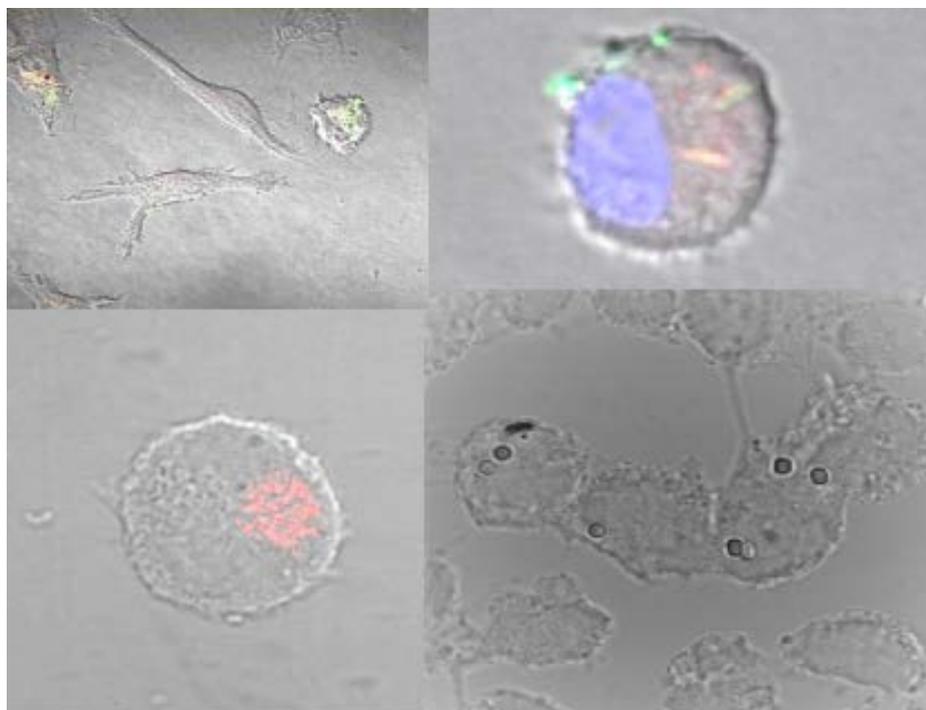


TESIS DOCTORAL

“Probióticos basados en bifidobacterias: interacción con células fagocíticas y acenocumarol”



Lic. Sabrina E. Assad

Director Dr. Pablo F. Pérez

Codirectora Dra. Jessica Minnaard

-2019-



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

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



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA**

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

“Probióticos basados en bifidobacterias: interacción con
células fagocíticas y acenocumarol”

Lic. Sabrina E. Assad

Director Dr. Pablo F. Pérez

Codirectora Dra. Jessica Minnaard

-2019-

El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), UNLP, CONICET; bajo la dirección del Dr. Pablo F. Pérez y la codirección de la Dra. Jessica Minnaard.



CIDCA



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

A mis papás...

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, por la formación brindada y por permitirme realizar el presente trabajo.

A mis directores, al Dr. Pablo Pérez por haberme inspirado a seguir el camino de la investigación científica en su rol como profesor y posteriormente por haberme guiado y alentado con confianza y optimismo a concretar este trabajo. A la Dra. Jessica Minnaard (Jessi) por haber sido un pilar fundamental en mi formación profesional, por haberme enseñado, acompañado y alentado siempre, por la enorme dedicación y compromiso. A los dos por la calidez humana.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado la beca para el desarrollo del presente trabajo de tesis.

A las autoridades del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), por abrirme las puertas del instituto y permitirme realizar este trabajo.

Al Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay y en especial a la Dra. Mariela Bollati por haberme recibido tan gentilmente para realizar estudios presentados en este trabajo de tesis. A “las chiquilinas” de la UBC, en especial a Sabina, Karen y Romina por su gran ayuda y apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A Laboratorios Bagó por donarme el acenocumarol y a Santiago Claver por brindarme el equipo para los ensayos de coagulación.

Al IIFP por recibirme para poder realizar los ensayos. En especial al Dr. Martín Rumbo por permitirme utilizar las Caco-2 CCL20:Luc y a David, por su buena predisposición y brindarme su conocimiento y ayuda con los experimentos de biología molecular.

A las chicas del citómetro, Ceci y Meli por brindarme ayuda con las adquisiciones y hacer que las horas allí sean más amenas.

A Marianela del CINDEFI, por su buena predisposición para enseñarme y aconsejarme sobre el uso del NanoDrop.

A la Dra. María Eugenia Rodríguez y a su grupo por crear la "AAM", Asociación de Ayuda Mutua, y colaborar con los reactivos para los experimentos.

A mi amiga, Sofi Goicoechea por ayudarme y transmitirme todos sus conocimientos para el experimento in vivo, aún con Lolo (mi ahijado) en la panza.

A Mari Urriza por su gran ayuda en el experimento in vivo.

A Meli, mi hermana de tesis, por su ayuda en el experimento in vivo y en los experimentos in vitro! Por estar dispuesta siempre, por las charlas, los cartelitos alentadores, por ser una gran compañera y amiga.

A Fabricio Lareu por su ayuda, consejos y buena predisposición.

A Iva por enseñarme, aconsejarme y acompañarme en mis primeros pasos por este camino, y por la ayuda con los cultivos celulares.

A todos los integrantes del grupo Micro y de la cátedra por haberme recibido cálidamente en el grupo, en especial gracias a Aye y a Fer por toda la ayuda y consejos brindados.

A mis compañeros de zoobox, Manu, Lina, Feli (especialmente por la gran ayuda en cuestiones informáticas), Gabi, Pachi, Esteban, Susan, Lu, Martín, Santi, Meli, Pau, Flor, Agus, Nina, Dolo, Nico por los mates, las charlas, la ayuda, por haber hecho los días más lindos y divertidos desde el primer día, por su compañerismo y amistad.

A mis papás, por enseñarme sus valores, por inculcarme la importancia de la formación profesional, por alentarme siempre a desafiarme, por no dejarme caer. A mi hermana por el cariño y apoyo incondicional.

A mi amor y mejor compañía Santi, por ayudarme, aconsejarme, y alentarme incontables veces para que llegue hasta este momento.

Gracias a todos los que colaboraron para que pueda cumplir con mi mayor desafío...

INDICE

INDICE GENERAL.....	I
ABREVIATURAS.....	VI

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
PROBIÓTICOS.....	2
BIFIDOBACTERIAS.....	5
MEDICAMENTOS Y PROBIÓTICOS	7
ACENOCUMAROL	9
BIBLIOGRAFIA	13
OBJETIVOS	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
CAPITULO I: EFECTO DEL ACENOCUMAROL SOBRE LA FAGOCITOSIS Y DESTINO INTRACELULAR DE BIFIDOBACTERIAS	
INTRODUCCIÓN	19
Bibliografía	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
I.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	27
I.2 Células eucarióticas.....	28
I.3 Estudio de viabilidad	28
I.4 Marcación de los microorganismos	28
I.5 Tratamientos con calor y con luz UV.....	29
I.6 Ensayo de hidrofobicidad.....	29
I.7 Partículas inertes.....	29

INDICE

I.8 Anticoagulante: Acenocumarol (AC).....	30
I.9 Fagocitosis de bifidobacterias por células THP-1.....	30
I.10 Efecto de la concentración bacteriana sobre la interacción con células fagocíticas.....	31
I.11 Fagocitosis de esferas de látex (<i>beads</i>) en presencia de bifidobacterias.....	31
I.12 Efecto de acenocumarol sobre la fagocitosis de bacterias y esferas de látex.....	31
I.13 Fagocitosis y destino intracelular de bifidobacterias.....	32
I.14 Ensayo de fagocitosis y destino intracelular de <i>beads</i> en presencia de la cepa CIDCA 5310.....	33
I.15 Análisis estadístico.....	33
RESULTADOS	34
I.1 Marcación de los microorganismos	35
I.2 Efecto del agregado de azul tripán	36
I.3 Fagocitosis de bifidobacterias por células THP-1.....	37
I.4 Destino intracelular de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317.....	41
I.5 Efecto de acenocumarol sobre la fagocitosis de bifidobacterias.	44
I.6 Efecto de acenocumarol sobre el destino intracelular de la cepa CIDCA 5310.	47
I.7 Fagocitosis de esferas de látex (<i>beads</i>) en presencia de bifidobacterias.....	48
I.8 Efecto de acenocumarol sobre la fagocitosis de esferas de látex.	50
I.9 Efecto de la presencia de la cepa CIDCA 5310 sobre la fagocitosis y destino intracelular de esferas de látex.	50
I.10 Efecto de bifidobacterias sobre la fagocitosis de <i>Bacillus cereus</i>	54
DISCUSIÓN.....	56
Bibliografía	65

CAPITULO II: RESPUESTA CELULAR FRENTE A LA ESTIMULACIÓN CON BIFIDOBACTERIAS Y ACENOCUMAROL

INTRODUCCIÓN	67
Bibliografía	73
MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
II.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	76
II.2 Células eucarióticas.....	76
II.3 Evaluación de la expresión de moléculas de superficie.....	77
II.4 Estudio de viabilidad	78
II.5 Evaluación de la respuesta celular en células HT-29 NF- κ B GFP.....	78
II.6 Evaluación de la respuesta celular en células Caco 2 CCL20: LUC.....	79
II.7 Estudio de la respuesta celular en un sistema de co-cultivo	80
II.8 Análisis estadístico	80
Bibliografía	80
RESULTADOS	82
II.1 Expresión de HLA-DR en células THP-1PMA.	83
II.2 Expresión de TLR2	85
II.3 Expresión de moléculas de superficie CD64 y CD16.	86
II.4 Expresión de las moléculas CD163, CD206 y CD23	89
II.5 Expresión de moléculas de superficie en células THP-1 en ausencia de PMA.....	92
II.6 Expresión NF- κ B	97
II.7 Expresión de CCL20	98
II.8 Expresión de NF- κ B en células HT-29 en sistema de co-cultivo con células THP- 1.....	100
II.9 Expresión de moléculas de superficie en células THP-1PMA en sistema de co-cultivo con células HT-29 NF- κ B GFP.	102

DISCUSIÓN	104
Bibliografía	114
CAPITULO III: EFECTO DEL ACENOCUMAROL SOBRE LA INTERACCIÓN DE BIFIDOBACTERIAS CON CÉLULAS DENDRÍTICAS	
INTRODUCCIÓN.....	117
Bibliografía	120
MATERIALES Y MÉTODOS.....	121
III.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	122
III.2 Células eucarióticas.....	122
III.3 Estudio de la respuesta celular en un sistema de co-cultivo	123
III.4 Evaluación de la expresión de moléculas de superficie en células dendríticas (CD) .	124
III.5 Fagocitosis de CIDCA 5310 y CIDCA 5317 por células dendríticas.....	126
III.6 Fagocitosis y destino intracelular de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 en células dendríticas.....	127
III.7 Medida de citoquinas en sobrenadante	128
III.8 Análisis estadístico.....	128
RESULTADOS	129
III.1 Expresión de NF- κ B.....	130
III. 2 Expresión de moléculas de superficie en células dendríticas en sistema de co-cultivo con células epiteliales.....	132
III.3 Medida de la concentración de citoquinas en sobrenadante de células dendríticas en co-cultivo con células epiteliales.....	139
III.4 Fagocitosis de bifidobacterias por células dendríticas y efecto del acenocumarol..	143
III.5 Fagocitosis de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 medido por microscopía confocal.	145
III.6 Destino intracelular de la cepa CIDCA 5310 en células dendríticas.....	145
III.7 Efecto del acenocumarol sobre el destino intracelular de la cepa CIDCA 5310 en células dendríticas.....	147

DISCUSIÓN.....	148
Bibliografía	155
CAPITULO IV: EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN BIFIDOBACTERIA- ACENOCUMAROL-HOSPEDADOR EN UN MODELO MURINO	
INTRODUCCIÓN.....	157
Bibliografía	160
MATERIALES Y MÉTODOS.....	162
IV.1 Ratones empleados.....	163
IV.2 Suspensiones de <i>Bifidobacterium</i>	163
IV.3 Protocolo de experimentación	164
IV.4 Medida de la actividad fagocítica de granulocitos y monocitos.....	166
IV.5 MEDIDA DEL TIEMPO DE PROTROMBINA.....	166
IV.6 Preparación de las muestras para realizar qPCR.	166
IV. 7 Cortes histológicos.	169
IV. 8 Análisis estadístico.	170
Bibliografía	170
RESULTADOS	172
IV. 1 Histología.....	173
IV.2 Determinación de la actividad fagocítica de granulocitos y monocitos.....	173
IV.3 Efecto sobre la coagulación.....	174
IV. 4 Estudio de le expresión de citoquinas.....	176
DISCUSIÓN	179
Bibliografía.....	185
DISCUSION GENERAL.....	187
PERSPECTIVAS	194

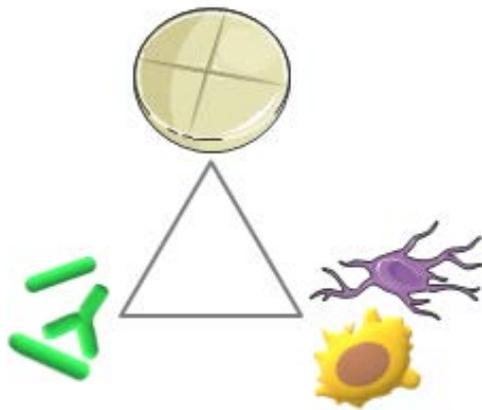
ABREVIATURAS

° C	Grados centígrados
AC	Acenocumarol
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
B	Bazo
B/C	<i>Bead</i> / célula
BSA	Álbumina de suero bovino
CD	Células dendríticas
CYP	Citocromo P450
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's minimum Essentials medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad óptica
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Flic	Flagelina
FSC	Foward Scatter
H	Hora
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
IE	Índice de expresión
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IP	Ioduro de propidio

LN	Luminiscencia normalizada
LPS	Lipopolisacárido
mg	Miligramo
MDI	Multiplicidad de infección
MDR1	Multidrug Resistance protein 1
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
min	Minutos
ml	Mililitros
MRSc	Caldo de Man, Rogosa y Sharpe
NCC	Colección de cultivo de Nestlé
NF- κ B	Factor Nuclear kappa B
NK	Células natural killer
NLM	Nódulos Linfáticos Mesentéricos
nm	Nanómetros
p/v	Peso en volúmen
PBS	Buffer salino fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldheído
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PP	Placas de Peyer
PPRs	Receptores de Reconocimiento de Patrones
RIN	Razón Internacional Normalizada
SFB	Suero fetal bovino
SSC	Side Scatter
T	Temperatura
THP-1PMA	Células THP-1 diferenciadas con PMA

TLRs	Receptor tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TP	Tiempo de protrombina
UA	Unidades Arbitrarias
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
μ l	Microlitro
μ M	Micromolar
v/v	Volúmen en volúmen

INTRODUCCIÓN GENERAL



 **PROBIÓTICOS**

Los microorganismos probióticos fueron definidos en el año 2001 por un panel de expertos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), como microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico al consumidor. Sin embargo, bacterias muertas y ciertos componentes moleculares bacterianos también pueden generar un efecto probiótico (Quigley, 2011; Giahi *et al.*, 2012; Chung *et al.*, 2019).

El efecto benéfico de los probióticos se ha demostrado en desórdenes como diarrea, alergias, enfermedad inflamatoria intestinal, malabsorción y enterocolitis necrotizante en bebés prematuros (Yousefi *et al.*, 2018). Además, se ha demostrado el potencial de estos microorganismos contra varias enfermedades no sólo a nivel intestinal sino también a nivel sistémico (Villena *et al.*, 2005; Quigley, 2011).

Las preguntas radican ahora en el mecanismo de acción de los probióticos. Se han descrito varios mecanismos, dentro de los cuales los principales son la contribución a la integridad de la barrera epitelial, la adhesión a la mucosa intestinal con la exclusión de patógenos, la producción de sustancias microbidas, la modulación del sistema inmune y de la inflamación a nivel local y sistémico, la inhibición de la actividad enzimática procarcinogénica y la inducción de la actividad enzimática que favorece a la buena nutrición (Boirivant and Strober, 2007; Thursby and Juge, 2017; Yousefi *et al.*, 2018). En la figura 1 se puede observar un esquema resumido de los elementos presentes en los mecanismos de acción de los probióticos. Cada uno de estos mecanismos puede subdividirse de acuerdo con la función involucrada y según las condiciones de su entorno, es decir de acuerdo al estado inflamatorio presente.

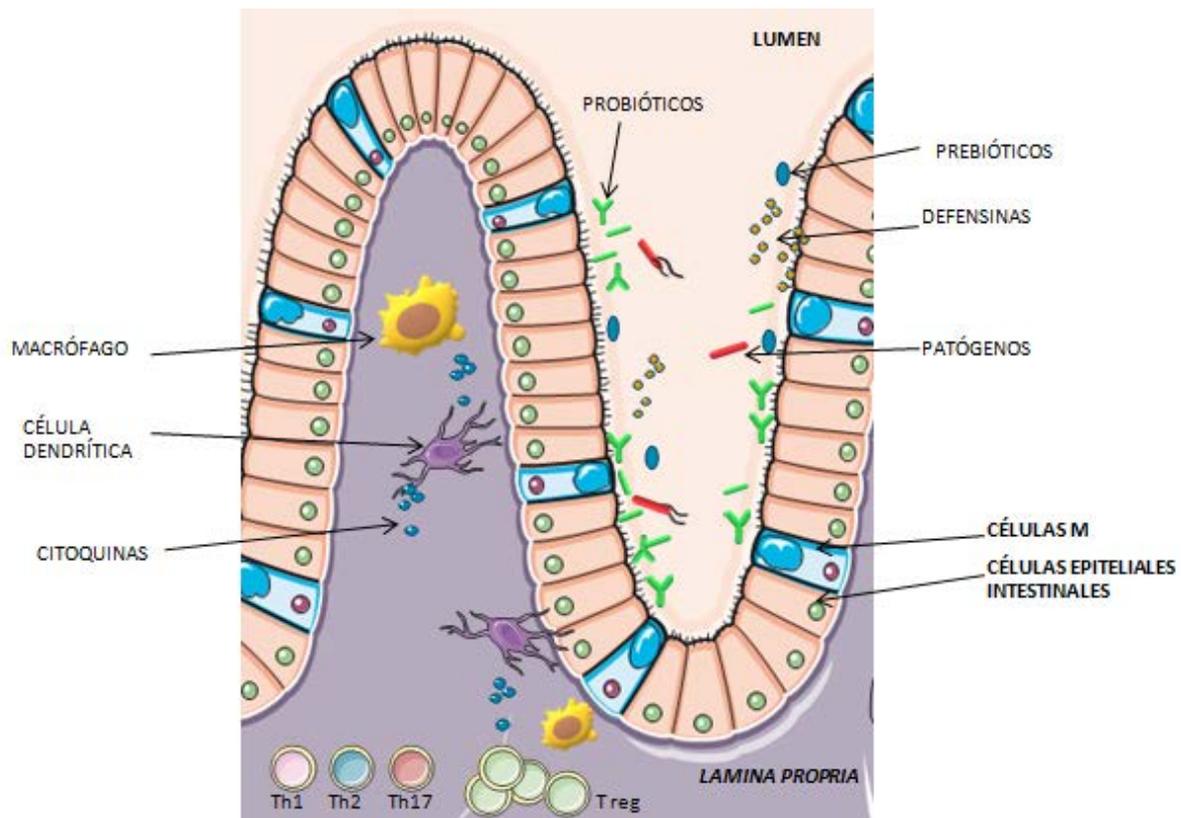


Figura 1 Esquema resumido de los elementos presentes en la acción probiótica a nivel intestinal.

La gran complejidad de los mecanismos de acción de los probióticos radica en que diferentes bacterias probióticas pueden desencadenar diferentes efectos, e incluso cepas de la misma especie pueden desempeñar distintas funciones, lo cual puede depender de la capacidad de expresar moléculas en su superficie (polisacáridos, glicolípidos, patrones moleculares asociados a microorganismos) o de su capacidad de secretar sustancias que son capaces de interactuar con varios componentes de las células del epitelio intestinal o con células profesionales del sistema inmune que se encuentran interactuando con esta barrera epitelial. Además se ha reportado el efecto de sus metabolitos, como ácidos grasos de cadena corta capaces de disminuir la activación proinflamatoria en células epiteliales, contribuyendo al efecto probiótico (Iraporda et al., 2014, 2015).

Las bacterias probióticas pueden interactuar con las células epiteliales intestinales promoviendo la producción de mucina, aumentando las uniones estrechas, induciendo la liberación de péptidos antimicrobianos, la producción de proteínas de shock térmico y modulando la secreción de citoquinas proinflamatorias. El efecto que estas bacterias

puedan generar sobre las células del epitelio intestinal repercutirá sobre las células inmunes subyacentes (Blum *et al.*, 2002; Tsukida *et al.*, 2016), modificando la actividad fagocítica, la expresión de moléculas necesarias para la activación antigénica, la secreción de citoquinas, la producción de IgA, entre otras.

Las células presentadoras de antígenos que se encuentran con estas bacterias o con sus elementos estructurales, desencadenan respuestas inmunes innatas con capacidad para reconocerlas, procesarlas, presentarlas y generar una respuesta inmune adaptativa (Yousefi *et al.*, 2018). En este sentido, es de gran relevancia estudiar las interacciones entre los probióticos y células claves en regular la respuesta inmune del hospedador, como son los macrófagos y células dendríticas (Rescigno *et al.*, 2001; Lescheid, 2014).

La bibliografía disponible destaca que las bacterias probióticas aumentan la inmunidad celular en humanos, caracterizada por la activación de macrófagos, células NK, linfocitos T citotóxicos y la liberación de citoquinas, con modificación del balance Th1 / Th2, modulando así los mecanismos de defensa inmunitarios innatos y adaptativos (Ashraf and Shah, 2014). Para cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se halla descrito que la secreción de citoquinas pro o anti-inflamatorias es dependiente del modelo de macrófagos utilizado y de la cepa (Kim, Kim and Kim, 2007; Donkor *et al.*, 2012; Ashraf and Shah, 2014).

La unión de las bacterias a receptores tipo Toll o tipo Nod desencadena vías de señalización que incluyen NF- κ B, proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), fosfoinositol-3-quinasa proteína quinasa B/Akt (PI3K-PKB/Akt) y el receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas (PPAR γ) generando un efecto directo sobre la respuesta inflamatoria (Lescheid, 2014).

Es importante recalcar que la capacidad de un probiótico de modificar aumentando o disminuyendo las respuestas celulares antes mencionadas, es cepa dependiente (Lebeer, Vanderleyden and De Keersmaecker, 2010).

Lactobacillus y *Bifidobacterium* son los géneros más utilizados en la elaboración de alimentos probióticos y productos farmacéuticos, y aunque se ha estudiado mucho sobre sus mecanismos, aún existen áreas vacantes de conocimiento.



BIFIDOBACTERIAS

Bifidobacterium, género perteneciente al *filum* de las Actinobacterias, fue descrito por primera vez en 1899 por Tissier como “*Lactobacillus bifidus*” (R, 1950), al analizar las bacterias aisladas a partir heces de niños alimentados con leche materna (O’Callaghan and van Sinderen, 2016).

Estos microorganismos anaeróbicos forman parte de la microbiota intestinal en humanos siendo uno de los géneros más abundantes en adultos, aunque su predominancia es mayor en niños, especialmente en lactantes, donde representan casi la totalidad de la población bacteriana (Young et al., 2004; Arboleya et al., 2016; Ruiz et al., 2017; Thursby and Juge, 2017). Se conocen por cumplir un importante rol en el metabolismo de componentes dietarios indigeribles en el intestino delgado, ejercen al igual que las demás bacterias comensales presentes en la microbiota un “efecto barrera” frente a gérmenes patógenos, y son capaces de producir bacteriocinas frente a microorganismos extraños (Yousefi et al., 2018). Además, presentan la capacidad de modular la respuesta inmune (Schiffrin and Blum, 2002; Ruiz et al., 2016), tema central de la presente tesis.

Las bifidobacterias constituyen una de las primeras poblaciones bacterianas que colonizan el tracto intestinal (Arboleya et al., 2016). La formación de la microbiota en recién nacidos involucra la colonización por parte de una comunidad bacteriana, cuya conformación va a depender de varios factores como por ejemplo la edad, el estado metabólico y el estilo de vida de la madre, hasta la posibilidad de transmisión de microorganismos al niño, antes del nacimiento (Collado et al., 2016). Otros factores pueden ser el modo de parto, el tipo de alimentación, el uso temprano de antibióticos y antecedentes genéticos (Ruiz et al., 2017). Se ha demostrado que la segunda especie mayoritaria identificada en niños alimentados con leche materna, es *Bifidobacterium bifidum* (siendo la primera *B. breve* y la tercera *B. longum*). Si bien, la concentración de esta especie y de las bifidobacterias en general disminuye con la edad, la concentración de *B. adolescentis* junto con *B. catenulatum* alcanzan niveles mucho mayores en el intestino del adulto que en el de niños (Turroni et al., 2009; Arboleya et al., 2016).

Las distintas cepas de bifidobacterias utilizadas en el presente trabajo de tesis y estudiadas en nuestro grupo, demostraron tener diferencias en las propiedades

superficiales (Pérez et al., 1998; Bibiloni, Pérez and De Antoni, 1999; Kociubinski et al., 2002), diferencias en la adhesión a enterocitos humanos en cultivo (Pérez et al., 1998; Bibiloni, Fernando Pérez and Liliana De Antoni, 1999; Trejo et al., 2006; Trejo, Pérez and De Antoni, 2010), y se ha demostrado la capacidad de la cepa *B. bifidum* CIDCA 5310 de antagonizar los efectos de la infección con *C. difficile* en un modelo de enterocolitis en hámster (Trejo, De Antoni and Pérez, 2013).

Como se mencionó anteriormente, no todas las cepas de bacterias probióticas generan el mismo efecto por lo que es crucial estudiar los mecanismos involucrados en la interacción bacteria-célula inmune, para poder comprender y predecir el comportamiento de una bacteria con efectos benéficos.

En este contexto, la inclusión de los medicamentos es relevante para ampliar el espectro de interacciones que ocurren en el entorno intestinal.



MEDICAMENTOS Y PROBIÓTICOS

El consumo de medicamentos orales genera el encuentro del fármaco con la microbiota intestinal presente, derivando en una posible interacción (Stojančević, Bojić and Salami, 2014). Se ha demostrado que las enzimas provenientes de los microorganismos presentes en la microbiota intestinal poseen la habilidad de metabolizar xenobióticos y de impactar sobre la farmacocinética de las drogas y sobre su biodisponibilidad modificando la efectividad del fármaco (Matuskova *et al.*, 2014; Stojančević, Bojić and Salami, 2014). En estos efectos podrían estar involucrados cambios en la expresión de citocromos, expresión de transportadores, modulación de la permeabilidad celular o cambios en la actividad enzimática en el lumen intestinal por la interacción del fármaco con la microbiota (Al-Salami *et al.*, 2008, 2012; Elefterios and Bezirtzoglou, 2012; Matuskova *et al.*, 2014; Stojančević, Bojić and Salami, 2014). Un esquema de estos efectos se puede observar en la figura 2. Además, la interacción de los probióticos con células fagocíticas y no fagocíticas da lugar a la producción de diferentes mediadores químicos (ej. citoquinas y quemoquinas) produciendo los mismos efectos que la microbiota, incluida la modificación de moléculas de unión a fármacos tales como los citocromos (Stojančević, Bojić and Salami, 2014).

Considerando lo antedicho, es de altísima relevancia estudiar la respuesta de las células fagocíticas luego de la interacción con los microorganismos probióticos en presencia de moléculas farmacológicamente activas, ya que estas interacciones pueden intervenir en la eficacia del medicamento y en las propiedades probióticas de las bacterias.

Las interacciones de los alimentos con los medicamentos se hallan descritas y aunque algunos aspectos de las interacciones probiótico-fármaco-hospedador han sido investigados, aún es un campo escasamente estudiado, particularmente el efecto de los fármacos sobre los probióticos. Se han encontrado trabajos que relacionan el consumo de fármacos con efectos sobre el sistema inmune, ya sea disminuyendo la concentración de mediadores de la inflamación o modificando la activación de células fagocíticas (An *et al.*, 2010; Schroecksnadel *et al.*, 2013; Warzecha *et al.*, 2017), o como se mencionó anteriormente, el efecto de la microbiota sobre el metabolismo del fármaco (Jourova, Anzenbacher and Anzenbacherova, 2016), pero no que relacionen los tres componentes, probiótico, fármaco y sistema inmune del hospedador.

Por este motivo, y teniendo en cuenta el aumento de la expectativa de vida, el aumento del número de pacientes multimedicados y la alteración de la biodisponibilidad de drogas en adultos mayores, es que son necesarios estudios que contemplen el efecto del consumo de un producto probiótico en individuos que estén recibiendo fármacos.

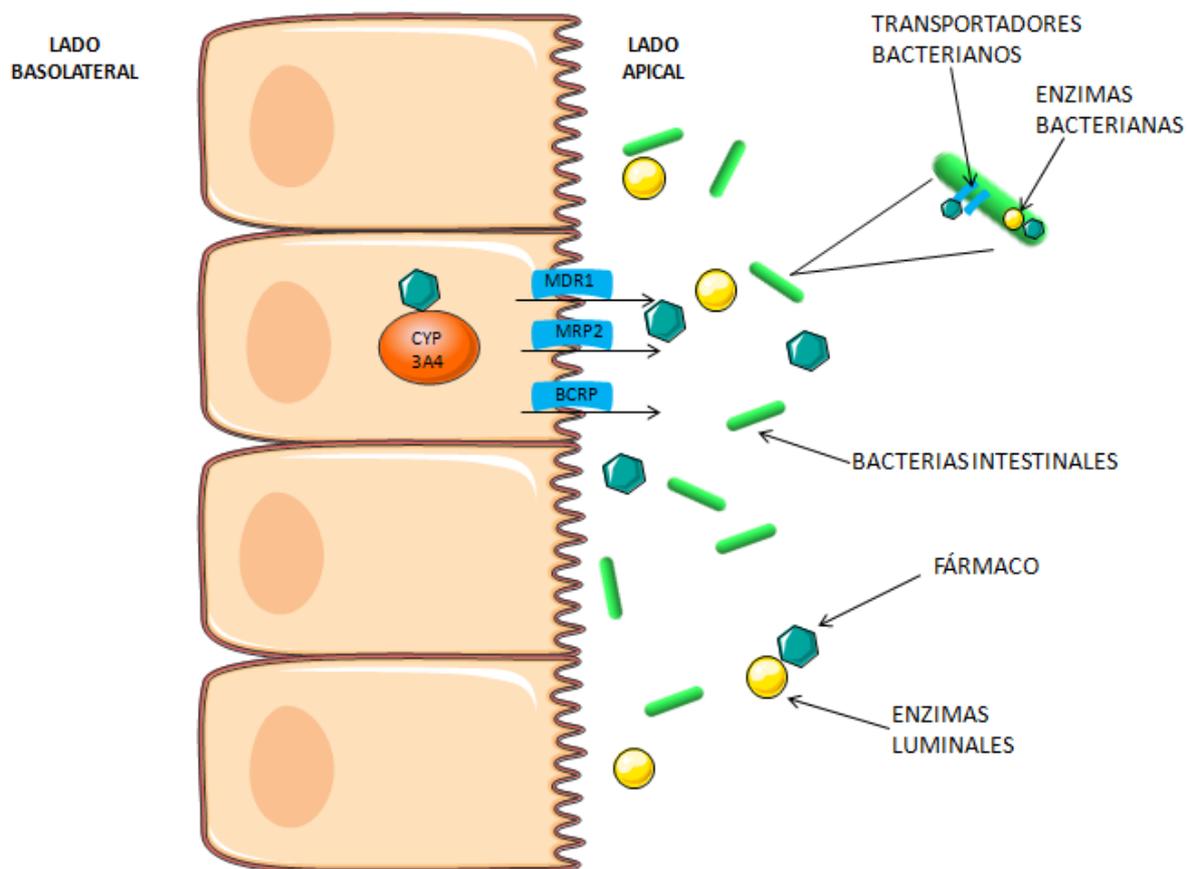


Figura 2 Esquema de las interacciones que puede sufrir un fármaco en el contexto intestinal. La acción conjunta de los transportadores presentes en las bacterias y en los enterocitos, y las enzimas bacterianas y luminales pueden generar alteraciones en la farmacocinética de la droga.



ACENOCUMAROL

El acenocumarol, al igual que la warfarina, es uno de los derivados cumarínicos más usado como anticoagulante oral para el tratamiento o prevención de desórdenes tromboembólicos (Gschwind *et al.*, 2013; Militaru *et al.*, 2015). Este medicamento es especialmente prescripto en Argentina y Europa, y considerando la vacancia de saberes científicos sobre el mismo, los estudios de la presente tesis se han enfocado en el acenoumarol.

El acenocumarol es un antagonista de la vitamina K, la cual es un cofactor necesario para la activación de la enzima hepática γ -glutamyl carboxilasa, necesaria para la maduración de los factores de coagulación II, VII, IX y X, así como también de las proteínas S, C y Z. Durante este proceso, la vitamina K es oxidada y por lo tanto se necesita la enzima epóxido reductasa para reducirla otra vez a su forma activa. Los derivados cumarínicos inhiben este último paso a través de la inhibición de la actividad de la epóxido reductasa; esto provoca la reducción de los niveles plasmáticos de los factores de la coagulación dependientes de vitamina K generando la disminución de la coagulación sanguínea (Warzecha *et al.*, 2016). La acción anticoagulante se esquematiza en la figura 3.

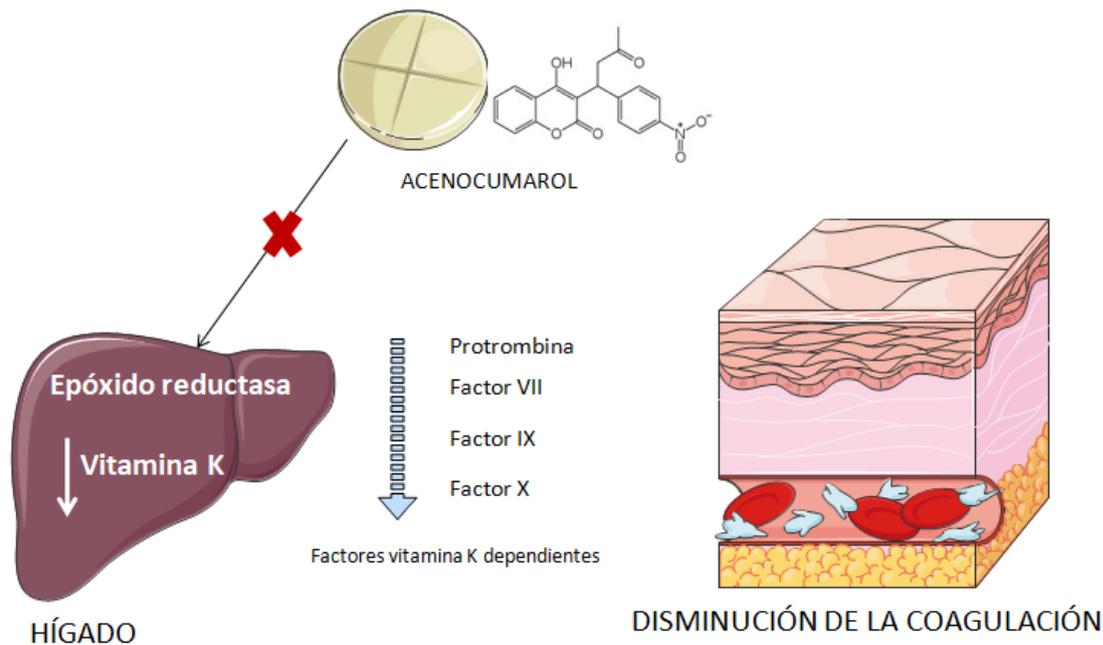


Figura 3 Acción anticoagulante del acenocumarol. Se muestra la inhibición de la enzima epóxido reductasa en hígado, con la consecuente disminución de la vitamina K, y de los factores de coagulación dependientes de la misma en plasma.

El hígado es el principal órgano responsable de la metabolización y biotransformación de drogas, sin embargo, el primer lugar donde comenzaría dicho proceso es en el intestino, donde se encuentran gran cantidad de enzimas producidas por la microbiota intestinal (Jourova, Anzenbacher and Anzenbacherova, 2016; Kim et al., 2018; Kyriachenko et al., 2019). Debido a la capacidad de ciertas bacterias de proveer vitamina K, el desbalance en la microbiota puede afectar la acción anticoagulante de la droga, con los efectos adversos que esto implica (Stojančević, Bojić and Salami, 2013).

La terapia con anticoagulantes orales como acenocumarol, requiere de un estricto control de la dosis empleada ya que la misma tiene una gran variación intra e inter-individual y un rango terapéutico muy estrecho. Parte de esta variabilidad se debe al polimorfismo genético del citocromo P450 2C9 (CYP2C9) involucrado en la metabolización de drogas y parte a las características enunciadas a continuación:

Características del paciente: edad, género, masa muscular.

Incorporación de vitamina K en la dieta.

Comorbilidades: falla hepática, falla cardíaca, falla renal severa, enfermedad tiroidea.

Enfermedades agudas: fiebre, sepsis, diarrea, falla cardíaca aguda.

Tratamiento concomitante con otra droga.

(Militaru et al., 2015)

Sin embargo, no se ha encontrado estudios que evalúen el efecto del consumo de probióticos sobre la dosificación de esta droga.

Inicialmente el tratamiento comienza con una dosis de 8 mg/día y luego se continua con la dosis de mantenimiento entre 2 y 4 mg/día. Debido a la variación intra e inter-individual mencionada anteriormente, es necesario un control periódico para ajustar la dosis, el cual se realiza a través de la determinación del tiempo de protrombina. Este método permite evaluar el funcionamiento de los factores inhibidos II, VII y X de forma precisa junto con la corrección hecha con el RIN (Razón internacional normalizada), el cual es calculado por cada laboratorio (Trejo I., 2004).

Además de la acción anticoagulante del acenocumarol, es importante destacar su capacidad inmunomodulatoria. Se ha demostrado en monocitos aislados de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina, que el acenocumarol es capaz de reducir la concentración de INF- γ , TNF- α y de neopterinina un marcador de respuesta inflamatoria, así como también en células Caco-2 activadas con INF- γ (Schroecksnadel et al., 2013). Además, se ha observado su capacidad de disminuir la respuesta inmune inflamatoria en su uso como pretratamiento, en un modelo de pancreatitis aguda en ratas (Warzecha et al., 2016).

Los alimentos y los nutraceuticos a base de probióticos han ganado espacio en el mercado actual y han adquirido relevancia debido a su gran demanda por los consumidores y profesionales de la salud. Esto lleva a que tanto el consumidor como el productor de alimentos y medicamentos elaborados con microorganismos probióticos, demanden del conocimiento de la acción específica que cada microorganismo probiótico o sustancia bioactiva tiene sobre el individuo.

En este contexto, es de gran relevancia estudiar el efecto de la interacción entre las bifidobacterias y el fármaco acenocumarol en relación a la respuesta celular que podrían generar juntos o separados teniendo en cuenta que tanto las bifidobacterias como el anticoagulante en estudio han demostrado tener un efecto inmunomodulador. Además, es necesario profundizar el estudio del efecto del consumo concomitante de microorganismos probióticos y, en este caso, de acenocumarol, con el fin de poder evaluar si el efecto

probiótico o el efecto anticoagulante se ven afectados, con la consecuencia que tendría sobre el consumidor.



BIBLIOGRAFIA

Al-Salami, H. *et al.* (2008) 'Probiotic pre-treatment reduces gliclazide permeation (ex vivo) in healthy rats but increases it in diabetic rats to the level seen in untreated healthy rats', *Archives of Drug Information*, 1(1), pp. 35–41. doi: 10.1111/j.1753-5174.2008.00006.x.

Al-Salami, H. *et al.* (2012) 'Probiotics decreased the bioavailability of the bile acid analog, monoketocholic acid, when coadministered with gliclazide, in healthy but not diabetic rats', *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 37(2), pp. 99–108. doi: 10.1007/s13318-011-0060-y.

An, J. *et al.* (2010) 'Losartan inhibits LPS-induced inflammatory signaling through a PPAR γ -dependent mechanism in human THP-1 macrophages', *Hypertension Research*, 33(8), pp. 831–835. doi: 10.1038/hr.2010.79.

Arboleya, S. *et al.* (2016) 'Gut bifidobacteria populations in human health and aging', *Frontiers in Microbiology*, 7, pp. 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2016.01204.

Ashraf, R. and Shah, N. P. (2014) 'Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), pp. 938–956. doi: 10.1080/10408398.2011.619671.

Bibiloni, R., Fernando Pérez, P. and Liliana De Antoni, G. (1999) 'Will a high adhering capacity in a probiotic strain guarantee exclusion of pathogens from intestinal epithelia?', *Anaerobe*, 5(5), pp. 519–524. doi: 10.1006/anae.1999.0198.

Bibiloni, R., Pérez, P. and De Antoni, G. (1999) 'Factors Involved in Adhesion of Bifidobacterial Strains to Epithelial Cells in Culture', *Anaerobe*, 5, pp. 483–485. doi:10.1006/anae.1999.0209

Blum, S. *et al.* (2002) 'Probiotics and immune response', *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 22(3), pp. 287–309. doi: 10.1385/CRIAI:22:3:287.

Boirivant, M. and Strober, W. (2007) 'The mechanism of action of probiotics', *Current Opinion in Gastroenterology*, 23(6), pp. 679–692. doi: 10.1097/MOG.0b013e3282f0cffc.

Chung, I.-C. *et al.* (2019) 'Pretreatment with a Heat-Killed Probiotic Modulates the NLRP3 Inflammasome and Attenuates Colitis-Associated Colorectal Cancer in Mice', *Nutrients*, 11(3), p. 516. doi: 10.3390/nu11030516.

Collado, M. C. *et al.* (2016) 'Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(March), pp. 1–13. doi: 10.1038/srep23129.

Donkor, O. N. *et al.* (2012) 'Cytokine profile and induction of T helper type 17 and regulatory T cells by human peripheral mononuclear cells after microbial exposure', *Clinical and Experimental Immunology*, 167(2), pp. 282–295. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04496.x.

Eleferios, E. and Bezirtzoglou, V. (2012) 'Intestinal cytochromes P450 regulating the intestinal microbiota and its probiotic profile', 1, pp. 1–10. doi:10.3402/mehd.v23i0.18370

Giahi, L. *et al.* (2012) 'Regulation of TLR4, p38 MAPkinase, IκB and mirnas by inactivated strains of lactobacilli in human dendritic cells', *Beneficial Microbes*, 3(2), pp. 91–98. doi: 10.3920/BM2011.0052.

Gschwind, L. *et al.* (2013) 'Role of P-glycoprotein in the uptake/efflux transport of oral vitamin K antagonists and rivaroxaban through the caco-2 cell model', *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 113(4), pp. 259–265. doi: 10.1111/bcpt.12084.

Iraporda, C. *et al.* (2014) 'The role of lactate on the immunomodulatory properties of the nonbacterial fraction of kefir', *Food Research International*. Elsevier Ltd, 62, pp. 247–253. doi: 10.1016/j.foodres.2014.03.003.

Iraporda, C. *et al.* (2015) 'Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells', *Immunobiology*. Elsevier GmbH., 220(10), pp. 1161–1169. doi: 10.1016/j.imbio.2015.06.004.

Jourova, L., Anzenbacher, P. and Anzenbacherova, E. (2016) 'Human gut microbiota plays a role in the metabolism of drugs', *Biomedical Papers*, 160(3), pp. 317–326. doi: 10.5507/bp.2016.039.

Kim, H., Kim, T. and Kim, H. (2007) 'Rapid Identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in Probiotic Products Using Multiplex PCR', 17, pp. 490–495.

Kim, J. K. *et al.* (2018) 'Effect of probiotics on pharmacokinetics of orally administered acetaminophen in mice', *Drug Metabolism and Disposition*, 46(2), pp. 122–130. doi: 10.1124/dmd.117.077222.

Kociubinski, G. *et al.* (2002) 'Effect of bile components on the surface properties of bifidobacteria', *Journal of Dairy Research*, 69(2), pp. 293–302. doi: 10.1017/S0022029901005313.

Kyriachenko, Y. *et al.* (2019) 'Crosstalk between gut microbiota and antidiabetic drug action', 10(3), pp. 154–168. doi: 10.4239/wjd.v10.i3.154.

Lebeer, S., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S. C. J. (2010) 'Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 8(3), pp. 171–184. doi: 10.1038/nrmicro2297.

Lescheid, D. W. (2014) 'Probiotics as regulators of inflammation: A review', *Functional Foods in Health and Disease*, 4(7), pp. 299–311.

Matuskova, Z. *et al.* (2014) 'Administration of a probiotic can change drug pharmacokinetics: Effect of *E. coli* Nissle 1917 on amidarone absorption in rats', *PLoS ONE*, 9(2), pp. 3–7. doi: 10.1371/journal.pone.0087150.

Militaru, F. *et al.* (2015) 'Pharmacogenetics aspects of oral anticoagulants therapy', *J Med Life*, 8(2), pp. 171–175. PMID: 25866574

O'Callaghan, A. and van Sinderen, D. (2016) 'Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota', *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN). doi: 10.3389/fmicb.2016.00925.

Pérez, P. F. *et al.* (1998) 'Surface properties of bifidobacterial strains of human origin', *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), pp. 21–26.

Quigley, E. M. (2011) 'Gut microbiota and the role of probiotics in therapy', *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd, 11(6), pp. 593–603. doi: 10.1016/j.coph.2011.09.010.

Norris, R. (1950) 'The isolation and cultivation of *Lactobacillus bifidus*: a comparison of branched and unbranched strains', *Journal of bacteriology*, 60, pp. 681–696.

Rescigno, M. *et al.* (2001) 'Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria.', *Nature immunology*, 2(4), pp. 361–367. doi: 10.1038/86373.

Ruiz, L. *et al.* (2016) 'Proteinaceous molecules mediating *Bifidobacterium*-host interactions', *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), pp. 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2016.01193.

Ruiz, L. *et al.* (2017) 'Bifidobacteria and their molecular communication with the immune system', *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), pp. 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2017.02345.

Schiffirin, E. J. and Blum, S. (2002) 'Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa', *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, pp. S60–S64. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601489.

Schroecksnadel, S. *et al.* (2013) 'Immunomodulatory effects in vitro of vitamin K antagonist acenocoumarol', *Thrombosis Research*. Elsevier Ltd, 131(6), pp. 264–269. doi: 10.1016/j.thromres.2013.02.012.

Stojančević, M., Bojić, G. and Salami, H. Al (2014) 'The Influence of Intestinal Tract and Probiotics on the Fate of Orally Administered Drugs', pp. 55–68. PMID: 24002548

Thursby, E. and Juge, N. (2017) 'Introduction to the human gut microbiota', 474, pp. 1823–1836. doi: 10.1042/BCJ20160510.

Trejo, F. M. *et al.* (2006) 'Inhibition of *Clostridium difficile* growth and adhesion to enterocytes by *Bifidobacterium* supernatants', *Anaerobe*, 12(4), pp. 186–193. doi: 10.1016/j.anaerobe.2006.03.004.

Trejo, F. M., De Antoni, G. L. and Pérez, P. F. (2013) 'Protective effect of bifidobacteria in an experimental model of *Clostridium difficile* associated colitis', *Journal of Dairy Research*, 80(3), pp. 263–269. doi: 10.1017/S0022029913000216.

Trejo, F. M., Pérez, P. F. and De Antoni, G. L. (2010) 'Co-culture with potentially probiotic microorganisms antagonises virulence factors of *Clostridium difficile* in vitro', *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 98(1), pp. 19–29. doi: 10.1007/s10482-010-9424-6.

Trejo I., C. (2004) 'Anticoagulantes: Farmacología, mecanismos de acción y usos clínicos',

Cuadernos de Cirugía, 18(1), pp. 83–90. doi: 10.4206/cuad.cir.2004.v18n1-14.

Tsukida, K. *et al.* (2016) 'Immunoregulatory effects triggered by immunobiotic *Lactobacillus jensenii* TL2937 strain involve efficient phagocytosis in porcine antigen presenting cells', *BMC Immunology*. *BMC Immunology*, pp. 1–12. doi: 10.1186/s12865-016-0160-1.

Turroni, F. *et al.* (2009) 'Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract', *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), pp. 1534–1545. doi: 10.1128/AEM.02216-08.

Villena, J. *et al.* (2005) 'Lactobacillus casei Improves Resistance to Pneumococcal Respiratory Infection in Malnourished Mice', *The Journal of Nutrition*, 135(6), pp. 1462–1469. doi: 10.1093/jn/135.6.1462.

Warzecha, Z. *et al.* (2016) 'Protective effect of pretreatment with acenocoumarol in cerulein-induced acute pancreatitis', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10). doi: 10.3390/ijms17101709.

Warzecha, Z. *et al.* (2017) 'Therapeutic Effect of Low Doses of Acenocoumarol in the Course of Ischemia / Reperfusion-Induced Acute Pancreatitis in Rats'. doi: 10.3390/ijms18040882.

Young, S. L. *et al.* (2004) 'Bifidobacterial Species Differentially Affect Expression of Cell Surface Markers and Cytokines of Dendritic Cells Harvested from Cord Blood', 11(4), pp. 686–690. doi: 10.1128/CDLI.11.4.686.

Yousefi, B. *et al.* (2018) 'Probiotics importance and their immunomodulatory properties', *Journal of Cellular Physiology*, (2018), pp. 8008–8018. doi: 10.1002/jcp.27559.

OBJETIVOS

OBJETIVOS



Objetivo general

Determinar las interacciones que se establecen entre bacterias probióticas del género *Bifidobacterium*, el anticoagulante acenocumarol y el hospedador.

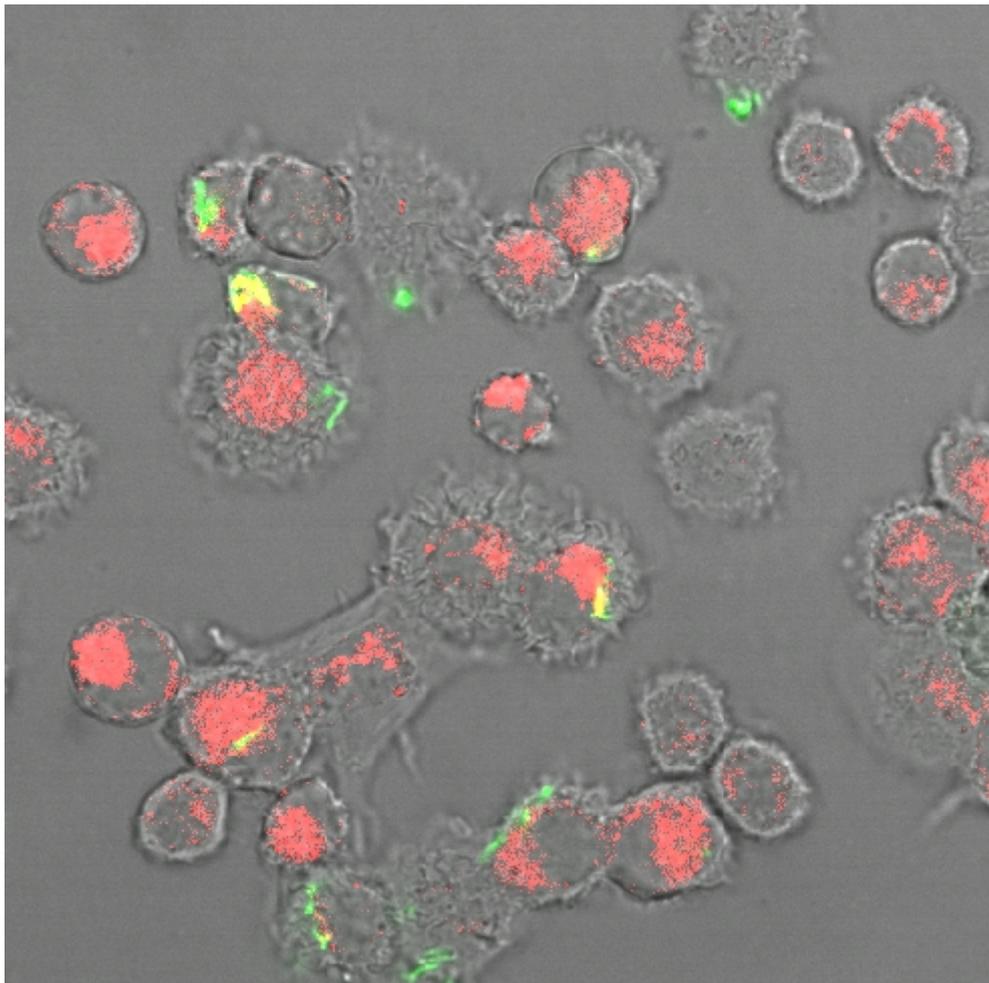


Objetivos específicos

1. Evaluar *in vitro* la actividad de células fagocíticas frente a diferentes cepas de bifidobacteria ensayadas solas o en presencia de acenocumarol y determinar el destino intracelular de las bacterias probióticas dentro de las células fagocíticas.
2. Estudiar los marcadores de activación expresados por las células THP-1 frente a los diferentes estímulos aplicados y las vías de señalización.
3. En un microambiente de co-cultivo con células epiteliales y células fagocíticas o dendríticas, estimuladas por las bifidobacterias:
 - a) Estudiar la respuesta celular mediante la medida de la producción de citoquinas, la actividad fagocítica y la expresión de marcadores de superficie.
 - b) Estudiar la vía de señalización NF- κ B.
4. Evaluar *in vivo* en animales anticoagulados con acenocumarol y tratados con las bacterias probióticas: el efecto sobre la actividad anticoagulante del acenocumarol y la respuesta inmune del hospedador.

CAPÍTULO I

EFFECTO DEL ACENOCUMAROL SOBRE
LA FAGOCITOSIS Y DESTINO
INTRACELULAR DE BIFIDOBACTERIAS



INTRODUCCIÓN

Debido a los escasos estudios que relacionan el efecto de bacterias probióticas, su interacción con fármacos y la repercusión en la respuesta celular del hospedador, es sumamente relevante la caracterización de la interacción de estas bacterias con células involucradas en la respuesta inmune en presencia del fármaco, para poder profundizar en los mecanismos a través de los cuales estas bacterias ejercen su efecto probiótico y si esto se ve modificado por la influencia de un fármaco como el acenocumarol que presenta actividad inmunomodulatoria (Schroeksnadel *et al.*, 2013; Warzecha *et al.*, 2016), además de su acción anticoagulante por la cual es prescripto.

En este sentido, gran parte del presente trabajo de tesis se basa en el estudio de los macrófagos, células implicadas en la inmunidad innata y adaptativa, cuyas funciones se pueden resumir en la detección, señalización y respuesta frente a la interacción con microorganismos (Chanput, Mes and Wichers, 2014).

Específicamente este capítulo se centra en el proceso de fagocitosis en condiciones no opsonizadas. La fagocitosis, proceso de gran importancia biológica, fue descubierto por Élie Metchnikoff, el padre de la probiótica en 1884. No sólo es descrito como un componente crítico de la respuesta inmune innata y adaptativa contra agentes patógenos, sino que también juega un rol crucial en el remodelamiento y en la homeostasis tisular (Flannagan, Jaumouill and Grinstein, 2012; Gordon, 2016).

La fagocitosis se define como la internalización de partículas mayores a 0,5 μm , involucrando el reconocimiento y la unión de las mismas por receptores presentes en la superficie celular y la participación activa de las células fagocíticas a través de la reorganización del citoesqueleto (Aderem and Underhill, 1999; Flannagan, Jaumouill and Grinstein, 2012). Luego de la internalización, la partícula se encuentra en una vacuola derivada de la membrana plasmática que contiene fluido extracelular, la cual sufre distintos cambios para llegar a la formación del fagolisosoma. Esta maduración del fagosoma es necesaria para lograr una fagocitosis efectiva (Flannagan, Jaumouill and Grinstein, 2012).

En la figura 1, se muestran los diferentes estados de maduración del lisosoma.

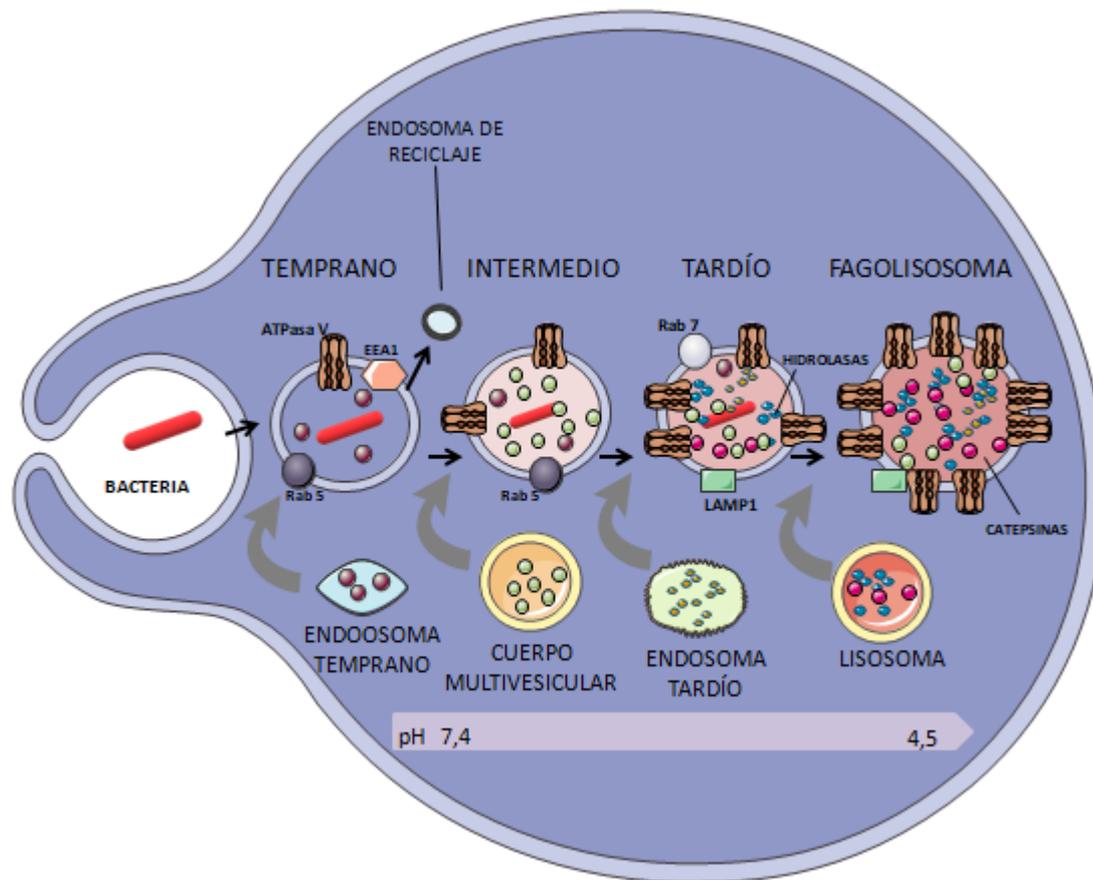


Figura 1. Estados de maduración del fagolisosoma. Se muestra la internalización de la bacteria con los distintos estados de maduración del fagosoma, donde va perdiendo o adquiriendo proteínas, sufriendo una acidificación progresiva debido a la bomba de protones ATPasa V, culminando en la formación del fagolisosoma y degradación bacteriana.

Muchos agentes patógenos son capaces de evadir su internalización o incluso impedir la maduración del fagosoma a través de múltiples estrategias que varían según el microorganismo. Este tema ha sido y es muy estudiado para poder indagar el mecanismo que utilizan los patógenos para evadir el tráfico hacia lisosomas o impedir su formación y poder sobrevivir a la acción fagocítica (Lamberti *et al.*, 2010; Rolny, Racedo and Pérez, 2017). Sin embargo, se ha demostrado que ciertas cepas probióticas tienen la capacidad de provocar un estado de activación en macrófagos generando un aumento de su capacidad fagocítica, tanto de partículas inertes como de patógenos (Hugo *et al.*, 2017; Rocha-Ramírez *et al.*, 2017; Jaffar *et al.*, 2018). Por otro lado, el proceso de fagocitosis de microorganismos probióticos es un tópico que ha resultado de mayor interés en los últimos años, y el cual no ha sido completamente caracterizado.

Dentro del estudio del proceso fagocítico, resulta relevante poder evaluar el destino intracelular de la bacteria en estudio. Se ha sugerido, en el estudio del destino intracelular de cepas *B. cereus* en condiciones no opsónicas, la existencia de diferentes cinéticas de tráfico al fagolisosoma de acuerdo a la cepa empleada (Rolny, Racedo and Pérez, 2017), siendo *B. cereus* un patógeno no especializado en la supervivencia en fagocitos.

El destino intracelular de una bacteria se puede estudiar evaluando ciertas características de los endosomas. El fagosoma temprano generado por fusión de fagosomas con endosomas de reciclaje (transferrina), posee GTPasa Rab5, y el antígeno de endosoma temprano 1 (EEA1), siendo estas características las más utilizadas para el estudio de colocación bacteriana en este estadio. Por otro lado, el endosoma tardío se encuentra enriquecido de proteasas y de proteínas de membrana asociadas a lisosoma (LAMPs), por lo que esta última es ampliamente utilizada para estudios de colocación en estos endosomas (Flannagan, Cosío and Grinstein, 2009). Asimismo, sondas con tropismo por ambientes ácidos (ej. LysoTracker) una sonda que tiene tropismo por ambientes ácidos, es también muy utilizada para estos estudios (Lamberti et al., 2010; Rolny et al., 2017). En lo que respecta a los ensayos realizados en este capítulo se utilizaron las marcaciones de los endosomas de reciclaje (transferrina) y de los compartimentos ácidos (LysoTracker), para poder identificar la colocación de las bifidobacterias con endosomas tempranos y tardíos, respectivamente. Como así también se emplearon partículas de látex, de manera de poder indagar el proceso de fagocitosis utilizando partículas con composición estructural diferente a la de las bacterias.

El modelo celular empleado para estos estudios fue la línea monocítica humana THP-1, una línea ampliamente utilizada como modelo tanto de monocitos como de macrófagos. La fácil disponibilidad de la línea, la posibilidad de conservación a largo plazo, la alta velocidad de crecimiento, la homogeneidad respecto a la carga genética y la ausencia de células contaminantes, son características de la línea apropiadas para los objetivos del estudio (Qin, 2012; Chanput, Mes and Wichers, 2014; Shiratori *et al.*, 2017; Kurygina *et al.*, 2018). Sin embargo, las condiciones de cultivo en el proceso de diferenciación influyen sobre el fenotipo resultante, generando dificultades al momento de comparar resultados provenientes de distintos fenotipos celulares (Forrester *et al.*, 2018). La polarización de macrófagos y sus distintos fenotipos celulares será un tema abordado en el capítulo II de la presente tesis doctoral.

Por otro lado, las cepas de bifidobacterias utilizadas para los ensayos presentes en este capítulo han sido estudiadas por nuestro grupo de investigación desde muchos aspectos. Se ha demostrado que la interacción entre bifidobacterias de origen humano con enterocitos es especie y cepa dependiente y está correlacionada fuertemente con sus propiedades superficiales (P.F. Pérez *et al.*, 1998; Gomez Zavaglia *et al.*, 2002), en este sentido se observó que la hidrofobicidad superficial de ciertas cepas estudiadas de bifidobacterias se correlaciona con la habilidad de adherirse a enterocitos humanos en cultivo (P.F. Pérez *et al.*, 1998; Gomez Zavaglia *et al.*, 2002). Además, por microscopía electrónica de barrido se observó que la cepa *Bifidobacterium bifidum* CIDCA 5310 presenta una alta adhesión a células intestinales Caco-2 (Pablo F. Pérez *et al.*, 1998). Dicha propiedad es uno de los criterios aceptados a la hora de elegir una cepa con potencialidad probiótica. Se ha determinado que la adhesión a células epiteliales humanas (Caco-2) de esta cepa es multifactorial e involucra factores termolábiles, como estructuras glucosídicas, moléculas no covalentemente unidas a la superficie bacteriana y factores proteicos (Bibiloni, *et al.*, 1999b). Si bien, dicha cepa no fue capaz de impedir la adhesión de *Salmonella arizonae* a células Caco-2, redujo significativamente el efecto citopático producido por este patógeno (Bibiloni, Pérez and De Antoni, 2000).

Son de suma importancia también los resultados obtenidos en el grupo, en relación al efecto antagónico presente en sobrenadantes de ciertas cepas de bifidobacteria frente al crecimiento y adhesión de *Clostridium (Clostridioides) difficile* sobre células intestinales, observándose la inhibición del crecimiento de dos cepas de *Clostridium*, cuyos grados de inhibición dependen de la cepa de bifidobacteria empleada (Trejo *et al.*, 2006). Además, Trejo *et al* demostraron que estos estudios *in vitro* permiten predecir el comportamiento *in vivo* en un modelo de infección aguda, ya que la cepa *B. bifidum* CIDCA 5310 fue capaz de antagonizar los efectos de la infección con *C. difficile* en un modelo de enterocolitis en hámster (Trejo, De Antoni and Pérez, 2013).

Teniendo en cuenta dichos estudios previos y la relevancia de la interacción con fagocitos para la respuesta inmune, en el presente capítulo se mostrarán los estudios sobre el proceso de fagocitosis de dos cepas de bifidobacterias y sus destinos intracelulares en células THP-1 en interacción con el fármaco acenocumarol.

BIBLIOGRAFÍA

- Aderem, A. and Underhill, D. M. (1999) 'Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages', *Annual Review of Immunology*, 17(1), pp. 593–623. doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.593.
- Bibiloni, R., Pérez, P. and De Antoni, G. (1999) 'Factors Involved in Adhesion of Bifidobacterial Strains to Epithelial Cells in Culture', *Anaerobe*, 5, pp. 483–485. doi: 10.1006/anae.1999.0209
- Bibiloni, R., Pérez, P. F. and De Antoni, G. L. (2000) 'Factors involved in adhesion of bifidobacterial strains to epithelial cells in culture', *Anaerobe*, 5(3–4), pp. 483–485. doi: 10.1006/anae.1999.0209.
- Chanput, W., Mes, J. J. and Wichers, H. J. (2014) 'THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach', *International Immunopharmacology*. Elsevier B.V., 23(1), pp. 37–45. doi: 10.1016/j.intimp.2014.08.002.
- Flannagan, R. S., Cosío, G. and Grinstein, S. (2009) 'Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies', *Nature Reviews Microbiology*, 7(5), pp. 355–366. doi: 10.1038/nrmicro2128.
- Flannagan, R. S., Jaumouill, V. and Grinstein, S. (2012) 'The Cell Biology of Phagocytosis'. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132445.
- Forrester, M. A. *et al.* (2018) 'Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens', *Cellular Immunology*, 332(April), pp. 58–76. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.07.008.
- Gomez Zavaglia, A. *et al.* (2002) 'Effect of bile on the lipid composition and surface properties of Bifidobacteria', *Journal of Applied Microbiology*, 93, pp. 794–799. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01747.x
- Gordon, S. (2016) 'Review', *Immunity*. Elsevier Inc., 44(3), pp. 463–475. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.026.
- Hugo, A. A. *et al.* (2017) 'Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis (strain CIDCA 133) stimulates murine macrophages infected with Citrobacter rodentium', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Springer Netherlands, 33(3), p. 0. doi: 10.1007/s11274-017-2219-4.
- Jaffar, N. *et al.* (2018) 'cells by macrophages activated by a probiotic Lactobacillus strain', *Journal of Dairy Science*. American Dairy Science Association, 101(7), pp. 5789–5798. doi: 10.3168/jds.2017-14355.
- Kurycina, A. V *et al.* (2018) 'Plasticity of Human THP 1 Cell Phagocytic Activity during Macrophagic Differentiation', 83(3), pp. 200–214. doi: 10.1134/S0006297918030021
- Lamberti, Y. A. *et al.* (2010) 'Intracellular Trafficking of Bordetella pertussis in Human Macrophages', 78(3), pp. 907–913. doi: 10.1128/IAI.01031-09.
- Pérez, P. F. *et al.* (1998) 'Surface properties of bifidobacterial strains of human origin', *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), pp. 21–26. PMID: 9435057
- Qin, Z. (2012) 'The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature', *Atherosclerosis*. Elsevier Ireland Ltd, 221(1), pp. 2–

11. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.003.

Rocha-Ramírez, L. M. *et al.* (2017) 'Probiotic Lactobacillus Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages', *Journal of Immunology Research*, 2017. doi: 10.1155/2017/4607491.

Rolny, I. S., Racedo, S. M. and Pérez, P. F. (2017) 'Fate of Bacillus cereus within phagocytic cells', *International Microbiology*, 20(4), pp. 170–177. doi: 10.2436/20.1501.01.300.

Schroeksnel, S. *et al.* (2013) 'Immunomodulatory effects in vitro of vitamin K antagonist acenocoumarol', *Thrombosis Research*. Elsevier Ltd, 131(6), pp. e264–e269. doi: 10.1016/j.thromres.2013.02.012.

Shiratori, H. *et al.* (2017) 'THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro', *Molecular Immunology*. Elsevier, 88(May), pp. 58–68. doi: 10.1016/j.molimm.2017.05.027.

Trejo, F. M. *et al.* (2006) 'Inhibition of Clostridium difficile growth and adhesion to enterocytes by Bifidobacterium supernatants', *Anaerobe*, 12(4), pp. 186–193. doi: 10.1016/j.anaerobe.2006.03.004.

Trejo, F. M., De Antoni, G. L. and Pérez, P. F. (2013) 'Protective effect of bifidobacteria in an experimental model of Clostridium difficile associated colitis', *Journal of Dairy Research*, 80(3), pp. 263–269. doi: 10.1017/S0022029913000216.

Warzecha, Z. *et al.* (2016) 'Protective effect of pretreatment with acenocoumarol in cerulein-induced acute pancreatitis', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10). doi: 10.3390/ijms17101709.

MATERIALES Y MÉTODOS



I.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Para la realización de los experimentos se utilizaron las cepas del género *Bifidobacterium* que se detallan en la tabla a continuación (**Tabla I.1**). Todas las cepas pertenecen a la colección de cultivos del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA).

A partir de las cepas conservadas a - 80°C, las bacterias se inocularon en caldo MRS (inóculo al 0,1% v/v) adicionado con 0,05 % p/v de cisteína (MRSc); se incubaron 48 h a 37 °C en anaerobiosis y luego se realizó un segundo cultivo en MRSc creciéndolas 24 h a 37 °C.

Tabla I.1 Cepas de *Bifidobacterium* aisladas en nuestro laboratorio a partir de heces de neonatos sanos (edad entre 6 días y 4 meses) (Pérez et al. 1998).

Especies	Designación cepas
<i>B. pseudolongum</i>	CIDCA 531
<i>B. breve</i>	CIDCA 532
<i>B. infantis</i>	NCC 200 (antes CIDCA 538)
<i>B. bifidum</i>	NCC 235 (antes CIDCA 533)
	NCC 536 (antes CIDCA 536)
	CIDCA 5310
	CIDCA 5311
<i>B. adolescentis</i> 5317	CIDCA 5317

NCC: Colección de cultivo de Nestlé

1.2 Células eucarióticas

Para la realización de los experimentos se utilizó la línea celular THP-1.

THP-1 (ATCC® TIB-202™) es una línea monocítica humana proveniente de un paciente pediátrico con leucemia monocítica aguda (Tsuchiya et al. 1980). Las células se conservaron en nitrógeno líquido a una concentración de 1×10^6 células/ml en medio DMEM adicionado con 10% suero fetal bovino (SFB) (GIBCO Life Technologies) y 10 % v/v de dimetil sulfóxido (DMSO). Para su cultivo, se descongelaron en baño de agua a 37°C, se centrifugó para retirar el medio de congelación y luego las células se suspendieron en medio DMEM (GIBCO Life Technologies) adicionado de 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO Life Technologies) y Glutamax (Life Technologies) a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. La diferenciación a macrófagos se realizó utilizando forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Sigma, Saint Louis, USA) en una concentración final de 200 nM durante 48 hs en las condiciones de incubación y medio de cultivo especificadas anteriormente. La concentración de células utilizadas para la diferenciación en las placas de cultivo fue de $1,3 \times 10^6$ células/ml.

1.3 Estudio de viabilidad

Se determinó la viabilidad celular por el agregado de yoduro de propidio (IP) a concentración final 1 µg/ml por tubo inmediatamente antes de analizar las células por citometría de flujo. Este agente se intercala en el ADN de aquellas células que sufrieron alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática, diferenciando así las células necróticas o apoptóticas de aquellas que mantienen la integridad de su membrana.

1.4 Marcación de los microorganismos

Para la marcación de los microorganismos se agitó el cultivo (de 24 h) en vortex, se dejó decantar 20 minutos y se tomaron los 6 ml superiores de manera tal de evitar tomar los agregados. Se lavaron con PBS centrifugando 1 minuto a 2100 g dos veces y luego se

suspendió el pellet en 500 µl de FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) 0,3 mg/ml. Se dejó incubando para la marcación 20 minutos a temperatura ambiente al resguardo de la luz. Luego, se lavaron los cultivos marcados 3 veces con PBS de forma de eliminar el fluorocromo no unido a las bacterias.

1.5 Tratamientos con calor y con luz UV

Para realizar la incubación con bacterias muertas, se realizaron los siguientes tratamientos:

Térmico: se calentaron las suspensiones con una $DO_{600nm}=2$ (5×10^8 UFC/ml) a 80°C por 10 minutos.

Luz UV: se colocaron las suspensiones en una placa de Petri con una $DO_{600nm} = 2$ y se dejaron por 30 minutos bajo la luz UV 254 nm, energía: 7,89 J/cm² a una distancia aproximada de 10 cm.

1.6 Ensayo de hidrofobicidad

Se pusieron en contacto 2 ml de cada suspensión bacteriana ($DO_{600nm} = 0,16$) y 4ml de xileno agitando en vórtex por 120 segundos. Las fases se separaron por decantación 15 minutos sobre mesada. Se retiró la fase acuosa y se midió la absorbancia a 600 nm. El descenso en la absorbancia de la fase acuosa fue tomado como la medida de la hidrofobicidad celular (H%), lo cual fue calculada con la siguiente fórmula $H\% = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$, donde A_0 y A son las absorbancias antes y después de la extracción con xileno respectivamente.

1.7 Partículas inertes

Se utilizaron partículas de látex (*beads*) marcadas con FITC de 2 µm de tamaño (SIGMA, St. Louis, USA) en una concentración final de 1×10^8 *beads*/ml.

1.8 Anticoagulante: Acenocumarol (AC)

La solución stock de acenocumarol (Laboratorios Bagó) se preparó en N,N-dimetilformamida en una concentración de 1,4 mM, se esterilizó por filtración (0,22 μm) y se almacenó a -20°C hasta el momento de su utilización.

Para los experimentos se hizo una dilución 1/3 en DMEM para llegar a la concentración de trabajo de 471 μM .

1.9 Fagocitosis de bifidobacterias por células THP-1

Todos los experimentos de fagocitosis fueron realizados con células THP-1 diferenciadas con PMA (THP-1PMA) en placas de 48 fosas como se especificó anteriormente.

Para este ensayo las cepas utilizadas fueron las cepas de bifidobacteria detalladas en la tabla I.1 presentada anteriormente.

Los cultivos bacterianos previamente marcados con FITC se agregaron a la placa de células THP-1PMA con una multiplicidad de infección (MDI) de 10 para cada una de las cepas. Para esto se llevaron los cultivos a una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 2$.

El volumen final por fosa fue de 200 μl , colocándose 10 μl de las suspensiones bacterianas en cada fosa.

Para la incubación se colocó la placa en estufa de 37°C con atmosfera de 5 % CO_2 durante 1 h protegiéndola de la luz.

Luego de la incubación se procedió a retirar los sobrenadantes de cada fosa, se lavaron las células 3 veces con PBS frío y se colocaron 250 μl de PBS por fosa para luego desprender con *scraper* las células. Finalmente el contenido de cada fosa se trasvasó a los tubos correspondientes para su evaluación por citometría de flujo.

Se analizó cada muestra dos veces, ya que previo a la segunda adquisición se agregó 200 μl de azul tripán 0,4% (preparado en buffer acetato 0,02 M, NaCl 0,15 M a pH 4,4). De esta manera, se apantalla la fluorescencia de las bacterias presentes en el exterior de las

células, ya que este colorante no penetra en células que tienen su membrana intacta, y así se obtiene la fluorescencia FITC + (FL1 +) de aquellas bacterias que estén en el interior de la célula.

Se calculó la fagocitosis como el porcentaje de células FITC + en presencia de azul tripán multiplicado por la media de su histograma, y la asociación como el porcentaje de células FITC + antes del agregado de azul tripán por la media correspondiente; ambos valores fueron expresados unidades arbitrarias (UA).

1.10 Efecto de la concentración bacteriana sobre la interacción con células fagocíticas

Siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente, se realizó el experimento de fagocitosis utilizando distintas multiplicidades de infección (MDI). Se ensayaron MDI 2, 5, 10, 15 y 20 para cada cepa. El período de incubación y la determinación por citometría de flujo se llevó a cabo como se especificó en el ítem anterior.

1.11 Fagocitosis de esferas de látex (*beads*) en presencia de bifidobacterias.

Para la evaluación de la fagocitosis de partículas inertes, se incubaron las células THP-1PMA con las *beads* con una multiplicidad de *beads* por célula (B/C) de 10, en presencia de las cepas CIDCA 5310 o CIDCA 5317 (MDI=10).

I.12 Efecto de acenocumarol sobre la fagocitosis de bacterias y esferas de látex.

Para este ensayo, se utilizaron las siguientes concentraciones de acenocumarol: 471 μM , 283 μM , 141 μM , 47,17 μM . Se incubó la placa durante 1 ó 18 horas, en las mismas condiciones mencionadas previamente y se siguió la determinación por citometría de flujo tal como se indicó anteriormente (ítem I.9).

I.13 Fagocitosis y destino intracelular de bifidobacterias

Para el estudio del destino intracelular de las bacterias fagocitadas, las células THP-1 se diferenciaron en placas de 24 fosas sobre cubreobjetos plásticos (Thermanox®).

Las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 marcadas con FITC se incubaron sobre las células durante 1 hora a 37°C en ambiente de 5% CO₂.

Luego de la incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS frío y se procedió a hacer las marcaciones correspondientes.

❖ Para el estudio de localización en compartimentos lisosomales, los macrófagos fueron marcados con LysoTracker DND-99 200nM 5min a 37°C (Life Technologies, Carlsbad, California).

❖ Para el estudio de localización en endosomas de reciclaje, se incubaron las células durante 1 hora con DMEM con 1% de BSA, para remover la transferrina endógena presente, y luego se marcaron las células con Transferrina-Alexa-594 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ incubando 10 min a 4°C. Seguida de otra incubación de 5 minutos a 37°C para permitir la internalización de la transferrina; se hizo un lavado con DMEM-BSA y se dejó incubando 45 minutos a 37°C en el mismo medio.

Posteriormente, los macrófagos se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con PFA 3% (v/v) durante 1 hora a 4°C en oscuridad. Se usó un medio de montaje (DakoCytomation, USA) para evitar la pérdida de la marca.

Las muestras fueron analizadas con un microscopio láser confocal (LEICA TCS SP5, Leica Microsystems, Germany) con una longitud de onda de excitación de 488 nm (laser argón) y 594 nm (láser helium-neon) con un objetivo HCX PL APO CS 63.0 x 1.40 OIL UV (Leica Microsystems, Germany). Para las imágenes se usó una resolución de 8 bits (1024 x 1024 pixels) y para su respectivo análisis se usó el software Leica LAS AF Lite.

Se analizaron al menos 200 células por muestra estudiada, calculándose el porcentaje de colocación como se muestra a continuación:

$$\% \text{ de colocación} = \frac{\text{Bacterias internalizadas colocadas} \times 100}{\text{Bacterias internalizadas}}$$

Para evaluar el efecto del acenocumarol, se agregó junto con las bacterias la cantidad necesaria de solución stock para lograr una concentración final a fosa de 471 Mm.

I.14 Ensayo de fagocitosis y destino intracelular de *beads* en presencia de la cepa CIDCA 5310.

Se realizó la marcación con Lysotracker y transferrina utilizando los procedimientos descritos con antelación (inciso I.13) e incubando las células con las *beads*. Además, se estudió el destino intracelular de estas partículas en presencia de la cepa CIDCA 5310 la cual no se marcó y se la utilizó con una MDI=10.

I.15 Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar. Las diferencias significativas fueron establecidas mediante test t de Student ($p < 0,05$).

RESULTADOS

En el presente capítulo se describen los resultados obtenidos de la fagocitosis de las bifidobacterias y de sus destinos intracelulares estudiando a su vez, el efecto del acenocumarol. Además, se evaluó el efecto de las cepas CIDCA 5310, CIDCA 5317 y el anticoagulante sobre la fagocitosis y destino intracelular de partículas inertes y sobre la fagocitosis de un microorganismo patógeno.

☀ 1.1 Marcación de los microorganismos

Con el objetivo de evaluar la fagocitosis de los microorganismos en células THP-1, se marcaron las bacterias con FITC y se analizaron las células por citometría de flujo.

En la figura 1.1 se pueden observar las bacterias marcadas con FITC (verdes) en la región de eventos positivos (+) para FL1.

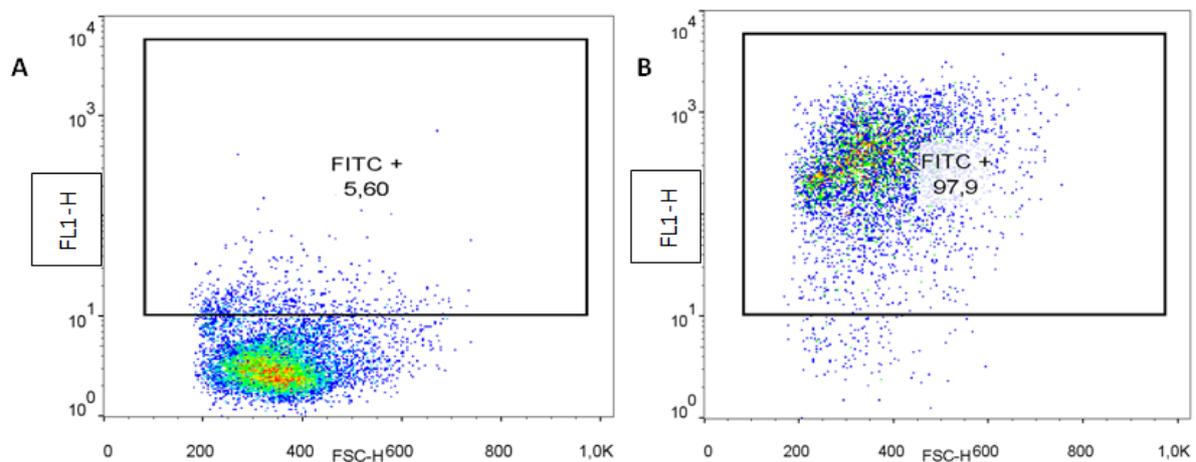


Figura 1.1 Citogramas de células THP-1PMA, incubadas con bacterias sin marcar (A) y marcadas con FITC (B). El recuadro indica los eventos considerados positivos (FL1).

1.2 Efecto del agregado de azul tripán

Para los ensayos de fagocitosis, se utilizó la técnica de apantallamiento mediante azul tripán para poder discriminar las bacterias adheridas de las internalizadas. En la figura **1.2.A**, se puede observar el citograma de células THP-1PMA incubadas con bacterias marcadas con FITC, cuyo porcentaje de células FITC positivas proviene de las bacterias dentro y fuera de las células. En la figura **1.2.B** se puede observar el citograma en presencia de azul tripán, por lo que el porcentaje de células FITC positivas corresponde a las bacterias internalizadas, ya que la marca de las bacterias externas está siendo apantallada por el azul tripán.

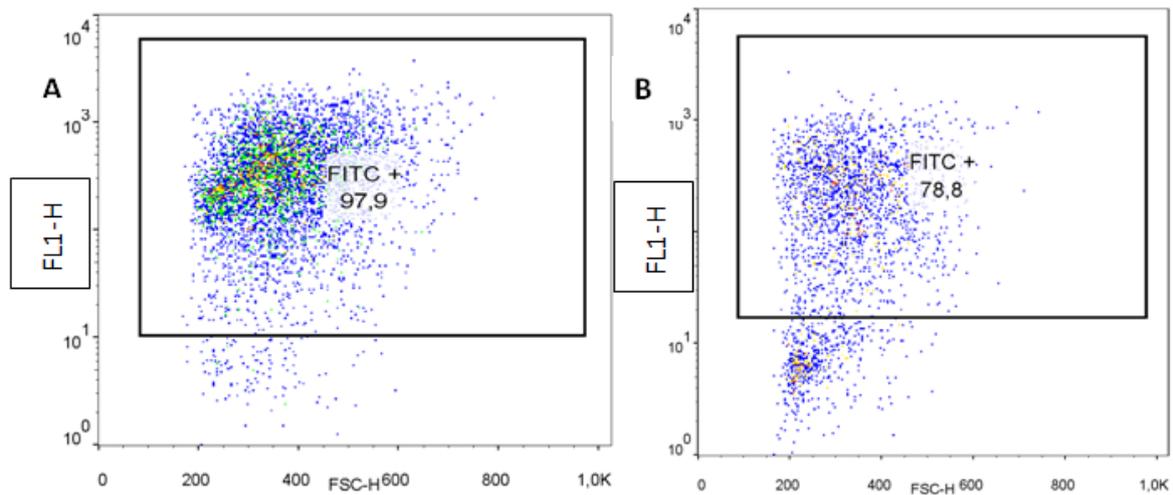


Figura 1.2 Citograma de células THP-1PMA incubadas con bacterias marcadas con FITC en ausencia (A) y en presencia (B) de azul tripán.



I.3 Fagocitosis de bifidobacterias por células THP-1.

En la interacción microorganismo-hospedador, uno de los primeros procesos que ocurren es el reconocimiento de los microorganismos por receptores presentes en la membrana celular para que tenga lugar posteriormente la fagocitosis. Este proceso puede tener como resultado la eliminación del microorganismo, o puede desencadenar algún otro tipo de respuesta inmune.

El análisis de la asociación y fagocitosis de las cepas de bifidobacterias por citometría de flujo mostró que hay dos grupos de microorganismos bien definidos. Aquellos que muestran bajos valores de interacción con las células THP1-PMA: *B. pseudolongum* CIDCA 531, *B. breve* CIDCA 532, *B. infantis* NCC 200, *B. bifidum* CIDCA 5311, *B. adolescentis* CIDCA 5317 and *B. bifidum* NCC 235 y aquellos que muestran altos valores de internalización: *B. bifidum* NCC 189 and *B. bifidum* CIDCA 5310 (**Tabla I.1**).

Anteriormente en nuestro grupo, se han estudiado las propiedades de superficie de estas bacterias que correlacionan con la adhesión a células Caco-2 (Pérez et al., 1998) y por lo tanto se quiso correlacionar los valores de asociación e internalización en células THP1-PMA con sus valores de hidrofobicidad superficial.

Los resultados mostraron que bacterias con bajos porcentajes de hidrofobicidad poseen bajos valores de interacción con células fagocíticas (**Figura I.3 A y B**). Sin embargo, altos porcentajes de hidrofobicidad no se correlacionan con un comportamiento específico. La relación bacterias internalizadas/bacterias asociadas no mostró correlación con la hidrofobicidad (**Figura I.3 C**).

En este sentido, en función de estos resultados y otros obtenidos por el grupo (Bibiloni, Pérez, Garrote, Disalvo, & De Antoni, 2001) se decidió profundizar el estudio con dos cepas cuyas propiedades son distintas: la cepa CIDCA 5310 y la cepa CIDCA 5317.

Al evaluar diferentes dosis de bacterias se observó un comportamiento dosis-respuesta para estas cepas, tanto para la asociación como para la fagocitosis (**Figura I.4**).

Tabla I.1 Resultados de la asociación e internalización de distintas cepas de bifidobacterias en células THP-1PMA empleando una multiplicidad de infección de 5 y de 10.

Cepa	Asociación		Internalización	
	MDI 5	MDI 10	MDI 5	MDI 10
<i>B.pseudolongum</i> (CIDCA 531)	467.96 ± 260.05	1989.13 ± 127.23	60.38 ± 7.56	233.18 ± 5.04
<i>B. breve</i> (CIDCA 532)	903.15 ± 131.91	1576.88 ± 237.34	96.79 ± 19.18	184.86 ± 14.04
NCC 200 <i>B.infantis</i> (antes CIDCA 538)	1090.27 ± 85.57	2397.03 ± 337.03	126.85 ± 5.85	295.16 ± 34.77
<i>B. adolescentis</i> (CIDCA 5317)	885.27 ± 61.56	2164.25 ± 223.65	929.77 ± 843.11	795.65 ± 72.30
NCC 235 <i>B. bifidum</i> (antes CIDCA 533)	1722.05 ± 82.56	4988.06 ± 1063.55	322.62 ± 34.16	896.43 ± 257.79
NCC 189 <i>B. bifidum</i> (antes CIDCA 536)	5736.69 ± 51.88	3819,93 ± 38.47	1540.08 ± 262.69	2976.63 ± 242.10
<i>B. bifidum</i> (CIDCA 5310)	5460.56 ± 555.44	12669.19 ± 804.12	2314.52 ± 716.45	4440.17 ± 754.84
<i>B. bifidum</i> (CIDCA 5311)	1048.39 ± 71.93	3879.70 ± 202.82	334.87 ± 154.13	1959.43 ± 1197.31

Los valores están expresados en unidades arbitrarias (UA= células FL1 (+) x intensidad de fluorescencia media). NCC: Colección de cultivo de Nestlé MDI: Multiplicidad de infección

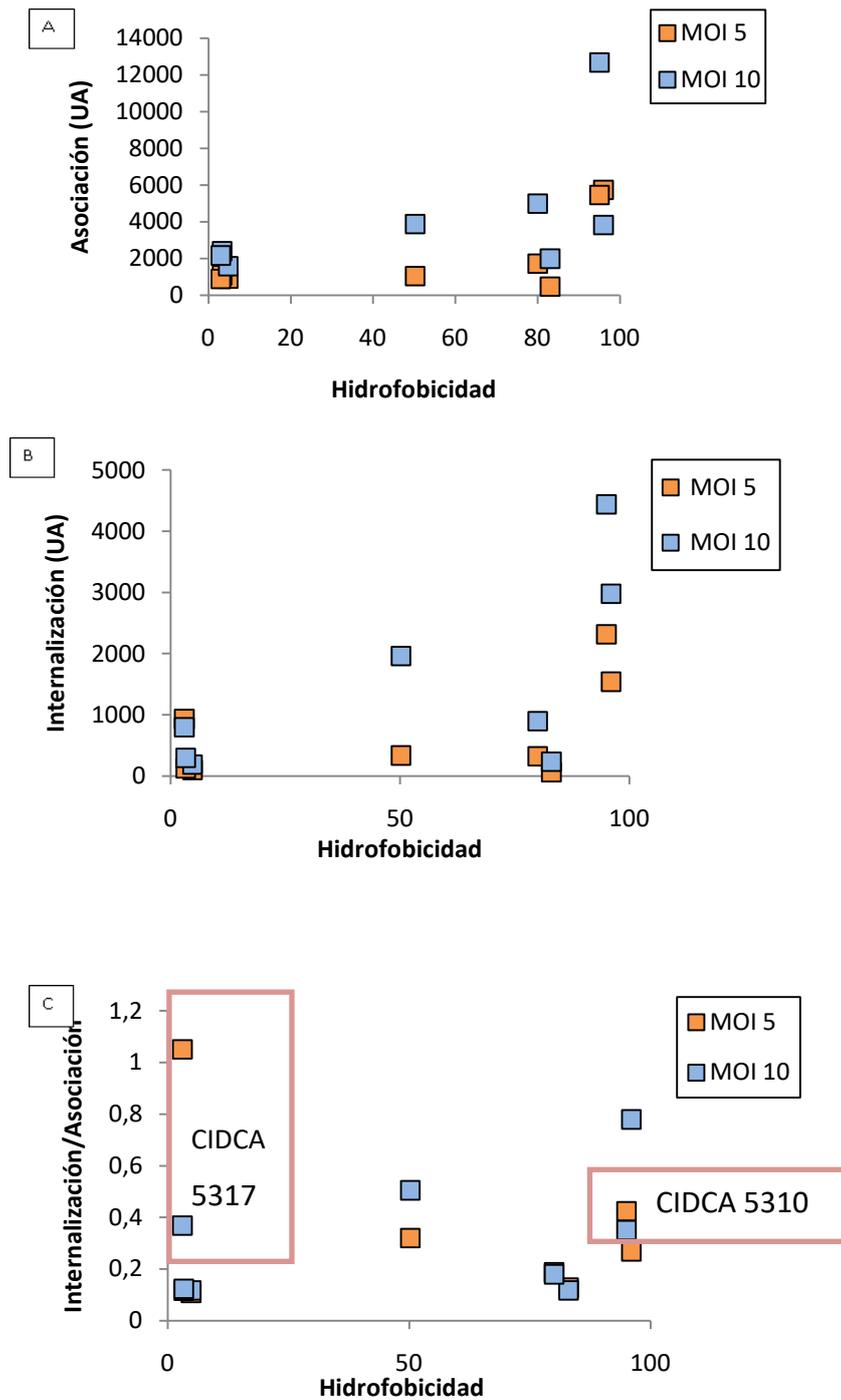


Figura 1.3 Relación entre la hidrofobicidad superficial de las cepas de bifidobacterias y la interacción con células fagocíticas.

A: antes del apantallamiento con azul tripán (asociación: bacterias adheridas + internalizadas)

B: luego del apantallamiento con azul tripán (internalización, bacterias fagocitadas)

C: Relación $UA_{asociación}/UA_{internalización}$

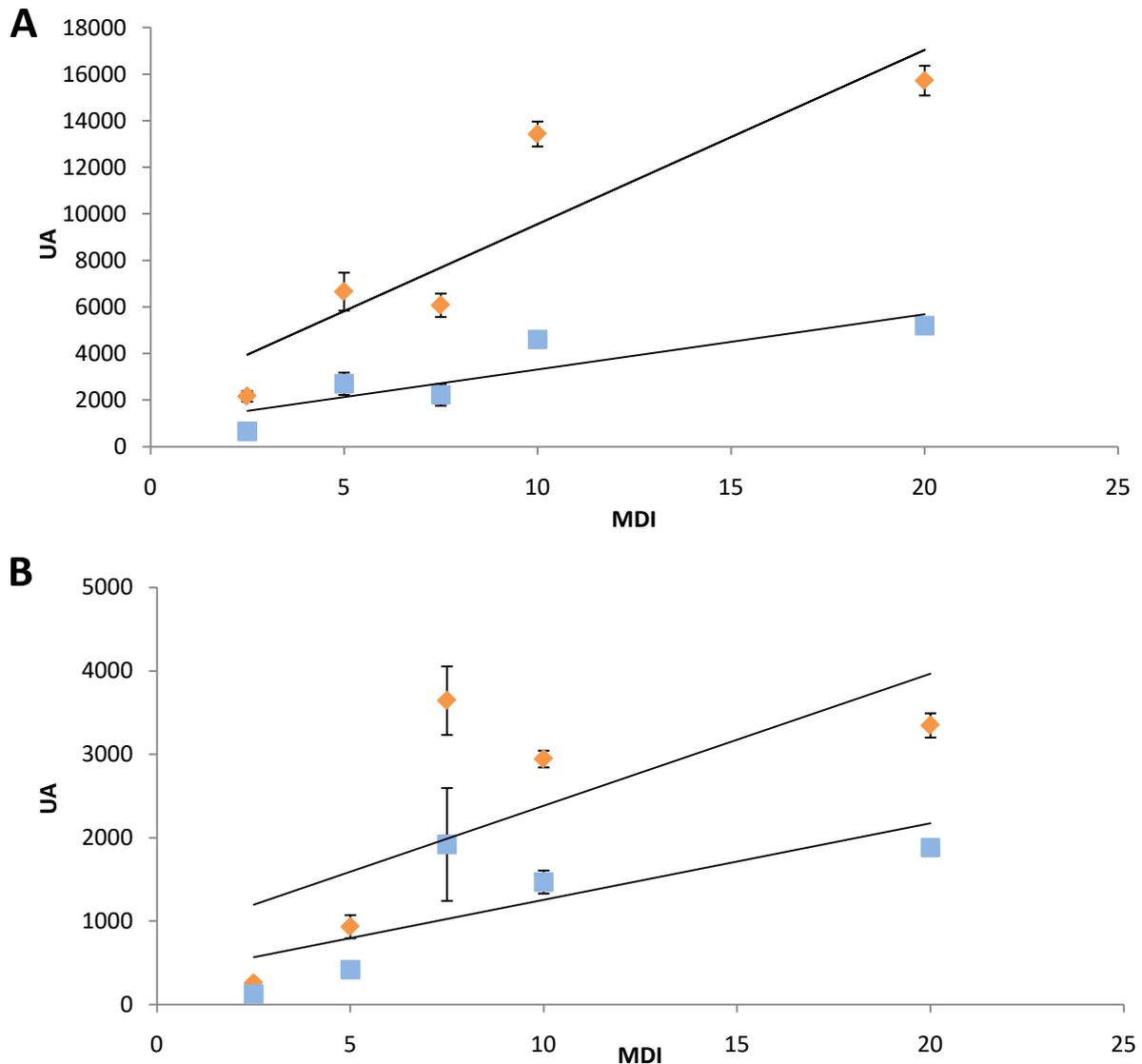


Figura I.4 Efecto de la multiplicidad de infección (MDI) sobre la interacción entre células THP-1PMA y bifidobacterias: CIDCA 5310 (A) y CIDCA5317 (B)

Asociación (◇) e internalización (■) fueron evaluadas antes y después de apantallar las bacterias extracelulares con azul de tripán, respectivamente.

Los resultados se expresan en:

Unidades arbitrarias (UA) = células FL1 (+) x intensidad de fluorescencia media.

Las barras representan la desviación estándar.



I.4 Destino intracelular de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317.

Las diferentes propiedades de superficie y el diferente índice de fagocitosis de estas dos bacterias llevo a cuestionar si estas diferencias se reflejarían en un diferente destino intracelular. Por lo tanto, se evaluó la localización intracelular por microscopía confocal.

Luego de incubar las células THP-1PMA con las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 durante 1 hora, se procedió a la marcación con Lysotracker (marcador lisosomal).

Los valores de colocalización con la marca lisosomal fueron significativamente ($P < 0,05$) mayores para la cepa CIDCA 5310 (63.80 ± 0.42 %) respecto a lo observado con la cepa CIDCA 5317 (27.14 ± 12.78 %) (**Figura. I.5**).

Con el fin de determinar otro posible destino intracelular, se marcó con transferrina para evaluar la colocalización con endosomas de reciclaje. Los resultados mostraron un bajo porcentaje de colocalización con este marcador: 9.42 ± 1.82 % para la cepa CIDCA 5310 y 17.42 ± 2.09 % para la cepa CIDCA 5317 (**Figura. I.5**).

A modo de ejemplo se muestra en la **figura I.6** las bacterias que colocalizan con compartimientos ácidos evidenciándose como zonas amarillas, observándose con rojo la marca con Lysotracker y con verde las bacterias marcadas con FITC (**Figura. I.6**). En las imágenes se observa la diferencia en el destino intracelular de las dos bacterias.

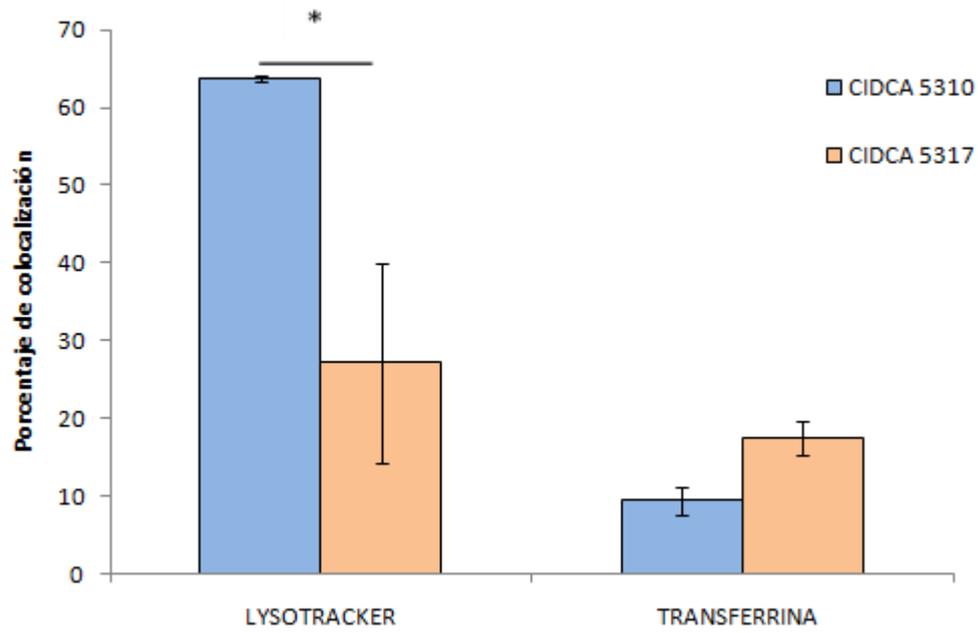


Figura I.5 Colocalización de bifidobacterias con el marcador lisosomal (Lysotracker) o con el marcador de endosomas de reciclaje (Transferrina).

Los resultados se expresan en porcentaje de células con bacterias colocalizando (* $P < 0,05$).

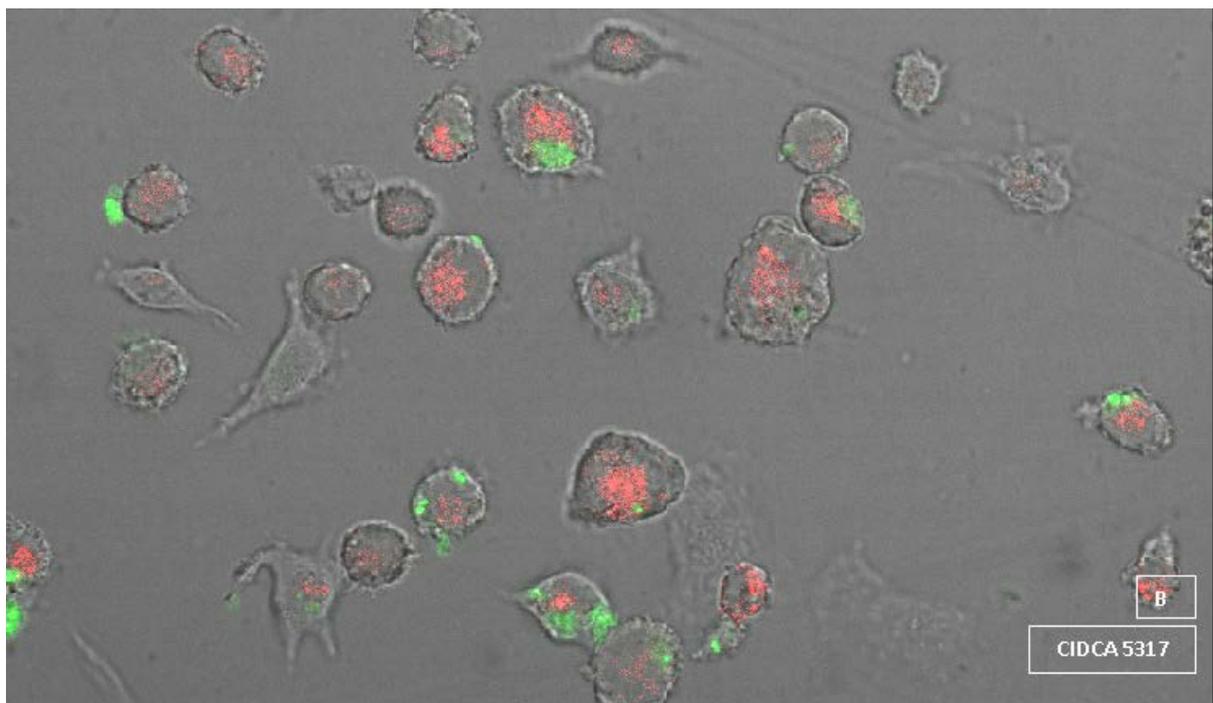
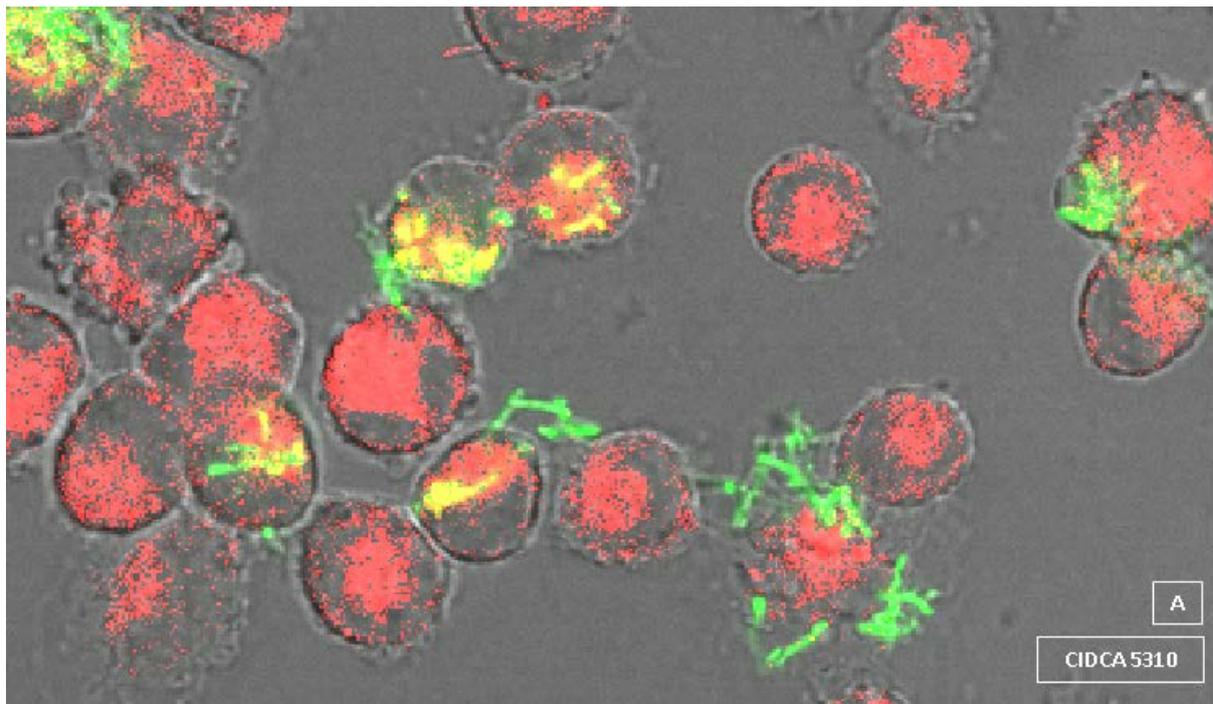


Figura I.6 Microscopía láser confocal de células THP-1PMA marcadas con Lysotracker (rojo) en presencia de las cepas CIDCA 5310 **(A)** y CIDCA 5317 **(B)**, marcadas con FITC (verde).

La colocalización de las bacterias con los compartimentos lisosomales se evidencia en color amarillo.

1.5 Efecto de acenocumarol sobre la fagocitosis de bifidobacterias.

Para evaluar el efecto del acenocumarol sobre la interacción bifidobacteria-célula fagocítica, se procedió a estudiar la fagocitosis de CIDCA 5310 y CIDCA 5317 en presencia de distintas dosis del anticoagulante.

Como resultado de estos ensayos, se obtuvo un comportamiento dosis y bacteria dependiente. Durante 1 hora de incubación, se observó un descenso significativo ($P < 0,05$) en la fagocitosis de la cepa CIDCA 5310 con la dosis de $471.00 \mu\text{M}$ ($58.93 \% \pm 3.02$) comparándose con la cepa CIDCA 5310 sin acenocumarol ($65.30 \% \pm 1.30$). Sin embargo, no se vio ningún efecto con las otras dosis empleadas ($283.00 \mu\text{M}$, $141.00 \mu\text{M}$ and $47.17 \mu\text{M}$) (**Figura. I.7**). Respecto a la fagocitosis de la cepa CIDCA 5317, la misma no se vió afectada por la presencia del anticoagulante (**Figura. I.8**).

Cuando se realizó la incubación de las células fagocíticas con las bacterias por 18 horas y en presencia del anticoagulante, se observó un descenso significativo ($P < 0,05$) en la fagocitosis de ambos microorganismos con la dosis de $471.00 \mu\text{M}$: 10.93 ± 0.70 para CIDCA 5310 y 1.67 ± 0.11 para CIDCA 5317, mientras que los valores obtenidos en ausencia de acenocumarol fueron 19.60 ± 2.83 y 2.79 ± 0.31 para las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317, respectivamente (**Figura. I.9**). En estas condiciones, la asociación de las cepas aumentó con acenocumarol, independientemente de la dosis empleada (**Figura. I.9**). Además, para la cepa CIDCA 5317, se observó un descenso de la fagocitosis con la dosis de $283 \mu\text{M}$ (1.96 ± 0.13 , $P < 0.05$).

Es importante destacar que ni el anticoagulante ni las bacterias afectaron la viabilidad de las células THP-1 luego de 18 horas de incubación (**Figura. I.10**).

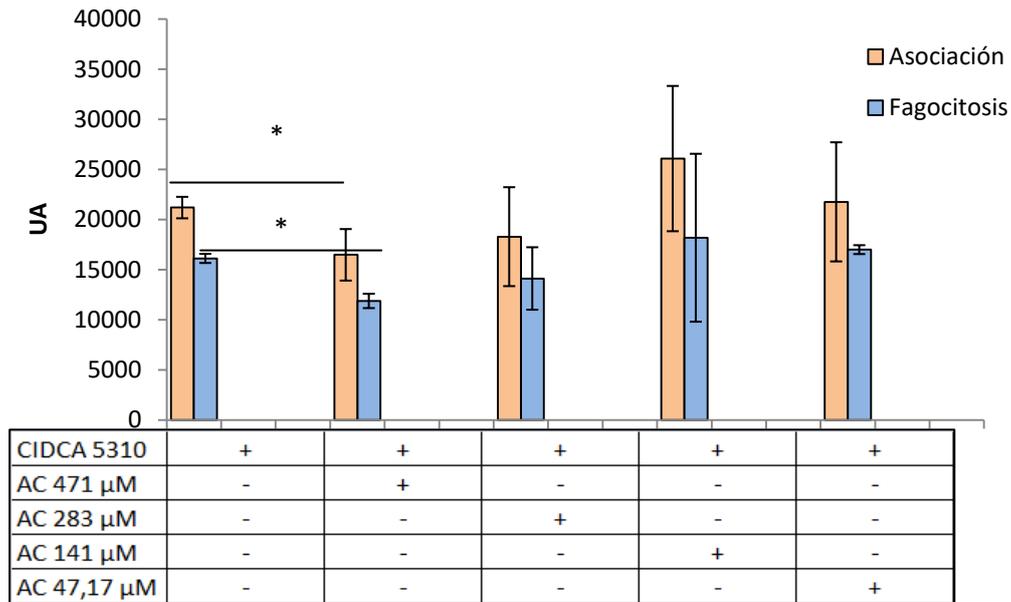


Figura I.7 Fagocitosis de CIDCA 5310 en células THP-1PMA durante 1 hora (*P < 0,05).

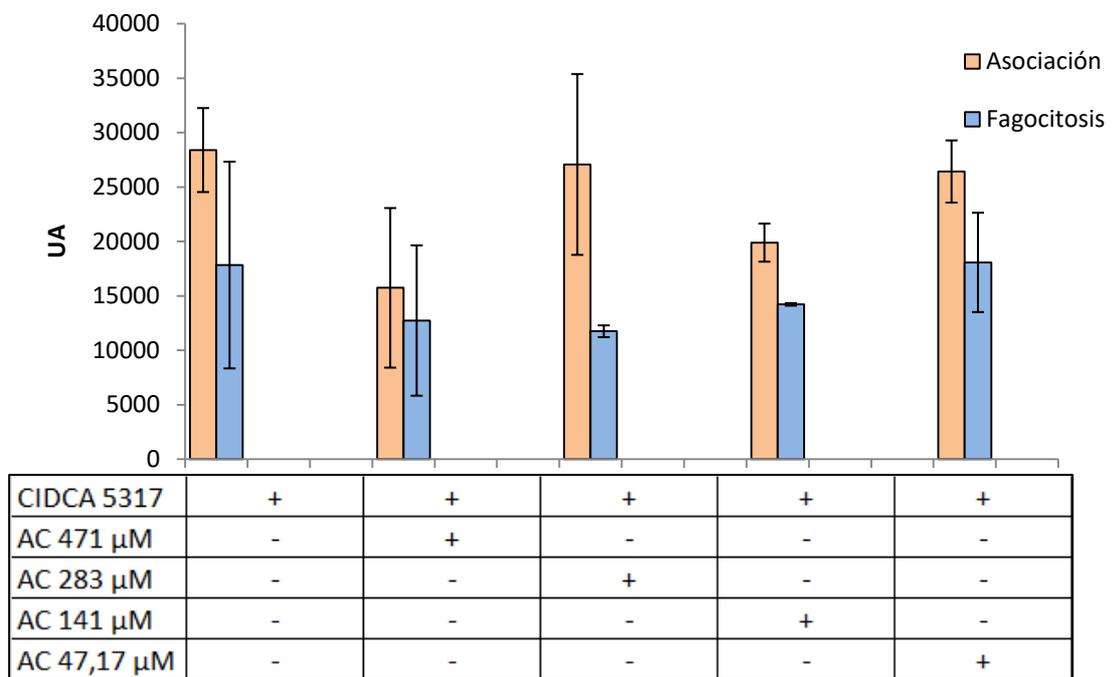


Figura I.8 Fagocitosis de CIDCA 5317 en células THP-1 PMA durante 1 hora.

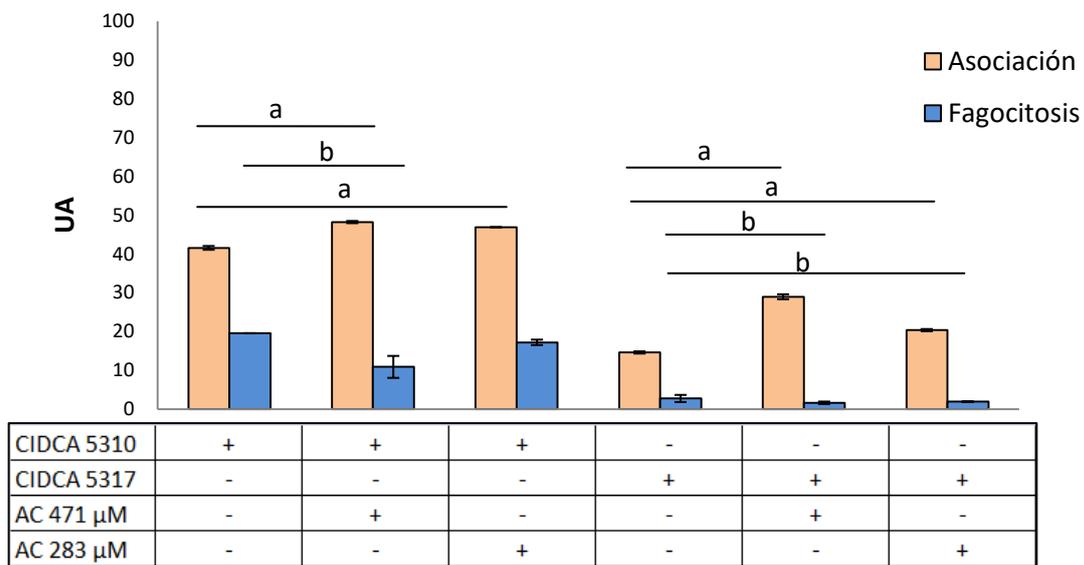


Figura I.9 Fagocitosis de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 por células THP-1 PMA durante 18 horas (a y b P < 0,05 indican diferencias significativas entre valores de asociación y fagocitosis, respectivamente).

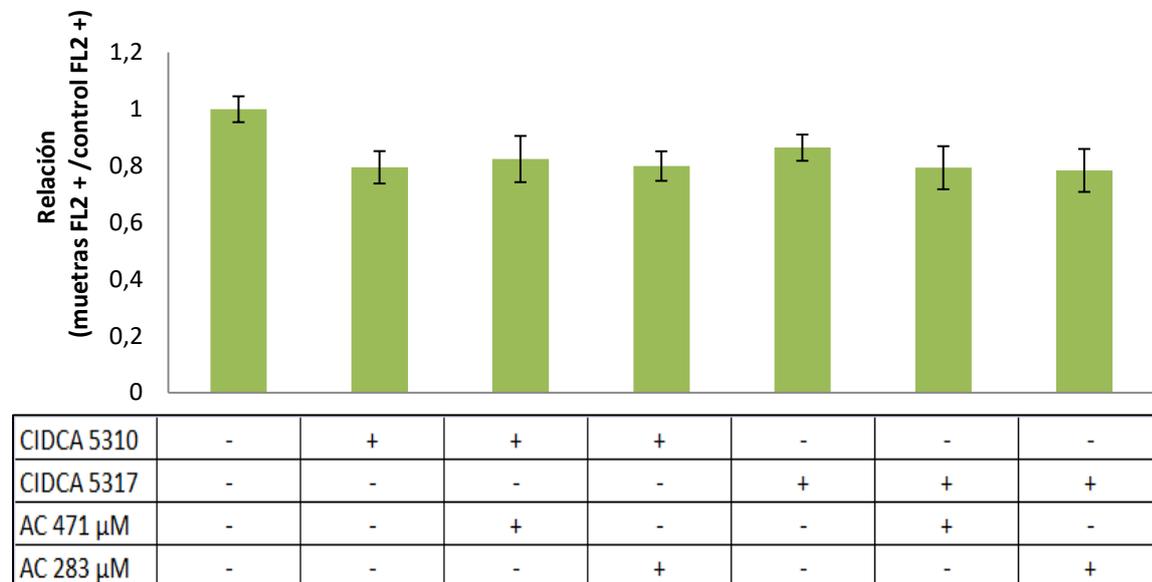


Figura I.10 Determinación de la viabilidad celular por exclusión de yoduro de propidio en células THP-1PMA incubadas con las bacterias y el anticoagulante durante 18 horas.



1.6 Efecto de acenocumarol sobre el destino intracelular de la cepa CIDCA 5310.

Dadas las diferencias en la fagocitosis de las bacterias en presencia de acenocumarol, se decidió evaluar si la presencia del anticoagulante cambiaría el destino intracelular de las bacterias. Debido a que el acenocumarol generó la disminución de la fagocitosis de CIDCA 5310 cuando se realizó la incubación durante 1 hora, se estudió el destino de dicha bacteria en ese mismo período de tiempo, en presencia del fármaco.

Con tal objetivo, se incubaron las células THP-1PMA con CIDCA 5310 en presencia de acenocumarol 471 μM , marcando con LysoTracker. El porcentaje de colocalización fue calculado como el número de bacteria colocalizando con el marcador, referidos al número total de bacterias internalizadas, como se describe en materiales y métodos I.14.

Como se puede observar en la **figura I.11**, la presencia de acenocumarol genera una disminución de la fagocitosis, ya observada en ensayos previos evaluados por citometría de flujo, generando por lo tanto, un menor tráfico del microorganismo hacia compartimentos lisosomales.

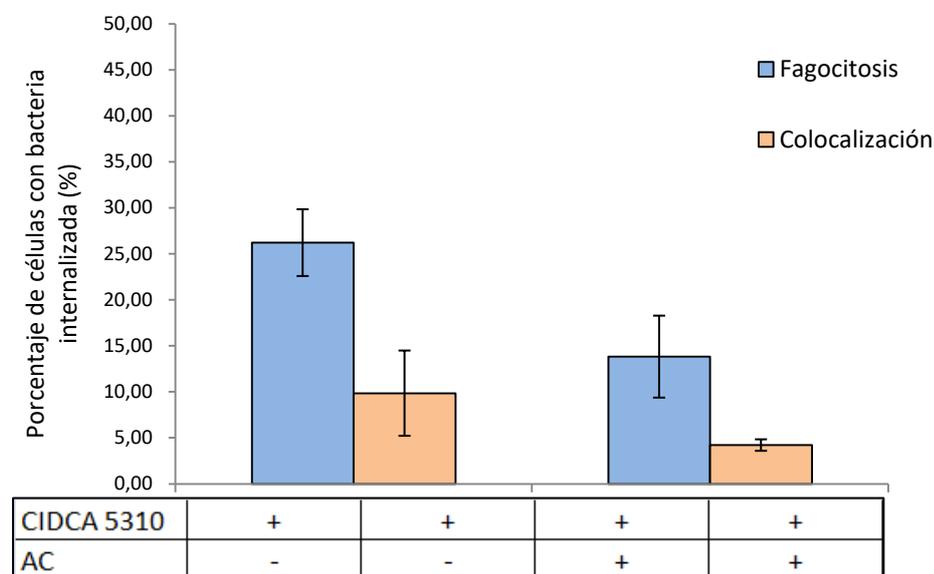


Figura I.11 Fagocitosis y colocalización con LysoTracker de la cepa CIDCA 5310 en células THP-1PMA, durante 1 hora de incubación, en ausencia y en presencia de acenocumarol.

☀ 1.7 Fagocitosis de esferas de látex (*beads*) en presencia de bifidobacterias.

Con el fin de estudiar el efecto de las bifidobacterias sobre la fagocitosis de partículas inertes sin ligandos de reconocimiento, se emplearon esferas de látex (*beads*).

Cuando se incubaron las células con las bifidobacterias utilizando una MDI=10, la asociación de las *beads* (B/C (*beads por célula*)=10) a las THP-1 fue similar en presencia de las dos cepas estudiadas: para la cepa CIDCA 5310 (UA: 3192 ± 632.22) y para la cepa CIDCA 5317 (UA: 2736 ± 412.76). Estos valores de asociación no fueron significativamente diferentes de los controles sin bacterias (UA: 3238 ± 379.22). Sin embargo, la internalización de las *beads* aumentó significativamente ($P < 0,05$) en presencia de la cepa CIDCA 5310 (UA: 1807 ± 265.41) comparando con el control sin bacteria (UA: 1007 ± 155.43). Ningún efecto se observó con la cepa CIDCA 5317 (UA: 1177 ± 131.62) (**Figura I.12**).

Con el fin de estudiar si el efecto observado en presencia de CIDCA 5310 se mantiene luego de la pérdida de su viabilidad se realizó el mismo ensayo con las bacterias muertas por calor o por tratamiento con luz UV. Como resultado se obtuvieron valores (UA) de fagocitosis de *beads* similares al control sin bacteria, mostrando que es necesaria la viabilidad para que haya un aumento de la fagocitosis en presencia de CIDCA 5310 durante 1 hora (**Figura I.13**).

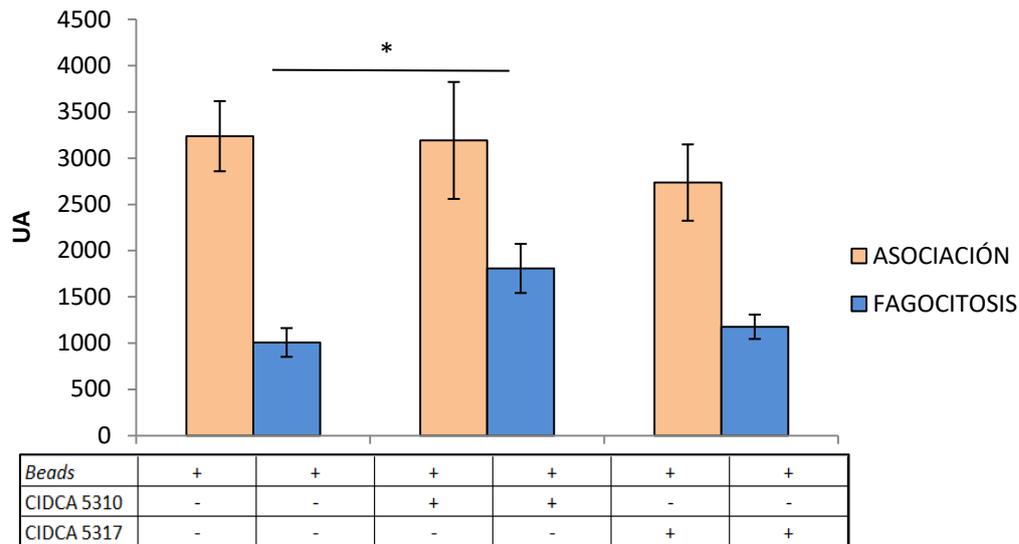


Figura I.12 Efecto de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 viables sobre la fagocitosis de esferas de látex por células THP1-PMA. Las incubaciones se realizaron durante 1 hora (*P<0,05).

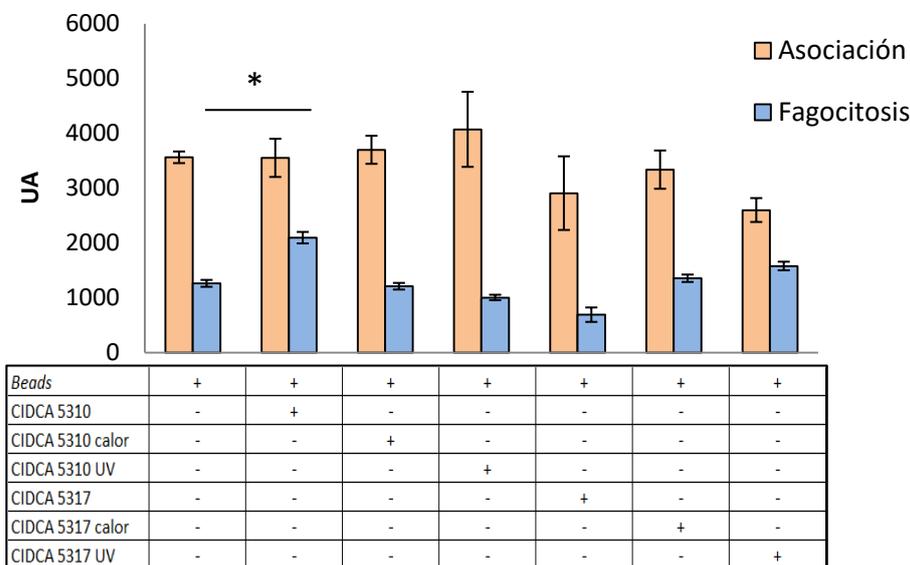


Figura I.13 Efecto de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 viables, tratadas con calor y con UV, sobre la fagocitosis de esferas de látex por células THP1-PMA. Las incubaciones se realizaron durante 1 hora (*P<0,05).

☀ 1.8 Efecto de acenocumarol sobre la fagocitosis de esferas de látex.

Así como se estudió el efecto del acenocumarol sobre la fagocitosis de las bifidobacterias, se evaluó el efecto de la presencia de este fármaco sobre la fagocitosis de partículas inertes. Con este fin, se determinó la fagocitosis de las *beads* por citometría de flujo en presencia de acenocumarol durante 1 hora, observándose la disminución significativa ($P < 0,01$) de la actividad fagocítica en presencia del anticoagulante (**Tabla I.2**).

Tabla I.2 Asociación y fagocitosis de *beads* en presencia de acenocumarol (* $p < 0,05$).

	Asociación		Fagocitosis	
	UA	ds	UA	ds
<i>Beads</i>	6835 *	176	2739 *	133
<i>Beads</i> + acenocumarol	2171*	98	841 *	86

☀ 1.9 Efecto de la presencia de la cepa CIDCA 5310 sobre la fagocitosis y destino intracelular de esferas de látex.

Debido a los resultados obtenidos por citometría de flujo en donde se observó una mayor fagocitosis de *beads* en presencia de CIDCA 5310, se decidió evaluar el destino intracelular en presencia de dicha bacteria, por microscopía láser confocal. Como se puede observar en la **figura I.14** se obtuvo una mayor asociación y fagocitosis de las esferas de látex, en presencia de la cepa CIDCA 5310 ($P < 0,05$). En la **figura I.15** se muestran imágenes obtenidas por microscopía láser confocal para este ensayo.

Con el fin de completar el análisis se estudió el número de *beads* internalizadas por célula, resultando en una mayor proporción de células con 1 *bead* internalizada. Estos resultados se exponen en el gráfico de la **figura I.16** cuyos datos corresponden a un experimento representativo.

Respecto al destino intracelular, se observó que la mayoría no colocaliza ni con los compartimentos lisosomales ni con endosomas de reciclaje, lo cual no es modificado en presencia de la cepa CIDCA 5310. Estos resultados se muestran en la **tabla I.3**, cuyos datos corresponden a dos experimentos independientes. La foto presente en la **figura I.17 A**

muestra la colocación de una *bead* con LysoTracker representándose en coloración amarilla, y en la **figura I.17 B** se muestra la imagen de un corte en el plano zeta de la internalización de una esfera de látex, evidenciando cómo se ha realizado el análisis. En la **figura I.18** se puede observar una imagen obtenida por microscopía láser confocal de un campo de células THP-1PMA marcadas con transferrina incubadas con *beads*.

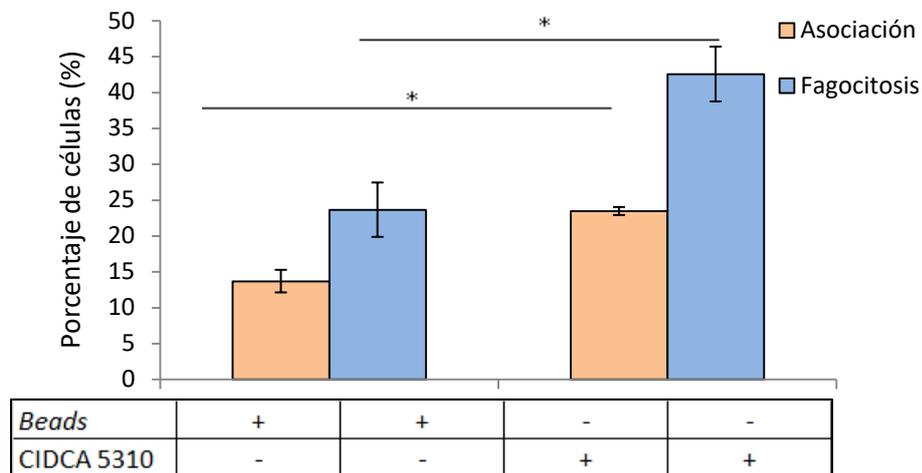


Figura I.14 Fagocitosis y asociación de esferas de látex por células THP-1PMA en presencia de CIDCA 5310, durante 1 hora. Los datos fueron obtenidos a partir del análisis de 200 células en 2 experimentos independientes (* P < 0,05).

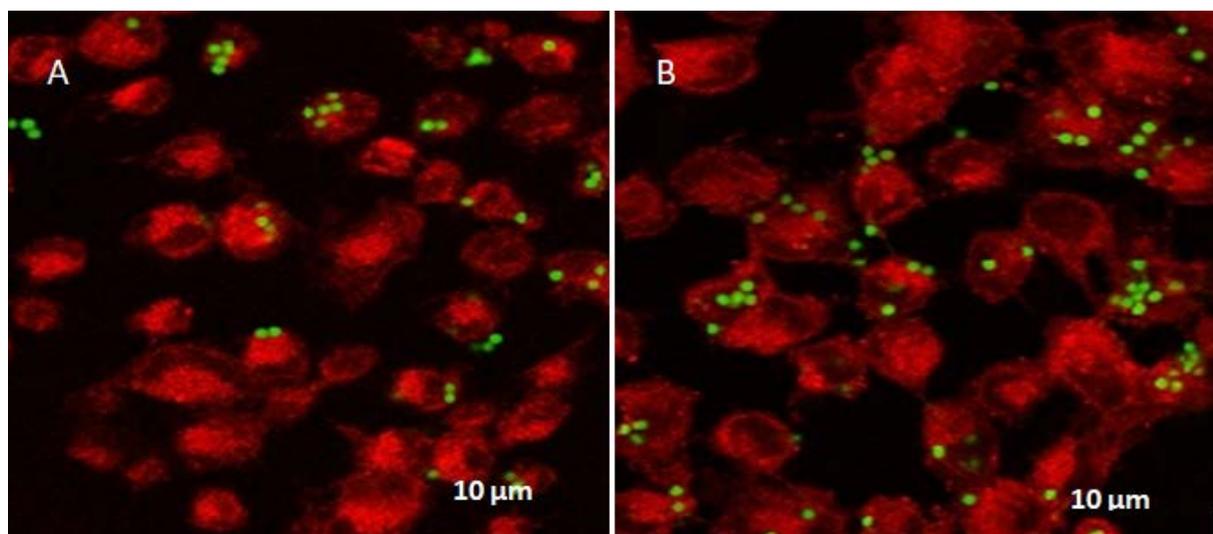


Figura I.15 Microscopía láser confocal de células THP1-PMA marcadas con LysoTracker e incubadas con *beads* solas (A) o con CIDCA 5310 (B).

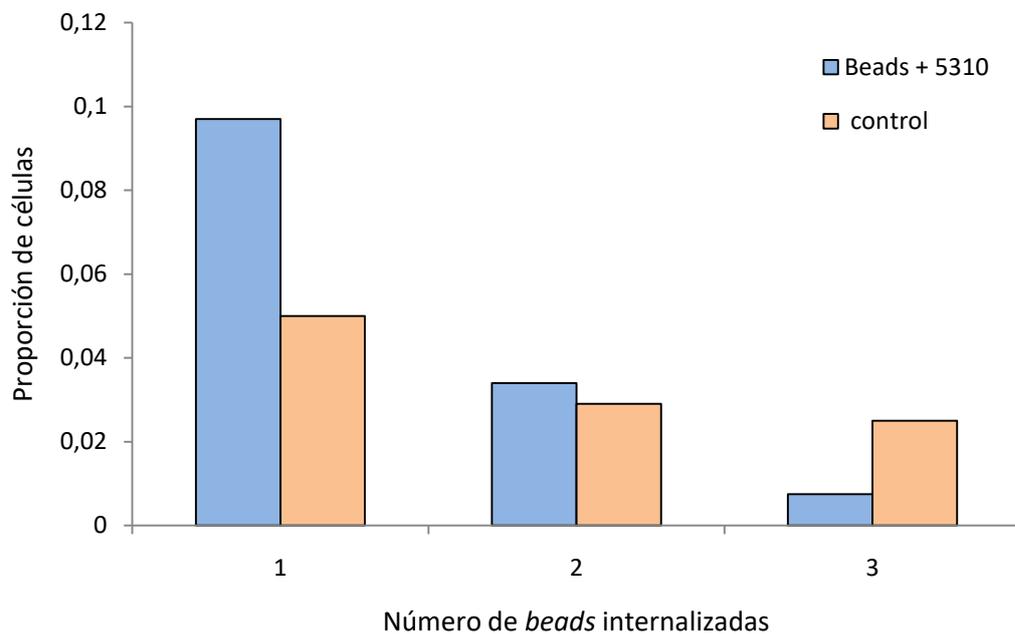


Figura I.16 Proporción de células con 1, 2 o 3 *beads* internalizadas.

Datos obtenidos del análisis de al menos 200 células por condición.

Tabla I.3 Colocalización de esferas de látex con compartimentos lisosomales (Lysotracker) y endosomas de reciclaje (Transferrina), luego de 1 hora de incubación con células THP1-PMA en presencia de CIDCA 5310.

Los datos corresponden a dos experimentos independientes. Los números indican células con *beads* internalizadas.

<i>Beads</i>	Lysotracker	CONTROL		CIDCA 5310	
	Internalizadas		29	66	48
Internalizadas colocalizando		7	8	13	17
<i>Beads</i>	Transferrina				
	Internalizadas		15	22	10
Internalizadas colocalizando		3	7	2	3

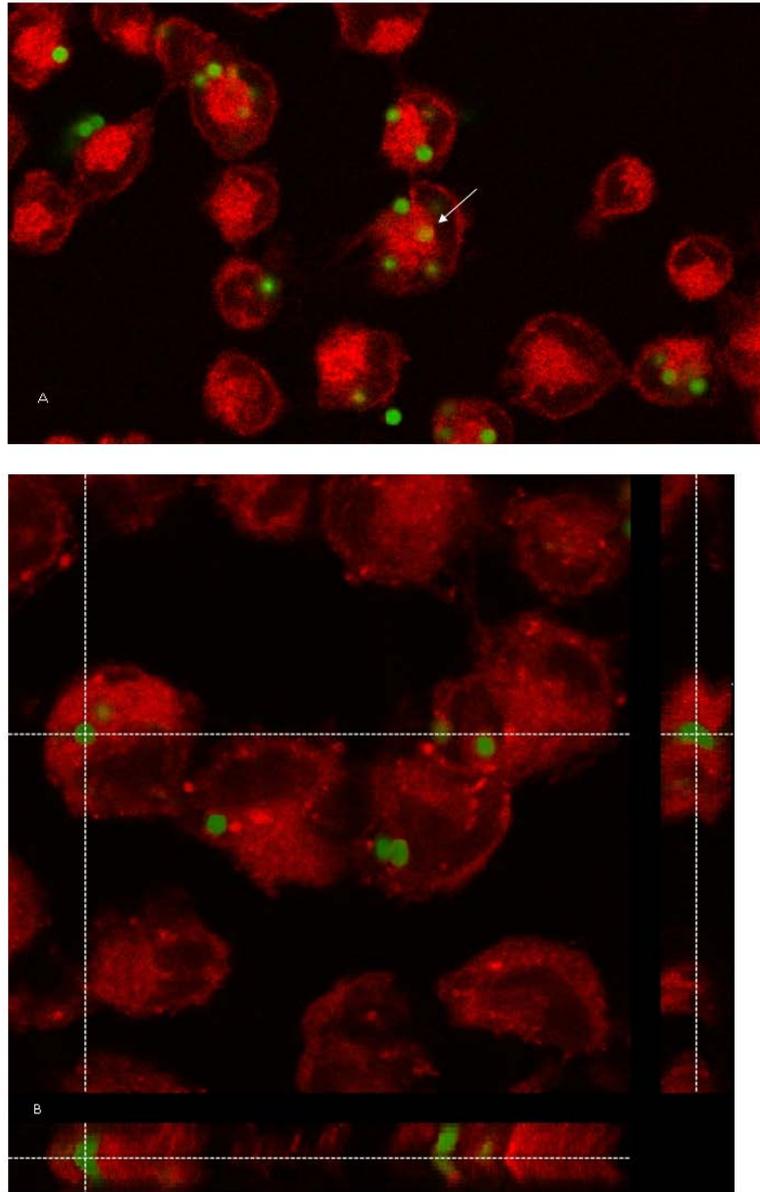


Figura I.17 Microscopía láser confocal de células THP-1PMA marcadas con Lyotracker (rojo) en presencia de esferas de látex (verde). En la imagen A la flecha muestra la colocación de la esfera de látex; en la imagen B se evidencia su internalización.

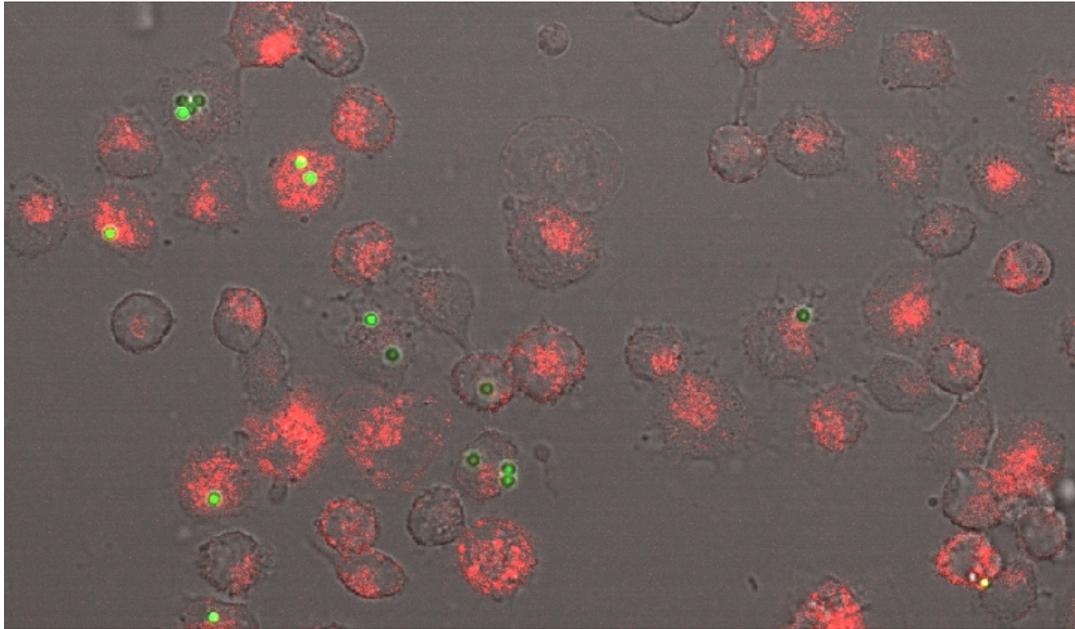


Figura I.18 Microscopía láser confocal de células THP-1PMA con endosomas de reciclaje marcados en rojo en presencia de *beads* en color verde.

☀ I.10 Efecto de bifidobacterias sobre la fagocitosis de *Bacillus cereus*.

Así como se evaluó el efecto de la presencia de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 sobre la fagocitosis de partículas inertes, se determinó el efecto de la presencia de estas bacterias sobre la fagocitosis de *Bacillus cereus* B10502, un microorganismo patógeno Gram positivo, esporulado. La presencia de la cepa CIDCA 5310 no modificó la fagocitosis ni la asociación del microorganismo patógeno (**Figura I.19 y figura I.20**). Sin embargo, la presencia de la cepa CIDCA 5317 generó una disminución significativa ($P < 0,05$) de la fagocitosis de B10502 ($247,53 \pm 43,77$) respecto al control sin bifidobacteria ($365,24 \pm 12,55$) (**Figura I.20**).

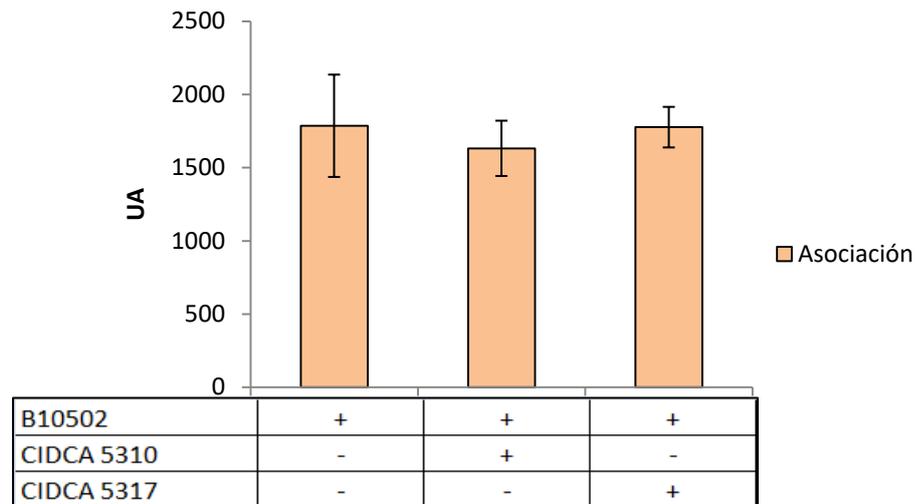


Figura I.19 Asociación de *Bacillus cereus* B10502 en presencia de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 (*P<0,05).

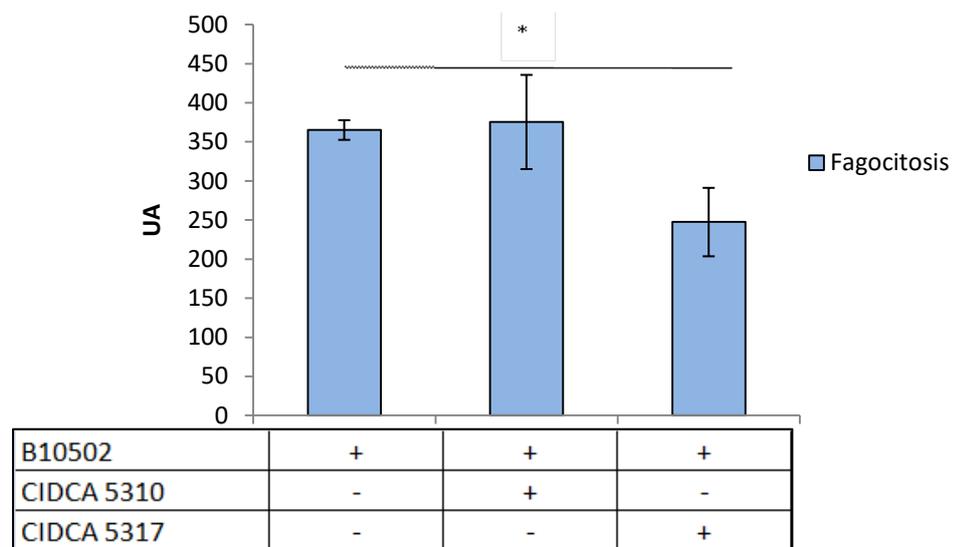


Figura I.20 Fagocitosis de *Bacillus cereus* B10502 en presencia de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 (*P<0,05).

DISCUSIÓN

El proceso de fagocitosis es un componente clave en la respuesta inmune innata y adaptativa desencadenada por microorganismos. Contribuye a la primera línea de defensa frente a una infección. Además, este proceso es crucial en la remodelación y homeostasis tisular.

Para que la fagocitosis tenga lugar, es necesario el reconocimiento y unión del antígeno por receptores presentes en la superficie celular, existiendo una gran variedad de receptores que pueden estar involucrados en esta interacción, dependiendo de la naturaleza de la partícula que va a ser fagocitada (Underhill and Ozinsky, 2002; Flannagan, Jaumouill and Grinstein, 2012). La consecuencia inmunológica y fisiológica del proceso fagocítico, va a depender entonces, de los receptores involucrados en el reconocimiento del antígeno, de las modificaciones a nivel del citoesqueleto así como también de la maduración de la vacuola una vez que la partícula es fagocitada (Aderem and Underhill, 1999).

Este proceso fue ampliamente estudiado para microorganismos patógenos (Lamberti *et al.*, 2010; Cano *et al.*, 2015; Valdez *et al.*, 2016; Rolny, Racedo and Pérez, 2017), sin embargo, hay escasos estudios que relacionan las bifidobacterias con células fagocíticas profesionales (Tahoun *et al.*, 2017a).

Teniendo en cuenta la relevancia de la fagocitosis para modelar la respuesta del hospedador y el conocido efecto inmunomodulador de las bifidobacterias, en el presente capítulo se estudió la interacción de cepas de bifidobacterias con células fagocíticas profesionales utilizando la línea THP-1.

A través de estudios anteriores realizados en nuestro grupo de investigación, se pudieron observar las diferentes propiedades de superficie que presentan las cepas de bifidobacterias evaluadas y su relación con propiedades relevantes de estas bacterias para su actividad probiótica. Las cepas utilizadas se detallan en la tabla I.1 (Pérez *et al.*, 1998; Bibiloni, Pérez and De Antoni, 2000; Kociubinski *et al.*, 2002; Trejo, De Antoni and Pérez, 2013).

Por lo tanto, la primera hipótesis planteada fue que, al igual que lo demostrado para células epiteliales, las diferentes propiedades superficiales de las bifidobacterias podrían generar distintos efectos sobre las interacciones con células fagocíticas y por

lo tanto, se obtendrían valores de fagocitosis distintos con el consecuente efecto sobre la respuesta inmune.

Los resultados de los ensayos de fagocitosis de las cepas de bifidobacterias mostraron dos grupos de microorganismos bien definidos, aquéllos que son altamente internalizados (*B. bifidum* CIDCA 5310 y *B. bifidum* NCC 189) y aquéllos que poseen bajos índices de fagocitosis (*B. pseudolongum* CIDCA 531, *B. breve* CIDCA 532, *B. infantis* NCC 200, *B. bifidum* CIDCA 5311, *B. adolescentis* CIDCA 5317 y *B. bifidum* NCC 235).

En estudios previos de nuestro grupo de investigación, se observó que altos valores de hidrofobicidad en estas cepas de bifidobacterias estarían relacionados con la capacidad de las mismas de adherirse a enterocitos humanos en cultivo (Pérez et al., 1998). De modo que, la medida de esta propiedad sería una herramienta útil para predecir propiedades relevantes en estas bacterias. Por lo tanto, se decidió estudiar si las diferencias en los valores de fagocitosis entre las cepas se correlacionaban con su hidrofobicidad superficial.

Los resultados mostraron que no hay correlación entre la hidrofobicidad bacteriana y la interacción de bifidobacterias con células fagocíticas. De hecho, la cepa CIDCA 5310 y NCC235 (ambas pertenecientes a la misma especie *B. bifidum*) son altamente hidrofóbicas y adherentes a enterocitos (Pérez et al., 1998) pero son fagocitadas de manera diferente por células THP-1.

En consecuencia, se puede concluir que la hidrofobicidad superficial de las cepas de bifidobacterias en estudio, no sería una propiedad relevante para predecir la interacción con células THP-1.

La diferente fagocitosis de las bacterias observada, puede estar relacionada con una diferente expresión de moléculas en la superficie celular de cada bacteria. Se han reportado diferentes moléculas involucradas en la interacción bifidobacteria-hospedador (Alessandri et al., 2019; Verma, Lee and Jeun, 2019), como por ejemplo exopolisacáridos (Ruas-madiedo et al., 2009; Chapot-Chartier et al., 2010; Fanning et al., 2012; Schiavi et al., 2016; Tahoun et al., 2017a; Speciale et al., 2019), la expresión de pili (Turrone et al., 2013, 2014; Milani et al., 2017), y proteínas con actividades inmunoactivas (Guglielmetti et al., 2008, 2014).

Se ha estudiado el efecto inhibitorio del polisacárido capsular de *Bifidobacterium longum* sobre la fagocitosis por macrófagos, y sobre la adhesión a células Caco-2 (Tahoun et al., 2017a). Se ha reportado el efecto de la presencia de polisacárido capsular, sobre la protección contra patógenos, la colonización y adhesión, la capacidad de ciertas bacterias

de formar biofilm, la resistencia a bilis y la inmunomodulación. En el estudio realizado por Tahoun et al. se observa, que una cepa mutante que carece de polisacárido capsular, es más fagocitada por macrófagos que la cepa salvaje (Tahoun *et al.*, 2017).

Para profundizar el estudio de interacción de microorganismos con células del hospedador, se seleccionaron dos cepas de bifidobacterias con características totalmente opuestas: las cepas CIDCA 5310 y 5317. La cepa CIDCA 5310, es altamente hidrofóbica, autoaglutinante y hemaglutinante, con capacidad de adherirse al vidrio y a células epiteliales Caco-2, y además, es altamente fagocitada por células THP-1. Por el contrario, la cepa CIDCA 5317 no ha demostrado tener ninguna de estas propiedades. Posteriormente, debido a las diferencias antes mencionadas entre las bacterias, se planteó el interrogante sobre los destinos intracelulares de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 una vez que son internalizadas.

A través del empleo de microscopía láser confocal, se pudo determinar la internalización en condiciones no opsónicas, de las bacterias y la colocación de las mismas, con compartimentos lisosomales y con endosomas de reciclaje. Los resultados del análisis de las imágenes obtenidas mostraron la mayor internalización de la cepa CIDCA 5310 respecto a la cepa CIDCA 5317, resultado compatible con lo observado por citometría de flujo.

En referencia al destino intracelular, la cepa CIDCA 5310 presentó la mayor colocación con el marcador lisosomal, mientras que la cepa CIDCA 5317 mostró una mayor tendencia a colocarse con endosomas de reciclaje, en los tiempos de incubación estudiados. Aunque el presente estudio no incluyó determinaciones de la cinética de internalización, los resultados serían compatibles con diferentes cinéticas de tráfico intracelular entre estas dos cepas, quizás debido a diferencias en los mecanismos de internalización frente a distintas bacterias así como también en lo que respecta a la maduración del fagosoma o la respuesta celular frente a distintos microorganismos (Aderem and Underhill, 1999).

Así pues, pensando en cómo un no patógeno podría influir sobre dichos aspectos, se halla descrito para lactobacilos que la respuesta celular es dramáticamente diferente cuando las bacterias son internalizadas a través de un receptor que induce a la macropinocitosis o a través de otros mecanismos como la fagocitosis dependiente de Syk o

simplemente una macropinocitosis constitutiva (Boye *et al.*, 2016). Además se ha reportado el reconocimiento por TLR de secuencias de ácidos nucleicos específicas en bacterias propias del hospedador distinguiéndose de la de microorganismos exógenos (Vabret, Bhardwaj and Greenbaum, 2018).

Teniendo en cuenta estos resultados, se podría pensar que la diferente localización intracelular de las bacterias podría dar lugar a diferentes respuestas inmunes. Por ejemplo, se ha correlacionado el tráfico intracelular del patógeno *B. cereus*, hacia compartimentos ácidos con la alta expresión de HLA-DR en células RAW 264.7, molécula necesaria para la presentación de antígenos a linfocitos T (Rolny, et al., 2017).

A causa de la gran variedad de interacciones entre las bacterias y las células del hospedador que existen reportadas, e incluso las interacciones que las bacterias pueden presentar con distintos fármacos con posible alteración de su eficacia (Jourova, Anzenbacher and Anzenbacherova, 2016), surgió el interrogante acerca de los efectos de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 junto con uno de los fármacos más utilizados en Argentina para la prevención de cuadros trombóticos, el anticoagulante acenocumarol. Teniendo en cuenta que se ha observado su efecto inmunomodulatorio (Warzecha *et al.*, 2017), se focalizaron los estudios en el efecto del acenocumarol sobre la fagocitosis de bifidobacterias.

Los resultados mostraron, una disminución significativa de la fagocitosis de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 cuando se incubó con acenocumarol. El descenso de la fagocitosis en presencia del fármaco es compatible con un efecto inmunomodulatorio del anticoagulante.

Se ha reportado la capacidad del acenocumarol de disminuir la activación de respuestas proinflamatorias desencadenadas por LPS e IFN- γ , y la disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias en células THP-1 (Schroecksnadel *et al.*, 2013).

Debido a los resultados obtenidos en referencia a la actividad fagocítica de las células THP-1 cuando son incubadas con acenocumarol, se procedió a evaluar si el anticoagulante afectaba también el destino intracelular de la cepa CIDCA 5310. Los resultados mostraron que, si bien disminuye la colocalización de la cepa CIDCA 5310 con el marcador lisosomal, esto se debe a la disminución de la internalización. No obstante, como era de esperar para una bacteria carente de factores de virulencia, el destino final es lisosomal. Estos resultados

permiten concluir que la presencia del fármaco no afectaría el destino intracelular de esta bacteria.

Luego de haber evaluado la fagocitosis de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317, en presencia de acenocumarol, se planteó la siguiente hipótesis: si las cepas interactúan de manera diferente con células fagocíticas, también podrían afectar de manera diferencial la fagocitosis de otras partículas o bacterias.

El uso de partículas inertes en estudios de fagocitosis, ha sido altamente empleado, debido a que estas partículas carecen de información específica en su estructura que permita interferir en su tráfico intracelular (Desjardins, Molecular and Program, 1994; Oh and Swanson, 1996; Daigneault *et al.*, 2010; Kurygina *et al.*, 2018).

Por consiguiente, se estudió el efecto de la presencia de las cepas CIDCA 5310, CIDCA 5317 y acenocumarol sobre la fagocitosis de partículas inertes (*beads*). En el análisis del ensayo de fagocitosis, se observó un mayor índice de internalización de *beads* cuando está presente la cepa CIDCA 5310, pero cuando se utilizó esta bacteria no viable, inactivada por calor o con radiación UV, este efecto no se observó indicando que es necesaria la viabilidad para que intervenga en la fagocitosis de las *beads*. Este hecho induce a pensar entonces, que estarían involucrados factores termolábiles en la interacción bacteria-célula (Bibiloni, Pérez and De Antoni, 2000) y que además se requiere mantener las secuencias de ADN intactas para el incremento de la fagocitosis; se ha demostrado previamente, que el ADN de bifidobacteria es capaz de inducir la activación de macrófagos *in vitro* (Li *et al.*, 2005).

Además, se estudió el efecto de la presencia de acenocumarol sobre la fagocitosis de las *beads*, observándose una disminución significativa de la internalización de las esferas de látex. Este resultado se relaciona con lo observado previamente en la disminución de la internalización de la cepa CIDCA 5310, en presencia de acenocumarol, cuando se utilizaron las mismas condiciones de cultivo.

Continuando con el estudio de la internalización de las partículas de látex, se decidió estudiar si el destino intracelular de las mismas se ve modificado por la presencia de la cepa CIDCA 5310, cepa que generó la mayor fagocitosis de estas partículas. Como resultado se observó, que la mayoría de las *beads* no colocalizan ni con lisosomas, ni con endosomas de reciclaje, y además este resultado no se ve modificado por la presencia de CIDCA 5310. La ausencia de *beads* colocalizando en compartimentos degradativos, podría deberse a la naturaleza inerte de esta partícula, la cual no posee componentes en su estructura que

puedan ser reconocidos por la célula ni que generen señales intracelulares (Boye *et al.*, 2016), y como consecuencia podría retardar la maduración del fagosoma al fagolisosoma debido al no reconocimiento de la partícula por la célula. Se han reportado trabajos en donde la maduración del fagosoma, conteniendo partículas de látex no ocurría por horas (Aderem and Underhill, 1999).

Por otro lado, a través de la microscopía láser confocal, se pudo corroborar el resultado antes obtenido por citometría de flujo, en donde se observó una mayor fagocitosis de *beads* en presencia de CIDCA 5310, y además se pudo notar que la mayoría de las células que fue capaz de internalizar estas partículas, internalizaron solo una.

Debido al efecto observado de la presencia de la cepa CIDCA 5310, sobre la fagocitosis de partículas inertes, y considerando que el proceso fagocítico constituye uno de los mecanismos inmunes innatos para la eliminación, procesamiento y presentación de antígenos, se decidió estudiar el efecto de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 sobre la fagocitosis en condiciones no opsónicas de la cepa *Bacillus cereus* B10502, una bacteria patógena que no se caracteriza por su supervivencia intracelular ni por poseer factores de virulencia específicos para interferir en la función de los fagocitos. Como resultado se observó, que la presencia de la cepa CIDCA 5310 no afecta la fagocitosis de *B. cereus*, lo cual contrasta con lo ocurrido con la fagocitosis de las *beads*.

Este hecho se puede explicar, considerando que las células fagocíticas ya se encuentran activadas en presencia de *B. cereus*, debido al reconocimiento de ligandos propios del patógeno, induciendo la fagocitosis, mientras que la presencia de una partícula inerte no genera este efecto. Se podría especular que la célula fagocítica reconoce señales propias de la bacteria activando la fagocitosis, mientras que la fagocitosis de las *beads* en condiciones no opsónicas se genera sin reconocimiento previo. Considerando esto, se puede explicar entonces, que la presencia de la cepa CIDCA 5310 no es capaz de modificar la activación de la fagocitosis desencadenada por *B. cereus*, mientras que sí es capaz de aumentar la fagocitosis de una partícula inerte. Este último hecho, se correlaciona con el aumento de la fagocitosis de esta misma cepa en comparación a la cepa CIDCA 5317. Se podría pensar en este sentido, que la cepa CIDCA 5310 genera una alta activación de la célula fagocítica a través de la interacción con receptores presentes en la membrana y con receptores intracelulares (Zeuthen, 2008), aumentando la capacidad fagocítica en este caso de ella misma y de partículas inertes estando las células en un estado basal sin estímulos,

pero no es capaz de aumentar aún más la fagocitosis de *B. cereus* debido a la activación celular generada por el estímulo del patógeno.

Por otro lado, la fagocitosis de *B. cereus* se observó significativamente disminuida en presencia de CIDCA 5317, proponiendo un efecto inmunomodulador sobre la célula fagocítica activada en presencia del patógeno. Este resultado se podría relacionar con lo observado en la fagocitosis de las bifidobacterias y de las *beads* en donde la cepa CIDCA 5317 es fagocitada en menor medida que la cepa CIDCA 5310, y en donde el aumento de la internalización de la *beads* ocurre en presencia de CIDCA 5310, sugiriendo una menor respuesta de la célula fagocítica en presencia de la cepa CIDCA 5317. Estos resultados reflejan el distinto efecto inmunomodulador que poseen estas dos cepas de bifidobacterias dependiendo de la presencia de componentes capaces de modificar la respuesta celular.

Como conclusión de este capítulo, se puede destacar el efecto diferencial de cepas de bifidobacterias, indicando posible participación de moléculas presentes en la superficie de las mismas (Alessandri *et al.*, 2019; Verma, Lee and Jeun, 2019), como por ejemplo exopolisacáridos (Ruas-madiedo *et al.*, 2009; Chapot-Chartier *et al.*, 2010; Fanning *et al.*, 2012; Schiavi *et al.*, 2016; Tahoun *et al.*, 2017a; Speciale *et al.*, 2019), la expresión de pili (Turroni *et al.*, 2013, 2014; Milani *et al.*, 2017), y proteínas con actividades inmunoactivas (Guglielmetti *et al.*, 2008, 2014) capaces de interaccionar diferente con receptores presentes en células fagocíticas, y además se podrían proponer diferentes interacciones con receptores intracelulares desencadenando señalizaciones intracelulares distintas entre estas dos cepas de bifidobacterias (Zeuthen, 2008; Boye *et al.*, 2016).

Teniendo en consideración las diferencias expuestas en la fagocitosis de las bifidobacterias en estudio y los diferentes efectos generados en la fagocitosis de otras partículas y microorganismos, se propusieron los ensayos presentes en los siguientes capítulos, con el fin de indagar si estas divergencias generan respuestas celulares diferentes y caracterizarlas en presencia de las cepas CIDCA 5310, CIDCA 5317 y la presencia concomitante de acenocumarol.

BIBLIOGRAFÍA

- Aderem, A. and Underhill, D. M. (1999) 'Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages', *Annual Review of Immunology*, 17(1), pp. 593–623. doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.593.
- Alessandri, G. *et al.* (2019) 'Bifidobacterial Dialogue With Its Human Host and Consequent Modulation of the Immune System', 10. doi: 10.3389/fimmu.2019.02348.
- Bibiloni, R., Pérez, P. F. and De Antoni, G. L. (2000) 'Factors involved in adhesion of bifidobacterial strains to epithelial cells in culture', *Anaerobe*, 5(3–4), pp. 483–485. doi: 10.1006/anae.1999.0209.
- Boye, L. *et al.* (2016) 'Plasma membrane Toll-like receptor activation increases bacterial uptake but abrogates endosomal *Lactobacillus acidophilus* induction of interferon- β ', 149 pp. 329–342. doi: 10.1111/imm.12650.
- Cano, V. *et al.* (2015) 'Klebsiella pneumoniae survives within macrophages by avoiding delivery to lysosomes', *Cellular Microbiology*, 17(11), pp. 1537–1560. doi: 10.1111/cmi.12466.
- Chapot-Chartier, M. P. *et al.* (2010) 'Cell surface of *Lactococcus lactis* is covered by a protective polysaccharide pellicle', *Journal of Biological Chemistry*, 285(14), pp. 10464–10471. doi: 10.1074/jbc.M109.082958.
- Daigneault, M. *et al.* (2010) 'The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and', 5(1). doi: 10.1371/journal.pone.0008668.
- Desjardins, M., Molecular, E. and Program, C. B. (1994) 'Biogenesis of Phagolysosomes Proceeds through a Sequential Series of Interactions with the Endocytic Apparatus', 124(5), pp. 677–688. doi: 10.1083/jcb.124.5.677
- Fanning, S. *et al.* (2012) 'Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection', 109(6), pp. 1–6. doi: 10.1073/pnas.1115621109.
- Flannagan, R. S., Jaumouill, V. and Grinstein, S. (2012) 'The Cell Biology of Phagocytosis'. 7, pp 61-98 doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132445.
- Guglielmetti, S. *et al.* (2008) 'Implication of an Outer Surface Lipoprotein in Adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 Cells', 74(15), pp. 4695–4702. doi: 10.1128/AEM.00124-08.
- Guglielmetti, S. *et al.* (2014) 'Murein lytic enzyme TgaA of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 modulates dendritic cell maturation through its cysteine- and histidine-dependent amidohydrolase/peptidase (CHAP) amidase domain', *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), pp. 5170–5177. doi: 10.1128/AEM.00761-14.
- Jourova, L., Anzenbacher, P. and Anzenbacherova, E. (2016) 'Human gut microbiota plays a

role in the metabolism of drugs', *Biomedical Papers*, 160(3), pp. 317–326. doi: 10.5507/bp.2016.039.

Kociubinski, G. *et al.* (2002) 'Effect of bile components on the surface properties of bifidobacteria', *Journal of Dairy Research*, 69(2), pp. 293–302. doi: 10.1017/S0022029901005313.

Kurycina, A. V *et al.* (2018) 'Plasticity of Human THP 1 Cell Phagocytic Activity during Macrophagic Differentiation', 83(3), pp. 200–214. doi: 10.1134/S0006297918030021

Lamberti, Y. A. *et al.* (2010) 'Intracellular Trafficking of *Bordetella pertussis* in Human Macrophages □', 78(3), pp. 907–913. doi: 10.1128/IAI.01031-09.

Li, Y. *et al.* (2005) 'Bifidobacteria DNA induces murine macrophages activation in vitro.', *Cellular & molecular immunology*, 2(6), pp. 473–478. PMID: 16426499

Milani, C. *et al.* (2017) 'The Sortase-Dependent Fimbriome of the Genus *Bifidobacterium* : Extracellular', 83(19), pp. 1–16. doi: 10.1128/AEM.01295-17

Oh, Y. and Swanson, J. A. (1996) 'Different Fates of Phagocytosed Particles after Delivery into Macrophage Lysosomes', 132(4), pp. 585–593. doi: 10.1083/jcb.132.4.585

Pérez, P. F. *et al.* (1998) 'Surface properties of bifidobacterial strains of human origin', *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), pp. 21–26. PMID: 9435057

Rolny, I. S., Racedo, S. M. and Pérez, P. F. (2017) 'Fate of *Bacillus cereus* within phagocytic cells', *International Microbiology*, 20(4), pp. 170–177. doi: 10.2436/20.1501.01.300.

Ruas-madiedo, P. *et al.* (2009) 'Bile Affects the Synthesis of Exopolysaccharides by *Bifidobacterium animalis* □', 75(4), pp. 1204–1207. doi: 10.1128/AEM.00908-08.

Schiavi, E. *et al.* (2016) '35624 Plays an Essential Role in Dampening Host Proinflammatory Responses and Repressing Local T H 17 Responses', 82(24), pp. 7185–7196. doi: 10.1128/AEM.02238-16.Editor.

Schroecksadel, S. *et al.* (2013) 'Immunomodulatory effects in vitro of vitamin K antagonist acenocoumarol', *Thrombosis Research*. Elsevier Ltd, 131(6), pp. e264–e269. doi: 10.1016/j.thromres.2013.02.012.

Speciale, I. *et al.* (2019) 'Bifidobacterium bifidum presents on the cell surface a complex mixture of glucans and galactans with different immunological properties', *Carbohydrate Polymers*, 218(May), pp. 269–278. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.05.006.

Tahoun, A. *et al.* (2017a) 'Capsular polysaccharide inhibits adhesion of *Bifidobacterium longum* 105-A to enterocyte-like Caco-2 cells and phagocytosis by macrophages', *Gut Pathogens*. BioMed Central, 9(1), pp. 1–17. doi: 10.1186/s13099-017-0177-x.

Trejo, F. M., De Antoni, G. L. and Pérez, P. F. (2013) 'Protective effect of bifidobacteria in an experimental model of *Clostridium difficile* associated colitis', *Journal of Dairy Research*, 80(3), pp. 263–269. doi: 10.1017/S0022029913000216.

Turróni, F. *et al.* (2013) 'Role of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in modulating bacterium-host interactions.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(27), pp. 11151–6. doi: 10.1073/pnas.1303897110.

Turróni, F. *et al.* (2014) 'Bifidobacterium bifidum PRL2010 Modulates the Host Innate Immune Response', 80(2), pp. 730–740. doi: 10.1128/AEM.03313-13.

Underhill, D. M. and Ozinsky, A. (2002) 'PHAGOCYTOSIS OF MICROBES : Complexity in Action', (2). doi: 10.1146/annurev.immunol.20.103001.114744.

Vabret, N., Bhardwaj, N. and Greenbaum, B. D. (2018) 'HHS Public Access', 38(1), pp. 53–65. doi: 10.1016/j.it.2016.10.006.Sequence-specific.

Valdez, H. A. *et al.* (2016) 'Bordetella pertussis modulates human macrophage defense gene expression', *Pathogens and Disease*, 74(6), pp. 1–14. doi: 10.1093/femspd/ftw073.

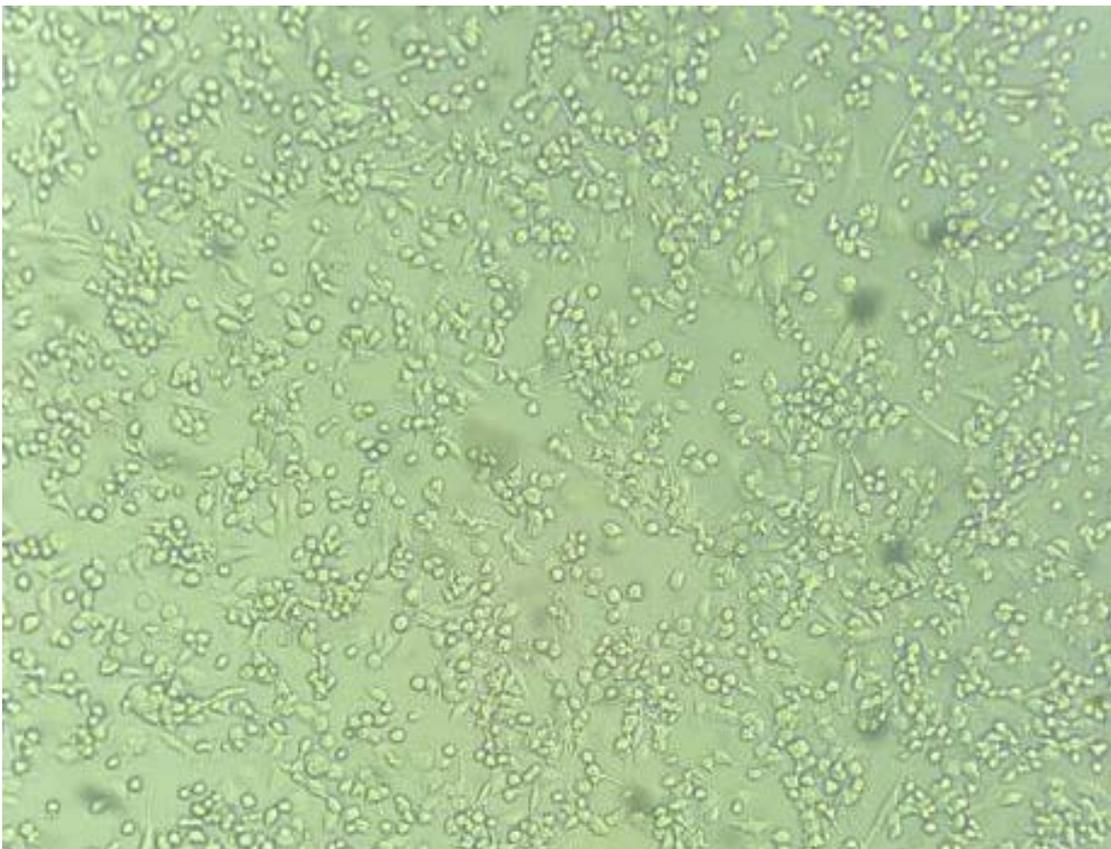
Verma, R., Lee, C. and Jeun, E. J. (2019) 'Cell Surface Polysaccharides of *Bifidobacterium bifidum* Induce the Generation of Foxp3 + Regulatory T Cells', *Transplantation*, 103(1), pp. 3–4. doi: 10.1097/TP.0000000000002550A.

Warzecha, Z. *et al.* (2017) 'Therapeutic Effect of Low Doses of Acenocoumarol in the Course of Ischemia / Reperfusion-Induced Acute Pancreatitis in Rats'. doi: 10.3390/ijms18040882.

Zeuthen, L. H. (2008) 'Toll-like receptor 2 and nucleotide-binding oligomerization domain- 2 play divergent roles in the recognition of gut-derived lactobacilli and bifidobacteria in dendritic cells', pp. 489–502. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02800.x.

CAPÍTULO II

RESPUESTA CELULAR FRENTE A LA ESTIMULACIÓN CON BIFIDOBACTERIAS Y ACENOCUMAROL



INTRODUCCIÓN

Las bacterias probióticas interactúan con diferentes poblaciones celulares del hospedador. En este contexto, estas bacterias pueden modular la actividad de células claves en la respuesta inmune como células dendríticas y macrófagos (Rescigno *et al.*, 2001; Lescheid, 2014).

Una de las primeras células involucradas en la generación de una respuesta inmune frente a un microorganismo son los macrófagos, los cuales se encargan de alertar al sistema inmune del ingreso de un patógeno y de reconocer a la microbiota comensal. Estas células fagocíticas reconocen al microorganismo, lo internalizan, lo procesan y presentan sus fragmentos peptídicos unidos a la molécula HLA (versión humana de MHC) en su superficie, de esta manera estimulan a las células T para desencadenar la respuesta inmune adaptativa. Estos macrófagos activados expresan altos niveles de moléculas co-estimuladoras y moléculas involucradas en la presentación de antígenos como CD80, CD86, MCH I y II en su superficie, por lo que la medida de la expresión de estas moléculas indican el grado de activación del macrófago frente a un microorganismo (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018).

Es importante resaltar, que los macrófagos conforman una población de células muy diversa y heterogénea debido a la plasticidad y diferente capacidad de diferenciación que presentan sus células precursoras, los monocitos. La polarización hacia un perfil proinflamatorio llamado M1 o hacia un perfil regulatorio llamado M2 dependerá del microambiente en el que se encuentre la población monocítica. El microambiente estará dado por el tipo de citoquinas y quemoquinas presentes, la presencia de productos bacterianos y el estado inflamatorio del entorno. Sustancialmente, la diferencia entre estos dos grandes grupos de macrófagos radica en la expresión de receptores, citoquinas y quemoquinas y en su funcionalidad (Mantovani *et al.*, 2004; Chistiakov *et al.*, 2018; Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018).

La activación macrofágica clásica (M1) está caracterizada por una alta capacidad de presentación de antígenos, alto poder microbicida y capacidad de activar vías inflamatorias, con producción de IL-12 e IL-23 así como también la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Por otro lado, el perfil M2, llamado también activación alternativa, generan macrófagos con propiedades inmunomoduladoras, de remodelamiento y reparación de tejidos pero con escaso poder microbicida (Mantovani *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha demostrado que la diferenciación macrofágica es plástica, rápida y

completamente reversible, sugiriendo que la activación de una población para resolver una infección puede luego, cambiar su perfil y frenar esa respuesta pro-inflamatoria una vez resuelta (Italiani and Boraschi, 2014; Murray, 2017; Benoit, Desnues and Mege, 2018).

Cabe destacar que dentro de estos dos grandes grupos de polarización de macrófagos, conceptualmente simplificado, hay un amplio abanico de perfiles macrofágicos que van a desarrollarse de acuerdo a las condiciones de su microambiente dado principalmente por las citoquinas, quemoquinas y ligandos presentes (Chistiakov *et al.*, 2018). Así pues, el interferón gamma (INF- γ) es la principal citoquina asociada al perfil M1, así como también su combinación con lipopolisacárido (LPS) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), mientras que el perfil M2 se genera a partir de la estimulación con interleuquina-4 (IL-4) o con interleuquina-13 (IL-13), e IL-10 caracterizándose por antagonizar el prototipo de respuesta inflamatoria y sus marcadores.

A modo de resumen, se pueden apreciar en la figura 1, las citoquinas involucradas en la polarización de los perfiles de macrófagos M1 y M2, con la consecuente expresión de moléculas de superficie y producción de citoquinas.

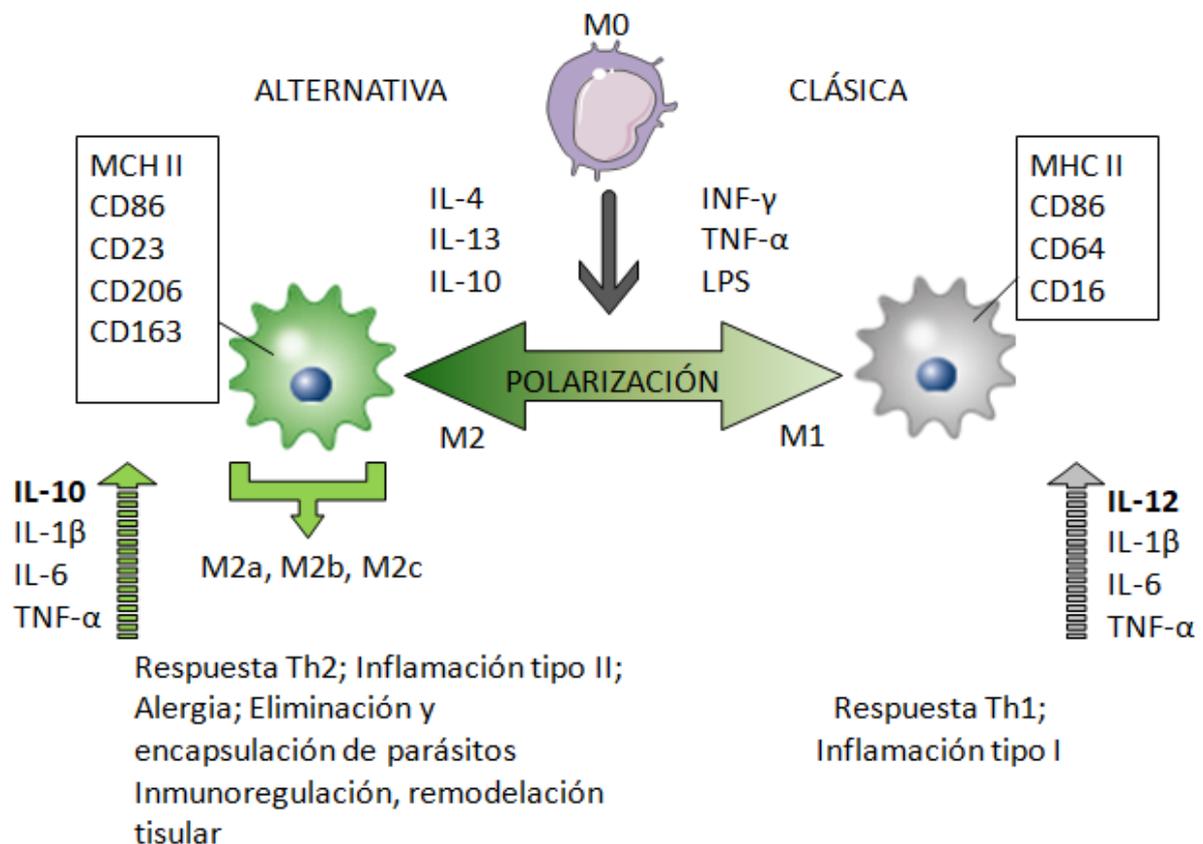


Figura 1 Modelo de polarización de macrófagos M1-M2. Se muestra la polarización de los macrófagos hacia el perfil M1 a partir de la estimulación del interferón gamma (INF-γ), lipopolisacárido (LPS), factor de necrosis tumoral (TNF-α) y hacia el perfil M2 con interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 13 (IL-13), interleuquina 10 (IL-10). Se exponen los marcadores presentes en cada perfil de polarización con su aumento en la liberación de citoquinas y su consecuente respuesta celular.

La inmunomodulación ejercida por los probióticos puede estar relacionada con su capacidad de modular las vías de señalización celulares (Lescheid, 2014; Vargas Garcia *et al.*, 2015). Esta actividad inmunomodulatoria está asociada a la interacción entre los patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs, como el peptidoglicano y lipopéptidos) y receptores del sistema inmune innato como los receptores tipo Toll (TLR), receptores lectina tipo C, receptores intracelulares tipo NOD (Lebeer, Vanderleyden and De Keersmaecker, 2010), más aún está descrito que algunas bacterias son capaces de generar su efecto probiótico a través de la secreción de factores solubles, sin necesidad de que haya interacción con la célula (Von Schilde *et al.*, 2012; Villena and Kitazawa, 2014; Yousefi *et al.*,

2018). Los efectos de estas interacciones o de los factores solubles liberados por microorganismos probióticos, generan a nivel celular la inducción de la señalización a través de la proteína kinasa B / Akt, NF- κ B, la proteína kinasa activada por mitógeno y moléculas adaptadoras como MyD88 para iniciar la cascada de señalización y generar la respuesta correspondiente (Llewellyn and Foey, 2017). El tipo de respuesta celular generada va a depender del microorganismo que desencadena la respuesta, del tipo de interacción celular, de la señalización intracelular que genere, de las condiciones del entorno, entre otras.

Con el fin de estudiar qué vías se expresarían en presencia de las cepas en estudio y de acenocumarol, se estudió la activación del factor transcripcional NF- κ B, el cual resulta de suma importancia en la regulación de procesos biológicos proinflamatorios. El factor NF- κ B se encuentra presente en el citoplasma de la mayoría de las células formando complejos con miembros de la familia de inhibidores I κ B, la activación de este factor de transcripción se desencadena mediante la fosforilación de su inhibidor I κ B permitiendo que el mismo se disocie del dímero NF- κ B permitiendo la traslocación del factor al núcleo y de esta manera induciendo la expresión génica (Mastropietro *et al.*, 2015). La activación del factor NF- κ B genera una respuesta celular caracterizada por la producción de citoquinas y quemoquinas con acción proinflamatoria, de factores antimicrobianos o citoprotectores y genera la expresión de moléculas co-estimuladoras (Lebeer, Vanderleyden and De Keersmaecker, 2010; Rolny *et al.*, 2016).

Las bacterias no patógenas, principalmente a través de las señales mediadas por receptores del tipo Toll, pueden inhibir la activación del factor NF- κ B en las células epiteliales del intestino por varios mecanismos (Cerf-bensussan and Gaboriau-routhiau, 2010). La medida de la activación de NF- κ B, se pudo realizar con una línea reportera HT-29-NF- κ B-hrGFP, generada en el Instituto Pasteur de Montevideo (Mastropietro *et al.*, 2015) como resultado de la transfección de la línea celular HT-29 con un plásmido pNF- κ B-hrGFP que permite detectar la expresión del factor NF- κ B a través de un gen reportero. Es muy útil para estudios específicos de esta vía, contribuyendo a dilucidar el modo de acción de cepas probióticas y fármacos (Smaldini *et al.*, 2014; Mastropietro *et al.*, 2015; Rolny *et al.*, 2016).

Además, en el mismo sentido, se estudio el efecto de las cepas utilizadas en este trabajo y del acenocumarol sobre otra línea celular epitelial reportera, Caco-2 ccl20:luc, donde el gen reportero de la luciferasa de luciérnaga se encuentra bajo el control del promotor CCL20, la cual es una quemoquina atractante para células dendríticas principalmente, y macrófagos. Esta línea reportera ha sido ampliamente utilizada para estudiar el efecto inmunomodulador de cepas probióticas (Romanin *et al.*, 2010; Smaldini *et al.*, 2014; Carasi *et al.*, 2015).

Debido a la fuerte evidencia científica que hay sobre la capacidad que poseen ciertas cepas probióticas de inmunomodular la respuesta (Duary, Batish and Grover, 2014; Azad, Sarker and Wan, 2018), en este capítulo se abordarán los estudios de expresión de moléculas inmunológicamente relevantes en células fagocíticas y los estudios de respuesta celular en células epiteliales frente a la interacción de las cepas CIDCA 5310, CIDCA 5317 y acenocumarol, con el fin de indagar un posible perfil de polarización macrofágico (Mantovani *et al.*, 2004).

BIBLIOGRAFÍA

Azad, M. A. K., Sarker, M. and Wan, D. (2018) 'Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles', *BioMed Research International*. Hindawi, 2018, pp. 1–10. doi: 10.1155/2018/8063647.

Benoit, M., Desnues, B. and Mege, J. (2018) 'Macrophage Polarization in Bacterial Infections'. 181, pp 3733-37339. doi: 10.4049/jimmunol.181.6.3733.

Carasi, P. *et al.* (2015) 'Impact of Kefir Derived Lactobacillus kefiri on the Mucosal Immune Response and Gut Microbiota', *Journal of Immunology Research*, 2015, pp. 1–12. doi: 10.1155/2015/361604.

Cerf-bensussan, N. and Gaboriau-routhiau, V. (2010) 'The immune system and the gut microbiota: friends or foes?', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 10(10), pp. 724–733. doi: 10.1038/nri2850.

Chistiakov, D. A. *et al.* (2018) 'The impact of interferon-regulatory factors to macrophage differentiation and polarization into M1 and M2', *Immunobiology*. Elsevier, 223(1), pp. 101–111. doi: 10.1016/j.imbio.2017.10.005.

Duary, R. K., Batish, V. K. and Grover, S. (2014) 'Immunomodulatory activity of two potential probiotic strains in LPS-stimulated HT-29 cells', *Genes and Nutrition*, 9(3). doi: 10.1007/s12263-014-0398-2.

Italiani, P. and Boraschi, D. (2014) 'From monocytes to M1 / M2 macrophages : phenotypical vs . functional differentiation', 5(October), pp. 1–22. doi: 10.3389/fimmu.2014.00514.

Lebeer, S., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S. C. J. (2010) 'Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 8(3), pp. 171–184. doi: 10.1038/nrmicro2297.

Lescheid, D. W. (2014) 'Probiotics as regulators of inflammation: A review', *Functional Foods in Health and Disease*, 4(7), pp. 299–311.

Llewellyn, A. and Foey, A. (2017) *Probiotic modulation of innate cell pathogen sensing and signaling events*, *Nutrients*. doi: 10.3390/nu9101156.

Mantovani, A. *et al.* (2004) 'The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization', 25(12). doi: 10.1016/j.it.2004.09.015.

Mastropietro, G. *et al.* (2015) 'HT-29 and Caco-2 reporter cell lines for functional studies of nuclear factor kappa B activation', *Mediators of Inflammation*, 2015. doi: 10.1155/2015/860534.

Murray, P. J. (2017) 'Macrophage Polarization', *Annual Review of Physiology*, 79(1), pp. 541–566. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.

Rescigno, M. *et al.* (2001) 'Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria.', *Nature immunology*, 2(4), pp. 361–367. doi: 10.1038/86373.

Rolny, I. S. *et al.* (2016) 'Lactobacillus delbrueckii subsp lactis CIDCA 133 modulates response of human epithelial and dendritic cells infected with Bacillus cereus', *Beneficial Microbes*, 7(5), pp. 749–760. doi: 10.3920/BM2015.0191.

Romanin, D. *et al.* (2010) 'Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 140(2–3), pp. 102–108. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.014.

Von Schillde, M. A. *et al.* (2012) 'Lactocepin secreted by *Lactobacillus* exerts anti-inflammatory effects by selectively degrading proinflammatory chemokines', *Cell Host and Microbe*, 11(4), pp. 387–396. doi: 10.1016/j.chom.2012.02.006.

Shapouri-Moghaddam, A. *et al.* (2018) 'Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease', *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), pp. 6425–6440. doi: 10.1002/jcp.26429.

Smaldini, P. L. *et al.* (2014) 'Down-regulation of NF- κ B signaling by *Gordonia bronchialis* prevents the activation of gut epithelial cells', *Innate Immunity*, 20(6), pp. 626–638. doi: 10.1177/1753425913503577.

Vargas Garcia, C. E. *et al.* (2015) 'Piliation of *Lactobacillus rhamnosus* GG promotes adhesion, phagocytosis, and cytokine modulation in macrophages', *Applied and Environmental Microbiology*, 81(6), pp. 2050–2062. doi: 10.1128/AEM.03949-14.

Villena, J. and Kitazawa, H. (2014) 'Modulation of intestinal TLR4-inflammatory signaling pathways by probiotic microorganisms: Lessons learned from *Lactobacillus jensenii* TL2937', *Frontiers in Immunology*, 4(JAN), pp. 1–12. doi: 10.3389/fimmu.2013.00512.

Yousefi, B. *et al.* (2018) 'Probiotics importance and their immunomodulatory properties', *Journal of Cellular Physiology*, (September 2018), pp. 8008–8018. doi: 10.1002/jcp.27559.

MATERIALES Y MÉTODOS

☀ II.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Para la realización de los experimentos de este capítulo se utilizaron las cepas *Bifidobacterium bifidum* CIDCA 5310 y *Bifidobacterium adolescentis* CIDCA 5317 descritas previamente en el capítulo I.

Condiciones de crecimiento:

A partir de las cepas conservadas a - 80°C, las bacterias se inocularon en caldo MRS (Sharpe, 1960) (inóculo al 1% v/v) adicionado con 0,05 % de cisteína MRSc, se incubaron 48 h a 37 °C en condiciones anaeróbicas. Luego se realizó un repique inoculando 100 µl en 10 ml de MRSc dejándolas crecer por 24 h.

☀ II.2 Células eucarióticas

THP-1 (ATCC TIB-202™) Descrita en capítulo I, materiales y métodos I.2.

HT-29 GFP (ATCC HTB-38) es una línea reportera generada en el Instituto Pasteur de Montevideo (Mastropietro et al., 2015) como resultado de la transfección de la línea celular HT-29 con un plásmido pNF-κB-hrGFP. La proteína GFP es reportera de la expresión del gen NF-κB. Las células se cultivaron en medio RPMI con 10% SFB (GIBCO, Life Technologies), durante 48 h a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂/95% O₂, previo a la realización del ensayo.

CACO-2 CCL20: LUC es una línea celular de epitelio intestinal humano que fue transfectada con un gen reportero de la luciferasa de luciérnaga (*Lamprya noctiluca*) bajo el control del promotor de la quimoquina CCL20 ((Nempont *et al.*, 2008). CCL20 es una quemoquina atrayente de células dendríticas y en menor medida de macrófagos y es muy importante tanto en la respuesta inmune intestinal como en la formación del epitelio y tejidos linfoides asociados a mucosas. Este sistema permite modelar la interacción microorganismo-epitelio que involucra patrones estructurales característicos conocidos como PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) aunque no son privativos de microorganismos patógenos. Las células se cultivaron en placas de 48 pocillos en una concentración de 3,5x10⁴ células/ml con medio DMEM con 10% SFB (GIBCO, Life Technologies) durante 1 semana a 37°C en un atmósfera de 5% CO₂, previo a la realización del ensayo.

☀ II.3 Evaluación de la expresión de moléculas de superficie

La determinación de la expresión de moléculas de superficie se evaluó utilizando células THP-1 diferenciadas con PMA (THP-1PMA) (200 nM) por 48 horas, y además para la molécula HLA-DR, y para los receptores CD64 Y CD206 también se utilizaron células THP-1 sin la diferenciación con PMA.

En ambas condiciones, se incubaron las células (en placa de 24 pocillos) con las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 MDI 10 y acenocumarol en una concentración final de 471 μ M, junto con los estímulos positivos (Tabla II.1). Las incubaciones se realizaron durante 18 horas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂.

Tabla II.1 Concentraciones de uso y marca de los estímulos positivos empleados para cada molécula de superficie en células THP-1

Molécula	Estímulo positivo	Concentración de uso	Marca
HLA-DR	IFN - γ	375 ng/ml	THERMO Scientific, USA
TLR-2	<i>Staphylococcus aureus</i> no viable		
CD64 CD16 CD23	IFN - γ + LPS	375 ng/ml + 0,5 μ g/ml	Sigma (LPS)
CD206 CD163	IL-4	9 ng/ml	Línea celular productora J588L

Luego de la incubación mencionada anteriormente se continuo con el siguiente protocolo de marcación:

Se desprendieron las células de la placa de cultivo con scraper y se trasvasaron a tubos de citómetro, para proceder a su lavado con PBS (3 veces). Se realizó otro lavado con 250 μ l de PBS con 1% suero fetal bovino (SFB), descartando el sobrenadante. Posteriormente, se agregaron 20 μ l de PBS con 20 % suero humano inactivado (SHI) 30 minutos a 50°C, incubando a 4°C por 15 minutos. Se realizó otro lavado con 200 μ l de PBS 10 % SFB y se agregó el volumen de anticuerpo correspondiente (HLA-DR 10 μ l, TLR-2 10 μ l,

CD64 20 μ l, CD16 10 μ l, CD23 20 μ l, CD206 10 μ l, CD163 5 μ l), o su isotipo. La incubación con el anticuerpo se realizó a 4°C en oscuridad durante 20 minutos. Se realizó un lavado con PBS y se agregó 250 μ l de PFA 1 % a cada tubo, de manera de conservar correctamente la marcación hasta la determinación por citometría de flujo. El Índice de Expresión (IE) de cada marcador se calculó como la multiplicación entre el porcentaje de células positivas y la media del histograma.

II.4 Estudio de viabilidad

El estado de las células luego de 18 horas de incubación con bacterias puede verse afectado, por lo que en todos los ensayos se analizó la viabilidad celular por exclusión de yoduro de propidio. Luego de cada adquisición, se realizó una segunda determinación tras el agregado de yoduro de propidio (IP) a concentración final 1 μ g/ml. Este agente se intercala en el ADN de aquellas células que sufrieron alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática, diferenciando así las células necróticas o apoptóticas de aquellas con las envolturas celulares intactas.

II.5 Evaluación de la respuesta celular en células HT-29 NF-kB GFP

Para el armado de la placa de cultivo, se realizó una suspensión de células en RPMI 10% SFB de manera tal de colocar $1,25 \cdot 10^5$ células en 500 μ l por pocillo en placa de 24.

En estas condiciones, se incubó la placa durante 48 horas en estufa a 37°C en atmósfera de 5% CO₂, para que las células estén completamente adheridas.

Antes de la estimulación con las bacterias y acenocumarol, se lavaron las células dos veces con PBS, se agregaron a todas las fosas el medio RPMI con 10% SFB con TNF- α (concentración final 10 ng/ml) excepto en las fosas de control basal.

Posteriormente, se agregaron las cepas CIDCA 5310 o CIDCA 5317 con una MDI de 10 y acenocumarol 471 μ M. El tiempo de incubación en estufa a 37°C en atmósfera con 5% CO₂ fue de 18 horas. Luego de la incubación, se lavaron las células con PBS y se desprendieron con tripsina para trasvasarlas a tubos de citómetro.

Además de la evaluación de la expresión de NF-κB, se controló por citometría de flujo la viabilidad celular mediante tinción con yoduro de propidio, tal como se detalla en el punto II.4.

☀ II.6 Evaluación de la respuesta celular en células Caco 2 CCL20: LUC.

Las células epiteliales se crecieron en placa de 48 pocillos como se indicó en el punto II.2. Al momento del ensayo, se cambió el medio a las células y se pre-incubaron con las cepas CIDCA 5310 o CIDCA 5317 con una MDI de 10 y acenocumarol. El tiempo de incubación fue de 18 horas en estufa a 37°C en atmósfera con 5% CO₂.

Posteriormente, las células fueron estimuladas con flagelina de *Salmonella enterica ser. Typhimurium* (FliC) concentración final 1 µg/ml, por 5 horas en presencia de las bacterias y acenocumarol en estufa a 37°C en atmósfera con 5% CO₂.

Se removió el sobrenadante y se colocaron 150 µl del buffer de lisis CCLR (Cell Culture Lysis Reagent) (Tris-fosfato 25mM, DTT2mM, ácido tetra acético 1,2-diaminociclohexano, 10% glicerol y 1% Tritón X-100) del kit comercial Luciferase Assay Systems (Promega Co., USA) por pocillo y se homogeneizó con la pipeta tratando de evitar la formación de espuma.

Una vez lisadas las células se procedió a realizar la medición con el luminómetro.

El mismo protocolo se realizó sin la estimulación con flagelina.

Medida de la actividad luciferasa:

Se colocó en un tubo de luminometría 40 µl del reactivo LAR (Luciferase Assay Reagent), perteneciente al kit comercial Luciferase Assay Systems (Promega Co., USA) y se agregaron 8 µl del lisado a medir.

Se tomó la medida con un luminómetro Labsystems Luminoskan TL Plus luminometer (ThermoScientific, USA) obteniendo el valor de expresión de la luciferasa.

Los resultados se expresaron como se muestra a continuación:

$$\text{Porcentaje de luminiscencia normalizado (\%LN)} = \frac{\text{Valor de la muestra} \times 100}{\text{Valor control positivo estimulado con flagelina}}$$

☀ II.7 Estudio de la respuesta celular en un sistema de co-cultivo

Para los ensayos de co-cultivo se emplearon las células THP-1 diferenciadas con PMA (THP-1PMA) sembradas sobre una placa de 24 pocillos como se explicó en el punto II.2. Además se emplearon insertos donde se sembraron las células epiteliales HT-29 NF- κ B GFP en una concentración de $2,5 \times 10^5$ células por inserto. Los dos tipos de células se sembraron y se incubaron por separado durante 48 horas hasta el momento de juntarlas para realizar el ensayo de co-cultivo. Debajo del inserto, en esas 48 horas, se colocaron 500 μ l del mismo medio de manera de mantenerlo hidratado.

En el sistema utilizado, las células THP-1PMA están entonces en la parte inferior y los insertos contienen las células epiteliales. Las bacterias (MDI: 10), el LPS (0,5 μ g/ml) y el acenocumarol (471 μ M) se agregaron sobre las células HT-29 NF- κ B presentes sobre el inserto. Una vez que se agregaron todos los estímulos, la placa se dejó incubando en estufa a 37°C 5% CO₂ por 18 horas.

Posteriormente, se lavaron ambas células con PBS y se desprendieron con tripsina-EDTA (0,25%) (Life Technologies) en el caso de las HT-29 NF- κ B, y con *scraper* en el caso de las células THP-1. Las células HT-29 NF- κ B se trasvasaron a tubos de citómetro estando ya listas para la determinación por citometría de flujo. Las células THP-1 se trasvasaron a tubos de citómetro y se procedió a realizar el protocolo de marcación explicado anteriormente en este capítulo (Inciso II.3).

En los experimentos de co-cultivo se marcaron las células con HLA-DR y con CD86.

☀ II.8 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar. Las diferencias significativas fueron establecidas mediante test t de Student ($p < 0,05$).

☀ Bibliografía

Mastropietro, G. *et al.* (2015) 'HT-29 and Caco-2 reporter cell lines for functional studies of nuclear factor kappa B activation', *Mediators of Inflammation*, 2015. doi: 10.1155/2015/860534.

Nempont, C. *et al.* (2008) 'Deletion of Flagellin's Hypervariable Region Abrogates Antibody-Mediated Neutralization and Systemic Activation of TLR5-Dependent Immunity', *The Journal of Immunology*, 181(3), pp. 2036–2043. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.2036.

Sharpe, M. R. (1960) 'A readily prepared medium for the cultivation of the lactobacilli', *Journal of bacteriology*, 51, p. 560. doi: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x

RESULTADOS

En el presente capítulo se describen los resultados obtenidos de la medida de la expresión de moléculas de superficie en células THP-1 con y sin diferenciación previa con PMA, incubadas por 18 horas con las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 y acenocumarol, estudiado además en un sistema de co-cultivo con células epiteliales. Asimismo, se evaluaron las respuestas celulares en dos sistemas reporteros tratados bajo las mismas condiciones.

EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE SUPERFICIE EN CÉLULAS THP-1

La importancia de la medida de la expresión de HLA-DR en macrófagos no sólo radica en su relación con la presentación de antígenos, sino también en la capacidad de desencadenar vías de señalización que determinan la función de esa célula. La expresión de HLA-DR en la superficie celular indica la activación celular, generando la secreción de citoquinas que influirán en la diferenciación de las células fagocíticas en los perfiles M1 (inflamatorio) y M2 (regulador), motivo por el cual, en el presente capítulo se estudiaron la expresión de moléculas de superficie relevantes en contextos de polarización hacia macrófagos M1 (CD64, CD16) o M2 (CD206, CD163, CD23) en presencia de las cepas CIDCA 5310, CIDCA 5317 y acenocumarol.

II.1 Expresión de HLA-DR en células THP-1PMA.

La expresión de HLA-DR (indicada como índice de expresión (IE)), al incubar las células 18 horas con las cepas CIDCA 5310 (IE: $894,75 \pm 1,80$) y CIDCA 5317 (IE: $1849,80 \pm 81,39$) fue significativamente mayor ($P < 0,05$) que el control sin estimular (IE: $236,36 \pm 8,47$) (**Figura II.1**). Por otra parte, cuando las células fueron incubadas en presencia de IFN- γ y la cepa CIDCA 5317 (IE: $1523,29 \pm 32,90$) se observó una expresión similar al control con IFN- γ (IE: $1661,19 \pm 111,34$) (**Figura II.1**), mas la incubación de las células en presencia de IFN- γ y la cepa CIDCA 5310 mostró la mayor expresión de HLA-DR (IE: $4491 \pm 318,87$) (**Figura II.1**).

Cuando se incubaron las células con IFN- γ en presencia del fármaco, acenocumarol (AC) con una concentración final $471 \mu\text{M}$, se observó una disminución significativa de la

expresión de HLA-DR mostrando un IE: $1155,2 \pm 275,97$ para las células estimuladas solo con IFN- γ y un IE: $79,28 \pm 10,45$ para las muestras con IFN- γ y acenocumarol (**Figura II.2**). Esta disminución observada en presencia del anticoagulante también se pudo observar cuando las células fueron incubadas con IFN- γ y cualquiera de las dos cepas estudiadas. Así pues, las células estimuladas en presencia de CIDCA 5310 mostraron un valor de IE: $2664,53 \pm 346,15$ mientras que en presencia de acenocumarol fue de IE: $196,33 \pm 13,67$; asimismo la presencia de la cepa CIDCA 5317 mostró un valor de expresión IE: $847,03 \pm 53,20$ que disminuyó en presencia del anticoagulante IE: $79,09 \pm 10,75$ (**Figura II.2**).

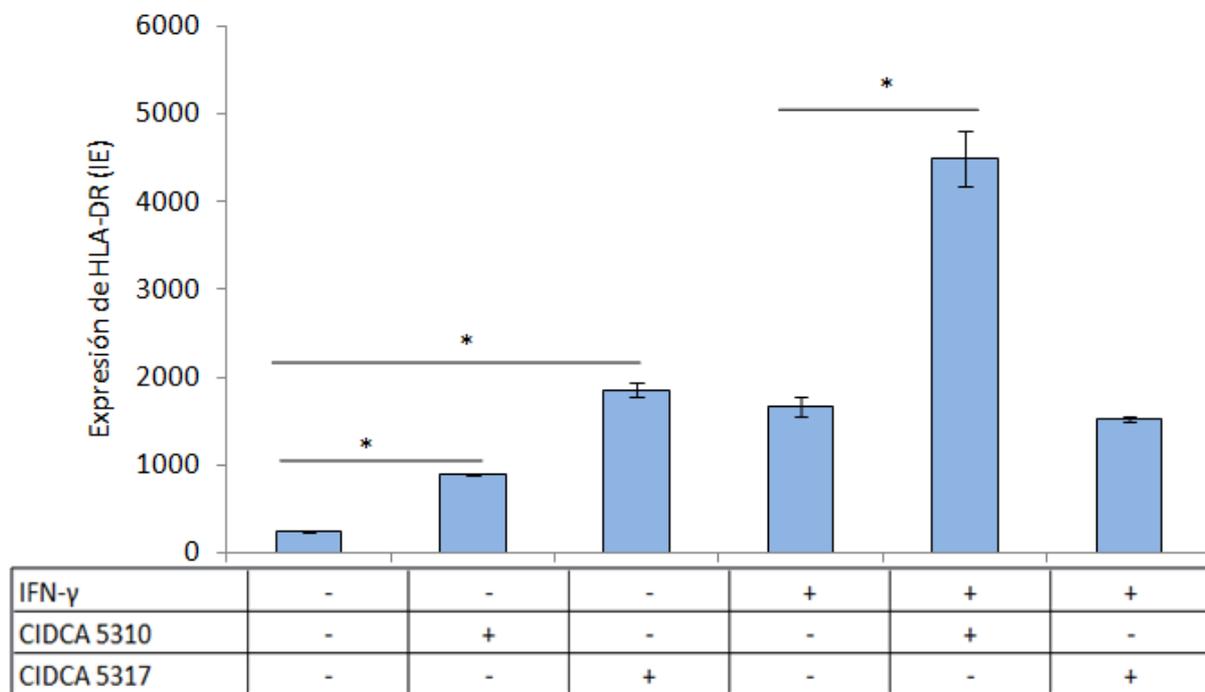


Figura II.1 Expresión de HLA-DR, indicado como índice de expresión (IE), en células THP-1 PMA bajo distintos estímulos, luego de 18 horas de incubación (* $P < 0,05$).

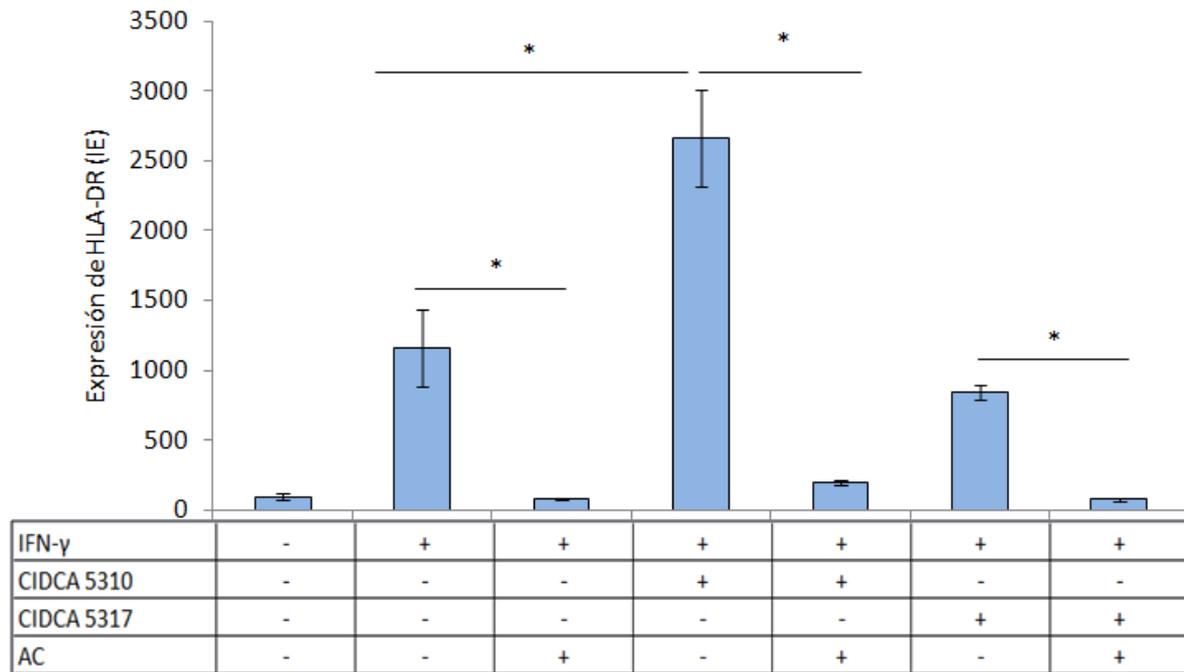


Figura II.2 Expresión de HLA-DR, indicada como índice de expresión (IE) en células THP-1 PMA bajo distintos estímulos, luego de 18 horas de incubación (* $P < 0,05$).

☀ II.2 Expresión de TLR2

Los receptores tipo TLR consisten en una familia de receptores de reconocimiento de patrones que detectan motivos moleculares conservados en microorganismos y entes biológicos como los virus. De esta manera, estos receptores son capaces de reconocer a los microorganismos tanto patógenos como comensales y desencadenar una respuesta.

Considerando lo antedicho, en el presente capítulo se estudió la expresión del receptor tipo Toll 2 (TRL2), cuyos ligandos, como el ácido lipoteicoico, se encuentran en la pared celular de las bacterias Gram positivas como las bifidobacterias. Se evaluó en células THP-1PMA estimuladas con CIDCA 5310, CIDCA 5317 y acenocumarol durante 18 horas.

Las células estimuladas con bifidobacterias expresaron altos niveles de TRL2 aunque no se encontraron diferencias entre ambas cepas. Los valores indicados como índice de expresión (IE) fueron $1832,05 \pm 268,1$ para la cepa CIDCA 5310 y $1689,41 \pm 99,36$ para la cepa CIDCA 5317 (**Figura II.3**). Estos valores no mostraron diferencias significativas con aquellos resultados obtenidos al estimular las células con *Staphylococcus aureus* (IE: $1401,21 \pm 4,3$), utilizado como control de la expresión de TLR2.

Por otro lado, la presencia de acenocumarol disminuyó significativamente ($P < 0,05$) la expresión del receptor en todas las condiciones evaluadas (**Figura II.3**).

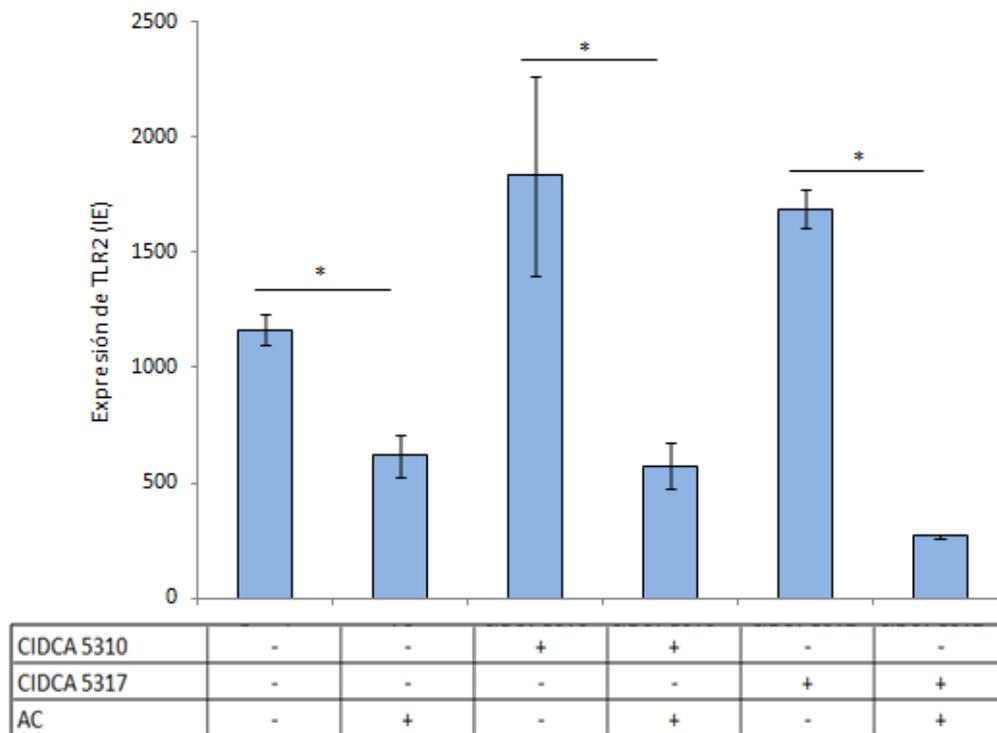


Figura II.3 Expresión de TLR2, indicada como índice de expresión (IE), en células THP-1PMA luego de 18 horas de incubación (* $P < 0,05$)

☀ II.3 Expresión de moléculas de superficie CD64 y CD16.

Los receptores CD64 (Fc γ I) y CD16 (Fc γ III), pertenecen a la familia de receptores de Fc para IgG, los cuales están ampliamente distribuidos en células efectoras del sistema inmune como son macrófagos, neutrófilos, y células NK.

En macrófagos bajo la activación llamada clásica o M1, cuya principal función es la eliminación del microorganismo o la generación de un ambiente inflamatorio, se observa la expresión de las moléculas de superficie mencionadas.

Por lo tanto, en este punto, se evaluó la expresión de CD16 y CD64 en células THP-1PMA estimuladas con CIDCA 5310, CIDCA 5317 y acenocumarol en presencia de IFN- γ y lipopolisacárido (LPS), durante 18 horas.

→ Expresión del receptor CD16 en células THP-1PMA.

Como resultado de la incubación de las células con las bifidobacterias, se observó un aumento significativo ($P < 0,05$) de la expresión del receptor CD16 en presencia de la cepa CIDCA 5310 (IE: $10795,033 \pm 863,27$) respecto al control estimulado con IFN- γ y LPS (IE: $5457,86 \pm 400,19$). Sin embargo, en presencia de la cepa CIDCA 5317 no hubo incremento de la expresión. Además, la presencia del anticoagulante generó un aumento significativo ($P < 0,05$) de la expresión de este receptor en todas las condiciones evaluadas, respecto a sus correspondientes controles (**Figura II.4**).

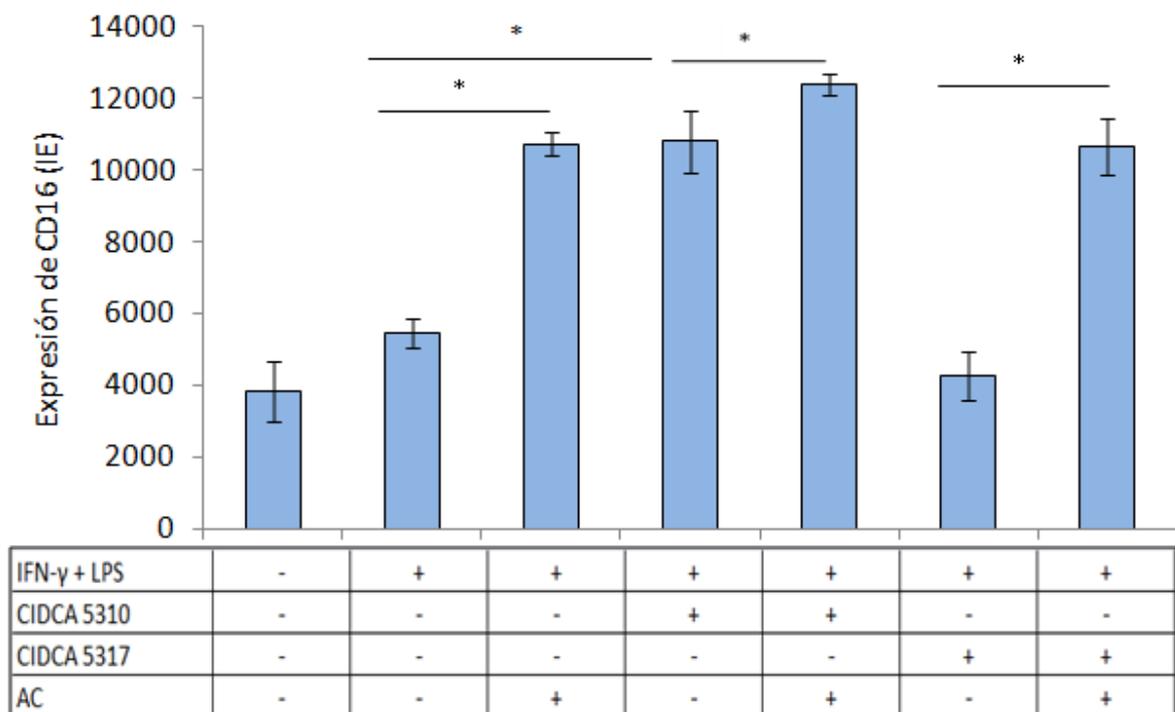


Figura II.4 Expresión del receptor CD16, indicado como índice de expresión (IE), en células THP-1PMA luego de 18 horas de incubación (* $P < 0,05$).

→ Expresión del receptor CD64 en células THP-1PMA.

Respecto a la expresión del receptor CD64, se observó que en presencia de CIDCA 5317 disminuyó significativamente ($P < 0,05$), respecto al control estimulado con IFN- γ y LPS, asimismo la cepa CIDCA 5310 mostró una tendencia ($P = 0,06$) a disminuir la expresión de este marcador. Además, la presencia del anticoagulante disminuyó la expresión de este receptor, en todas las condiciones evaluadas (**Figura. II.5**).

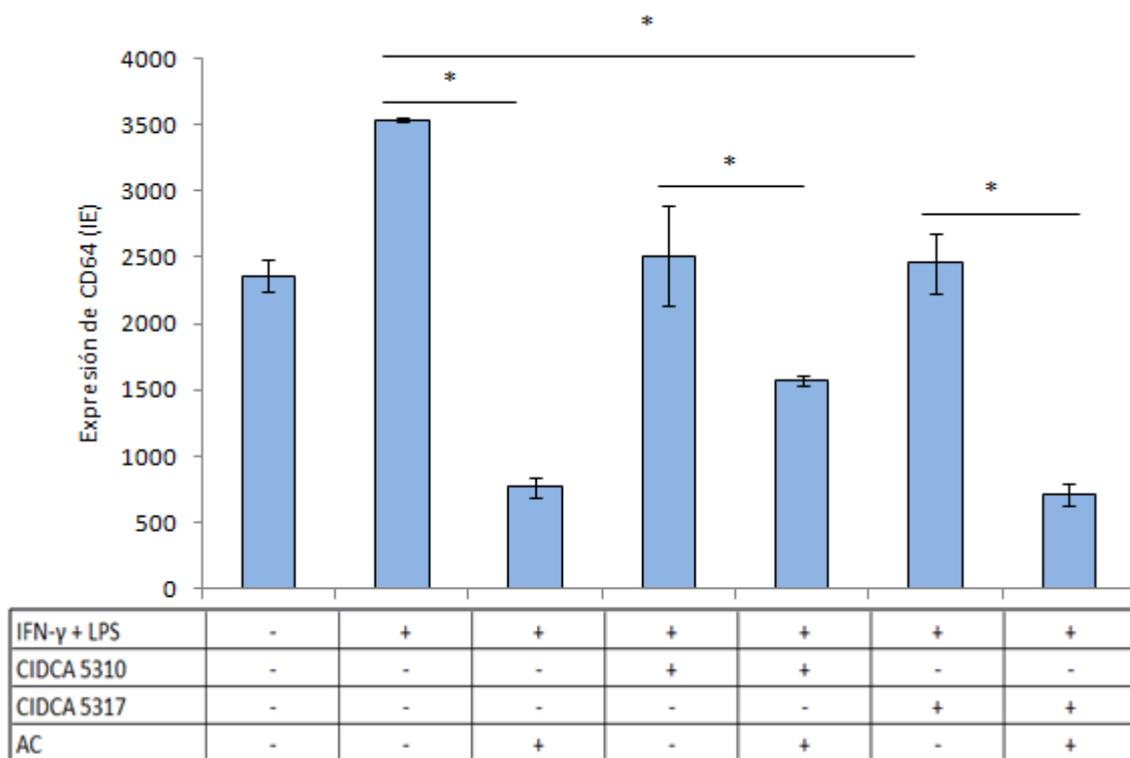


Figura II.5 Expresión de CD64, indicado como índice de expresión (IE), en células THP-1PMA luego de 18 horas de incubación ($*P < 0,05$)



II.4 Expresión de las moléculas CD163, CD206 y CD23

Los receptores tipo scavenger CD163, el receptor de manosa CD206 y el receptor de baja afinidad por IgE CD23 son receptores que cumplen un rol importante en la homeostasis inmune, expresándose en los macrófagos llamados M2 o reguladores, bajo la estimulación de IL-4. Por lo tanto, con el fin de indagar el perfil de macrófago presente en células THP-1PMA estimuladas con CIDCA 5310, CIDCA 5317 y acenocumarol durante 18 horas, se determinó posteriormente la expresión de estas moléculas.

→ Expresión del receptor CD163 en células THP-1PMA.

La determinación de la expresión del receptor CD163, indicado como índice de expresión (IE), dio como resultado un aumento significativo tanto en presencia de CIDCA 5310 (IE: $4740,94 \pm 272,40$) como de CIDCA 5317 (IE: $4613,41 \pm 285,38$) respecto al control estimulado con IL-4 (IE: $3982,77 \pm 153,01$). Asimismo, la presencia de acenocumarol aumentó de manera significativa ($P < 0,05$) la expresión de este receptor (IE: $4332,82 \pm 81,51$). Sin embargo, no modificó los valores de IE obtenidos en las condiciones estimuladas con las bacterias (**Figura II. 6**).

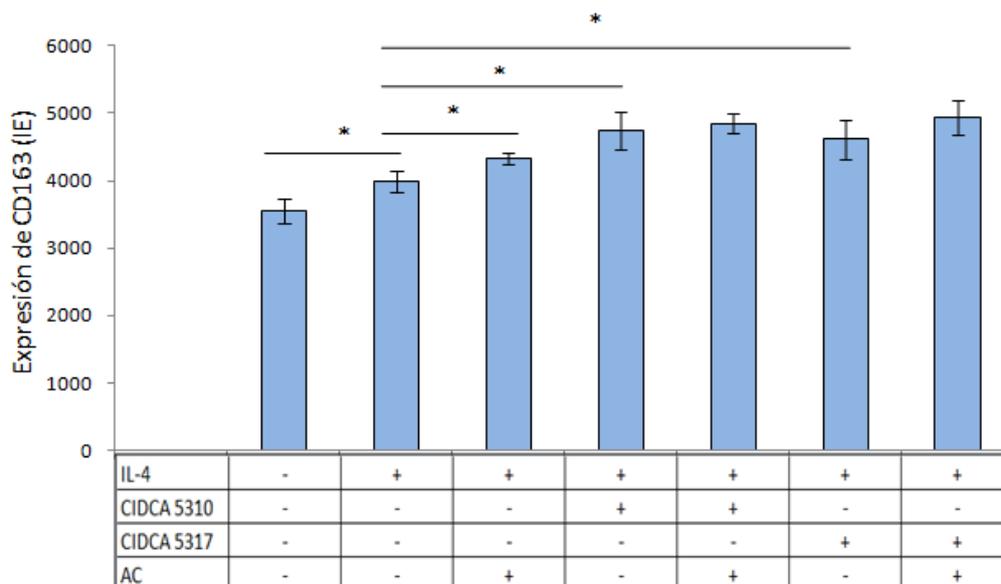


Figura II.6 Expresión del receptor CD163, indicado como índice de expresión (IE), en células THP-1PMA luego de 18 horas de incubación con diferentes estímulos (* $P < 0,05$).

→ Expresión del receptor CD206 en células THP-1PMA.

Como resultado de la determinación de la expresión del receptor CD206, se observó una disminución significativa ($P < 0,05$) de la expresión en presencia de acenocumarol (IE: $115,82 \pm 21,61$), respecto al control con IL-4 (IE: $265,78 \pm 83,73$). Sin embargo, la presencia de la cepa CIDCA 5310, tanto en ausencia como en presencia de acenocumarol generó un aumento significativo de la expresión del receptor. Paralelamente, la cepa CIDCA 5317 no mostró cambios en la expresión del receptor CD206 aún con acenocumarol (**Figura II.7**).

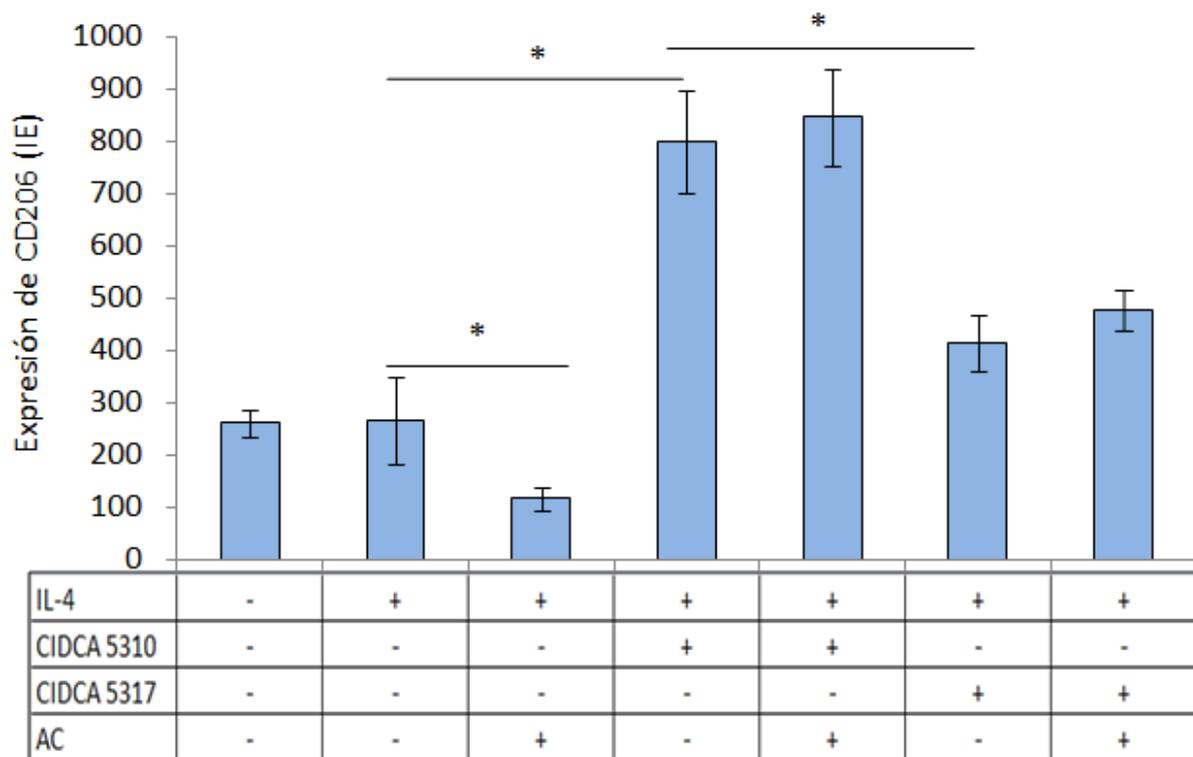


Figura II.7 Expresión del receptor CD206, indicado como índice de expresión (IE), en células THP-1 PMA durante 18 horas de incubación con diferentes estímulos (* $P < 0,05$)

→ Expresión del receptor CD23 en células THP-1PMA

La determinación de la expresión del receptor CD23, dio como resultado una disminución significativa de la expresión en presencia de las cepas CIDCA 5310, CIDCA 5317 o acenocumarol, respecto al control estimulado solo con IL-4. Además, el anticoagulante, disminuyó significativamente la expresión del receptor en presencia de la cepa CIDCA 5310 (Figura II.8).

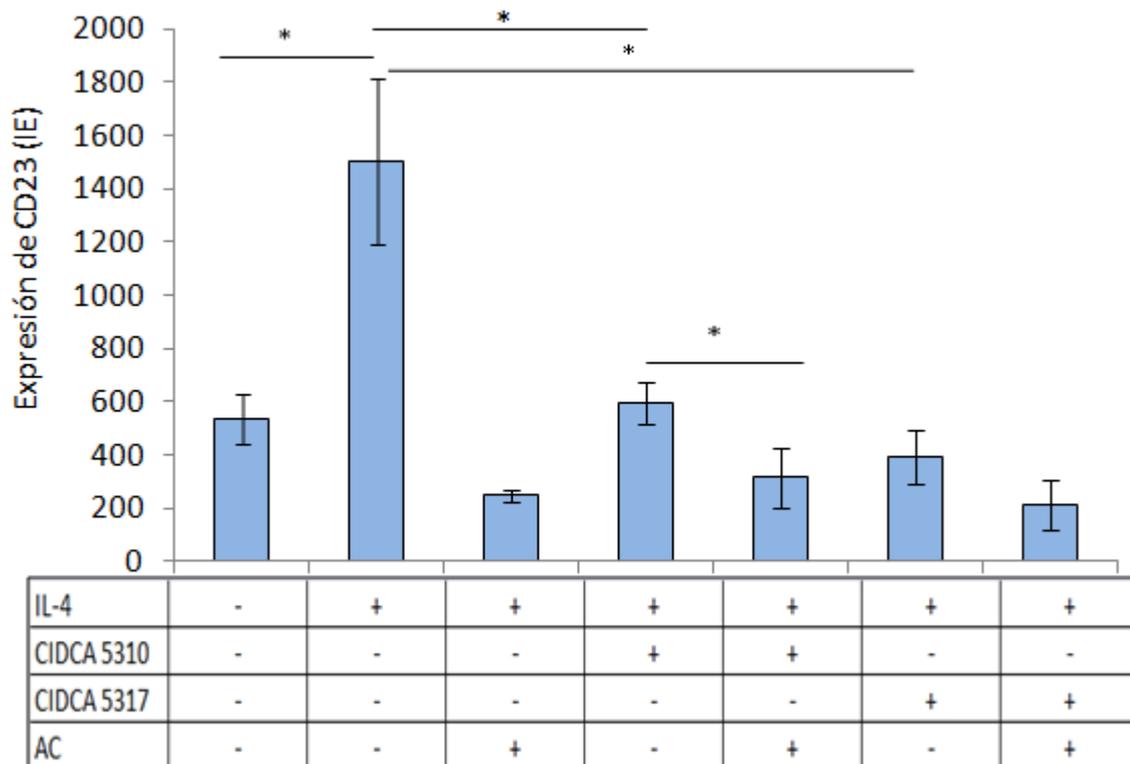


Figura II.8 Expresión de CD23, indicado como índice de expresión (IE), en células THP-1PMA durante 18 horas de incubación con diferentes estímulos (*P<0,05)



II.5 Expresión de moléculas de superficie en células THP-1 en ausencia de PMA

A partir de los resultados de la expresión de moléculas de superficie expuestos anteriormente, se decidió determinar el comportamiento de estas moléculas en células THP-1 no diferenciadas con PMA. Esto surgió como consecuencia de observar una alta expresión de estas moléculas en las células THP-1 diferenciadas con PMA y no estimuladas. El aumento en la expresión de moléculas de superficie en células diferenciadas con PMA, fue descrito por Tedesco et al (Tedesco *et al.*, 2018).

Por lo tanto, se evaluó la expresión de HLA-DR, CD64 y CD206 en células no diferenciadas previamente con PMA y estimuladas durante 18 horas con las cepas CIDCA 5310, CIDCA 5317, acenocumarol y el estímulo positivo que corresponda según la molécula (IFN- γ , LPS o IL-4). De esta manera, se buscó evaluar a las bacterias y el anticoagulante como estímulos sin la presencia de PMA.

→ Expresión de HLA-DR

La determinación de la expresión de HLA-DR en células THP-1 estimuladas con IFN- γ , las bifidobacterias y acenocumarol, mostró el mismo resultado que la expresión determinada a partir de células diferenciadas con PMA.

La presencia del anticoagulante mostró un descenso significativo de la expresión de HLA-DR en todas las condiciones ensayadas. Además, se observó una vez más, como CIDCA 5310 es capaz de aumentar significativamente ($P < 0,05$) la expresión de esta molécula (IE: $61665 \pm 131,52$), respecto al control con IFN- γ (IE: $6959,35 \pm 46,44$) (**Figura II.9**).

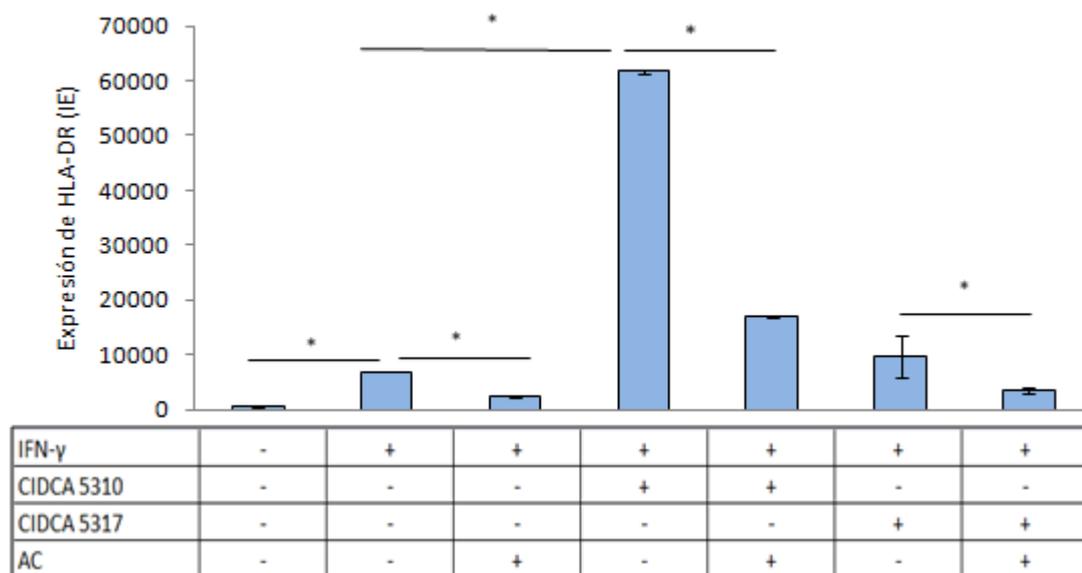


Figura II.9 Expresión de HLA-DR, indicado como índice de expresión (IE), en células THP-1 sin diferenciar con PMA, incubadas durante 18 horas con distintos estímulos (* $P < 0,05$)

→ Expresión del receptor CD64.

El efecto del acenocumarol sobre la expresión del receptor CD64, fue similar al obtenido en la determinación de la expresión en células diferenciadas con PMA. Sin embargo, no se observó efecto de las bacterias sobre la expresión de dicho receptor (**Figura II.10**).

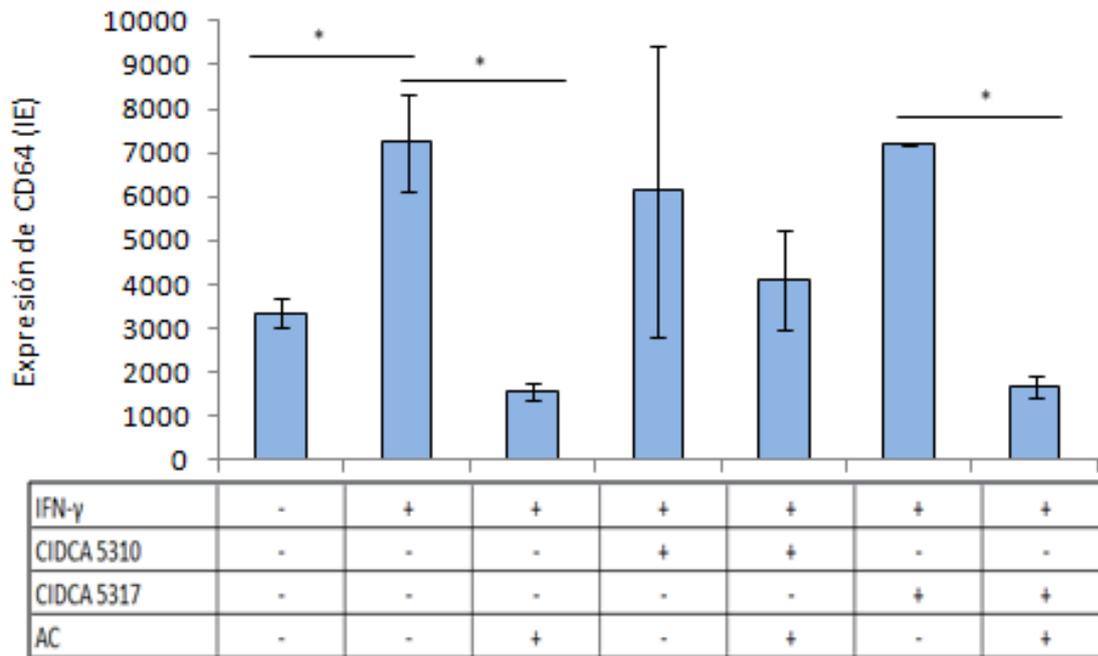


Figura II.10 Expresión del receptor CD64, indicado como índice de expresión (IE), en células THP-1 sin diferenciadas con PMA, incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos (*P<0,05)

→ Expresión del receptor CD206

La estimulación con acenocumarol junto con IL-4, generó un aumento significativo ($P < 0,05$) de la expresión del receptor CD206 (IE: $175,21 \pm 2,90$), respecto a las células estimuladas en ausencia del anticoagulante (IE: $58,65 \pm 18,65$) (**Figura II.11**).

Respecto a la diferenciación con las bifidobacterias, la mayor expresión del receptor CD206 se observó bajo la estimulación con la cepa CIDCA 5310 (IE: $2921,89 \pm 32,00$), respecto al control sin la bacteria (IE: $1630,85 \pm 29,49$) (**Figura II.12**). Asimismo, la presencia de acenocumarol junto con la cepa CIDCA 5310 generó una disminución significativa de la expresión del receptor en estudio (IE: $1914,55 \pm 87,36$) respecto a la condición sin el anticoagulante (IE: $2921,89 \pm 32,00$) (**Figura II.12**).

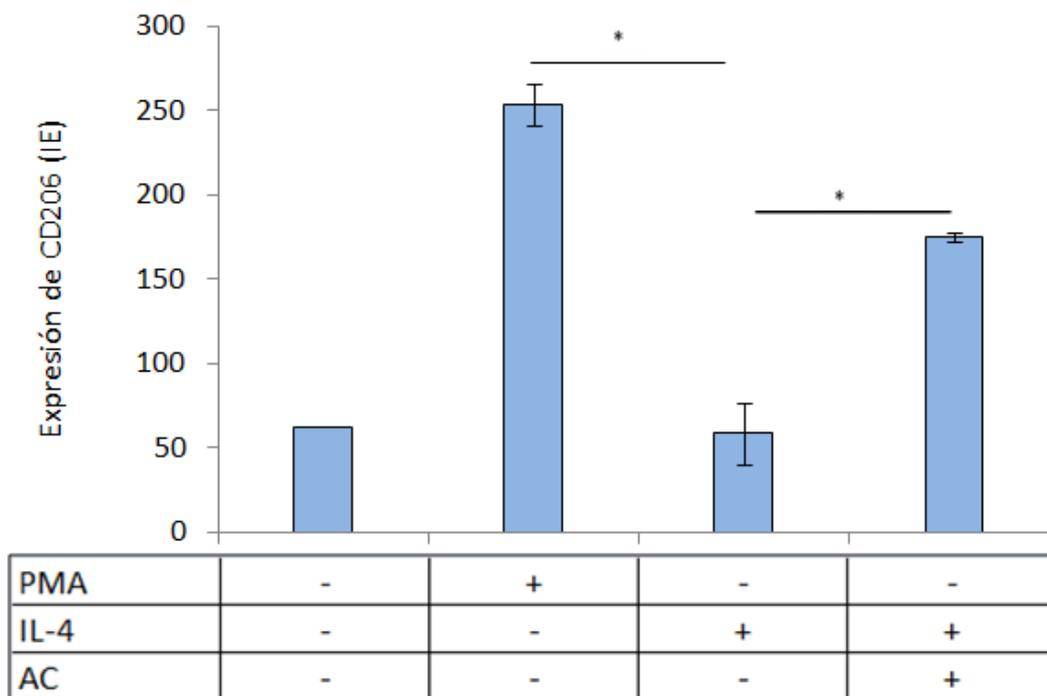


Figura II.11 Expresión del receptor CD206, indicado como índice de expresión (IE), en células THP-1 incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos (* $P < 0,05$)

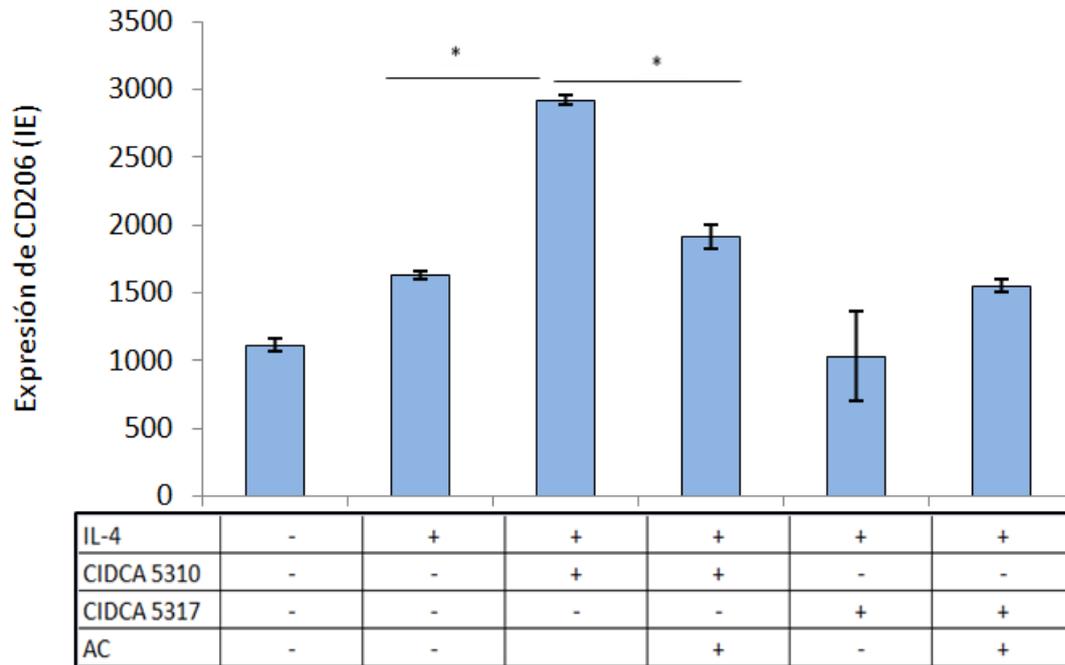


Figura II.12 Expresión del receptor CD206, indicado como índice de expresión (IE), en células THP-1 sin diferenciar con PMA, luego de 18 horas de incubación con diferentes estímulos (* $P < 0,05$)

Efecto de bifidobacterias en dos sistemas reporteros

II.6 Expresión NF-κB

En la **figura II.13** se observan los resultados de la expresión de NF-κB luego de 18 horas de estimulación con TNF-α, CIDCA 5310, CIDCA 5317 y acenocumarol.

Se puede notar la mayor expresión de NF-κB cuando las células fueron estimuladas con CIDCA 5317 (% FL1: 38,95 ± 2,62), respecto al control estimulado sólo con TNF-α (% FL1: 25,5 ± 2,26); en cambio no hay diferencia cuando se incluye el AC junto con la cepa. Aunque individualmente el acenocumarol o CIDCA 5310 no disminuyeron la expresión de NF-κB, la incubación conjunta de la bifidobacteria y el anticoagulante la disminuyó significativamente ($P < 0,05$) (Figura II.13).

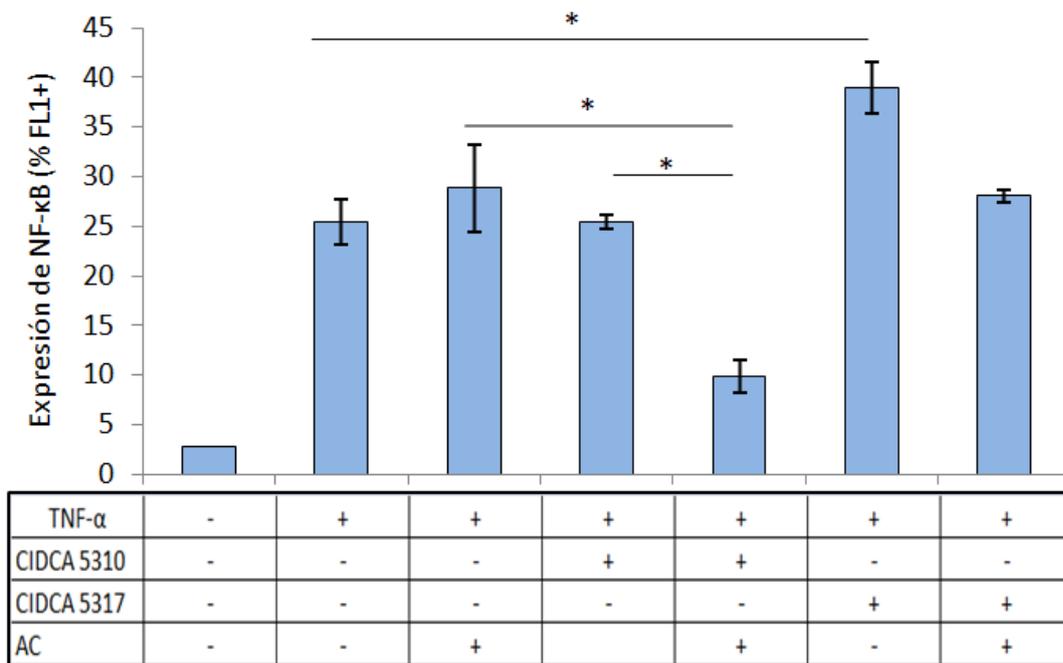


Figura II.13 Expresión de NF-κB, en células HT-29 NF-κB GFP incubadas durante 18 horas con distintos estímulos (* $P < 0,05$). Se expresa como porcentaje de células FL1 positivas.



II.7 Expresión de CCL20

La expresión génica de la quemoquina CCL20 puede inducirse por varios factores microbianos como LPS, flagelina, y también por citoquinas inflamatorias como IFN- γ o TNF- α . Debido a que la inducción de la expresión se genera bajo condiciones inflamatorias, la determinación de la expresión de esta quemoquina bajo la estimulación con CIDCA 5310, CIDCA 5317, acenocumarol y flagelina contribuyó a dilucidar el efecto de las bacterias y el fármaco en este sistema.

En la **figura II.14** se pueden observar los resultados de la expresión de CCL20, obtenidos luego de 18 horas de estimulación con las bacterias y acenocumarol y 5 horas de estimulación con flagelina (FLIC). Los resultados se expresaron como el porcentaje del valor obtenido en cada condición respecto al control positivo estimulado sólo con flagelina.

En el análisis de los resultados, se destaca la mayor expresión de CCL20 al estimular las células con acenocumarol, siendo significativamente mayor que el control positivo incubado sólo con flagelina (**Figura II.14**). En este sentido, también se observó que ambas bacterias son capaces de disminuir de manera significativa ($P < 0,05$) el aumento de expresión generado por la estimulación con acenocumarol.

Además, se observó que la presencia de CIDCA 5310 logró disminuir significativamente la expresión de esta quemoquina, respecto a la condición con flagelina.

Por otro lado, se realizó otro experimento en las mismas condiciones, excepto que no se incubó posteriormente con flagelina, con el objetivo de observar el efecto generado sólo por la estimulación con las bacterias y acenocumarol. En la **figura II.15**, se observa que en ausencia de flagelina, ni las bacterias ni el acenocumarol estimulan la expresión de esta quemoquina.

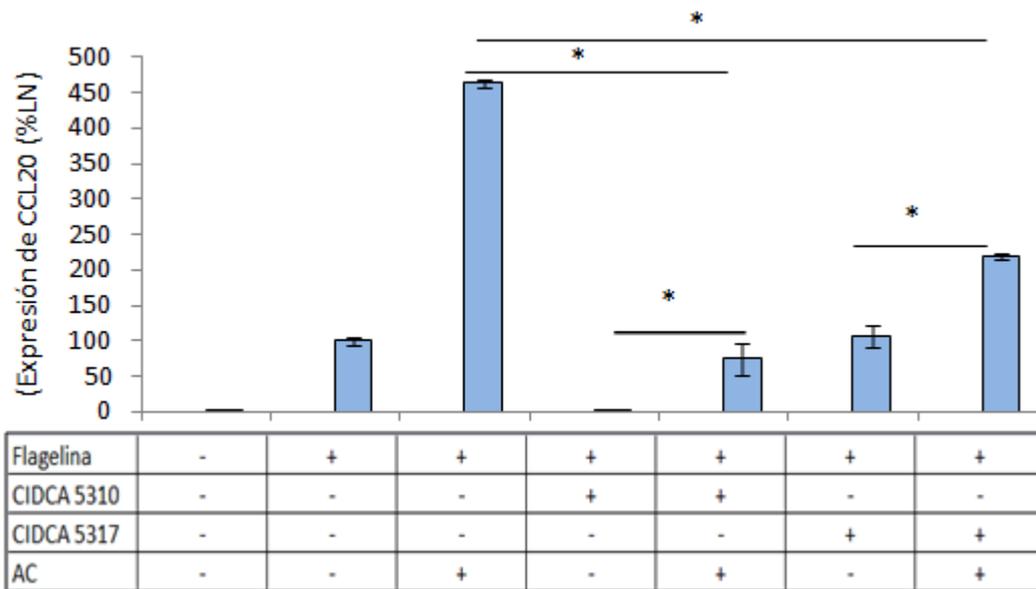


Figura II.14 Expresión de CCL20, indicado como porcentaje de luminiscencia normalizado, en células Caco-2 CCL20:LUC, incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos (*P < 0,05).

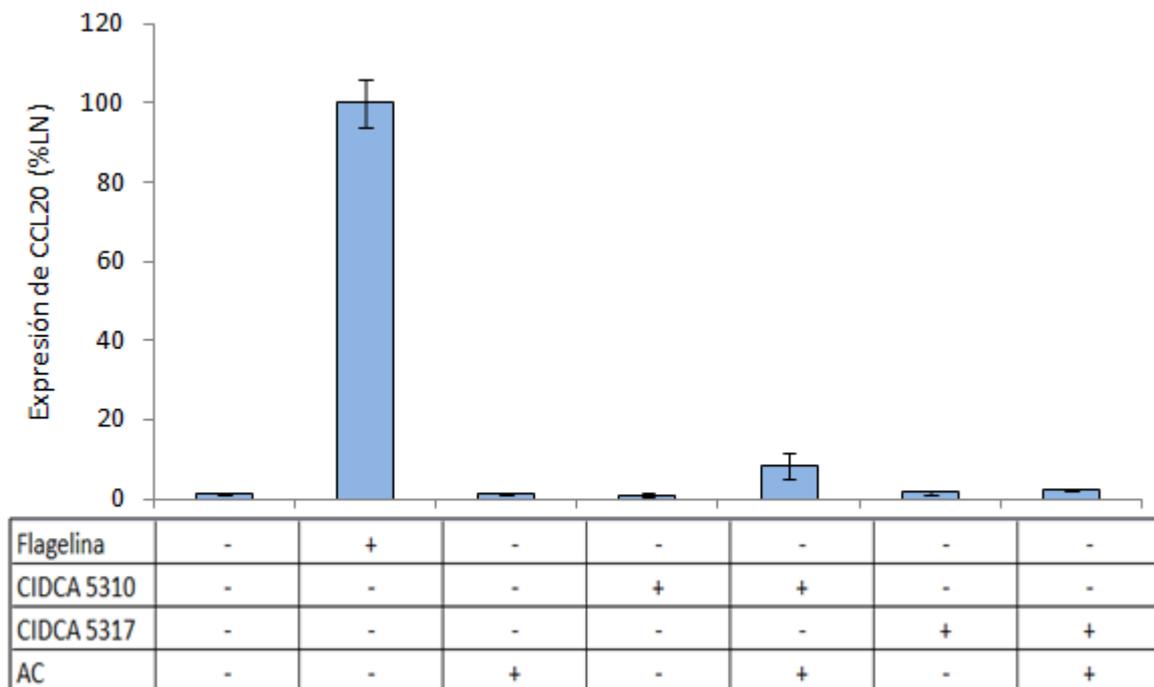


Figura II.15 Expresión de CCL20, indicado como porcentaje de luminiscencia normalizado, en células Caco-2 CCL20:LUC, incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos (*P < 0,05).

ENSAYO EN SISTEMA DE CO-CULTIVO.

Dado que la respuesta involucra el diálogo de diferentes poblaciones celulares, se introdujo el sistema de co-cultivo para refinar el análisis. Se realizaron ensayos con insertos, donde se colocaron células de epitelio intestinal humano (línea celular HT-29 NF- κ B GFP) y debajo, sobre la placa de cultivo, se colocaron macrófagos (línea células THP-1PMA).

Se realizó la estimulación con CIDCA 5310, CIDCA 5317, acenocumarol y LPS desde el inserto, es decir sobre las células epiteliales. A partir de incubaciones durante 18 horas se determinó la expresión de NF- κ B en las células HT-29 reporteras y la expresión de HLA-DR y CD86 en las células THP-1PMA.

II.8 Expresión de NF- κ B en células HT-29 en sistema de co-cultivo con células THP-1.

Se determinó el efecto de la estimulación con LPS, las bacterias y acenocumarol midiendo la expresión de NF- κ B, en una línea celular reportera.

Como resultado, se observó que las incubaciones realizadas tanto con CIDCA 5310 como con CIDCA 5317 fueron capaces de disminuir de manera significativa ($P < 0,05$) la expresión de NF- κ B generada por el LPS. A su vez, la presencia de acenocumarol también disminuyó la expresión generada por el LPS.

Por otro lado, la incubación solamente con acenocumarol generó una alta expresión de NF- κ B (% FL1: $31,7 \pm 1,27$), la cual pudo ser disminuida significativamente por la cepa CIDCA 5310 (% FL1: $1,46 \pm 0,63$) (**Figura II.16**).

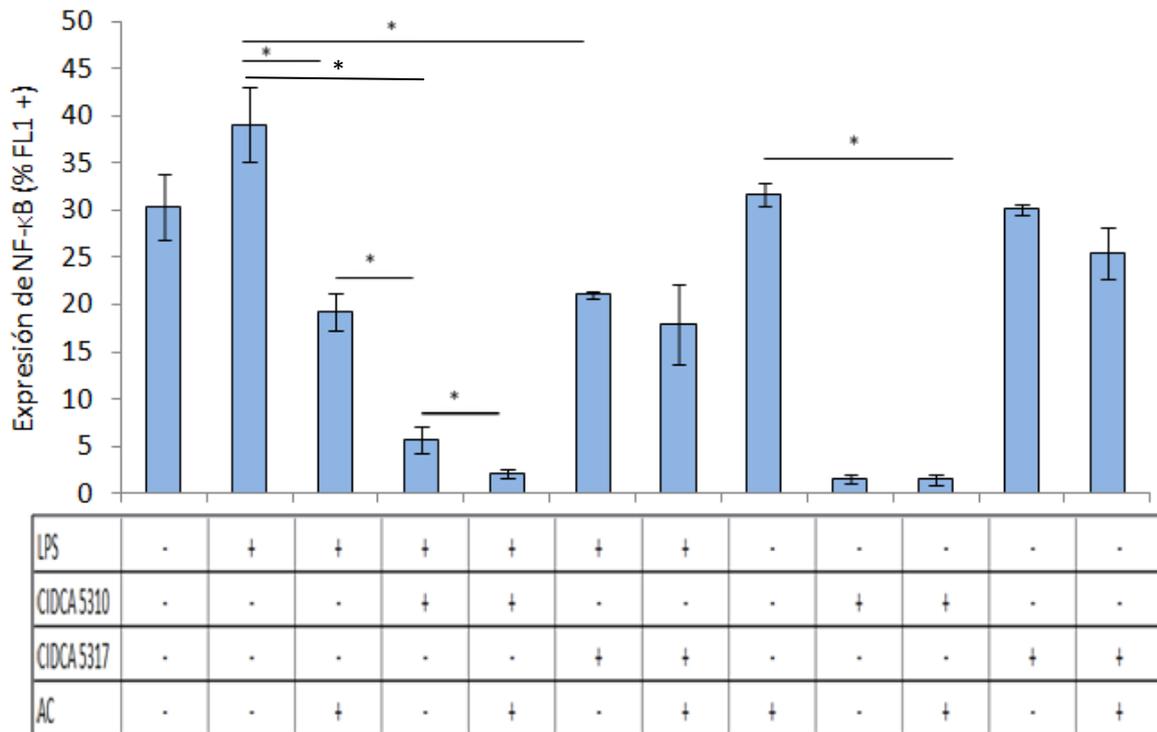


Figura II.16 Expresión de NF- κ B, indicado como porcentaje de células FL1 positivas (%FL1+), en células HT-29 NF- κ B GFP en sistema de co-cultivo con células THP-1PMA, incubadas durante 18 horas con distintos estímulos (* $P < 0,05$).

☀ II.9 Expresión de moléculas de superficie en células THP-1PMA en sistema de co-cultivo con células HT-29 NF-κB GFP.

→ Expresión de HLA-DR

Se evaluó la expresión de HLA-DR en células THP-1PMA luego de la estimulación en un sistema de co-cultivo, durante 18 horas. Como se muestra en la **figura II.17**, no se observó ningún efecto significativo de los estímulos en la expresión.

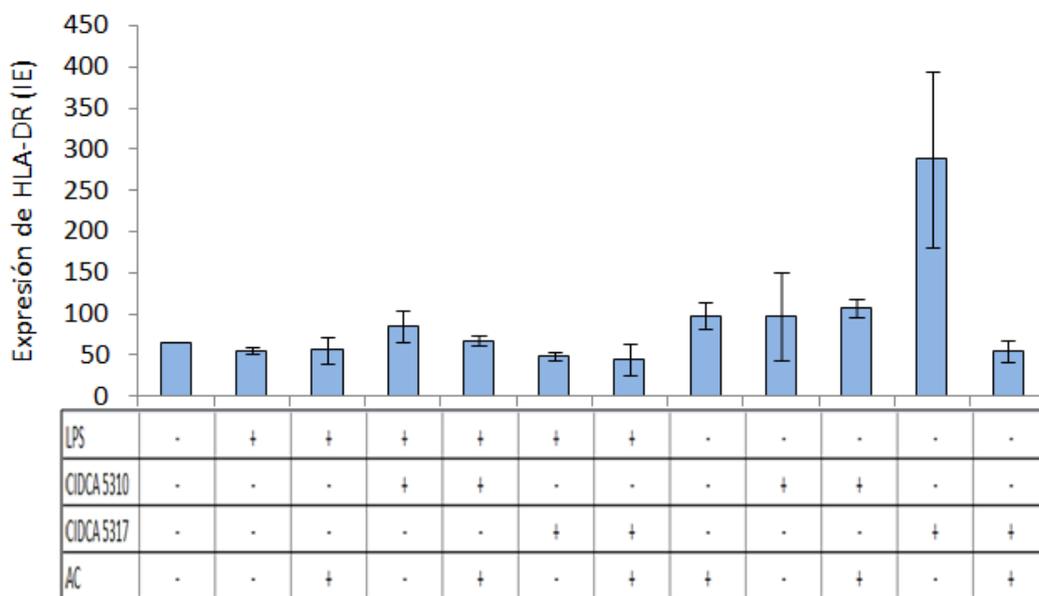


Figura II.17 Expresión de HLA-DR, indicado como índice de expresión (IE), en células THP-1PMA en sistema de co-cultivo con células HT-29 NF-κB GFP, incubadas durante 18 horas con distintos estímulos (*P< 0,05).

→ Expresión de CD86.

El marcador CD86 se encuentra presente en las membranas de células presentadoras de antígeno, como por ejemplo, los macrófagos. Su función como molécula co-estimuladora junto con CD80, es mediar la interacción de células T con las células presentadoras de antígenos. Con el fin de determinar la activación de los macrófagos bajo los estímulos estudiados, se evaluó la expresión de CD86 en las células THP-1PMA incubadas en sistema de co-cultivo, estimuladas durante 18 horas con CIDCA 5310, CIDCA 5317, acenocumarol y LPS.

Como resultado se observó que la estimulación de las células con acenocumarol generó la mayor expresión de CD86 (IE: $122,67 \pm 2,21$), aún más que en la condición acenocumarol en presencia de LPS (IE: $50,18 \pm 22,26$); además el anticoagulante fue capaz de disminuir significativamente ($P < 0,05$) la expresión cuando se incubaron las células con LPS y CIDCA 5310. Respecto a las condiciones en ausencia de LPS, la cepa CIDCA 5310 logró disminuir (IE: $80,57 \pm 6,93$) la gran expresión del receptor provocada por acenocumarol (IE: $122,67 \pm 2,21$), de manera significativa ($P < 0,05$) (**Figura II.18**).

DISCUSIÓN

Como se describió en la Introducción de este capítulo, los macrófagos son componentes clave de la respuesta inmune tanto en su rama innata como adaptativa. La activación y la funcionalidad de estas células ha demostrado ser plástica, rápida y reversible, sugiriendo que hay distintos fenotipos de macrófagos que pueden llegar a formar parte de un ambiente pro-inflamatorio y luego contribuir en la resolución de la inflamación (Mantovani *et al.*, 2004; Italiani and Boraschi, 2014; Benoit, Desnues and Mege, 2018).

Los resultados de la evaluación de la fagocitosis, expuestos en el capítulo I de la presente tesis, demostraron que las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 interactúan de manera diferente con los fagocitos, siendo la presencia de acenocumarol, otro factor determinante en dicha interacción. Por lo tanto, con el fin de profundizar el estudio sobre el fenotipo que desarrolla el fagocito en presencia de las bacterias evaluadas y acenocumarol, en este capítulo se estudiaron la expresión de moléculas de superficie relevantes en contextos de activación (MHC clase II (HLA-DR), TLR2, CD64,CD16) y de regulación (CD163,CD206,CD23) de la respuesta inmune (Mantovani *et al.*, 2004).

La evaluación de la expresión de HLA-DR, mostró como resultado un aumento significativo de su expresión en presencia de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317, en co-incubación con los macrófagos durante 18 horas. Estos resultados demuestran la capacidad de estas bacterias de inducir la activación de fagocitos. Además, se realizó este ensayo en presencia de una citoquina inductora de la expresión de HLA-DR, como es el IFN- γ (Lee *et al.*, 2017), observándose como resultado que en presencia de la cepa CIDCA 5310 se obtuvo la mayor expresión de esta molécula. Por el contrario, la cepa CIDCA 5317 no afectó la expresión de HLA-DR en presencia de IFN- γ .

Teniendo en cuenta los resultados previos, expuestos en el capítulo I, que mostraron la mayor fagocitosis de la cepa CIDCA 5310, y una mayor fagocitosis de partículas inertes en presencia de esta bacteria, compatible con una activación de la célula fagocítica, se podría pensar que esa activación se verá reflejada en la mayor expresión de moléculas necesarias para la presentación de antígenos, como es el caso de HLA-DR. De hecho, se ha demostrado que una cepa de *Lactobacillus jensenii* la cual posee alta capacidad inmunomoduladora es

mayormente internalizada por los fagocitos mononucleares de placas de Peyer porcina que una cepa no inmunomoduladora (Tsukida *et al.*, 2016).

Habiéndose reportado previamente el efecto inmunomodulador del acenocumarol (Schroecksnadel *et al.*, 2013), se evaluó el efecto que tendría la presencia del anticoagulante sobre la expresión de moléculas de superficie estimuladas con las cepas probióticas.

Se pudo notar, respecto a la expresión de HLA-DR que, en todos los casos, el acenocumarol provocó una disminución significativa de la expresión del marcador en estudio. Este resultado demuestra la capacidad del fármaco de afectar la respuesta inmune, disminuyendo la expresión de una molécula necesaria para el desencadenamiento de respuestas inmunes innatas y adaptativas.

Este efecto inmunomodulador del acenocumarol observado en los presentes resultados, se ha descrito en su uso como tratamiento de pancreatitis aguda inducida en ratas, observándose una inhibición del desarrollo de la inflamación cuando se tratan las ratas con bajas dosis de acenocumarol, luego de ser inducida la pancreatitis (Warzecha *et al.*, 2016). Además se observó que este anticoagulante interfiere en la producción de citoquinas pro-inflamatorias y en las vías de señalización desencadenadas por LPS o IFN- γ , disminuyendo la expresión de mediadores de la respuesta inmune tipo Th1 (Schroecksnadel *et al.*, 2013).

Dentro de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), los receptores más estudiados son los de tipo Toll (TLR), los cuales a partir de la unión con su ligando, son capaces de desencadenar respuestas inmunes a través de la vía dependiente de NF- κ B (Zeuthen, 2008). El receptor tipo Toll 2, TLR2, posee como algunos de sus ligandos al peptidoglicano y al ácido lipoteicoico, por lo que este receptor juega un rol importante en el reconocimiento de bacterias Gram (+) como las bifidobacterias (Scuotto *et al.*, 2014). La unión de los TLR con su ligando puede desencadenar una amplia variedad de señales que van a regular la naturaleza, la magnitud y la duración de la respuesta inmune.

Así pues, se midió la expresión de TLR2 luego de la estimulación de las células fagocíticas con ambas cepas de *Bifidobacterium* observándose un resultado compatible con una señalización a través de dicho receptor. Sin embargo, esta activación disminuyó

significativamente en presencia de acenocumarol. Debido a que se encuentra descrita la inducción o disminución de la expresión de MCH II a través de la activación de TLR2 (Barrionuevo *et al.*, 2008; Ferrero *et al.*, 2014), se podría relacionar el presente resultado, con la disminución de la expresión de HLA-DR en presencia del anticoagulante, visto anteriormente.

Aunque solamente se evaluó la expresión de TLR2 exocelular, la participación de receptores ubicados en endosomas no puede descartarse. En este sentido, Boye *et al.* (Boye *et al.*, 2016) demostraron que *L. acidophilus* induce la producción de IFN- β luego de la endocitosis y la señalización por endosomas a través de un mecanismo dependiente de MyD88. Este efecto puede ser inhibido desde la membrana plasmática a través de la señalización via TLR2, por lo que estos autores especulan que los receptores situados en la membrana plasmática compiten con aquellos ubicados en los compartimientos endosomales por el reclutamiento de MyD88 (Boye *et al.*, 2016).

Si bien la expresión de TLR2 fue similar bajo la estimulación con las cepas CIDCA 5310 o CIDCA 5317, las diferentes respuestas celulares generadas por estas dos bacterias, pueden estar relacionadas con la capacidad de TLR2 de oligomerizar con otras moléculas de superficie formando complejos como, TLR2/TLR6/CD36 y TLR2/TLR1 (Zeuthen, 2008) aumentando así la interacción con motivos bacterianos que podrían ser diferentes en distintos microorganismos aún pertenecientes a taxa relacionadas.

Esta oligomerización de receptores puede estar relacionada con la diferente habilidad de inducir la respuesta celular por *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Zeuthen, 2008).

Dada la diferente interacción de las bifidobacterias con células fagocíticas demostrada hasta aquí y el efecto inmunomodulatorio del acenocumarol, se planteó la hipótesis de que esto condicione la polarización de los macrófagos.

La diferenciación de monocitos a macrófagos depende de los estímulos presentes en el entorno (Mosser and Edwards, 2009). La presencia de productos bacterianos como LPS, o de citoquinas como IFN- γ , pueden desencadenar su diferenciación hacia un tipo de macrófago llamado M1 con alto poder microbicida y con capacidad de inducir reacciones inflamatorias a través de la secreción de mediadores de la inflamación (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12) cuya acción prolongada puede generar daños tisulares (Mantovani *et al.*, 2004; Chanput, Mes and Wichers, 2014; Chistiakov *et al.*, 2018; Tedesco *et al.*, 2018). Por otro

lado, la presencia de citoquinas regulatorias como IL-4, IL-13 o IL-10, pueden generar la diferenciación de los monocitos hacia otro tipo de macrófagos llamados M2, los cuales están involucrados en la reparación y remodelación de tejidos a través de la liberación de quemoquinas y citoquinas antiinflamatorias (TGF- β , IL-10) (Mantovani *et al.*, 2004; Chanput, Mes and Wichers, 2014; Chistiakov *et al.*, 2018; Tedesco *et al.*, 2018). La modificación de la polarización de macrófagos hacia un perfil permisivo M2, se conoce como una de las estrategias de bacterias patógenas para poder sobrevivir dentro de macrófagos (Valdez *et al.*, 2016; Benoit, Desnues and Mege, 2018).

Si bien podemos dividir la polarización macrofágica en los fenotipos M1 (pro-inflamatorio) y M2 (anti-inflamatorio), es de alta relevancia saber que hay muchos estadios intermedios entre estos dos fenotipos extremos (Mantovani *et al.*, 2004; Italiani and Boraschi, 2014).

En los estudios realizados, las cepas CIDCA 5310, CIDCA 5317 y el acenocumarol generaron la disminución de la expresión de CD64, molécula presente en los macrófagos con polarización hacia M1, y generaron el aumento de la expresión de CD163, presente en los macrófagos M2. A su vez, ambas bacterias provocaron el aumento de CD206, otro marcador de macrófagos M2. Considerando los presentes resultados se podría sospechar la polarización de los macrófagos hacia un perfil M2, en presencia de cualquiera de las dos bacterias y de acenocumarol. Sin embargo, la cepa CIDCA 5310 y el acenocumarol, aumentaron la expresión de CD16, un marcador M1, y no afectaron la expresión de CD23, relevante en los macrófagos M2. Estos resultados ambiguos en lo que respecta a la definición de un perfil de macrófago determinado, se relaciona con la gran variedad de estadios de polarización en la que puede encontrarse la célula fagocítica dentro de los márgenes M1-M2 (Mantovani *et al.*, 2004; Benoit, Desnues and Mege, 2018).

Por otra parte, los resultados de la expresión de CD206 en células THP-1 diferenciadas con PMA y estimuladas con IL-4, fueron similares a los obtenidos en células THP-1 diferenciadas con PMA sin estimular. Motivo por el cual, se podría pensar que la célula diferenciada con PMA posee alta expresión de CD206.

En un trabajo de Tedesco *et al.* (Tedesco *et al.*, 2018), se observó una mayor expresión de CD206 en células THP-1 diferenciadas con PMA bajo la estimulación para el perfil M1. En contraste, la expresión de CD206 en un entorno que estimularía un perfil M2 fue menor.

Este resultado es paradójico teniendo en cuenta que CD206 es un receptor presente en macrófagos M2 (Mantovani *et al.*, 2004).

Se han realizado numerosos estudios acerca del efecto de la diferenciación con PMA sobre monocitos THP-1, y se halla descrito que la concentración de PMA puede afectar la polarización M1-M2 (Maeß *et al.*, 2014; Lund *et al.*, 2016; Sichetti *et al.*, 2018). Las publicaciones citadas indican que el PMA es un inductor fuerte de polarización de macrófagos que dirige el patrón de diferenciación hacia un perfil M1 pero, dada su gran potencial estimulador, da lugar también a la expresión de marcadores asociados al perfil M2 tales como CD206 (receptor de manosa) impidiendo que la estimulación con IL-4 sea capaz de aumentar esa expresión (Tedesco *et al.*, 2018).

Teniendo en cuenta lo antedicho, se decidió realizar ensayos con células THP-1 sin diferenciar con PMA con el fin de eliminar este estímulo inicial que podría enmascarar efectos menos marcados. La hipótesis subyacente es que esta estrategia conduciría a un sistema de estudio más sensible a los estímulos generados por las bacterias y del acenocumarol.

En estas condiciones, se pudo observar el incremento de la expresión de CD206 en las células estimuladas en ausencia de PMA. Además, la cepa CIDCA 5310 estimuló la expresión, no sólo de CD206 sino también de CD64 y de HLA-DR, denotando la capacidad de los agonistas utilizados de inducir la diferenciación de monocitos en ausencia de PMA.

La presencia de acenocumarol disminuyó la expresión de CD64 y de HLA-DR, sin embargo, el efecto notable del anticoagulante, fue el aumento significativo de la expresión de CD206 en presencia de IL-4. De esta manera, se observa la capacidad del acenocumarol de inmunomodular a través del aumento de la expresión de una molécula característica de los macrófagos con polarización M2 y disminuyendo la expresión de moléculas presentes en macrófagos M1.

Cabe destacar, que en ausencia de PMA, la cepa CIDCA 5317 no generó efecto alguno sobre la expresión de las moléculas en estudio.

Con el objetivo de indagar acerca de las vías de señalización involucradas en la respuesta celular, se utilizaron dos líneas celulares de epitelio intestinal reporteras. Por un lado, la línea celular HT-29-NF-κB-hrGFP que permite detectar la expresión de NF-κB

(Mastropietro *et al.*, 2015), y la línea celular Caco-2 ccl20-luc la cual tiene un gen reportero para la expresión de CCL20 (Romanin *et al.*, 2010; Carasi *et al.*, 2014, 2015). Ambos genes se expresan en condiciones inflamatorias.

La activación de la vía NF- κ B se observó en presencia de la cepa CIDCA 5317. Mientras que la presencia conjunta de la cepa CIDCA 5310 con acenocumarol, mostró la disminución significativa de la activación de esta vía inflamatoria. Este último resultado indicaría que es necesaria la presencia conjunta de la cepa CIDCA 5310 y acenocumarol, para que se genere el efecto inmunomodulador, en este modelo de célula epitelial.

Respecto a la expresión de CCL20 en presencia de un agonista TLR5 como la flagelina (Flic), se observó la disminución de su expresión en presencia de CIDCA 5310, mientras que la cepa CIDCA 5317 no mostró efecto alguno. Este resultado evidencia la capacidad de la cepa CIDCA 5310 de disminuir la respuesta inflamatoria generada por un agonista TLR5. Existen varios estudios que reportan la capacidad de microorganismos potencialmente probióticos y sus metabolitos, de disminuir la respuesta inmune innata provocada por la flagelina. En este sentido, se ha observado la capacidad de levaduras aisladas de kéfir de inhibir la respuesta innata en células epiteliales intestinales desencadenada via NF- κ B (Romanin *et al.*, 2010). Además, se han demostrado las propiedades inmunomoduladoras del lactato a través de la unión de este metabolito, con receptores acoplados a proteínas G específicos GPR81, en los enterocitos (Iraporda *et al.*, 2014, 2015).

Cuando las células fueron estimuladas con acenocumarol se observó una alta expresión de CCL20, aún mayor que la generada por Flic sola, sin embargo, la presencia tanto de la cepa CIDCA 5310 como de la cepa CIDCA 5317 generó la disminución de la expresión de CCL20. Este hecho sugeriría, que el efecto del anticoagulante sobre la activación de esta vía inflamatoria, tendría lugar en un contexto de estimulación vía TLR5. Es decir, que un contexto de alteración de la microbiota intestinal, como puede ser una infección, la presencia de acenocumarol podría exacerbar esa inflamación generada por la patología, no obstante, la presencia de cepas probióticas impediría que esa exacerbación de la inflamación ocurra.

La alta activación de la expresión de CCL20 en presencia de acenocumarol, no sería compatible con los efectos inmunomodulatorios del anticoagulante mostrados en el presente trabajo de tesis y en la bibliografía. Esto indicaría que la activación de la vía

relacionada con esta quemoquina no implica la activación de otras vías inflamatorias. Se ha reportado que la respuesta celular ante la infección con *Brucella*, genera baja respuesta inflamatoria local pero alta expresión de CCL20 (Ferrero *et al.*, 2012).

La homeostasis intestinal está especialmente regulada por un intercambio de señales entre subpoblaciones celulares, que incluyen a las células epiteliales y a las células inmunes profesionales presentes en los tejidos subyacentes. Para poder simular *in vitro* esta intercomunicación entre bacterias, células epiteliales intestinales y macrófagos, usamos un modelo de co-cultivo empleando células epiteliales y células fagocíticas.

La estimulación con las bacterias y acenocumarol de este sistema de co-cultivo, se realizó con la finalidad de estudiar, si aquellos efectos observados previamente en la expresión de moléculas de superficie en las células fagocíticas se conservan cuando no hay una interacción directa bacteria-célula. Además utilizando como células epiteliales intestinales, la línea reportera para el gen NF- κ B, se pudo determinar si las condiciones evaluadas, y en sistema de co-cultivo, activan esta vía de señalización (Mastropietro *et al.*, 2015).

En primer lugar, en ausencia de LPS, se observó un efecto inmunomodulador de la cepa CIDCA 5310, provocando la disminución significativa de la expresión basal de NF- κ B. Este efecto de la cepa CIDCA 5310 no se había observado previamente sobre estas células epiteliales en monocultivos, lo cual evidencia que es necesaria la presencia de las células fagocíticas en el compartimento inferior, para que la cepa CIDCA 5310 genere una respuesta por parte de las células epiteliales.

Al incorporar el estímulo del LPS, que genera un aumento de la activación de NF- κ B, se observó una disminución de la misma tanto en presencia de las cepas como de acenocumarol, mostrando la capacidad de estos estímulos para disminuir la respuesta generada por el LPS. Considerando estos resultados, la cepa CIDCA 5317, al igual que ocurre con el acenocumarol, disminuyeron la activación de la vía solamente en presencia del estímulo del LPS. Este resultado denota que tanto la cepa CIDCA 5317, como el acenocumarol, necesitarían la presencia de un estímulo inflamatorio, como es el LPS, para ejercer su efecto inmunomodulador; resultado que se halla descrito para otros microorganismos inmunomoduladores (An *et al.*, 2010; Romanin *et al.*, 2010; Smaldini *et al.*,

2014). Cabe destacar, que la menor activación de la vía NF- κ B se obtuvo en presencia de acenocumarol junto con la cepa CIDCA 5310. Motivo por el cual se podría pensar, que la presencia conjunta de CIDCA 5310 y acenocumarol potenciaría la capacidad de disminuir la activación de esta vía. Este mismo resultado, se observó cuando se estimularon las células epiteliales previamente sin co-cultivo.

Siguiendo con el análisis de la estimulación del sistema de co-cultivo. Se evaluó la expresión de la molécula HLA-DR en las células THP-1. Como resultado, se encontró que en este sistema no se observa estimulación de la molécula necesaria para la presentación de antígenos, ni incluso en presencia de LPS. Este resultado sugeriría, que la presencia de LPS solo, no modifica la expresión de HLA-DR ya que el fenotipo de macrófago estaría definido al diferenciar las células con PMA (Sichetti *et al.*, 2018).

La molécula co-estimuladora CD86, es otra de las moléculas necesarias para la presentación de antígenos. Su determinación mostró la mayor expresión cuando se estimularon las células con acenocumarol, mientras que estimulando con la cepa CIDCA 5310 ese efecto disminuyó.

Sin embargo, el efecto del acenocumarol sobre la expresión de CD86 fue diferente en presencia de LPS y CIDCA 5310, mostrando su efecto inmunomodulador a través de la disminución de la expresión de dicho receptor. Se podría pensar en la existencia de una potenciación del efecto generado por el acenocumarol y CIDCA 5310, observado previamente en la disminución de la activación de la vía NF- κ B, que se reflejaría en la disminución de CD86.

Es importante notar que el efecto inmunomodulador del acenocumarol sólo se observó bajo un estímulo potente, proinflamatorio, como es el LPS. En ausencia del agonista TLR4, el anticoagulante no provocó ni la disminución de la activación de la vía NF- κ B, ni el descenso en la expresión de CD86. En este sentido, se ha reportado que la atenuación de la respuesta celular generada por el fármaco, losartán, tendría lugar sobre respuestas inflamatorias inducidas por LPS (An *et al.*, 2010). Además, la presencia de la cepa CIDCA 5310 en ausencia de acenocumarol, no fue capaz de generar ninguna modificación en la expresión de CD86, mientras que en presencia de acenocumarol la disminuyó. Como explica Hugo *et al.* para que una bacteria probiótica refleje su efecto en la expresión de una molécula de superficie, como es CD86, podría necesitar la presencia de otro estímulo (Hugo *et al.*, 2017).

Como conclusión se puede decir que la estimulación con las bacterias, acenocumarol y LPS, agregados sobre las células epiteliales, generó efectos sobre las mismas repercutiendo sobre la expresión de CD86 presente en las células fagocíticas, ubicadas en el compartimento inferior del sistema, mostrando la intercomunicación entre estas células a través de factores solubles (Sichetti *et al.*, 2018).

Considerando los resultados presentados, se puede decir que las respuestas celulares evaluadas se ven modificadas en presencia de las cepas y de acenocumarol, generando diferentes perfiles de polarización en los macrófagos. Se demostró que las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 provocan la expresión tanto de moléculas relevantes presentes en contextos de activación celular como en contextos de disminución de la respuesta inmune, proponiéndose de acuerdo a lo observado, que ambas cepas presentan una ambigüedad en el recorrido de polarización M1-M2, requiriéndose mayores estudios para poder reconocer el perfil de polarización generado.

En referencia al acenocumarol, se demostró con mayor precisión su efecto inmunomodulatorio sobre células fagocíticas, disminuyendo o regulando la respuesta celular, compatibilizando con la polarización hacia un perfil M2. Sin embargo, ese efecto se vio alterado en células epiteliales y en presencia de un agonista TLR5.

Por lo tanto, los presentes resultados reflejan los diferentes efectos que generan las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 y el acenocumarol sobre la respuesta celular, y cómo esa respuesta puede ser modificada de acuerdo al estado inflamatorio del entorno.

Seguidamente, se decidió continuar los ensayos estudiando las interacciones con células dendríticas debido a que constituyen una subpoblación de células presentadoras de antígenos con una funcionalidad claramente diferente a la de los macrófagos, lo cual es fundamental para tener una mejor aproximación de los factores relevantes para la respuesta del huésped frente a bifidobacterias y acenocumarol.

Bi BIBLIOGRAFÍA io

An, J. *et al.* (2010) 'Losartan inhibits LPS-induced inflammatory signaling through a PPAR γ -dependent mechanism in human THP-1 macrophages', *Hypertension Research*, 33(8), pp. 831–835. doi: 10.1038/hr.2010.79.

Barrionuevo, P. *et al.* (2008) 'Brucella abortus Inhibits Major Histocompatibility Complex Class II Expression and Antigen Processing through Interleukin-6 Secretion via Toll-Like Receptor 2', 76(1), pp. 250–262. doi: 10.1128/IAI.00949-07.

Benoit, M., Desnues, B. and Mege, J. (2018) 'Macrophage Polarization in Bacterial Infections'. 181, pp 3733-3739. doi: 10.4049/jimmunol.181.6.3733.

Boye, L. *et al.* (2016) 'Plasma membrane Toll-like receptor activation increases bacterial uptake but abrogates endosomal Lactobacillus acidophilus induction of interferon- β ', pp. 329–342. doi: 10.1111/imm.12650.

Carasi, P. *et al.* (2014) 'Safety and potential beneficial properties of Enterococcus strains isolated from kefir', *International Dairy Journal*, 39(1), pp. 193–200. doi: 10.1016/j.idairyj.2014.06.009.

Carasi, P. *et al.* (2015) ' Impact of Kefir Derived Lactobacillus kefiri on the Mucosal Immune Response and Gut Microbiota ', *Journal of Immunology Research*, 2015, pp. 1–12. doi: 10.1155/2015/361604.

Chanput, W., Mes, J. J. and Wichers, H. J. (2014) 'THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach', *International Immunopharmacology*. Elsevier B.V., 23(1), pp. 37–45. doi: 10.1016/j.intimp.2014.08.002.

Chistiakov, D. A. *et al.* (2018) 'The impact of interferon-regulatory factors to macrophage differentiation and polarization into M1 and M2', *Immunobiology*. Elsevier, 223(1), pp. 101–111. doi: 10.1016/j.imbio.2017.10.005.

Ferrero, M. C. *et al.* (2012) 'Brucella invasion of human intestinal epithelial cells elicits a weak proinflammatory response but a significant CCL20 secretion', *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 66(1), pp. 45–57. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00985.x.

Ferrero, M. C. *et al.* (2014) 'Key role of toll-like receptor 2 in the inflammatory response and major histocompatibility complex class ii downregulation in brucella abortus-infected alveolar macrophages', *Infection and Immunity*, 82(2), pp. 626–639. doi: 10.1128/IAI.01237-13.

Hugo, A. A. *et al.* (2017) 'Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis (strain CIDCA 133) stimulates murine macrophages infected with Citrobacter rodentium', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Springer Netherlands, 33(3). doi: 10.1007/s11274-017-2219-4.

Iraporda, C. *et al.* (2014) 'The role of lactate on the immunomodulatory properties of the nonbacterial fraction of kefir', *Food Research International*. Elsevier Ltd, 62, pp. 247–253. doi: 10.1016/j.foodres.2014.03.003.

Iraporda, C. *et al.* (2015) 'Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells', *Immunobiology*. Elsevier GmbH., 220(10), pp. 1161–1169. doi: 10.1016/j.imbio.2015.06.004.

Italiani, P. and Boraschi, D. (2014) 'From monocytes to M1 / M2 macrophages : phenotypical vs . functional differentiation', 5(October), pp. 1–22. doi: 10.3389/fimmu.2014.00514.

Lee, J. *et al.* (2017) 'The MHC class II antigen presentation pathway in human monocytes differs by subset and is regulated by cytokines'. doi: 10.1371/journal.pone.0183594

Lund, M. E. *et al.* (2016) 'The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus', *Journal of Immunological Methods*. Elsevier B.V., 430, pp. 64–70. doi: 10.1016/j.jim.2016.01.012.

Maeß, M. B. *et al.* (2014) 'Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli', *Journal of Immunological Methods*. Elsevier B.V., 402(1–2), pp. 76–81. doi: 10.1016/j.jim.2013.11.006.

Mantovani, A. *et al.* (2004) 'The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization', 25(12). doi: 10.1016/j.it.2004.09.015.

Mastropietro, G. *et al.* (2015) 'HT-29 and Caco-2 reporter cell lines for functional studies of nuclear factor kappa B activation', *Mediators of Inflammation*, 2015. doi: 10.1155/2015/860534.

Mosser, D. M. and Edwards, J. P. (2009) 'Exploring the full spectrum of macrophage polarization', *Nat Rev Immunology*, 8(12), pp. 958–969. doi: 10.1038/nri2448.

Romanin, D. *et al.* (2010) 'Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 140(2–3), pp. 102–108. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.014.

Schroecksnadel, S. *et al.* (2013) 'Immunomodulatory effects in vitro of vitamin K antagonist acenocoumarol', *Thrombosis Research*. Elsevier Ltd, 131(6), pp. e264–e269. doi: 10.1016/j.thromres.2013.02.012.

Scuotto, A. *et al.* (2014) 'Bifidobacterium breve C50 secretes lipoprotein with CHAP domain recognized in aggregated form by TLR2', *Biochimie*, 107(PB), pp. 367–375. doi: 10.1016/j.biochi.2014.10.007.

Sichetti, M. *et al.* (2018) 'Anti-inflammatory effect of multistrain probiotic formulation (L. rhamnosus, B. lactis, and B. longum)', *Nutrition*. Elsevier Inc., 53, pp. 95–102. doi: 10.1016/j.nut.2018.02.005.

Smaldini, P. L. *et al.* (2014) 'Down-regulation of NF- κ B signaling by *Gordonia bronchialis* prevents the activation of gut epithelial cells', *Innate Immunity*, 20(6), pp. 626–638. doi: 10.1177/1753425913503577.

Tedesco, S. *et al.* (2018) 'Convenience versus biological significance: Are PMA-differentiated THP-1 cells a reliable substitute for blood-derived macrophages when studying in vitro polarization?', *Frontiers in Pharmacology*, 9(FEB), pp. 1–13. doi: 10.3389/fphar.2018.00071.

Tsukida, K. *et al.* (2016) 'Immunoregulatory effects triggered by immunobiotic *Lactobacillus jensenii* TL2937 strain involve efficient phagocytosis in porcine antigen presenting cells', *BMC Immunology*. *BMC Immunology*, pp. 1–12. doi: 10.1186/s12865-016-0160-1.

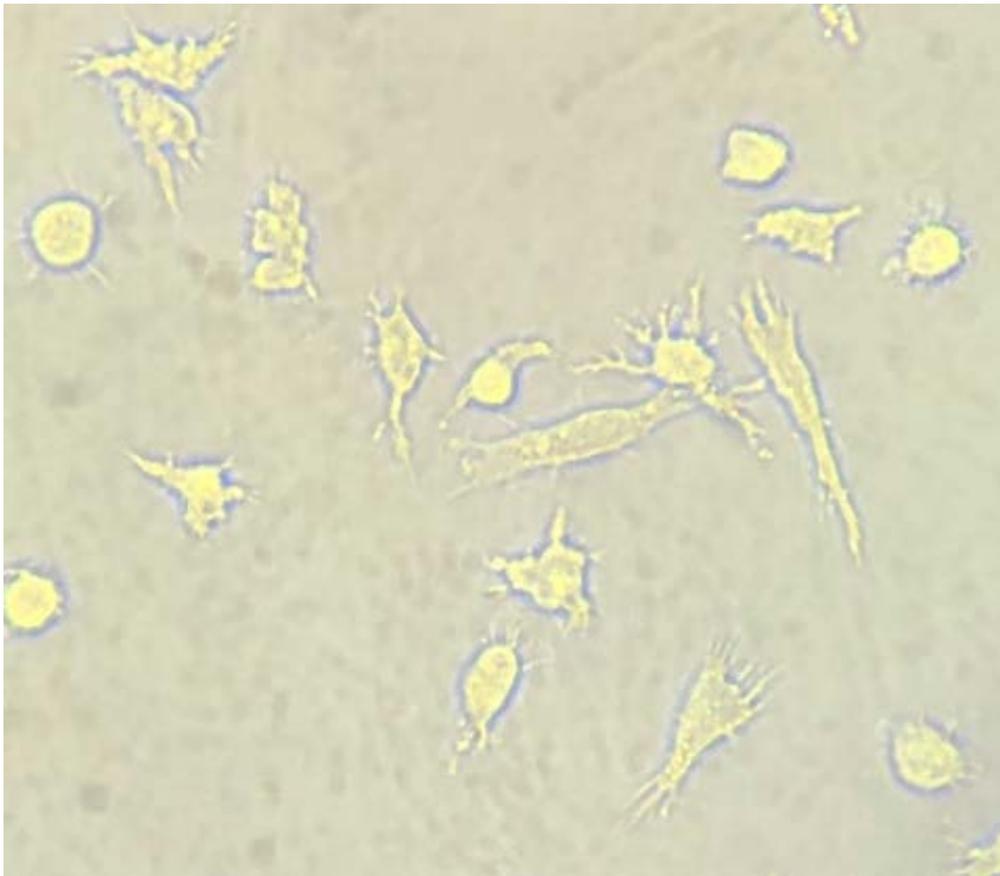
Valdez, H. A. *et al.* (2016) 'Bordetella pertussis modulates human macrophage defense gene expression', *Pathogens and Disease*, 74(6), pp. 1–14. doi: 10.1093/femspd/ftw073.

Warzecha, Z. *et al.* (2016) 'Protective effect of pretreatment with acenocoumarol in cerulein-induced acute pancreatitis', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10). doi: 10.3390/ijms17101709.

Zeuthen, L. H. (2008) 'Toll-like receptor 2 and nucleotide-binding oligomerization domain-2 play divergent roles in the recognition of gut-derived lactobacilli and bifidobacteria in dendritic cells', pp. 489–502. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02800.x.

CAPÍTULO III

EFFECTO DEL ACENOCUMAROL SOBRE LA INTERACCIÓN DE BIFIDOBACTERIAS CON CÉLULAS DENDRÍTICAS



INTRODUCCIÓN

Las células epiteliales intestinales (CEI) representan una importante barrera entre las células que conforman la *lamina propria* y el contenido luminal potencialmente dañino, contribuyendo con la homeostasis intestinal y con defensas no específicas como la secreción de mucus, lisozima, y péptidos antimicrobianos. (Stadnyk, 2002; Mastropietro *et al.*, 2015). Además contribuyen a la inmunidad intestinal ya que poseen la capacidad de detectar patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), de expresar moléculas involucradas en la presentación de antígenos y en los últimos años se ha visto la capacidad de estas células de secretar citoquinas y quemoquinas modulando células subyacentes (Stadnyk, 2002; Canny, Swidsinski and McCormick, 2006). El factor de transcripción NF- κ B, es un regulador clave de respuestas proinflamatorias presente en las CEI, con el fin de controlar la integridad de la barrera y las interacciones entre el sistema inmune de mucosas y la microbiota intestinal (Smaldini *et al.*, 2014; Mastropietro *et al.*, 2015). Las CEI y las células presentadoras de antígenos profesionales como las células dendríticas (CD) y macrófagos son algunas de las células que intervienen en las respuestas inmunes a nivel intestinal.

En lo que concierne a las células dendríticas, se pueden distinguir dos estados funcionalmente diferentes: las células dendríticas inmaduras las cuales se encuentran en órganos periféricos, sensando la presencia de microorganismos y cuya principal función es fagocítica, y las células dendríticas maduras que derivan de las anteriores como consecuencia de un estímulo inflamatorio, generando la migración y maduración de células dendríticas en nódulos linfáticos, donde se especializan en la presentación de antígenos. Estas últimas, son las únicas células capaces de activar células T en reposo y de iniciar respuestas primarias y de memoria inmunológica (Savina and Amigorena, 2007; Rescigno, 2010). Están mayormente especializadas en vincular la respuesta innata con la respuesta adaptativa, que en la eliminación de microorganismos de manera directa.

Suele referirse como células dendríticas inmaduras a aquellas células con alta capacidad fagocítica, ya que luego de encontrarse en un ambiente inflamatorio o frente a ciertos ligandos Toll entran en un proceso madurativo que lleva a la pérdida de la capacidad fagocítica debido a cambios en la actividad de las proteínas Rac y Cdc42. Además la proteólisis llevada a cabo en la fagocitosis en células dendríticas maduras se basa en una degradación proteica parcial más que total, como ocurre en macrófagos y neutrófilos (Savina and Amigorena, 2007).

Las células dendríticas de la mucosa son capaces de muestrear los antígenos presentes en el lumen a través de la prolongación de sus dendritas por entre las uniones estrechas del epitelio de manera directa (Rescigno *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2011; Tiscornia *et al.*, 2012) o asimismo pueden captar los antígenos de manera indirecta a través del transporte de los mismos por las células M que recubren las placas de Peyer (Rescigno *et al.*, 2001). Luego de la captación del antígeno, las células dendríticas pueden inducir una respuesta T asociada a mucosas en placas de Peyer y exponer los antígenos en los nódulos linfáticos mesentéricos, mediando la atracción de células T efectoras o de memoria, células B secretoras de Ig-A e induciendo células T regulatorias a producir interleuquina 10 (IL-10) y TGF- β . Esto está regulado por el tipo de moléculas de superficie coestimuladoras y por la producción de citoquinas o quemoquinas inflamatorias (Rescigno, 2010; Kim, Park and Ji, 2012).

Debido a la complejidad estructural del intestino y a las múltiples interacciones que se manifiestan entre varios tipos celulares, los ensayos de incubación con sistema que involucran solo un tipo celular, son una aproximación válida pero no suficiente para intentar predecir lo que ocurre *in vivo*, razón por la cual, varios autores han empleado el sistema de co-cultivo empleando insertos donde se colocan células epiteliales intestinales y por debajo del mismo células dendríticas (Kim, Park and Ji, 2012; Rolny *et al.*, 2016). A través del empleo de sistemas de co-cultivo se ha demostrado el intercambio de información que se genera entre ambos tipos celulares, destacando la posibilidad de que una cepa probiótica ejerza su efecto inmunomodulador a través de la barrera epitelial por factores solubles y no por contacto directo con células de la respuesta inmune (Kim, Park and Ji, 2012; Rolny *et al.*, 2016; Kämpfer *et al.*, 2017; S *et al.*, 2018). Es importante recalcar que hay antecedentes que demuestran que los estudios realizados solamente con un tipo celular no arrojan los mismo resultados que los experimentos en co-cultivo con otras células, exponiendo una intercomunicación entre las células (Kim, Park and Ji, 2012), mostrando la relevancia de la realización de estos ensayos en co-cultivo para indagar el efecto probiótico a nivel intestinal.

En este sentido, el objetivo del presente capítulo se centró en el estudio de la respuesta celular generada por la estimulación con las cepas de bifidobacterias y acenocumarol sobre un sistema de co-cultivo con células epiteliales y células dendríticas, realizando de esta manera un estudio más aproximado sobre las múltiples interacciones presentes a nivel intestinal.

Bibliografía

- Canny, G., Swidsinski, A. and McCormick, B. A. (2006) 'Interactions of Intestinal Epithelial Cells With Bacteria and Immune Cells', 341(1). doi: 10.1385/1-59745-113-4:17
- Kämpfer, A. A. M. *et al.* (2017) 'Development of an in vitro co-culture model to mimic the human intestine in healthy and diseased state', *Toxicology in Vitro*. Elsevier, 45(August), pp. 31–43. doi: 10.1016/j.tiv.2017.08.011.
- Kim, J. Y., Park, M. S. and Ji, G. E. (2012) 'Probiotic modulation of dendritic cells co-cultured with intestinal epithelial cells', 18(12), pp. 1308–1318. doi: 10.3748/wjg.v18.i12.1308.
- Mastropietro, G. *et al.* (2015) 'HT-29 and Caco-2 reporter cell lines for functional studies of nuclear factor kappa B activation', *Mediators of Inflammation*, 2015. doi: 10.1155/2015/860534.
- Rescigno, M. *et al.* (2001) 'Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers', *Immunobiology*, 204(5), pp. 572–581. doi: 10.1078/0171-2985-00094.
- Rescigno, M. (2010) *Chapter 4 - Intestinal Dendritic Cells*. 1st edn, *Advances in Immunology: Mucosal Immunity*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-381300-8.00004-6.
- Rolny, I. S. *et al.* (2016) 'Lactobacillus delbrueckii subsp lactis CIDCA 133 modulates response of human epithelial and dendritic cells infected with Bacillus cereus', *Beneficial Microbes*, 7(5), pp. 749–760. doi: 10.3920/BM2015.0191.
- S, M. S. M. *et al.* (2018) 'Anti-inflammatory effect of multistrain probiotic formulation', *Nutrition*. Elsevier Inc., 53, pp. 95–102. doi: 10.1016/j.nut.2018.02.005.
- Savina, A. and Amigorena, S. (2007) 'Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells', *Immunological Reviews*, 219(1), pp. 143–156. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x.
- Smaldini, P. L. *et al.* (2014) 'Down-regulation of NF-κB signaling by Gordononia bronchialis prevents the activation of gut epithelial cells', *Innate Immunity*, 20(6), pp. 626–638. doi: 10.1177/1753425913503577.
- Stadnyk, A. W. (2002) 'Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines', *Canadian Journal of Gastroenterology*, 16(4), pp. 241–246. doi: 10.1155/2002/941087.
- Tiscornia, I. *et al.* (2012) 'Human monocyte-derived dendritic cells from leukoreduction system chambers after plateletpheresis are functional in an in vitro co-culture assay with intestinal epithelial cells', *Journal of Immunological Methods*. Elsevier B.V., 384(1–2), pp. 164–170. doi: 10.1016/j.jim.2012.07.005.
- Weiss, G. *et al.* (2011) 'Cytokine Lactobacilli and bifidobacteria induce differential interferon- b profiles in dendritic cells', *Cytokine*. Elsevier Ltd, 56(2), pp. 520–530. doi: 10.1016/j.cyto.2011.07.024.

MATERIALES Y MÉTODOS



III.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 fueron cultivadas y crecidas en las mismas condiciones explicadas en el Capítulo I, inciso I.1.



III.2 Células eucarióticas

Para la realización de los experimentos de este capítulo, se utilizaron células dendríticas provenientes de monocitos de sangre periférica obtenidos por aféresis de individuos donantes de la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos y del Servicio Nacional de Sangre de Montevideo, Uruguay. Además, se utilizó la línea celular reportera HT-29 NF- κ B GFP, descrita previamente en el Capítulo II, materiales y métodos inciso II.2.

Células dendríticas: los monocitos de sangre periférica fueron obtenidos por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque y almacenadas previo a su uso en nitrógeno líquido. Para la diferenciación a células dendríticas, los monocitos fueron incubados por 48 horas en RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor, 800 U/ml de factor estimulante de colonia macrófago-granulocito (GM-CSF) Y 500 U/ml de IL-4.

ENSAYO EN CO-CULTIVO



III.3 Estudio de la respuesta celular en un sistema de co-cultivo

A. Células dendríticas (CD)

Para la obtención de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica, se trabajó con aféresis de distintos pacientes donantes para cada uno de los experimentos.

Se suspendieron las células previamente descongeladas a 37°C, en 10 ml de RPMI, se centrifugó a 260 g por 15 minutos y se volvió a suspender en 10 ml de RPMI adicionado de 10 % de suero fetal bovino (SFB) (410F GIBCO) sin antibiótico, colocando 5ml en botella de 25 cm³. Se incubó por 2 horas a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ para lograr la adhesión de las células. Luego, se agregó 1 ml de PBS tibio y con movimientos suaves circulares se procedió a remover las células no adherentes y a descartar el sobrenadante. Se agregaron 5 ml de RPMI con 10 % de SFB adicionado con IL-4 (500 U/ml) y GM-CSF (800 U/ml) a la botella con las células adheridas y se dejó incubando por 2 días en la estufa gaseada a 37°C para lograr su diferenciación.

B. Células HT-29 NF - κB GFP

Se tripsinaron las células y se colocaron 2,5x10⁵ células por inserto en 500 µl de RPMI 10 % SFB. Debajo del inserto se colocaron 500 µl del mismo medio de manera de mantenerlo hidratado durante 2 días. Los insertos utilizados en este ensayo fueron de 12mm con un diámetro de poro de membrana de 3 µm (Corning®).

C. Armado de la placa de co-cultivo y estimulación

Las células dendríticas ya diferenciadas se despegaron de la botella con *scraper*, se centrifugaron a 260 g por 15 minutos y se ajustó la concentración a 2,5x10⁵ células/ml. A esta suspensión se le agregó IL-4 y GM-CSF y se colocaron 500 µl por fosa.

Se colocaron los insertos con las células epiteliales sin medio, sobre la placa con las células dendríticas, y una vez allí se colocaron 300 µl de RPMI con 10% de SFB sobre los mismos.

Se incubó la placa de co-cultivo por 4 horas antes de la estimulación.

Se agregaron las bacterias con una MDI de 30, lipopolisacárido de *E.coli* (LPS) (*E.coli* 026:B6, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) 0,5 µg/ml concentración final y acenocumarol 471 µM por la parte superior del inserto y se incubó por 18 horas a 37°C con atmósfera de 5% CO₂. El agregado de LPS se realizó debido a que es el estímulo positivo para la expresión de las moléculas en estudio (HLA-DR, CD80, CD86 y CD40).

Finalizada la incubación, se separaron los insertos en otra placa de cultivo vacía. Se lavaron las células dos veces con PBS, se tripsinaron para despegarlas de los insertos y se colocaron en tubos de citómetro estando así, listas para la determinación por citometría de flujo.

Respecto a las células dendríticas, sin quitar el medio de incubación se levantaron con tips y se recolectaron para centrifugar a 260 g por 5 minutos. Se tomó el sobrenadante de cada condición y se lo volvió a centrifugar a máxima velocidad con el fin de guardar para una posterior determinación de citoquinas. Las células dendríticas ya lavadas se suspendieron en 50 µl de PBS, para proceder al protocolo de marcación de las mismas con los anticuerpos.

III.4 Evaluación de la expresión de moléculas de superficie en células dendríticas (CD)

La marcación de las células dendríticas se realizó en una placa de 96 pocillos. Se colocaron 25 µl de suspensión de células correspondiente a cada condición por pocillo y se crearon dos mezclas de anticuerpos cuyas diluciones se detallan entre paréntesis. La **mezcla A** contenía HLA-DR (1/25), CD86-PE (1/50) Y CD80-PEy5 (1/25) y la **mezcla B** CD11c APC (1/50), CD40-PE (1/25) agregándose IP en el momento del análisis. También se realizó un **control de diferenciación** con CD11c-APC y CD14-FITC (1/50) y un **control de linfocitos** CD3-FITC (1/50) y CD19-PE (1/50).

Posteriormente al agregado del anticuerpo y su incubación a 4°C en oscuridad por 30 minutos, se lavaron las células con 150 µl de PBS 1% BSA y se centrifugaron a 260 g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 200 µl de PBS 1% BSA volviéndose a centrifugar a 260 g por 5 minutos. Luego se transfirieron las células con 150 µl de PBS 1%

BSA a tubos de citómetro. Las muestras se determinaron con un citómetro CyAn™ ADP (Beckman Coulter) y fueron analizadas con el software FlowJo.

La expresión de los marcadores de superficie fue calculada según la siguiente fórmula:

Indice de expresión (IE) = Porcentaje de células positivas x media del histograma

ENSAYO DE FAGOCITOSIS MEDIDOS POR CITOMETRÍA



III.5 Fagocitosis de CIDCA 5310 y CIDCA 5317 por células dendríticas

Se evaluó la fagocitosis de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 marcadas con FITC (como se explica en el capítulo I, materiales y métodos inciso I.4) utilizando células dendríticas.

El procedimiento de diferenciación y armado de la placa de cultivo de células se llevó a cabo como se explicó anteriormente en el presente capítulo (incisos III.3.A y III.3.C).

El protocolo del ensayo de fagocitosis es el mismo que el realizado con células THP-1 detallado en el capítulo I, inciso I.9, siendo para este experimento la multiplicidad de infección de 10 y la concentración de acenocumarol de 471 μM .

Para la incubación se colocó la placa en estufa a 37°C con atmósfera de 5 % CO_2 durante 1 hora protegiéndola de la luz.

Se calculó la fagocitosis como el porcentaje de células FITC (+) en presencia de azul de tripán multiplicado por la media de su histograma, y la asociación como el porcentaje de células FITC (+) antes del agregado de azul tripán por la media correspondiente, expresado como unidades arbitrarias (UA).

ENSAYOS DE FAGOCITOSIS Y DESTINO INTRACELULAR DETERMINADOS MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

III.6 Fagocitosis y destino intracelular de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 en células dendríticas

Para este ensayo se utilizaron las células dendríticas diferenciadas a partir de monocitos como se detalló anteriormente y se colocaron sobre vidrios en placa de cultivo de 24 pocillos para luego del ensayo poder retirarlos y observarlos por microscopia láser confocal.

Para una mayor adherencia de las células a los vidrios, éstos se pre-trataron con polilisina 0,01 %. Se colocaron 50 µl de esta solución durante 5 minutos, se removió el excedente y se dejó secar 40 minutos. Se colocaron 500 µl de la suspensión de células dendríticas en una concentración de $2,5 \times 10^5$ células/ml, y se dejaron incubando por 18 horas bajo atmósfera con 5% de CO₂, para permitir su completa adherencia a los vidrios.

Para el ensayo de fagocitosis, se agregaron las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 marcadas con FITC, acenocumarol 471 µM y se incubó la placa de cultivo durante 1 hora a 37°C en ambiente con 5% de CO₂, en oscuridad.

Luego de la incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS frío y se procedió a hacer las marcaciones correspondientes.

Para el estudio de localización en compartimientos ácidos, se realizó la marcación con Lyotracker DND-99 200nM 5min (Life Technologies, Carlsbad, California).

Para el estudio de localización en endosomas de reciclaje, se utilizó Transferrina-Alexa-594 10 ug/ml 10 min

Posteriormente, las células dendríticas se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con PFA 4% (v/v) durante 15 minutos a 4°C en oscuridad. Se hizo un lavado con PBS con 1 % de BSA y se agregó HOESCHT 33342 en una concentración final de 0,1mg/ml durante 15 minutos a temperatura ambiente, con la finalidad de teñir ADN y poder evidenciar los núcleos de las células dendríticas.

Se hicieron dos últimos lavados con PBS y se montaron los vidrios en portaobjetos con un medio de montaje (PROLONG, Life Technology) para evitar la pérdida de la marca.

Las muestras fueron analizadas con un microscopio de barrido láser confocal semiespectral Zeiss LSM 800CyAn™ ADP (Beckman Coulter). Para las imágenes se usó una resolución de 8 bits (1024 x 1024 pixels) y para su respectivo análisis se usó el software Fiji-ImageJ.

Se calculó el porcentaje de colocalización como el número de bacterias internalizadas colocalizando con el marcador, referido al número total de bacterias internalizadas.

III.7 Medida de citoquinas en sobrenadante

Luego de la incubación de la placa de co-cultivo, explicado anteriormente en el inciso III.3, se procedió a retirar los sobrenadantes de las células dendríticas. Estos, se centrifugaron a máxima velocidad con el fin de obtener los sobrenadantes aptos para la medición de las citoquinas.

Las citoquinas medidas fueron: IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70 utilizando el Kit Cytometric Bead Array (CBA) de BD y el citómetro CyAn ADP (Beckman Coulter).

III.8 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar. Las diferencias significativas fueron establecidas mediante test t de Student ($p < 0,05$).

RESULTADOS

En el presente capítulo se describen los resultados de la estimulación con las bifidobacterias y el acenocumarol a en un sistema de co-cultivo compuesto por células epiteliales y células dendríticas, evaluando moléculas de superficie en estas últimas y midiendo la activación de la vía NF- κ B en las células epiteliales. A su vez, similar a lo realizado en el capítulo II, se estudió la fagocitosis y el destino intracelular de las dos bacterias en las células dendríticas.

ENSAYOS EN SISTEMA DE CO-CULTIVO

III.1 Expresión de NF- κ B.

La vía desencadenada por la expresión de NF- κ B, está asociada a la detección de diferentes estímulos. Por lo tanto, se estudió qué efecto genera la presencia de CIDCA 5310, CIDCA 5317 y acenocumarol sobre esta vía, en un sistema de co-cultivo con células dendríticas, como se detalla en materiales y métodos III.3. El estudio se realizó también en co-estimulación con LPS, un agonista TLR4 inductor de NF- κ B.

Por un lado, en ausencia de la estimulación con LPS, se observó que la mayor expresión de NF- κ B fue generada en presencia de la cepa CIDCA 5310, siendo este aumento disminuido por el acenocumarol. Por otro lado, las células incubadas con acenocumarol generaron una menor expresión del gen respecto a las células en ausencia del fármaco (**Figura III.1**).

Como se puede apreciar en la **figura III.2**, la estimulación ejercida por el LPS, agregado sobre las células epiteliales, generó un aumento significativo de la expresión de NF- κ B en todas las condiciones, excepto en aquellas en donde se incubó con acenocumarol. Es decir, que la presencia del fármaco disminuyó significativamente la expresión del gen en todas las condiciones evaluadas. Además la estimulación con CIDCA 5310 disminuyó la expresión respecto al control con LPS solo (**Figura III.2**).

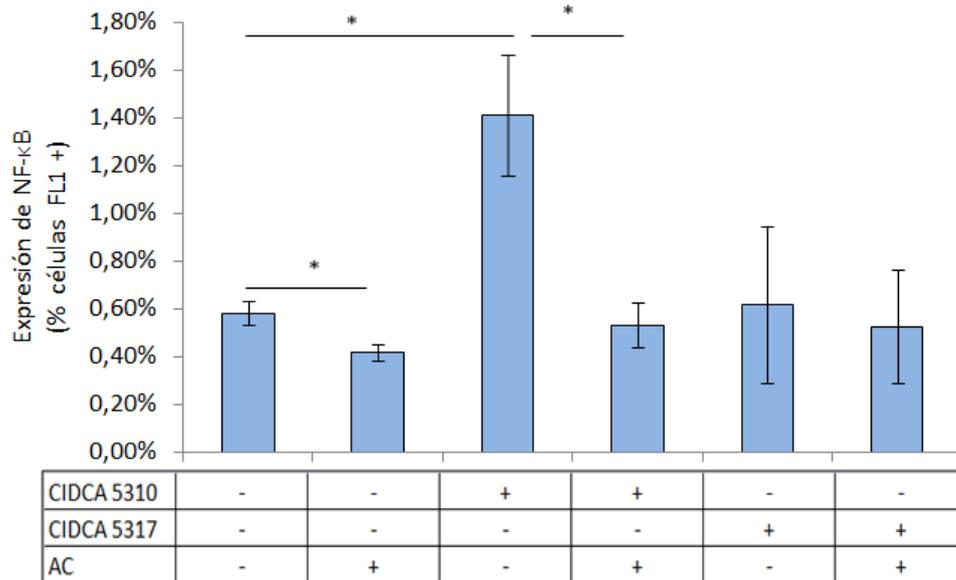


Figura III.1 Expresión de NF-κB, indicado como porcentaje de células FL1 positivas, en células HT-29 NF-κB GFP en sistema de co-cultivo con células dendríticas, incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos (*P < 0,05).

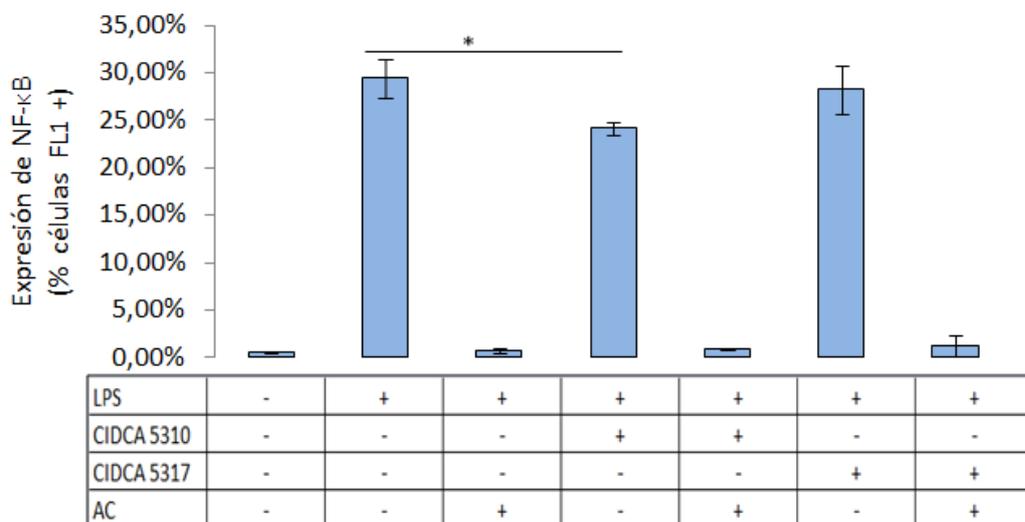


Figura III.2 Expresión de NF-κB, indicado como porcentaje de células FL1 positivas, en células HT-29 NF-κB GFP en sistema de co-cultivo con células dendríticas, incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos (*P < 0,05).

III.2 Expresión de moléculas de superficie en células dendríticas en sistema de co-cultivo con células epiteliales.

El estudio de la expresión de moléculas de superficie, como se explicó en el capítulo II, proporciona información acerca del estado de activación celular. En el presente inciso se muestran los resultados obtenidos de la expresión de la molécula de HLA-DR, CD86 y CD40 en células dendríticas en co-cultivo con células epiteliales.

En la **figura III. 3** se observan los gráficos de citometría de flujo donde en el gráfico III.3.A se muestra con un círculo la población celular elegida para analizar (células dendríticas) y en el gráfico III.3.B se muestra la exclusión de dobletes. A partir de estas selecciones se procedió a medir la expresión de las moléculas de superficie mencionadas anteriormente.

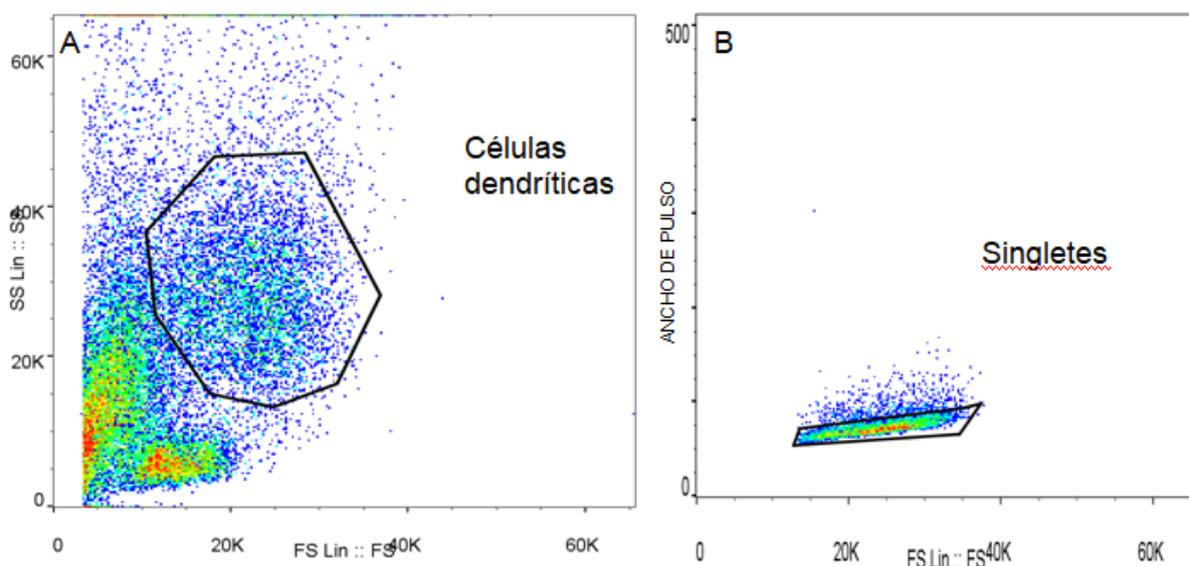


Figura III.3 Selección de células dendríticas (A) con exclusión de dobletes (B) mediante citometría de flujo, para determinar la expresión de moléculas de superficie.

→ Expresión de HLA-DR en células dendríticas en co-cultivo.

Luego de la incubación durante 18 horas con las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317, acenocumarol y LPS según corresponda, se estudió la expresión de HLA-DR.

En las incubaciones realizadas en ausencia del estímulo de LPS, se observó el aumento significativo de la expresión de la molécula HLA-DR en presencia de la cepa CIDCA 5310 (IE: $19761 \pm 373,35$) y de la cepa CIDCA 5317 (IE: $16148,5 \pm 173,24$), respecto al control sin estímulo alguno (IE: $11590 \pm 251,73$). Por otro lado, la presencia del anticoagulante disminuyó significativamente ($P < 0,05$) la expresión de esta molécula generado por cada una de las cepas (**Figura III.4**).

La presencia de LPS generó el aumento significativo de la expresión de HLA-DR (IE: $24944,25 \pm 79,55$), y tanto la presencia de acenocumarol (IE: $18832,25 \pm 187,03$) como la de la cepa CIDCA 5317 (IE: $21371,5 \pm 6,36$) disminuyeron de manera significativa la expresión de la misma (**Figura III.5**).

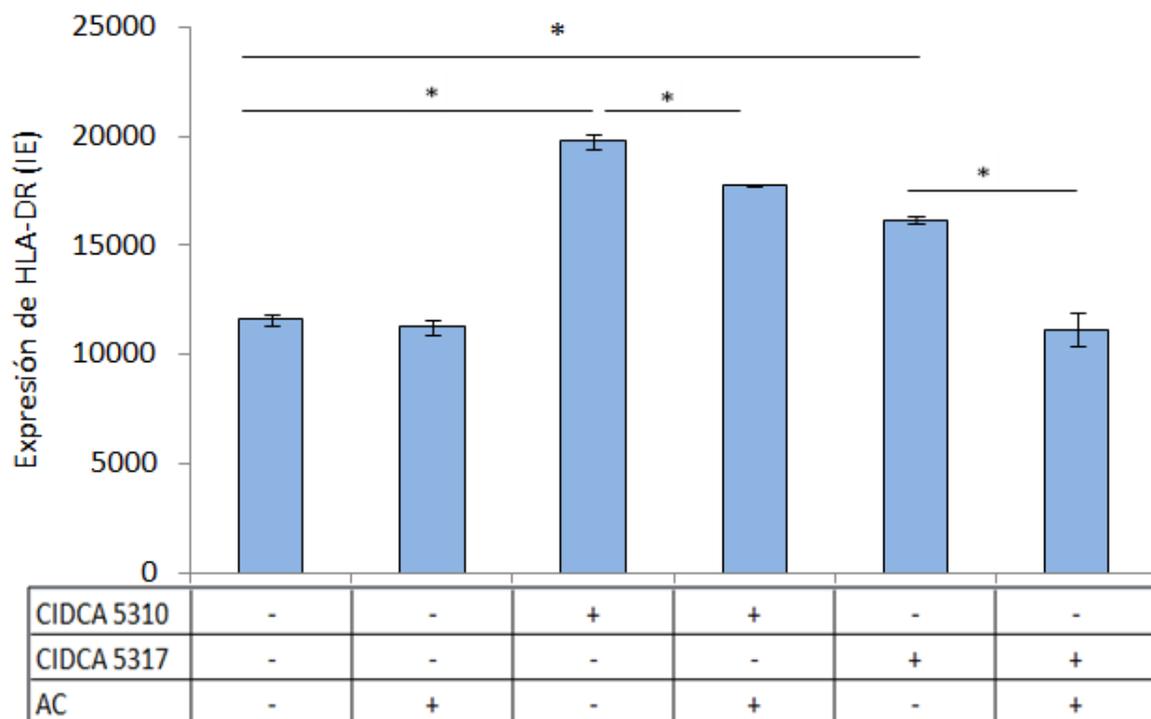


Figura III.4 Expresión de HLA-DR, indicado como índice de expresión (IE), en células dendríticas en sistema de co-cultivo con células epiteliales, incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos (* $P < 0,05$).

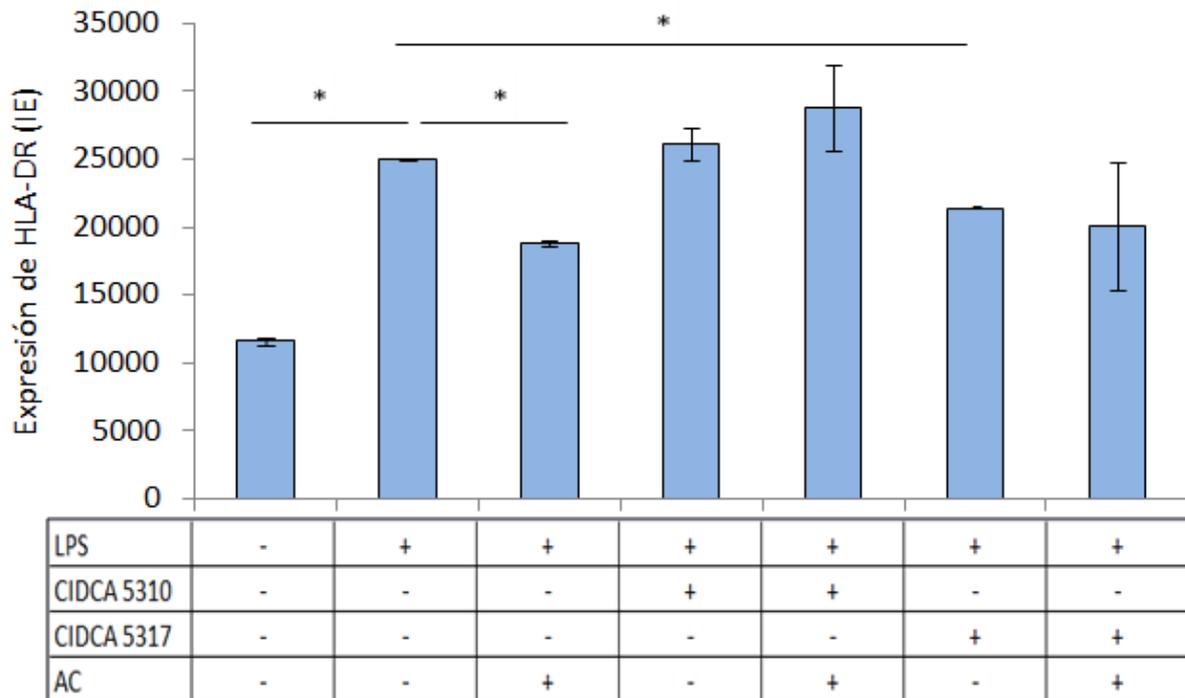


Figura III.5 Expresión de HLA-DR, indicado como índice de expresión (IE), en células dendríticas en sistema de co-cultivo con células epiteliales, incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos (*P < 0,05).

→ Expresión de CD86 en células dendríticas en co-cultivo.

El marcador CD86 es una de las moléculas coestimuladoras junto con CD80, cuya función es mediar en la interacción de células T con las células presentadoras de antígenos. Su expresión brinda información acerca de la activación de la célula, en este caso de las células dendríticas.

La expresión de esta molécula coestimuladora, dio como resultado en todas las condiciones en ausencia de LPS, un aumento significativo de la expresión (**Figura III.6**). Sin embargo, la mayor expresión se obtuvo cuando se estimuló con las bacterias solas (CIDCA 5310, IE: 52492,25 ± 515,83; CIDCA 5317, IE: 42406,33 ± 2323,38), ya que en presencia de acenocumarol esa expresión disminuyó (CIDCA 5310, IE: 33526 ± 1530,18; CIDCA 5317, IE: 29526,5 ± 4336,69) significativamente (P < 0,05), aunque siguió siendo mayor que el control sin estimular (14702,83 ± 2072,11) (**Figura III.6**).

En relación a los resultados obtenidos utilizando LPS como estímulo, se observó un aumento en la expresión del marcador con el agonista TLR4, y además el acenocumarol provocó una disminución significativa en todas las muestras donde está presente (LPS, IE: $63488 \pm 1329,36$; CIDCA 5310, IE: $67216,75 \pm 364,51$; CIDCA 5317, IE: $69577,25 \pm 8478,56$) respecto a las condiciones en ausencia del mismo (LPS, IE: $149303,75 \pm 3625,69$; CIDCA 5310, IE: $149063,25 \pm 4666,55$; CIDCA 5317, IE: $146448,5 \pm 3069,55$) (**Figura III.7**). La presencia de las cepas no modificó la expresión en células estimuladas con LPS (**Figura III.7**).

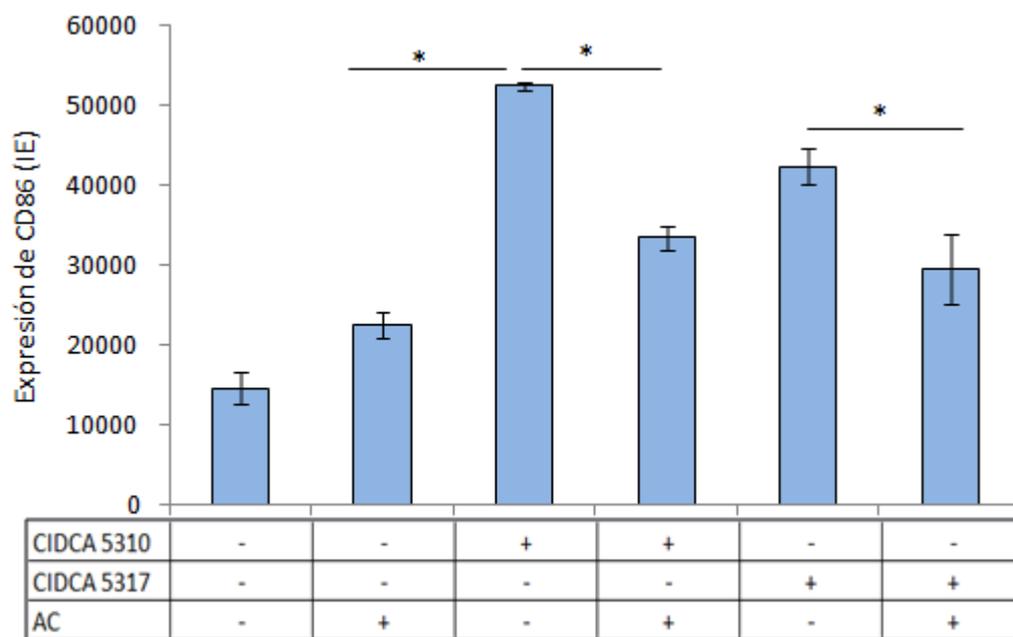


Figura III.6 Expresión de CD86, indicado como índice de expresión (IE), en células dendríticas en sistema de co-cultivo con células epiteliales, incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos (*P < 0,05).

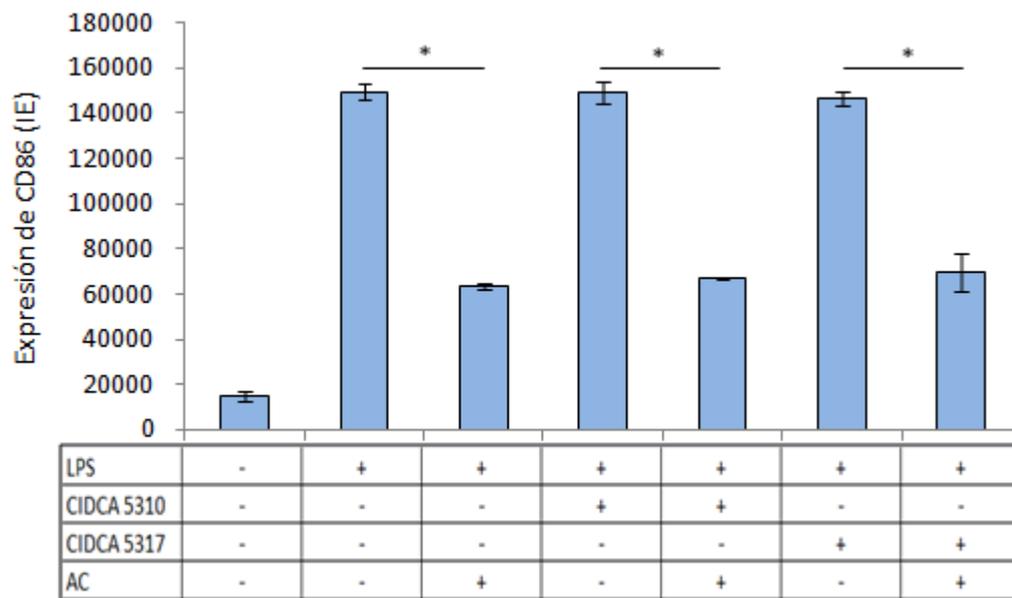


Figura III.7 Expresión de CD86, indicado como índice de expresión (IE), en células dendríticas en sistema de co-cultivo con células epiteliales, incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos (*P < 0,05).

→ Expresión de CD40 en células dendríticas en co-cultivo.

La molécula CD40 está presente en varias células del sistema inmune, principalmente en células presentadoras de antígenos profesionales. Su expresión está relacionada con la inducción de la respuesta inmune humoral y celular eficiente.

Los resultados de la expresión de CD40 se pueden observar en la **figura III.8**. En ausencia de LPS, no se encontró ningún efecto generado por las bacterias, sin embargo, la presencia del acenocumarol disminuyó la expresión de este receptor significativamente ($1586,66 \pm 34,53$), respecto al control sin estimular ($1911 \pm 4,24$). Asimismo, la presencia de acenocumarol en las células estimuladas con la cepa CIDCA 5310 ($1888 \pm 68,17$), también generó un descenso significativo, respecto a las células estimuladas sólo con la bacteria ($2183,66 \pm 155,05$) (**Figura III.8**).

En presencia de la estimulación con LPS, el acenocumarol (IE: $1751,5 \pm 47,99$), y CIDCA 5317 (IE: $2081,83 \pm 296,21$) disminuyeron la expresión del receptor significativamente, respecto al control estimulado sólo con LPS (IE: $2678,5 \pm 167,55$). Además, la estimulación

con acenocumarol (IE: $1886,5 \pm 375,89$) disminuyó significativamente la expresión inducida por la presencia de CIDCA 5310 (IE: $2992,83 \pm 325,39$) (**Figura III.9**).

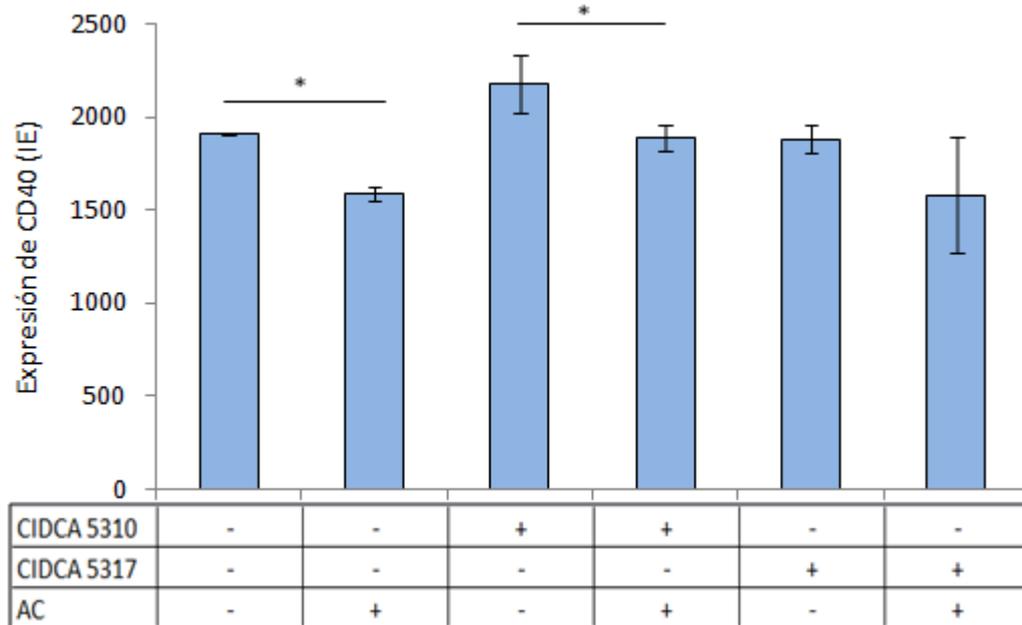


Figura III.8 Expresión de CD40, indicado como índice de expresión (IE), en células dendríticas en sistema de co-cultivo con células epiteliales, incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos (*P < 0,05).

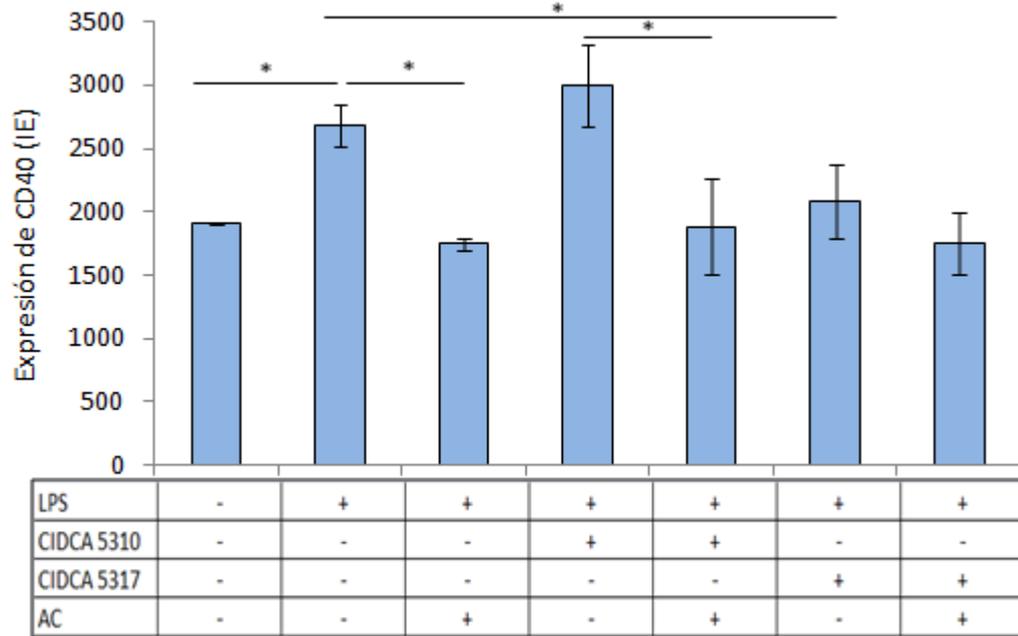


Figura III.9 Expresión de CD40, indicado como índice de expresión (IE), en células dendríticas en sistema de co-cultivo con células epiteliales, incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos (*P < 0,05).

☀ III.3 Medida de la concentración de citoquinas en sobrenadante de células dendríticas en co-cultivo con células epiteliales

La fagocitosis, la presentación de antígenos y la secreción de citoquinas, es un resumen de la acción de las células dendríticas frente al reconocimiento de un microorganismo, dependiendo del tipo de microorganismo que esté presente el grado de la respuesta celular inmune.

Una manera de estudiar el grado de respuesta frente a distintos estímulos es a través de la medida de la concentración de citoquinas presentes. Por lo tanto, se midió la concentración de citoquinas relevantes TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 IL-10 e IL-12 en el sobrenadante de las células dendríticas en co-cultivo, estimuladas con las bacterias, acenocumarol y LPS por 18 horas.

Los gráficos expuestos muestran las tres aféresis de los donantes de las cuales provinieron las células dendríticas con las que se trabajó.

Los resultados muestran la tendencia a un aumento de TNF- α en presencia de ambas cepas, con un aumento mayor en presencia de acenocumarol y la cepa CIDCA 5310, mientras que en presencia de la cepa CIDCA 5317, el acenocumarol tiende a disminuir la concentración de esta citoquina (**Figura III.10**). Respecto a la concentración de IL-1 β se observa un aumento cuando están en conjunto las cepas con acenocumarol (**Figura III.11**). En la **figura III.12** se observa la tendencia al aumento de la concentración de IL-6, en presencia de ambas cepas y aún más con acenocumarol. Por otro lado, la presencia de la cepa CIDCA 5310 generó el aumento de la concentración de IL-8 (**Figura III.13**). La concentración de IL-10 e IL-12 tiende a aumentar en presencia de la cepa CIDCA 5310 (**Figura III.14 y Figura III.15**), disminuyendo la concentración de esta última citoquina en presencia de acenocumarol (**Figura III.15**). Aunque es de resaltar que estas dos citoquinas han dado una gran variabilidad intra e inter donantes.

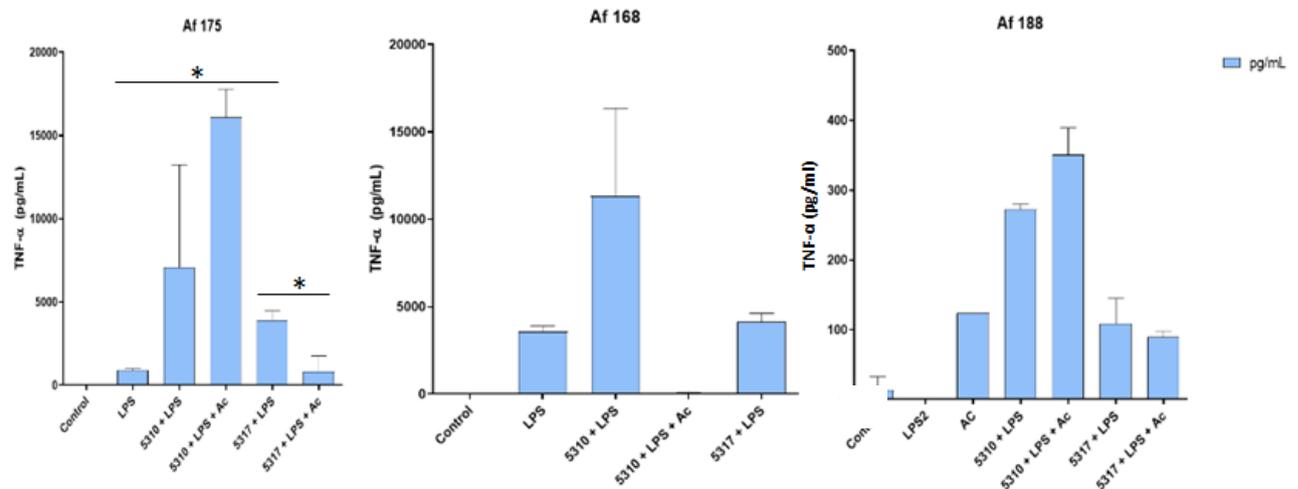


Figura III.10 Concentración de TNF- α , medido en pg/ml, en sobrenadante de células dendríticas en co-cultivo con células epiteliales incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos (* $P < 0,05$).

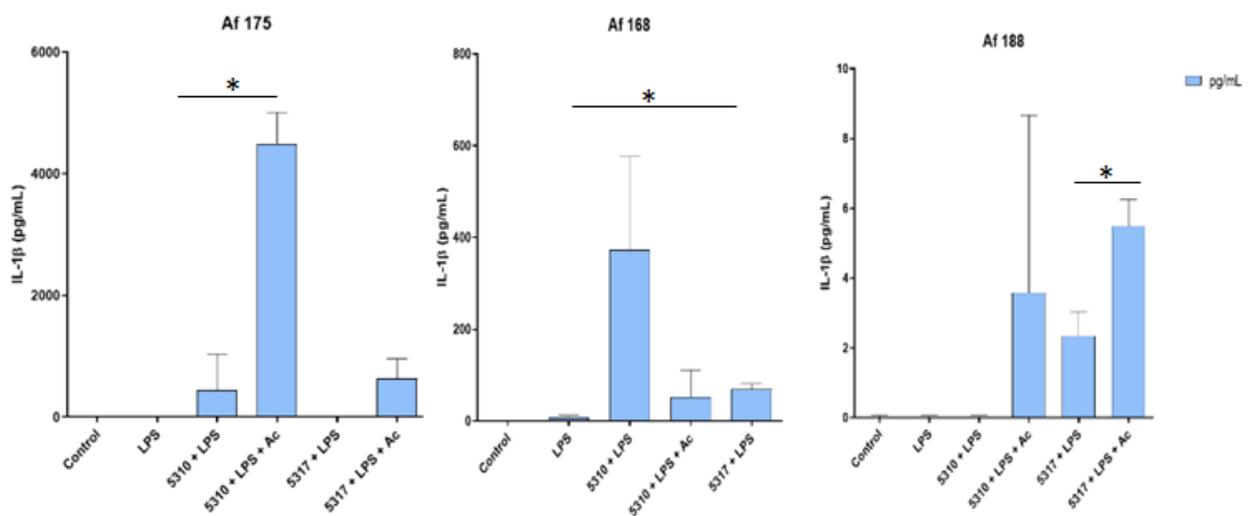


Figura III.11 Concentración de IL1- β , medido en pg/ml, en sobrenadante de células dendríticas en co-cultivo con células epiteliales incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos (* $P < 0,05$).

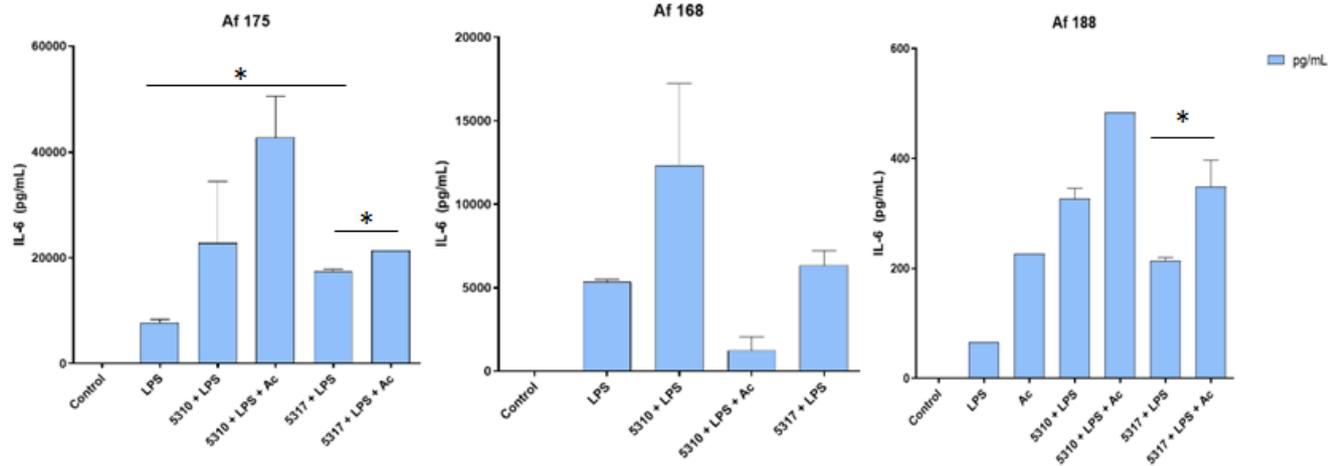


Figura III.12 Concentración de IL-6, medido en pg/ml, en sobrenadante de células dendríticas en co-cultivo con células epiteliales incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos (* $P < 0,05$).

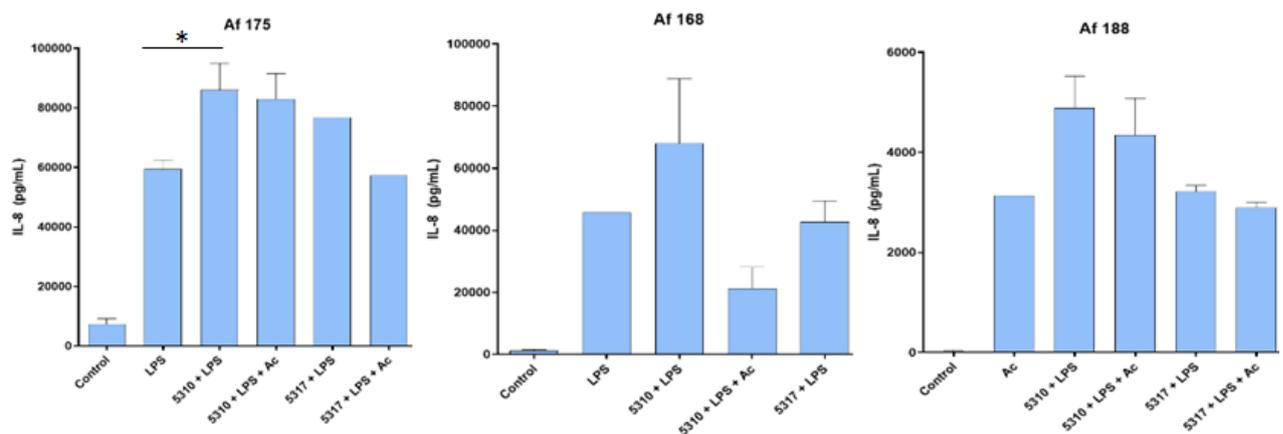


Figura III.13 Concentración de IL-8, medido en pg/ml, en sobrenadante de células dendríticas en co-cultivo con células epiteliales incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos.

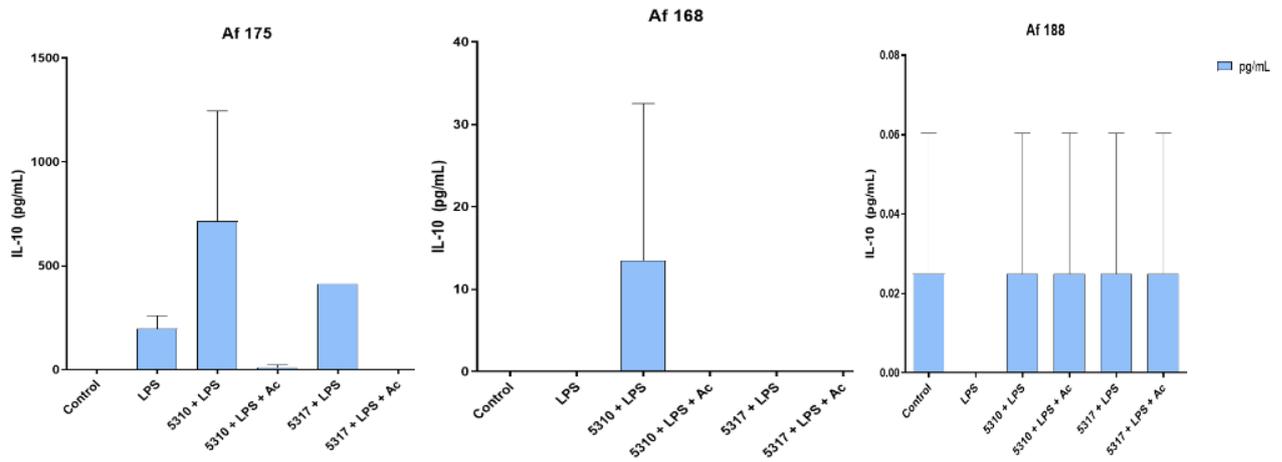


Figura III.14 Concentración de IL-10, medido en pg/ml, en sobrenadante de células dendríticas en co-cultivo con células epiteliales incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos.

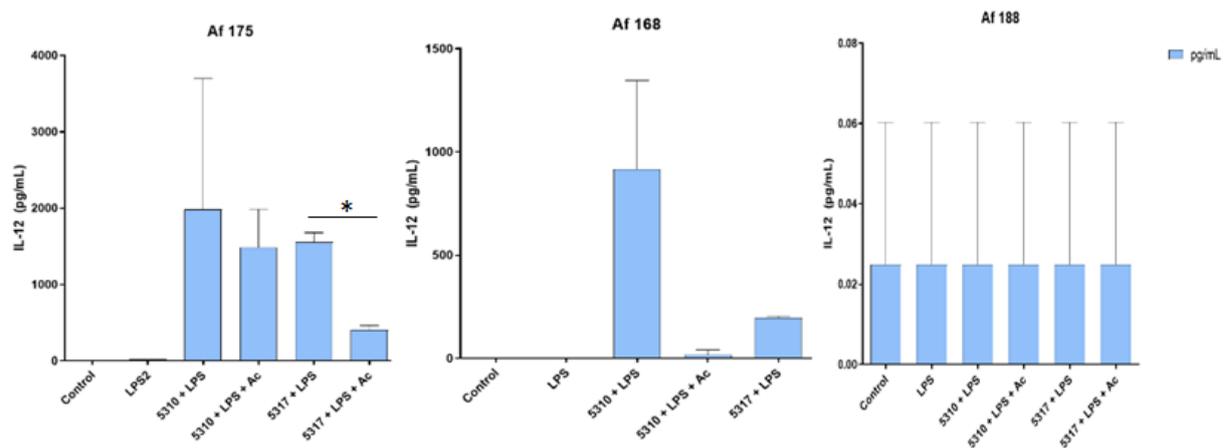


Figura III.15 Concentración de IL-12, medido en pg/ml, en sobrenadante de células dendríticas en co-cultivo con células epiteliales incubadas durante 18 horas con diferentes estímulos.

☀ III.4 Fagocitosis de bifidobacterias por células dendríticas y efecto del acenocumarol.

Aunque las células dendríticas son consideradas como fagocitos profesionales al igual que macrófagos y neutrófilos, el resultado funcional del evento fagocítico en células dendríticas es diferente. Mientras que la función principal en macrófagos y neutrófilos es degradar la partícula fagocitada, las células dendríticas preservan mayor información de estas partículas, necesaria para luego desencadenar una respuesta inmune adaptativa eficiente. Además las células dendríticas no poseen el potencial degradativo y de acidificación como sí lo poseen los otros dos tipos celulares (Rescigno and Sabatino, 2009) .

Debido a las diferencias en el proceso de fagocitosis entre macrófagos (estudiado en el capítulo II) y células dendríticas, se estudió en el corriente capítulo la fagocitosis de las bifidobacterias y el efecto del acenocumarol en un sistema de cultivo simple con células dendríticas.

Semejante a los resultados ya obtenidos con células THP-1, se observó una mayor asociación (adhesión + fagocitosis) y fagocitosis de CIDCA 5310 ($89,36 \pm 5,54$; $63,11 \pm 15,78$) respecto a la cepa CIDCA 5317 ($21,88 \pm 3,28$; $16,74 \pm 2,66$).

Por otro lado, la co-incubación de la cepa CIDCA 5310 con acenocumarol durante 1 hora no modificó ni la asociación ni la fagocitosis ($89,37 \pm 4,82$ y $67,37 \pm 6,82$, respectivamente). Sin embargo, la presencia del anticoagulante provocó la disminución significativa de la asociación y de la fagocitosis de CIDCA 5317 ($12,19 \pm 1,99$; $4,80 \pm 0,90$) (**Figura III.16**).

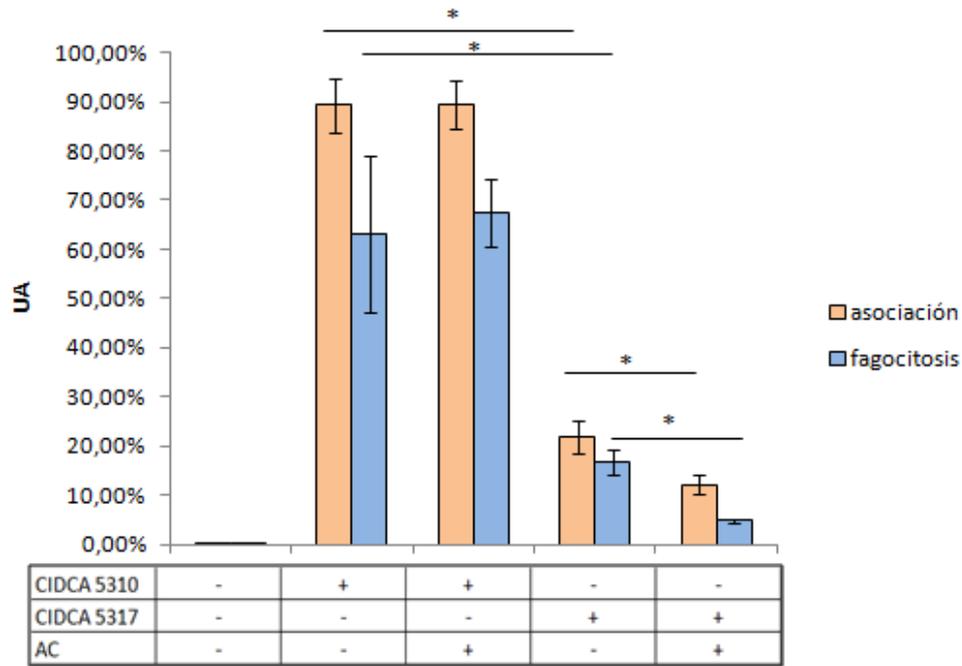


Figura III.16 Fagocitosis y asociación de CIDCA 5310 y CIDCA 5317 expresado como unidades arbitrarias (UA), en células dendríticas incubadas durante 1 hora (* $P < 0,01$).

☀ III.5 Fagocitosis de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 medido por microscopía confocal.

Se estudió la fagocitosis a través de microscopía láser confocal, observándose una mayor proporción de células que han fagocitado la cepa CIDCA 5310 ($26,16 \pm 12,69$) que a la cepa CIDCA 5317 ($7,60 \pm 6,93$) (Tabla III.1).

Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes, contando 20 células en cada uno de ellos a través del software Image J. Debido a que se trabajó con distintas aféresis de células dendríticas, es decir con distintos donantes, se ha encontrado mucha variabilidad entre las muestras, por lo que los resultados presentes en este inciso no son significativos ($P=0,2$). Se encontró que un $26 \% \pm 12,9$ de células dendríticas fagocitaron la cepa CIDCA 5310, y un $8 \% \pm 6,9$ fagocitaron la cepa CIDCA 5317.

☀ III.6 Destino intracelular de la cepa CIDCA 5310 en células dendríticas.

Debido a los resultados obtenidos a lo largo de la presente tesis, que indican la diferente actividad fagocítica de las células (tanto macrófagos como células dendríticas) sobre las dos cepas en estudio, se decidió indagar sobre el destino intracelular de la cepa CIDCA 5310 para la cual se obtuvieron los mayores valores de fagocitosis.

El estudio del destino intracelular se realizó mediante microscopía láser confocal, y a través del software ImageJ se seleccionaron aquellas células que contenían bacterias internalizadas y sobre estas se evaluó el porcentaje de células cuyas bacterias colocalizaban con la marca lisosomal.

Como se puede notar en la **figura III.17**, las bacterias fagocitadas se dirigieron principalmente a compartimentos lisosomales ($71\% \pm 2$).

En la **figura III.18** se observa una imagen de un corte en el plano z donde se visualiza la coloración amarilla, resultado de la superposición de los colores rojo (LysoTracker) y verde (FITC), lo que evidencia la colocalización.

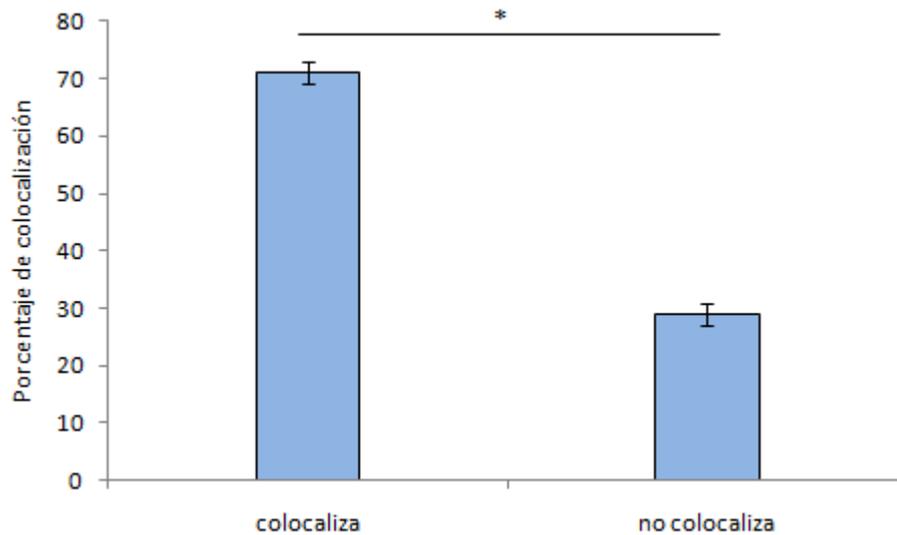


Figura III.17 Colocalización de la cepa CIDCA 5310 con el marcador lisosomal, por células dendríticas incubadas durante 1 hora. Los resultados se expresan en porcentaje de células con bacterias internalizadas (* $P < 0,01$).

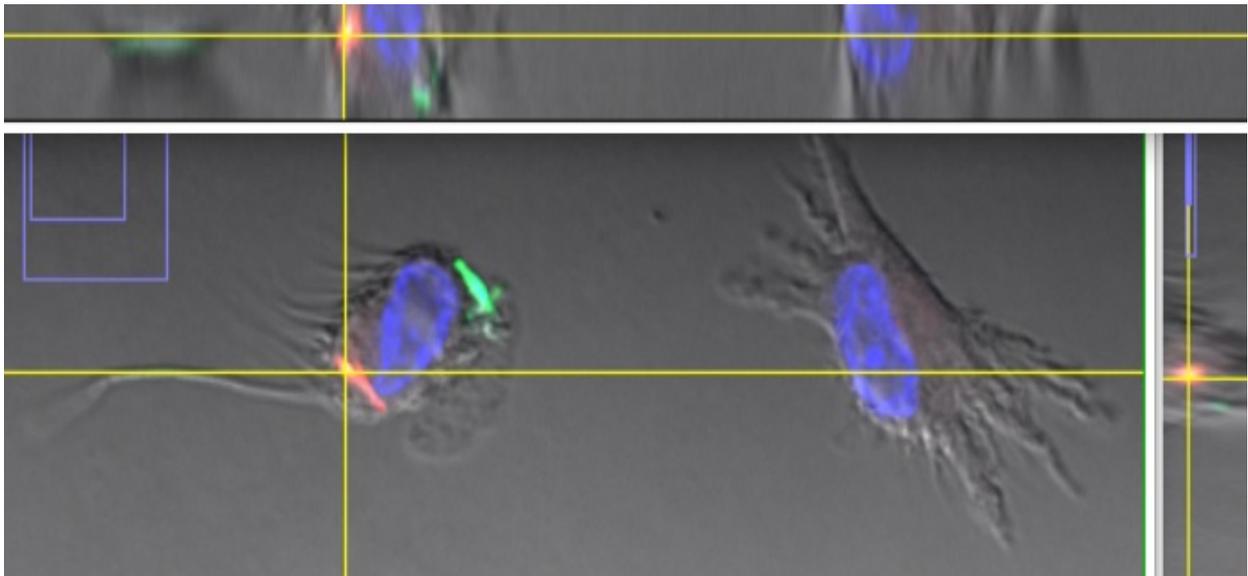


Figura III.18 Colocalización (zona amarilla), de la cepa CIDCA 5310 (en verde) con el compartimento lisosomal (en rojo) en células dendríticas cuyos núcleos se observan en color azul. Imagen de un corte en el plano z obtenida del software Image J, mediante microscopía láser confocal.

☀ III.7 Efecto del acenocumarol sobre el destino intracelular de la cepa CIDCA 5310 en células dendríticas.

Los resultados expuestos anteriormente mostraron una alta capacidad fagocítica de las células dendríticas sobre la cepa CIDCA 5310 y su evidente destino lisosomal, por lo tanto, se decidió estudiar si la presencia de acenocumarol modificaba estos resultados.

En presencia del fármaco el porcentaje de colocalización disminuyó, obteniéndose un $25\% \pm 35,36$ respecto a las células que fagocitaron dicha cepa en ausencia del anticoagulante ($71\% \pm 2$), aunque esta diferencia no resultó ser significativa (Tabla III.1). Es importante resaltar que el número total de bacterias internalizadas fue el mismo en ambas condiciones.

Tabla III.1 Efecto del acenocumarol sobre el tráfico hacia lisosomas.

	Colocaliza		No colocaliza	
	PROMEDIO	DS	PROMEDIO	DS
CIDCA 5310	71	2	29	2
CIDCA 5310 + AC	25	35,36	75	35,36

Bibliografía

Rescigno, M. and Sabatino, A. Di (2009) 'Science in medicine Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease', 119(9), pp. 2441–2450. doi: 10.1172/JCI39134.of.

DISCUSIÓN

En el presente capítulo se estudió el efecto de bifidobacterias (cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317) y acenocumarol sobre otro tipo de célula presentadora de antígenos, las células dendríticas. El motivo de la elección de este modelo celular para el estudio radica, en que son células que están implicadas tanto en el mantenimiento de la tolerancia a la microbiota comensal como en la generación de respuestas inmunes protectoras contra patógenos intestinales. Estas células son capaces de muestrear directamente los antígenos presentes en el intestino proyectando sus dendritas hacia el lumen, dirigiéndose posteriormente a órganos linfoides secundarios, donde presentan estos antígenos a células T, permitiendo así desarrollar la respuesta inmune (Rescigno and Sabatino, 2009).

Las células dendríticas se pueden encontrar en dos estados funcionales diferentes. Las células dendríticas inmaduras, presentes en tejidos periféricos y con gran capacidad fagocítica y las células dendríticas maduras, presentes en órganos linfáticos, las cuales poseen alta expresión de moléculas de superficie coestimuladoras, ya que están especializadas en la presentación antigénica (Rescigno and Sabatino, 2009). La maduración de las células dendríticas se desencadena a partir del contacto con un componente estructural microbiano o viral o con citoquinas pro-inflamatorias, cambiando su perfil funcional hacia un aumento de la capacidad de estimular células T (Savina and Amigorena, 2007; Rescigno and Sabatino, 2009).

En el contexto de la inmunidad intestinal, las células epiteliales también juegan un rol importante a través de la secreción de mediadores peptídicos como defensinas, mucinas, quemoquinas y citoquinas (Stadnyk, 2002; Corfield, 2015). Además, se ha reportado que la modulación de las células epiteliales por microorganismos probióticos puede generar la maduración de las células dendríticas presentes en la *lamina propria* (Kim, Park and Ji, 2012).

Debido a que tanto las células epiteliales intestinales como las células dendríticas son reguladores claves de la homeostasis intestinal, y su intercomunicación se entiende necesaria para el desencadenamiento de una respuesta inmune, se decidió emplear el modelo de co-cultivo, en donde ambos tipos celulares están presentes (Haller *et al.*, 2002; Tiscornia *et al.*, 2012; Rolny *et al.*, 2016). De esta manera se estudió el efecto de las bifidobacterias seleccionadas y de acenocumarol sobre las células epiteliales (HT-29 NF- κ B GFP) y sobre la expresión de moléculas de superficie y la secreción de citoquinas en células dendríticas.

A partir de las células epiteliales HT-29 NF- κ B GFP se evaluó la activación de la vía NF- κ B. La expresión de esta proteína se produce bajo un ambiente pro-inflamatorio. En este sentido, en primer lugar, en ausencia de LPS, se observó la disminución de la expresión basal de NF- κ B en presencia de acenocumarol y el aumento significativo de la misma en presencia de la cepa CIDCA 5310. Sin embargo, bajo la estimulación con LPS, la cepa CIDCA 5310 fue capaz de modular la respuesta, disminuyendo la expresión de NF- κ B, como así también se observó para el anticoagulante. La disminución de la activación de esta vía bajo la estimulación con acenocumarol, es compatible con un efecto inmunomodulador del mismo, el cual ya había sido sugerido por otros autores (Schroeksnadel *et al.*, 2013; Warzecha *et al.*, 2016). Se ha observado *in vitro* la capacidad del acenocumarol de disminuir la concentración de neopterin en macrófagos activados con IFN- γ , así como también de disminuir la concentración de citoquinas pro-inflamatorias y generando la disminución de vías desencadenadas por LPS vía TLR (Schroeksnadel *et al.*, 2013), además se ha demostrado *in vivo* que el tratamiento con bajas dosis de acenocumarol antes o después de la generación de la pancreatitis aguda en ratas, reduce la inflamación generada en este modelo (Warzecha *et al.*, 2016, 2017).

Es importante destacar, el diferente efecto en la respuesta celular que generaron ambas bacterias y cómo las condiciones del microambiente afectaron a dicha respuesta. En este caso, el efecto inmunomodulador de la cepa CIDCA 5310 cambió de acuerdo a las condiciones inflamatorias de su entorno. Por un lado, generó una activación de la vía NF- κ B en ausencia de estímulo inflamatorio descrito asimismo en bacterias probióticas (Karlsson *et al.*, 2012; Rolny *et al.*, 2016) y por otro, generó una inmunoregulación del efecto del LPS, mientras que la cepa CIDCA 5317 no mostró efecto.

La capacidad de la cepa CIDCA 5310 de generar diferentes respuestas celulares, de acuerdo a su entorno inflamatorio, podría ser uno de los mecanismos de su acción probiótica.

Continuando con el estudio de las células en sistema de co-cultivo, se evaluó la expresión de moléculas de superficie en las células dendríticas. Estas moléculas fueron HLA-DR, CD86 y CD40, cuya expresión tiene lugar en el caso de las células dendríticas, cuando estas se encuentran maduras y con alta presentación antigénica (Weiss *et al.*, 2011; Kim, Park and Ji, 2012).

El estudio de la expresión de HLA-DR mostró que las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 fueron capaces de aumentar la expresión de la molécula necesaria para la presentación antigénica, aún en células dendríticas en co-cultivo. Así como también, fueron capaces de aumentar la expresión de la molécula coestimuladora CD86. Estos resultados se relacionan con varios estudios en donde se observa la inducción de la expresión de la molécula de HLA-DR y de moléculas coestimuladoras por estimulación con cepas probióticas en células dendríticas (Mohamadzadeh *et al.*, 2005; Niers *et al.*, 2007; Kim, Park and Ji, 2012).

En presencia de un agonista TLR4 como es el LPS, tanto el acenocumarol como la cepa CIDCA 5317 fueron capaces de disminuir la expresión de HLA-DR, mostrando una vez más la capacidad inmunomoduladora del anticoagulante y mostrando la capacidad que tiene CIDCA 5317 de disminuir la respuesta generada por el LPS. Esta disminución se mantuvo en la expresión de CD86 generada por el acenocumarol en todas las condiciones presentes, pero las bacterias no modificaron el efecto del LPS, para este marcador.

La disminución observada en la expresión de HLA-DR en presencia de LPS por parte del acenocumarol y de la cepa CIDCA 5317, también se observó para el marcador CD40.

En conclusión, se puede decir que la estimulación de las células epiteliales con las bifidobacterias o acenocumarol generan diferentes efectos sobre las células dendríticas, provocando cambios en la expresión de moléculas de activación. El anticoagulante provocó un efecto inmunomodulador disminuyendo la expresión de las moléculas evaluadas, efecto más evidente aún en presencia de un ambiente inflamatorio, como es bajo la estimulación con LPS. Teniendo en cuenta que el acenocumarol podría interferir en los procesos desencadenados por LPS (Schroecksnadel *et al.*, 2013), se podría explicar entonces la baja expresión de NF- κ B observada en presencia del acenocumarol, con la consecuente producción de citoquinas antiinflamatorias y por lo tanto generando la disminución de la expresión de moléculas presentes en células dendríticas activadas.

Haciendo referencia a la estimulación con las bacterias, estos resultados una vez más denotan los diferentes efectos que una misma cepa puede generar sobre la respuesta celular dependiendo de la presencia, en este caso de un estímulo pro-inflamatorio, el LPS. Si bien ambas cepas fueron capaces de activar a la célula dendrítica, la única cepa capaz de disminuir la respuesta celular en presencia de un agonista TLR4, fue la cepa CIDCA 5317.

Por otro lado, el efecto observado sobre las células dendríticas podría relacionarse con una intercomunicación a través de factores solubles generados por las células epiteliales

ubicadas en el compartimento superior del sistema de co-cultivo.(Rescigno and Sabatino, 2009; Kim, Park and Ji, 2012; Rolny *et al.*, 2016).

Así como la estimulación con cepas probióticas puede generar diferentes perfiles de expresión de moléculas coestimuladoras en células dendríticas, también tienen influencia en la producción de citoquinas, a partir de las cuales se inicia la respuesta adaptativa.

La importancia de las citoquinas radica, dentro de sus amplias funciones, en la unión a receptores de membrana específicos para desencadenar vías celulares de aumento o disminución de la expresión de varios genes relevantes para la respuesta celular. La medición de la concentración de citoquinas, sirve para determinar el perfil inflamatorio caracterizado por la presencia de IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-1 β o por las citoquinas IL-10, TGF- β en un ambiente regulador, para mencionar ejemplos de algunas de ellas (Azad, Sarker and Wan, 2018).

La producción de estas citoquinas bajo la estimulación de cepas probióticas, permite definir un criterio de selección entre dos categorías de probióticos como explica Azad *et al.* (Azad, Sarker and Wan, 2018). Los probióticos llamados inmunomoduladores, tienen la capacidad de actuar frente a procesos infecciosos o frente a células malignas, induciendo la producción de IL-12, la cual activa células NK y desarrolla respuestas Th1. Por otro lado, los probióticos llamados inmunoregulatorios, están caracterizados por la producción de IL-10 y de células T reguladoras (Treg), lo cual resulta en una disminución de procesos alérgicos, de enfermedades autoinmunes y de respuestas inflamatorias (Azad, Sarker and Wan, 2018).

De manera de caracterizar el perfil de citoquinas generados por las cepas CIDCA 5310, CIDCA 5317 y acenocumarol en presencia de LPS, en sistema de co-cultivo, se determinó la concentración de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IL-10 e IL-12, presentes en los sobrenadantes de las células dendríticas.

Las concentraciones de TNF- α , IL-8, IL-6 e IL-10 se vieron aumentadas en presencia de las cepas de bifidobacterias, siendo la secreción de IL-12 mayor en presencia de CIDCA 5310 que en presencia de CIDCA 5317. Se podría hipotetizar que la cepa CIDCA 5310 posee un perfil más inmunoactivador caracterizado por el incremento de IL-12, IL-8 y TNF- α , lo cual estaría relacionado con el efecto protector de esta cepa, habiéndose descrito previamente la producción de citoquinas pro-inflamatorias por microorganismos probióticos (Tiscornia *et al.*, 2012; Rolny *et al.*, 2016).

En cuanto a la cepa CIDCA 5317 se podría sospechar de un efecto inmunoregulador de acuerdo a las categorías propuestas por Azad et al (Azad, Sarker and Wan, 2018), ya que si bien el perfil de citoquinas proinflamatorias aumenta también, lo hace en menor medida que la cepa CIDCA 5310. Por otro lado, la presencia de acenocumarol junto con las bacterias tendría una tendencia a aumentar la secreción de IL-1 β , citoquina que se libera por estímulos inflamatorios.

Sin embargo, observamos que los resultados encontrados de las concentraciones de citoquinas poseen gran variabilidad entre las aféresis estudiadas. Este hecho se puede entender debido a que las células dendríticas fueron obtenidas a partir de monocitos aislados de 3 individuos donantes de sangre, por lo que el estado inicial de las células es diferente. Esta variación interindividual agrega un elemento más al estudio de los probióticos, entendiendo de acuerdo a los resultados mencionados previamente, que la respuesta celular generada va a depender del estado de activación o diferenciación celular dado por las condiciones de su entorno.

Como se explicó en el comienzo de la corriente discusión, las células dendríticas maduras no poseen una eficiente capacidad fagocítica, sino que se especializan en la presentación de antígenos (Savina and Amigorena, 2007; Rescigno and Sabatino, 2009). En otros trabajos se estudió la capacidad de macrófagos y de células dendríticas de inactivar eficientemente bacterias comensales, observándose la capacidad de macrófagos de matar a esas bacterias en 4 horas, mientras que en células dendríticas las mismas pudieron sobrevivir (Macpherson and Uhr, 2014). Teniendo en cuenta estas diferencias entre los dos tipos celulares, y habiendo evaluado la fagocitosis en macrófagos previamente, se decidió estudiar el proceso fagocítico en células dendríticas.

Tanto la fagocitosis, la eliminación de la sustancia fagocitada, como la presentación de antígenos son procesos que ocurren en macrófagos y células dendríticas pero de manera distinta como explican Savina et al (Savina and Amigorena, 2007). De cualquier modo, los resultados encontrados de la fagocitosis de estas dos bacterias y de su destino celular en células dendríticas son similares a aquellos obtenidos previamente en macrófagos. Como resultado se obtuvo una mayor fagocitosis y asociación de CIDCA 5310 que de CIDCA 5317 y una mayor colocalización de la cepa CIDCA 5310 con lisosomas, aún en condiciones no opsónicas que fueron las utilizadas en el presente trabajo. Esto indicaría que hay interacciones diferentes entre las cepas estudiadas y las células dendríticas, generando

además señalizaciones intracelulares diferentes o al menos a distintos tiempos resultando en diferente localización intracelular en el tiempo estudiado (Boye *et al.*, 2016).

Los resultados encontrados en el presente capítulo permitieron demostrar que la diferente interacción de las cepas CIDCA 5310, CIDCA 5317 y acenocumarol, con células epiteliales en co-cultivo se puede reflejar en la expresión de moléculas de superficie en células dendríticas, y en la secreción de citoquinas, dependiendo su efecto de las condiciones inflamatorias de su entorno.

Además, se pudo observar que las interacciones generadas por las bifidobacterias en macrófagos se vieron reflejadas en células dendríticas.

En función de los resultados obtenidos *in vitro*, se continuó el estudio evaluando el efecto de las cepas CIDCA 5310, CIDCA 5317 y acenocumarol sobre la respuesta del hospedador en un modelo complejo como es el modelo *in vivo*, detallado en el próximo capítulo.

Bibliografía

Azad, M. A. K., Sarker, M. and Wan, D. (2018) 'Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles', *BioMed Research International*. Hindawi, 2018, pp. 1–10. doi: 10.1155/2018/8063647.

Boye, L. *et al.* (2016) 'Plasma membrane Toll-like receptor activation increases bacterial uptake but abrogates endosomal *Lactobacillus acidophilus* induction of interferon- β ', pp. 329–342. doi: 10.1111/imm.12650.

Corfield, A. P. (2015) 'Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1850(1), pp. 236–252. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.05.003.

Haller, D. *et al.* (2002) 'IL-10 producing CD14^{low} monocytes inhibit lymphocyte-dependent activation of intestinal epithelial cells by commensal bacteria', *Microbiology and Immunology*, 46(3), pp. 195–205. doi: 10.1111/j.1348-0421.2002.tb02686.x.

Karlsson, M. *et al.* (2012) 'Lactobacillus rhamnosus GR-1 enhances NF- κ B activation in Escherichia coli-stimulated urinary bladder cells through TLR4', *BMC Microbiology*. BioMed Central Ltd, 12(1), p. 15. doi: 10.1186/1471-2180-12-15.

Kim, J. Y., Park, M. S. and Ji, G. E. (2012) 'Probiotic modulation of dendritic cells co-cultured with intestinal epithelial cells', 18(12), pp. 1308–1318. doi: 10.3748/wjg.v18.i12.1308.

Macpherson, A. J. and Uhr, T. (2014) 'Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells', 1662(2004). doi: 10.1126/science.1091334.

Mohamadzadeh, M. *et al.* (2005) 'Lactobacilli active human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8), pp. 2880–2885. doi: 10.1073/pnas.0500098102.

Niers, L. E. M. *et al.* (2007) 'Selection of probiotic bacteria for prevention of allergic diseases: Immunomodulation of neonatal dendritic cells', *Clinical and Experimental Immunology*, 149(2), pp. 344–352. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03421.x.

Rescigno, M. and Sabatino, A. Di (2009) 'Science in medicine Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease', 119(9), pp. 2441–2450. doi: 10.1172/JCI39134.of.

Rolny, I. S. *et al.* (2016) 'Lactobacillus delbrueckii subsp lactis CIDCA 133 modulates response of human epithelial and dendritic cells infected with *Bacillus cereus*', *Beneficial Microbes*, 7(5), pp. 749–760. doi: 10.3920/BM2015.0191.

Savina, A. and Amigorena, S. (2007) 'Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells', *Immunological Reviews*, 219(1), pp. 143–156. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x.

Schroecksnadel, S. *et al.* (2013) 'Immunomodulatory effects in vitro of vitamin K antagonist acenocoumarol', *Thrombosis Research*. Elsevier Ltd, 131(6), pp. e264–e269. doi: 10.1016/j.thromres.2013.02.012.

Stadnyk, A. W. (2002) 'Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines', *Canadian Journal of Gastroenterology*, 16(4), pp. 241–246. doi: 10.1155/2002/941087.

Tiscornia, I. *et al.* (2012) 'Human monocyte-derived dendritic cells from leukoreduction system chambers after plateletpheresis are functional in an in vitro co-culture assay with intestinal epithelial cells', *Journal of Immunological Methods*. Elsevier B.V., 384(1–2), pp. 164–170. doi: 10.1016/j.jim.2012.07.005.

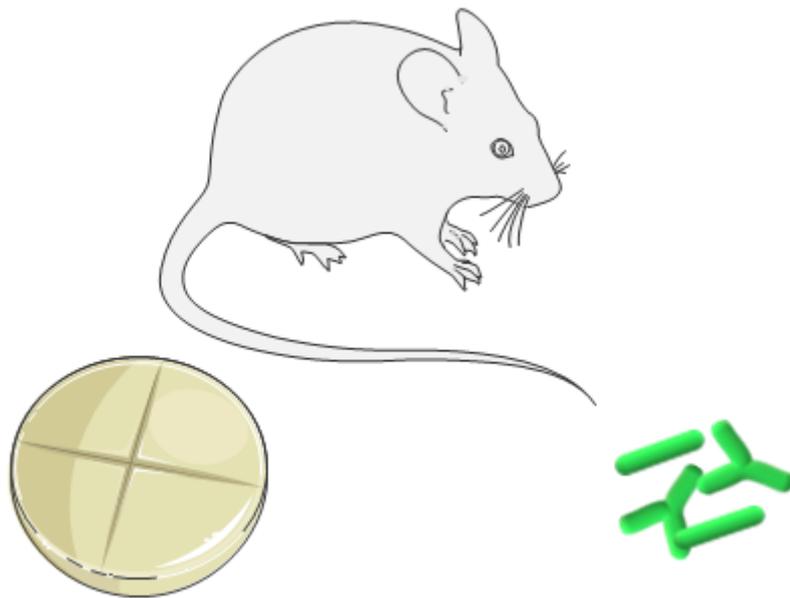
Warzecha, Z. *et al.* (2016) 'Protective effect of pretreatment with acenocoumarol in cerulein-induced acute pancreatitis', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10). doi: 10.3390/ijms17101709.

Warzecha, Z. *et al.* (2017) 'Therapeutic Effect of Low Doses of Acenocoumarol in the Course of Ischemia / Reperfusion-Induced Acute Pancreatitis in Rats'. doi: 10.3390/ijms18040882.

Weiss, G. *et al.* (2011) 'Cytokine Lactobacilli and bifidobacteria induce differential interferon- γ profiles in dendritic cells', *Cytokine*. Elsevier Ltd, 56(2), pp. 520–530. doi: 10.1016/j.cyto.2011.07.024.

CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN
BIFIDOBACTERIA-ACENOCUMAROL-
HOSPEDADOR
EN UN MODELO MURINO



INTRODUCCIÓN

La utilización de modelos celulares es una aproximación sumamente válida y a través de la cual se obtiene información relevante para contribuir a la comprensión de los mecanismos involucrados en la respuesta celular frente a la interacción con microorganismos. Sin embargo, la utilización del modelo murino aún sigue siendo una herramienta fundamental e imprescindible para acercarnos aún más a las condiciones reales. Debido a esto, estos modelos *in vivo* son ampliamente utilizados en el estudio de la acción de fármacos y de microorganismos probióticos (Chiba *et al.*, 2016; Yoo, 2016; Nogacka *et al.*, 2019).

El estudio en conjunto de las interacciones presentes en el contexto intestinal ha permitido resaltar el rol que tiene la microbiota en el metabolismo de drogas orales. Se entiende entonces, que una vez que el fármaco alcanzó el tracto gastrointestinal, antes de ser absorbido a través del epitelio intestinal, se encuentra expuesto a metabolitos, enzimas y condiciones microambientales, factores directamente relacionados con la microbiota intestinal presente, la cual puede influir en la estructura y metabolismo de la droga, teniendo implicancias en su biodisponibilidad y vida media (Jourova, Anzenbacher and Anzenbacherova, 2016). Así también es importante destacar la influencia que pueden tener fármacos, como los antibióticos (Shashkova *et al.*, 2016), y compuestos derivados de la dieta sobre la composición de la microbiota intestinal, derivando como consecuencia en una disbiosis y el desarrollo de varias enfermedades (Jourova, Anzenbacher and Anzenbacherova, 2016).

Por otra parte, los efectos protectores de cepas probióticas observados *in vivo* se han correlacionado con resultados obtenidos previamente *in vitro*. Investigadores de nuestro grupo han demostrado el efecto protector de *B. bifidum* CIDCA 5310 en un modelo *in vivo* de colitis asociada a la infección con *Clostridium difficile* (Trejo, De Antoni and Pérez, 2013). También, se ha observado que la administración de kéfir en ratones reduce la infección generada por *Giardia intestinalis* a través de la activación de diferentes mecanismos de la inmunidad humoral y celular (Franco *et al.*, 2013), como así también se ha demostrado para *Lactobacillus johnsonii* La1, cepa capaz de antagonizar los efectos generados por la infección por *Giardia intestinalis* en un modelo de merión (Humen *et al.*, 2005). Además, se ha demostrado el efecto de la administración oral de kefirán sobre la activación de respuestas

celulares en *lamina propria*, placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos (Medrano *et al.*, 2011).

Dados los resultados obtenidos en sistemas *in vitro* se pasó a evaluar los efectos derivados de la administración de las cepas de bifidobacterias y acenocumarol en ratones. El efecto inmunomodulador del acenocumarol se ha estudiado en ratas y a partir de este estudio se eligió la dosis de administración adecuada del anticoagulante para los ratones (Warzecha *et al.*, 2016, 2017). Se evaluaron los efectos de la administración de las cepas y acenocumarol sobre la capacidad fagocítica de las células de los ratones (Małaczewska *et al.*, 2014), sobre el tiempo de protrombina y RIN (determinaciones adecuadas para controlar la coagulación) (Trejo I., 2004; Haro *et al.*, 2009; Zelaya *et al.*, 2015), sobre la medida de expresión de citoquinas en sitios relevantes (placas de Peyer, nódulos linfáticos mesentéricos y bazo) para la respuesta del hospedador frente al estímulo de la mucosa intestinal, y sobre la estructura de la mucosa intestinal mediante coloración histológica de las placas de Peyer y zona flanqueante de intestino (Rumbo and Finke, 2004; Anderle *et al.*, 2005).

Esta aproximación experimental permite indagar acerca de los efectos de la interacción bifidobacteria-acenocumarol-hospedador, en un modelo mamífero que contempla la complejidad de las interacciones en el hospedador.

Bibliografía

- Anderle, P. *et al.* (2005) 'intestine along the anterior-posterior and crypt-villus axes', 17, pp. 1–17. doi: 10.1186/1471-2164-6-69.
- Chiba, T. *et al.* (2016) 'Trans -Resveratrol Enhances the Anticoagulant Activity of Warfarin', pp. 1099–1110. doi: 10.5551/jat.31765.
- Franco, M. C. *et al.* (2013) 'Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection', *Journal of Medical Microbiology*, 62(PART 12), pp. 1815–1822. doi: 10.1099/jmm.0.068064-0.
- Haro, C. *et al.* (2009) 'Lactobacillus casei: Influence on the innate immune response and haemostatic alterations in a liver-injury model', *Canadian Journal of Microbiology*, 55(6), pp. 648–656. doi: 10.1139/W09-022.
- Humen, M. A. *et al.* (2005) 'Lactobacillus johnsonii La1 antagonizes *Giardia intestinalis* in vivo', *Infection and Immunity*, 73(2), pp. 1265–1269. doi: 10.1128/IAI.73.2.1265-1269.2005.
- Jourova, L., Anzenbacher, P. and Anzenbacherova, E. (2016) 'Human gut microbiota plays a role in the metabolism of drugs', *Biomedical Papers*, 160(3), pp. 317–326. doi: 10.5507/bp.2016.039.
- Małaczewska, J. *et al.* (2014) 'Effect of oral administration of kynurenic acid on the activity of the peripheral blood leukocytes in mice', *Central European Journal of Immunology*, 39(1), pp. 6–13. doi: 10.5114/ceji.2014.42115.
- Medrano, M. *et al.* (2011) 'Oral Administration of Kefiran Induces Changes in the Balance of Immune Cells in a Murine Model - Journal of Agricultural and Food Chemistry', *Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), pp. 5299–5304. doi: 10.1021/jf1049968.
- Nogacka, A. M. *et al.* (2019) 'Intestinal Immunomodulation and Shifts on the Gut Microbiota of BALB/c Mice Promoted by Two Bifidobacterium and Lactobacillus Strains Isolated from Human Samples', *BioMed Research International*. Hindawi, 2019. doi: 10.1155/2019/2323540.
- Rumbo, M. and Finke, D. (2004) 'Lymphotoxin Receptor Signaling Induces the Chemokine CCL20 in Intestinal Epithelium', 127 pp. 213–223. doi: 10.1053/j.gastro.2004.04.018.
- Shashkova, T. *et al.* (2016) 'Agent based modeling of human gut microbiome interactions and perturbations', *PLoS ONE*, 11(2), pp. 1–26. doi: 10.1371/journal.pone.0148386.
- Trejo, F. M., De Antoni, G. L. and Pérez, P. F. (2013) 'Protective effect of bifidobacteria in an experimental model of *Clostridium difficile* associated colitis', *Journal of Dairy Research*, 80(3), pp. 263–269. doi: 10.1017/S0022029913000216.
- Trejo I., C. (2004) 'Anticoagulantes: Farmacología, mecanismos de acción y usos clínicos', *Cuadernos de Cirugía*, 18(1), pp. 83–90. doi: 10.4206/cuad.cir.2004.v18n1-14.

Warzecha, Z. *et al.* (2016) 'Protective effect of pretreatment with acenocoumarol in cerulein-induced acute pancreatitis', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10) pp 1-14. doi: 10.3390/ijms17101709.

Warzecha, Z. *et al.* (2017) 'Therapeutic Effect of Low Doses of Acenocoumarol in the Course of Ischemia / Reperfusion-Induced Acute Pancreatitis in Rats'. 18(882) pp 1-19 doi: 10.3390/ijms18040882.

Yoo, Hy. H. (2016) 'Effects of orally administered antibiotics on the bioavailability of amlodipine: gut microbiota-mediated drug interaction', 34(1), pp. 156–162. doi: 10.1097/HJH.0000000000000773.

Zelaya, H. *et al.* (2015) 'Nasal priming with immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* modulates inflammation??coagulation interactions and reduces influenza virus-associated pulmonary damage', *Inflammation Research*, 64(8), pp. 589–602. doi: 10.1007/s00011-015-0837-6.

MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Ratones empleados

Para el ensayo *in vivo* se emplearon 30 ratones hembras de 5 a 7 semanas obtenidos del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de UNLP. La cepa utilizada fue BALB/cAnNLAE cuyos progenitores proceden del National Institute of Health (USA). Estos ratones pertenecían a la categoría de SPF (libre de patógenos específicos). Los animales fueron trasladados al bioterio de experimentación perteneciente a la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de La Plata y se mantuvieron allí en un sistema bajo barreras para evitar contaminaciones cruzadas y externas durante el transcurso del experimento. Los primeros 7 días consistieron en el período de adaptación al nuevo bioterio para luego comenzar con los protocolos de experimentación; de esta forma se logra disminuir el estrés causado por el transporte y el cambio de las condiciones de alojamiento.

Todos los procedimientos efectuados fueron realizados de acuerdo a las normas internacionales para el trabajo con animales de experimentación y se realizaron según el protocolo número: 002-30-18, “Estudio *in vivo* del efecto de microorganismos potencialmente probióticos sobre animales tratados con anticoagulantes orales” aprobado por el CICUAL de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP).

IV.2 Suspensiones de *Bifidobacterium*

Se emplearon cultivos de 24 horas de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317, crecidas en las condiciones detalladas previamente en el capítulo I punto I.1. Dos ml de cada uno de estos cultivos fueron utilizados para inocular 200 ml de caldo MRS (Sharpe, 1960) suplementado con cisteína al 0,05% (p/v) los cuales se incubaron en anaerobiosis por 24 horas a 37°C. Los pellets obtenidos luego de la centrifugación de los cultivos a 12000 g por 10 minutos, fueron lavados 2 veces con PBS estéril.

Las bacterias fueron suspendidas en 7,5 ml de PBS estéril + 2,5 ml de sacarosa 80% (usada como crioprotector) para luego fraccionar de a 1 ml esa suspensión en criotubos para su almacenamiento a -80°C hasta su utilización. En el agua de bebida, se colocaron 1 ml de la

suspensión de bacterias en 100 ml de agua mineral, obteniendo una concentración final de 1×10^7 UFC/ml.

IV.3 Protocolo de experimentación

Los ratones se dividieron en 6 grupos, de 5 animales cada uno, los cuales se detallan a continuación:

GRUPO 1 CONTROL

A los 5 ratones del primer grupo se les administró en el agua de bebida PBS estéril (1 ml en 100ml de agua mineral) durante 7 días.

GRUPO 2 CONTROL DE ACENOCUMAROL

Al igual que al grupo 1 control, se agregó PBS estéril en el agua de bebida. En los últimos 2 días previos al sacrificio, es decir en los días 6 y 7, se les administró mediante gavage con sonda orogástrica el anticoagulante acenocumarol en una dosis de 0,3 mg/ kg.

GRUPO 3 CIDCA 5310 Y GRUPO 5 CIDCA 5317

Durante 7 días, diariamente se agregó la cepa correspondiente, CIDCA 5310 o CIDCA 5317 según corresponda en el agua de bebida (1 ml del cultivo conservado a -80°C tal como se describió en el punto IV.2 en 100 ml de agua mineral). La concentración de las bacterias en el agua de bebida fue de 1×10^7 UFC/ml y ambas cepas continuaron viables durante todo el período de experimentación. La dosis aproximada de bacterias por día fue de 2×10^7 UFC.

GRUPO 4 CIDCA 5310 + ACENOCUMAROL Y GRUPO 6 CIDCA 5317 + ACENOCUMAROL

Estos ratones estuvieron bajo el mismo tratamiento con las bacterias durante 7 días y en los días 6 y 7 se les administró la dosis de acenocumarol de igual forma y concentración que la indicada para el grupo 2.

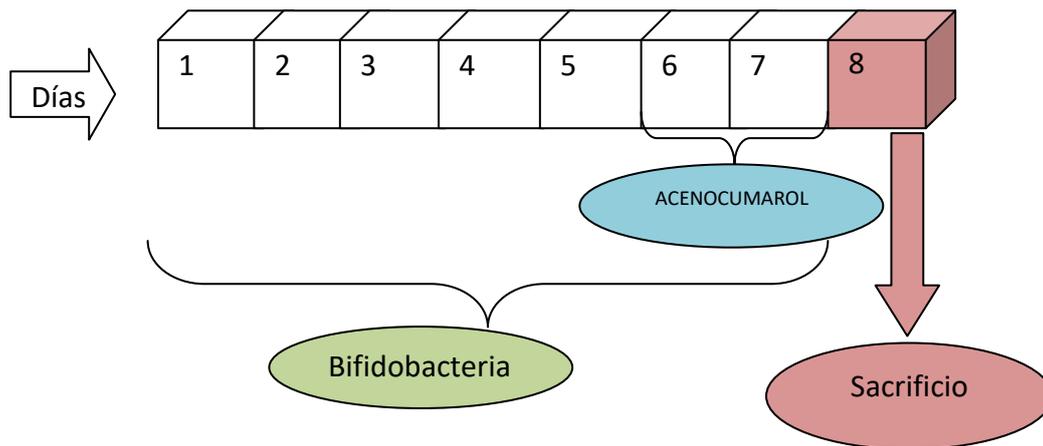


Figura IV 1. Esquema de los tratamientos administrados durante 7 días. Las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 se administraron en el agua de bebida y el acenocumarol a través de la técnica de gavage en los últimos dos días del tratamiento, en el día 8 se procedió al sacrificio de los ratones.

Los animales fueron anestesiados 1 por vez con ketamina xilacina administrada intraperitonealmente en una concentración 80 mg/kg -5 mg/kg, inyectándose a razón de 5ml/kg. Una vez que se confirmó el efecto de la anestesia, a través de la pérdida del reflejo postural se procedió a la obtención de sangre entera por punción cardíaca y luego se procedió al sacrificio por dislocación cervical.

A partir de la muestra de sangre, se obtuvo plasma citratado apto para la medida del tiempo de protrombina (IV.5). Para lo cual, se colocó la muestra de sangre en un tubo con citrato de sodio al 3,8%, en una relación de sangre citrato 1:9 y se centrifugó durante 15 min a 3000rpm. Además, otra fracción de la muestra de sangre fue colocada en un tubo con heparina, muestra requerida para el ensayo de fagocitosis (IV.4).

Por otro lado, se extirparon bazo, placas de Peyer (PP) porción distal de intestino delgado, y nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), con el fin de medir la expresión de citoquinas por q PCR (IV.6), para lo cual se almacenaron las muestras en trizol a -80 °C, hasta su procesamiento. Además, se colocaron las muestras de placa de Peyer en alcohol 96º y se almacenaron a 4 °C, para la realización de los cortes histológicos (IV.7).

IV.4 Medida de la actividad fagocítica de granulocitos y monocitos

Para medir la actividad fagocítica de granulocitos y monocitos de la sangre extraída de los ratones, se colocaron 100 μ l de sangre heparinizada en un tubo previamente en hielo y se le agregaron 20 μ l de la cepa CIDCA 5317 marcada con FITC termostaticada previamente a 0°C. Todos los tubos se agitaron en vortex y se colocaron en un baño de agua a 37°C por 10 minutos, excepto el control negativo que permaneció en hielo, para evitar el proceso de fagocitosis.

Luego de la incubación, todas las muestras se colocaron en hielo para detener la fagocitosis. Se agregaron 100 μ l de azul tripan frío, 3 ml de PBS y se centrifugó 5 minutos a 250 g (2-8°C) dos veces. Se colocaron 2ml de líquido de Turk por condición y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras nuevamente y se descartó el sobrenadante. Se lavó otra vez con PBS descartando el sobrenadante.

Por último, se agregaron 250 μ l de PBS para analizar las muestras por citometría de flujo.

IV.5 MEDIDA DEL TIEMPO DE PROTROMBINA

Para la medida del tiempo de protrombina, se utilizó el coagulómetro COATRON M1 (TECO GMBH). Se colocaron 50 μ l de cada muestra (plasma) en pocillos enumerados y el reactivo (SOLUPLASTIN, Wiener) en su pocillo correspondiente para que se termostaticase. Luego se colocó una muestra por vez en el pocillo de lectura y se le agregaron 25 μ l del reactivo para iniciar la reacción. Además, se calculó el RIN (Razón Internacional Normalizada) utilizando el valor ISI 1,2 propio del kit y el promedio geométrico de los tiempos de protrombina de los ratones no anticoagulados.

☀ IV.6 Preparación de las muestras para realizar qPCR.

Las muestras guardadas a -80°C en trizol se procesaron de la siguiente manera:

1. Extracción de RNA.

- Se disgregaron y homogeneizaron las muestras de PP, NLM y bazo con IKA T 10 basic, ULTRA-TURRAX®.
- Se agregaron 0,1 ml de cloroformo frío.
- Se agitó por 15 segundos manualmente, y se incubaron las muestras de 2 a 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 12.000g 15 minutos a 4°C.
- Se obtuvieron dos fases, la fase inferior rojiza de fenol-cloroformo, una pequeña interfase y la fase superior acuosa en donde está el RNA, y que se transfirió a un tubo limpio (aproximadamente 200 µl).
- Se mezcló la fase acuosa con 0,25 ml de isopropanol frío y se incubó de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 12.000 g 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante.
- El pellet se lavó con 0,5 ml de etanol 75 %, se mezcló con vórtex y se centrifugó a 7500 g 5 minutos a 4°C.
- El pellet se dejó secar a temperatura ambiente sin que se reseque, para eso se abrió el tubo para permitir la evaporación del etanol. El pellet se vuelve transparente cuando ya está seco.
- Se disuelve el pellet en agua farmacológica (Laboratorio Rivero, CABA), aproximadamente en 25 µl, y se dividió de a 5 µl en otro tubo para analizar la muestra por la técnica Nanodrop.

2. Nanodrop.

Esta técnica de espectrofotometría UV-visible permitió confirmar con pocos microlitros de muestra, si se obtuvo la cantidad suficiente de ácidos nucleicos (DNA/ RNA) de calidad adecuada antes de llevar a cabo la q PCR.

3. RT PCR.

Para pasar las muestras de ARN a c DNA, se siguió el siguiente protocolo:

- Se calculó el volumen de muestra a usar de RNA y se agregó agua para llegar a un volumen final de 11 μ l.
- En el tubo se colocó 1 μ l de random primer
- Se centrifugó a máxima velocidad.
- Se colocó en el termociclador por 10 minutos
- Luego de los 10 minutos, se incubó en hielo y se les agregó la premix, 8 μ l por muestra.
- Finalmente, se procesaron las muestras en el termociclador iCycler thermal cycler (BioRad, EEUU) por 1 hora.

La premix consistió en:

- **Buffer de lisis**, FS 5x 4 μ l
- **dNTPs** (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 Mm 1 μ l
- Ditioteitrol (**DTT**) 0,1 M 1,5 μ l
- RNAasa (**RNA se OUT**) 0,5 μ l
- Transcriptasa reversa del virus murina Moloney de leucemia (**MMLV-RT**) 1 μ l

4. q PCR.

Para la realización de la q PCR :

- Se trabajó con una dilución de los primers 1/10 para tener una concentración final 10 μ M.
La concentración stock de los primers era de 100 μ M.
- La normalización se realizó utilizando primers para β -actina
- Se realizó una *master mix* por cada gen, la cual contenía:
Sybr green 12 μ l
Primer forward (f) 1 μ l
Primer reverse (r) 1 μ l

- A partir de los cDNA obtenidos por RTPCR, se trabajó con una dilución 1/15, la cual se utilizó como *template*. De esta dilución se colocaron 10 µl por fosa.
- El volumen final en la fosa fue de 24 µl.
- Se selló la placa y se realizó la reacción.

Los genes de citoquinas analizados fueron: IFN- γ , IL-12, IL-10, cuyas secuencias de detallan en la tabla IV.1 Para el análisis de los resultados, se realizaron los cálculos a partir de la diferencia del threshold cycle, o ciclo umbral ΔC_t , descrita por Rumbo y colaboradores (Rumbo and Finke, 2004) entre el gen de interés y el gen normalizador o housekeeping.

Tabla IV.1 **Secuencias de los primers utilizados.**

Se muestran las secuencias para los primers de las citoquinas: IFN- γ , IL-12 p40, IL-10. Se utilizó el gen de β -actina como control interno.

Bases nucleotídicas: A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina

GEN	SECUENCIA	REFERENCIA	MARCA
IFN- γ	TGGCATAGATGTGGAAGAAAAGAG TGCAGGATTTTCATGTCACCAT	(Rolny <i>et al.</i> , 2014)	Genbiotech SRL (Argentina).
IL-12p40	GCAAAGAAACATGGACTTGAAGTTC CACATGTCACTGCCCGAGAGT		
IL-10	CATTTGAATTCCTGGGTGAGA TGCTCCACTGCCTTGCTCTT		
β -Actina	CGTCATCCATGGCGAACTG GCTTCTTGCAGCTCCTTCGT		

IV. 7 Cortes histológicos.

Se realizaron cortes transversales de las placas de Peyer de intestino delgado y se colorearon con hematoxilina- eosina.

Las muestras fueron evaluadas mediante microscopía de campo claro en un microscopio Leica DMLB acoplado a una cámara Leica DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Suiza).

Protocolo de coloración con Hematoxilina – Eosina.

Desparafinización de los cortes:

1. Xileno (3 veces durante 5 minutos cada vez)
2. Etanol absoluto (2 veces durante 2 minutos cada vez)
3. Etanol 96o (2 veces durante 2 minutos cada vez)
4. Etanol 80o – 70o (2 minutos)
5. Agua destilada (1 minuto)

Coloración de los cortes:

1. Colocar en solución de Hematoxilina durante 5 minutos
2. Lavar con agua corriente, luego agua ácida (pH=6) durante 3 min. Agua corriente y finalmente agua destilada para terminar de lavarlo
3. Colocar en solución de Eosina durante 30 segundos
4. Lavar con etanol 70 % una vez rápidamente
5. Deshidratar en etanol 96 ° (2 veces durante 2 min.), etanol absoluto (2 veces durante 2 min.), xilol (2 veces durante 2 min.)
6. Montar en portaobjeto usando bálsamo de Canadá.

IV. 8 Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar. Estos fueron estudiados utilizando un análisis de la varianza (ANOVA) a través del software InfoStat (Grupo InfoStat, Córdoba, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Las diferencias significativas fueron establecidas mediante test t de Student ($p < 0,05$), test de Fischer para las proporciones o por análisis de mediana o Mann Whitney.



Bibliografía

Rolny, I. S. *et al.* (2014) 'Murine model of *Bacillus cereus* gastrointestinal infection', *Journal of Medical Microbiology*, 63, pp. 1741–1749. doi: 10.1099/jmm.0.079939-0.

Rumbo, M. and Finke, D. (2004) 'Lymphotoxin in Intestinal Epithelium', 127, pp. 213–223. doi: 10.1053/j.gastro.2004.04.018.

Sharpe, M. R. (1960) 'A readily prepared medium for the cultivation of the lactobacilli', *Journal of bacteriology*, 51, p. 560. doi: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x

RESULTADOS

En el presente capítulo se describen los resultados obtenidos del ensayo *in vivo* en ratones, realizado con el fin de profundizar el estudio de la interacción entre bifidobacterias, acenocumarol y el hospedador, utilizando un modelo de mayor complejidad. A partir de la administración del acenocumarol y de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317, se midió la actividad fagocítica, el efecto sobre la coagulación, se realizaron histologías de intestino delgado y se midió la expresión de genes de citoquinas en órganos relevantes desde el punto de vista inmunológico.

☀ IV.1 Histología.

Con el fin de observar el estado microscópico de las placas de Peyer y tejido circundante de intestino delgado luego de los tratamientos, se realizó su coloración con hematoxilina-eosina y se midió la relación vellosidades-criptas.

En el análisis microscópico, no se encontraron diferencias histológicas, ni en la observación de las placas de Peyer, ni en la relación vellosidad/cripta en las condiciones ensayadas. En la **figura IV.1**, se pueden ver imágenes representativas de lo que se observó para todos los ratones bajo el ensayo.

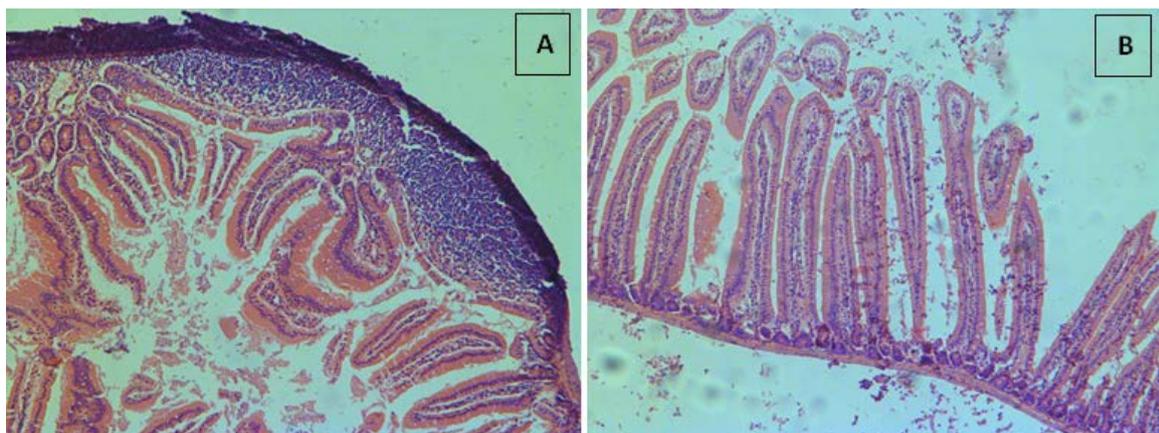


Figura IV.1 Tinción con hematoxilina y eosina de intestino delgado. Las imágenes muestran A placa de Peyer, B criptas y vellosidades.

☀ IV.2 Determinación de la actividad fagocítica de granulocitos y monocitos.

Con la finalidad de estudiar el efecto de las cepas probióticas y del anticoagulante sobre las células fagocíticas en los ratones, se procedió a evaluar la fagocitosis a partir de muestras de sangre de cada uno de los ratones, como se explicó en materiales y métodos IV.4

Como se muestra en la figura IV.2, la actividad fagocítica evaluada disminuyó significativamente ($P < 0,05$) en aquellos ratones a los que se les administró sólo el acenocumarol (UA: $111745,40 \pm 985,71$), la cepa CIDCA 5310 (UA: $84001,35 \pm 24283,39$) o la cepa CIDCA 5317 (UA: $48041,33 \pm 4914,97$), respecto al grupo de ratones sin tratamiento (UA: $190136,05 \pm 21000,58$).

Por otra parte, podemos observar también que el tratamiento con la cepa CIDCA 5317 disminuyó aún más la actividad fagocítica en presencia de acenocumarol (UA: $62100,9 \pm 5412,34$), respecto a los ratones tratados sólo con acenocumarol (UA: $111745,40 \pm 985,71$), pero resultó mayor respecto a la cepa sola (Figura IV.2).

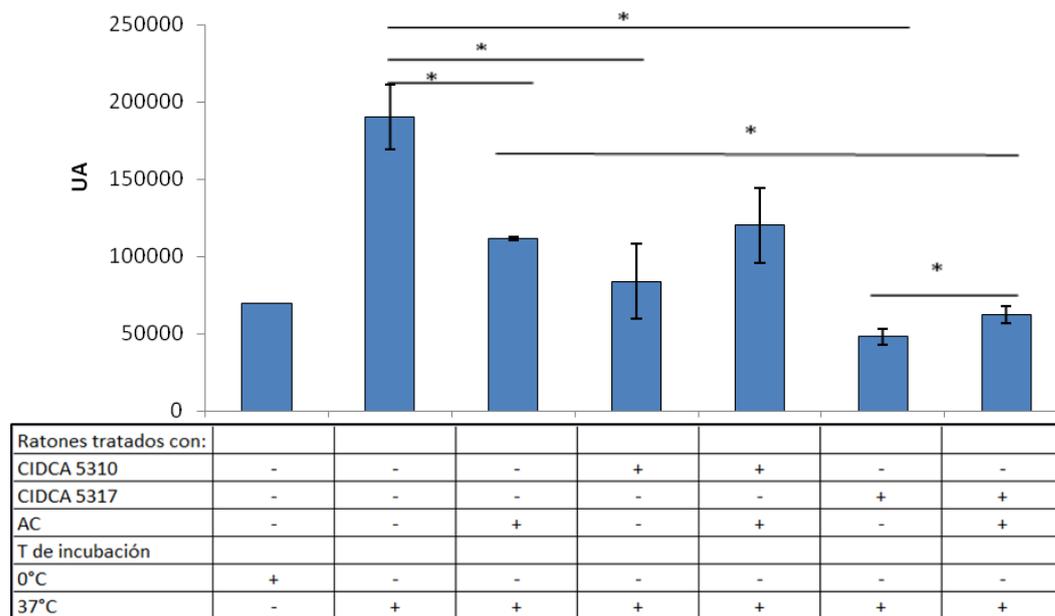


Figura IV.2 Fagocitosis de la cepa CIDCA 5317 en animales sometidos a diferentes tratamientos.

UA: unidades arbitrarias (* $P < 0,05$)

IV.3 Efecto sobre la coagulación.

Debido a la estrecha ventana terapéutica que presenta el acenocumarol, se estudió si su administración concomitante con las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 generaban alguna modificación en el efecto anticoagulante de la droga. Con este propósito se evaluó el tiempo de protrombina de cada uno de los ratones, como se explicó en materiales y métodos IV.5.

Los resultados obtenidos denotan un aumento significativo ($P < 0,05$) del tiempo de protrombina en aquellos ratones a los que se les administró solamente el anticoagulante ($105,44 \pm 22,29$) respecto a los otros tratamientos, incluidos aquellos a los que se les administró cada una de las cepas junto con el anticoagulante. Es importante destacar que los valores del tiempo de protrombina de los ratones tratados con cada una de las cepas y acenocumarol no tienen diferencias significativas con el control sin tratar con anticoagulante. Asimismo, se ve una significativa disminución del tiempo de protrombina en los animales tratados con la cepa CIDCA 5310 ($13,76 \pm 0,32$) o la cepa CIDCA 5317 ($13,07 \pm 0,39$) respecto al grupo control sin tratamiento ($40,17 \pm 10,80$) (Figura IV.3).

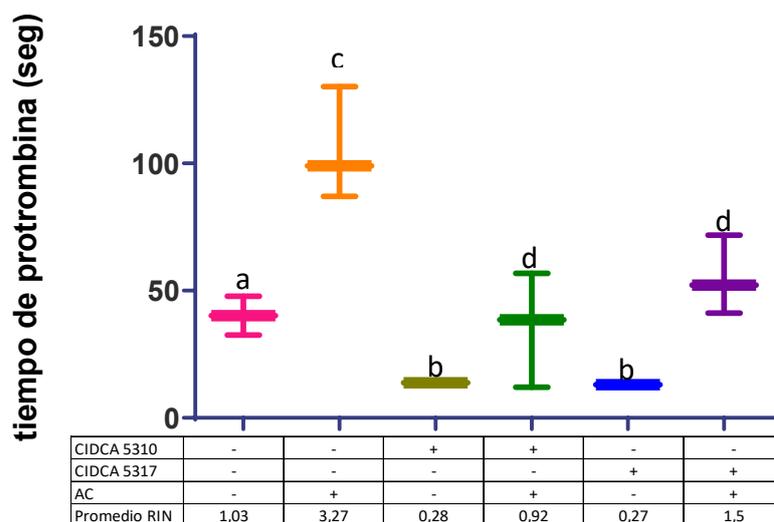


Figura IV.3 Tiempo de protrombina y RIN de los animales sometidos a distintos tratamientos

Las distintas letras indican $p < 0,05$.

IV.4 Estudio de la expresión de citoquinas.

En el presente trabajo se ha demostrado que tanto las bifidobacterias como el acenocumarol poseen capacidad inmunomodulatoria, por lo tanto se decidió estudiar la expresión de citoquinas relevante en placas de Peyer (PP), nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) y bazo (B).

Las citoquinas determinadas fueron: interferón gamma (IFN- γ) e interleuquina 12 (IL-12) como citoquinas presentes en contextos de inflamación, e interleuquina 10 (IL-10) como citoquina capaz de disminuir o regular la respuesta inflamatoria.

En la figura IV.4 se observa la expresión relativa del ARN mensajero (ARNm) de las citoquinas en los diferentes órganos para cada grupo de ratones.

En el gráfico IV.4.A, se muestran los resultados obtenidos del estudio en placas de Peyer. Con respecto a la expresión relativa del ARNm del IFN- γ , se observó una disminución significativa ($P < 0,05$) en aquellos grupos de ratones que fueron tratados con acenocumarol, respecto a sus controles sin el fármaco. Además, se observó un incremento significativo en la expresión de esta citoquina en aquellos animales que contenían en el agua de bebida a la cepa CIDCA 5317.

En cuanto a la expresión de ARNm de las citoquinas IL-12 e IL-10, se observó el mismo resultado. En aquellos ratones tratados con la cepa CIDCA 5317 en conjunto con acenocumarol, se observó la disminución significativa de la expresión de ambas citoquinas, respecto a sus controles sin el fármaco (Figura IV.4.A).

En la figura IV.4.B se observa la expresión relativa del ARNm de las distintas citoquinas en nódulos linfáticos mesentéricos. Debido a la amplia dispersión de los datos, no se definió un patrón de comportamiento o una tendencia significativamente diferente entre estas muestras.

Por otra parte, en la figura IV.4.C se observa la expresión relativa del ARN m de las citoquinas bajo estudio, en bazo. En relación a las citoquinas inflamatorias no se pudo encontrar una diferencia significativa o una tendencia particular entre las muestras. Sin embargo, la expresión relativa encontrada para IL-10, denota un aumento significativo de su expresión, en los ratones tratados con la cepa CIDCA 5317, respecto a la expresión relativa encontrada en los animales control, y en los animales tratados con CIDCA 5310. En cuanto al efecto de la administración del acenocumarol, se observaron dos efectos dependientes de la

cepa. La administración conjunta de CIDCA 5310 con el anticoagulante generó un aumento significativo de la expresión relativa del ARN m de IL-10, respecto a su control sin acenocumarol. Por el contrario, la administración conjunta de CIDCA 5317 con el anticoagulante generó una disminución significativa de la expresión relativa de ARN m de dicha citoquina.

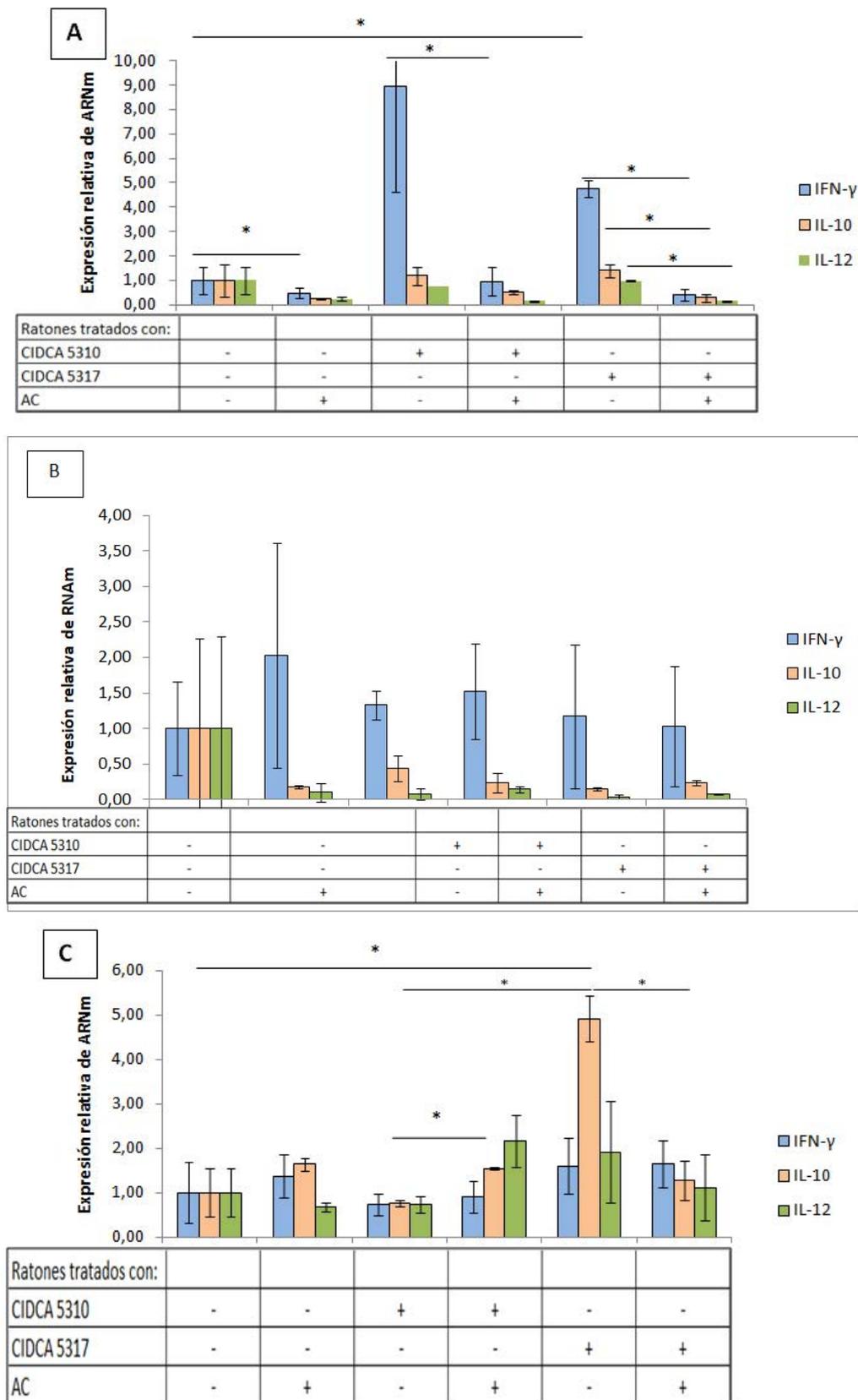


Figura IV.4 Expresión relativa de ARN mensajero de las citoquinas estudiadas en distintos órganos pertenecientes a los ratones ensayados. En la figura A se muestran los valores obtenidos para PP, en la figura B los valores obtenidos para NLM y en la figura C para bazo (*P<0,05).

DISCUSIÓN

En los capítulos anteriores, se demostró una interacción diferencial de las bifidobacterias estudiadas con poblaciones celulares relevantes de la respuesta inmune en presencia de acenocumarol. A lo largo del trabajo, se fueron elaborando modelos más complejos para intentar dilucidar los efectos y los factores relevantes para la respuesta.

En el presente capítulo, se lleva el sistema hacia un escenario más complejo pero más cercano al sistema real. En un modelo murino, se estudian respuestas relacionadas con los hallazgos realizados y se determina también el efecto del acenocumarol como variable relevante que, debido a limitaciones de los sistemas anteriores, no había podido ser evaluada.

En primer lugar, haciendo referencia al efecto de la presencia de las bacterias estudiadas y del acenocumarol sobre el proceso de fagocitosis, se determinó la actividad fagocítica de los granulocitos y monocitos presente en los ratones bajo los distintos tratamientos (Małaczewska et al., 2014). Se podría hipotetizar, que los distintos efectos sobre la actividad fagocítica de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317, tanto solas como en presencia de acenocumarol, observados in vitro, se podrían reflejar en la actividad fagocítica de las células monocíticas circulantes en un modelo in vivo bajo las distintas condiciones experimentales.

Los resultados mostraron que la mayor actividad fagocítica tuvo lugar en las células pertenecientes al grupo control, sin tratamiento. El resto de las condiciones mostraron una menor actividad fagocítica, siendo la condición bajo el tratamiento con la cepa CIDCA 5317 la que menor actividad mostró. Es necesario destacar, que la actividad fagocítica disminuyó significativamente en aquellos ratones tratados sólo con acenocumarol, mas la presencia de CIDCA 5317 la disminuyó aún más.

Los resultados descriptos muestran correlación con lo propuesto en la hipótesis. La administración tanto de las bacterias como de acenocumarol, administrados por separado o en conjunto, generaron modificaciones a nivel celular evidenciados por la diferente actividad fagocítica de las células sanguíneas, en cada tratamiento. Vale decir que, el efecto inmunomodulador de las bifidobacterias y del acenocumarol observados in vitro se vio reflejado in vivo, aunque los resultados no son completamente iguales debido a la desemejanza de los modelos empleados.

Teniendo en cuenta que elementos presentes en el sistema de coagulación pueden activar rápidamente respuestas inmunes innatas (Opal and Esmon, 2003), se entiende

entonces que el efecto del acenocumarol sobre la coagulación genere una disminución de esos elementos y como consecuencia tenga lugar una disminución de la respuesta innata celular, en este caso medida a través de la fagocitosis. Se ha demostrado previamente la capacidad que tiene el acenocumarol de disminuir las respuestas inflamatorias generadas por LPS a través de la activación TLR (Schroecksnadel *et al.*, 2013; Warzecha *et al.*, 2017), como se explicó en los capítulos anteriores, pero no se han reportado estudios del efecto del acenocumarol sobre la actividad fagocítica, hasta el momento.

Además, el efecto inmunomodulador del acenocumarol, se observa potenciado por la cepa CIDCA 5317, lo cual sugiere que esta cepa es capaz de disminuir aún más la respuesta inmune innata. El beneficio de la presencia de esta cepa en su conjunto con acenocumarol dependerá de las condiciones de su entorno.

Respecto a la cepa CIDCA 5310, si bien es capaz de disminuir la fagocitosis, este efecto inmunomodulador no se observa tan preciso como con la cepa CIDCA 5317, ni tampoco es capaz de disminuir la fagocitosis en presencia de acenocumarol.

Se observa una vez más, el diferente efecto que generan las bacterias en estudio, y cómo ese efecto se modifica por la presencia del anticoagulante.

Puesto que el acenocumarol presenta una estrecha ventana terapéutica, que además la dosificación está afectada por múltiples factores individuales, y habiéndose reportado que el consumo de probióticos puede tener efecto sobre la farmacocinética de ciertas drogas (Matuskova *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2018), se decidió estudiar si la presencia de bifidobacterias modificaba el efecto anticoagulante propio del fármaco.

Para esto, se estudió el tiempo de protrombina de los ratones sometidos a distintos tratamientos. Esta determinación permite monitorear terapias con anticoagulantes orales, midiendo el tiempo que tarda en formarse el coágulo de fibrina al agregar tromboplastina cálcica a un plasma con citrato.

Como resultado, se observó que el mayor tiempo de protrombina se obtuvo en aquellos ratones a los que se les administró acenocumarol sólo, lo cual demuestra que la dosis calculada cumplió con los dos requisitos propuestos: producir un efecto anticoagulante sin generar daño a los animales. Este último hecho se pudo comprobar a través de la observación macroscópica de los órganos y a través de la observación de las histologías de placas de Peyer, donde no se observaron diferencias en cuanto a la longitud de las vellosidades ni en cuanto a las poblaciones celulares presentes, indicando que los

tratamientos no generaron daño en la mucosa intestinal. Esto está relacionado con la elección de la dosis de acenocumarol así como también a las características GRAS (Generally Recognized as Safe) de las bacterias en estudio.

El estudio del tiempo de protrombina condujo a un resultado altamente relevante: la administración de bifidobacterias generó la disminución del tiempo de protrombina obtenido en los ratones bajo la administración de acenocumarol. Para poder explicar este resultado hay que tener en cuenta que si bien el hígado es un órgano muy involucrado en el metabolismo de drogas, el rol de la microbiota intestinal ha empezado a tomar alta relevancia en este contexto (Stojančević, Bojić and Salami, 2014; Jourova, Anzenbacher and Anzenbacherova, 2016; Kyriachenko *et al.*, 2019). Se encuentran descritos numerosos trabajos acerca de los cambios que bacterias probióticas pueden realizar en el intestino y así afectar el metabolismo, absorción y eficacia de las drogas. Estos cambios pueden tener que ver con una disminución de la absorción del fármaco por una menor permeabilidad de las células, consecuencia de un aumento de la integridad de las uniones estrechas, efecto que se haya descrito para las bifidobacterias; también podría deberse a cambios en los transportadores de fármacos. Se ha encontrado que cepas de *Lactobacillus* aumentan la expresión de sistemas intestinales de bombeo de xenobióticos tales como la glicoproteína-P (Saksena *et al.*, 2011). Por otro lado, los fármacos pueden sufrir reacciones catabólicas por enzimas liberadas por las bacterias modificando su estructura o también pueden unirse a enzimas propias de las bacterias impidiendo su absorción (Kato *et al.*, 2007; Al-Salami *et al.*, 2008; Saksena *et al.*, 2011; Stojančević, Bojić and Salami, 2014). Considerando estos estudios, se podría proponer que las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 generan cambios a nivel intestinal o bien cambios en la molécula del acenocumarol afectando la eficacia del fármaco. Varios estudios han reportado los diversos efectos que puede generar la microbiota intestinal sobre el metabolismo de fármacos, pero principalmente las bacterias intestinales generan reacciones reductoras y de hidrólisis dando origen a subproductos no polares y de bajo peso molecular (Sousa *et al.*, 2008; Kim, 2015)

Asimismo, se observó que los tiempos de protrombina de aquellos ratones no tratados con acenocumarol a los cuales se les administraron las cepas CIDCA 5310 o CIDCA 5317 tendieron a ser reducidos respecto al grupo control. Podría postularse que esta reducción estaría relacionada con una modificación de la síntesis de factores de coagulación

en el hígado, de la absorción de vitamina K o de la concentración de vitamina K en el intestino.

A partir de los tejidos de placas de Peyer, de nódulos linfáticos mesentéricos y de bazo, se determinó la expresión de citoquinas relevantes en el contexto de la respuesta inmune de mucosas. La selección de los tejidos a evaluar se debe a la importancia de los mismos en el desarrollo de una respuesta inmunológica.

Como citoquinas presentes en contextos de inflamación se determinaron interferón gamma (IFN- γ) e interleuquina 12 (IL-12), y como citoquinas capaces de disminuir la inflamación se estudió la interleuquina 10 (IL-10).

La presencia de determinados microorganismos puede desencadenar la secreción de distintas citoquinas. Por lo que se planteó la hipótesis de que si las cepas poseen efectos inmunomodulatorios diferentes solas e interaccionando con acenocumarol, la expresión relativa de las citoquinas sería diferente en los órganos de los ratones bajo los distintos tratamientos.

El análisis en conjunto de los resultados denota las diferencias en la expresión de las distintas citoquinas de acuerdo al tratamiento administrado, concierne a la hipótesis planteada. No obstante, el resultado más notorio, fue la disminución de la expresión de los genes de las citoquinas, generada por la presencia del acenocumarol, efecto que se observó mayormente en presencia de la cepa CIDCA 5317. Se observa una vez más en los resultados obtenidos el efecto inmunomodulador del fármaco. La disminución de la secreción de IFN- γ e IL-12 sugiere la capacidad del acenocumarol de generar una disminución de la respuesta inmune sin aumento de citoquinas regulatorias.

En cuanto al efecto de las bacterias, ambas estimularon la expresión del gen de IFN- γ en placas de Peyer, indicando el posible aumento de respuesta inmune en presencia de las cepas de bifidobacterias, resultado también descrito en presencia de cepas probióticas de lactobacilos (Hong *et al.*, 2009; Jain *et al.*, 2009; Salva, Villena and Alvarez, 2010).

En bazo, se observó el aumento significativo de IL-10 en presencia de la cepa CIDCA 5317. El aumento de la expresión de una citoquina que disminuya la respuesta inmune ha sido descrito para varias bacterias probióticas entre ellas *L. kefir* (Carasi *et al.*, 2015). Este último resultado se correlaciona con las hipótesis anteriormente planteadas en la corriente discusión: la cepa CIDCA 5317 generaría un efecto de atenuación de la respuesta inmune,

disminuyendo la actividad fagocítica y generando la secreción de IL-10 en bazo, una citoquina capaz de disminuir y regular la respuesta inflamatoria.

Se puede concluir entonces que los tratamientos evaluados generaron cambios en la fagocitosis de las células sanguíneas de ratón, provocando una menor activación de los mismos, especialmente bajo la estimulación con la cepa CIDCA 5317 y acenocumarol, reflejando la potenciación del efecto inmunoregulador. Además, el tiempo de protrombina se vio disminuido en los ratones bajo el tratamiento con las bacterias, motivo por el cual se podría suponer que el fármaco es modificado o que su absorción es afectada por la presencia de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317. En este sentido, también se observaron diferencias entre los tratamientos en la expresión de genes de citoquinas presentes en los órganos estudiados, observándose un mayor efecto regulador de la respuesta inmune por parte de la cepa CIDCA 5317 y de acenocumarol.

Los presentes resultados permitieron mostrar los diferentes efectos in vivo de las interacciones acenocumarol-bifidobacterias-hospedador, resaltando la modificación del efecto anticoagulante del acenocumarol en presencia de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA5317, ampliando las perspectivas de estudio en esta temática.

Bibliografía

Al-Salami, H. *et al.* (2008) 'Probiotic pre-treatment reduces gliclazide permeation (ex vivo) in healthy rats but increases it in diabetic rats to the level seen in untreated healthy rats', *Archives of Drug Information*, 1(1), pp. 35–41. doi: 10.1111/j.1753-5174.2008.00006.x.

Carasi, P. *et al.* (2015) 'Impact of Kefir Derived Lactobacillus kefiri on the Mucosal Immune Response and Gut Microbiota', *Journal of Immunology Research*, 2015, pp. 1–12. doi: 10.1155/2015/361604.

Haro, C. *et al.* (2009) 'Lactobacillus casei: Influence on the innate immune response and haemostatic alterations in a liver-injury model', *Canadian Journal of Microbiology*, 55(6), pp. 648–656. doi: 10.1139/W09-022.

Hong, W. S. *et al.* (2009) 'Effects of kefir supernatant and lactic acid bacteria isolated from kefir grain on cytokine production by macrophage', *International Dairy Journal*. Elsevier Ltd, 19(4), pp. 244–251. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.10.010.

Jain, S. *et al.* (2009) 'Modulation of cytokine gene expression in spleen and Peyer's patches by feeding dahi containing probiotic Lactobacillus casei in mice', *Journal of Digestive Diseases*, 10(1), pp. 49–54. doi: 10.1111/j.1751-2980.2008.00362.x.

Jourova, L., Anzenbacher, P. and Anzenbacherova, E. (2016) 'Human gut microbiota plays a role in the metabolism of drugs', *Biomedical Papers*, 160(3), pp. 317–326. doi: 10.5507/bp.2016.039.

Kato, R. *et al.* (2007) 'Effect of Lactobacillus casei on the absorption of nifedipine from rat small intestine', *Drug Metab Pharmacokinet*, 22(2), pp. 96–102. doi: JST.JSTAGE/dmpk/22.96 [pii].

Kim, D. (2015) 'Special Section on Drug Metabolism and the Microbiome — Perspective Gut Microbiota-Mediated Drug-Antibiotic Interactions', 43 pp. 1581–1589. doi: 10.1124/dmd.115.063867

Kim, J. K. *et al.* (2018) 'Effect of probiotics on pharmacokinetics of orally administered acetaminophen in mice', *Drug Metabolism and Disposition*, 46(2), pp. 122–130. doi: 10.1124/dmd.117.077222.

Kyriachenko, Y. *et al.* (2019) 'Crosstalk between gut microbiota and antidiabetic drug action', 10(3), pp. 154–168. doi: 10.4239/wjd.v10.i3.154.

Małaczewska, J. *et al.* (2014) 'Effect of oral administration of kynurenic acid on the activity of the peripheral blood leukocytes in mice', *Central European Journal of Immunology*, 39(1), pp. 6–13. doi: 10.5114/ceji.2014.42115.

Matuskova, Z. *et al.* (2014) 'Administration of a probiotic can change drug pharmacokinetics: Effect of E. coli Nissle 1917 on amidarone absorption in rats', *PLoS ONE*, 9(2), pp. 3–7. doi: 10.1371/journal.pone.0087150.

Opal, S. M. and Esmon, C. T. (2003) 'Bench-to-bedside review: Functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis', *Critical Care*, 7(1), pp. 23–38. doi: 10.1186/cc1854.

Saksena, S. *et al.* (2011) 'Upregulation of P-glycoprotein by probiotics in intestinal epithelial cells and in the dextran sulfate sodium model of colitis in mice', *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(6), pp. G1115–G1123. doi: 10.1152/ajpgi.00027.2011.

Salva, S., Villena, J. and Alvarez, S. (2010) 'Immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from goat milk: Impact on intestinal and respiratory infections', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 141(1–2), pp. 82–89. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.013.

Schroecksnadel, S. *et al.* (2013) 'Immunomodulatory effects in vitro of vitamin K antagonist acenocoumarol', *Thrombosis Research*. Elsevier Ltd, 131(6), pp. e264–e269. doi: 10.1016/j.thromres.2013.02.012.

Sousa, T. *et al.* (2008) 'The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs', *International Journal of Pharmaceutics*, 363(1–2), pp. 1–25. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.07.009.

Stojančević, M., Bojić, G. and Salami, H. Al (2014) 'The Influence of Intestinal Tract and Probiotics on the Fate of Orally Administered Drugs', (Figure 1), pp. 55–68.

Warzecha, Z. *et al.* (2017) 'Therapeutic Effect of Low Doses of Acenocoumarol in the Course of Ischemia / Reperfusion-Induced Acute Pancreatitis in Rats'. 18(882), pp. 2-19 doi: 10.3390/ijms18040882.

DISCUSIÓN GENERAL

El presente trabajo de tesis abordó el estudio integral de la interacción de cepas de bifidobacterias potencialmente probióticas con células relevantes de la inmunidad del hospedador, integrando el efecto inmunomodulador del anticoagulante acenocumarol.

Se realizó un recorrido partiendo desde la interacción de las bifidobacterias y acenocumarol con macrófagos derivados de la línea celular THP-1, incluyendo el efecto de estas interacciones sobre la fagocitosis de partículas inertes y de un patógeno, indagando además sobre el destino intracelular de las bifidobacterias internalizadas. Luego, se siguió caracterizando dichas interacciones a través de la determinación de marcadores celulares expresados en distintos contextos de inflamación-regulación, empleando a su vez, sistemas de co-cultivos con células epiteliales, sumamente relevantes en el contexto de la complejidad de las interacciones que ocurren a nivel de la mucosa intestinal. Asimismo, el empleo de dos líneas celulares epiteliales reporteras, permitió indagar sobre la posible activación de vías de señalización.

Debido a que otras células protagonistas en el contexto de la inmunidad intestinal son las células dendríticas, se caracterizó la interacción de las cepas de bifidobacterias y acenocumarol con estas células presentadoras de antígenos en cultivo simple y aumentando la aproximación en sistema de co-cultivo con células epiteliales. Se caracterizó la interacción empleando marcadores de superficie y evaluando la fagocitosis y sus destinos intracelulares, de manera similar a lo ya realizado en THP-1, con la finalidad de poder comparar las interacciones en dos modelos celulares diferentes. Por último, para complementar el estudio y complejizarlo, el recorrido finaliza en la administración de las cepas de bifidobacterias y acenocumarol en un modelo murino, con el objetivo de evaluar el efecto sobre las células fagocíticas, sobre la coagulación y sobre la expresión de citoquinas en sitios relevantes de la inmunidad intestinal.

Los estudios mencionados permitieron establecer que la interacción de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 en condiciones no opsónicas con las células fagocíticas THP-1 fueron diferentes, mostrando una mayor actividad fagocítica sobre la cepa CIDCA 5310 que sobre la cepa CIDCA 5317. Además, se comprobó que la capacidad de internalizar distintas cepas de bifidobacterias por parte de las células THP-1, no se correlaciona con las distintas propiedades de hidrofobicidad superficial presentes en las bacterias. Respecto al efecto del acenocumarol sobre la fagocitosis de las bifidobacterias se obtuvo como resultado la disminución de la fagocitosis de la cepa CIDCA 5310.

Sumado a los efectos diferenciales de estas dos cepas de bifidobacterias, se encontró que la fagocitosis de partículas inertes se vio aumentada en presencia de la cepa CIDCA 5310, siendo necesaria su viabilidad para ver este efecto. A su vez, se observó la disminución de la fagocitosis de las partículas inertes en presencia de acenocumarol.

En contraposición a la fagocitosis de partículas inertes, se evaluó la fagocitosis de un patógeno, *Bacillus cereus* B10502, dando como resultado la disminución de su fagocitosis cuando está presente la cepa CIDCA 5317.

Los diferentes efectos de las bifidobacterias estudiadas sobre la fagocitosis tanto de partículas inertes como de *B. cereus* B10502, muestran la capacidad de ambas cepas de modular de manera distinta la respuesta, de acuerdo al contexto en el que se encuentre. La cepa CIDCA 5310 potenció la fagocitosis, sin necesidad de un estímulo externo para desencadenar dicho proceso. Sin embargo, la cepa CIDCA 5317 requirió del estímulo de una bacteria patógena (*B. cereus*) para modificar la fagocitosis. Esto se correlaciona con el diferente perfil de polarización de macrófagos desencadenado, tal como se discutirá más adelante.

Es de destacar que lo antedicho se relaciona con el tráfico de la cepa CIDCA 5310 a compartimentos lisosomales, mientras que la cepa CIDCA 5317 en el mismo tiempo evaluado se encontró en compartimentos de reciclaje. Es de esperar que el destino final de una bacteria que carece de mecanismos para persistir intracelularmente sea lisosomal, sugiriendo los resultados obtenidos que la cinética de la cepa CIDCA 5317 es más lenta. Asimismo, no se encontraron beads ni en compartimentos de la vía de reciclaje ni en compartimentos lisosomales, con lo cual una de las hipótesis es que las beads hayan ingresado por una vía diferente a la de las bacterias, como por ejemplo a través de un proceso de macropinocitosis. Una vez internalizadas las beads, debido a su composición, generan un estímulo diferente al de las bacterias, lo cual haría que el tráfico hacia compartimentos lisosomales sea más lento. Es importante resaltar que el acenocumarol no afecta el destino intracelular de las bifidobacterias, en macrófagos.

La caracterización de la respuesta celular a través de la determinación de la expresión de moléculas relevantes en la respuesta inmune ha mostrado en primer lugar la estimulación de la expresión de TLR2 por parte de ambas cepas, lo cual es de esperar tratándose de bacterias Gram (+). Además, se observó la alta expresión de la molécula HLA-DR necesaria para la presentación de antígenos en presencia de ambas cepas. La presencia

de acenocumarol disminuyó la expresión tanto de TLR2 como de HLA-DR, lo cual está de acuerdo con el efecto inmunomodulador propuesto para el anticoagulante que modifica la estimulación Th1 y las vías inducidas por IFN- γ .

Como se mencionó anteriormente, los efectos generados por las bifidobacterias dependen de las condiciones de su microentorno, tal es así que en presencia de IFN- γ , se pudo observar el aumento de la expresión de HLA-DR sólo con la cepa CIDCA 5310. Se podría postular que la mayor activación de los macrófagos generada por la cepa CIDCA 5310, da lugar a su mayor fagocitosis y tráfico a compartimentos lisosomales, provocando el aumento de la expresión de HLA-DR.

La expresión de moléculas presentes en macrófagos bajo la activación clásica (M1) se vio aumentada en presencia de la cepa CIDCA 5310 mientras que la cepa CIDCA 5317 y el acenocumarol la disminuyeron. La disminución de los marcadores de activación por parte del anticoagulante se observó de manera más precisa en células dendríticas que en macrófagos, lo cual evidencia la complementariedad de los dos tipos celulares en estudio en las condiciones evaluadas. En cuanto a la expresión de las moléculas presentes en macrófagos regulatorios (M2), se observó que las cepas en estudio y el acenocumarol aumentaron la expresión de estos marcadores.

Es muy importante resaltar, que la expresión de estas moléculas se puede ver altamente modificada de acuerdo a las condiciones de su entorno, y de acuerdo al estado inicial de la célula en la que se realiza la determinación. Esto hace referencia a que se pudo comprobar en la presente tesis, que la diferenciación de la línea celular monocítica THP-1 en presencia de PMA, genera un perfil de macrófago similar al descrito como macrófago activado de manera clásica o M1, lo cual está de acuerdo con lo reportado en bibliografía.

Por otra parte, la caracterización de la respuesta celular en un sistema de co-cultivo con células epiteliales y células fagocíticas THP-1 o dendríticas, mostró la relevancia de la utilización de células con diferente funcionalidad para indagar la respuesta celular frente a los estímulos bacterianos. La determinación de la concentración de citoquinas presente en el sobrenadante de células dendríticas en co-cultivo con las células epiteliales confirmó la importancia del estado de activación inicial de las células empleadas sobre la respuesta. Debe tenerse en cuenta, que las células provinieron de diferentes donantes lo cual implica necesariamente diferentes estados iniciales de activación.

Además, se observó el impacto de la cepa CIDCA 5310 sobre la expresión de NF- κ B, lo cual no ocurrió en el caso de la cepa CIDCA 5317 que dependió del entorno en que se realizó la estimulación, evidenciando que la interacción de estas cepas con las células tiene influencia en las vías de señalización. Los resultados obtenidos con el acenocumarol demostraron que su efecto sobre la respuesta inmune estaría relacionado con esta vía.

Respecto a la participación de CCL20 en la respuesta, se pudo observar la inmunoregulación por parte de ambas cepas que no dependió de la presencia de acenocumarol. Sin embargo, el marcado aumento de la expresión de CCL20 generado por el acenocumarol y la flagelina en conjunto, induce a la conclusión de que el efecto inmunomodulador del fármaco sería diferente dependiendo de la presencia de distintos estímulos. Es decir, que el acenocumarol en presencia de un agonista TLR5 como es la flagelina, potenciaría el efecto de este estímulo.

La utilización del modelo murino permitió obtener resultados de suma importancia, debido a que se pudieron observar efectos inmunomodulatorios por parte de ambas cepas de bifidobacterias y del acenocumarol, en concordancia con lo observado *in vitro*. La capacidad fagocítica de las células sanguíneas de los ratones tratados disminuyó con la administración de las cepas y del fármaco. Este efecto de disminución de la actividad fagocítica fue mayor en los ratones tratados con la cepa CIDCA 5317, resultado que se correlaciona con lo observado *in vitro*.

Asimismo, el estudio de la expresión de citoquinas en órganos relevantes para la respuesta inmune mostró resultados en concordancia con lo obtenido en los ensayos *in vitro*. Es de destacar que la expresión de IFN- γ generada por ambas cepas en placas de Peyer fue disminuida en presencia del anticoagulante. En bazo, la cepa CIDCA 5317 fue capaz de aumentar la expresión de IL-10, lo cual está de acuerdo con la capacidad de modular la respuesta inflamatoria demostrada por esta cepa, observada a lo largo de todo este trabajo de tesis.

Finalmente, es importante remarcar los resultados obtenidos en referencia al efecto del acenocumarol como anticoagulante en animales a los cuales se les administraron las bifidobacterias. En este contexto experimental, se observó la disminución del tiempo de protrombina en presencia de las bacterias, demostrando por primera vez una interacción entre estas cepas de bifidobacterias y el acenocumarol. Estos resultados plantean la necesidad de profundizar los estudios de los efectos de probióticos en individuos que estén

recibiendo anticoagulantes orales, abriendo un nuevo campo de estudio en el ámbito de los alimentos probióticos.

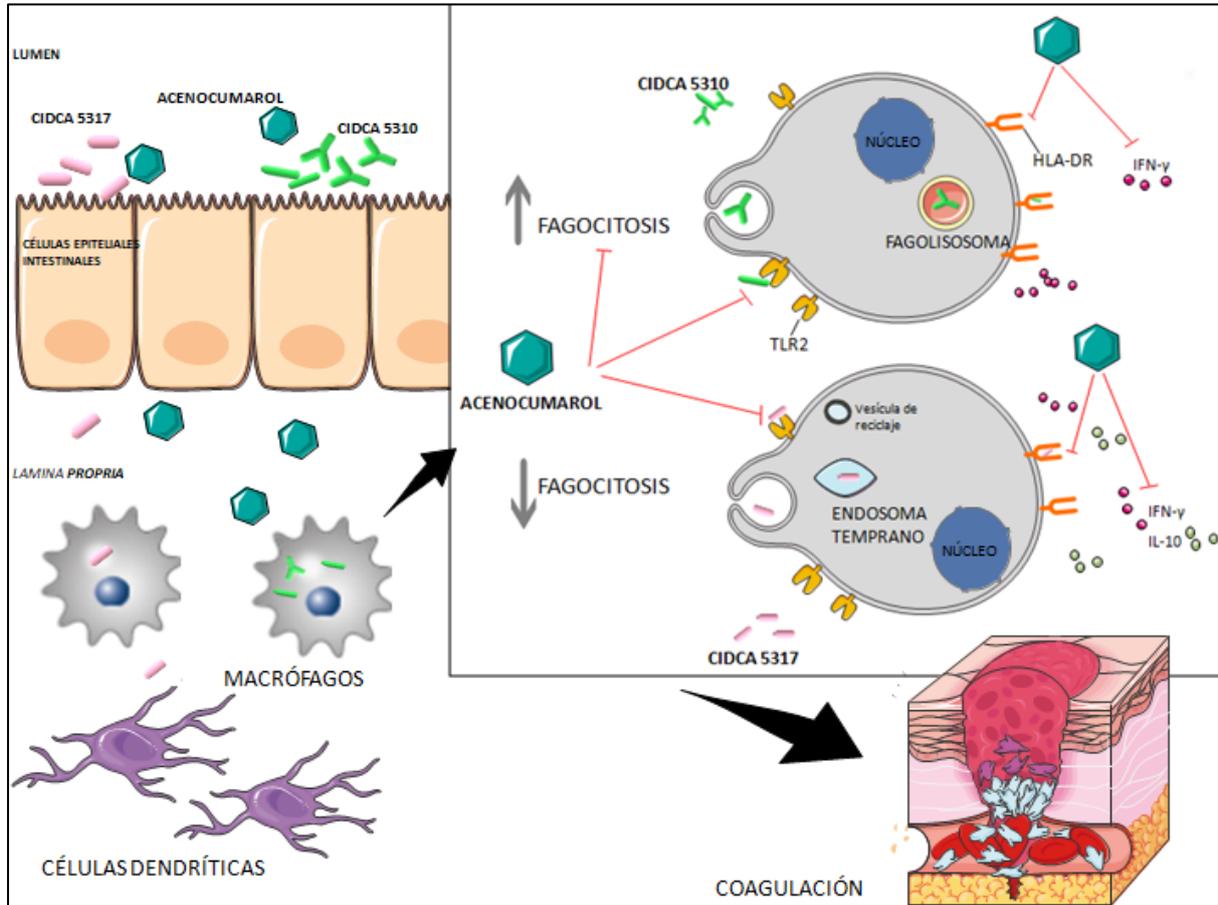
Los estudios realizados en el presente trabajo de tesis contribuyeron al conocimiento de las interacciones entre fármacos, microorganismos probióticos y células del hospedador.

Se remarca la existencia de un efecto inmunomodulador diferencial entre las cepas de bifidobacterias que se ve modificado por la presencia de acenocumarol. A estos hallazgos se suma un aporte altamente relevante en el contexto clínico que es la modificación de la actividad anticoagulante del acenocumarol en presencia de bacterias probióticas.

La complejidad de las interacciones fármaco-probiótico-hospedador, como consecuencia de los múltiples factores involucrados, amplía las perspectivas de estudio, siendo el presente trabajo la primera contribución en esta área.

MODELO DE INTERACCIÓN

A continuación se provee una sinopsis gráfica de los aspectos salientes del presente trabajo:



PERSPECTIVAS

- Caracterizar las moléculas bacterianas implicadas en la interacción bifidobacteria macrófago.
- Evaluar la participación de procesos de macropinocitosis y autofagia.
- Determinar las moléculas y los mecanismos implicados en el efecto inmunomodulador del acenocumarol.
- Caracterizar las vías intracelulares implicadas en los efectos del acenocumarol y las bifidobacterias.
- Caracterizar la respuesta inmune en un modelo de infección *in vivo*, con la administración de acenocumarol y las cepas de bifidobacterias estudiadas.
- Determinar la fagocitosis de las cepas de bifidobacterias opsonizadas en presencia de acenocumarol.



El presente trabajo de tesis buscó profundizar aspectos escasamente estudiados en el contexto de las interacciones entre los alimentos probióticos y el hospedador. Se considera aquí como aspecto novedoso, el efecto del acenocumarol, un anticoagulante oral de amplia aplicación en nuestro país en el marco de la hipótesis de que la presencia del fármaco y los microorganismos probióticos podría dar lugar a efectos relevantes para el individuo que no pueden determinarse mediante estudios de efectos de cada agente por separado.

Los ensayos *in vitro* permitieron demostrar que la presencia del fármaco modula la respuesta celular conduciendo a modificaciones de la internalización de microorganismos y cambios en los mediadores químicos generados por las células. Este escenario complejo dependió del contexto inflamatorio en el que se efectuaron los estímulos.

Los resultados de los ensayos *in vitro* condujeron a la implementación de un modelo murino en el que se evidenció nuevamente el efecto inmunomodulatorio del acenocumarol que modificó la respuesta del hospedador frente a las bacterias, pero ya en un ámbito de interacciones de la complejidad de un modelo mamífero. Como elemento adicional de altísima relevancia, se determinó que la administración de bifidobacterias modifica el efecto del fármaco como anticoagulante.

El presente trabajo abre numerosas perspectivas de estudios para dilucidar los mecanismos involucrados en los evidentes efectos inmunomodulatorios de las bifidobacterias y el acenocumarol.

