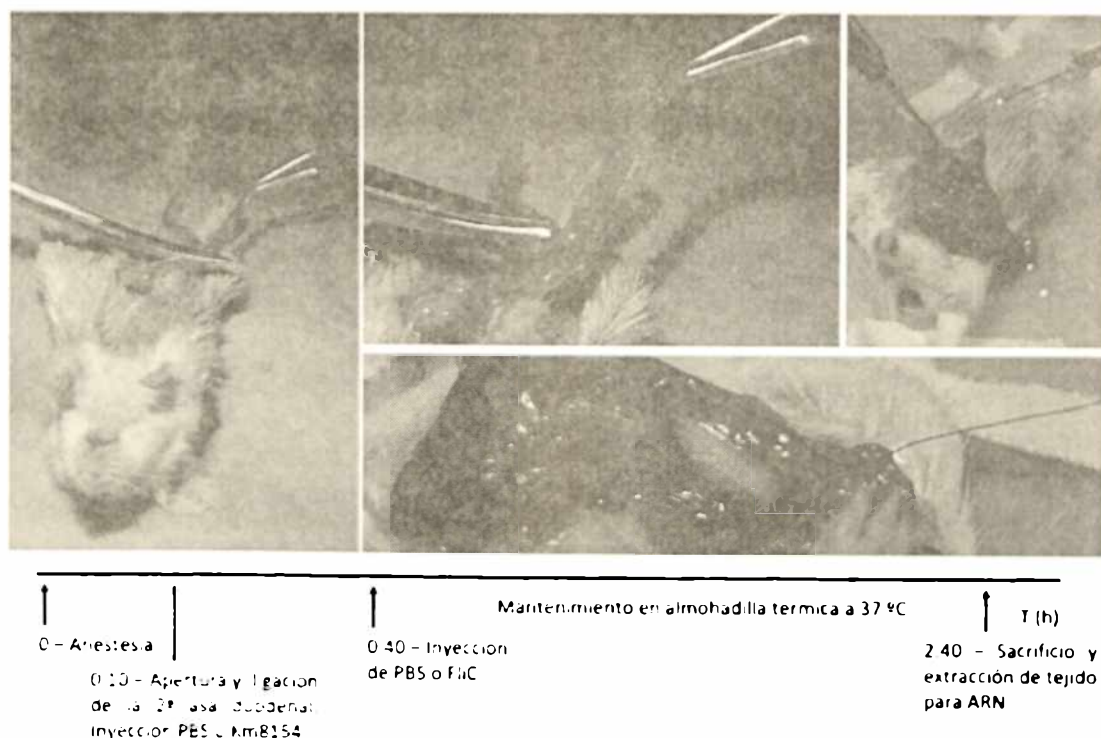


Figura 3.3 – Cirugía de ligación de asa intestinal. Imágenes y línea de tiempo del ensayo.

Los primeros ensayos consistieron en la puesta a punto del sistema. Como principal variable se ajustó la dosis de flagelina a inyectar, la dosis óptima para la estimulación fue de 450 μg (Figura 3.4A).

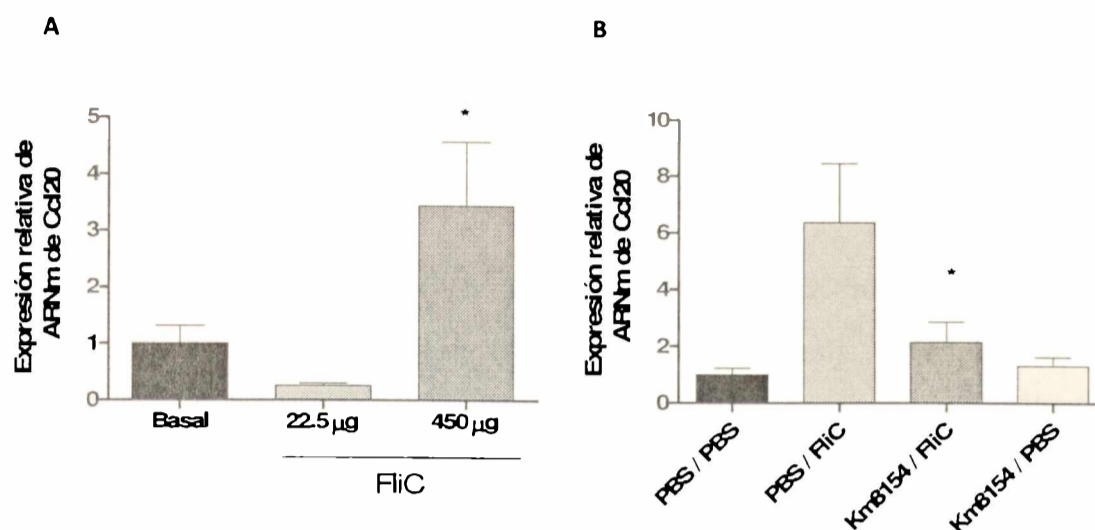


Figura 3.4 – Expresión de ARNm de la quimocina Ccl20 en muestras de intestino tomadas de los ensayos de ligación de asa duodenal. **A** Puesta a punto de la dosis de flagelina. **B** La administración de Km8154 intraluminal modula la expresión de Ccl20. Diferencia significativa * $p < 0,05$ ANOVA + test de Dunnet comparando contra el control Basal en **A** y PBS/FliC en **B**. Resultados representativos de 3 ensayos independientes con 3 animales por grupo.

La administración intraluminal de flagelina en altas concentraciones induce significativamente la expresión de Ccl20. Cabe destacar que la expresión relativa a actina del ARNm de Ccl20 es mucho menor en este sistema que la observada para experimentos *in vitro*. La baja respuesta a flagelina observada en los ensayos de asa ligada, en comparación con los resultados de estimulación obtenidos *in vitro* podrían explicarse por una menor distribución de TLR5 en el epitelio intestinal, así como también a la presencia de mucus, contenido intestinal y microorganismos que mediante interacciones fisicoquímicas podrían causar una disminución de la disponibilidad de flagelina para estimular el epitelio intestinal.

Una vez ajustada la dosis de flagelina a administrar se procedió a ensayar si la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 era capaz de modular la expresión de Ccl20 en este sistema. Para ello 30 minutos antes de la estimulación se inyectó una suspensión de 10^6 UFC/ml de la levadura y PBS en los animales control. Esta es una simplificación del modelo que no incluye la administración oral de las levaduras que se decidió por cuestiones de infraestructura. Los ensayos de ligación del asa intestinal se realizaron en el Laboratorio de Transplante de Órganos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata con la ayuda de los doctores Natalia Lausada y Pablo Stringa, especialistas en microcirugía, quienes poseen las instalaciones

adecuadas para la anestesia y soporte vital de los ratones en dichos ensayos.

En la Figura 3.4B puede observarse que la expresión de Ccl20 en la zona ligada se ve aumentada frente al estímulo con flagelina y la preincubación con la levadura la disminuye significativamente, reproduciendo en este modelo los resultados observados en los capítulos 1 y 2 empleando sistemas *in vitro*. Cabe destacar que la administración de la levadura no causa ningún efecto adverso en los ratones.

El modelo de estimulación intraluminal con flagelina purificada muestra ser útil para probar la capacidad moduladora *in vivo*, sin embargo no es fisiológico puesto que no considera el efecto del pasaje por el tracto digestivo de la levadura. Los resultados alentadores obtenidos en esta primera aplicación en un sistema *in vivo* abren el camino a la aplicación en nuevos modelos. Antes de proceder a ensayos en modelos más fisiológicos, se optimizaron las condiciones experimentales para la administración oral de una suspensión de levadura.

Factibilidad de la administración de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 en el agua de bebida

Para evaluar la eficiencia de la administración *ad libitum* de la levadura suspendida en el agua de bebida, se estudió su viabilidad y variación de la concentración en función del tiempo. Una suspensión de levadura se preparó utilizando agua estéril y se tomaron muestras cada 2 horas durante 8 horas para realizar el recuento de levaduras viables en agar YGC (Figura 3.5). La viabilidad no varió significativamente durante las primeras 8 horas del ensayo, independientemente de la concentración inicial de microorganismos utilizada, sin embargo se observa que los mismos decantan al cuello de la botella en este lapso, concentrándose en la parte más cercana al pico por el que los animales beben. Dicho fenómeno compensaría la disminución en el recuento de levaduras viables de entre 1 y 1,5 órdenes de magnitud observada a las 24 horas de haber preparado la suspensión. Para los ensayos posteriores, se implementó una estrategia de recambio de la suspensión cada 24 h, durante las tardes, considerando los hábitos nocturnos de los ratones, de manera de aumentar la dosis efectiva de suspensión “fresca”.

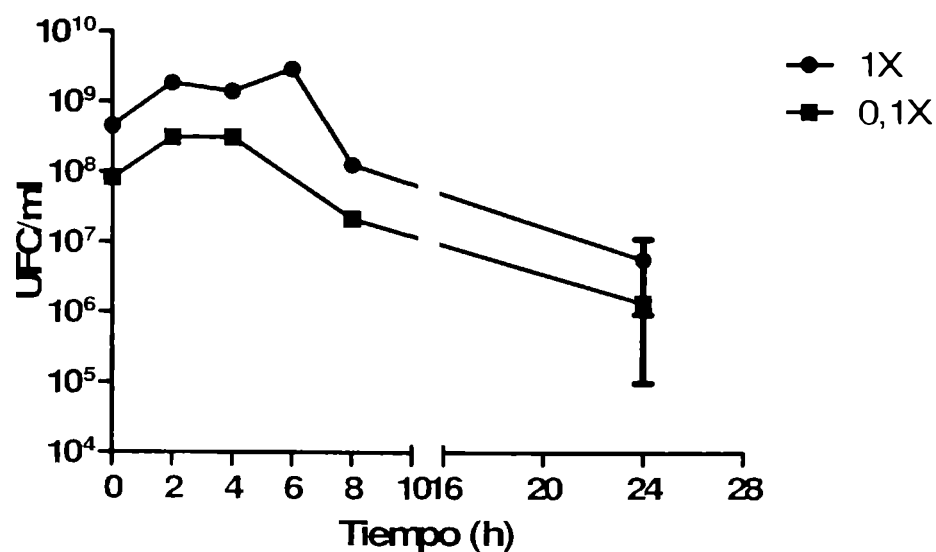


Figura 3.5 – Supervivencia de la levadura *K. marxianus* CIDCA 8154 en el agua de bebida para ratones. Se muestran dos concentraciones iniciales diferentes 1X ($\sim 1 \cdot 10^9$ UFC/ml) y 0,1X ($\sim 1 \cdot 10^8$ UFC/ml). Se muestra la media y el error estándar de dos ensayos independientes.

Evaluación de la supervivencia de las levaduras seleccionadas al pasaje por el tracto gastrointestinal murino

Una vez decidida la estrategia de administración más cercana a las condiciones fisiológicas de administración de un probiótico se procedió a evaluar la capacidad de levaduras seleccionadas de sobrevivir al pasaje por el tracto gastrointestinal de ratones de la cepa Balb-c.

Se administró en agua de bebida una suspensión de $1 \cdot 10^8$ UFC/ml de las levaduras *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154, *Saccharomyces cerevisiae* CIDCA 8112 o *Saccharomyces boulardii* durante 12 días con un recambio cada 24 horas. Se realizó un seguimiento individual del recuento de levaduras en heces para cada ratón (4 por grupo) durante los 12 días de administración para evaluar la capacidad de las levaduras de sobrevivir al pasaje por el tracto gastrointestinal. Luego del día 12 se realizaron recuentos para evaluar la persistencia de las mismas. En la figura 3.6 se muestran los valores promedio de unidades formadoras de colonia por gramo de materia fecal.

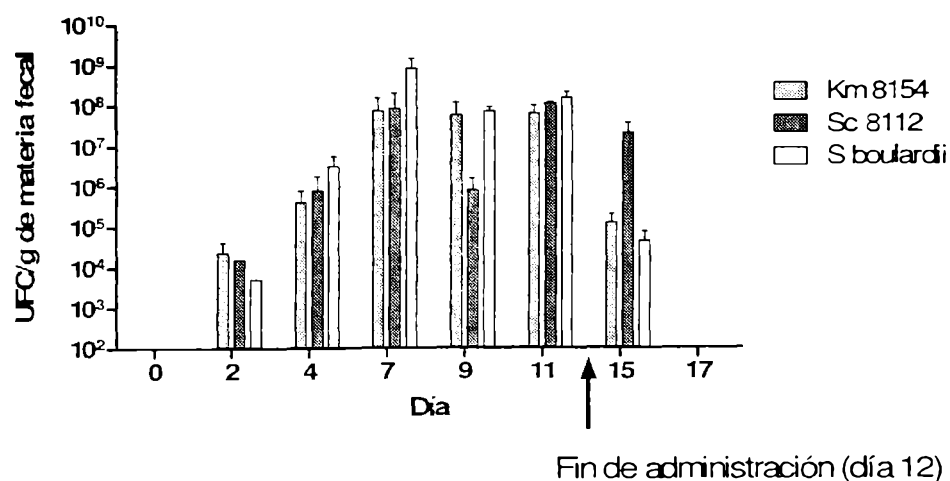


Figura 3.6 – Supervivencia y persistencia de las levaduras al pasaje por el tracto gastrointestinal de ratones de la cepa Balb-c. La administración se realizó de manera continua durante 12 días. Se realizaron recuentos en agar YGC en los días indicados. No se encontraron levaduras en heces los días 0 y 17. Se muestran los valores promedio y el desvío estándar de dos ensayos independientes con 4 animales por grupo. Km *Kluyveromyces marxianus* Sc *Saccharomyces cerevisiae*.

Las levaduras se detectan en heces al cabo de 2 días de iniciada la administración de la suspensión por vía oral. A los 7 días se alcanza la mayor concentración de levaduras en heces, variando entre $1 \cdot 10^8$ y $1 \cdot 10^9$ UFC/ml y se mantiene durante todo el período de administración. Al día 12, se suspendió la administración de microorganismos y 5 días después (día 17) no se detectaron levaduras en heces. Resultados similares se observaron utilizando la cepa de ratones C57BL/6, indicando la ausencia de efectos específicos de cepa de ratón en la supervivencia de las levaduras al pasaje del tracto gastrointestinal.

Como se ha demostrado en los ensayos *in vitro*, para las levaduras, la capacidad moduladora de la respuesta inflamatoria es dependiente de la viabilidad de las mismas, por lo que la capacidad de supervivencia al pasaje por el tracto gastrointestinal de ratones es una característica deseable. Existen muchos estudios donde las condiciones gastrointestinales son simuladas *in vitro* evaluando la resistencia a bajo pH, altas concentraciones de bilis^{48,49}, sin embargo es escasa la bibliografía acerca de la evaluación de supervivencia y persistencia de probióticos en el tracto gastrointestinal y están limitados a aplicaciones en animales de interés comercial como pollos, vacas o conejos⁵⁰⁻⁵².

Estudio de la distribución de las levaduras en el tracto gastrointestinal murino

Una vez determinadas la supervivencia y la persistencia de las levaduras en el tracto gastrointestinal murino, se estudió la distribución de dichos microorganismos en el mismo. Para ello se suministró en agua de bebida una suspensión de levadura tal como se indica en la sección anterior durante tres días, luego de lo cual se sacrificaron los animales. Se tomaron muestras de duodeno, ileon, ciego y colon y se evaluó la cantidad de levaduras viables en cada sección. Para poder comparar entre las mismas, se refirieron las unidades a UFC/cm de tejido tal como se explica en la sección de materiales y métodos.

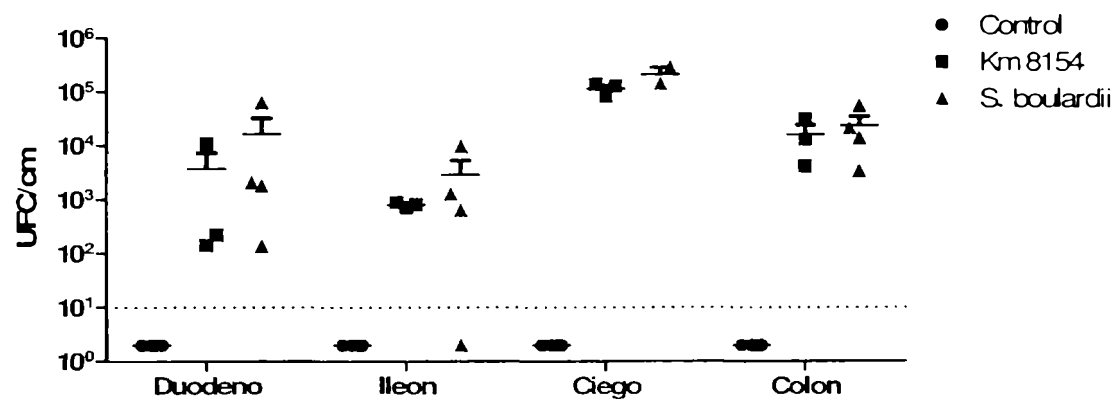


Figura 3.7– Distribución de las levaduras en el tracto gastrointestinal de ratones Balb-c. La línea punteada indica el límite de detección inferior del método de recuento. A los animales del grupo de control se les administró agua normal. Km *Kluyveromyces marxianus*.

En la figura 3.7 se puede apreciar que tanto *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 como *Saccharomyces boulardii* se encuentran en mayor concentración en las porciones distales (ciego y colon). Esto podría deberse en parte a los movimientos peristálticos que arrastran a las levaduras junto con el contenido y al mayor calibre de las porciones distales.

Se evaluó también la traslocación de levaduras a hígado y bazo y en ningún caso se obtuvieron recuentos positivos, lo que indica que las levaduras permanecen en el tracto gastrointestinal.

Este estudio acerca de la distribución de levaduras viables a lo largo de todo el intestino indica la factibilidad de su potencial aplicación en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales

o de infecciones causadas por patógenos.

Modelo murino de infección con *Salmonella typhimurium*

Habiendo ajustado las condiciones de administración oral de la suspensión de levaduras, se procedió a estudiar su efecto en modelos de inflamación intestinal.

Se evaluó la supervivencia de la levadura *Kluyveromyces marxianus* 8154 al pasaje por el tracto gastrointestinal de ratones C57BL/6 con diferente complejidad de flora intestinal, animales con microflora normal (*wt*) y animales LCF (del inglés *Low Complexity Microflora*, microflora de baja complejidad), estos animales han sido criados en condiciones de esterilidad desde su nacimiento y poseen una microflora compuesta de pocas especies y con diferente proporción que los animales *wt*. Estos animales se caracterizan por ser susceptibles a las infecciones intestinales y tener estructuras orgánicas diferentes de los animales *wt* como hipertrofia del ciego y longitud intestinal disminuída.

A diferencia de los animales LCF, en los animales *wt* la infección con *Salmonella* sólo puede lograrse con un tratamiento previo con estreptomycin que genera un desbalance en la flora intestinal creando un nicho propicio para el establecimiento del patógeno.

En la figura 3.8 se muestran los resultados de los recuentos microbiológicos de levadura en heces de los ratones, a los cuales se les administró en agua de bebida, *ad libitum*, una suspensión de $1 \cdot 10^6$ UFC/ml (1X) o $2 \cdot 10^6$ UFC/ml (2X) durante 3 días. Al día 4 se administró de manera intragástrica una dosis única de 20mg de estreptomycin. Al quinto día los animales fueron sacrificados. Se observa que al segundo día de administración de levaduras, se consigue obtener un recuento de entre 10^4 UFC/g heces, con un máximo de 10^6 UFC/g heces en el día 3. En el día 4 la administración de levadura fue suspendida y al día 5 se puede apreciar la caída del recuento, indicando que la levadura no es capaz de colonizar el tracto gastrointestinal y que no es afectada por el antibiótico.

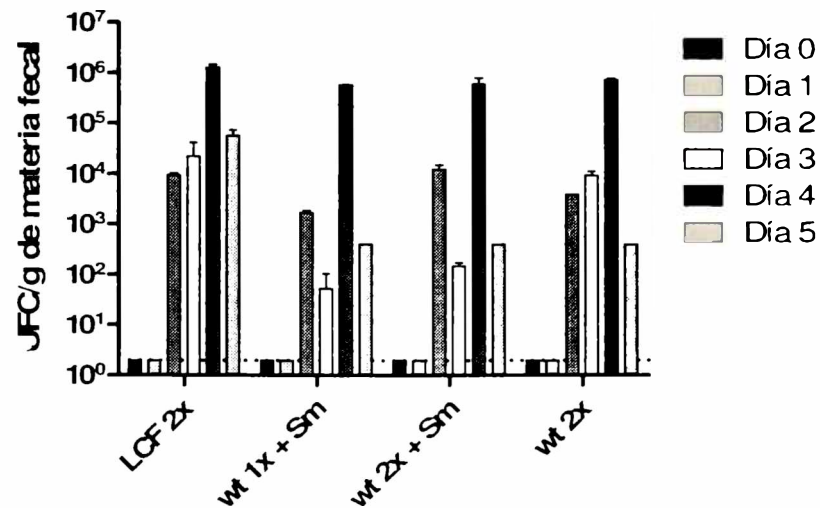


Figura 3.8 – Supervivencia de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 al pasaje por el tracto gastrointestinal de ratones C57BL/6 con microflora convencional (wt) o con microflora de baja complejidad (LCF). 1x y 2x se refieren a las dosis de levadura administradas en el agua de bebida. A dos de los grupos wt se los trató al cuarto día con estreptomycin (Sm). Se muestran los valores promedio y la desviación estándar de un ensayo con 4 animales por grupo.

El establecimiento de la levadura en los animales LCF es ligeramente más rápido que en los animales wt que recibieron la misma dosis de levadura y resulta ser más persistente. En base a esto último se decidió utilizar el modelo de animales LCF para los ensayos de infección con *Salmonella*. Animales LCF fueron tratados con levadura según se describe más arriba, al día 4 fueron infectadas con una única dosis de *Salmonella* ($5 \cdot 10^7$ UFC) por vía oral. Al día 6 los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de diferentes secciones del intestino para recuento de *Salmonella* y de levadura. Los resultados se muestran en la figura 3.9.

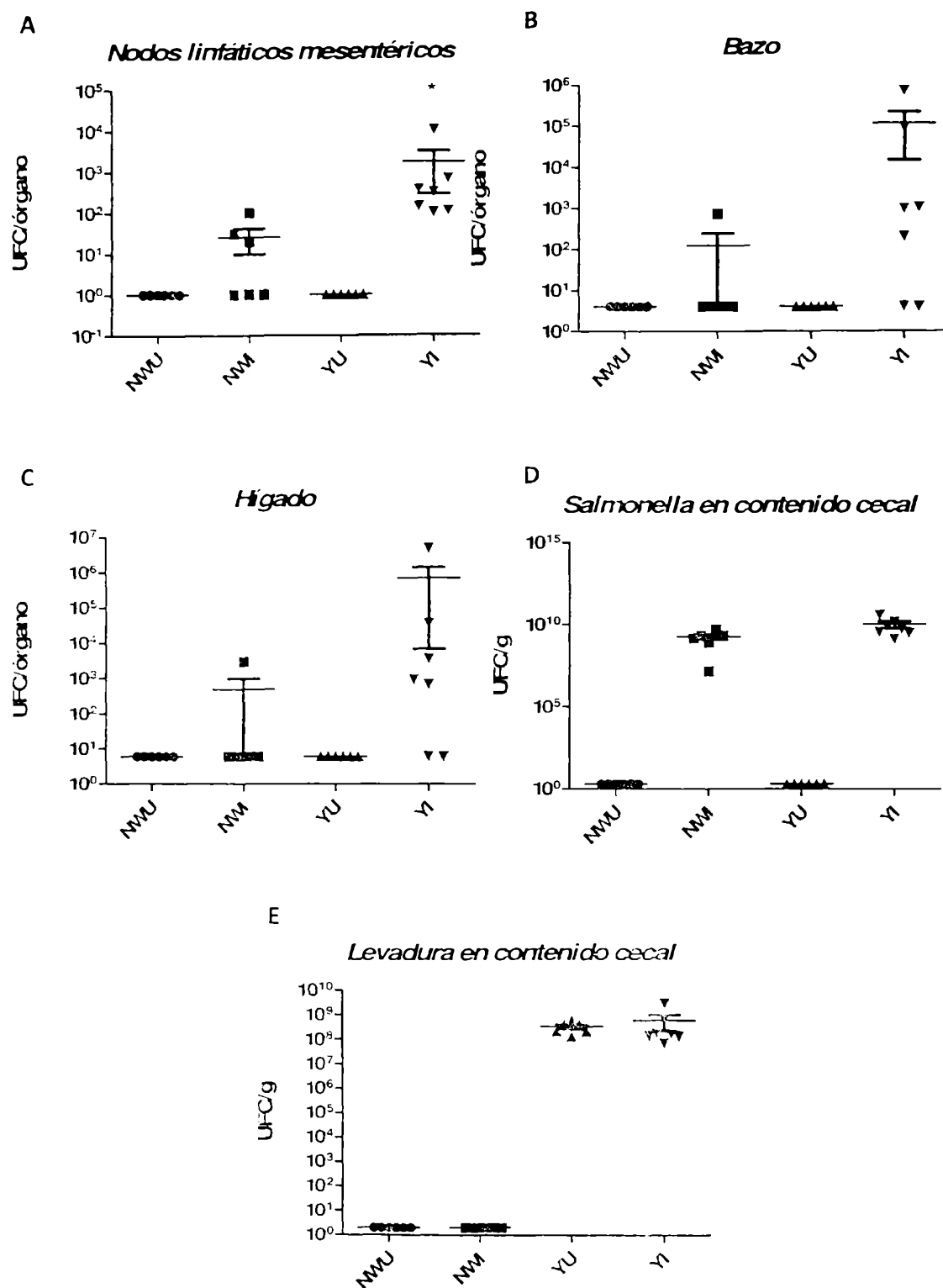


Figura 3.9 – Recuentos de *Salmonella* en nodos linfáticos mesentéricos (A), Bazo (B) hígado (C) y contenido del ciego (D). (E) Recuento de levadura en contenido de Ciego. NWU control no infectado al que se le administró agua de bebida normal. NMI control de infección al que se le administró agua normal. YU control sin infectar al que se le administró la suspensión de levadura. YI grupo al que se le administró la suspensión de levadura y luego se desafió con *Salmonella*.

Se observa que la traslocación de *Salmonella* a órganos periféricos como hígado y bazo no es significativa, y que el tratamiento con levadura no modifica el número de *Salmonella* establecida

en el colon. Aunque existe un aumento aparente de la traslocación a hígado y bazo de *Salmonella* en los animales tratados con levadura, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en este comportamiento. El recuento de levaduras en el ciego (Figura 3.9E) muestra que las mismas pudieron establecerse.

El análisis histopatológico llevado a cabo, muestra un *score* inflamatorio inferior a 3 en todos los grupos de animales analizados, es decir que no se puede apreciar inflamación ni siquiera en los animales a los que se les administró *Salmonella*. Este hecho no permite concluir acerca del poder protector de la administración de levadura en el contexto de la infección con *Salmonella*, probablemente por una cuestión de cinética del establecimiento de la infección. Los experimentos mostrados en esta sección fueron llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Wolf-Dietrich Hardt *Eidgenössische Technische Hochschule Zürich*, Suiza durante una estadía breve financiada por una beca de *Boehringer-Ingelheim Fonds* y la Universidad Nacional de La Plata. Nuestro grupo de trabajo se encuentra en tratativas de continuar esta cooperación y completar los estudios en estos modelos animales exclusivos del laboratorio del Dr. Hardt.

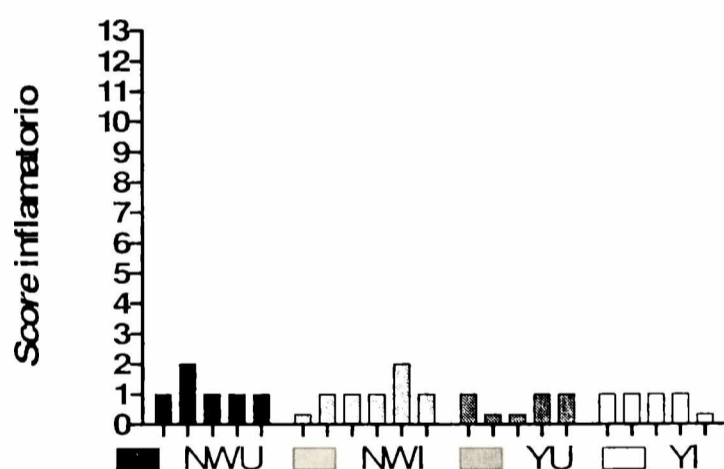


Figura 3.10 – Caracterización histopatológica de la infección con *Salmonella* en ratones C57-BL/6 LCF. NWU control no infectado al que se le administró agua de bebida normal. NWI control de infección al que se le administró agua normal. YU control sin infectar al que se le administró la suspensión de levadura. YI grupo al que se le administró la suspensión de levadura y luego se desafió con *Salmonella*. La evaluación, realizada a doble ciego, considera los siguiente puntajes: Edema en la submucosa (*score* 0–3), infiltrado de leucocitos polimorfonucleares en lámina propia (*score* 0–4), pérdida de células caliciformes (*score* 0–3), y daño epitelial (*score* 0–3). El *score* final se obtiene por la suma de esos valores.

Modelo de colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobencen-sulfónico (TNBS)

Uno de los modelos más utilizados de inflamación intestinal en ratones es la inducción de colitis

por la administración intrarrectal de TNBS. Este modelo experimental ha sido aceptado como modelo de enfermedad de Crohn, ya que el mismo genera inflamación en la mucosa con un perfil de activación tipo Th1 y una excesiva producción de citoquinas proinflamatorias como $\text{iFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ e IL-12^{36} . La principal lectura de este modelo es la histopatología del recto. El daño tisular se caracteriza por edema en la capa submucosa, un gran infiltrado linfocitario, eliminación de la capa mucosa y daño epitelial. Se ha descrito que la variabilidad genética en los ratones, así como la edad de los mismos al momento del ensayo influyen en el correcto establecimiento del modelo.

Como primera aproximación se evaluó la dosis efectiva de TNBS que pudiera generar una histopatología acorde con el cuadro de inflamación aguda. Se ensayaron 2 concentraciones de TNBS diferentes: 1,5% y 2,5% instiladas en una única dosis al día cero en 200 μl de etanol al 50%. Los animales control fueron instilados con etanol al 50%. Se realizó un seguimiento del peso de los animales durante 7 días y luego del sacrificio se realizaron preparados histológicos del recto de los animales utilizando la técnica de tinción con hematoxilina-eosina (HE). Como se muestra en la figura 3.11, el peso de los animales no varía significativamente a lo largo del tratamiento. La histopatología no muestra daño en epitelio, sin embargo la gran cantidad de infiltrado puede indicar que el tejido ha sido reparado de un daño reciente.

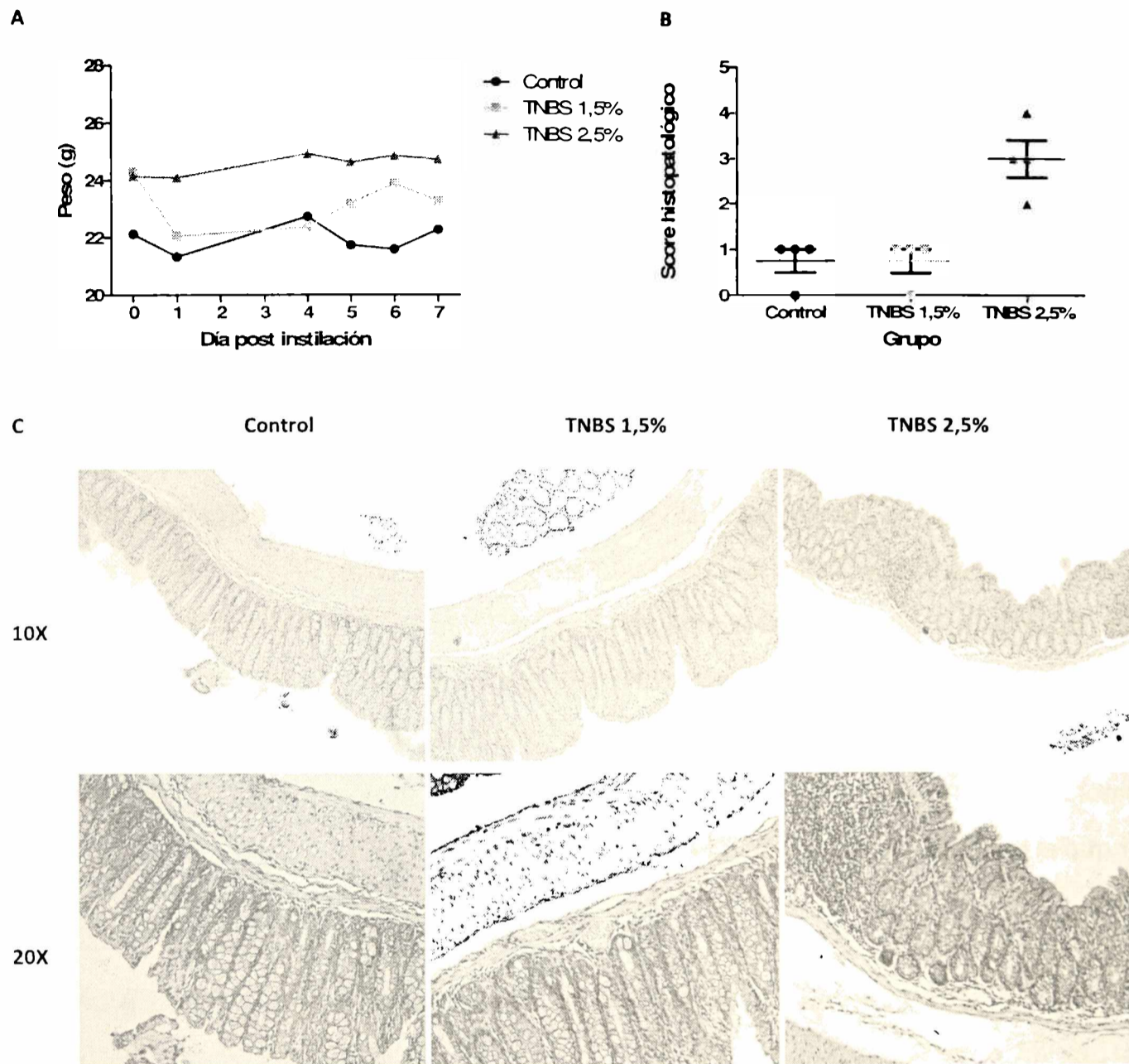


Figura 3.11 – Efecto de la dosis de TNBS intrarrectal sobre el peso (A) y sobre la histopatología (B) en ratones Balb-c sacrificados a los 7 días post inoculación. C Preparados histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina del recto de los animales tratados.

Para probar esta hipótesis, se realizaron ensayos donde se instilaron animales Balb-c de 6 semanas con una única dosis de 200µl de TNBS al 2.5% en etanol 50% como vehículo y se sacrificaron distintos grupos de animales a las 48, 72 y 96 horas post-institución. Los resultados se muestran en la figura 3.12.

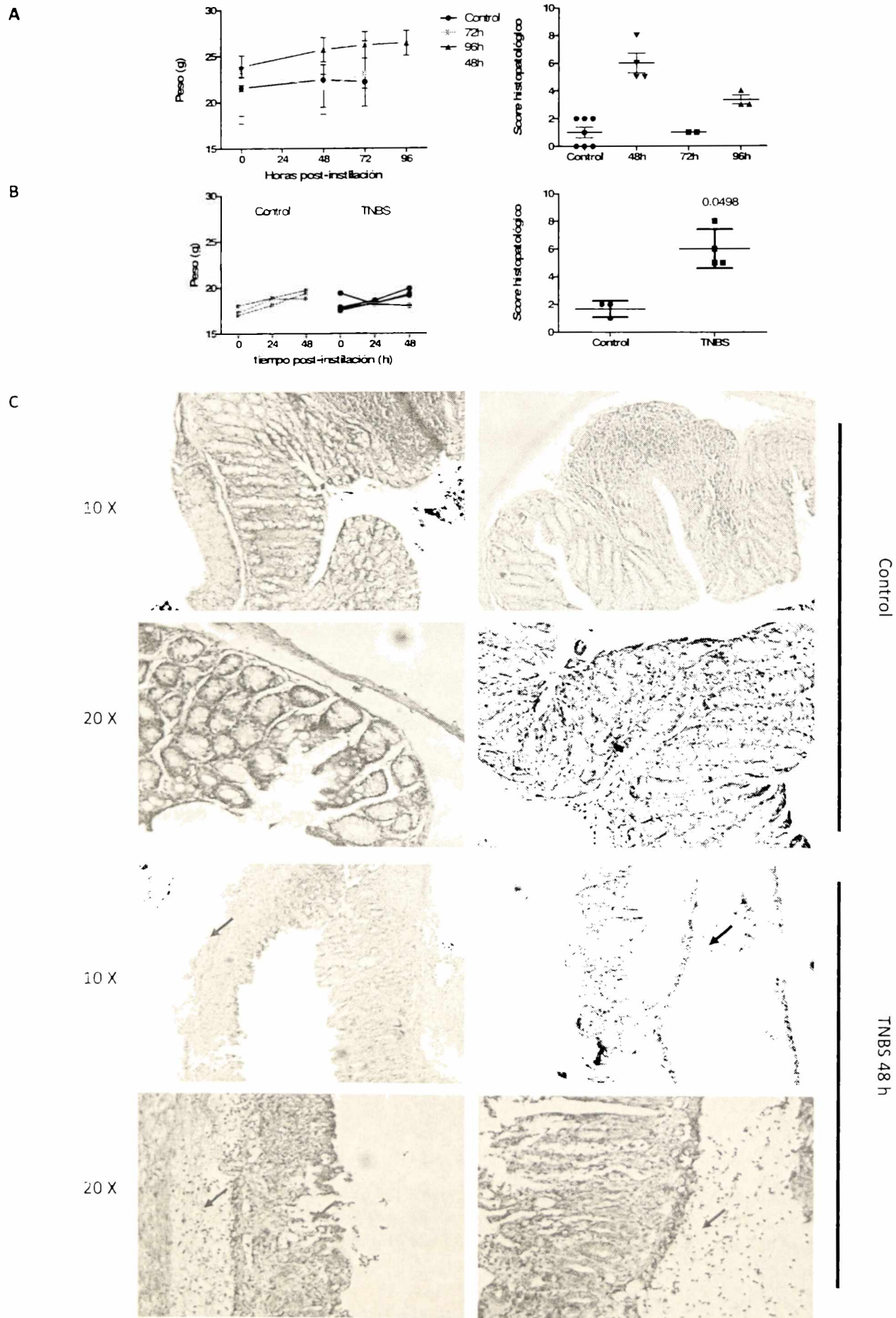


Figura 3.12 - A Cinética del daño histopatológico en recto de ratones Balb-c por la instilación intrarrectal de TNBS al 2,5%. **B** Detalle del peso e histopatología a las 48 hs post-institución. **C** Cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina de los animales control y tratados con TNBS por 48 hs. Las flechas negras indican las áreas de daño epitelial, edema e infiltrado de la submucosa.

La histología de los animales sacrificados 48 horas luego de la instilación de TNBS 2,5% muestra un claro daño en la capa epitelial con pérdida de las células caliciformes y edema en la capa submucosa con infiltrado. Para los siguientes ensayos se utilizaron estas condiciones de concentración de TNBS y tiempo de sacrificio como modelo de colitis.

Una vez establecido el modelo de inflamación y la histopatología, se procedió a evaluar el efecto de la administración en agua de bebida de una suspensión de *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 sobre la histopatología en el colon de los animales tratados con TNBS. Para este fin se administró en agua de bebida una suspensión de 2×10^6 UFC/ml de la levadura *K. marxianus* CIDCA 8154 durante 3 días, tal como se realizó en los ensayos de infección por *Salmonella* descritos previamente. Luego de los tres días, los animales fueron separados en cuatro grupos de al menos 4 animales por grupo en cada ensayo, los animales a los que se les administró agua normal de bebida fueron separados en dos grupos AGUA/Vehículo, que fueron instilados con 200µl de etanol al 50% y AGUA/TNBS instilados con TNBS al 2,5% en etanol al 50%. Los animales a los que se les administró la suspensión de levadura fueron separados en dos grupos análogos Km8154/Vehículo y Km8154/TNBS de acuerdo al tratamiento que recibieron. Se realizó un seguimiento del peso luego de la instilación hasta el sacrificio a las 48 h (Figura 3.13). Los resultados del análisis histopatológico muestran el establecimiento del daño en los animales tratados con TNBS, mientras que este es mucho menor en las que recibieron levadura y fueron tratados con TNBS. Si bien la diferencia en los casos analizados es clara, su nivel de significación estadística es bajo. Se deberá confirmar este resultados aumentando el número de animales por grupo.

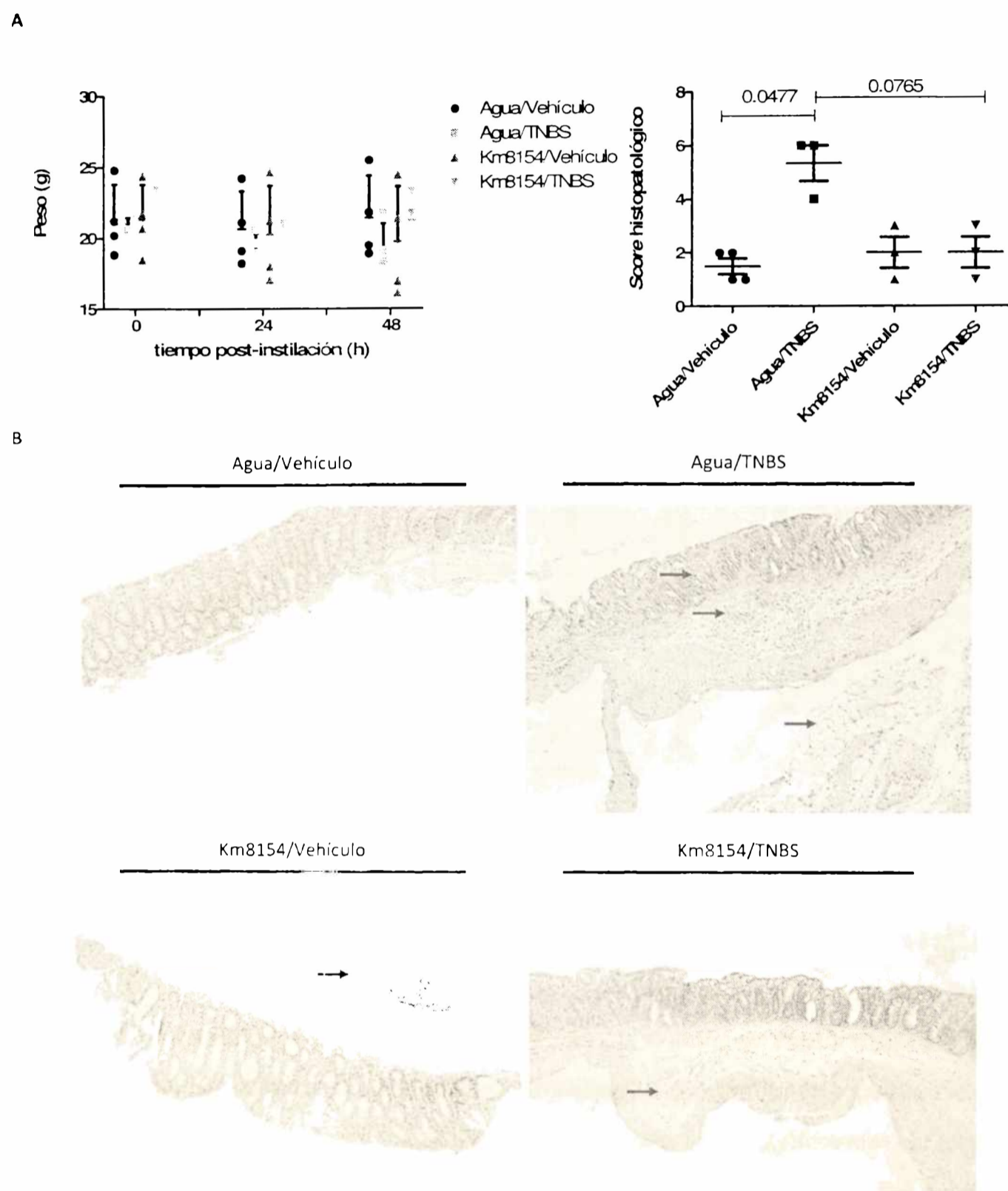


Figura 3.13 – Efecto de la administración de la levadura *K marxianus* CIDCA 8154 en agua de bebida en el modelo de inflamación intestinal inducida por TNBS. A Seguimiento de peso e histopatología. Se muestra el P valor para la prueba no paramétrica de Mann-Withney. B Cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. Las flechas indican edema e infiltrado.

Para estudiar en parte los mecanismos moleculares puestos en juego durante el desarrollo de la inflamación se estudiaron los perfiles de expresión de ARNm de CXCL1, CXCL2 e IL-6 en el colon de

los animales tratados con TNBS al 2,5% durante 48 h utilizando PCR cuantitativa en tiempo real.

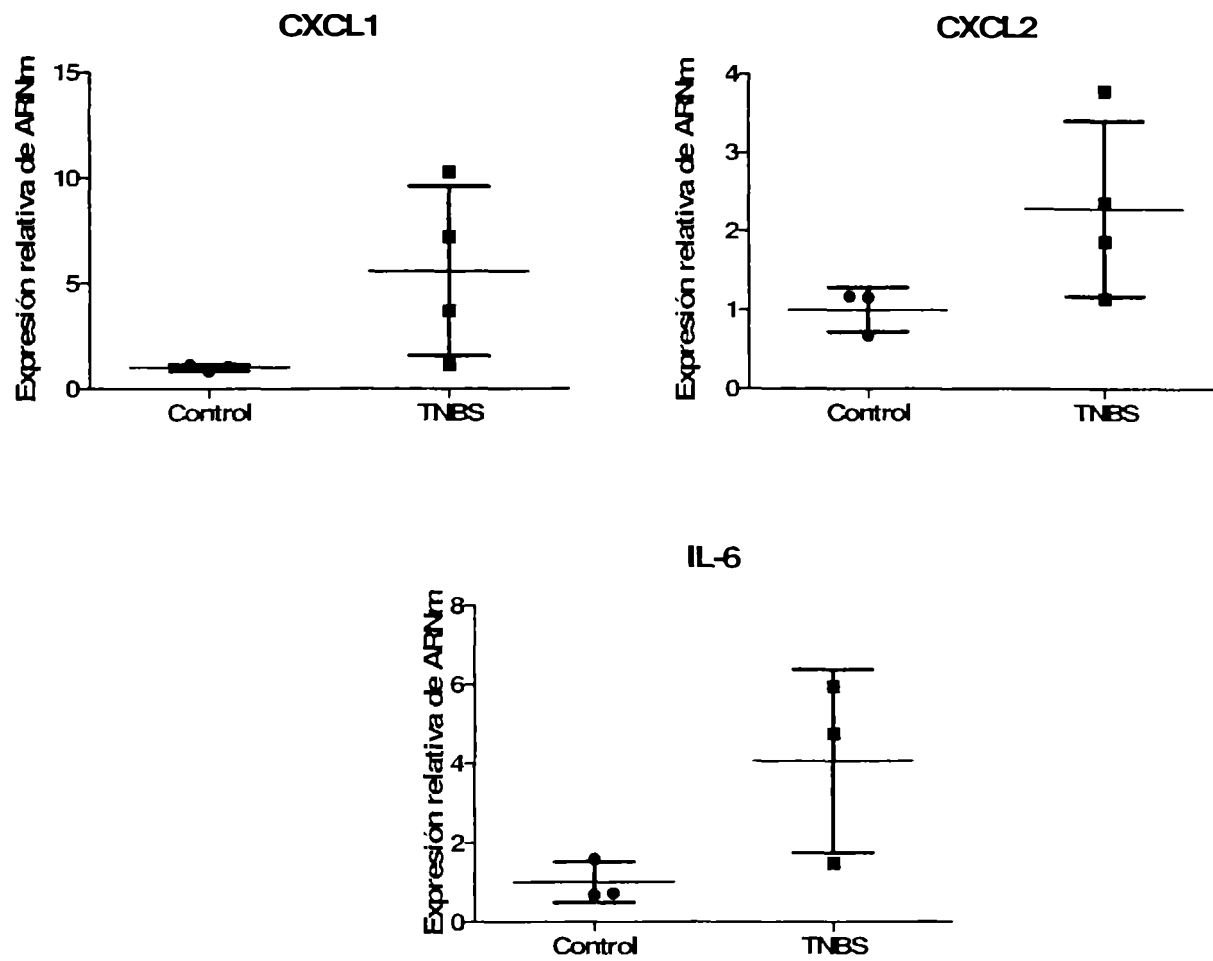


Figura 3.14 – Expresión de las quimoquinas CXCL1 y CXCL2 e IL- 6 en colon de animales tratados con TNBS al 2,5% por 48 h. No se aprecian diferencias significativas t-Student.

Los niveles de expresión de las citoquinas proinflamatoria se ven aumentados por la administración de TNBS, aunque esta diferencia no es significativa, probablemente esto sea debido a una cuestión de cinética de la expresión génica y a la variabilidad en las medidas individuales.

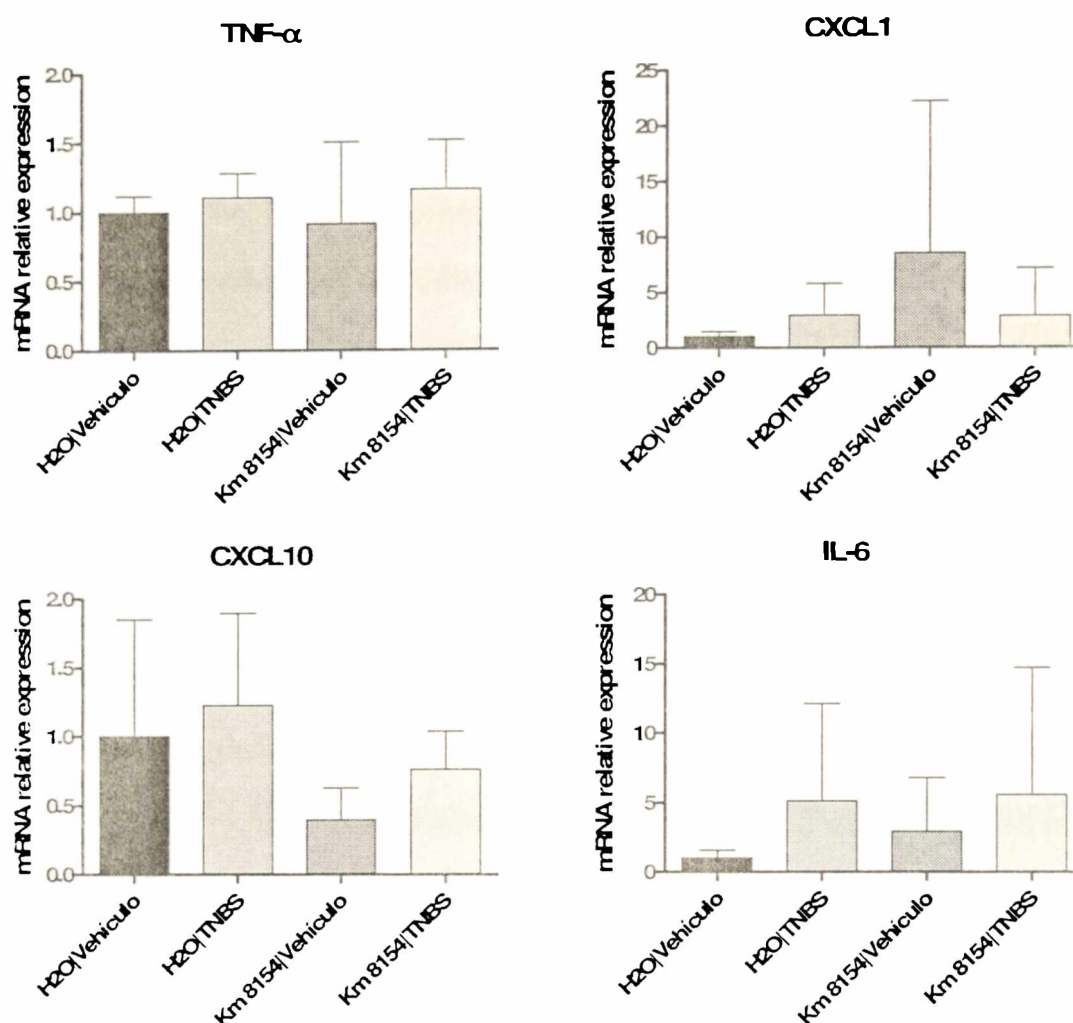


Figura 3.15 – Expresión de las quimoquinas TNF, CXCL1, CXCL2 e IL-6 en colon de animales tratados con TNBS al 2,5% por 48 h. No se aprecian diferencias significativas t-Student.

La variabilidad en los niveles de expresión de citoquinas depende de varios factores. En primer lugar el tiempo de medida es a 48 h post inducción de la inflamación, lo niveles de expresión de ARNm podrían verse elevados en tiempos más cortos y luego disminuir. Para evaluar esta hipótesis debería realizarse una cinética de inducción de la expresión de citoquinas proinflamatorias. Por otra parte, al tomar la muestra para extracción de RNA, se toma tejido inflamado (como epitelio y lámina propia) y tejido no inflamado (capa muscularis) lo que diluye la cantidad de ARNm de citoquinas proinflamatorias. Para disminuir este efecto podría extraerse el ARN de la zona epitelial mediante la selección del tejido con un microscopio de disección láser.

Discusión

La utilización de microorganismos con capacidad antiinflamatoria para el tratamiento de enfermedades intestinales con un importante componente inflamatorio es una estrategia con gran potencial de aplicación. Los ensayos en modelos animales son indispensables para el desarrollo de dichos tratamientos. Como se ha mencionado anteriormente, los modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal generan perfiles inflamatorios incompletos o parciales en comparación con la afección real, esto se debe a la gran variedad de mecanismos y factores que participan en el desarrollo de la patología, de ahí la necesidad de probar al posible candidato en diversos modelos de inflamación.

En el presente capítulo se mostraron los resultados de la aplicación diferentes modelos de inflamación intestinal para evaluar la capacidad *in vivo* de modulación de la respuesta inflamatoria innata intestinal de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154.

La levadura es capaz de sobrevivir al pasaje por el tracto gastrointestinal murino, característica deseable en un microorganismo que podría ser usado como agregado probiótico en un alimento, esto es particularmente importante dado que en el capítulo 2 del presente trabajo, se ha demostrado que estas levaduras son incapaces de ejercer su efecto modulador si no están viables. Como se ha mencionado anteriormente, existen pocas referencias en la bibliografía con respecto a la supervivencia de los microorganismos al pasaje por el tracto gastrointestinal en ensayos *in vivo*, la mayoría de los trabajos se realizan en condiciones simuladas o en animales de granja⁵⁰⁻⁵².

El uso de microorganismos probióticos en el tratamiento de infecciones gastrointestinales ha sido descrito para bacterias tales como *Bifidobacterium bifidum* en un modelo de infección por *Salmonella*⁵³, en donde la administración del probiótico revierte el daño histopatológico y aumenta la sobrevivencia. Sin embargo los estudios empleando levaduras se limitan al uso de *Saccharomyces boulardii*. Martins y colaboradores demuestran un efecto protector de esta levadura en un modelo de muerte por infección con *Salmonella* en ratones NIH de microbiota convencional y adjudican este comportamiento al efecto que la interacción entre el patógeno y la levadura tiene sobre el efecto barrera y la disminución producción de IL-8 inducida por *Salmonella* en cultivos de células epiteliales T-84⁵⁴. Dentro de los diferentes modelos proinflamatorios probados en este trabajo de

tesis, se encuentra el modelo de infección por *Salmonella* en el cual hasta el momento no se ha podido concluir si existe una protección ante la infección, sin embargo nuestro grupo de trabajo se encuentra en contacto con el laboratorio del Dr. Hardt quien dispone de estos modelos de inflamación y están siendo evaluadas futuras misiones de colaboración. En el establecimiento de la infección, *Salmonella* genera un entorno proinflamatorio en el intestino que conlleva a la eliminación de la microbiota comensal, eliminando la competencia por recursos. Dado que sin este entorno inflamatorio la infección no es exitosa¹⁶, el uso de microorganismos con capacidad anti-inflamatoria como las levaduras descritas en este trabajo, permitiría disminuir las probabilidades de infección.

Los modelos de inflamación intestinal inducidos por TNBS son ampliamente aceptados como modelos de enfermedad inflamatoria intestinal. Existen estudios revisados que muestran resultados favorables para el uso de microorganismos probióticos o combinaciones de los mismos en la remisión de síntomas de IBDs⁵⁵. Por ejemplo el uso de la combinación de bacterias probióticas VSL#3 o leches fermentadas con bifidobacterias muestra efectos positivos en la remisión de los síntomas de colitis ulcerosa. En la figura 3.16, tomada de un trabajo de meta-análisis⁵⁶ se compara en un diagrama de Forest la efectividad del uso de microorganismos probióticos en el tratamiento de IBDs.

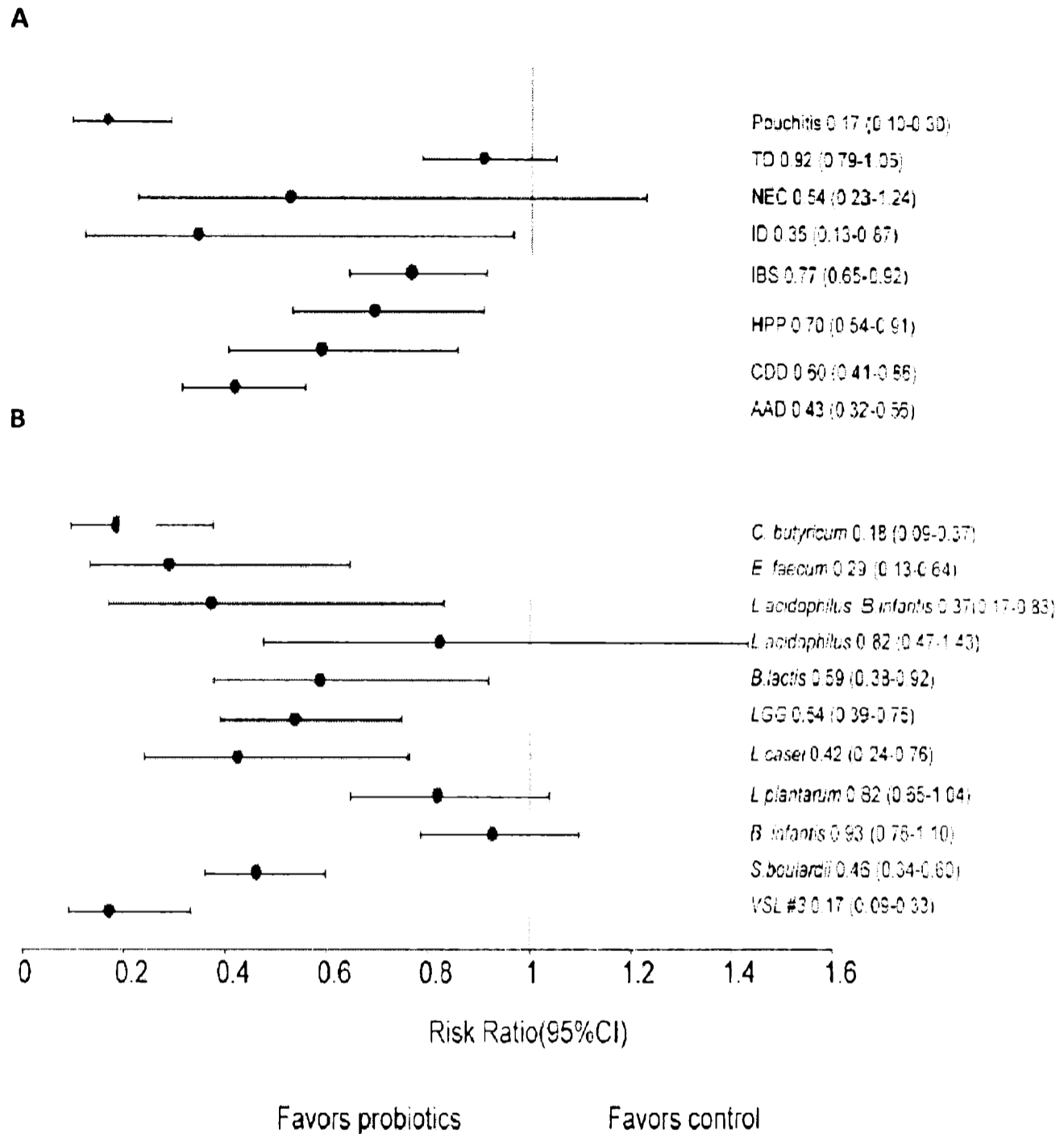


Figura 3.16 – Comparación de estudios sobre el uso de probióticos en enfermedades inflamatorias intestinales. Los resultados del meta análisis se muestra utilizando un diagrama de Forest. Los estudios con resultados favorables hacia el tratamiento con probióticos se ubican a la izquierda de la línea vertical de valor 1, la que indica un efecto nulo en comparación con el control del estudio. La longitud de las líneas horizontales indican el intervalo de confianza de un 95%. En la columna de la derecha se indican en **A** la patología tratada y en **B** el probiótico utilizado. Los números en la columna de la derecha indican la media y el intervalo de confianza al 95%. Adaptado de Ritchie, M. L. & Romanuk, T. N. A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. *PloS one* 7, e34938 (2012). **TD** Diarrea del viajero – **NEC** Colitis necrotizante – **ID** Diarrea infecciosa - **IBS** Síndrome de intestino irritable - **HPP** Infección por *Helicobacter pylori* – **CDD** infección por *Clostridium difficile* – **AAD** diarrea asociada a antibióticos.

Se puede apreciar que la estrategia terapéutica basada en microorganismos probióticos puede ser favorable en la mayoría de las IBDs (figura 3.16A). En cuanto a los tipos de microorganismos

utilizados, la mayoría de los tratamientos se basan en bacterias ácido lácticas y bifidobacterias, siendo *Saccharomyces boulardii* la única levadura utilizada. Recientemente se ha publicado el primer estudio controlado de administración de *Saccharomyces boulardii* en pacientes con enfermedad de Crohn como complemento a tratamientos basados en esteroides o salicilatos. Los autores concluyen que los pacientes que recibieron la levadura (una única dosis de 1g de levadura liofilizada por día) no mostraron una remisión significativamente mayor a las 52 semanas de tratamiento⁵⁷. Sin embargo, deberían evaluarse otras condiciones como un cambio en la dosis de microorganismo administrado, cantidad de dosis diarias, forma de administración y complementación con otros microorganismos para poder concluir formalmente acerca del uso de terapias basadas en probióticos para las enfermedades inflamatorias intestinales.

Se ha probado que la capacidad de modular la respuesta inflamatoria en modelos de IBD similares al utilizado en el presente capítulo es compartida por diferentes cepas de levaduras, y que el efecto de protección que ejercen es a nivel de mucosas y no sistémico⁵⁸.

En el presente trabajo se demuestra que la administración de levadura es capaz de revertir parcialmente el daño histopatológico causado por la administración intrarrectal de TNBS, sin embargo, son necesarios estudios posteriores para esclarecer los mecanismos moleculares tanto del evento inflamatorio generado como de la modulación por la levadura. Si la capacidad antiinflamatoria de las levaduras es capaz de tener algún efecto en la señalización intracelular del epitelio, o en la composición de la microbiota, se podrían diseñar estrategias basadas en la combinación de microorganismos probióticos y terapias farmacológicas para revertir los diferentes síntomas de las enfermedades inflamatorias intestinales.

Como perspectivas futuras para la continuación de este trabajo se podría evaluar el efecto de la administración de levaduras o de mezclas de levaduras con bacterias aisladas de kefir en la composición de la microbiota mediante técnicas de biología molecular independientes de cultivo como puede ser DGGE o secuenciación de ARNr 16S, tanto en situaciones de homeostasis inflamatoria como en condiciones proinflamatorias dadas ya sea por infecciones o por inducción química como en los modelos murinos de colitis inducida por TNBS.

Resumen de resultados y conclusiones

- *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 modula la respuesta inflamatoria disparada por la administración intraluminal de flagelina en un modelo de asa intestinal ligada.
- Las levaduras aisladas de kefir sobreviven durante 24 horas en agua de bebida, lo que permite su administración *ad libitum* por vía oral.
- Las levaduras sobreviven al pasaje por el tracto gastrointestinal de ratones Balb-c y C57BL/6, sin ser afectadas por el tratamiento con estreptomicina o la composición de la microbiota.
- No se pudo establecer correctamente el modelo de infección por *Salmonella typhimurium* en ratones C57BL/6 en animales con microbiota de baja complejidad dentro de los límites temporales del presente trabajo. Se continuará trabajando en este aspecto.
- Se puso a punto un modelo de inflamación intestinal basado en la administración intrarrectal de TNBS. La administración en agua de bebida de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 revierte parcialmente el daño histológico en el colon de los animales tratados.
- Se requieren estudios adicionales para establecer los mecanismos moleculares de inflamación en el modelo de colitis inducida por TNBS y el rol de las levaduras en la modulación de los mismos.

Bibliografía

1. Surawicz, C. M. *et al.* Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology* **96**, 981–8 (1989).
2. Jones, K. Probiotics: preventing antibiotic-associated diarrhea. *Journal for specialists in pediatric nursing*: *JSPN* **15**, 160–2 (2010).
3. D'Souza, a. L. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *Bmj* **324**, 1361–1361 (2002).
4. Buts, J.-P., Stilmant, C., Bernasconi, P., Neirinck, C. & De Keyser, N. Characterization of alpha,alpha-trehalase released in the intestinal lumen by the probiotic *Saccharomyces boulardii*. *Scandinavian journal of gastroenterology* **43**, 1489–96 (2008).
5. De Roos, N. M., Katan, M. B. & Articles, R. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *The American journal of clinical nutrition* **71**, 405–11 (2000).
6. Arienzo, R. D., Maurano, F., Lavermicocca, P., Ricca, E. & Rossi, M. Modulation of the immune response by probiotic strains in a mouse model of gluten sensitivity. *CYTOKINE* 1–6 (2009).doi:10.1016/j.cyto.2009.08.003
7. Myllyluoma, E., Ahonen, a-M., Korpela, R., Vapaatalo, H. & Kankuri, E. Effects of multispecies probiotic combination on helicobacter pylori infection in vitro. *Clinical and vaccine immunology*: *CVI* **15**, 1472–82 (2008).
8. Yang, Y.-J., Chuang, C.-C., Yang, H.-B., Lu, C.-C. & Sheu, B.-S. Lactobacillus acidophilus ameliorates H. pylori-induced gastric inflammation by inactivating the Smad7 and NFκB pathways. *BMC microbiology* **12**, 38 (2012).
9. Pantoflickova, D. *et al.* Favourable effect of regular intake of fermented milk containing Lactobacillus johnsonii on Helicobacter pylori associated gastritis. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **18**, 805–813 (2003).
10. Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, a & Campieri, M. Probiotics in infective diarrhoea and inflammatory bowel diseases. *Journal of gastroenterology and hepatology* **15**, 489–93 (2000).
11. Endt, K. *et al.* The microbiota mediates pathogen clearance from the gut lumen after non-typhoidal Salmonella diarrhea. *PLoS pathogens* **6**, e1001097 (2010).
12. Szajewska, H., Skórka, a & Dylag, M. Meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* for treating acute diarrhoea in children. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **25**, 257–64 (2007).
13. Strober, W., Fuss, I. & Mannon, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *The Journal of clinical investigation* **117**, 514–21 (2007).
14. Bacteriosis, V. I., Acha, P. N. & Street, T. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales Tercera edición. (2001).
15. Salud de la Nación, M. de *Boletín Epidemiológico Periódico*. 9–18 (2006).at <http://msal.gov.ar/html/site/sala_situacion/boletines_ultimos.asp>
16. Stecher, B. *et al.* Salmonella enterica serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biology* **5**, 2177–2189 (2007).
17. Miao, E. a *et al.* Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 3076–3080 (2010).
18. Wang, Y., Huang, H., Sun, M., Zhang, Q. & Guo, D. T3DB: an integrated database for bacterial type III secretion system. *BMC bioinformatics* **13**, 66 (2012).
19. Sperandio, D. *et al.* Virulence of the Pseudomonas fluorescens clinical strain MFN1032 towards Dictyostelium discoideum and macrophages in relation with type III

- secretion system. *BMC microbiology* **12**, 223 (2012).
20. Stecher, B. *et al.* Chronic Salmonella enterica serovar Typhimurium-induced colitis and cholangitis in streptomycin-pretreated Nramp1+/+ mice. *Infection and immunity* **74**, 5047–57 (2006).
21. Endt, K. *et al.* The microbiota mediates pathogen clearance from the gut lumen after non-typhoidal Salmonella diarrhea. *PLoS pathogens* **6**, e1001097 (2010).
22. Molodecky, N. a *et al.* Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* **142**, 46–54.e42; quiz e30 (2012).
23. Van Beelen, A. J. *et al.* Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* **27**, 660–9 (2007).
24. Bouma, G. & Strober, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature reviews. Immunology* **3**, 521–33 (2003).
25. Te Velde, A. a *et al.* Comparative analysis of colonic gene expression of three experimental colitis models mimicking inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* **13**, 325–30 (2007).
26. Alex, P. *et al.* Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflammatory bowel diseases* **15**, 341–52 (2009).
27. Sasaki, M. & Klapproth, J.-M. a The role of bacteria in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Journal of signal transduction* **2012**, 704953 (2012).
28. Chapman, J. M. *et al.* Searching for genotype-phenotype structure: using hierarchical log-linear models in Crohn disease. *American journal of human genetics* **84**, 178–87 (2009).
29. Sugimura, K. *et al.* A novel NOD2/CARD15 haplotype conferring risk for Crohn disease in Ashkenazi Jews. *American journal of human genetics* **72**, 509–18 (2003).
30. Iv, S. B. & Hill, C. The Changing Shape of Disease: Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Crohn's Disease A case series and review of the literature. *Inflammatory bowel diseases* **18**, 49–54 (2013).
31. Lesuis, N., Befrits, R., Nyberg, F. & Van Vollenhoven, R. F. Gender and the treatment of immune-mediated chronic inflammatory diseases: rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease and psoriasis: an observational study. *BMC medicine* **10**, 82 (2012).
32. Múzes, G., Molnár, B., Tulassay, Z. & Sipos, F. Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology*: WJG **18**, 5848–61 (2012).
33. Roda, G. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology* **16**, 4264 (2010).
34. Cabré, E. & Domènech, E. Impact of environmental and dietary factors on the course of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*: WJG **18**, 3814–22 (2012).
35. Pizarro, T. T., Arseneau, K. O., Bamias, G. & Cominelli, F. Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends in Molecular Medicine* **9**, 218–222 (2003).
36. Te Velde, A. a, Verstege, M. I. & Hommes, D. W. Critical Appraisal of the Current Practice in Murine TNBS-induced Colitis. **12**, 995–999 (2006).
37. Sadlack, B. *et al.* Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* **75**, 253–261 (1993).
38. Mombaerts, P. *et al.* Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* **75**, 275–282 (1993).
39. Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. & Müller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263–274 (1993).
40. Foligne, B. *et al.* A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS one* **2**, e313 (2007).

41. Marcinkiewicz, J. *et al.* Differential inflammatory mediator response in vitro from murine macrophages to lactobacilli and pathogenic intestinal bacteria. *International journal of experimental pathology* **88**, 155–64 (2007).
42. O’Hara, A. M. *et al.* Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology* **118**, 202–15 (2006).
43. Toki, S. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus casei* suppress *Escherichia coli*-induced chemokine expression in intestinal epithelial cells. *International archives of allergy and immunology* **148**, 45–58 (2009).
44. Buts, J.-P. & De Keyser, N. Transduction pathways regulating the trophic effects of *Saccharomyces boulardii* in rat intestinal mucosa. *Scandinavian journal of gastroenterology* **45**, 175–85 (2010).
45. Zanello, G., Meurens, F., Berri, M. & Salmon, H. *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases. *Current issues in molecular biology* **11**, 47–58 (2009).
46. Szajewska, H., Skórka, a. & Dylag, M. Meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* for treating acute diarrhoea in children. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **25**, 257–64 (2007).
47. Lodes, M. J. *et al.* Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *The Journal of clinical investigation* **113**, 1296–1306 (2004).
48. Sathyabama, S., Vijayabharathi, R., Bruntha Devi, P., Ranjith Kumar, M. & Priyadarisini, V. B. Screening for probiotic properties of strains isolated from feces of various human groups. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* **50**, 603–12 (2012).
49. Bao, Y. *et al.* Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control* **21**, 695–701 (2010).
50. Chaucheyras-durand, F., Chevaux, E., Martin, C. & Forano, E. Use of Yeast Probiotics in Ruminants: Effects and Mechanisms of Action on Rumen pH, Fibre Degradation, and Microbiota According to the Diet. (2012).
51. Fajardo, P. *et al.* Effects of feeding of two potentially probiotic preparations from lactic acid bacteria on the performance and faecal microflora of broiler chickens. *TheScientificWorldJournal* **2012**, 562635 (2012).
52. Ryu, R. H. K. Naturally Derived Probiotic Supplementation Effects on Physiological Properties and Manure Gas Emission of Broiler Chickens. *Journal of Agriculture & life science* **46**, 119–127 (2012).
53. Silva, a M. *et al.* Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. typhimurium in conventional and gnotobiotic mice. *Journal of applied microbiology* **86**, 331–336 (1999).
54. Martins, F. S. *et al.* Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. *PloS one* **5**, e8925 (2010).
55. Jonkers, D., Penders, J., Masclee, A. & Pierik, M. Probiotics in the management of inflammatory bowel disease: a systematic review of intervention studies in adult patients. *Drugs* **72**, 803–23 (2012).
56. Ritchie, M. L. & Romanuk, T. N. A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. *PloS one* **7**, e34938 (2012).
57. Bourreille, A. *et al.* *Saccharomyces Boulardii* Does Not Prevent Relapse of Crohn’s Disease. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* (2013).doi:10.1016/j.cgh.2013.02.021
58. Foligné, B. Probiotic yeasts: Anti-inflammatory potential of various non-pathogenic strains in experimental colitis in mice. *World Journal of Gastroenterology* **16**, 2134 (2010).

Discusión General

evadura

Discusión general, conclusiones y perspectivas

En el presente trabajo de tesis se seleccionaron microorganismos con capacidad moduladora de la respuesta innata de microorganismos aislados de kefir y se estudiaron sus mecanismos de acción y posibles aplicaciones en modelos de enfermedades inflamatorias *in vivo*.

La selección de los microorganismos se realizó mediante ensayos de modulación de la respuesta proinflamatoria disparada por flagelina en un sistema reportero generado en células de epitelio intestinal Caco ccl20:luc. Este sistema funciona mediante el promotor de la quimoquina Ccl20, una de las más sensibles a las señales proinflamatorias en ese tejido¹⁻³.

De la gran variedad de microorganismos que fueron probados se demostró que los aislados de levaduras poseen mayor capacidad moduladora, además de que el efecto se observa en todas las levaduras ensayadas. En contraposición con el comportamiento de las bacterias, que es mucho más variable, incluso entre diferentes aislados de la misma especie. La comparación entre los distintos tipos de microorganismos (bacterias y levaduras) propone un enfoque original ya que la mayoría de los trabajos basados en estudios comparativos sólo utilizan bacterias y los trabajos con levaduras se limitan al uso de *Saccharomyces boulardii*.

La diferencia de capacidad moduladora sugiere la existencia de distintos mecanismos de interacción entre los microorganismos y las células epiteliales. La comprensión de los mecanismos moduladores puede dar una base para el diseño racional de un producto polimicrobiano por selección de combinaciones de microorganismos que actúen mediante mecanismos moduladores diferentes. Hasta el momento los productos disponibles en el mercado se han desarrollado mediante la selección de microorganismos por las propiedades individuales de las cepas sin tener en cuenta si existe redundancia o no en los mecanismos de acción.

La viabilidad de los microorganismos, la multiplicidad de interacción (relación entre microorganismos/células epiteliales) y el tiempo de incubación mostraron ser factores que influyen en el efecto modulador.

En cuanto a los aspectos mecanísticos que surgen del trabajo, se puede destacar que el efecto modulador que ejercen las levaduras va más allá de la interacción flagelina/TLR5 pudiendo modular la respuesta disparada por diversos agonistas como IL-1, TNF y LPS. La modulación de la expresión génica es específica para genes proinflamatorios, la interacción con las levaduras no altera la expresión de genes relacionados con otras funciones no inmunológicas de los enterocitos, por ejemplo, la reconstrucción de epitelios, funciones metabólicas, etc.

En bibliografía, los trabajos más completos en cuanto a mecanismos de interacción entre microorganismos y células epiteliales son los del grupo de Neish y colaboradores⁴⁻⁷ quienes describen un papel importante de las especies reactivas de oxígeno (ROS), generadas en el epitelio intestinal, en la activación de las vías de ubiquitinación y degradación proteasómica intracelular. Estos autores describen que ciertas bacterias ácido lácticas (o metabolitos por ellas generados) inducen la generación de ROS en las células epiteliales, lo que inhibe la activación de las ubiquitin-ligasas, indispensables para la eliminación del inhibidor I κ B, el que al estar estabilizado, retiene al factor de transcripción NF- κ B en el citoplasma, impidiendo la transcripción de genes proinflamatorios. En el presente trabajo demostramos que 5 de las 30 bacterias ensayadas son capaces de inducir la producción de ROS en las células epiteliales. En contraposición, ninguna de las levaduras muestra este comportamiento. El mecanismo de inducción de ROS podría explicar parcialmente el efecto modulador de las bacterias *Lactobacillus plantarum* DSMZ 20174 y *L. kefir* 8348 quienes pierden la capacidad de modular significativamente en presencia de N-acetil-cisteína. Por otra parte, las levaduras, se muestran completamente independientes de este mecanismo, sin alterar su modulación la presencia de dicho antioxidante.

El mecanismo de modulación de las levaduras, claramente independiente de la inducción de ROS, todavía debe ser estudiado en profundidad. Una de las posibles explicaciones es que la levadura estaría inhibiendo las ROS inducidas por flagelina. La dualidad en la función de las ROS en la señalización epitelial es un tema hasta la fecha poco explorado⁸.

Existen pocos trabajos en donde se adjudique una propiedad inmunomoduladora a un componente de levaduras. Hasta la fecha se ha descrito que *Saccharomyces boulardii* produce un factor soluble y termoestable, de bajo peso molecular que es capaz de modular la expresión del gen para IL-8 disparada por LPS, IL-1 y TNF- α ⁹. La interacción con las células epiteliales y la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 estudiada en este trabajo descarta la existencia de un factor

análogo en esta levadura y demuestra que es necesario el contacto entre la levadura y las células epiteliales. Se demostró que la presencia de *K. marxianus* CIDCA 8154 en el lado apical de las células epiteliales es capaz de modular el estímulo de flagelina en el lado basolateral.

Como perspectivas futuras para los estudios de mecanismos de señalización se han comenzado dos aproximaciones. Por un lado, se está diseñando un protocolo de trabajo en base a un screening sobre una biblioteca de mutantes de levadura que cubre el genoma completo de *Saccharomyces*. En colaboración con el *Institut Pasteur* de Montevideo, se han realizado ensayos de modulación con las levaduras parentales de esta biblioteca y se ha demostrado que son capaces de modular la respuesta proinflamatoria disparada por flagelina en el sistema Caco ccl20:luc. El *screening* sobre la biblioteca completa, se realizará en primera instancia por grupos de mutantes relacionados por las funciones alteradas, por ejemplo, mutantes de catalasa, mutantes de enzimas para glucosilación de pared celular, etc. hasta completar el estudio sobre todos los mutantes. Mediante esta estrategia se pretende indentificar a los genes de la levadura indispensables para el efecto modulador.

Por otra parte, se ha utilizado otro modelo que resulta prometedor para el análisis molecular de la interacción huésped-comensal en sistemas *in vivo* de protección frente a estrés oxidativo y de aumento de la sobrevivencia en *Caenorhabditis elegans*, un gusano nemátodo no segmentado del cual se dispone de una colección de mutantes funcionales en todos los genes. La ventaja de este modelo es que simplifica la interacción microorganismo epitelio intestinal. El nemátodo no cuenta con microbiota propia y se alimenta de microorganismos. Resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo demuestran que la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 protegen al nemátodo del estrés oxidativo causado por peróxido de hidrógeno y modifican su vida media. Se han identificado en parte las vías de señalización intracelular responsables de este efecto y se ha demostrado que bacterias y levaduras interactúan con el epitelio mediante receptores diferentes. Estos estudios mostraron la factibilidad de emplear el modelo de *C. elegans* para caracterizar la interacción huésped-levadura probiótica a nivel molecular.



El tercer aspecto estudiado en el presente trabajo fue la posibilidad de aplicar levaduras con capacidad inmunomoduladora en modelos de inflamación intestinal.

Los ensayos en modelos de infección con *Salmonella* no arrojaron evidencia de protección, ya que al evaluar los resultados de la infección en tiempos tempranos no se pudieron observar diferencias con el grupo control. En futuros ensayos se han de considerar las diferencias en los tiempos de establecimiento del patógeno entre los animales de microbiota de baja complejidad (LCF) y los animales de microbiota convencional (WT). La cooperación entre nuestro grupo de trabajo y el laboratorio del Dr. Hardt se encuentra abierta, por lo que se espera continuar esta línea de trabajo en un futuro cercano.

El modelo de colitis inducida por TNBS muestra resultados alentadores en cuanto a la posible aplicación de *K. marxianus* CIDCA 8154 en enfermedades inflamatorias intestinales. Sin embargo, se debe profundizar en los mecanismos de acción de la levadura en el sistema, caracterizando primeramente los marcadores moleculares de la inflamación y la cinética de establecimiento de la misma. Otros posibles modelos de enfermedades inflamatorias intestinales podrían incluir la inducción de colitis por la administración oral de Dextrán Sulfato de Sodio (DSS) o la utilización de animales knock-out para IL-10 como se ha mencionado previamente.

Los estudios controlados con pacientes son necesarios para evaluar definitivamente la utilidad de los microorganismos probióticos seleccionados como tratamiento efectivo, ya que si bien los modelos murinos pueden mimetizar en parte los mecanismos celulares de daño, no incluyen las variaciones existentes en la composición de la microbiota, la dieta, la variabilidad genética de los individuos, etc.

En conjunto los resultados de la presente tesis, muestran al kefir como una fuente de microorganismos con capacidad moduladora de la respuesta inmune innata, factibles de ser aplicados en el tratamiento de enfermedades donde el componente inflamatorio tenga un papel importante para el desarrollo de la misma. Si bien es necesario profundizar los estudios, el presente trabajo demuestra que los mecanismos inmunomoduladores de bacterias y levaduras son diferentes. Las levaduras surgen como microorganismos con mayor capacidad para modular la

respuesta innata epitelial en situaciones proinflamatorias y con potencial aplicación a mediano plazo en el diseño y desarrollo racional de nuevos alimentos funcionales.

Bibliografía

1. Sierra, F. *et al.* Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 13722–13727 (2001).
2. Rumbo, M., Sierra, F., Debard, N., Kraehenbuhl, J.-P. & Finke, D. Lymphotoxin β receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium. *Gastroenterology* **127**, 213–223 (2004).
3. Schutysse, E., Struyf, S. & Van Damme, J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **14**, 409–426 (2003).
4. Jones, R. M., Mercante, J. W. & Neish, S. Reactive oxygen production induced by the gut microbiota: pharmacotherapeutic implications. *Current medicinal chemistry* **19**, 1519–29 (2012).
5. Kumar, A. *et al.* Changes in Cullin-1 Neddylation 1. *The Journal of Immunology* **1**, 538–546 (2009).
6. Kumar, A. *et al.* Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. *The EMBO journal* **26**, 4457–66 (2007).
7. Swanson, P. a *et al.* Enteric commensal bacteria potentiate epithelial restitution via reactive oxygen species-mediated inactivation of focal adhesion kinase phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 8803–8 (2011).
8. Gloire, G., Legrand-Poels, S. & Piette, J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical pharmacology* **72**, 1493–505 (2006).
9. Sougioultzis, S. *et al.* *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression. *Biochemical and biophysical research communications* **343**, 69–76 (2006).

Materiales y métodos

AGK

Granulios CIP
Kefir

Materiales y métodos

Cultivo de células

Las líneas celulares Caco-2 y HT29 fueron mantenidas en medio DMEM (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (PAA) al 10%, Aminoácidos no esenciales (Gibco), HEPES 10mM y Penicilina-estreptomicina 1µg/ml, en estufa gaseada 5%CO₂ -95% aire a 37°C.

Ensayos con el sistema reportero Caco ccl20:luc

Ensayo por Luminometría

Preparación de los microorganismos

Se parte de un cultivo de 24 h en agar YGC en el caso de levaduras y de 48 h en MRS en caso de bacterias. Se realiza una suspensión al en buffer PBS, se mide la densidad óptica de la suspensión a 590 nm en un espectrofotómetro. A partir de este dato se toma la cantidad necesaria de la suspensión para generar una DO₅₉₀ = 1 en DMEM sin suero.

Cuando el volumen necesario de la suspensión en PBS es mayor al 10% del volumen final en DMEM, se centrifuga a 5000 g durante 5 min, se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en el volumen necesario de DMEM. Esto último es para evitar altas concentraciones salinas en el medio de cultivo de las células, lo que puede llevar a una situación estresante que interfiera con los resultados.

Si se parte de un cultivo líquido en YPD en el caso de levaduras o MRS en el caso de bacterias se toma una alícuota del cultivo, se centrifuga 5000 g durante 5 min. y se resuspende en PBS. Luego se utiliza esa suspensión de la misma forma.

En los ensayos de comparación de microorganismos vivos e inactivados con calor, la inactivación térmica se realiza calentando la suspensión de DO₅₉₀ 1 durante 5 min. a 100°C.

La inactivación por radiación ultravioleta se realiza exponiendo la suspensión durante 30 min. en flujo laminar de manera de conservar la esterilidad.

La efectividad de los tratamientos se comprueba mediante la no observación de desarrollo de levaduras en medio YGC o bacterias en agar MRS en las condiciones normales de cultivo.

Preparación de Sobrenadantes

Los sobrenadantes de cultivo de *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 fueron preparados en botellas para cultivo celular de 25 cm² a 37°C durante 8 hs en presencia o ausencia de células Caco crecidas a confluencia en la botella (w/caco y wo/caco respectivamente).

Los sobrenadantes de los cultivos fueron colectados, centrifugados a 5000G durante 5 min. para eliminar la mayor parte de las levaduras y esterilizados por filtración utilizando una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro.

Preincubación y estimulación

A partir de un cultivo de células Caco ccl20:luc en DMEM de 24 h post-confluencia (aproximadamente 8 días) en placa de cultivo de 48 fosas a 37°C y atmósfera controlada con 5% de CO₂. Se cambia el medio a 500 µl de DMEM fresco por fosa.

Se adiciona el volumen necesario de la suspensión de microorganismos de manera de alcanzar una DO₅₉₀ final de 1 del microorganismo. Se deja incubar entre 2h y 30 min., dependiendo del ensayo a 37°C y 5%CO₂.

La estimulación se lleva a cabo agregando 25 µl de una dilución 20X de flagelina en DMEM por fosa. La concentración final de flagelina es de 1 µg/ml. La flagelina debe estar previamente calentada a 50° C durante 5 min. para eliminar posibles agregados. Se deja incubar 5h en las condiciones mencionadas anteriormente.

Luminometría

La reacción de luminometría se lleva a cabo siguiendo las especificaciones del kit *Luciferase Assay System* (Promega, Madison WI, USA).

Luego de la incubación, se retira completamente el medio de cultivo. Se preparan 150 µl de buffer de lisis por fosa a partir de la solución madre 5x provista por el fabricante. Se disgrega la monocapa celular con la micropipeta hasta obtener una consistencia viscosa y homogénea. Es indispensable que el lisado sea homogéneo y evitar la formación de espuma para disminuir el error en la medida. Se mezclan 8 µl del lisado con 40 µl del sustrato para luciferasa de luciérnaga (LAR) en tubos plásticos transparentes y se mide en el luminómetro utilizando 1s como tiempo de integración.

Los valores de luminiscencia son referidos al promedio de los controles estimulados con flagelina (FliC). Las unidades de luminiscencia normalizadas (NAL) se definen como

$$\text{Luminiscencia normalizada} = \frac{\text{luminiscencia en la fosa}}{\text{luminiscencia promedio del control FliC}}$$

Obtención de un Sistema Reportero con Patrón Interno

Se utilizan estrategias de doble transfección, es decir transfección con dos tipos de plásmidos distintos donde uno expresa constitutivamente la luciferasa de Renilla (TK-Renilla, Promega) y otro expresa bajo un promotor inducible la luciferasa de luciérnaga.

Obtención de DNA Plasmídico

Se parte de un cultivo ON de *E. coli* DH5α conteniendo el plásmido deseado en caldo LB con 0.075 mg/ml de ampicilina (Sigma). 3ml de cultivo se procesan de acuerdo al protocolo comercial de QIAGEN (Qiagen, California, USA) para sus columnas de extracción Qiaprep. El método consiste en ruptura celular, fijado del ADN a columnas de sílice, varios lavados y elución del ADN.

Visualización mediante Electroforesis en Gel de Agarosa

El ADN obtenido se visualiza mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% p/v.

Se prepara una suspensión 1.5% p/v de agarosa en TBE, se funde en microondas y se agregan 10 μ l de Bromuro de Etidio (5 mg/ml) cada 100 ml de suspensión.

Se prepara un gel con 10 calles. Se siembran 5 μ l de muestra y 3 μ l de buffer muestra por calle.

Se aplica un voltaje constante de 80 mV/cm hasta que el frente llegue al final del gel.

Se observa con ayuda de un transiluminador UV y se digitaliza la imagen con una cámara CCD mediante el software ImageJ.

Transfección de Células de Epitelio Intestinal con lipofectamina 2000

Se utiliza una modificación del protocolo comercial sugerido por el fabricante. Se trabaja con células en placas de cultivo de 48 fosas al 80 % de confluencia. Esto es para evitar la muerte celular debido a la duración del ensayo.

Se utiliza 1 μ l de lipofectamina (LFM) por fosa. Para una eficiente formación de complejos de transfección se utiliza 1 μ g de ADN por cada 2 μ l de LFM.

Para estimar la concentración de ADN se utiliza un espectrofotómetro con cubeta de cuarzo para medir la absorbancia a 260 nm. No obstante se verifica la cantidad de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.

Se mezclan los volúmenes necesarios para tener 0.5 μ g de ADN del plásmido con luciferasa de luciérnaga inducible con 0.5 μ g de ADN del plásmido con renilla luciferasa constitutiva con OMEM en una proporción 1:15.

Por separado se mezclan 2 μ l de LFM por μ g de ADN total utilizado con OMEM en una relación 1:15.

Se mezclan estas dos preparaciones y se dejan reposar 15min. a temperatura ambiente. Se quita el medio de cultivo a las células y se lavan con DMEM sin suero fetal bovino 2 veces. Se agrega un volumen de OMEM a la mezcla y se reparten 300 μ l de esta última preparación por fosa a transfectar. Se incuban las células durante 8 h a 37 $^{\circ}$ C y 5% CO₂.

Se cambia el medio de cultivo por DMEM completo y se deja incubar en las mismas condiciones durante un día.

Es muy importante mantener las condiciones de esterilidad en los reactivos, los materiales y durante el proceso, ya que el ensayo tiene una duración prolongada y cualquier contaminación puede llevar a la muerte de las células o a resultados erróneos. Previo a la realización de los ensayos, se verifica la integridad celular por observación microscópica.

Caracterización de las Transfecciones

Se parte de un cultivo de 24 h en agar YGC de *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154. Se prepara una suspensión en PBS estéril, se mide la DO a 590 nm y se diluye a DO₅₉₀ 1 en DMEM.

Algunas fosas son preincubadas con 250 µl de esta suspensión y otras con la misma cantidad de DMEM fresco durante 2 h a 37° C y 5 % CO₂.

La estimulación se lleva a cabo agregando 35 µl de una dilución 20X de flagelina en DMEM por fosa. La flagelina debe estar previamente calentada a 50° C durante 5 min. para eliminar posibles agregados. Se deja incubar 5h en las condicione mencionadas anteriormente.

Se descarta el medio de cultivo con ayuda de una micropipeta.

Se prepara el buffer de lisis celular pasiva según el protocolo Dual system luciferase assay sugerido por el proveedor (PROMEGA, Madison WI, USA). Se mezcla con micropipeta y se raspa el fondo con el tip.

Para las medidas de luminiscencia se toman 10 µl del lisado celular y se mezclan con 50 µl del sustrato LAR II. Se mide la luminiscencia. Esta medida corresponde a la luciferasa de luciérnaga. Luego se agregan 50 µl del sustrato para luciferasa de renilla en buffer *Stop & Glo* y se mide la luminiscencia correspondiente a esta segunda enzima.

La luminiscencia se expresa de manera relativa al control interno con la luciferasa de expresión constitutiva en cada condición y luego son normalizadas con respecto al control estimulado con flagelina mediante la siguiente fórmula.

$$Luminiscencia\ relativa = \frac{Luminiscencia\ inducible}{Luminiscencia\ constitutiva}$$

$$Luminiscencia\ relativa\ Normalizada = \frac{Luminiscencia\ relativa}{Luminiscencia\ relativa\ promedio\ del\ control\ de\ flagelina}$$

Cultivo de microorganismos

En la siguiente tabla se muestra una lista de los microorganismos utilizados en este trabajo, su género y especie y el origen.

Las bacterias ácido lácticas fueron crecidas en agar o caldo MRS a 30° C. Las levaduras fueron crecidas en agar YGC o caldo YPD a 30° C, según el ensayo.

Aislado	Género / especie	Origen
ATCC 314	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	American Type Culture Collection
ATCC 8007	<i>Lactobacillus kefir</i>	American Type Culture Collection
ATCC 8287	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	American Type Culture Collection
DSMZ 20011	<i>Lactobacillus casei</i>	Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen
DSMZ 20174	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen
DSMZ 20176	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen
DSMZ 20179	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen
299v	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Probiótico comercial, Lp299V, NextFoods
JCM 1059	<i>Lactobacillus brevis</i>	Japan Collection of Microorganism
CIDCA 133	<i>Lactobacillus delbrueckii lactis</i>	Colección CIDCA de Microorganismos
CIDCA 83114	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 8316	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 8321	<i>Lactobacillus kefir</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 2
CIDCA 83112	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 8346	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 4
CIDCA 8324	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 2
CIDCA 8312	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 83113	<i>Lactobacillus kefir</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 8348	<i>Lactobacillus kefir</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 4
CIDCA 8323	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 2
CIDCA 83210	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 2
CIDCA 8338	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 3
CIDCA 8337	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 3
CIDCA 8310	<i>Lactobacillus kefir</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 8319	<i>Lactobacillus kefir</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 8344	<i>Lactobacillus kefir</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 4

CIDCA 83110	<i>Lactobacillus kefir</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 83111	<i>Lactobacillus kefir</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 83115	<i>Lactobacillus kefir</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 83116	<i>Lactobacillus kefir</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 8314	<i>Lactobacillus kefir</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 8315	<i>Lactobacillus kefir</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 8317	<i>Lactobacillus kefir</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 8313	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
KI	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Colección CIDCA de microorganismos
CIDCA 2	<i>Saccharomyces sp.</i>	Gránulos de kefir
CIDCA 5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gránulos de kefir
CIDCA 7	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Gránulos de kefir
CIDCA 8111	<i>Saccharomyces unisporus</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 8112	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 8113	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 8116	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 8118	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 8153	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 5
CIDCA 8154	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 5
CIDCA 81102	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 10
CIDCA 81103	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 10
CIDCA 81104	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 10
CIDCA 81105	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 10
CIDCA 81106	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 10
CIDCA 81108	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 10
CIDCA 81109	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 10
CIDCA 81111	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Gránulos de kefir CIDCA AGK 1
CIDCA 9121	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Gránulos de kefir de agua CIDCA SK 2
CIDCA 9123	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gránulos de kefir de agua CIDCA SK 2
CIDCA 9124	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gránulos de kefir de agua CIDCA SK 2
CIDCA 9127	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gránulos de kefir de agua CIDCA SK 2
CIDCA 9131	<i>Issatchenkia sp.</i>	Gránulos de kefir de agua CIDCA SK 3
CIDCA 9132	<i>Saccharomyces unisporus</i>	Gránulos de kefir de agua CIDCA SK 3
CIDCA 9133	<i>Saccharomyces unisporus</i>	Gránulos de kefir de agua CIDCA SK 3
CIDCA 9135	<i>Saccharomyces unisporus</i>	Gránulos de kefir de agua CIDCA SK 3

CIDCA 9136	<i>Saccharomyces unisporus</i>	Gránulos de kefir de agua CIDCA SK 3
Rdt 12013	<i>Rhodotorula sp.</i>	Colección CINDEFI de microorganismos
LPSC 719	<i>Candida krusei</i>	Cepario de levaduras y hongos filamentosos- Instituto de Botánica Carlos Spegazzini
LPSC 601	<i>Picchia anomala</i>	Cepario de levaduras y hongos filamentosos- Instituto de Botánica Carlos Spegazzini
LPSC 610	<i>Candida tropicalis</i>	Cepario de levaduras y hongos filamentosos- Instituto de Botánica Carlos Spegazzini
Sb	<i>Saccharomyces boulardi</i>	Probiótico comercial, Floratil, Merck

Recuento de levaduras en muestras biológicas de ratones

Para el recuento de microorganismos en heces se colectaron heces de cada ratón en tubos de polipropileno de 1,5 ml previamente esterilizados y pesados. La masa de materia fecal obtenida se obtiene por diferencia de pesada entre el tubo con heces y el tubo vacío pesado previamente.

Utilizando un *tip* estéril de micropipeta de 1ml al cual se le practica un pequeño corte en bisel en la punta para ampliar el diámetro del orificio y así evitar obstrucciones, se prepara una suspensión de las heces colectadas utilizando solución fisiológica estéril en cantidad necesaria para que la concentración de heces sea de 1 mg/ml.

Se realizan diluciones seriadas (1:10) de la suspensión utilizando solución fisiológica estéril y se siembran en placas de agar YGC 100 µl de la suspensión y se esparce utilizando espátula de Drigalsky previamente flameada. Se incuban las placas durante 24-48 h a 32° C. Se recuentan las colonias en la placa y se calcula teniendo en cuenta el factor de dilución la cantidad de unidades formadoras de colonias por gramo de heces.

Para el recuento en contenido intestinal, luego del sacrificio del animal se toma una porción de 1 cm de longitud de duodeno, ileon, ciego o colon y se practica la apertura longitudinal. Se colocan en un tubo de polipropileno estéril conteniendo 1 ml de solución fisiológica estéril. Se agita vigorosamente utilizando un *vortex* durante 30 segundos. Se preparan las diluciones y siembra con el sobrenadante de este preparado. El recuento en placa se lleva a cabo como se explicó previamente.

Para el recuento en hígado y bazo, se homogeniza con un *potter* el lóbulo menor hepático o el bazo entero en solución fisiológica estéril. Se realizan diluciones en este mismo medio y se siembra en placa como se mencionó previamente.

Extracción de ARN total

Para la obtención de ARN total se utiliza el protocolo comercial NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Alemania). Se retira completamente el medio de cultivo con la ayuda de una micropipeta. Se preparan 250 μ l de buffer de lisis por fosa, se agregan junto con 3.5 μ l de β -mercaptoetanol y se homogeniza con micropipeta. Se agregan 250 μ l de etanol al lisado y la mezcla se dispone en una columna para microcentrífuga con un tubo colector. Se centrifuga a 8000 g durante 1 min. Luego se agregan 350 μ l de buffer de desalinización (MDB) y se centrifuga a 11000 g durante 1 min.

El ADN que puede llegar a interferir se elimina agregando 95 μ l de una mezcla de reacción con DNAsa (1 parte de DNAsa reconstituida más 9 partes de buffer de reacción para DNAsa), la reacción toma lugar a temperatura ambiente durante 15 min.

Se inactiva la DNAsa con 200 μ l de buffer RA2 y se centrifuga 1 min. a 8000 g. Se lava la columna con 600 μ l de buffer RA3 y se centrifuga a 8000 g por 1 min. Luego otro lavado con 250 μ l del mismo buffer que se centrifuga a 11000 g durante 2 min. para que la columna se seque completamente. Se coloca la columna en un tubo eppendorf de 1.5 ml y la elución del ARN se lleva a cabo agregando 50 μ l de agua libre de RNAsa y centrifugando a 11000 g por 2 min.

Es indispensable usar material libre de RNAsa, DNAsa y pirógenos, así como tips con filtro para micropipetas para evitar pérdidas de material.

Retrotranscripción

Para la transcripción reversa se utiliza el siguiente protocolo por muestra:

Premezcla de Random Primers:

13 μ l Random Primers (50 μ M)

91 μ l H₂O

Premezcla 1

1 μ l premezcla de Random Primers

4 μ l Muestra de ARN

7 μ l H₂O

Premezcla 2

1 μ l Inhibidor de RNAsa

1 μ l Ditioneitol (DTT)

4 μ l buffer de reacción 5X (Invitrogen)

1 μ l dNTPs 10mM

1 μ l MMLV-Reverse Transcriptase (Invitrogen)

Se prepara la premezcla 1 y se deja a 70° C por 10 min. en un bloque térmico y se enfría en hielo inmediatamente para evitar la reformación de estructuras secundarias en el mRNA.

Se prepara la premezcla 2 y se agregan 8 μ l por tubo de reacción.

La reacción se lleva a cabo en un ciclador térmico con el siguiente programa:

Paso 1) 25° C 10 min.

Paso 2) 42° C 2 h

El cDNA obtenido se conserva a -20° C.

PCR cuantitativa en tiempo real

Preparación de los microorganismos

Las suspensiones de los microorganismos se preparan de la forma descrita en el punto de ensayos de modulación en el sistema reportero.

Preincubación y estimulación

Se parte de cultivos de células de epitelio intestinal Caco 2 o HT29 24h post-confluencia en DMEM en placas de 24 fosas. Se agregan 400 μ l de la suspensión del microorganismo a probar y se deja incubar 2 h a 37° C con 5% de CO₂.

La estimulación se lleva a cabo agregando 200 μ l por fosa del agente estimulante a una concentración 3X en DMEM.

El agente estimulante puede ser flagelina, IL-1, o LPS. La flagelina debe ser previamente calentada 5 min. a 50° C.

Se deja incubar 1 h a 37° C y 5% CO₂.

Los tiempos y concentraciones de estimulación en sistemas *in vivo* se describen en cada sección.

Se utiliza un protocolo comercial (Invitrogen) el cual utiliza una mezcla con el colorante SYBR-Green que se une a ADN de doble hebra y fluoresce enverde cuando es excitado con luz azul o UV. Un aumento en la intensidad de la fluorescencia verde indica una mayor cantidad de Producto de PCR.

Cuanto mayor sea la cantidad de moléculas que sirvan de molde, mayor será la fluorescencia, es decir, dada una determinada intensidad en la fluorescencia, el tubo que tenga mayor cantidad de molde para la reacción que produce fragmento de ADN de doble cadena llegará a esa intensidad en un número menor de ciclos de reacción.

Por tubo de reacción se utiliza:

1 μ l Primer Forward

1 μ l Primer Reverse

10 µl dilución 1/20 de molde de cDNA

12 µl MasterMix

El programa de ciclado de temperaturas es el siguiente.

Paso 1) 50° C 2 min. 1 ciclo

Paso 2) 90° C 2 min. 1 ciclo

Paso 3) (95° C 15 seg, 60° C 1 min.) 40 ciclos

Modelo de infección con *Salmonella typhimurium*

Los ratones de la cepa C57BL/6 de 6 semanas son mantenidos en un bioterio libre de patógenos específicos con alimentación y agua normal. Para los ensayos se utilizaron animales con microbiota convencional (WT) o de baja complejidad (LCF).

Los animales recibieron una suspensión conteniendo $1 \cdot 10^6$ o $2 \cdot 10^6$ UFC/ml de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 en agua de bebida *ad libitum* durante 3 días. Los animales WT recibieron al cuarto día una dosis única intragástrica de estreptomicina de 20mg. Los animales LCF no son tratados con estreptomicina. En el día 5 los animales son desafiados con una única dosis de $5 \cdot 10^7$ de *Salmonella enterica* serovar. *typhimurium* crecidas durante 24 h en caldo LB. Al día sexto, los animales fueron sacrificados y las muestras de colon, intestino delgado, nodos linfáticos mesentéricos, hígado, bazo y placas de Peyer fueron recolectadas para los análisis de recuentos de levaduras en agar YGC y *Salmonella* mediante cultivo en agar MacConkey. También se prepararon muestras para el análisis histológico de colon, intestino delgado, bazo e hígado mediante inclusión en resina para criótomo (OCT). Los procedimientos para los preparados histológicos se describen en la sección de histología.

Ligación de asa intestinal

Se anestesiaron ratones Balb-c de 7 semanas (4 animales por grupo) mediante la administración intraperitoneal de diazepam (5mg/kg) y ketamina (100 mg/kg). Se ligó una sección del intestino delgado de 7 cm de longitud utilizando hilo de seda quirúrgica. Se inyectaron 50 µl de una

suspensión de *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 de $4,6 \pm 0,9 \cdot 10^8$ UFC/ml o PBS. Luego de 30 min. se inyectaron 150 μ l de flagelina (450 μ g) o PBS en la misma asa. Los animales se mantuvieron en una almohadilla a una temperatura constante de 37 ° C y luego de 2 horas los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

Se tomaron muestras de las secciones ligadas en buffer RA1 para extracción de ARN total.

Detección de especies reactivas de oxígeno mediante microscopía de fluorescencia

Células Caco2 en cultivo confluyente, se incuban con el estímulo a ensayar durante 15 minutos. El estímulo puede ser una suspensión de microorganismos a DO1 como en los ensayos de modulación o diluciones de butirato dependiendo del ensayo. En los ensayos de vinculación de capacidad moduladora con la capacidad inductora de ROS, en los que se utiliza N-acetil cisteína (15 mM concentración final), ésta se agrega a las células 30 minutos antes del estímulo.

Luego del estímulo con los microorganismos o el butirato, las células son lavadas con PBS-HEPES (1mM) tres veces y se cubren con una solución 4 μ M de diacetato de carboxi-metildicloro-dihidro fluoresceína (H2DCFDA) en PBS-HEPES. Luego de 30 min. en oscuridad, se lava con PBS-HEPES y se observa en microscopio de fluorescencia.

Se compensan las condiciones de captura de manera de que la saturación de pixel en la cámara CCD corresponda al control con peróxido de hidrógeno. Se mantienen las condiciones de captura (aumento 20X, tiempo de integración, filtros de excitación y factor de ganancia) durante la captura de todas las imágenes del ensayo.

El análisis de las imágenes obtenidas se detalla en el apéndice.

Detección de NF- κ B mediante inmunofluorescencia

Células Caco 2 crecidas en confluencia sobre cámaras ópticas (*Cell Culture Chamber-slides*, Bioexpress) fueron tratadas con *K. marxianus* CIDCA 8154 durante 30 min. y estimuladas con flagelina durante 15 min., en las mismas condiciones que se describen en los ensayos de *screening*. Luego de la estimulación se retiró el sobrenadante de cultivo, se realizaron 3 lavados con PBS-HEPES(1mM) y las células fueron fijadas con paraformaldehído al 10 % en PBS durante 30 min..

Luego de la fijación las células fueron permeabilizadas con PBS con 10 % de Tritón X-100 y 5% de Suero fetal bovino durante 15 min. Luego de la fijación, se incubó con el anticuerpo anti- NF- κ B p65 conjugado con FITC (SC-8008 FITC, Santra Cruz Biotechnology, California) en una dilución de 1:250 en PBS con 5% de suero fetal bovino. Luego de una incubación de una hora a temperatura ambiente, los preparados fueron lavados con PBS e incubados 15 min. a temperatura ambiente con yoduro de propidio como contracolorante de núcleos en una concentración de 1,5 μ M. Luego de 3 lavados con PBS, se retira la cámara plástica, se seca el portaobjetos y se deja secar. Se monta el cubreobjeto utilizando resina de montaje para microscopía.

Las imágenes fueron tomadas utilizando el microscopio Nikon TI-Eclipse y analizadas utilizando el plugin para colocación de ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/colocalization.html>).

Preparación de extractos subcelulares para *Western blot*

Extracto citoplasmático

Se descartan los sobrenadantes y se resuspenden los pellets con micropipeta en 200 μ l de FT LYSIS buffer.

Los tubos se congelan sumergiéndolos en nitrógeno líquido y se dejan descongelar en hielo. Se agita en un vortex hasta que la suspensión quede completamente descongelada.

El proceso de congelación-descongelación-agitación se repite 5 veces.

Se centrifugan los tubos 5 min. a 8000 g.

Los pellets y sobrenadante pueden guardarse por separado a -20° C.

Extracto nuclear

Se descartan los sobrenadantes y se resuspenden los pellets en 200 μ l de buffer A (ver 3.1.3 pág. 19). Se deja reposar en hielo 15 min.

Se centrifuga a 3000 g y 4° C durante 5 min. Se descarta el sobrenadante.

Se lavan los pellets con 300 μ l de buffer B y se centrifuga nuevamente.

Se resuspenden los pellets con 100 µl de buffer C y se deja 45 min. en hielo con agitación intermitente.

Se centrifuga a 14000 g y 4º C durante 15 min.

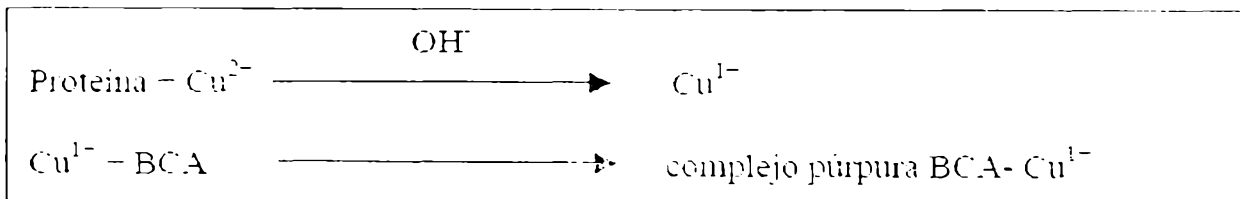
El sobrenadante representa a la fracción nuclear, se alicuota y se mantiene a -80 º C hasta su uso.

En el momento de utilizar los buffers se debe agregar un coctel inhibidor de proteasas para obtener una concentración final del mismo de 1mM.

Estimación de la cantidad de proteína

Se utiliza el método del ácido bicinconínico.

El ácido bicinconínico (Pierce biotechnology, Rockford Illinois, USA) es un compuesto capaz de formar un complejo color púrpura con iones cuprosos en medio alcalino. El ión cuproso puede formarse por la reacción de proteínas con Cu^{+2} en medio alcalino, reacción conocida como reacción de Biuret. La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos tales como azúcares, que afectan a otros métodos.



Se trabaja en placas de ELISA de 96 fosas.

Se realiza una curva de calibración, por duplicado, con Seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma) en PBS como patrón, de acuerdo a la siguiente tabla:

Mezcla	BSA µl	PBS µl	[BSA] mg/ml
A	25 del stock	--	2
B	25 del stock	25	1
C	25 de B	25	0.5
D	25 de C	25	0.25

E	25 de D	25	0.125
F	25 de E	25	0.0625
G	--	50	0

Para preparar el stock de BSA se pesan 10 mg y resuspenden en 1 ml de PBS y luego se realiza una dilución 1:5.

Las muestras se miden en diluciones 1:5 y 1:10 por duplicado.

Se preparan 200 µl por fosa a medir del reactivo de trabajo (WR) agregando 50 partes del reactivo A y una parte del reactivo B.

Para estimar el volumen de WR a preparar se puede usar la siguiente fórmula:

$$(\# \text{ patrones} + \# \text{ muestras}) * \# \text{ réplicas} * 200 \mu\text{l} = \text{volumen de WR}$$

Luego de preparar las diluciones se agregan 200 µl del reactivo de trabajo por fosa, se deja 30 min. A 37° C y se mide la Absorbancia a 562 nm en un lector de placas.

Western-blot

Se utiliza un gel desnaturizante de poliacrilamida SDS. La concentración de poliacrilamida en el gel separador es de 10%. Se prepara el gel separador según la siguiente composición:
(para dos geles de 90X80X1 mm)

Buffer separador 4X	2.5 ml
Agua destilada	4.25 ml
Acrilamida-Bisacrilamida (30.8 %)	3.25 ml
Persulfato de amonio	0,07 ml

Se coloca entre los vidrios y se aplana el frente con etanol al 96%. Cuando solidifica, se quita el etanol sobrante con un papel absorbente y se prepara el gel apilador según la siguiente composición:

Buffer apilador 4X	875 μ l
Agua destilada	980 μ l
Glicerol	980 μ l
Acrilamida-Bisacrilamida (30.8 %)	455 μ l
Persulfato de amonio	45 μ l

Una vez solidificado el gel se siembran 5 mg de proteína por calle. Se mezclan 1 volumen de la muestra con un volumen de buffer de muestra.

Como patrón de peso molecular se utiliza LMW (Farmacia).

Se aplica un voltaje constante de 120 V hasta que el frente de corrida llegue al final del gel.

Electrotransferencia

Se coloca el gel en contacto con una membrana de nitrocelulosa y se cubren con papel de filtro embebido en buffer de transferencia frío.

Se quita el aire con una varilla de vidrio y se electrotransfiere durante 1 h con una corriente constante de 300 mA.

Las membranas se tiñen reversiblemente con el colorante rojo de Ponceau y se corta siguiendo las calles. Se lavan las tiras con agua destilada y se dejan en la solución de bloqueo 2 h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4° C. Se realizan 3 lavados con solución de lavado.

Para visualizar la ubicación de las calles se tiñe reversiblemente la membrana con el colorante rojo de Ponceau, se cortan las tiras y se colocan en buffer de bloqueo durante 1h a 37°C o toda la noche a 4°C.

Revelado por quimioluminiscencia

Las tiras a revelar se incuban durante 1 h a 37° C con una dilución 1/100 del anticuerpo policlonal de conejo anti-NF- κ B p65 (A): sc-109 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz California, USA) o el

anticuerpo monoclonal de ratón anti p-IkB en una dilución 1/500. Se realizan 3 lavados de 5 min. con solución de lavado.

Se incuba 1 h a 37° C con una dilución 1/1000 del anticuerpo monoclonal anti inmunoglobulina de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) o con una dilución 1/1000 de anticuerpo monoclonal anti Ig de ratón conjugado con HRP según corresponda. Se realizan 3 lavados de 5 min. con solución de lavado y un cuarto lavado de al menos 30 min.

Se preparan los stocks de luminol 40 µg/µl y ácido p-cumárico 15 µg/µl (Fluka, Sigma-Aldrich, Stenheim U.K.).

Se preparan las soluciones de revelado A y B:

Solución A

Stock de luminol	50 µl
Stock de ácido p-cumárico	22 µl
Buffer Tris:HCl 100mM pH 7.5	330 µl
Agua bidestilada c.s.p	5 ml

Solución B

Buffer Tris:HCl 100mM pH 7.5	330 µl
H ₂ O ₂	3.3 µl
Agua bidestilada c.s.p	5 ml

Es muy importante preparar estas soluciones en oscuridad o con luz roja de baja intensidad ya que tanto el luminol como el ácido p-cumárico se degradan rápidamente con la luz.

Se mezclan 1 volumen de la solución A y uno de la solución B y se deja reposar 1 min. en la oscuridad.

Se cubre la membrana con la mezcla de las soluciones A y B preparadas anteriormente y se retira el exceso inclinando la membrana sobre un papel absorbente. Se cubre la membrana con una lámina

de celofán transparente. Sobre la superficie seca del celofán se coloca una placa radiográfica (Kodak) haciendo coincidir el borde superior de la placa con el de la membrana. El tiempo de exposición varía entre 15 s y 10 min. de acuerdo a la intensidad de la luminiscencia que puede apreciarse a simple vista.

Se retira la placa radiográfica y se sumerge en solución de revelado (Romek, Argentina) durante 1 min. luego es retirada, enjuagada con agua corriente y sumergida en solución fijadora (Romek, Argentina) durante 2 min. Se deja secar la membrana y se digitaliza la imagen utilizando un *scanner*. La intensidad de las bandas es cuantificada utilizando el software *ImageJ*.

Histología

Los preparados histológicos para el modelo de infección con *Salmonella* fueron realizados mediante la inclusión en medio de montaje para criótomo (Cryoplast, Biopack) y congelados en nitrógeno líquido. Se toman secciones de 5 μm de espesor cortadas en criótomo y se colocan en portaobjetos con carga positiva para resinas. Luego de 16 h de fijación a temperatura ambiente, se tiñen con hematoxilina y eosina como se detalla más adelante.

Para los modelos de colitis con TNBS, los segmentos de recto de los animales se fijan en paraformaldehído al 10%, se deshidratan en un tren de deshidratación que incluye 3 incubaciones en etanol (50%, 70% y 100%) y dos incubaciones en Xilol al 100%. El tejido se incluye luego en parafina fundida a 60° C. Se toman secciones de 7-10 μm de espesor utilizando un micrótomo, se fijan las secciones en portaobjetos con calor y se elimina los restos de parafina lavando con xilol. Se rehidratan los preparados utilizando el tren de deshidratación en sentido inverso. Los preparados, lavados con agua destilada para eliminar los restos de etanol, se sumerge durante 10 min. en una preparación de hematoxilina, se lava con etanol y luego con agua destilada hasta eliminar los restos del colorante. Se sumergen los preparados en eosina durante 30 segundos y se enjuaga con agua destilada, se deshidrata nuevamente el preparado y se deja 10 min. en xilol, Luego de secar, se monta el cubreobjetos con resina de montaje.

Scores histopatológicos

Para el modelo de infección con *Salmonella* se utilizó el protocolo de actividad de histopatología descrito por Hapfelmeier¹. La evaluación, realizada a doble ciego, considera los siguientes puntajes: Edema en la submucosa (*score* 0–3), infiltrado de leucocitos polimorfonucleares en lámina propia (*score* 0–4), pérdida de células caliciformes (*score* 0–3), y daño epitelial (*score* 0–3). El puntaje combinado de histopatología para cada tejido se determina como la suma de los puntajes quedando como resultado rangos de valores de acuerdo al daño histopatológico entre 0–3, sin o con mínimas señales de inflamación que no significan ninguna patología; 4–8, inflamación moderada; y 9–13, inflamación severa.

Para los modelos de colitis inducida por la administración intrarrectal de TNBS, el daño histopatológico se determinó siguiendo el criterio de actividad histopatológica descrito Obermeier². Este sistema registra dos puntajes por separado que luego se suman. Por un lado se evalúa el daño epitelial de la siguiente manera: 0, ningún daño; 1, mínima pérdida de células caliciformes; 2, pérdida importante de células caliciformes; 3, pérdida mínima de criptas y extensa de células caliciformes y 4, pérdida extensa de criptas. Por otro lado se evalúa el infiltrado de la siguiente manera: 0, ninguno; 1, infiltrado alrededor de la base de las criptas; 2, infiltrado en la capa muscular de la mucosa; 3, extenso infiltrado en la muscular de la submucosa y edema y 4; infiltrado en la submucosa.

Los preparados fueron evaluados a doble ciego, y los puntajes sumados, para obtener el *Score* de actividad histopatológica.

Buffers y medios de cultivo

Medios de cultivo

Caldo MRS

Peptona de carne	10 g/l
Extracto de carne	5 g/l
Extracto de levadura	5 g/l

D(+) glucosa	20 g/l
K ₂ HPO ₄	2 g/l
Tween 80	1 g/l
Citrato ácido de amonio	2 g/l
Acetato de sodio	5 g/l
MgSO ₄	0.1 g/l
MnSO ₄	0.05 g/l
pH = 6.5 ± 0.1	

Agar YGC

Extracto de levadura	3 g/l
Cloranfenicol	0.1 g/l
Glucosa	20 g/l
Agar	20 g/l
pH = 5-6	

Caldo YPD

Extracto de levadura	10 g/l
Glucosa	20 g/l
Peptona de carne	10 g/l
pH = 5-6	

Caldo LB

Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l
pH = 7	

Agar MacConkey

Peptona	17 g/l
Lactosa	10 g/l
Sales biliares	1,5 g/l
Rojo neutro	0,03 g/l
Agar	13,5 g/l
NaCl	5 g/l
pH = 7	

DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Minimal esencial medium*)

Gibco BRL *Life technologies*, Rockville, MD, USA.

Suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado térmicamente 30 min. 56° C (Gen S.A. Buenos Aires, Argentina), HEPES 1 mM, 1% de aminoácidos no esenciales (GIBCO) y 1 mg/ml de Penicilina-estreptomicina.

OMEM (*Opti-MEM*)

Gibco BRL *Life technologies*, Rockville, MD, USA.

Buffers

Buffer PBS

KH ₂ PO ₄	0.14 g
Na ₂ HPO ₄	0.79 g
NaCl	9 g
Agua bidestilada	c.s.p 1 l
pH = 7.4	

Electroforesis

Agarosa

TBE 5X

Trizma Base	54 g
EDTA 0.5M	20 ml
Ácido Bórico	27.5 g
Agua bidestilada	c.s.p. 1l

Poliacrilamida

Buffer apilador 4X

Tris Base	54 g
SDS	0.2 g
TEMED	0.2 ml
Agua bidestilada	c.s.p. 50 ml
pH 6.8	

Buffer separador 4X

Tris Base	27.2 g
SDS	0.6 g
TEMED	0.6 ml
Agua bidestilada	c.s.p. 150 ml
pH 8.8	

Buffer de muestra

Buffer apilador 4X	4 ml
Sacarosa	0.8 g
Azul de Bromofenol	una pizca

2-mercaptoetanol 5% v/v

Buffer de corrida 5X

Glicina 72 g
Tris Base 15 g
SDS 5 g
Agua bidestilada c.s.p. 1000 ml
pH 8.3

Western Blot

Buffer de transferencia

Tris-HCl pH 8 200 ml
Metanol 200 ml
Agua bidestilada c.s.p. 1000 ml

TBS

Trizma Base 30.27 g
NaCl 43.83 g
Agua c.s.p. 1000 ml
pH 7.4

Buffer de lavado

Tween 20 al 0.05 % v/v en TBS

Diluyente para anticuerpos

Leche en polvo descremada (MOLICO) al 1% p/v en TBS. Filtrar antes de usar.

Buffer de Bloqueo

Leche en polvo descremada (MOLICO) al 3% p/v en TBS. Filtrar antes de usar.

Extracto nuclear

Buffer A

Hepes	20 mM pH 7.9
NaCl	10 mM
MgCl ₂	3 mM
NP-40	0.1 %
Glicerol	10 %
EDTA	0.2 mM
DTT	1 mM

Buffer B

Hepes	20 mM pH 7.9
EDTA	0.2 mM
Glicerol	20 %
DTT	1 mM

Buffer C

Hepes	20 mM pH 7.9
NaCl	400 mM
EDTA	0.2 mM
Glicerol	20 %
DTT	1 mM

Referencias

1. Hapfelmeier, S. & Stecher, B. island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *The Journal of ...* 1675–1685 (2005).at <<http://www.jimmunol.org/content/174/3/1675.short>>
2. Obermeier, F. *et al.* Interferon-gamma (IFN-g) - and tumour necrosis factor (TNF) -induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS) -induced colitis in mice. *Clinical and experimental allergy*: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology 238–245 (1999).

UIC

Apéndice

Análisis de imágenes

Apéndice - Desarrollo de una *macro* para *ImageJ* destinada al análisis automatizado de imágenes de microscopía de fluorescencia

Objetivo: El presente apéndice tiene como objetivo mostrar el uso, desarrollo y evolución de las herramientas de análisis de imágenes generadas durante el trabajo de tesis. Se proporcionan los códigos de dichas herramientas para su uso y adaptación a otras aplicaciones.

Aclaración especial para esta sección: Si bien el correcto uso del lenguaje dicta que se utilice la menor cantidad de términos extranjeros en un trabajo de este estilo, en este apéndice se adoptan términos en inglés sin traducir debido a la aceptación internacional de los mismos en los campos de conocimiento en que se aplica este desarrollo.

Introducción

El análisis de imágenes de microscopía de fluorescencia utilizado en el presente trabajo de investigación se basó en el uso de la herramienta *ImageJ*, un software de dominio público, de arquitectura abierta, basado en el lenguaje de programación Java; este software fue desarrollado originalmente por el *National Institute of Health* (NIH) (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). La decisión de los desarrolladores de utilizar Java, permite que el software pueda ser utilizado en prácticamente todos los sistemas operativos actuales. La arquitectura de dominio público permite que desarrolladores de cualquier parte del mundo, generen herramientas para aplicaciones variadas, dependiendo de la necesidad de los mismos y las compartan con el resto de la comunidad científica. La funcionalidad de *ImageJ* puede ser ampliada mediante el uso de “agregados”, o como se los conoce internacionalmente, *plug-ins* en donde el usuario necesita tener algún conocimiento rudimentario de programación o mediante el uso de las llamadas *macros* (abreviatura de macroinstrucción), que podrían definirse como el uso secuencial de funciones preexistentes en el software para simplificar el uso del mismo en tareas repetitivas. En el presente trabajo se desarrolló una *macro* para la cuantificación de la fluorescencia emitida por 5,6-diclorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato acetil ester (DCFDA), un indicador de la

presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) en cultivos células epiteliales Caco-2, tal como se describe en el capítulo 2 del trabajo.

Para dichos ensayos se realizaron un total de 1699 microfotografías, cuyo análisis debe ser uniforme, estandarizado y normalizado para permitir la comparación entre ensayos sin interferencia de las variaciones particulares de cada ensayo. Entre estas variaciones se pueden considerar por ejemplo, condiciones de compensación de fluorescencia del microscopio, estado celular o variaciones en la fluorescencia debidas a la inestabilidad del reactivo entre otras. Dada la cantidad de imágenes a analizar surge la necesidad de utilizar una herramienta que permita el análisis de las imágenes de una manera rápida y objetiva.

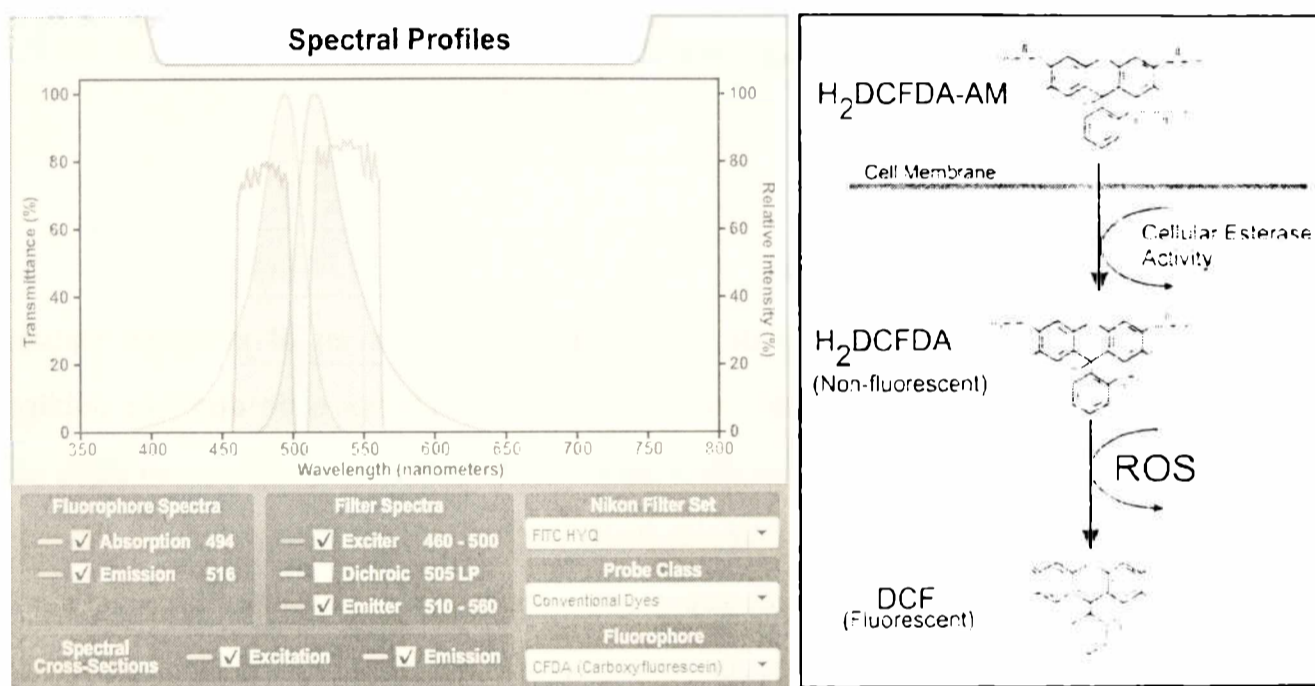


Figura A.1 – Espectro de absorción y emisión de 5,6-diclorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato acetil ester (DCFDA) (curvas sombreadas) y espectro de excitación (azul) y emisión (rojo) medidos utilizando el set de filtros FITC HYQ del microscopio Nikon Eclipse U. A la derecha se muestra un ejemplo del sistema de detección de ROS mediante un derivado de la carboxifluoresceína. Créditos Nikon Microscopy U Adam Rainey and Michael W. Davidson / ©2012 BioTek Instruments, Inc.

La composición de la imagen

Para los ensayos, las imágenes fueron tomadas con el microscopio invertido de fluorescencia NIKON Eclipse TI-U. La cámara genera una imagen compuesta de 3 canales (RGB), al utilizar el filtro

para detección de fluorescencia verde FITC HYQ (figura A.1), la imagen se compone casi pura y exclusivamente por el canal verde (*Green*) en la figura 2 se muestra una imagen representativa y su descomposición en los 3 canales de color. La cantidad de fluorescencia en el canal azul (*Blue*) depende del ensayo, por ejemplo en la estabilidad de emisión del reactivo y la pérdida de intensidad de emisión de fluorescencia debida a la exposición a la luz UV para excitación, fenómeno conocido como *photobleaching*.

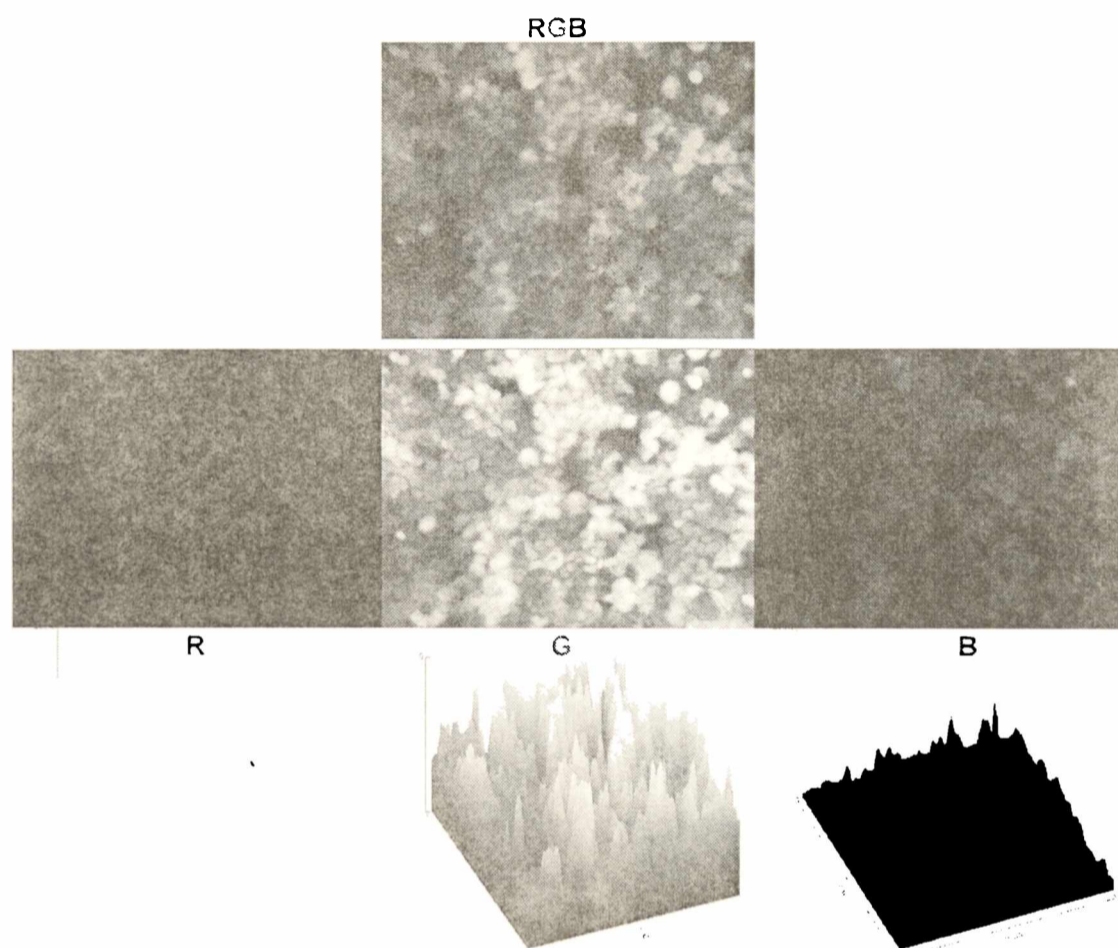


Figura A.2 – Composición del color de una imagen de fluorescencia ejemplo.

Como primera aproximación a la cuantificación de la fluorescencia en el canal verde y el análisis de los resultados, se definió una región umbral en la imagen resultante de la descomposición de canales. Esta región debería, en principio, excluir las zonas del campo en donde no haya células, ya sea porque estas no estaban 100% confluentes o porque se hayan generado huecos en la monocapa debido a la manipulación durante el ensayo, y también debería excluir artefactos saturados en fluorescencia que pueden generarse por sobrecrecimientos locales en la monocapa o por manipulación durante el ensayo. En la figura A.3 se muestra el proceso de demarcado del umbral de medición.

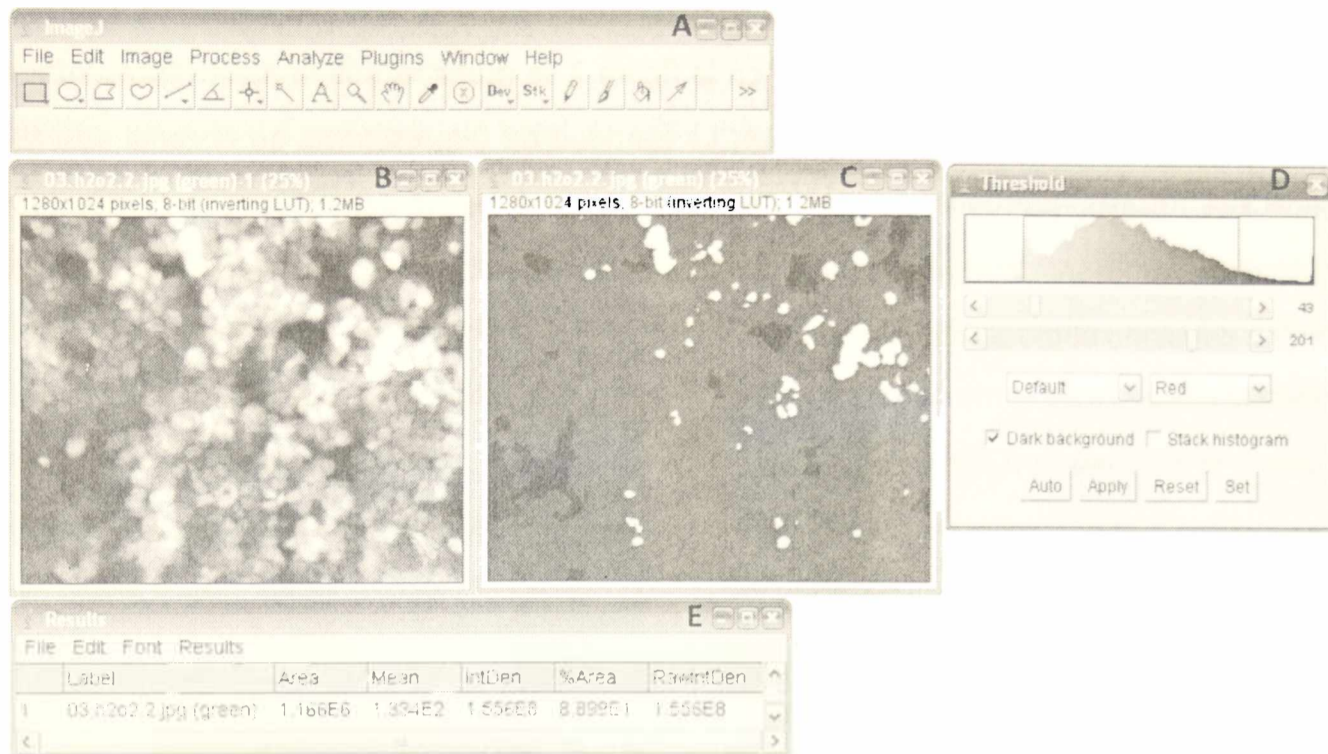


Figura A.3 - **A** Interfaz de ImageJ. **B** Canal verde de la imagen ejemplo. **C** En rojo se muestra el umbral de medida, las zonas negras son excluidas por ausencia de células y las blancas por saturación de fluorescencia. **D** Control de ajuste de umbral. **E** Tabla de medidas de intensidad realizada en la región del umbral. Se mide el área total de la imagen, la intensidad media, el porcentaje de área ocupado por el umbral.

El proceso de generación de medida para esa imagen ejemplo consta de los siguientes pasos:

1. Apertura de la imagen
2. Separación de canales RGB
3. Conversión de la imagen a escala de grises (8 o 16 bit)
4. Selección del canal verde
5. Triplicación del canal verde
6. Ajuste de contraste en una de las réplicas para ajustar las áreas en donde no hay células, esto no tiene influencia sobre la medida ya que la misma se realiza sobre la otra réplica, la función de este paso es para ayudar al usuario a ajustar correctamente el umbral.
7. Ajuste del umbral de medida en la segunda réplica.
8. Medida
9. Al tener varias ventanas abiertas, es necesario cambiar el tamaño de las mismas y acomodarlas en el escritorio de manera de trabajar cómodamente.

Para la agilización de tales pasos se procedió a generar *macros* asociadas a teclas de acceso rápido. El código se muestra a continuación:

Una vez abierta la imagen a analizar se procede a la ejecución de las siguientes *macros* que al presionar la tecla F6 separan los canales y F7 selecciona el canal verde, el equivalente a realizar los pasos 2 a 4.

```
macro "Split Channels[f6]"{
run("Split Channels");}

macro "just green channel [f7]"{
run("Stack to Images");
selectWindow("Red");
close();
selectWindow("Green");
selectWindow("Blue");
close();
run("8-bit");
}
```

La siguiente *macro* triplica la imagen, renombrando a una de las réplicas como "contraste" y a la otra como "treshoid" (umbral) y genera una pausa en el análisis para el ajuste del contraste, tal como se explica en el paso 6.

```
macro "ROS2 part1...[f1]"{run("Out");
run("Out");
run("Duplicate...", "title=contraste.tif");
run("Out");
run("Out");
run("16-bit");
run("Duplicate...", "title=treshold.tif");
run("Out");
run("Out");
run("16-bit");
run("Tile");}
```

```
selectWindow("contraste.tif");  
run("Brightness/Contrast...");  
}
```

El código para la siguiente parte se muestra a continuación:

```
macro "ROS2 part2 ...[f2]" {  
selectWindow("treshold.tif");  
run("16-bit");  
run("Threshold...");  
}
```

Al presionar la tecla F2 se selecciona la copia de la imagen para ajuste del umbral y se llama a la función umbral, el usuario ahora ajusta el umbral teniendo en cuenta las consideraciones previamente mencionadas. Al presionar la tecla "m", se llama a la función rápida de medida (*measure*) integrada en *ImageJ*.

Para limpiar la pantalla de trabajo y cerrar todas las imágenes sin guardar los cambios se generó la siguiente *macro*, que asigna a la tecla F4 el comando de cierre de todas las ventanas, exceptuando los controles de brillo/contraste, umbral y la ventana de resultados.

```
macro "close All ... [f4]" {  
run("CloseAll");  
}
```

Con esta primera versión dividida en partes para el análisis de imágenes la velocidad de procesamiento de imágenes se mejoró (ver más adelante), sin embargo, el uso prácticamente críptico de los comando para ejecutar las *macros* con teclas de acceso rápido hace de esta versión del análisis poco amigable para ser adaptado a otros usuarios. La secuencia de utilización de estas herramientas puede ahora resumirse en:

1. Abrir la imagen.
2. Presionar F6 para separar canales.
3. Presionar F7 para seleccionar sólo el canal verde y convertir a imagen de 8-bit.
4. Presionar F1 para la triplicación de la imagen y llamado a la herramienta de contraste.

5. Mejorar el contraste en la imagen de referencia de ser necesario
6. Presionar F2 para el ajuste de umbral.
7. Presionar "m" para medir.
8. Presionar F4 para limpiar el área de trabajo y proceder con la siguiente imagen.

Para mejorar la herramienta se trabajó sobre los pasos limitantes de la velocidad del proceso: el ajuste del umbral y la cantidad de eventos usuario-dependientes del proceso, es decir la longitud y complejidad de la secuencia de teclas a presionar. En cuanto al primero de los pasos, el ajuste del umbral, se procedió a evaluar el efecto o error que acarrea medir la fluorescencia en toda la imagen, incluyendo las zonas oscuras (sin células) y los artefactos de elevada intensidad de fluorescencia.

La hipótesis de la siguiente comparación es que el área representada por dichos artefactos no aporta cantidad de error significativa con respecto al resto de la imagen e incluir esas áreas en la medida no influye en el resultado.

El segundo aspecto a mejorar fue la experiencia de usuario, se proveyó al complejo de *macros* con una interfaz gráfica que agrupara en una barra de herramientas, los botones necesarios para el proceso de imágenes.

La interfaz gráfica se generó utilizando el *plugin* ActionBar del autor Jerome Mutterer (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/action-bar.html>). El mismo provee de un entorno para la generación de barras de herramientas personalizadas.

El *plugin* generado se denominó *Trained monkey* por la simplicidad de uso; a continuación se presenta el código:

```
// Action Bar description file :Trained_monkey
run("Action Bar", "/plugins/ActionBar/Trained_monkey.txt");
exit();
```

```
<line>
<button> 1 line 1
label=RGB
icon=noicon
arg=<macro>
```

```
run("RGB Color");
</macro>
<button> 2 line 1
label=Measure
icon=noicon
arg=<macro>
run("Measure");
run("Close");
</macro>
<button> 3 line 1
label=Next >>
icon=noicon
arg=<macro>
run("Open Next");
</macro>
<button> 4 line 1
label=X
icon=noicon
arg=<macro>
run("Close All");
</macro>
</line>
<line>
<button> 1 line 2
label=Trained Monkey
icon=noicon
arg=<macro>
run("RGB Color");
run("Measure");
run("Close");
run("Open Next");
</macro>
</line>
// end of file
```


En la figura A.4 se muestra la interfaz gráfica y un espacio de trabajo modelo.

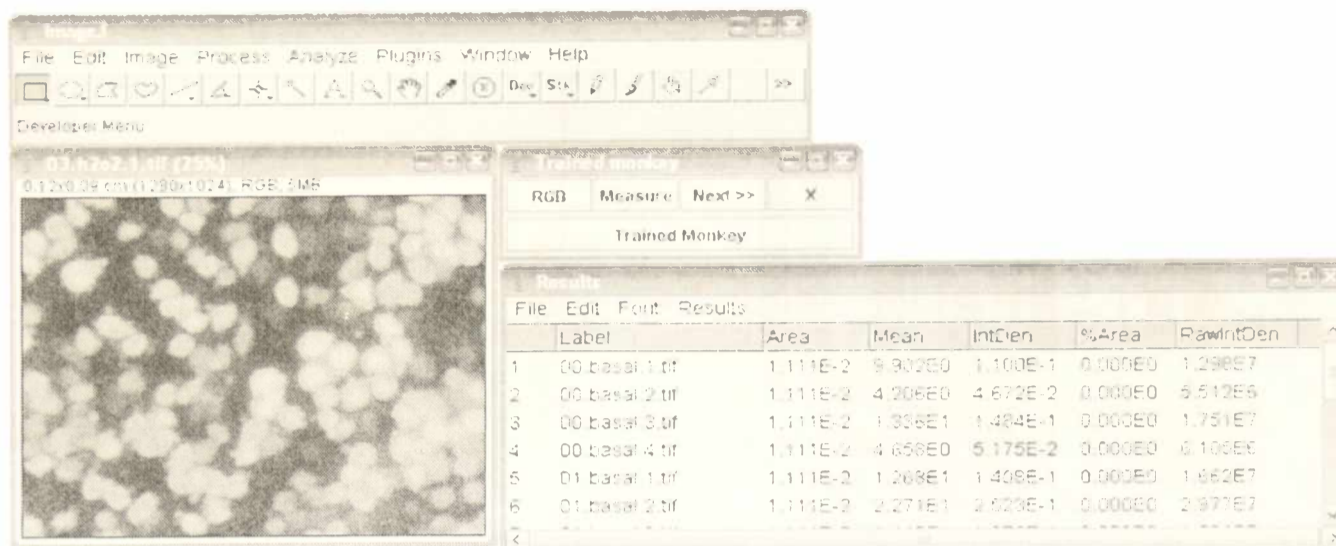


Figura A.4 – Análisis de imágenes mediante el uso de *Trained monkey*. El botón **RGB** convierte la imagen en una imagen compatible con la medida de intensidad, el botón **measure** mide la intensidad de fluorescencia en toda el área de la imagen, el botón **Next>>** abre la siguiente imagen en la carpeta de trabajo. El botón **Trained mokey** realiza las tres tareas anteriores de manera secuencial. El botón **X** cierra todas las imágenes abiertas, sin guardar cambios.

El análisis de las imágenes se reduce a un clic por imagen, dejando la posibilidad de realizar paso por paso el análisis, por ejemplo para evitar la medida de imágenes erróneas. Sin embargo se deben hacer dos suposiciones para simplificar el análisis de esta manera, a saber:

1. La interferencia del canal azul o rojo por sobre el verde es despreciable frente a la intensidad de fluorescencia en el canal verde. Es necesaria esta suposición para evitar separar la imagen en sus componentes de color.
2. Como se mencionó anteriormente, las áreas sin células o con artefactos fluorescentes no alteran significativamente la medida. Incluso, si existiera diferencia, esta podría ser salvada aumentando el número de mediciones en cada condición.

Para evaluar si el análisis por ambos métodos es equivalente se analizaron nuevamente todos los ensayos de detección de ROS por microscopía de fluorescencia utilizando la herramienta *Trained monkey*. En la figura A.5 se muestra la comparación para un ensayo de cuantificación de fluorescencia inducida por ROS.

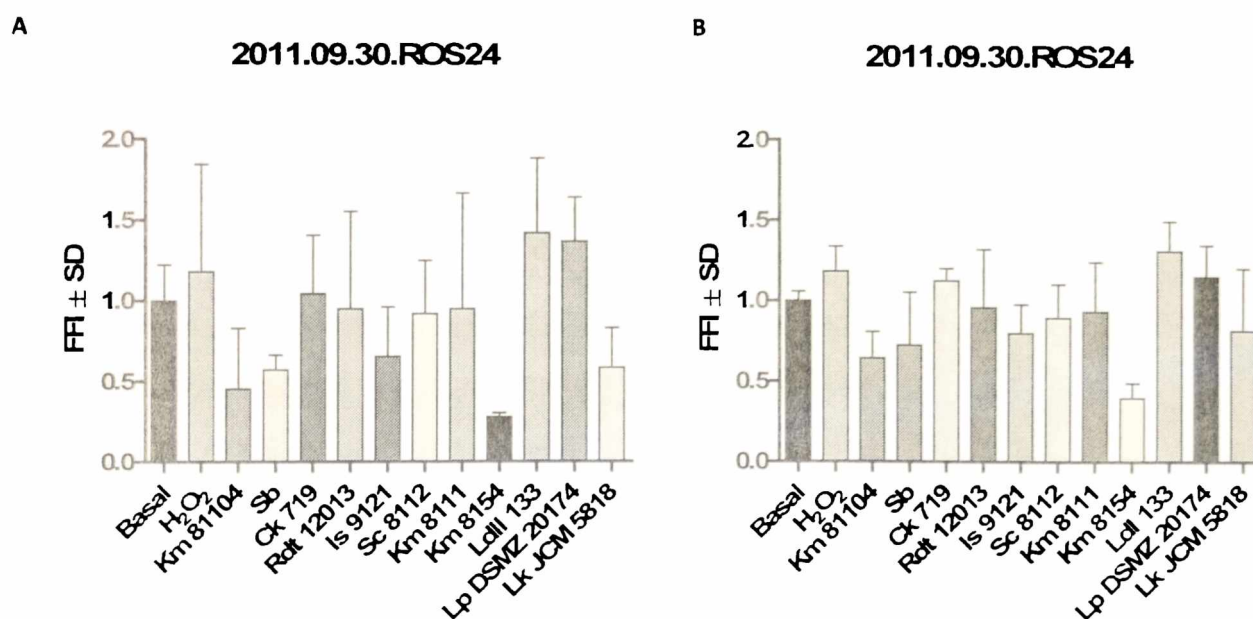


Figura A.5 – Comparación en el análisis de intensidad de fluorescencia en imágenes correspondientes a un mismo elemento utilizando A el método manual y B el *plugin Trained monkey*.

Se puede observar claramente que el error en la medida es menor cuando se elimina el factor de subjetividad a la hora de establecer los umbrales de fluorescencia. Al hacer la comparación del análisis de varios ensayos, se decidió a reanalizar todos los ensayos con este nuevo método.

Se cuantificó la mejora en el tiempo de análisis de los ensayos de fluorescencia comparando los métodos. La velocidad de procesamiento utilizando el método de teclas abreviadas fue de 30 segundos por imagen en promedio. Al utilizar la interfaz de gráfica el tiempo se redujo a un promedio de 3 segundos por imagen.

Como perspectiva futura se pretende agregar una función de medida en *batch* es decir, completamente automatizada en donde se indique la carpeta que contiene las imágenes a analizar y se obtenga directamente la tabla de resultados así como la publicación como *plugin* de dominio público para *ImageJ* de estas funciones.

Bibliografía y enlaces de interés

ImageJ

<http://rsbweb.nih.gov/ij/>

Lenguaje para macros de *ImageJ*

<http://rsbweb.nih.gov/ij/developer/macro/macros.html>

Microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-u

<http://www.nikoninstruments.com/Products/Microscope-Systems/Inverted-Microscopes/Eclipse-Ti>

Aplicación interactiva para la selección de fluoróforos

<http://www.microscopyu.com/tutorials/flash/spectralprofiles/index.html>

Artículos de microscopía de fluorescencia

<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/index.html>

Licencia

El código que se presenta en el presente apéndice se distribuye bajo licencia *Creative Commons NonCommercialSharealike 3.0*. Brevemente:

Usted es libre de:

copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra

Remezclar — transformar la obra

Bajo las condiciones siguientes:

Reconocimiento — Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciador (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra).

No comercial — No puede utilizar esta obra para fines comerciales.

Compartir bajo la misma licencia — Si altera o transforma esta obra, o genera una obra derivada, sólo puede distribuir la obra generada bajo una licencia idéntica a ésta.

Entendiendo que:

Renuncia — Alguna de estas condiciones puede **no aplicarse** si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor

Dominio Público — Cuando la obra o alguno de sus elementos se halle en el **dominio público** según la ley vigente aplicable, esta situación no quedará afectada por la licencia.

Otros derechos — Los derechos siguientes no quedan afectados por la licencia de ninguna manera:

Los derechos derivados de **usos legítimos** u otras limitaciones reconocidas por ley no se ven afectados por lo anterior.

Los derechos **morales** del autor;

Derechos que pueden ostentar otras personas sobre la propia obra o su uso, como por ejemplo **derechos de imagen** o de privacidad.

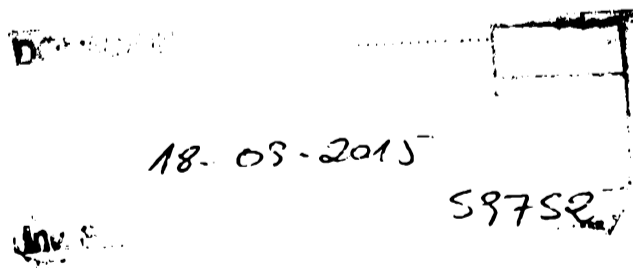
Aviso — Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra.

Puede conseguir el texto completo de la licencia (texto legal) en el siguiente vínculo:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/legalcode>



Trained monkey - ImageJ plugin by David Emmanuel Romanin is licensed under a Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported License.



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.
IUV-59752